

Strukturelle und funktionelle
Charakterisierung des
Parkinson-assoziierten Proteins
DJ-1

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von

Jens Waak

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Mai 2009

Dekan: Prof. Lars Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Philipp Kahle

2. Berichterstatter: Prof. Thilo Stehle

Danksagungen

Die vorliegende Dissertation wurde im Labor für funktionelle Neurogenetik am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung des Universitätsklinikums Tübingen angefertigt. Prof. Philipp Kahle danke ich für die Überlassung dieses sehr spannenden Themas. Ich bin ihm zu besonderem Dank verpflichtet für seine exzellente Betreuung, seinen Einsatz und seine vielen hilfreichen Vorschläge und Diskussionen, die diese Arbeit entscheidend vorangetrieben haben.

Prof. Thilo Stehle danke ich für seine engagierte Fachbetreuung und seine methodische Unterstützung. Dr. Christoph Schall und ihm danke ich für den Zugang und die Unterstützung bei den Gelfiltrationsexperimenten. Insbesondere möchte ich Prof. Stehle für seine Ratschläge bei der Modellierung der [M26I]DJ-1- und [C106DD]DJ-1-Mutanten danken.

Mein besonderer Dank gilt Stephanie Weber für ihre ausgezeichnete technische Assistenz. Ohne ihre Hilfe hätte die Vielzahl von Ergebnissen in dieser Zeit nicht erreicht werden können.

Ich habe das DJ-1-Projekt von Dr. Karin Görner übernommen. Ihre Erfahrung auf diesem Gebiet war eine sehr große Hilfe, besonders in der Einarbeitungsphase. Besonderer Dank gilt ihr auch für die Hilfe mit den quantitativen RT-PCR-Messungen.

Thu-Trang Pham, Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn und Prof. Wolfgang Wurst danke ich für die Zurverfügungstellung der *Dj-1^{-/-}*-Mäuse. Heinrich Schell möchte ich für seine Hilfe bei der Zucht der *Dj-1^{-/-}*-Mäuse danken.

Dr. Wolfdieter Springer und Nicole Springer danke ich für die *C. elegans*-Stämme und ihre Hilfe bei der Planung und Durchführung der Experimente.

Prof. Ingo Autenrieth danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung mit humanpathogenen Bakterien arbeiten zu können. Dr. Monika Schütz war eine sehr große Hilfe

bei der praktischen Durchführung dieser Experimente, wofür ihr großer Dank gebührt.

Dr. Susann Klein war mir eine große Hilfe bei der Etablierung der primären Neurokulturen. Hierfür möchte ich ihr danken.

Dr. Veerle Reumers danke ich für die Bereitstellung der lentiviralen DJ-1-Konstrukte und ihrer Anleitung bei der Etablierung des Transduktionsprotokolls.

Abschließend möchte ich allen Mitgliedern der Abteilung Neurodegeneration des HHH und vor allem den funktionellen Neurogenetikern für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Görner K, Holtorf E, **Waak J**, Pham TT, Vogt-Weisenhorn DM, Wurst W, Haass C und Kahle PJ (2007) Structural determinants of the C-terminal helix-kink-helix motif essential for protein stability and survival promoting activity of DJ-1. *J. Biol. Chem.* 282, 13680 - 13691

Waak J, Weber SS, Waldenmaier A, Görner K, Alunni-Fabbroni M, Schell H, Vogt-Weisenhorn D, Pham TT, Reumers V, Baekelandt V, Wurst W, Kahle P (2009) Regulation of astrocyte inflammatory responses by the Parkinson's Disease-associated gene DJ-1. *FASEB J.* im Druck

Waak J, Weber SS, Görner K, Schall C, Ichijo H, Stehle T und Kahle PJ (2009) Oxidizable residues mediating protein stability and cytoprotective interaction of DJ-1 with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Biol. Chem.* 284, 14245 - 14257

Die Publikationen sind an diese Dissertation angehängt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	15
1 Einleitung	21
1.1 Die Parkinson-Krankheit (PK)	21
1.1.1 Krankheitsbild und Behandlung	21
1.1.2 Neuropathologie	25
1.1.3 Genetische Ursachen der PK	26
1.1.3.1 Autosomal dominante Gene	27
1.1.3.1.1 <i>SNCA</i>	27
1.1.3.1.2 <i>LRRK2</i>	30
1.1.3.1.3 <i>HtrA2/Omi</i>	31
1.1.3.2 Autosomal rezessive Gene	33
1.1.3.2.1 <i>PRKN</i>	33
1.1.3.2.2 <i>UCH-L1</i>	34
1.1.3.2.3 <i>PINK1</i>	34
1.1.3.2.4 <i>DJ-1</i>	35
1.1.4 Mechanismen der Zellschädigung	36
1.1.4.1 Mitochondrien und oxidativer Stress	36
1.1.4.2 Ubiquitin-Proteasom-System	38
1.1.5 Tiermodelle der PK	39
1.1.5.1 <i>C. elegans</i>	41
1.1.5.2 Mausmodelle	42
1.2 <i>DJ-1</i>	43
1.2.1 Expression und zelluläre Lokalisation	43
1.2.2 Struktur	45

1.2.3	Funktion von DJ-1	47
1.2.3.1	Regulation von Signalwegen	48
1.2.3.2	Transkriptionelle Regulation	48
1.2.3.3	Andere Mechanismen	50
1.2.3.4	Aktivierung von DJ-1	50
1.2.4	DJ-1-Mausmodelle	51
1.3	ASK1	52
1.3.1	Struktur von ASK1	52
1.3.2	Regulation von ASK1	53
1.3.3	Funktion von ASK1	54
1.4	Neuroinflammation	55
1.4.1	Neuropathologie	56
1.4.2	Funktion der Astrozyten	56
1.4.2.1	Stickstoffmonoxid und Prostaglandine	57
1.4.2.2	Zytokine	59
1.4.2.3	Wachstumsfaktoren	59
1.4.3	Signalwege	60
1.4.4	Neuroinflammation und PK	62
2	Ziele der Doktorarbeit	63
3	Material und Methoden	65
3.1	Material	65
3.1.1	Geräte	65
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	66
3.1.3	Chemikalien	67
3.1.4	Vektoren	71
3.1.5	Puffer und Lösungen	71
3.2	Molekularbiologische Methoden	78
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	78
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	78
3.2.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	79
3.2.4	DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen	79

3.2.5	Ligation von DNA	79
3.2.6	Transformation elektrokompenter Bakterien	80
3.2.7	Colony-PCR	80
3.2.8	Minipräparation von Plasmiden	81
3.2.9	Sequenzierung	81
3.2.10	Maxipräparation von Plasmiden	82
3.2.11	Anlegen von Glycerolstocks	82
3.2.12	Herstellung elektrokompenter Bakterien	83
3.2.13	Gerichtete Mutagenese	83
3.2.13.1	DJ-1-Mutanten	83
3.2.13.2	ASK-1-Mutanten	85
3.2.14	RNA-Isolation	85
3.2.15	Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR	85
3.2.16	Isolierung genomischer DNA	86
3.2.17	Genotypisierung der <i>Dj-1 knockout</i> -Mäuse	86
3.3	Proteinbiochemische Methoden	88
3.3.1	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	88
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	88
3.3.3	Western Blot	89
3.3.4	Antikörper	90
3.3.5	‘Strippen‘ von Western Blots	92
3.3.6	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	92
3.3.7	Co-Immunpräzipitation	92
3.3.8	Immunkomplexkinaseassay	93
3.3.9	Pulse-Chase	93
3.3.10	Zytotoxizitätsmessung	94
3.3.11	Stickstoffmonoxid-Quantifizierung	94
3.3.12	Interleukin-6-ELISA	95
3.3.13	Untersuchung von <i>C. elegans</i>	95
3.3.14	Immunfluoreszenz	95
3.3.15	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)	96
3.4	Zellkultur	97

3.4.1	Kultivierung von Zellen	97
3.4.2	Primäre Astrozytenkulturen	98
3.4.3	Kortikale Neuronenkulturen	98
3.4.4	Transiente Transfektion	99
3.4.5	Stabil retransfizierte <i>Dj-1</i> ^{-/-} -MEF	99
3.4.6	Lentivirale Transduktion	99
3.4.7	Poly D-Lysin- und Kollagen-beschichtete Deckgläser	100
3.4.8	Zelllyse zur Proteinisolation	100
3.5	Statistische Auswertung	101
4	Ergebnisse	103
4.1	Untersuchung oxidierbarer Reste	103
4.1.1	Strukturelle Untersuchung der oxidierten Reste	103
4.1.2	Funktionelle Untersuchung der oxidierten Reste	108
4.1.2.1	Cysteinmutanten	108
4.1.2.2	Methioninmutanten	113
4.1.2.3	Oxidierbare Reste beeinflussen die Cytoprotektivität von DJ-1	115
4.1.2.4	Funktionelle Charakterisierung von [M26I]DJ-1	116
4.2	ASK-Regulation	119
4.2.1	Kinetik der DJ-1-Bindung	119
4.2.2	DJ-1 bindet an aktiviertes ASK1	119
4.3	Entzündungsregulation von DJ-1	122
4.3.1	Astrozyten-und Neuronenkulturen	122
4.3.2	Regulation proinflammatorischer Marker	124
4.3.2.1	ICAM-1	124
4.3.2.2	NO	125
4.3.2.3	Zytokine	127
4.3.2.4	COX-2	129
4.3.3	iNOS	129
4.3.4	Rettung durch lenti-DJ-1	133
4.3.5	Regulatorischer Mechanismus von DJ-1	133
4.3.5.1	DJ-1 reguliert p38 ^{MAPK}	133

4.3.5.2	p38-Inhibition revidiert den Phänotyp	136
4.3.5.3	Regulation in <i>C. elegans</i>	140
4.3.6	Astrozyten-Neuronen-Kokulturen	141
5	Diskussion	145
5.1	Die oxidierbaren Reste beeinflussen die Stabilität und Funktionalität von DJ-1	145
5.1.1	Cysteinreste	145
5.1.2	M26I	149
5.2	Mechanismus der ASK-Regulation durch DJ-1	152
5.3	Neuroinflammation	154
5.3.1	NO	155
5.3.2	Proinflammatorische Marker	157
5.3.3	Mechanismus	159
5.3.4	Zytotoxische Wirkung	160
5.3.5	<i>C. elegans</i>	162
6	Ausblick	165
7	Zusammenfassung	169
8	Anhang	197
	Vektoren	197
	Akademische Lehrer	200

Abkürzungen

AD	autosomal dominant
APC	primäre Astrozytenkulturen (engl.: <i>Astrocyte Primary Cultures</i>)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AR	autosomal rezessiv
AS	Aminosäure(n)
ASK1	Apoptosesignal-regulierende Kinase 1 (engl.: <i>Apoptosis-signal regulating kinase 1</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
CHIP	Carboxy-terminal Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) interagierendes Protein
CoIP	Co-Immunpräzipitation
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CTP	Cytosintriphosphat
DDC	Dopa-Decarboxylase
ddH ₂ O	entionisiertes Wasser
Del	Deletionen
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungen

DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: <i>Desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure (engl.: <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ETC	Elektronentransportkette (engl.: <i>Electron transport chain</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: <i>Fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fötale Kälberserum (engl.: <i>Fetal calf serum</i>)
GAPDH	G lycerinaldehyd p hosphat d ehydrogenase
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein (engl.: <i>Glial fibrillar acidic protein</i>)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	G uanosin t riphosphat
h	Stunde(n) (lat.: <i>hora</i>)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2- H ydroxyethyl)- 1- p iperazinyl)- e thansulfonsäure
ICAM-1	<i>Intercellular cell adhesion molecule 1</i>
IL	I nterleukin
Ins	I nsertationen
JNK	c- J un N -terminale K inase
ko	<i>knockout</i>
LK	L ewy k örper
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> -Medium
LDH	L actat d ehydrogenase
LPS	L ipopolysaccharide

LRRK2	L eucinreiche R epeat- K inase 2 (eng.: <i>Leucin-rich repeat kinase 2</i>)
LTD	<i>L</i> ong <i>T</i> erm <i>D</i> epression
MAO	M onoaminoxidase
MAPKKK	M itogenaktivierte P roteinkinasekinasekinase
MBP	M yelin b asisches P rotein
MEF	embryonale Mausfibroblasten (engl.: <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
min	M inute(n)
MLS	m itochondriales L okalisationssignal
MPTP	1- M ethyl-4- p henyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Boten-RNA (engl: <i>messenger RNA</i>)
Multi	Genmultiplikationen
NAC	N - A cetylcystein
NF κ B	<i>N</i> uclear <i>f</i> actor κ <i>B</i>
NGF	<i>N</i> erve <i>g</i> rowth <i>f</i> actor
NOS	NO -Synthase
NPC	primäre Neuronenkulturen (engl.: <i>Neuron primary cultures</i>)
Nrf2	<i>n</i> uclear <i>f</i> actor (<i>erythroid-derived 2</i>)- <i>r</i> elated <i>f</i> actor 2
PAGE	P olyacrylamid- G elelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>Polymerase chain reaction</i>)
PET	P ositronenemissionstomographie
PINK1	<i>P</i> TEN- <i>i</i> nduced <i>p</i> utative <i>k</i> inase 1
PK	P arkinson- K rankheit
PM	P unktmutation(en)
PVDF	P olyvinylidenfluorid

RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNA	Ribonucleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
ROCO	ROC-COR
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	R aum t emperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SAP	Krabben Alkalische Phosphatase (engl.: <i>shrimps alkaline phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
sek	S ekunde(n)
SNpc	S ubstantia n igra p ars c ompacta
STN	S ubthalamischer N ucleus
TBE	T ris- B orat- E DTA
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>Tris buffered saline</i>)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
TEMED	T etramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	T ransmembrandomäne
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF-receptor-associated factor</i>
Tris	T ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	T hioredoxin
TTP	T hymidin t riphosphat
UPS	U biquitin- P roteasom- S ystem
Verd	Verdünnung
wt	w ild t yp

Aminosäuren

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

1 Einleitung

1.1 Die Parkinson-Krankheit (PK)

1.1.1 Krankheitsbild und Behandlung

Die Parkinson-Krankheit (PK) ist eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung des Bewegungsapparats. Die Krankheit betrifft mehr als 1 % aller über 65-jährigen Menschen in Industrieländern (de Rijk et al., 2000; Elbaz et al., 2002; Nutt und Wooten, 2005) und ist somit nach der Alzheimer-Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Männer: 2 %, Frauen: 1.3 % der über 65-jährigen) (Weintraub et al., 2008). Das Krankheitsbild der PK wurde erstmals vom britischen Arzt James Parkinson (1755-1824) in seiner 1817 erschienenen Arbeit ‘An Essay on the Shaking Palsy‘ (Abhandlung über die Schüttellähmung) beschrieben (Abbildung 1.1). Hierin beschreibt er die Symptome der später nach ihm benannten Krankheit anhand von vier Patienten. Er selber hat den Begriff ‘Schüttellähmung‘ für die Krankheit verwendet, da viele Patienten einen auffälligen Ruhetremor haben. Der Begriff ‘Parkinson-Krankheit‘ wurde erst lange nach seinem Tod für das von ihm beschriebene Krankheitsbild eingeführt.

Die klinischen Kardinalsymptome der Parkinson-Krankheit sind Rigor (Muskelsteifheit), Bradykinese/Akinese (langsame/fehlende Bewegung), Tremor (unwillkürliches, regelmäßiges Zittern einer Extremität, des Kopfes oder des ganzen Körpers) und Haltungsinstabilität (Gang- und Gleichgewichtsstörungen). Diese Krankheitssymptome wurden erstmals ausführlich vom französischen Psychiater Jean-Martin Charcot (1825-1893) beschrieben (Savitt et al., 2006; Jankovic, 2008). Zusätzlich wurden in den letzten Jahren Symptome erkannt, die sich nicht auf den Bewegungsapparat auswirken. Hierzu gehören Störungen des Geruchssinns, Depression, Demenz und Psychosen (Weintraub et al., 2008). Die motorischen Symptome werden durch das Absterben dopaminerger

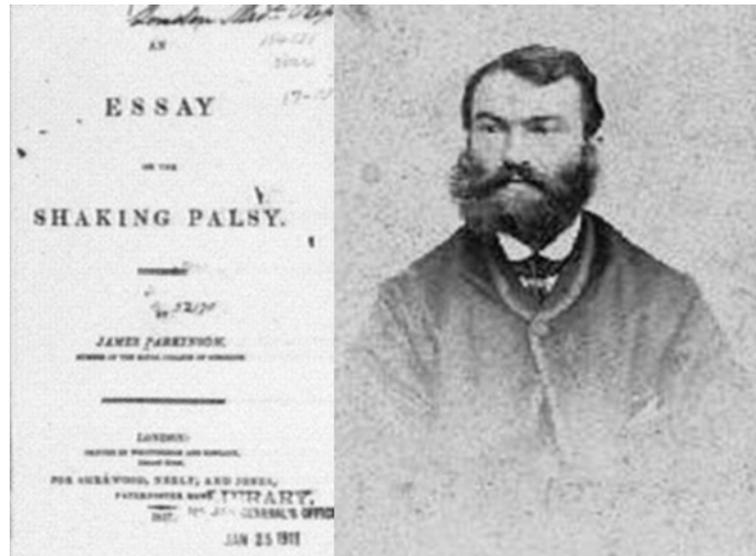


Abbildung 1.1 – Erste Beschreibung der Parkinson-Krankheit durch James Parkinson

Bild rechts: James Parkinson (1755-1824) (Quelle: www.parkinsonsinjury.info)

Bild links: Der Einband seiner 1817 erschienen Arbeit 'An Essay on the Shaking Palsy' (Quelle: National Library of Medicine, <http://www.nlm.nih.gov>)

Neuronen und damit einhergehendem Dopamindefizit im Striatum und in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) (Ehringer und Hornykiewicz, 1960; Poirier und Sourkes, 1965) ausgelöst. Dies nutzt man zur Frühdiagnose der PK aus. Den Patienten wird [^{18}F]Dopa gespritzt und die Lokalisation im Gehirn durch Positronenemissionstomographie (PET) untersucht (Chung et al., 2003). In Bereichen, in denen weniger dopaminerge Neurone vorhanden sind, wird weniger [^{18}F]Dopa aufgenommen.

Die Parkinson-Krankheit wird in drei große Gruppen eingeteilt: die sporadische (ideopathische) PK, die familiäre PK und die sekundäre PK. Die ideopathische PK macht etwa 80 % aller Fälle aus. Die Ursache ist in diesen Fällen meist unbekannt. Als größter Risikofaktor gilt das Alter, zusätzlich werden aber auch Umwelteinflüsse, Umweltgifte und genetische Faktoren verantwortlich gemacht (McNaught et al., 2006; Olanow, 2007). Der Krankheitsbeginn liegt bei diesen Patienten meist in den frühen 60ern (Weintraub et al., 2008). Die Fälle familiärer PK machen ungefähr 10 % aller Parkinsonpatienten aus. Hier hat die Krankheit immer genetische Ursachen. Auf die familiäre PK wird ausführlich in Kapitel 1.1.3 eingegangen. Die sekundären Parkinson-Erkrankungen werden durch Gifte, Medikamente, Tumore, Traumata, Durchblutungs-

störungen oder Infektionen ausgelöst (Dauer und Przedborski, 2003). Das bekannteste Toxin ist MPTP, welches als Verunreinigung in einer heroинartigen Designerdroge vorkommt und Parkinsonsymptome auslöst (Langston et al., 1983).

Die Symptome der PK entwickeln sich langsam. Die ersten motorischen Störungen sind Ruhetremor in einer Körperhälfte und eine Verlangsamung der Bewegungen. Bereits früher sind jedoch eine Beeinträchtigung des Geruchssinns und oftmals Depressionen diagnostizierbar. Klinisch definiert wird die PK, wenn die oben genannten Kardinalsymptome vorliegen und ein Verlust dopaminerger Neurone vorliegt. Eine endgültige Diagnose ist aber nur *post mortem* durch neuropathologische Untersuchungen möglich (Irvine et al. (2008), Kap. 1.1.2).

Die PK ist bis heute unheilbar. Die Behandlung beschränkt sich auf die Linderung der Symptome und erfolgt in den meisten Fällen durch eine Dopaminersatztherapie (Abbildung 1.2). Hierbei werden die Patienten mit der Dopaminvorstufe L-Dopa behandelt, welche im Gegensatz zu Dopamin die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und im Gehirn zu Dopamin umgesetzt wird. Um die Bioverfügbarkeit des Dopamins zu erhöhen, werden zusätzliche Medikamente eingesetzt. Hierzu zählen periphere Dopam-Decarboxylasehemmer, Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-Inhibitoren und Monoaminoxidase (MAO)-Inhibitoren (Youdim et al., 2006). Diese Medikamentengruppen sollen den Abbau von Dopamin verlangsamen.

Bei medikamentös schlecht zu behandelnden Patienten gibt es zusätzlich die Möglichkeit der Tiefenhirnstimulation. Hierbei wird eine Elektrode in den Globus pallidus, Subthalamischen Nucleus (STN) oder den ventralen mittleren Thalamus eingeführt (Abbildung 1.3) und mit einem Schrittmacher verbunden, der unter die Haut implantiert wird. Die Elektroden stimulieren eine Ausschüttung von Neurotransmittern und sorgen dadurch für eine konstante Dopaminausschüttung (Sydow, 2008).

Zusammenfassend handelt es sich bei der PK um eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die sich klinisch vor allem durch motorische Störungen manifestiert und neuropathologisch durch das Absterben dopaminerger Neurone in der SNpc begründet ist. Es ist bisher nur eine symptomatische, aber noch keine kausale Behandlung möglich.

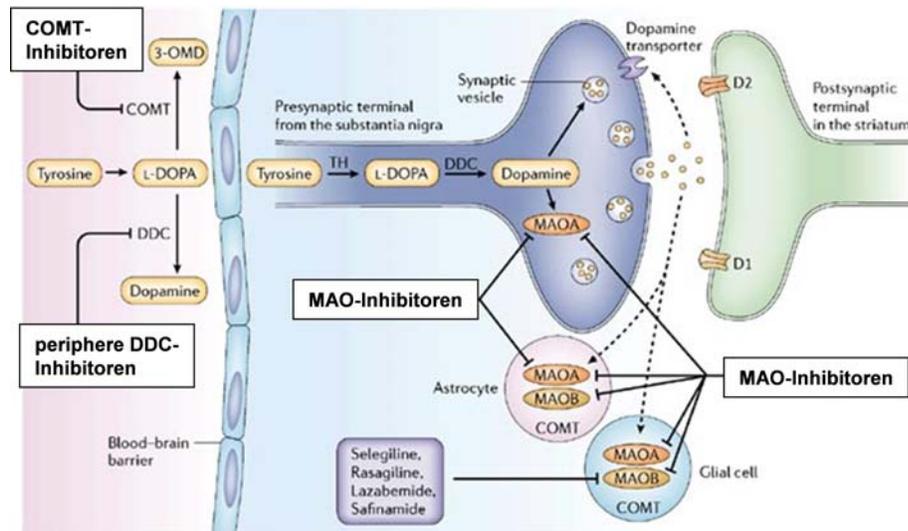


Abbildung 1.2 – Stoffwechsel von L-Dopa und Dopamin

L-Dopa wird durch die Dopacarbonylase (DDC) zu Dopamin umgesetzt. Dieses wird durch Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und Monoaminoxidase (MAO) abgebaut. Eingezeichnet sind die Angriffspunkte der Dopaminersatztherapie (Abbildung verändert nach Youdim et al. (2006))

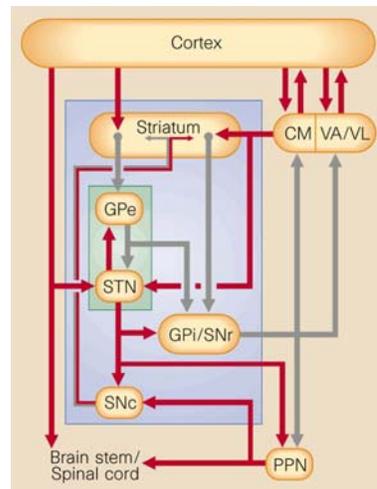


Abbildung 1.3 – Verschaltungsschema der Basalganglien

Die Basalganglien bestehen aus dem Striatum (STN), dem Globus Pallidus (GP), der Substantia nigra (SN) und dem subthalamischen Nucleus (STN). Abbildung aus Wichmann und DeLong (1999).

1.1.2 Neuropathologie

Neuropathologisch ist die PK durch den Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) und im Striatum charakterisiert (Dawson und Dawson, 2003). Die Nervenbahnen von der SNpc zum Putamen sind stark gestört und die Nervenendungen degenerieren im Laufe der Zeit immer weiter (Abbildung 1.4, Dauer und Przedborski (2003)). Die mesolimbischen dopaminergen Neurone, welche sich gegenüber der SNpc im ventralen tegmental Areal befinden, sind weniger von dem Verlust der Neurone betroffen (Uhl et al., 1985). Da dopaminerge Neurone durch Neuromelanin dunkel gefärbt sind, führt der Verlust der Neurone zur charakteristischen Depigmentierung der SNpc (Marsden, 1983). Bemerkenswerterweise sind beim Auftreten der ersten Parkinsonsymptome bereits 70 % aller dopaminergen Neuronen abgestorben. Diese lange symptomfreie Zeit ist nur durch eine beeindruckende kompensatorische Leistung des Gehirns möglich (Wakabayashi et al., 2007).

Das zweite pathologische Kardinalsymptom ist das Auftreten von Lewykörpern (LK)

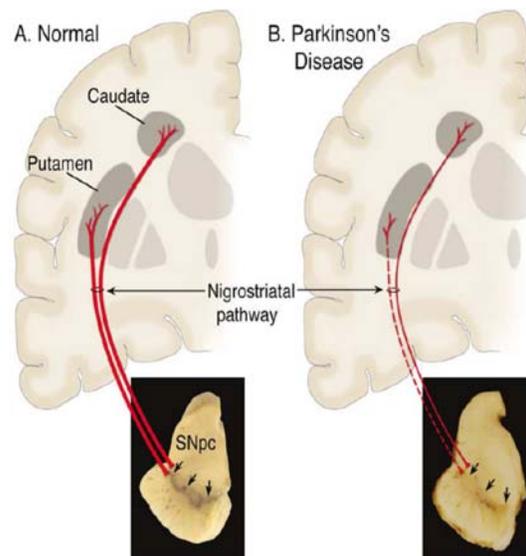


Abbildung 1.4 – Degeneration des nigrostriatalen Wegs bei der PK

Schematische Darstellung des nigrostriatalen Wegs (in rot) im gesunden (**A**) und PK-Hirn (**B**). Die Zellkörper der dopaminergen Neurone liegen in der Substantia nigra und projizieren ins Putamen und den Nucleus caudatus. Im PK-Hirn sind vor allem Neurone, die ins Putamen projizieren, betroffen (Abbildung aus Dauer und Przedborski (2003))

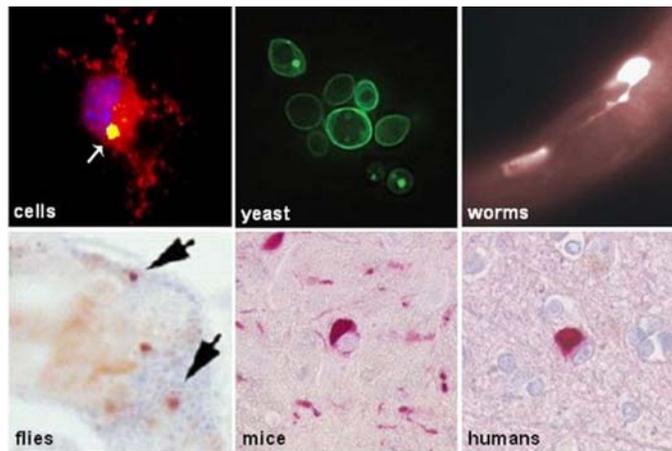


Abbildung 1.5 – Aggregation/Lewy-Körper-Bildung von α -Synuclein

Überexpression von α -Synuclein in Zellkultur, Hefen, dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und in Mäusen führt zur Bildung von Aggregaten. Bei PK-Patienten finden sich die LK. Die Abbildung wurde freundlicherweise von P. Kahle zur Verfügung gestellt.

und Lewyneuriten in überlebenden Neuronen (Abbildung 1.5). Hierbei handelt es sich um intraneuronale zytoplasmatische eosinophile Einschlüsse (Forno, 1996). Sie haben einen Durchmesser von ca. $15 \mu\text{m}$ und besitzen einen dichten Kern, dessen Hauptkomponente fibrilläres α -Synuclein ist (Spillantini et al., 1998). Zusätzlich wurden bis heute über 70 Proteine als Komponenten der LK identifiziert. Diese üben so unterschiedliche zelluläre Funktionen aus wie Strukturproteine, Zellzykluskontrolle und Signaltransduktion (Wakabayashi et al., 2007). LK entwickeln sich langsam im Krankheitsverlauf. Braak et al. (2003) haben die Verbreitung der LK in verschiedenen Stufen der PK untersucht und ein 6-Stufen-Modell entwickelt. In diesem beginnt die Bildung der LK in der Medulla oblongata und breitet sich über das Mittelhirn zum Neocortex aus. Wie die LK mit der Neurodegeneration zusammenhängen, ist bisher jedoch nicht verstanden (siehe Kapitel 1.1.3.1.1).

1.1.3 Genetische Ursachen der PK

Bis vor etwa zehn Jahren glaubte man, dass die PK nur durch Umwelteinflüsse ausgelöst würde und keine genetische Ursachen habe (Pankratz und Foroud, 2007). Es

ist zwar seit über 100 Jahren bekannt, dass es Familien mit einer auffälligen Häufung von Parkinsonerkrankungen gibt und diese oft nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden (Moore et al., 2005), doch erst durch die Entdeckung einer Mutation im Gen, welches das Protein α -Synuclein kodiert (Polymeropoulos et al., 1997), wurde die Suche nach genetischen Ursachen der PK angestoßen. Bis heute wurden Mutationen in sieben Genen in Parkinsonpatienten gefunden und fünf weitere Loci mit der PK assoziiert (Galter, 2008). Die Loci und identifizierten Gene sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. Sowohl die Vererbung als auch die Ausprägung der Krankheit unterscheiden sich zwischen den einzelnen Genen. Die PK, die mit α -Synuclein und LRRK2 assoziiert ist, wird autosomal-dominant vererbt, während die PK, die mit DJ-1, Parkin und PINK1 assoziiert ist, rezessiv vererbt wird (Gasser, 2007). Auch der Krankheitsbeginn und die Pathologie unterscheiden sich teilweise sehr stark. Im folgenden sollen die Gene einzeln vorgestellt werden.

1.1.3.1 Autosomal dominante Gene

1.1.3.1.1 *SNCA*

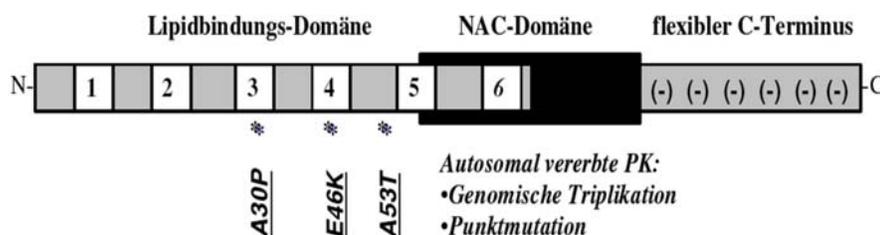


Abbildung 1.6 – Struktur von α -Synuclein

Die einzelnen Domänen von α -Synuclein sind hervorgehoben: Die N-terminale Lipidbindungsdomäne mit 6 imperfekten Wiederholungen der Aminosäuren: KT-KEGV, die NAC-Domäne und der flexible azide C-Terminus. Sterne markieren Punktmutationen, die mit der PK assoziiert sind: A30P, E46K und A53T (Abbildung aus Kahle et al. (2002)).

SNCA war das erste Gen, welches mit der PK assoziiert wurde. Polymeropoulos et al. (1997) entdeckten eine Punktmutation in einer Familie mit autosomal-dominant vererbter PK, welche zu einem Alanin zu Threonin-Austausch an Position 53 führt. Später wurden noch zwei weitere Mutationen entdeckt, die zum Austausch einzelner Amino-

Locus	Gen	Protein	Vererbung	Mutationen	Referenzen
PARK1/4	<i>SNCA</i>	α -Synuclein	AD M	PM Multi	Polymeropoulos et al. (1997) Singleton et al. (2003)
PARK2	<i>PRKN</i>	Parkin	AR, M	PM, Del, Ins	Kitada et al. (1998)
PARK3	<i>SPR</i> (?)	Sepiapterin-reductase(?)	AD	?	Sharma et al. (2006)
PARK5	<i>UCH-L1</i>	Ubiquitin C-term. Hydrolase L1	AD	PM	Leroy et al. (1998)
PARK6	<i>PINK1</i>	PTEN-Induced Putative Kinase 1	AR, M	PM, Del, Ins	Valente et al. (2004)
PARK7	<i>DJ-1</i>	DJ-1	AR, M	PM, Del	Bonifati et al. (2003)
PARK8	<i>LRRK2</i>	Leucin-Rich Repeat Kinase 2	AD, M	PM	Zimprich et al. (2004)
PARK10	?	?	assoziiert	-	Hicks et al. (2002)
PARK11	<i>GIGYF2</i> (?)	Grb10-Interacting GYF Protein 2 (?)	assoziiert	PM	Lautier et al. (2008)
PARK13	<i>HtrA2</i>	HtrA2/Omi	assoziiert	PM	Strauss et al. (2005)

Tabelle 1.1 – Loci und Gene, die mit der PK assoziiert sind

Tabelle der Loci, die mit der PK assoziiert sind, sowie die zugehörigen Gene und Proteine. Vererbung: autosomal dominant (AD), autosomal rezessiv (AR); Mendel'scher Erbgang (M). Mutationen: Punktmutationen (PM), Genmultiplikationen (Multi), Insertionen (Ins), Deletionen (Del).

säuren führen: A30P (Krüger et al., 1998) und E46K (Zarranz et al., 2004). Singleton et al. (2003) haben entdeckt, dass nicht nur Punktmutationen, sondern auch Multiplikationen des Gens die PK auslösen.

SNCA kodiert für α -Synuclein, ein 14.5 kDa großes Protein (Abbildung 1.6). Es gehört zur Synuclein-Familie, zu der auch noch β - und γ -Synuclein gehören. Die Funktion von α -Synuclein ist weitgehend unbekannt. Hinweise sind aus seiner Lokalisation in Neuronen erhältlich. Es bindet an synaptische Membranen und interagiert mit synaptischen Vesikeln. Es wird deshalb angenommen, dass α -Synuclein eine regulatorische Rolle bei der Neurotransmitterausschüttung hat (Abeliovich und Beal, 2006).

α -Synuclein ist nativ ungefaltet, besitzt eine N-terminale Lipidbindungsdomäne (60 Aminosäuren (AS)), eine ungefaltete azide C-terminale Domäne (40 AS) und eine hydrophobe NAC-Domäne (*non-amyloid component of Alzheimer's disease plaques*) (40 AS). α -Synuclein liegt in der Zelle im Gleichgewicht zwischen einer gefalteten, membrangebundenen und einer löslichen, ungefalteten Form vor. Diese lösliche Form kann unter Ausbildung von Oligomeren und Protofibrillen aggregieren. Als Initiator wird hierbei die NAC-Domäne gesehen (Bodles und Irvine, 2004). Diese können sich schließlich zu unlöslichen Proteineinschlüssen zusammenlagern, den charakteristischen LK (Abb. 1.5). Die Aggregation wird durch die PK-assoziierten Mutanten und durch eine Konzentrationserhöhung durch Genmultiplikationen verstärkt. Die starke Krankheitsassoziation der Phosphorylierung an Serin-129 führte zu der Hypothese, dass dies ein Auslöser oder Verstärker der Aggregation wäre, da in Lewy-Körpern das meiste α -Synuclein phosphoryliert ist (Fujiwara et al., 2002; Anderson et al., 2006). Mittlerweile wird auch diskutiert, ob die Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Aggregation hat oder sogar ein vergeblicher Versuch der Antiaggregation ist (da Silveira et al., 2008; Gorbatyuk et al., 2008). Es besteht weitgehend Einigkeit, dass der Fibrillogeneseprozess am Absterben der dopaminergen Neurone beteiligt ist. Es ist jedoch nicht klar, ob die Lewykörper oder die oligomeren Formen die zytotoxische Spezies sind und warum die Toxizität auf dopaminerge Neurone beschränkt ist. In vitro hergestellte Protofibrillen können ringförmige Strukturen bilden, die porenartige Eigenschaften haben und die Membranen von Vesikeln permeabilisieren (Volles und Lansbury, 2003).

In den letzten Jahren verstärken sich die Hinweise, dass α -Synuclein Neuroinflammation auslösen kann. Exogen appliziertes α -Synuclein kann sowohl Mikroglia (Zhang

et al., 2005) als auch Astrozyten (Klegeris et al., 2006) aktivieren. Die physiologische Relevanz ist jedoch unklar, da das Vorhandensein von extrazellulärem α -Synuclein kontrovers diskutiert wird. In einer aktuellen Publikation haben Gao et al. (2008) gezeigt, dass LPS-vermittelte Neuroinflammation auf einem α -Synuclein-Überexpressionshintergrund die Neurodegeneration *in vivo* verstärkt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass α -Synuclein normalerweise in der Regulation von synaptischen Vesikeln eine Rolle spielt und Hauptbestandteil der LK ist. α -Synuclein neigt zu Aggregation und Fibrillenbildung, was durch PK-assoziierte Mutanten verstärkt wird. Außerdem scheint α -Synuclein ein inflammatorischer Stressor zu sein.

1.1.3.1.2 *LRRK2*

LRRK2 wurde 2004 als Gen des PARK8-Locus identifiziert (Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004). Mutationen im Gen *LRRK2* sind die häufigste Ursache für autosomal-dominante PK. Bis heute wurden 30 Mutationen gefunden, von denen 7 erwiesenermaßen pathogen sind (Healy et al., 2008). Mutationen in *LRRK2* sind auch ein wichtiger genetischer Risikofaktor für sporadische PK, da ungefähr 1 % aller sporadischen PK-Patienten Mutationen in *LRRK2* aufweisen (Latourelle et al., 2008). Das klinische Bild von Mutationsträgern unterscheidet sich nicht von der idiopathischen PK. Neuropathologisch sind die Befunde jedoch recht unterschiedlich und umfassen LK, Tauopathien oder aber die vollständige Abwesenheit von Proteineinschlüssen (Wszolek et al., 2004; Zimprich et al., 2004).

Strukturell gehört das Protein *LRRK2* zur Klasse der sogenannten ROCO-Kinasen (Abbildung 1.7). Deren namensgebende Domänensignatur ist eine Anordnung aus einer GTPase-Domäne *Ras-of-complex* (Roc) unmittelbar gefolgt von einer *C-terminal of Roc* (COR)-Domäne. Darüberhinaus enthält *LRRK2* mehrere vorausgesagte Proteinbindungsdomänen (ARM, ANK, LRR, WD40) und die Kinasedomäne (Mata et al., 2006). Die Kinasedomäne von *LRRK2* besitzt Sequenzhomologie zum MLK-Typ der MAPKKK-Kinasen. *LRRK2* liegt in seiner aktiven Form als Dimer vor (Greggio et al., 2008). *LRRK2* hat eine schwache Autophosphorylierungsaktivität und eine stärkere Kinaseaktivität gegenüber Substraten (Anand et al., 2009). Interessanterweise wird

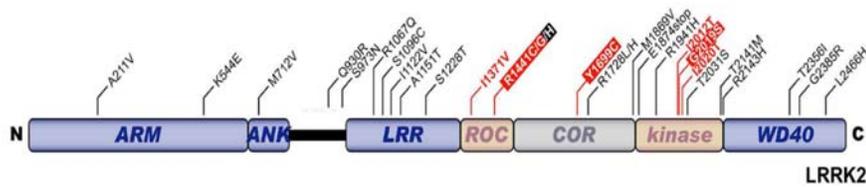


Abbildung 1.7 – Struktur von LRRK2 und Lokalisation wichtiger Punktmutationen

Dargestellt ist die Domänenstruktur von LRRK2: Armadillo (ARM)- und Ankyrin (ANK)-Repeats, *Leucin-rich Repeat* (LRR), *Ras-of-complex* (ROC), *C-terminal of ROC* (COR), Kinasedomäne und die WD40-Domäne. Die Abbildung wurde freundlicherweise von C. Klein zur Verfügung gestellt.

diese von vielen Mutationen verändert, allerdings verstärken einige die Aktivität, während andere sie abschwächen. Es ist jedoch unbekannt, ob LRRK2 tatsächlich in einen Signalweg eingebunden ist und wenn ja, in welchen (Mata et al., 2006).

Auch der pathologische Mechanismus, der zur PK führt, ist unklar. Es gibt Hinweise, nach denen Mutationen in LRRK2 zu einer Rückbildung von Neuriten führt. Da zusätzlich Strukturproteine als Substrate für LRRK2 identifiziert wurden, wäre es möglich, dass LRRK2 am Umbau des Zytoskeletts während der Ausbildung von Neuriten beteiligt ist (MacLeod et al., 2006).

Nach den bisherigen Erkenntnissen ist LRRK2 ein Protein mit robuster Kinaseaktivität, dessen physiologische Funktion eventuell mit Neuritenwachstum zusammenhängen könnte.

1.1.3.1.3 *HtrA2/Omi*

Strauss et al. (2005) haben eine Punktmutation (S399S) und einen Polymorphismus (A141S) im Gen *HtrA2/Omi* mit Parkinson assoziiert. Da die Patienten heterozygote Allelträger sind, wird auf eine autosomal dominante Vererbung geschlossen. Die Patienten zeigen ein Krankheitsbild, welches von idiopathischer PK nicht unterscheidbar ist. Zusätzlich zu der ursprünglich gefundenen Punktmutation wurde aktuell noch eine zweite (R404W) entdeckt, die ebenfalls in der PDZ-Domäne lokalisiert ist (Bogaerts et al., 2008).

Das *HtrA2*-Gen kodiert ein mitochondriales Protein, welches zur HtrA-Familie der Se-



Abbildung 1.8 – Struktur von HtrA2/Omi und Lokalisation der bekannten Punktmutationen

Domänenstruktur von HtrA2/Omi. Eingezeichnet ist das mitochondriale Lokalisationssignal (MLS), das Transmembransegment (TM), die Serinproteasedomäne und die PDZ-Domäne (Abbildung verändert nach Walle et al. (2008)).

rinproteasen gehört. Es besteht aus einer trypsinähnlichen Proteasedomäne und einer PDZ-Domäne, welche für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist (Abbildung 1.8). HtrA2/Omi ist im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert (Hegde et al., 2002; Martins et al., 2002). HtrA2 werden sehr gegensätzliche Funktionen zugesprochen. In apoptotischen Zellen wirkt HtrA2 als Effektorprotease. Durch proapoptotische Stimuli wird die aktive Protease ins Zytosol transloziert, wo sie zu caspaseabhängiger und -unabhängiger Apoptose beiträgt (Walle et al., 2008). Die normale Funktion in Mitochondrien ist dagegen unbekannt. Interessanterweise haben *HtrA2*^{-/-}-Mäuse einen neurodegenerativen Phänotyp, der innerhalb von 30 Tagen zum Tod führt (Walle et al., 2008). Normalerweise würde man vom *knockout* eines proapoptotischen Proteins einen protektiven Effekt erwarten. Es ist deshalb anzunehmen, dass HtrA2 noch eine weitere, protektive Funktion hat. Diese könnte über die Phosphorylierung durch PINK1 reguliert werden (Plun-Favreau et al., 2007). Hierdurch ergibt sich eine Verknüpfung mit dem rezessiven Parkinsongen PINK1.

Das mitochondriale Protein HtrA2/Omi verknüpft die familiäre PK mit mitochondrialen Ursachen, auch wenn bisher unbekannt ist, ob die PK durch eine Abschwächung einer hypothetischen protektiven Funktion oder einer Verstärkung der proapoptotischen Funktion ausgelöst wird.

1.1.3.2 Autosomal rezessive Gene

1.1.3.2.1 *PRKN*

Kitada et al. (1998) identifizierten das erste rezessive Parkinsongen *PRKN*. Patienten mit einer der zahlreichen Parkinmutationen, die mit der PK assoziiert sind, sind beim Auftreten der Krankheit oft sehr jung. Parkinmutationen sind weitaus die häufigsten Ursachen für familiären Parkinson (ca. 50%) (Lücking et al., 2000). Bis heute wurden über 100 Mutationen im *PRKN*-Gen gefunden (Pankratz und Foroud, 2007).

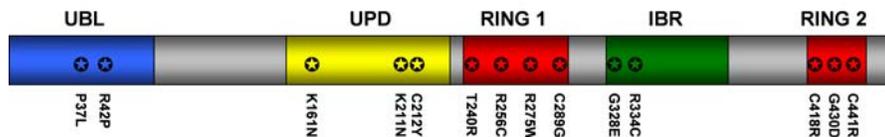


Abbildung 1.9 – Struktur von Parkin und Lokalisation wichtiger Mutationen

Die Domänenstruktur von Parkin besteht aus der Ubiquitin-ähnlichen Domäne (UBL), welche das 26S-Proteasom bindet, der *Unique Parkin Domain* (UPD) und der RING-IBR-RING-Ligasedomäne. Eingezeichnet sind wichtige PK-assoziierte Mutationen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von W. Springer zur Verfügung gestellt.

Parkin, das Produkt des *PRKN*-Gens, ist eine E3-Protein-Ubiquitin-Ligase (Shimura et al., 2000). Charakteristisches Merkmal der Parkin-Struktur sind die beiden RING (*Really Interesting New Gene*)-Domänen, welche Parkin der RING-Klasse der E3-Ligasen zuordnen (Abbildung 1.9). Es wird vermutet, dass Parkin am proteasomalen Abbau von fehlgefalteten und beschädigten Proteinen beteiligt ist (Pankratz und Foroud, 2007). Man kennt einige mögliche Substrate, die von Parkin erkannt und dann abgebaut werden, darunter synaptische Proteine wie z.B. Synaptotagmin XI (Huynh et al., 2003) und CDCrel1 (Zhang et al., 2000), was dafür sprechen würde, dass Parkin eine synaptische Funktion besitzen könnte. Die nahe liegende Vermutung, dass Parkin auch α -Synuclein dem Proteasom zuführt (Shimura et al., 2001), konnte nicht bestätigt werden. Die Verbindung zu α -Synuclein erfolgt aber über sein Bindungsprotein Synphilin, welches ein Substrat von Parkin ist (Chung et al., 2001). Parkin bindet an das Carboxy-terminal Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) interagierende Protein (CHIP). Deshalb herrscht die verbreitete Meinung, dass Parkin Teil eines komplexen Netzwerks

ist, welches Proteinabbau kontrolliert (Imai et al., 2002). CHIP interagiert mit Hsp70 und ist Teil einer Maschinerie, welche fehlgefaltete Proteine entweder zurückfaltet oder ins Zytosol transportiert, wo sie dann abgebaut werden (Dauer und Przedborski, 2003). Der genaue Mechanismus, der zum Absterben dopaminergener Neurone in Mutationsträgern führt, ist unklar. Da viele Mutationen die E3-Ligase-Aktivität von Parkin beeinflussen, ist anzunehmen, dass ein verminderter proteasomaler Abbau von Proteinen eine Ursache ist (Pankratz und Foroud, 2007). Erstaunlicherweise fand man weder in *Prkn*^{-/-}-Mäusen noch in Fliegen typische Parkinsonphänotypen, sondern mitochondriale Störungen. Diese waren auf Defizite im mitochondrialen Atmungssystem zurückzuführen und gingen einher mit der Apoptose der Flugmuskulatur in Fliegen (Greene et al., 2003; Palacino et al., 2004).

1.1.3.2.2 *UCH-L1*

UCH-L1 ist ein Enzym, welches die Hydrolyse C-terminaler Ubiquitylester katalysiert. Es scheint also auch eine Rolle beim proteasomalen Abbau zu spielen, indem es die Ubiquitinmoleküle wieder verwendbar macht, die an Proteine gekettet sind und vor dem proteasomalen Abbau entfernt werden (Liu et al., 2002). Es gibt eine I93M Mutante im *UCH-L1* Gen, welche in einer Familie mit vererbtem Parkinson gefunden wurde und einen Polymorphismus S18Y, der eine protektive Rolle einnimmt und vor der PK schützt (Healy et al., 2004). Die pathogene Mutante I93M besitzt eine verminderte Hydrolaseaktivität und stützt damit die Vermutung, dass ein nicht intaktes proteasomales System für die PK kritisch ist (Dauer und Przedborski, 2003).

1.1.3.2.3 *PINK1*

PINK1 ist das Gen des PARK6-Locus (Valente et al., 2004). Bis heute wurden 15 Mutationen mit autosomal-rezessiver PK assoziiert (Mills et al., 2008).

PINK1 ist eine mitochondriale Serin/Threonin-Kinase. Strukturell ist sie mit den Ca²⁺/Calmodulin-Kinasen verwandt (Abbildung 1.10). Viele der bekannten Mutationen verringern die Kinaseaktivität (Mills et al., 2008). Über die Funktion ist kaum etwas bekannt. Es wurde berichtet, dass *PINK1* HtrA2/Omi phosphoryliert und dadurch die Proteaseaktivität reguliert (Plun-Favreau et al., 2007). Dies bildet eine Verbindung

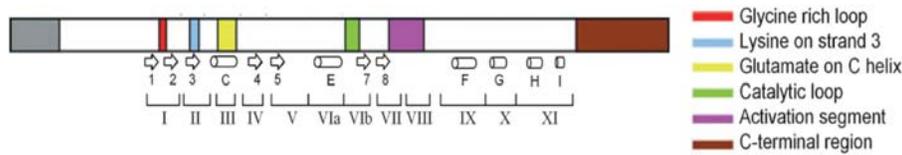


Abbildung 1.10 – Struktur von PINK1

Die Abbildung zeigt die vorhergesagte Domänenstruktur von PINK1 (Abbildung verändert nach Mills et al. (2008)).

zu diesem dominanten Parkinsongen. Überexpression von PINK1 schützt Zellen vor oxidativem Stress und Proteasominhibitoren. *Pink1 knockout* führt zu mitochondrialen Schäden, die dem *Prkn knockout* ähneln (Mills et al., 2008). Interessanterweise kann Parkin-Überexpression den Phänotyp des *Pink1 knockout* in Drosophila und HeLa-Zellen aufheben, während PINK1 keinen Schutz vor *Prkn knockout* bietet (Clark et al., 2006; Park et al., 2006; Exner et al., 2007). Es ist deshalb anzunehmen, dass PINK1 in einem Signalweg oberhalb von Parkin wirkt.

1.1.3.2.4 DJ-1

DJ-1 wurde von Bonifati et al. (2003) als das Gen des PARK7-Locus identifiziert. Mutationen in DJ-1 sind die Ursache für autosomal rezessive PK. Die Patienten sind meist recht jung und haben einen milden Krankheitsverlauf. Dem Protein DJ-1 wurden verschiedene Funktionen zugesprochen. Die wichtigste ist der Schutz der Zelle vor oxidativem Stress. Da der Schwerpunkt dieser Doktorarbeit auf der Untersuchung von DJ-1 liegt, wird es ausführlich in Kapitel 1.2 vorgestellt.

Die Gene, die mit der familiären PK assoziiert sind, kodieren Proteine unterschiedlichster Funktion. Trotz dieser funktionellen Diversität lassen sie sich doch in drei Gruppen unterteilen: Ein Teil der Proteine hat mitochondriale Funktionen oder schützt vor oxidativem Stress (HtrA2/Omi, PINK1, DJ-1), ein anderer Teil hängt mit dem Ubiquitin-Proteasom-System zusammen (Parkin, UCH-L1), während eine dritte Gruppe vermutlich Einfluss auf neuronale Funktionen bzw Morphologie hat (α -Synuclein, LRRK2). Diese Gruppen fügen sich gut in die allgemeinen Mechanismen der Zellschädigung bei der PK ein, die im nächsten Kapitel betrachtet werden.

1.1.4 Mechanismen der Zellschädigung

1.1.4.1 Mitochondrien und oxidativer Stress

Ein biochemisches Kardinalsymptom der PK ist ein erhöhter oxidativer Stress. Hierfür gibt es drei Hauptursachen. Die wichtigste Ursache sind mitochondriale Schädigungen und damit einhergehende Fehlfunktionen. Des Weiteren sind neuroinflammatorische Prozesse und der Dopaminstoffwechsel für die verstärkte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich (Jenner, 2003).

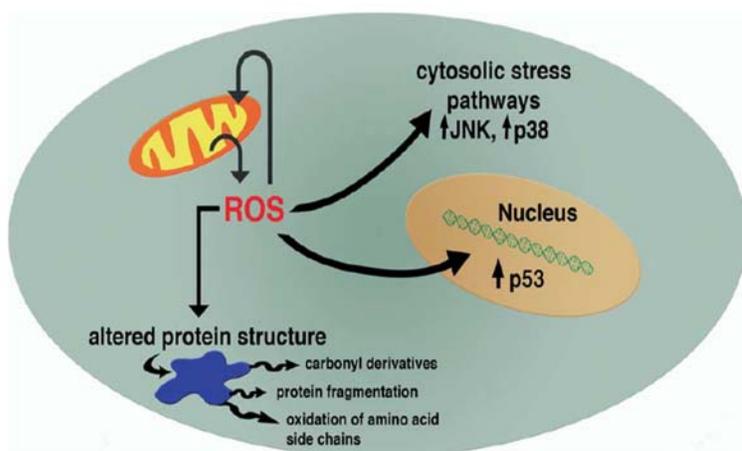


Abbildung 1.11 – Modell der ROS-bedingten Schädigung von dopaminergen Neuronen (aus Balaban et al. (2005))

Mitochondrien in Zellen von Parkinsonpatienten zeigen prominente Defekte in den Komponenten der Elektronentransportkette (ETC) (Moore et al., 2005). Die Grundlage hierfür sind alterungsabhängige Prozesse (Abbildung 1.11). Die ETC ist kein perfekt abgeschlossenes System. Ungefähr 2 % der Elektronen entweichen und reagieren mit molekularem Sauerstoff zu hochreaktiven Sauerstoffradikalen. Diese schädigen wiederum die mitochondriale DNA (mtDNA). Da die mtDNA einige Untereinheiten der ETC kodiert, führt eine Schädigung der mtDNA zu Defekten in der ETC. Besonders betroffen sind hierbei die Komplexe I und III. Schäden an diesen Komplexen sorgen für eine noch stärkere ROS-Produktion, die wiederum für eine weitere mtDNA-Schädigung verantwortlich ist (Bandy und Davison, 1990; Balaban et al., 2005; Fukui und Moraes,

2008). Dieser Prozess ist Teil des Alterns und kommt bei jedem Menschen vor. Da er in den Gehirnen von PK-Patienten besonders ausgeprägt ist, müssen noch andere, verstärkende Faktoren eine Rolle spielen. Eine genetische Prädisposition könnte hierbei eine Rolle spielen. Es wurde bereits gezeigt, dass Polymorphismen in den Genen, die die Komponenten der ETC kodieren, zu einem verstärkten oder verringerten Risiko der PK führen - es konnten jedoch noch keine verantwortlichen Mutationen gefunden werden (Moore et al., 2005). Ein weiterer Grund könnte die chronische Exposition von Giften wie MPTP und Pestiziden wie Paraquat oder Rotenon sein. MPTP entsteht als Verunreinigung eines synthetischen Heroinderivats und führt bei den Konsumenten zu Parkinsonsymptomen (Langston et al., 1983). MPTP wird von Astrozyten zur toxischen Komponente MPP⁺ umgesetzt und selektiv von dopaminergen Neuronen über den Dopamintransporter aufgenommen. Hier wirkt es als Komplex I-Inhibitor und führt zum Tod der dopaminergen Neuronen mit einer parkinsonähnlichen Neuro-pathologie (Dauer und Przedborski, 2003). Die Pestizide Paraquat und Rotenon sind beide Komplex I-Inhibitoren. Rotenon und Paraquat werden von allen Zellen aufgenommen. Interessanterweise verursachen sie trotzdem selektiv den Tod dopaminerger Neurone (Betarbet et al., 2000; McCormack et al., 2002). Dies zeigt, wie empfindlich speziell diese Zellen auf oxidativen Stress reagieren.

Die erhöhte ROS-Produktion führt zu verstärkter Lipidperoxidation, Proteinoxidation, DNA-Schädigung und zur Aktivierung von proapoptotischen Signalwegen (Balaban et al., 2005). Lipidoxidation verringert die Fluidität der Membran, verringert die Aktivität von membrangebundenen Enzymen und führt im schlimmsten Fall zu einem Verlust der Membranintegrität. Dies wiederum verschiebt den Ionenhaushalt der Neurone und löst Excitotoxizität aus (Stark, 2005). Reversible Oxidation von bestimmten Aminosäureresten ist durchaus physiologisch und dient der Regulation der Proteinaktivität (Claiborne et al., 1999). Übermäßige ROS-Produktion führt jedoch zu unspezifischer Oxidation von Proteinen, was oftmals zu deren Inaktivierung, Abbau oder sogar zu ihrer Aggregation führt (Balaban et al., 2005). Das prominenteste Beispiel hierfür ist α -Synuclein. Dieses liegt in Lewy-Körpern in nitrosylierter Form vor (Giasson et al., 2000). In vitro führt die Nitrosylierung von α -Synuclein zu einer verstärkten Aggregation (Conway et al., 2001; Ischiropoulos, 2003).

Oxidative DNA-Schädigung löst proapoptotische Signalwege in der Zelle aus, wenn eine

Reparatur nicht mehr möglich ist. Dieser Prozess spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle, da sich Neurone nicht mehr teilen und die Zellen dadurch eher durch inaktive Proteine, die durch die mutierte DNA kodiert werden, geschädigt werden (Martin, 2008). Proapoptotische Signalwege wie der JNK- oder $p38^{MAPK}$ -Signalweg werden durch ROS aktiviert (Matsuzawa und Ichijo, 2008) Diese Aktivierung wird als wichtiger Teil der caspaseabhängigen Apoptose in neurodegenerativen Prozessen angesehen (Schroeter et al., 2002).

Neuroinflammation ist durch die übermäßige Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) gekennzeichnet. Dieses reagiert mit ROS zu Peroxinitrit, welches zytotoxisch wirkt. Auf die Neuroinflammation und die Mechanismen der Zytotoxizität wird ausführlich in Kapitel 1.4 eingegangen.

Eine ROS-Quelle speziell in dopaminergen Neuronen ist der Dopaminstoffwechsel. Dopamin wird durch MAO zu Dihydrophenylelessigsäure umgesetzt (siehe Abb. 1.2). Bei dieser Reaktion entsteht H_2O_2 , weshalb diese eine ROS-Quelle ist. Dopamin kann aber auch autooxidiert werden, wobei das reaktive Dopaminchinon und Superoxid entsteht. Dopaminchinon kann mit diversen Biomolekülen wie den Cysteinresten von Proteinen reagieren und diese unter Ausbildung von Dopaminaddukten inaktivieren, was neben der ROS-Produktion einen zusätzlichen Stress für die dopaminergen Neurone darstellt (Miyazaki und Asanuma, 2008).

Die verstärkte Produktion von ROS stellt bereits ein Problem für die Neuronen da. Dieses wird noch dadurch verstärkt, dass die Menge an Antioxidantien in den Gehirnen von Parkinsonpatienten deutlich verringert ist. Speziell die Glutathionkonzentration ist deutlich erniedrigt (Pearce et al., 1997). Somit kann der verstärkte oxidative Stress noch schlechter von antioxidativen Mechanismen der Zelle aufgefangen werden.

Zusammenfassend bestätigen diese Befunde, dass oxidativer Stress eine der Hauptursachen für idiopathische PK ist (Abbildung 1.12).

1.1.4.2 Ubiquitin-Proteasom-System

Die Entdeckung, dass Mutationen im Gen der Ubiquitin E3-Ligase Parkin mit der PK assoziiert sind (Kitada et al., 1998), hat eine erste Verbindung zwischen der PK und dem UPS gebracht. Einige Parkinson-assoziierte Mutanten verringern die Ubiquitin-Ligaseaktivität (Lim und Tan, 2007). Eine weitere genetische Verbindung ergab sich

durch die Entdeckung, dass die Ubiquitinesterase UCH-L1 ebenfalls mit der PK assoziiert ist (Leroy et al., 1998). Es wurde festgestellt, dass die Mutation I93M zu einer verringerten Hydrolyseaktivität führt (Leroy et al., 1998). Somit ist anzunehmen, dass die korrekte Prozessierung von Proteinen, die zum Abbau bestimmt sind, für die dopaminergen Neuronen überlebensnotwendig ist. Weitere Evidenzen für die wichtige Funktion des UPS wurden durch die Beobachtung geliefert, dass sowohl die Menge als auch die Aktivität von Proteasomen in der Substantia nigra von ideopathischen PK-Patienten deutlich geringer ist als in anderen Gehirnregionen (Furukawa et al., 2002; McNaught et al., 2003). Es ist also anzunehmen, dass eine strukturelle und funktionelle Beeinträchtigung bei sporadischen PK-Patienten vorliegt. Diese Beeinträchtigungen werden wahrscheinlich durch oxidativen Stress, einen gestörten Energiehaushalt und Toxine wie Rotenon und Paraquat verursacht (Lim und Tan, 2007).

Es wird vermutet, dass die Akkumulation von Proteinen für die Neurodegeneration verantwortlich ist. Zum einen akkumulieren in Patienten mit Parkin-Mutationen Substrate von Parkin (Lim und Tan, 2007), zum anderen führt systemische Proteasominhibition zu Parkinsonismus und Neurodegeneration (McNaught et al., 2004). Ein zusätzlicher Stress entsteht durch die Bildung von toxischen α -Synuclein-Aggregaten. Da diese zu einem großen Anteil ubiquitiniert sind, ist auch hier von einem fehlerhaften UPS auszugehen. Warum gerade dopaminerge Neurone besonders empfindlich gegenüber Proteasominhibition sind, ist bisher nicht verstanden. Proteasomale Inhibition hat jedoch einen wichtigen Anteil an der Zytotoxizität sowohl bei der ideopathischen als auch der familiären PK (Abbildung 1.12).

1.1.5 Tiermodelle der PK

Bei den Tiermodellen für die PK geht man von zwei vollkommen unterschiedlichen Ansätzen aus, den Toxinmodellen und den genetischen Modellen. Bei den Toxinmodellen werden Gifte eingesetzt, die im Modellorganismus Parkinsonsymptome auslösen. Bei Mäusen und Ratten sind dies normalerweise die Komplex I-Hemmer MPTP, Paraquat und Rotenon (siehe 1.1.4.1) oder 6-Hydroxydopamin. All diesen Toxinen ist gemeinsam, dass sie oxidativen Stress in ihren Zielzellen auslösen. Die Spezifität der Toxine ist jedoch sehr unterschiedlich. Während MPTP und 6-Hydroxydopamin spezifisch auf dopaminerge Neurone wirken, sind Rotenon und Paraquat unspezifische

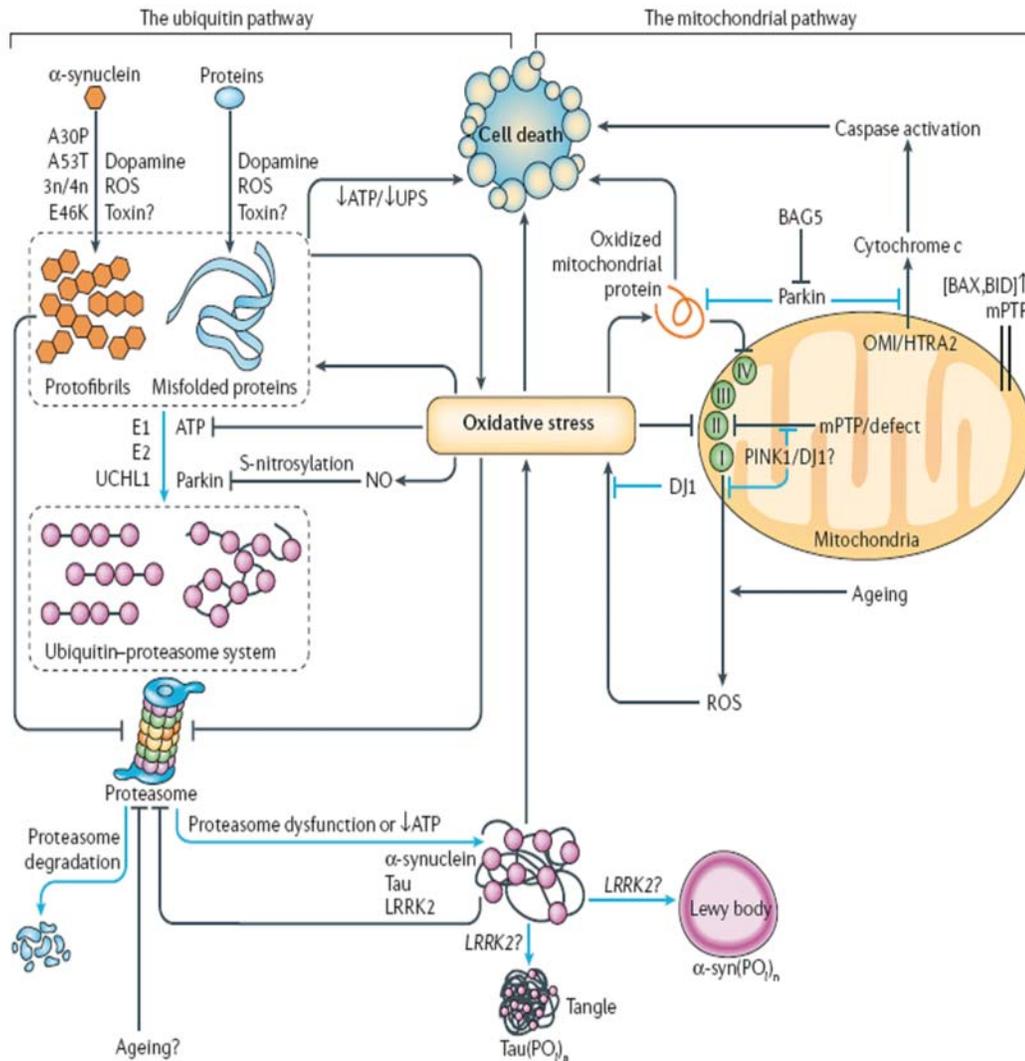


Abbildung 1.12 – Modell der Ursachen für ideopathische und familiäre PK

Zwei Hauptwege werden für das Absterben von dopaminergen Neuronen verantwortlich gemacht. Mitochondriale Schädigungen führen zu einer verstärkten Produktion von ROS. Die mitochondriale Beeinträchtigung entsteht durch Toxine, genetische Prädisposition oder Mutationen in den PK-Genen *PINK1*, *HtrA2* oder *PRKN*. Mutationen im *DJ-1*-Gen beeinträchtigen die zelluläre Abwehr gegen oxidativen Stress. Beeinträchtigungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems führen zur Akkumulation von Proteinen. Diese und α -Synuclein-Aggregate sind toxisch für dopaminerge Neurone. Mutationen in den PK-Genen *SNCA*, *PRKN* und *UCHL1* sind mitverantwortlich für diesen Mechanismus (Abbildung aus Abou-Sleiman et al. (2006)).

Stressoren. Trotz ihrer unterschiedlichen Spezifität lösen alle Toxine einen selektiven Verlust Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone aus (Terzioglu und Galter, 2008). Die Toxine sind aus diesem Grund sehr gut geeignet, die Symptome der PK im Tiermodell nachzubilden.

Bei den genetischen Modellen wird versucht, durch genetische Veränderungen Verhältnisse herzustellen, wie sie in Patienten mit familiären PK herrschen. Hierzu werden die entsprechenden Gene entweder deletiert oder überexprimiert. Bei den Überexpressionsmodellen gibt es die Möglichkeit, entweder das Wildtyp-Gen oder eine pathogene Mutante zu exprimieren. Verschiedene Organismen werden für diese Studien verwendet. Am häufigsten sind es der Nematode *Caenorhabditis elegans*, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder die Hausmaus *Mus musculus*. *C. elegans* und *D. melanogaster*-Modelle haben den Vorteil, dass sie leicht zu generieren und zu manipulieren sind. Der Nachteil ist die relativ große evolutionäre Entfernung vom Menschen. Viele zelluläre Funktionen sind jedoch konserviert und für die meisten PK-Gene gibt es Homologe. Die Maus als Modell ist wesentlich näher am Menschen; die Modelle sind jedoch deutlich aufwendiger zu generieren und zu untersuchen. Im folgenden beschränkt sich die Beschreibung auf die in dieser Studie eingesetzten genetischen Modelle *C. elegans* und Maus.

1.1.5.1 *C. elegans*

Der Nematode *C. elegans* ist ein sehr nützliches Modell für die Erforschung der PK-Gene. Der Aufbau des Wurms ist sehr übersichtlich. Er besteht nur aus 959 Zellen, von denen 302 neuronale Zellen sind. Von diesen 302 sind wiederum acht dopaminerge Neurone (Schmidt et al., 2007). Das Genom ist vollständig sequenziert. Für die meisten PK-Gene mit Ausnahme von α -Synuclein und PINK1 existieren Homologe in *C. elegans*. Entsprechend wurden *knockout*-Würmer auf ihren Phänotyp untersucht. Für α -Synuclein existiert kein Homolog. Überexpression von humanem α -Synuclein in neuronalen Zellen führt zum Absterben von dopaminergen Neuronen und motorischen Defiziten (Lakso et al., 2003). *C. elegans* besitzt ein Homolog für Parkin, *pdr1*. Der Verlust dieses Gens macht den Wurm sensitiver gegenüber ER-Stress, woraus man schließen kann, dass *pdr1* eine Funktion bei der Degradierung von Proteinen hat.

Der *knockout* selber hat keinen Effekt auf die Vitalität (Springer et al., 2005). *C. elegans* besitzt zwei Homologe von DJ-1, *djr1.1* und *djr1.2*. Die Herunterregulation mit RNAi beeinträchtigt die Vitalität des Wurms nicht, macht ihn aber sensitiver gegenüber Rotenon-Toxizität. Hieraus ist zu schließen, dass die Homologe wie DJ-1 eine Funktion als antioxidative Proteine haben (Ved et al., 2005). Es existiert ein Homolog von LRRK2, *lrk-1*, welches die axo-dendritische Polarisierung synaptischer Vesikelproteine vermittelt (Sakaguchi-Nakashima et al., 2007).

Aus diesen Beobachtungen ist zu schließen, dass die Homologe der PK-Gene in *C. elegans* oft ähnliche Funktionen haben bzw dass die Überexpression humaner Proteine zu einem neurodegenerativen Phänotyp führt.

1.1.5.2 Mausmodelle

Seit der Entdeckung der PK-assozierten Genmutationen wurde versucht, dieses Wissen einzusetzen, um genetische Modelle für die PK zu generieren. Dies geschah im Fall der Gene, deren Mutationen zu einem Funktionsverlust führen (*Dj-1*, *Prkn*, *HtrA2*, *Pink1*), durch den *knockout* der Gene. Bei den Genen, deren Mutation zu einem toxischen Aktivitätsgewinn führt (*Snca*, *Lrrk2*), wurden die Gene unter der Kontrolle starker neuronaler Promotoren überexprimiert. Das Problem bei all diesen Modellen ist, dass keines die Kardinalsymptome der PK auslöst (Terzioglu und Galter, 2008). Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die vorhandenen Modelle gegeben werden. Überexpression von [A30P]- oder [A53T]- α -Synuclein führt zu den Symptomen einer Synucleinopathie mit neuronalen Einschlüssen, Degeneration und motorischen Störungen (Kahle, 2008). Eine Pathologie in den normalerweise von der PK betroffenen Hirnregionen fehlt jedoch. Für LRRK2 gibt es bisher keine publizierten Mausmodelle. Die bisher publizierten Mausmodelle für Parkin ergeben ein uneinheitliches Bild. In einigen Studien wird eine leichte Beeinträchtigung des nigrostriatalen Wegs gefunden, andere Studien finden gar keinen Phänotyp (von Coelln et al., 2004; Palacino et al., 2004; Perez und Palmiter, 2005). Keine der Studien zeigt Symptome der PK in den Mäusen. In einer aktuellen Publikation wurden *Pink1 knockout*-Mäuse beschrieben, die leichte mitochondriale Defizite, aber keinerlei PK-Symptome zeigen (Gautier et al., 2008). Der *knockout* von *HtrA2* verursacht einen neurodegenerativen Phänotyp, der innerhalb

von 30 Tagen zum Tod der Tiere führt (Martins et al., 2004). Die DJ-1-Mausmodelle werden ausführlich in Kapitel 1.2.4 besprochen.

Keins der bisher publizierten genetischen Mausmodelle ist ein Modell für die PK. Ihre Stärke liegt in der Möglichkeit, die Funktion der Proteine zu untersuchen und darüber Informationen über die Ursachen der PK zu erhalten (siehe Kapitel 1.1.4).

1.2 DJ-1

Bonifati et al. (2003) haben Mutationen im Gen *DJ-1* mit dem PARK7-Locus assoziiert. Die beiden zuerst gefundenen Mutationen sind für autosomal-rezessive PK verantwortlich. In den Jahren danach wurden noch weitere Punktmutationen, Deletionen und Polymorphismen gefunden, die mit der PK assoziiert sind (Tabelle 1.2). Die Patienten sind beim Krankheitsbeginn meist recht jung und haben einen langsamen Krankheitsverlauf (Gasser, 2007). Mutationen in *DJ-1* sind sehr selten, sie sind nur für 1-2% aller familiären Parkinsonfälle verantwortlich (Abou-Sleiman et al., 2006).

1.2.1 Expression und zelluläre Lokalisation

DJ-1 ist ubiquitär im Körper exprimiert. Interessanterweise kann keine verstärkte Expression in Gehirnarealen, die bei der PK betroffen sind, festgestellt werden (Bandopadhyay et al., 2004; Shang et al., 2004; Bader et al., 2005; Kotaria et al., 2005). Über die Expression in verschiedenen Zelltypen des Gehirns gibt es unterschiedliche Berichte. Alle Studien stimmen darin überein, dass DJ-1 in Astrozyten exprimiert wird (Bandopadhyay et al., 2004; Neumann et al., 2004; Bader et al., 2005; Kotaria et al., 2005), wobei ruhende Astrozyten nur eine geringe Expression aufweisen (Kotaria et al., 2005), während reaktive Astrozyten von PK-Patienten und α -Synuclein-überexprimierenden Mäusen sehr viel DJ-1 exprimieren (Neumann et al., 2004). Über Neurone gibt es unterschiedliche Berichte. Bandopadhyay et al. (2004) finden keine Immunreaktivität gegen DJ-1 in Neuronen, während zwei andere Studien eine starke Expression detektieren (Bader et al., 2005; Kotaria et al., 2005). Bader et al. (2005) haben zusätzlich noch DJ-1-Expression in Mikroglia und Oligodendrozyten beschrieben.

Alle bisher publizierten Studien sind sich darin einig, dass DJ-1 vor allem ein cytosolisches Protein ist (Takahashi et al., 2001; Niki et al., 2003; Canet-Aviles et al., 2004;

Mutation	Vererbung	Population	Effekt	Referenzen
L166P	homozygot	italienisch	Proteininstabilität	Bonifati et al. (2003)
14kb Deletion	homozygot	holländisch	Verlust des Proteins	Bonifati et al. (2003)
M26I	homozygot	Ashkenazi jüdisch	verringerte Stabilität	Abou-Sleiman et al. (2003)
D149A	heterozygot	afro-karibisch	unbekannt	Abou-Sleiman et al. (2003)
IVS6-1 G-C	heterozygot	hispanisch	abweichendes Transkript	Hague et al. (2003)
c.56delC c.57 G-A	heterozygot	hispanisch	Proteinverkürzung	Hague et al. (2003)
A104T	heterozygot	latino	unbekannt	Hague et al. (2003)
Ex5-7del	heterozygot	norditalienisch	abweichendes Transkript	Hedrich et al. (2004)
IVS5+2-12del	heterozygot	russisch	abweichendes Transkript	Hedrich et al. (2004)
E64D	homozygot	türkisch	unbekannt	Hering et al. (2004)
E163K	homozygot	italienisch	unbekannt	Annesi et al. (2005)
g.168_185dup	homozygot	italienisch	unbekannt	Annesi et al. (2005)

Tabelle 1.2 – Mutationen in *DJ-1*, die mit der PK assoziiert sind

Blackinton et al., 2005; Li et al., 2005; Xu et al., 2005; Zhang et al., 2005; Fan et al., 2008). Zusätzlich gab es einige Berichte über eine Kernlokalisierung von DJ-1 (Takahashi et al., 2001; Niki et al., 2003; Xu et al., 2005; Fan et al., 2008). Des Weiteren gibt es Evidenzen, dass oxidiertes DJ-1 mit Mitochondrien assoziiert (Canet-Aviles et al., 2004; Li et al., 2005; Xu et al., 2005; Zhang et al., 2005; Blackinton et al., 2009). Ob die mitochondriale Lokalisation von DJ-1 eine physiologische Bedeutung hat, ist bisher unklar (siehe Kapitel 1.2.3).

DJ-1 ist somit ein ubiquitär exprimiertes, hauptsächlich cytosolisches Protein, dessen Ausfall im Gehirn bevorzugt Neurone und reaktive Astrozyten betrifft.

1.2.2 Struktur

DJ-1 wird auf Chromosom 1p36 im PARK7-Locus kodiert. Das Gen besteht aus acht Exons (Bonifati et al., 2003). Das aus 189 Aminosäuren bestehende Protein DJ-1 gehört strukturell zur ThiJ/Pfp1-Superfamilie. Zu dieser gehören bakterielle Proteasen, Katalasen und Chaperone. Die Sequenz ist evolutionär von prokaryotischen Zellen bis zu den Säugern hochkonserviert (siehe Abbildung 4.1). Das Spezielle an DJ-1 innerhalb der ThiJ/Pfp1-Superfamilie ist seine dimere Quartärstruktur. Jedes der beiden Monomere hat eine Flavodoxin-ähnliche Rossmann-Faltung (Honbou et al., 2003). Im Inneren jedes Monomers liegt ein vermutetes aktives Zentrum, welches das Cystein-106 enthält (Tao und Tong, 2003). Im Gegensatz zu vielen seiner bakteriellen Homologe ist die katalytische Triade, die für eine Proteaseaktivität notwendig wäre, nicht vollständig konserviert (Huai et al., 2003). Zusätzlich ist dieses aktive Zentrum nicht frei zugänglich, sondern wird durch die α -Helices des von uns beschriebenen Helix-Knick-Helix-Motivs (Görner et al., 2007) am C-Terminus des Proteins verdeckt (Abbildung 1.13). Interessanterweise besitzt *E. coli* mit YhbO ein Homolog, welches ebenfalls keine Proteaseaktivität besitzt, aber die Bakterien gegen verschiedenste Stressoren schützt (Abdallah et al., 2007).

Aus diesen strukturellen Besonderheiten lässt sich schließen, dass die Funktion von DJ-1 in engem Zusammenhang mit seinen strukturellen Besonderheiten steht.

Es gab umfangreiche Untersuchungen, wie die PK-assoziierten DJ-1-Mutanten die

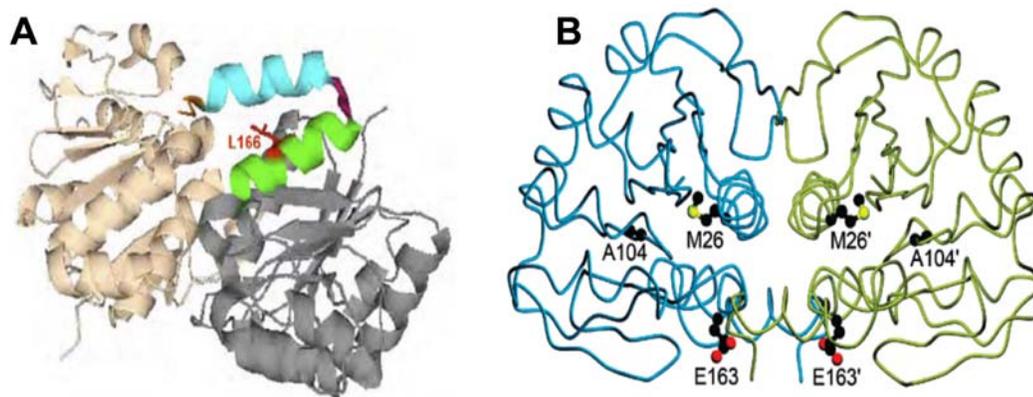


Abbildung 1.13 – Lokalisation der PK-assoziierten Mutationen in der DJ-1-Kristallstruktur

A Die Mutation L166P liegt in der G-Helix des Helix-Knick-Helix-Motivs am C-Terminus von DJ-1. Legende: grün = Helix G, purpur = Knick, blau = Helix H (Abbildung aus Görner et al. (2007)).

B Die Mutation M26I liegt in einer α -Helix im hydrophoben Kern von DJ-1, A104T ist ebenfalls im Inneren des Moleküls, während die Mutation E163K wie L166P in der G-Helix liegt (Abbildung aus Lakshminarasimhan et al. (2008)).

Struktur des Proteins beeinflussen (Abbildung 1.13). Die strukturell schädlichste Mutation ist der Leucin zu Prolin Austausch an Position 166 (L166P, Bonifati et al. (2003)). Die Position 166 ist in der G-Helix von DJ-1 lokalisiert, welche ein Teil des C-terminalen Helix-Knick-Helix-Motivs ist (Görner et al., 2007). Die Einführung des helixbrechenden Prolins führt zu einer Zerstörung der Sekundärstruktur der G-Helix und damit zu einer Störung des gesamten C-Terminus von DJ-1. Da der C-Terminus auch für die Dimerisierung wichtig ist, führt L166P auch zu einer Beeinträchtigung der Dimerstruktur (Huai et al., 2003; Tao und Tong, 2003; Wilson et al., 2003; Görner et al., 2007; Anderson und Daggett, 2008; Malgieri und Eliezer, 2008). Weniger eindeutig sind die Effekte bei den anderen PK-assoziierten Mutanten. Die Mutationen M26I, A104T, D149A und E163K verursachen jeweils geringfügige Veränderungen in der Kristallstruktur wie die Einlagerung eines Wassermoleküls (A104T), die Zerstörung einer Ionenbindung (E163K) oder Packungsdefekte (M26I), die jeweils zu einer etwas verstärkten thermodynamischen Instabilität führen (Lakshminarasimhan et al., 2008; Malgieri und Eliezer, 2008). Für die Mutation E64D findet sich keine Veränderung in der Kristallstruktur (Malgieri und Eliezer, 2008).

Außer für die Mutation L166P kann somit die pathologische Wirkung keiner weiteren

PK-assoziierten DJ-1-Mutation aus ihrer veränderten Struktur erklärt werden.

1.2.3 Funktion von DJ-1

DJ-1 wurde erstmals 1997 als Onkogen beschrieben, dessen Überexpression NIH3T3-Zellen Ras-abhängig transformiert (Nagakubo et al., 1997). Einige Zeit später wurde es als Faktor, der für die männliche Fertilität wichtig ist, beschrieben (Wagenfeld et al., 1998). Diese Funktion erfüllt DJ-1 möglicherweise durch seine positive Regulation des Androgenrezeptors (Takahashi et al., 2001; Niki et al., 2003). In dieser Zeit wurde auch zum ersten Mal eine Verbindung zwischen DJ-1 und oxidativem Stress gefunden, als Mitsumoto und Kollegen die Oxidation von DJ-1 durch endogene und exogene ROS beschrieben (Mitsumoto und Nakagawa, 2001; Mitsumoto et al., 2001). Starke Auftrieb erhielt die DJ-1-Forschung, als Bonifati et al. (2003) Mutationen in *DJ-1* mit der PK assoziierten. In den letzten fünf Jahren wurde zusätzlich zu den bereits beschriebenen Funktionen noch eine dritte Funktion entdeckt und intensiv untersucht: DJ-1 schützt Zellen vor oxidativem Stress. Verschiedene Zelltypen und Organismen wurden hierbei unter Anwendung verschiedener Stressoren untersucht. In Zellkulturmodellen wurde entdeckt, dass DJ-1 Neuroblastomzellen gegen MPTP-Toxizität (Canet-Aviles et al., 2004), Dopamin (Lev et al., 2008a), Rotenon und 6-Hydroxydopamin schützt (Lev et al., 2008b). Es wurde ebenfalls ein protektiver Effekt von DJ-1 gegenüber H_2O_2 in dopaminergen Neuronen (Martinat et al., 2004) und Wildtyp-Mausfibroblasten (MEF) im Vergleich zu *Dj-1*^{-/-}-MEF gefunden (Görner et al., 2007). In *D. melanogaster* macht der Verlust von DJ-1 die Fliegen sensibler gegenüber Paraquat (Lavara-Culebras und Paricio, 2007). Es wurden auch mehrere Mausmodelle untersucht. In diesen wurde die Schutzfunktion von DJ-1 gegen die bekannten Parkinsontoxine MPTP (Paterna et al., 2007) und Paraquat (Yang et al., 2007) bestätigt. In einem dritten Modell wurde entdeckt, dass DJ-1 gegen Ischämien und Excitotoxizität nach einem Schlaganfall schützt (Aleyasin et al., 2007).

Die Frage, wie DJ-1 vor oxidativem Stress schützt, konnte bisher nicht vollständig beantwortet werden. Aus den bisherigen Forschungsergebnissen kristallisieren sich jedoch zwei grundsätzliche Mechanismen heraus. DJ-1 wirkt zum einen protektiv durch die Beeinflussung von Signalwegen, zum anderen durch transkriptionelle Regulation. Im

folgenden sollen diese beiden Punkte genauer dargestellt werden.

1.2.3.1 Regulation von Signalwegen

DJ-1 beeinflusst sowohl pro- als auch antiapoptotische Signalwege (Abbildung 1.14). Der wichtigste antiapoptotische Signalweg ist der Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-Signalweg (Kim et al., 2005a; Yang et al., 2005). Die Regulation erfolgt durch eine Suppression der Phosphatase PTEN, wodurch die Konzentration von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat zunehmen sollte. Dies führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt und zu verringertem Zelltod (Duronio, 2008). Zusätzlich zur Stimulation des antiapoptotischen Akt-Signalwegs unterdrückt DJ-1 auch die Aktivität der proapoptotischen JNK/p38-MAP-Kinase-Signalwege. In diesen Signalwegen sind zwei Angriffspunkte von DJ-1 bekannt. Zum einen interagiert DJ-1 mit der MAPKKK ASK1 und unterdrückt ihre Aktivität (Junn et al., 2005; Görner et al., 2007). Da die Regulation dieser Kinase für diese Arbeit sehr wichtig ist, wird auf sie in Kapitel 1.3 näher eingegangen. Der zweite Angriffspunkt ist die MAPKKK MEKK1, deren Aktivität ebenfalls von DJ-1 unterdrückt wird (Mo et al., 2008). Sowohl die Inhibition der einen als auch der anderen MAPKKK führt zu einer geringeren Aktivität der $p38^{MAPK}$ und JNK-Signalwege und dem Schutz der Zelle vor apoptotischem Zelltod.

DJ-1 erfüllt seine zytoprotektive Wirkung somit durch die Stimulation antiapoptotischer und die Unterdrückung proapoptotischer Signalwege.

1.2.3.2 Transkriptionelle Regulation

Der zweite zytoprotektive Mechanismus von DJ-1 ist die transkriptionelle Regulation. Die Rolle von DJ-1 als transkriptioneller Koaktivator war im Zusammenhang mit der männlichen Fruchtbarkeit bereits früh bekannt (Takahashi et al., 2001; Niki et al., 2003). Auch beim Schutz der Zelle gegen oxidativen Stress beeinflusst DJ-1 die transkriptionelle Hochregulation antioxidativer Gene. Intensiv wurde hierbei die Erhöhung der Glutathion-Konzentration durch die verstärkte Expression des limitierenden Enzyms Glutamat-Cystein-Ligase untersucht (Zhou und Freed, 2005; Liu et al., 2008b). Liu et al. (2008b) fanden zusätzlich noch eine Hochregulation von Hsp70. Der genaue

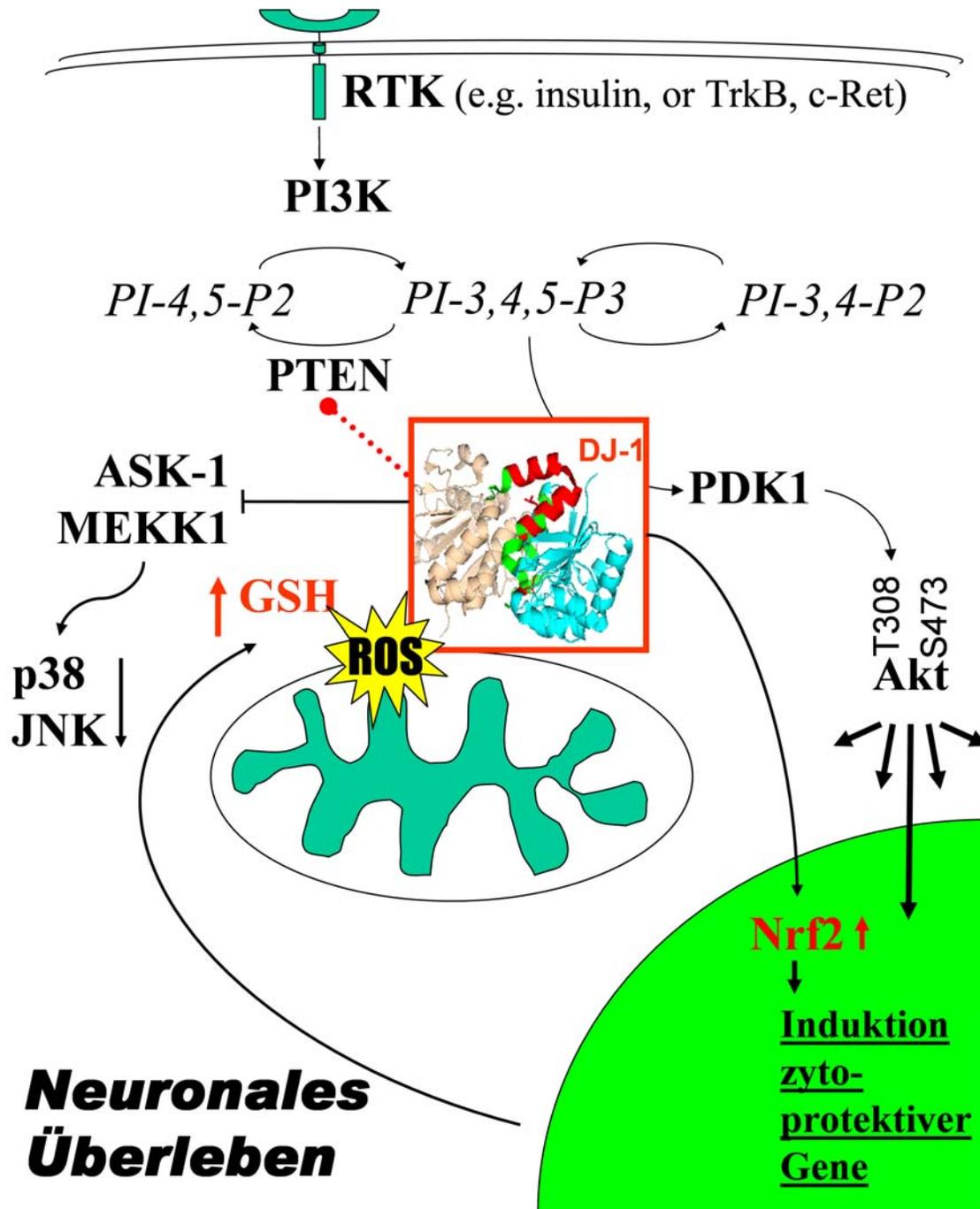


Abbildung 1.14 – Modell des zytprotektiven Mechanismus von DJ-1

Mechanismus, durch den DJ-1 die Regulation antioxidativer Gene beeinflusst, ist bisher unbekannt. Verschiedene Aspekte wurden jedoch schon untersucht. Clements et al. (2006) konnten zeigen, dass DJ-1 den antioxidativen Transkriptionsfaktor nukleären Faktor erythroid-derived 2 related factor(Nrf2) stabilisiert, den Hauptregulator der antioxidativen Transkription. DJ-1 verhindert angeblich durch einen unbekanntem Mechanismus die Bindung der Ubiquitinligase Keap1 an Nrf2, was die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Nrf2 verhindert. DJ-1 kann zudem als transkriptionaler Koaktivator wirken (Xu et al., 2005) sowie RNA binden (van der Brug et al., 2008). Interessanterweise hat DJ-1 auch eine spezifische Funktion in dopaminergen Neuronen als transkriptioneller Regulator des Enzyms Tyrosinhydroxylase (Jeong et al., 2006; Zhong et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DJ-1 wahrscheinlich durch verschiedene Mechanismen die Expression antioxidativer Gene reguliert.

1.2.3.3 Andere Mechanismen

Zusätzlich zu den oben genannten Bereichen gibt es noch verschiedene andere Berichte über zytoprotektive Eigenschaften von DJ-1. So wirkt DJ-1 oxidationsabhängig als Chaperon für α -Synuclein und vermindert dessen Toxizität (Shendelman et al., 2004; Batelli et al., 2008). Außerdem vermindert es die Menge der Dopamintransporter in dopaminergen Neuronen, was einen regulatorischen Mechanismus bei der Dopaminausschüttung nahelegt (Goldberg et al., 2005; Manning-Bog et al., 2007). Eine interessante Funktion von DJ-1 wurde in einer aktuellen Publikation von Mullett und Hinkle (2008) beschrieben. Diese fanden heraus, dass der *knockdown* von DJ-1 in Astrozyten kulturell kultivierte Neurone sensitiver gegenüber oxidativem Stress macht. DJ-1 scheint somit an der Versorgung von Neuronen mit protektiven Substanzen durch Astrozyten beteiligt zu sein.

1.2.3.4 Aktivierung von DJ-1

Für die meisten in diesem Abschnitt beschriebenen Funktionen muss DJ-1 aktiviert werden. Dies geschieht durch Oxidation. Alle bisher erschienenen Studien sind sich

darin einig, dass die Anwesenheit von ROS eine notwendige Voraussetzung für die Aktivität von DJ-1 ist (Canet-Aviles et al., 2004; Shendelman et al., 2004; Takahashi-Niki et al., 2004; Meulener et al., 2006; Hulleman et al., 2007; Mo et al., 2008; Blackinton et al., 2009). In den meisten Berichten wird Cystein-106 als die Aminosäure angesehen, die durch ihre Oxidation als molekularer Schalter wirkt (Canet-Aviles et al., 2004; Takahashi-Niki et al., 2004; Meulener et al., 2006; Hulleman et al., 2007; Blackinton et al., 2009). Cystein-106 wird dabei zur Sulfinosäure oxidiert (Canet-Aviles et al., 2004; Zhou et al., 2006; Tsuboi et al., 2008; Blackinton et al., 2009). Da der Zugang zu Cystein-106 durch das C-terminale Helix-Knick-Helix-Motiv blockiert ist (Görner et al., 2007), ist es wahrscheinlich, dass DJ-1 seine Konformation ändern muss, um durch ROS aktiviert zu werden (Honbou et al., 2003). Diese Tatsache könnte die Regulation der DJ-1-Aktivität erklären. Duan et al. (2008) haben in einer aktuellen Publikation gezeigt, dass oxidiertes DJ-1 nicht reduziert, sondern proteasomal abgebaut wird. Da die blockierende α -Helix am C-Terminus wichtig für die Dimerisierung von DJ-1 ist (Tao und Tong, 2003), könnte eine aktivierende Konformationsänderung die weitere Dimerisierung verhindern. Da aber die Dimerisierung als notwendige Voraussetzung für die Stabilität von DJ-1 angesehen wird, würde die Monomerisierung zu einer Destabilisierung des Proteins und damit zu einem proteasomalen Abbau führen. Diese Hypothese wird durch Hulleman et al. (2007) gestützt, die eine Destabilisierung von DJ-1 nach Oxidation an C-106 gefunden haben.

Hieraus lässt sich schließen, dass DJ-1 durch die Oxidation an Cystein-106 aktiviert wird und diese Aktivierung notwendig für die Funktion von DJ-1 ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DJ-1 ein im Gehirn ubiquitär exprimiertes Protein ist, welches die Zelle durch verschiedene Mechanismen vor oxidativem Stress schützt. Wie der Verlust der DJ-1-Aktivität zu den Symptomen der PK führt, ist bis jetzt noch nicht verstanden.

1.2.4 DJ-1-Mausmodelle

Wie schon bei den meisten anderen genetischen Mausmodellen der PK beobachtet wurde, gibt es bei *Dj-1^{-/-}*-Mäusen keine Zeichen von Neurodegeneration (Goldberg et al., 2005; Yamaguchi und Shen, 2007) und keine Beeinträchtigung des nigrostriata-

len Weges (Goldberg et al., 2005; Yamaguchi und Shen, 2007; Chandran et al., 2008). Die Modelle bestätigen jedoch einige Funktionen von DJ-1 und geben Hinweise auf andere, bisher kaum untersuchte Funktionen. *Dj-1^{-/-}*-Mäuse sind sensitiver gegenüber den Parkinson-Toxinen MPTP (Kim et al., 2005b; Manning-Bog et al., 2007) und Paraquat (Yang et al., 2007), was seine zytoprotektive Funktion gegen oxidativen Stress bestätigt. Zusätzlich zeigen die *Dj-1^{-/-}*-Mäuse eine Reduktion der *Long Term Depression* (LTD) (Goldberg et al., 2005; Wang et al., 2008), was wahrscheinlich durch eine größere Anzahl von Dopamintransportern (Manning-Bog et al., 2007) und somit eine verstärkte Wiederaufnahme von Dopamin verursacht wird (Goldberg et al., 2005; Manning-Bog et al., 2007). Dies könnte eventuell gewisse Verhaltensauffälligkeiten alter Tiere erklären (Chandran et al., 2008).

Warum der Verlust von DJ-1 im Menschen zur PK führt, lässt sich auch durch die bisher publizierten Mausmodelle nicht erklären.

1.3 Apoptosesignal-regulierende Kinase 1 (ASK1)

DJ-1 erfüllt seine zytoprotektive Funktion unter anderem über die Regulation ASK1 (siehe Kap. 1.2.3). Da der Regulationsmechanismus in dieser Studie näher untersucht wurde, soll ASK1, seine Regulation und Funktion hier vorgestellt werden.

ASK1 gehört zur Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasekinasen (MAPKKK) (Sekine et al., 2006). Sie wurde 1997 von Ichijo et al. (1997) als proapoptische Kinase entdeckt. Es handelt sich um eine ubiquitär exprimierte zytosolische Kinase (Sekine et al., 2006).

1.3.1 Struktur von ASK1

ASK1 ist eine 1374 Aminosäuren lange Serin/Threonin-Kinase. Sie besteht aus verschiedenen Domänen, deren funktionelle Bedeutung teilweise bekannt ist (Abbildung 1.15). Am N-terminalen Ende befindet sich im Bereich der Aminosäuren 46-277 die Bindungsstelle des negativen Regulators Thioredoxin (Trx) 1, gefolgt von der N-terminalen *Coiled coil*-Domäne (297-324), welche für die Oligomerisierung von ASK1 wichtig ist. Hierauf folgt die TRAF-Bindungsregion im Bereich der Aminosäuren 384-655 (Fuji-

no et al., 2007). Die Kinasedomäne liegt im Bereich der Aminosäuren 687-945. Am C-terminalen Ende gibt es noch eine zweite *Coiled coil*-Domäne, die ebenfalls für die Oligomerisierung wichtig ist (Sekine et al., 2006).

ASK1 liegt sowohl im inaktiven wie auch im aktiven Zustand als Oligomer mit einem Molekulargewicht von über 1500 kDa vor, dem ASK-Signalosom (Noguchi et al., 2005). Nach Aktivierung durch ROS wird das Molekulargewicht des ASK-Signalosoms durch die Anlagerung weiterer Effektorproteine wie DAXX (Chang et al., 1998), TRAF2 (Liu et al., 2000) und TRAF6 auf über 3000 kDa vergrößert (Noguchi et al., 2005).

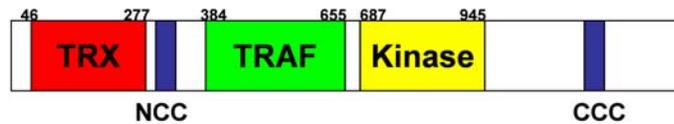


Abbildung 1.15 – Domänenstruktur von ASK1

Eingezeichnet sind die bekannten Domänen mit ihrer Funktion. TRX: Thioredoxin-Bindungsstelle; NCC: N-terminale *Coiled coil*-Domäne; TRAF: TRAF-Bindungsstelle; Kinase: Kinasedomäne; CCC: C-terminale *Coiled coil*-Domäne.

1.3.2 Regulation von ASK1

ASK1 gehört zur Gruppe der stressaktivierten MAPKKK und kann durch verschiedene Stimuli aktiviert werden. Hierzu gehören H_2O_2 , Zytokine, Entzug von Wachstumsfaktoren und Glucose, Krebsmedikamente und Todesrezeptorliganden (Ichijo et al., 1997; Nishitoh et al., 1998; Saitoh et al., 1998; Wang et al., 1998; Chen et al., 1999; Kanamoto et al., 2000; Takeda et al., 2004; Matsuzawa et al., 2005). Gemeinsam ist allen Aktivatoren, dass sie in der Zelle ROS produzieren, die für die Aktivierung verantwortlich sind. Im Grundzustand bindet ASK1 seinen negativen Regulator Trx 1 (Saitoh et al., 1998), welcher die Aktivität von ASK1 unterdrückt. Diese negative Regulation erfolgt durch kovalente Bindung von Trx an ASK1 über Disulfidbrücken und verhindert die Interaktion der N-terminalen *Coiled Coil*-Domänen im ASK-Signalosom (Fujino et al., 2007; Nadeau et al., 2007). Durch die aktivierenden ROS wird Trx oxidiert und diffundiert aus dem Komplex. Hierdurch können die N-terminalen *Coiled coil*-Domänen intera-

gieren. Dies erlaubt den ASK-Oligomeren, Thr838 und Thr842 in der Kinasedomäne zu phosphorylieren (Tobiume et al., 2002). Diese Phosphorylierung erlaubt schließlich die Bindung von TRAF2, TRAF6 und DAXX unter Ausbildung des hochmolekularen aktiven ASK1-Signalosom (Chang et al., 1998; Noguchi et al., 2005). DAXX kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. Durch seine Bindung wird eine inhibitorische Interaktion zwischen dem N- und dem C-Terminus von ASK1 aufgehoben, wodurch das Signalosom eine volle Aktivität erlangen kann (Chang et al., 1998).

Neben Trx 1 wird ASK1 auch noch durch Phosphorylierung und Bindung weiterer Effektorproteine reguliert. Phosphorylierung von Serin-83 durch Akt unterdrückt die Aktivität von ASK1 (Kim et al., 2001a). Serin-967 ist ebenfalls im inaktiven Zustand phosphoryliert und dient als Bindungsstelle von 14-3-3-Proteinen, die die Aktivierung von ASK1 unterdrücken (Zhang et al., 1999). Ein weiterer negativer Regulator von ASK1 ist DJ-1 (Junn et al., 2005; Görner et al., 2007). Der genaue Mechanismus der DJ-1-vermittelten ASK1-Regulation wird in dieser Arbeit untersucht.

Die bisherigen Untersuchungen ergeben, dass die Aktivität von ASK1 durch Phosphorylierung und die Bindung von aktivierenden und reprimierenden Proteinen reguliert wird.

1.3.3 Funktion von ASK1

ASK1 ist eine stressaktivierte MAPKKK und somit ein Teil des MAP-Kinase-Signalwegs (Abbildung 1.16). Substrate von ASK1 sind die MAP-Kinasekinasen MKK3, MKK4 und MKK6. Diese wiederum können $p38^{MAPK}$ (MKK3, MKK6) und JNK (MKK4) phosphorylieren und aktivieren. Diese wiederum können Transkriptionsfaktoren, weitere Kinasen und Komponenten des Zytoskeletts phosphorylieren und beeinflussen dadurch Transkription, Apoptose und zelluläre Funktionen (Sekine et al., 2006). Verstärkte ASK1-Aktivität wurde mit vielen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Hierzu zählen neurodegenerative Erkrankungen, Infektionen, Herzinfarkt und Asthma (Nagai et al., 2007). Bei der PK wird die Aktivität von ASK1 durch die verstärkte ROS-Produktion stimuliert, was zum Untergang dopaminerger Neurone beiträgt (Sekine et al., 2006).

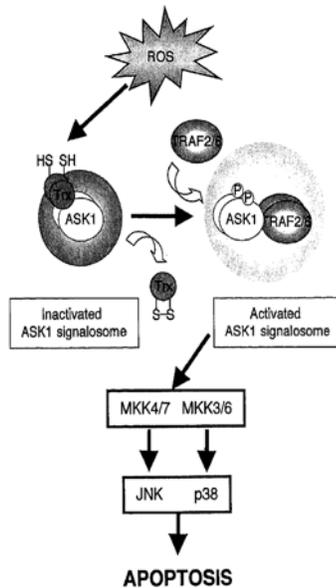


Abbildung 1.16 – Aktivierung und Funktion von ASK1

ASK1 wird durch ROS aktiviert. Thioredoxin wird oxidiert und diffundiert ab. ASK1 bindet TRAF und DAXX und bildet das aktive Signalosom. Jetzt kann es seine Substrate MKK3, MKK4 und MKK6 phosphorylieren und aktivieren (Abbildung aus Sekine et al. (2006)).

ASK1 ist eine ubiquitär exprimierte stressaktivierte MAPKKK. Ihre Aktivität wird über Phosphorylierungen und die Bindung von aktivierenden und reprimierenden Effektorproteinen reguliert. Da sie ein Modul des proapoptotischen JNK/p38-Signalwegs ist, spielt sie eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der PK.

1.4 Neuroinflammation

Neuroinflammation ist ein Schutzmechanismus, der das Gehirn vor bakteriellen und viralen Infektionen und vor übermäßigen Schäden durch Traumata schützt. Pathogene werden hierbei bekämpft bzw. geschädigte Zellen und Hirnareale abgesondert, die befallenen Zellen entfernt und die extrazelluläre Matrix repariert (Correale und Villa, 2004). Es wird zwischen akuter und chronischer Neuroinflammation unterschieden. Akute Neuroinflammation entsteht durch Infektionen und Ischämien, während chronische Inflammationen bei neurodegenerativen Erkrankungen auftreten.

1.4.1 Neuropathologie

Die neuropathologischen Kardinalsymptome der Neuroinflammation sind aktivierte Mikroglia und Astrozyten. Ruhende Mikroglia haben eine verästelte Morphologie, die sich durch ihre Aktivierung zu einer amöboiden Morphologie wandelt. Aktivierte Mikrogliazellen proliferieren und migrieren zur Läsionsstelle. Reaktive Astrozyten sind histologisch durch Proliferation und eine verstärkte Expression des Strukturproteins Gliales fibrilläres saures Protein (GFAP) charakterisiert (Farooqui et al., 2007). Zusätzlich kommt es zur Rekrutierung von polymorphonuclearen Leukozyten aus dem Blut, die Pathogene bekämpfen und phagozytieren können (Diamond et al., 1999; Serhan und Savill, 2005).

Die neuropathologischen Veränderungen dienen somit der Konzentration von immunkompetenten Zellen an geschädigten Orten des Gehirns.

1.4.2 Funktion der Astrozyten

Da DJ-1 prominent in reaktiven Astrozyten exprimiert wird (Neumann et al., 2004), wurde in der vorliegenden Studie vor allem die Rolle von Astrozyten in neuroinflammatorischen Prozessen untersucht. Astrozyten stellen die Hauptmasse der Zellen im Gehirn. Ihre Hauptfunktion während der Neuroinflammation ist die Aktivierung von Mikroglia und der Schutz umliegender Neuronen (Eddleston und Mucke, 1993; McGeer und McGeer, 2008). Hierzu schirmen sie den pathologischen Herd ab und produzieren große Mengen frei diffundierbarer Stoffe wie Stickstoffmonoxid und Prostaglandine, inflammatorische Botenstoffe wie Zytokine und neurotrophe Faktoren (McGeer und McGeer, 2008). Diese drei Gruppen sollen im folgenden näher beleuchtet werden. Zusätzlich produzieren Astrozyten noch Enzyme, die zum Umbau und der Regeneration der extrazellulären Matrix notwendig sind wie z.B. Matrixmetalloproteasen (Farooqui et al., 2007). Bei chronischer Neuroinflammation kann sich die positive Wirkung der produzierten Stoffe auch in eine negative, zellschädigende Wirkung umkehren.

1.4.2.1 Stickstoffmonoxid und Prostaglandine

Stickstoffmonoxid (NO) ist in kleinen Mengen ein Botenstoff, wirkt aber in großen Konzentrationen zytotoxisch. Seine Funktion als Botenstoff im Gehirn ist die retrograde Kommunikation zwischen prä- und postsynaptischen Neuronen und dient der *Long Term Potentiation* und synaptischen Plastizität. Hierzu wird es in kleinen Mengen über einen Zeitraum von wenigen Minuten produziert (Guix et al., 2005). In Astrozyten werden während neuroinflammatorischer Prozesse große Mengen NO über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen produziert. Seine Hauptaufgabe ist die Eliminierung von Pathogenen durch die Erzeugung von oxidativem und nitrosativem Stress. NO wird durch NO-Synthasen (NOS) produziert. Es gibt drei Typen von NOS im Gehirn. Zwei von ihnen, NOS1 (neuronal NOS) und NOS3 (epitheliale NOS), produzieren NO als Botenstoff. Sie werden konstitutiv exprimiert und Calmodulin-abhängig durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration aktiviert (Guix et al., 2005). NOS2, auch induzierbare NOS genannt, produziert NO während inflammatorischer Prozesse. Das Enzym wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern die Expression wird durch proinflammatorische Stimuli innerhalb von 12 - 24 h aktiviert. Das Enzym wird nur transkriptionell reguliert und hat eine relativ kurze Halbwertszeit von ca 2 h (Kolodziejcki et al., 2004). Alle NO-Synthasen produzieren NO nach dem gleichen Reaktionsschema aus Arginin (Abbildung 1.17). Dieses wird unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH zu Citrullin und NO umgesetzt (Guix et al., 2005).

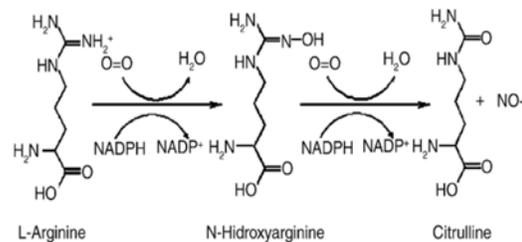


Abbildung 1.17 – Reaktionsmechanismus der NO-Synthasereaktion (aus Guix et al. (2005))

NO kann frei durch Membranen diffundieren, hat aber wegen seiner hohen Reaktivität eine kurze Halbwertszeit. Seine zytotoxische Wirkung gegenüber Pathogenen entfaltet es zum einen durch seine Reaktion mit endogenen ROS unter Ausbildung von Per-

oxynitrit. Dieses reagiert sofort mit Proteinen, Lipiden und DNA und schädigt durch diese Nitrosylierungen die Zelle. Zum anderen kann NO auch direkt mit Biomolekülen unter Bildung von Nitrogruppen reagieren. Bei chronischer Neuroinflammation kommt es durch die lange und übermäßige Produktion von NO und die oftmals geschwächte Abwehr gegen ROS zur Schädigung von körpereigenen Zellen. Besonders Neurone reagieren empfindlich auf NO, wodurch die Neuroinflammation zu neurodegenerativen Prozessen beiträgt (Brown, 2007).

Die zweite Gruppe frei diffundierbarer Botenstoffe, die von Astrozyten nach proinflammatorischen Stimuli produziert werden, sind Prostaglandine (Farooqui et al., 2007). In hohen Konzentrationen wirken sie durch die Freisetzung von Zytokinen, Produktion von oxidativem Stress und die Aktivierung von Leukozyten proinflammatorisch (Phillis et al., 2006). Prostaglandine werden durch die enzymatische Aktivität der Cyclooxygenase (COX) aus Arachidonsäure synthetisiert (Abbildung 1.18). Es gibt zwei Isoformen der COX, COX-1 und COX-2. COX-1 wird konstitutiv exprimiert, während COX-2 abhängig vom Zelltyp entweder konstitutiv oder induzierbar exprimiert wird. In Astrozyten wird die Expression von COX-2 durch proinflammatorische Stimuli induziert.

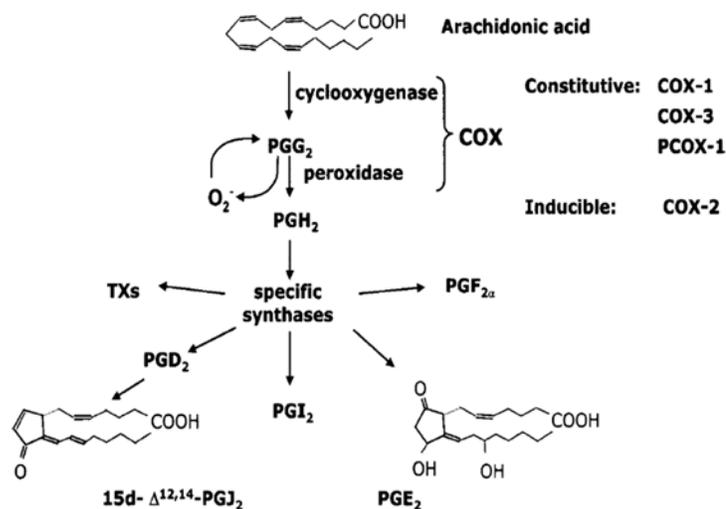


Abbildung 1.18 – Biosynthese verschiedener Prostaglandine

Die Cyclooxygenase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Prostaglandinsynthese. Es setzt Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) um. Dieses kann dann zu weiteren Prostaglandinen umgesetzt werden (Abbildung aus Consilvio et al. (2004)).

Die in Astrozyten produzierten Prostaglandine wirken auf umliegende Neurone, Mikroglia und andere Astrozyten. In diesen Zellen können sie proinflammatorische Signalwege aktivieren.

NO und Prostaglandine sind die wichtigsten frei diffundierbaren Botenstoffe, die von Astrozyten produziert werden. Sie wirken zum einen gegen Pathogene und zum anderen als Signalmoleküle zur Kommunikation mit umliegenden Zellen.

1.4.2.2 Zytokine

Astrozyten wie auch Mikroglia produzieren eine Vielzahl von Zytokinen, deren Expression durch proinflammatorische Stimuli ausgelöst wird. Hierzu gehören Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), *Colony Stimulating Factor 1* und *Transforming Growth Factor β* (Hays, 1998; Wu et al., 1998; Kim et al., 2001b; Sun et al., 2004; Drew et al., 2005; Minghetti et al., 2005; Noda et al., 2006). Diese verstärken die Neuroinflammation bzw tragen sie durch die Bindung an Rezeptoren auf benachbarten Gliazellen und Neuronen weiter, wo sie unter anderem die Aktivierung von Cyclooxygenasen, Lipoxigenase und NO-Synthasen stimulieren. Dies führt wiederum zur Produktion weiterer proinflammatorischer Signalmoleküle (Farooqui et al., 2007). Die Zytokine können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen haben (Wagoner und Benveniste, 1999). Normalerweise wirken sie neuroprotektiv. Werden sie jedoch in einer Umgebung sekretiert, die bereits vorgeschädigt ist, wie es bei neurodegenerativen Erkrankungen vorliegt, wirken sie neurotoxisch (Rothwell, 1999).

1.4.2.3 Wachstumsfaktoren

Vor allem Astrozyten, aber auch zu einem geringeren Maße Mikroglia, produzieren neurotrophe Faktoren, um umliegende Neuronen zu unterstützen und zu schützen. Die wichtigsten Faktoren, die von Astrozyten produziert werden, sind *Nerve Growth Factor* (NGF), IL-6, *Glial Derived Neurotrophic Factor*, *Brain Derived Neurotrophic Factor*, *Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor* (McGeer und McGeer, 2008). Diese löslichen Faktoren tragen zum Schutz der Neurone durch Aktivierung von antiapoptotischen und wachstumsfördernden Signalwegen bei (Mena und de Yebenes,

2008).

Astrozyten produzieren während neuroinflammatorischer Prozesse eine Vielzahl pro- und antiinflammatorischer Signalmoleküle. Diese sollen in ihrer Umgebung neuroprotektiv wirken. Bei chronischer Inflammation bzw einer vorgeschädigten Umgebung können sie jedoch auch zellschädigend wirken.

1.4.3 Signalwege

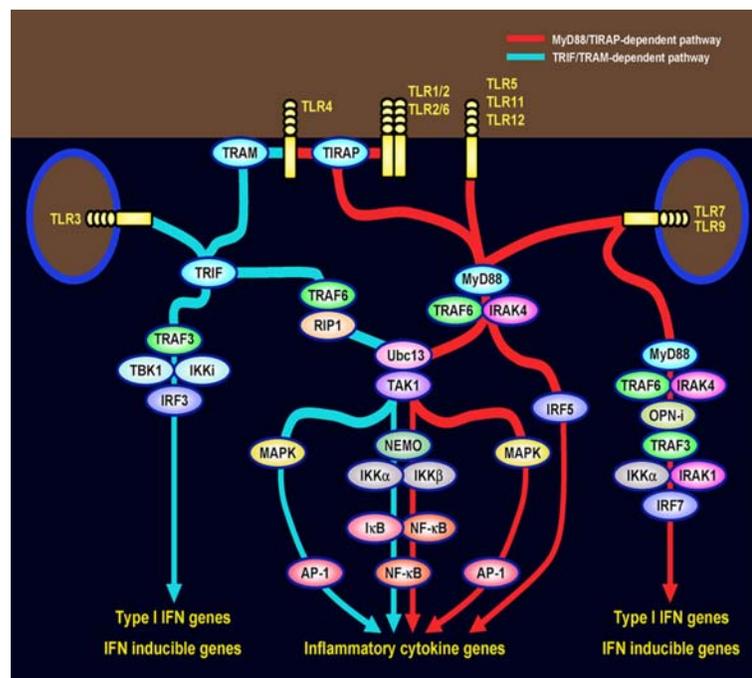


Abbildung 1.19 – TLR-Signaltransduktion (aus Kawai und Akira (2007))

Im Rahmen der angeborenen Immunität können immunkompetente Zellen wie Astrozyten Pathogene und beschädigte Zellen erkennen und die Immunantwort des Körpers initiieren. Die Detektion von proinflammatorischen Stimuli erfolgt über verschiedene Mechanismen. Pathogene wie Bakterien und Viren werden über ihre Bindung an *Toll like receptors* (TLR) erkannt, die von den immunkompetenten Zellen des Gehirns, Microglia und Astrozyten, exprimiert werden. Bis heute sind mehr als 10 verschiedene TLR bekannt, die verschiedene Liganden binden und damit unterschiedliche Pathoge-

ne erkennen können (Akira et al., 2001). So erkennen TLR3 die doppelsträngige RNA bestimmter Viren, während TLR4 Lipopolysaccharide (LPS) binden, die ein Teil der Außenhülle gram-negativer Bakterien sind (Akira et al., 2001). Beschädigte Zellen oder Gewebe werden dagegen über sekretierte Kollektine erkannt, die das Komplementsystem aktivieren und schlussendlich zur Phagozytose führen (Tenner, 1998, 1999). Im folgenden werde ich mich auf die TLR-vermittelte Immunität konzentrieren, da diese für die vorliegende Arbeit wichtig ist.

TLR sind Typ1 Transmembranproteine. Die verschiedenen TLR haben unterschiedliche extrazelluläre Domänen, um unterschiedliche Zielmoleküle zu erkennen. Ihre cytosolischen Domänen sind jedoch sehr ähnlich, weswegen zum Teil überlappende Signalwege aktiviert werden. TLR besitzen selbst keine Kinaseaktivität, sondern geben ihr Signal durch Bindung von Effektorkinasen weiter (siehe Abbildung 1.19). Hierdurch werden drei generelle Typen von Signalwegen aktiviert: die MAP-Kinase-Signalwege, der *Nuclear factor* (NF) κ B-Signalweg und der JAK/STAT-Signalweg. Welcher Signalweg wie und wie stark aktiviert wird, hängt vom TLR-Komplex und dem Liganden ab. Im folgenden soll der TLR-Signalweg am Beispiel von TLR4 aufgezeigt werden (Abbildung 1.19). TLR4 bindet LPS an seiner extrazellulären Domäne und wird hierdurch aktiviert. Dieses aktivierte TLR4 kann das Adaptermolekül MyD88 binden, welches wiederum die Bindestelle für die Serin/Threonin-Kinase IRAK bildet (Takaesu et al., 2001). Gebundenes IRAK wird autophosphoryliert, dissoziiert vom Rezeptor ab und bildet einen Komplex mit TRAF6 und weiteren Effektorproteinen. Dieser aktive Komplex kann schließlich die MAP-Kinase- und NF κ B-Signalwege aktivieren (Janssens und Beyaert, 2003). Die Aktivierung der verschiedenen Signalwege wirkt sich über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nrf2, AP-1 und NF κ B auf die transkriptionelle Regulation der in Abschnitt 1.4.2 beschriebenen pro- und antiinflammatorischen Gene aus.

Proinflammatorische Stimuli werden über TLR erkannt. Diese aktivieren vor allem den MAPK- und NF κ B-Signalweg. Diese Signale führen dann zur Expression pro- und antiinflammatorischer Gene.

1.4.4 Neuroinflammation und PK

Die Neuroinflammation spielt auch bei der in dieser Studie untersuchten PK eine wichtige Rolle. Astrogliose und das Auftreten reaktiver Mikroglia in der Substantia nigra sind neuropathologische Kardinalsymptome der PK (McGeer und McGeer, 2008). Es wird angenommen, dass die Neuroinflammation eine Konsequenz des neuronalen Zelltods ist (Hirsch et al., 2003). Interessanterweise trägt sich die Neuroinflammation und die damit verbundene Neurodegeneration selbst weiter. In den Gehirnen von Patienten, die kurzzeitig MPTP ausgesetzt waren, hat man auch nach Jahren noch Zeichen von Astrogliose gefunden (Langston et al., 1999). In PK-Hirnen wurde sowohl eine verstärkte Expression von NOS2 (Hirsch et al., 2003) als auch erhöhte Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen gefunden (Nagatsu et al., 2000a,b). Es wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, dass reaktive Astrozyten und Mikroglia umliegende dopaminerge Neurone schädigen können (Bronstein et al., 1995; Herrera et al., 2000; Gao et al., 2002). Dies geschieht zum einen durch die übermäßige NO-Produktion (Brown, 2007), zum anderen durch proinflammatorische Zytokine. Dopaminerge Neurone besitzen Rezeptoren für die meisten Zytokine und werden durch die Bindung zur Expression von COX-2 stimuliert (Hirsch et al., 2003). Zusätzlich kommt es zur Aktivierung proapoptotischer Signalwege, vor allem durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ (Tansey et al., 2007).

Ein zusätzliches Augenmerk auf die Neuroinflammation bei der PK wurde durch den Einfluss der familiären PK-Gene gelegt. Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass α -Synuclein proinflammatorisch wirken kann und dies durch seine pathogenen Mutanten verstärkt wird (Klegeris et al., 2006). Aktuell haben Gao et al. (2008) gezeigt, dass Überexpression von α -Synuclein die proinflammatorische Wirkung von LPS *in vivo* verstärkt. Auch der Verlust von Parkin verstärkt die LPS-vermittelte Neurodegeneration in einem *in vivo*-Modell (Frank-Cannon et al., 2008).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Neuroinflammation eine wichtige Rolle im Verlauf der PK spielt und aktiv am neurodegenerativen Prozess beteiligt ist.

2 Ziele der Doktorarbeit

Das Thema der vorliegenden Doktorarbeit ist die strukturelle und funktionelle Untersuchung des Parkinson-assoziierten Proteins DJ-1. DJ-1 wird eine zytoprotektive Funktion zugesprochen. Die genauen strukturellen und funktionellen Grundlagen dieser Zytoprotektion sind bisher nur teilweise bekannt.

DJ-1 wird durch ROS aktiviert. Dies geschieht wahrscheinlich durch Oxidation einer oxidierbaren Aminosäure. DJ-1 besitzt drei Cysteine und fünf Methionine, die potentiell oxidiert werden könnten. Es gibt bisher keine systematische Untersuchung, welche dieser Aminosäuren für die Aktivierung von DJ-1 wichtig sind. In der vorliegenden Studie wurden alle oxidierbaren Reste mutagenisiert, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Wie beeinflusst die Mutagenese der oxidierbaren Aminosäuren die Stabilität und Expression von DJ-1?
2. Wie beeinflusst die Mutagenese der oxidierbaren Aminosäuren die Funktionalität von DJ-1? Dies soll anhand verschiedener funktioneller Studien untersucht werden:
 - a) Binden die generierten Mutanten weiterhin an ASK1?
 - b) Wirken die generierten Mutanten weiterhin zytoprotektiv?
 - c) Können die generierten Mutanten den Transkriptionsfaktor Nrf2 stabilisieren?
3. Kann der aktive Zustand von DJ-1 durch geeignete Mutanten, die konstitutiv aktiv sind, simuliert werden?

Ein Mechanismus, mit dem DJ-1 die Zellen vor oxidativem Stress schützt, ist die Repression der proapoptischen Kinase ASK1. Der Mechanismus, nach dem DJ-1 die

ASK1-Aktivität unterdrückt, wird kontrovers diskutiert. Zwei Wege wurden vorgeschlagen:

- DJ-1 reprimiert ASK1 direkt durch Bindung (Görner et al., 2007).
- DJ-1 verhindert die Translokation von DAXX aus dem Zellkern ins Zytosol, wodurch dieses nicht mehr an ASK1 binden kann, was für die vollständige Aktivität von ASK1 notwendig ist (Junn et al., 2005).

Um dieses Problem zu lösen, sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wo liegt die Bindungsstelle von DJ-1 an ASK1?
2. Wie ist das Zusammenspiel von DJ-1 mit anderen regulatorischen Proteinen wie Trx 1?
3. Beeinflusst DJ-1 die aktivierende Phosphorylierung von ASK1 an Threonin-838?
4. Welchen Einfluss haben aktivierende und reprimierende Phosphorylierungen von ASK1 auf die DJ-1-Bindung?

DJ-1 wird prominent in reaktiven Astrozyten exprimiert. Seine Funktion in diesen Zellen ist bisher vollkommen unbekannt. Zur Beantwortung dieser Frage wird ein Modellsystem aus primären Astrozytenkulturen aus *Dj-1^{-/-}*-Mäusen und wt-Wurfgeschwistern etabliert und diese mit LPS aus *E. coli* als proinflammatorisches Agens behandelt. Hierdurch sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat DJ-1 auf die Aktivierung von Astrozyten durch LPS und andere proinflammatorische Stressoren?
2. Wie beeinflusst DJ-1 die Produktion von inflammatorischen Markern wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Zytokinen?
3. Besitzt DJ-1 einen neuroprotektiven Effekt in inflammatorischen Systemen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Geräte	Herkunft
Autoklav	VX-150 (Systec, Wettenberg)
Blotkammer	Biorad (München)
Elektroporator	MicroPulser (Biorad, München)
Elektroporationsküvetten	Biorad (München)
FACS-Cytometer	Cyan flow (Dako, Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop	Imager Z1 (Zeiss, Jena)
Gelkammer für SDS-PAGE	PerfectBlue Twin S (Peqlab, Erlangen)
Gelkammer für Agarosegele	Peqlab (Erlangen)
Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Mikrotiterplattenphotometer	Model 680 (Biorad, München)
Mikrowelle	Panasonic (Hamburg)
Nanodrop	ND1000 (Peqlab, Erlangen)
Pipettierhilfe	Pipetboy (Integra Bioscience, Fernwald)
Präparierbesteck	Roth (Karlsruhe)
Rührer	RH basic (IKA, Staufen)
Schüttler	SSL3 (Stuart, Staffordshire, UK)
Sequenzierer	ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt)
Spannungsquelle	EV231 (Consort, Turnhout, Belgien)
Stereomikroskop	MZ7 (Leica, Solms)

Geräte	Herkunft
Sterilbank	Herasafe (Thermo Fisher Heraeus, Hanau)
Thermocycler	2720 (Applied Biosystems, Darmstadt)
Thermomixer	comfort (Eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge, ungekühlt	Biofuge pico (Thermo Fisher Heraeus, Hanau)
Tischzentrifuge, gekühlt	Mikro 22R (Hettich, Tutlingen) Biofuge fresco (Thermo Fisher Heraeus, Hanau)
Trocknungsrahmen	Sigma (München)
Überkopfschüttler	Labor-Brand (Gießen)
UV-Tisch	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Zählkammer (Neubauer)	Assistent (Sondheim)
Zellkulturinkubator	Heracell 240 (Thermo Fisher Heraeus, Hanau)
Zentrifuge	Multifuge 3 (Thermo Fisher Heraeus, Hanau) 5810R (Eppendorf, Hamburg)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialie	Herkunft
Blot-Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Einmalpipetten	Corning (Kaiserslautern)
Filme	GE Healthcare (Freiburg)
Mikrotiterplatten	Greiner (Frickenhausen)
Netze	Nitex 03-132/44, Nitex 03-210/40 (Sefar, München)
Objektträger	Langenbrinck (Emmendingen)
PCR-Reaktionsgefäße	PeqLab (Erlangen)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnbrecht) Biozym (Hess. Oldendorf)
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
PVDF-Membran	Millipore (Schwalbach)
Reaktionsgefäße (1.5 ml, 2 ml)	Greiner (Frickenhausen)

Materialie	Herkunft
Skalpelle	Braun (Melsungen)
Zellkulturflaschen	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturplatten 96 well, 24 well, 6 well, 14.5 cm 6 cm, 10 cm	Greiner (Frickenhausen) Corning (Kaiserslautern)

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
100 bp DNA-Leiter	Fermentas (St Leon-Rot)
1400W	Sigma (München)
40 % Acrylamid 19:1	Applichem (Darmstadt)
Agar	Serva (Heidelberg)
Agarose	Lonza (Wuppertal)
Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas (St Leon-Rot)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat	Roth (Karlsruhe)
Amphotericin B	Sigma (München)
Ampicillin	Sigma (München)
Amplify	GE Healthcare (Freiburg)
ATP	Sigma (München)
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	GE Healthcare (Freiburg) Hartmann (Braunschweig)
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	Fermentas (St Leon-Rot)
B-27-Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)
Bactoagar	BD (Heidelberg)
Bactopepton	BD (Heidelberg)
BCA	Pierce (Bonn)
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems (Darmstadt)
Blocking Solution	Roche (Mannheim)

Chemikalie	Herkunft
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Cholesterol	Sigma (München)
Complete Proteaseinhibitorcocktail	Roche (Mannheim)
Coomassie Brillant Blue R-250	Applichem (Darmstadt)
L-Cystein	Sigma (München)
DABCO	Roth (Karlsruhe)
DNA Blood and Tissue-Kit	Qiagen (Hilden)
Dulbecco´s modifiziertes Eagles Medium (DMEM)	Biochrom (Berlin)
DMEM, glucose-und pyruvatfrei	PAA (Pasching, Österreich)
DMEM, methionin- und cysteinfrei	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Applichem (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol, reinst	Merck (Darmstadt)
Ethanol, vergällt	Apotheke des UKT
Ethidiumbromid (1% in ddH ₂ O)	Sigma (München)
ExTaq	Takara (Verviers, Belgien)
FLAG-Agarose	Sigma (München)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA (Pasching, Österreich)
Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Gentamycin	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom (Berlin)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Applichem (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Griess-Reagenz	Sigma (München)

Chemikalie	Herkunft
HA-Agarose	Sigma (München)
10 x <i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS)	Sigma (München)
Hefeextrakt	Applichem (Darmstadt)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)- ethansulfonsäure (HEPES)	Roth (Karlsruhe)
Hoechst33342	Invitrogen (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Fluka (Buchs, Schweiz)
10 x Kinasepuffer	Cell Signaling (Frankfurt)
Lipopolysaccharide	Sigma (München)
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Maxiprep-Kit	Qiagen (Hilden)
β -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
L-Methionin	Sigma (München)
^{35}S -Methionin / ^{35}S -Cystein	GE Healthcare (Freiburg)
MOWIOL	Roth (Karlsruhe)
MYC-Agarose	Sigma (München)
Myelin basisches Protein (MBP)	Fluka (Buchs, Schweiz)
N-Acetylcystein	Sigma (München)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Sigma (München)
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)

Chemikalie	Herkunft
Natriumnitrit	Merck (Darmstadt)
Natriumpyrophosphat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Neurobasal-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Nonidet P-40 (NP-40)	United States Biological (Swampscott, USA)
OptiMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Sigma (München)
peqGold triFast	Peqlab (Erlangen)
PenicillinG / Streptomycinsulfat (100x)	Biochrom (Berlin)
polyI:C	Invivogen (Toulouse, Frankreich)
Proteinmarker	Biorad (München)
Quickchange Kit	Stratagene (La Jolla, USA)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St Leon-Rot)
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas (St Leon-Rot)
Rinderserumalbumin	Roth (Karlsruhe)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Sekundärantikörper	Jackson Immunoresearch (Suffolk, GB)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St Leon-Rot)
Taq	Promega (Mannheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem (Darmstadt)
Triton X-100	Applichem (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Biochrom (Berlin)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween-20	Applichem (Darmstadt)
Venor GeM	Minerva Biolabs (Berlin)
Wasserstoffperoxid	Sigma (München)
Xylencyanal	Merck (Darmstadt)
Zeocin	Invivogen (Toulouse, Frankreich)
Ziegenerum	Sigma (München)

3.1.4 Vektoren

Vektor	Resistenzgene	Herkunft
pCMV-myc	Ampicillin	Clontech (Heidelberg)
pCMV-HA	Ampicillin	Clontech (Heidelberg)
pIRES-ZsGreen	Kanamycin Neomycin	Clontech (Heidelberg)
pcDNA3.1-Zeocin	Ampicillin Zeocin	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3	Ampicillin	Invitrogen (Karlsruhe)

Die Vektorkarten finden sich im Anhang dieser Arbeit.

3.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 % Ammoniumperoxidisulfat APS	10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat in dd ₂ O
Antikörperpuffer	5 % Roche Blocking Solution 0.02 % Natriumazid in TBS
Blocklösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
1 % BSA	1 % (w/v) Rinderserumalbumin in PBS
Chase-Medium	DMEM 2 mM L-Glutamin 1 mM L-Cystein 1 mM L-Methionin 10 % FCS 10 units/ml PenicillinG 10 µg/ml Streptomycinsulfat

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
CoIP-Puffer	0.2% (v/v) NP-40 10 mM KCl 50 mM NaCl 1 mM EDTA 0.5 mM EGTA 1.5 mM MgCl ₂ 10 % (v/v) Glycerol 10 mM NaPP _i 50 mM HEPES (pH 7.5) Complete Proteaseinhibitorcocktail
Coomassie-Lösung	0.25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 in Entfärbelösung
DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerol 0.1 % Bromphenolblau 0.1 % Xylencyanal in ddH ₂ O
dNTPs	10 mM dATP 10 mM dTTP 10 mM dCTP 10 mM dGTP
Eindeckmedium	100 mM Tris-HCl pH 8.5 25 % (w/v) Glycerol 10 % MOWIOL 25 mg/ml DABCO in ddH ₂ O
Entfärbelösung	45 % Methanol 10 % Essigsäure in ddH ₂ O
70 % Ethanol	70 % (v/v) Ethanol in ddH ₂ O

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Ethanol/Natriumacetat	115 mM Natriumacetat pH 4.8 in Ethanol
50 % Glycerol	50 % (v/v) Glycerol in ddH ₂ O
10 % Glycerol	10 % (v/v) Glycerol in ddH ₂ O
HBSS-Medium	10 % 10 x HBSS 2.5 µg/ml Amphotericin B 10 units/ml PenicillinG 10 µg/ml Streptomycinsulfat in ddH ₂ O
Inkubationsmedium	glucose- und pyruvatfreies DMEM 5 mM Glucose
Kinasepuffer	10 % 10 x Kinasepuffer in ddH ₂ O
6 x Lämmli-Puffer	375 mM Tris-HCl pH 6.8 9 % SDS 50 % Glycerol 9 % β-Mercaptoethanol 0.01 % Bromphenolblau in ddH ₂ O
Laufpuffer	25 mM Tris 193 mM Glycin 3.5 mM SDS in ddH ₂ O
LB-Medium	1 % (w/v) Hefeextrakt 0.5 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl in ddH ₂ O

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
LB-Platten mit Ampicillin	1 % (w/v) Hefeextrakt 0.5 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl 1.5 % Agar 100 µg/ml Ampicillin in ddH ₂ O
LB-Platten mit Kanamycin	1 % (w/v) Hefeextrakt 0.5 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl 1.5 % Agar 25 µg/ml Kanamycin in ddH ₂ O
Lysepuffer	1 % Triton X-100 150 mM NaCl 2 mM EDTA 10 mM NaPP _i 50 mM Tris (pH 7,6) Complete Proteaseinhibitorcocktail in ddH ₂ O
M9-Puffer	48 mM Na ₂ HPO ₄ 22 mM KH ₂ PO ₄ 8.5 mM NaCl 18 mM NH ₄ Cl 2 mM MgSO ₄ 0.1 mM CaCl ₂ 0.2 % Glucose in ddH ₂ O
Miniprep-Puffer 1	0.9 % Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris in ddH ₂ O

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Miniprep-Puffer 2	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS in ddH ₂ O
Miniprep-Puffer 3	3 M Kaliumacetat pH 5.0 11.5 % Essigsäure in ddH ₂ O
Neuronenmedium	Neurobasal-Medium 10 % FCS B-27-Supplement 2 mM L-Glutamin 10 units/ml PenicillinG 10 µg/ml Streptomycinsulfat
NGM-Agar	50 mM NaCl 0.25 % (w/v) Bactopecton 1.7 % (w/v) Bactoagar 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgSO ₄ 25 mM KH ₂ PO ₄ pH 6.0 5 mg/l Cholesterol in ddH ₂ O
OptiMEM-Inkubationsmedium	OptiMEM 10 units/ml PenicillinG 10 µg/ml Streptomycinsulfat
4 % Paraformaldehyd	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7.4 (PBS)	2.2 mM KH ₂ PO ₄ 7.8 mM Na ₂ HPO ₄ 150 mM NaCl in ddH ₂ O

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Präparationspuffer	137 mM NaCl 5.4 mM KCl 0.2 mM KH ₂ PO ₄ 0.2 mM Na ₂ HPO ₄ 1 g/l Glucose 20 g/l Saccharose 50 µg/ml Gentamycin
Pulse-Medium	methionin- und cysteinfreies DMEM 2 mM L-Glutamin 10 units/ml PenicillinG 10 µg/ml Streptomycinsulfat
Sammelgelpuffer	0.5 M Tris-HCl pH 6.8 0.4 % SDS in ddH ₂ O
SOC-Medium	2 % Trypton 0.5 % Hefeextrakt 8.5 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glucose in ddH ₂ O
Selektionsmedium	DMEM 10 % FCS 400 µg/ml Zeocin
‘Stripping‘-Puffer	62,5 mM Tris pH 7.6 2 % SDS 100 mM β-Mercaptoethanol in ddH ₂ O

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
TBS	50 mM Tris pH 7.4 150 mM NaCl in ddH ₂ O
TBST	50 mM Tris pH 7.4 150 mM NaCl 0.5 % Tween-20 in ddH ₂ O
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin in ddH ₂ O
Trenngelpuffer	1.5 M Tris-HCl pH 8.8 0.4 % SDS in ddH ₂ O
Tris-Borat-EDTA-Puffer TBE	90 mM Tris 89 mM Borsäure 20 mM EDTA in ddH ₂ O
1 % Triton X-100	1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
Trocknungslösung	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Glycerol in ddH ₂ O
10 % Ziegenserum	10 % (v/v) Ziegenserum in PBS

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Subklonierung der DJ-1-Mutanten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Als Vorlage dienten hierbei die jeweiligen pCMV-myc-Konstrukte. Für die unterschiedlichen Vektoren wurden die in Tabelle 3.6 auf Seite 79 aufgelisteten Primer verwendet. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

5 μ l	10 x ExTaq-Puffer
1 μ l	dNTPs
1 μ l	Vorwärtsprimer (10 pmol/ μ l)
1 μ l	Rückwärtsprimer (10 pmol/ μ l)
1 μ l	DNA
0.5 μ l	ExTaq (5 U/ μ l)
40.5 μ l	ddH ₂ O

Folgende Bedingungen wurden für die PCR verwendet:

1 min	94°C
30 Zyklen	
	30 sek 94°C
	1 min 50°C
	2 min 72°C
6 min	72°C

Das PCR-Produkt wurde über ein 1 %-Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten, aus dem Gel aufgereinigt und verdaut.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung von linearisierten DNA-Fragmenten, überspiralisierter Plasmid-DNA oder zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele je nach Größe der Fragmente eingesetzt. Die entsprechende Menge Agarosepulver wurde in TBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst und mit Ethidiumbromid

Plasmid	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
pCMV-myc	5'-ACGAATTCGAATGGCTTCCAA AAGAGCTCTGGT-3'	5'-AGCGGCCGCGTCTTTAAGAAC AAGTGGAGCC-3'
pIRES	5'-CGCTAGCATGGCTTCCAAAAG AGCTCTGG-3'	5'-CGAATTCCTAGTCTTTAAGAAC AAGTGGAGCCTTC-3'
pcDNA3.1-Zeo	5'-ACGAATTCGAATGGCTTCCAA AAGAGCTCTGGT-3'	5'-AGCGGCCGCGTCTTTAAGAAC AAGTGGAGCC-3'

Tabelle 3.6 – Klonierungsprimer

in einer Endkonzentration von 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ versetzt. Die Lösung wurde in eine Agarosegelkammer gegossen und ein Ladetaschenkamm eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Eine 100 bp-DNA-Leiter diente zum Größenvergleich. Die DNA-Fragmente wurden bei 100 V aufgetrennt.

3.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA wurde mit einem Skalpell auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und mit dem Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

3.2.4 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

1 μg DNA wurde mit 10 U des Restriktionsenzym in einem 20 μl -Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym nach Anleitung des Herstellers Hitze-inaktiviert, die DNA auf ein Gel aufgetragen und aus diesem isoliert.

3.2.5 Ligation von DNA

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase ligiert. Hierzu wurde die Konzentration des geschnittenen Plasmids und des einzufügenden DNA-Fragments bestimmt. Diese wurden dann in einem molaren Fragment/Plasmid-Verhältnis von 5:1 gemischt und mit 2 μl T4 DNA-Ligase-Puffer (Fermentas) und 1 U

T4 DNA-Ligase (Fermentas) in einem 20 μl -Ansatz über Nacht bei 15°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA in kompetente Bakterien transformiert.

3.2.6 Transformation elektrokompenter Bakterien

Zur Transformation von DNA in Bakterien wurden elektrokompente *E. coli* Top10 verwendet. Die DNA wurde mit 50 μl Bakterien gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Mischung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Biorad) pipettiert und im MicroPulser Elektroporator (Biorad) mit 2500 V elektroporiert. Die elektroporierten Bakterien wurden in 750 μl SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C und 450 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf vorgewärmten LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubator inkubiert.

3.2.7 Colony-PCR

Die Colony-PCR wurde genutzt, um Bakterienklone auf das Vorhandensein eines Plasmids zu testen. Einzelklone wurden mit einer Pipettenspitze gepickt, eine Replikplatte angeimpft und die Bakterien in 50 μl ddH₂O auf Eis lysiert. Das Lysat wurde in einer PCR mit Primern spezifisch für das untersuchte Plasmid analysiert. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

2 μl	5 x PCR-Puffer
0.2 μl	dNTPs
0.2 μl	Vorwärtsprimer (10 pmol/ μl)
0.2 μl	Rückwärtsprimer (10 pmol/ μl)
3 μl	Bakterienlysat
0.025 μl	Taq (5 U/ μl)
4.375 μl	ddH ₂ O

Für die PCR wurden folgende Bedingungen verwendet:

2 min	94°C
25 Zyklen	
10 sek	94°C
2.30 min	50°C
2 min	72°C
6 min	72°C

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %-Agarosegel aufgetrennt.

3.2.8 Minipräparation von Plasmiden

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 2 ml der Kultur wurden für 10 min bei 8000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 μ l Miniprep-Puffer 1 resuspendiert und die Bakterien durch Zugabe von 150 μ l Miniprep-Puffer 2 lysiert. Nach Zugabe von 150 μ l Miniprep-Puffer 3 wurden die Lysate für 15 min bei 18000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde das Plasmid durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol und Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm gefällt. Anschließend wurde die DNA mit 1 ml 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 30 μ l ddH₂O gelöst und für Restriktionsverdauung und Sequenzierungen verwendet.

3.2.9 Sequenzierung

Zum Ausschluss von Mutationen wurden alle verwendeten Konstrukte sequenziert. Hierzu wurde das Kettenabbruchverfahren nach Sanger verwendet. Die Sequenzierung erfolgte mit dem BigDye Terminator v3.1-Kit (Applied Biosystems) nach Anleitung des Herstellers.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

2 μl BigDye Terminator v3.1
1 μl 5 x Reaktionspuffer
1 μl Primer (10 pmol/ μl)
500 ng DNA

Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 10 μl aufgefüllt.

Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler mit den folgenden Bedingungen:

1 min 94°C
30 Zyklen
10 sec 94°C
5 sec 50°C
4 min 60°C

Das PCR-Produkt wurde mit 26 μl Ethanol/Natriumacetat gefällt und für 45 min bei 3220 g bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und zum Trocknen über Kopf für 1 min bei 600 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 15 μl ddH₂O gelöst. 7 μl des Reaktionsprodukts wurden mit 15 μl Formamid versetzt und im ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analysiert.

3.2.10 Maxipräparation von Plasmiden

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Hierzu wurden 1000 ml LB-Medium mit Antibiotikum mit einem Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden für 30 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert und die Plasmide mit dem Maxiprep-Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

3.2.11 Anlegen von Glycerolstocks

600 μl einer frischen Über Nacht-Kultur wurden mit 400 μl 50 % Glycerol (w/v) gemischt und bei -80°C gelagert.

3.2.12 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

50 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* Top10 von einer frisch ausgestrichenen Platte angeimpft und über Nacht inkubiert. 10 ml dieser Vorkultur wurden verwendet um 500 ml LB-Medium anzupfen. Diese wurden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 geschüttelt. Die Bakterien wurden für 20 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert und anschließend wieder für 20 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Bakterien wurden nacheinander in 250 ml, 100 ml und 50 ml ddH₂O resuspendiert und danach jeweils abzentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 5 ml 10 % Glycerol (v/v) resuspendiert und die Bakterien in 50 µl-Aliquots bei -80°C eingefroren.

3.2.13 Gerichtete Mutagenese

3.2.13.1 DJ-1-Mutanten

Die gerichtete Mutagenese von DJ-1 wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen mit dem Mutagenesevorwärtsprimer und pCMV-Not-rev bzw pCMV-Eco-for und dem Mutageneserückwärtsprimer angesetzt. Die Mutageneseprimer finden sich in Tabelle 3.7. Als Vorlage diente pCMV-myc-DJ-1 wt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	dNTPs
1 µl	Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
1 µl	Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
1 µl	DNA
0.5 µl	ExTaq (5 U/µl)
40.5 µl	ddH ₂ O

Die Bedingungen für die PCR sind unter 3.2.1 auf Seite 78 beschrieben.

Die isolierten PCR-Produkte wurden als Vorlage für eine weitere PCR mit den Primern pCMV-Eco-for und pCMV-Not-rev verwendet:

Mutation	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
C106D	5'-CCGCCATCGATGCAGGTC-3'	5'-GACCTGCATCGATGGCGG-3'
C106E	5'-CCGCCATCGAGGCAGGTC-3'	5'-GACCTGCCTCGATGGCGG-3'
C106DD	5'-GCCGCCATCGATGATGCAGGTC CTAC-3'	5'-GTAGGACCTGCATCATCGATGG CGGC-3'
C106EE	5'-GCCGCCATCGAAGAAGCAGGTC CTAC-3'	5'-GTAGGACCTGCTTCTTCGATGG CGGC-3'
C106DDD	5'-GCCGCCATCGATGATGATGCAG GTCCTAC-3'	5'-GTAGGACCTGCATCATCATCGA TGGCGGC-3'
C106EEE	5'-GCCGCCATCGAAGAAGAAGCAG GTCCTAC-3'	5'-GTAGGACCTGCTTCTTCTTCGA TGGCGGC-3'
M17I	5'-GGAGCAGAGGAAATAGAGACGG TCATC-3'	5'-GATGACCGTCTCTATTTCTCT GCTCC-3'
M26I	5'-TGTAGATGTCATTAGGCGACTG- 3'	5'-CAGCTCGCCTAATGACATCTACA- 3'
M133I	5'-GCTAAAGACAAAATAATGAATG GAGGTC-3'	5'-GACCTCCATTTCATTATTTGTCT TTAGC-3'
M134I	5'-GCTAAAGACAAAATGATAAATG GAGGTC-3'	5'-GACCTCCATTTATCATTTTGTCT TTAGC-3'

Tabelle 3.7 – DJ-1-Mutageneseprimer

5 μ l	10 x PCR-Puffer
1 μ l	dNTPs
1 μ l	pCMV-Eco-for (10 pmol/ μ l)
1 μ l	pCMV-Not-rev (10 pmol/ μ l)
1 μ l	PCR-Produkt 1
1 μ l	PCR-Produkt 2
0.5 μ l	ExTaq (5 U/ μ l)
39.5 μ l	H ₂ O

Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und Not1 verdaut und in den pCMV-myc-Vektor ligiert.

Mutation	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
S83A	5'-GCCGGGGCAGCGCTGTTGGCG GG-3'	5'-CCCGCCAACAGCGCTGCCCG GC-3'
T838A	5'-ATAAACCCCTGTACTGAAGCT TTTACTGGTACCCTCC-3'	5'-GGAGGGTACCAGTAAAAGCTT CAGTACAGGGGTTTAT-3'
T842A	5'-CCTGTACTGAAACTTTTACTG GTGCCCTCCAGTATATGG-3'	5'-CCATATACTGGAGGGCACCAG TAAAAGTTTCAGTACAGG-3'
S967A	5'-GAATATCTCAGGAGTATAGCC TTGCCGGTACCTG-3'	5'-CAGGTACCGCAAGGCTATAC TCCTGAGATATTC-3'

Tabelle 3.8 – ASK1-Mutageneseprimer

3.2.13.2 ASK-1-Mutanten

Die gerichtete Mutagenese von ASK-1 wurde mit Hilfe des Quickchange-Kits (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Vorlage wurde pcDNA3-ASK-1-HA verwendet. Die Mutageneseprimer finden sich in Tabelle 3.8.

3.2.14 RNA-Isolation

RNA aus Zellen wurde nach der Trizol-Methode isoliert. Hierzu wurde das peqGold triFast-Kit (PeqLab) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

3.2.15 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR

Mit Hilfe von reverser Transkription und anschließender PCR wurden die mRNA-Mengen verschiedener Zielgene bestimmt. Die Reverse Transkriptase schreibt die mRNA in cDNA um. Für die Reverse Transkriptase-Reaktion wurden 1 μg RNA und 1 μl Oligo-dT-Primer mit RNase-freiem Wasser auf 11 μl aufgefüllt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 4 μl 5 x Reaktionspuffer, 1 μl RiboLock RNase-Inhibitor und 2 μl dNTP-Mix zugegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde noch 1 μl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas) zugegeben und der Ansatz für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 10 min gestoppt.

Die gebildete cDNA wurde anschließend in einer PCR mit spezifischen Primern amplifiziert (Tabelle 3.9 auf Seite 87). Folgender Ansatz wurde verwendet:

5 μ l	5 x PCR-Puffer
1 μ l	dNTP
0.5 μ l	Vorwärtsprimer (10 pmol/ μ l)
0.5 μ l	Rückwärtsprimer (10 pmol/ μ l)
1 μ l	cDNA
0.1 μ l	Taq (5 U/ μ l)
16.9 μ l	ddH ₂ O

Für die PCR wurden folgende Bedingungen verwendet:

2 min	94°C
25 Zyklen	
1 min	94°C
30 sek	54°C
1 min	72°C
6 min	72°C

Die Vervielfältigungsrate war bei 25 Zyklen linear, wie auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel gezeigt wurde.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

3.2.16 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA aus Mausgewebe zur Genotypisierung wurde mit Hilfe des DNA Blood and Tissue-Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

3.2.17 Genotypisierung der *Dj-1 knockout*-Mäuse

Die *Dj-1 knockout*-Mäuse wurden mit einer Triplex-PCR mit der genomischen DNA der Mäuse als Vorlage genotypisiert. Hierbei wird ein Vorwärtsprimer verwendet, der sowohl im Wildtyp- als auch im Knockout-Allel bindet. Die beiden Rückwärtsprimer

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
β -ACTIN	5'-CTAAGGCCAACCGTGAA-3'	5'-CCGGAGTCCATCACAAT-3'
COX-2	5'-TCCTCCTGGAACATGGACTC-3'	5'-CCCCAAAGATAGCATCTGGA-3'
DJ-1	5'-ACGAATTCGAATGGCTTCCAA AAGAGCTCTGGT-3'	5'-AGCGGCCGCGTCTTTAAGAAC AAGTGGAGCC-3'
IL-1 β	5'-CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3'	5'-AGGCCACAGGTATTTTGTCTG-3'
IL-6	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'	5'-GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-3'
NGF	5'-GCAGTGAGGTGCATAGCGTA-3'	5'-CACTGAGAACTCCCCCATGT-3'
NOS1	5'-AGCACCTACCAGCTCAAGGA-3'	5'-ATGGGTACTTCCAGCACCCAG-3'
NOS2	5'-GTGGTGACAAGCACATTTGG-3'	5'-GGCTGGACTTTTCACTCTGC-3'
NOS3	5'-GCAAGACCTCCTGAGGACAG-3'	5'-AGAAAAGCTCTGGGTGCGTA-3'
TNF-alpha	5'-AGCCCCCAGTCTGTATCCTT-3'	5'-AGCAAAGAGGAGGCAACAA-3'

Tabelle 3.9 – RT-PCR-Primer

binden entweder das Wildtyp-Allel mit einem PCR-Produkt von 600 bp oder das Knockout-Allel mit einem PCR-Produkt von 400 bp.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

5 μ l	5 x PCR-Puffer
1 μ l	Vorwärtsprimer (5'-AGGCAGTGGAGAAGTCCATC-3')
0.5 μ l	Wildtyp-Rückwärtsprimer (5'-AACATACAGACCCGGGATGA-3')
0.5 μ l	Knockout-Rückwärtsprimer (5'-CGGTACCAGACTCTCCCATC-3')
0.5 μ l	dNTPs
10 μ l	DNA
1.25 μ l	DMSO
0.25 μ l	Taq
6 μ l	ddH ₂ O

Für die PCR wurden folgende Bedingungen verwendet:

2 min	94°C
30 Zyklen	
1 min	94°C
30 sek	50°C
1 min	72°C
5 min	72°C

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Die Gesamtproteinmenge von Zelllysaten wurde mit dem BCA-Kit (Pierce) gemessen. 10 μ l des 1:10-verdünnten Lysats wurde mit 200 μ l des Detektionsreagenz gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurde eine Standardkurve aus BSA in Lysepuffer oder CoIP-Puffer mit einer Konzentration von 0 - 1.5 mg/ml analog inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Extinktion bei 560 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen und die Proteinkonzentration aus der Standardkurve errechnet.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das negativ geladene SDS bindet Proteine, wodurch diese eine negative Gesamtladung erhalten. Ihre Laufgeschwindigkeit ist dadurch vor allem durch ihr Molekulargewicht bestimmt. Die Gele bestehen aus einem Trenn- und einem Sammelgel, weshalb man auch von diskontinuierlicher SDS-PAGE spricht. Die Zusammensetzung der Trenngele ist in Tabelle 3.10 auf Seite 89 aufgeführt, die des Sammelgels in Tabelle 3.11 auf Seite 89. 25 μ g Proteinlysate wurde im Verhältnis 5:1 mit 6 x Lämmli-Puffer (Laemmli, 1970) gemischt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Je nachdem, ob dem 6 x Lämmli-Puffer β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde, wurde die SDS-PAGE reduzierend oder nichtre-

Trenngel	6 %	7.5 %	10 %	12.5%	15 %
Trenngelpuffer	2.75ml	2.75ml	2.75ml	2.75ml	2.75ml
40 % Acrylamid 19:1	1.7ml	2.1 ml	2.8 ml	3.4 ml	4.1 ml
ddH₂O	6.5ml	6.1 ml	5.4 ml	4.7 ml	4.1 ml
10 % APS	0.110 ml	0.110 ml	0.110 ml	0.110 ml	0.110 ml
TEMED	0.011 ml	0.011 ml	0.011 ml	0.011 ml	0.011 ml

Tabelle 3.10 – Zusammensetzung der Trenngele

	Sammelgel
Sammelgelpuffer	0.69 ml
40 % Acrylamid 19:1	0.31 ml
ddH₂O	1.7 ml
10 % APS	0.028 ml
TEMED	0.003 ml

Tabelle 3.11 – Zusammensetzung des Sammelgels

duzierend durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurden 10 μ l Proteinmarker geladen. Die Elektrophorese wurde für 30 min bei 110 V und danach bei 140 V durchgeführt.

3.3.3 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Hierzu wurde die Membran in Methanol für 1 min aktiviert. Danach wurden die Membran, das Gel, die Blotting-Papiere und die Blotting-Schwämme in Transferpuffer äquilibriert. Das Blot-Sandwich besaß folgenden Aufbau:

- Kathode
- Schwamm
- Blotting-Papier

- Gel
- PVDF-Membran
- Blotting-Papier
- Schwamm
- Anode

Der Transfer erfolgte im Kühlraum für 2 h bei 100 V oder über Nacht bei 25 V. Am Ende des Transfers wurde die Membran für 1 h bei RT in Blocklösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Bei peroxidasegekoppelten Primärantikörpern wurde die Membran viermal für 15 min mit TBST gewaschen, bevor die Proteine detektiert wurden. Bei der Verwendung eines peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers wurde die Membran dreimal für 15 min mit TBST und einmal mit Blocklösung gewaschen, bevor die Membran mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert wurde. Danach wurde die Membran wieder viermal für 15 min mit TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) nach Anleitung des Herstellers. Gleiche Volumina der Detektionslösung A und B wurden gemischt und die Membran für 5 min hiermit inkubiert. Die Signale wurden auf Hyperfilm ECL high performance chemiluminescence - Filmen (GE Healthcare) nachgewiesen.

3.3.4 Antikörper

Die Verdünnungen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Primärantikörper wurden in Antikörperpuffer, Sekundärantikörper in Blocklösung verdünnt.

Antigen	Klon	Spezies	Verd. WB	Verd. IF	Verd. IP	Herkunft
ASK-1	H-300	Kaninchen	5000	-	100	Santa Cruz
phospho-ASK (S83A)		Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling

Antigen	Klon	Spezies	Verd. WB	Verd. IF	Verd. IP	Herkunft
phospho-ASK (T838A)		Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling
phospho-ASK (T838A)		Kaninchen	5000			Hidenori Ichijo Univ. Tokyo, Japan
phospho-ASK (S967A)		Kaninchen	1000			Cell Signaling
Caspase-3 geschnitten		Kaninchen	-	1000	-	Cell Signaling
DAXX	25C12	Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling
DJ-1	3E8	Maus	1000	1000	-	Stressgen
DJ-1		Kaninchen	1000	1000	-	Alphagenix
ERK1/2		Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling
phospho-ERK (Thr202/Tyr204)		Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling
FLAG	M2	Maus	5000	-	500	Sigma
GAPDH		Maus	5000	-	-	BioTrend
GFAP		Kaninchen	-	1000	-	Dako
JNK1/2		Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling
phospho-JNK1/2 (Thr183/Tyr185)		Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling
Kaninchen-HRP		Ziege	1000	-	-	Jackson
MAP2		Maus	-	2000	-	
Maus-HRP		Ziege	1000	-	-	Jackson
Myc	9E10	Maus	10000	5000	-	Hybridoma Bank, University of Iowa
Myc-POD	9E10	Maus	40000	-	-	Sigma
NOS2		Maus	2000	-	-	Sigma
Nrf2		Kaninchen	200	-	-	Santa Cruz
phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	3D7	Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling
p38		Kaninchen	1000	-	-	Cell Signaling
p65 (NF κ B)	F-6	Maus	-	100	-	Santa Cruz
α -Tubulin		Maus	5000	-	-	Sigma

3.3.5 'Stripping' von Western Blots

Um eine PVDF-Membran nach dem Blotten mit verschiedenen AK zu analysieren, wurde diese in 'Stripping'-Puffer bei 56°C 30min lang im Wasserbad geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen und für 1 h mit Blocklösung geblockt. Danach konnte sie wieder für einen immunchemischen Nachweis verwendet werden.

3.3.6 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Coomassie-Färbung wurde zur Detektion des Gesamtproteins auf Polyacrylamid-Gelen verwendet. Hierzu wurde das Gel für 60 min in Coomassie-Lösung und anschließend über Nacht in Entfärbelösung geschwenkt. Zum Trocknen des Gels wurde dieses für 30 min in Trocknungslösung äquilibriert und anschließend im Trocknungsrahmen nach Anleitung des Herstellers getrocknet.

3.3.7 Co-Immunpräzipitation

HEK 293E wurden in einer Konzentration von 0.5×10^6 Zellen/ml in 10 cm-Platten ausgesät und 12 h später transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für 30 min in Inkubationsmedium mit oder ohne H_2O_2 inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen in eiskaltem PBS aufgenommen, mit PBS gewaschen und in 1 ml CoIP-Puffer lysiert (siehe 3.4.8 auf Seite 100). Gleiche Proteinmengen in einem Gesamtvolumen von 1 ml wurden für eine Immunpräzipitation mit 40 μ l HA-Agarose über Nacht über Kopf rotiert. Die Beads wurden dreimal mit CoIP-Puffer gewaschen und anschließend in 50 μ l 6 x Lämmli für 15 min bei 95 °C aufgekocht. Die Proteine wurden über eine 12.5 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der Proteine erfolgte sequenziell mit anti-MYC (DJ-1), anti-Trx und anti-ASK.

3.3.8 Immunkomplexkinaseassay

Die Aktivität der Kinase ASK-1 wurde durch einen Immunkomplexkinaseassay bestimmt. Stabil retransfizierte *Dj-1*^{-/-}-MEF wurden in einer Konzentration von 200000 Zellen /ml in 14.5 cm-Platten in DMEM/10 % FCS ausgesät. 72 Stunden später wurden die Zellen für 30 min in Inkubationsmedium mit oder ohne H₂O₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml CoIP-Puffer lysiert (siehe 3.4.8 auf Seite 100) und die Proteinkonzentration bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden mit 10 µl ASK-Antikörper in 1 ml Gesamtvolumen über Nacht über Kopf rotiert. Am Morgen wurden 40 µl Protein A-Agarose zugegeben und die Proben für zwei Stunden rotiert. Anschließend wurden die Agarosebeads dreimal mit CoIP-Puffer und einmal mit Kinasepuffer gewaschen. Für die Kinasereaktion wurden die Beads in 50 µl Kinasepuffer mit 0.2 µg/µl Myelin basischem Protein (MBP), 0.2 mM ATP und 5 µCi γ -³²P-ATP resuspendiert und für 20 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 6 x Lämmli gestoppt und die Proben für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proteine wurden über eine 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Anfärbung mit Coomassie wurde das Gel getrocknet. Die Radioaktivität wurde auf Hyperfilm ECL high performance chemiluminescence - Filmen (GE Healthcare) bei -80°C nachgewiesen.

3.3.9 Pulse-Chase

HEK 293E und MEF-Zellen wurden in einer Konzentration von 0.5 x 10⁶ Zellen/ml in 6cm-Platten ausgesät. Nach 12 Stunden wurden sie mit verschiedenen DJ-1-Konstrukten transfiziert. 24 Stunden später wurde das Medium entfernt, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und für eine Stunde mit 5 ml Pulse-Medium vorinkubiert. Danach wurde das Medium zu 3 ml Pulse-Medium mit 14.4 µCi/ml [³⁵S]Methionin/[³⁵S]Cystein gewechselt und die Zellen für 3 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Chase-Medium gewaschen und für 0, 0.5, 2, 6, 10, 18 und 24 h mit Chase-Medium inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Lysepuffer lysiert (siehe 3.4.8 auf Seite 100). Gleiche Proteinmengen wurden für eine Immunpräzipitation mit MYC-Agarose eingesetzt. Die Lysate wurden über Nacht mit 20 µl MYC-Agarose inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit Lysepuffer wurden diese in 30 µl 6 x Lämmli für 5 min bei 95°C aufgeköcht und die Proteine

über eine 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und vor dem Trocknen zur Verstärkung des Signals für 30 min in Amplify inkubiert. Die Radioaktivität wurde auf Hyperfilm ECL high performance chemiluminescence - Filmen (GE Healthcare) bei -80°C nachgewiesen. Die Intensität der Banden wurde mit dem ImageQuant-Programm (Amersham) quantifiziert. Die Intensitäten wurden als prozentualer Anteil der Intensität zum Zeitpunkt 0 berechnet. Die Halbwertszeit metabolisch markierter Proteine wurde durch nicht-lineare Regression ($y=e^{-kt}$) mit dem Programm ORIGIN errechnet.

3.3.10 Zytotoxizitätsmessung

Die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 - und LPS-Behandlungen wurde über die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium bestimmt. 10000 Zellen/*well* wurden in einer 96 *well*-Platte ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit H_2O_2 oder LPS behandelt. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Hälfte der wells in 0.9 % Triton X-100 lysiert. Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte mit dem Cytotox96-Kit (Promega) nach Anleitung des Herstellers. Die Zytotoxizität wurde aus dem Quotienten der LDH-Aktivität im Medium und der Gesamt-LDH-Aktivität berechnet.

3.3.11 Stickstoffmonoxid-Quantifizierung

Stickstoffmonoxid (NO) im Zellkulturüberstand wurde durch den Nachweis seines stabilen Abbauprodukts Nitrit (NO_2^-) bestimmt. Primäre Astrozytenkulturen wurden mit und ohne LPS in OptiMEM-Inkubationsmedium inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und zu gleichen Teilen mit Griess-Reagenz (Sigma) gemischt. Die Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve, für die Natriumnitrit in einer Konzentration von 0 - 50 μM frisch in OptiMEM gelöst wurde. Nach 15 min wurde die Absorption bei 540 nm gemessen und anhand der Standardkurve die Nitritkonzentration berechnet. Die erhaltenen Werte wurden auf die Proteinmenge pro *well* normalisiert.

3.3.12 Interleukin-6-ELISA

Sekretiertes Interleukin-6 (IL-6) wurde im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Primäre Astrozytenkulturen wurden mit und ohne LPS in OptiMEM-Inkubationsmedium inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1:25 verdünnt. IL-6 wurde mit dem BD OptEIA Maus IL-6 ELISA-Kit (BD Biosciences) nach Anleitung des Herstellers bestimmt und mit Hilfe einer Standardkurve aus rekombinantem IL-6 quantifiziert. Die erhaltenen Werte wurden auf die Proteinmenge pro *well* normalisiert.

3.3.13 Untersuchung von *C. elegans*

Der *C. elegans* Wildtyp-Stamm N2, die Deletionsmutante der DJ-1-Homologe *djr-1.1(tm918);djr-1.2(tm1346)* und die NSY- und SEK-*knockout*-Mutanten wurden freundlicherweise von Wolfdieter Springer zur Verfügung gestellt. Um Würmer gleichen Alters zu erhalten, wurden adulte Würmer für 3 h bei 25°C zum Eierlegen inkubiert und anschließend entfernt. Drei Tage später wurden die adulten Würmer, die sich aus den Eiern entwickelt hatten, für Experimente verwendet. Zur Untersuchung der p38^{MAPK}-Aktivität wurden 50 N2- und *djr1/2-ko*-Würmer für 24 h entweder mit dem *E. coli* Stamm OP50 oder dem *P. aeruginosa* Stamm Boston 41501 auf NGM-Agar gefüttert. Die Würmer wurden in M9-Puffer auf Eis gesammelt, bei 1400 rpm und 4°C für 5 min abzentrifugiert und in 50 µl 6 x Lämmli für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proteine wurden auf einer 7.5 % SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und sequenziell mit Antikörpern gegen phospho-p38 und α-Tubulin inkubiert.

Zur Untersuchung der Überlebensrate wurden jeweils 5 x 20 adulte Würmer pro Stamm auf OP50 oder *P. aeruginosa* inkubiert und alle 12 - 24 h die Zahl der überlebenden Würmer bestimmt. Um die Vermischung mit jüngeren Würmern zu verhindern, wurden die adulten Würmer alle 48 h auf neue Platten umgesetzt.

3.3.14 Immunfluoreszenz

Zellen wurden in einer Konzentration von 20000/ml auf Deckgläschen ausgesät. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 30 min mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd/PBS inku-

biert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 % (v/v) Triton X-100/PBS für 30 min permeabilisiert. Nach abermaligem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen mit 10 % Ziegenerum für 60 min abgeblockt. Hiernach wurden die Zellen mit dem Primärantikörper - gelöst in 1 % (w/v) BSA - für 60 min inkubiert. Zwischen Primär- und Sekundärantikörper wurden die Zellen wieder dreimal mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Er wurde in 1 % (w/v) BSA gelöst und für 60 min zu den Zellen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min mit dem Kernfarbstoff Hoechst33342 (Invitrogen) inkubiert. Hiernach wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Deckgläschen mit Eindeckmedium auf Objektträger eingedeckt wurden.

3.3.15 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Primäre Astrozytenkulturen wurden mit und ohne LPS in OptiMEM-Inkubationsmedium inkubiert. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und abtrypsiniert. Die abtrypsinierten Zellen wurden in DMEM / 10 % FCS aufgenommen und noch einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden 1×10^6 Zellen in PBS mit $4 \mu\text{g/ml}$ anti-CD54 Antikörper, gekoppelt mit Phycoerythrin (BioLegend), oder anti-CD11b Antikörper, gekoppelt mit PacificBlue (Caltag), resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und danach bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert. Für jede Probe wurden ca 50000 Zellen im CyAn flow Cytometer (Dako) gemessen. Für CD54 wurden die Zellen mit dem 488 nm Argon Laser angeregt und die Emission durch den Phycoerythrinfilter (575 nm) gemessen, während die Anregung bei CD11b mit dem 405 nm-Laser erfolgte und die Emission mit dem 450 nm-Filter detektiert wurde. Der prozentuale Anteil von Zellen oberhalb oder unterhalb des Schwellenwerts wurde mit der Summit v4.2-Software berechnet.

Zelllinie	Organismus	Medium	Herkunft
HEK 293 E Embryonale Nierenzellen	Mensch	DMEM + 10 % FCS	ATCC
MEF Embryonale Fibroblasten	Maus	DMEM + 10 % FCS	Karin Görner
MEF stabil retransfiziert	Maus	DMEM + 10 % FCS 400 µg/ml Zeocin	selbst angelegt
APC primäre Astrozyten	Maus	DMEM + 10 % FCS + 10 units/ml PenicillinG + 10 µg/ml Streptomycinsulfat	selbst angelegt
NPC primäre kortikale Neurone	Maus	Neurobasal-Medium + 10 % FCS + B-27 + 2 mM Glutamin + 10 units/ml PenicillinG + 10 µg/ml Streptomycinsulfat	selbst angelegt

Tabelle 3.13 – Verwendete Zelllinien

3.4 Zellkultur

3.4.1 Kultivierung von Zellen

Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293 E), embryonale Maus-Fibroblasten (MEF), primäre Astrozytenkulturen und primäre Neuronenkulturen wurden bei 5 % CO₂ und 37°C in einem Zellkulturinkubator kultiviert. Die entsprechenden Medien und Bedingungen sind in Tabelle 3.13 auf Seite 97 aufgeführt. Alle Zellen wurden routinemäßig mit Venor GeM (Minerva Biolabs) auf Mycoplasmenkontaminationen untersucht.

HEK und MEF wurden in 175 cm²-Flaschen kultiviert. Die HEK-Zellen wurden durch Abklopfen vom Flaschenboden gelöst, durch Trituieren vereinzelt, entsprechend verdünnt und für Experimente und zur weiteren Kultivierung ausgesät. Die MEF-Zellen wurden mit 5 ml Trypsin/EDTA abtrypsinisiert, in 25 ml Medium aufgenommen und durch Trituieren vereinzelt. Danach wurden sie entsprechend verdünnt und für Experimente und zur weiteren Kultivierung ausgesät.

3.4.2 Primäre Astrozytenkulturen

Astrozytenreiche Primärkulturen aus wt- und *Dj-1^{-/-}*-Mäusen wurden nach dem Protokoll von Hamprecht und Löffler (1985) angelegt. Jedes Gehirn wurde hierbei separat behandelt und für eine einzelne Kultur verwendet. Alle Schritte wurden hierbei unter der Sterilbank auf Eis durchgeführt. Neugeborenen Mäusen wurde das Gehirn entnommen und in kaltem Präparationspuffer gewaschen. Zusätzlich wurden Gewebeproben der Mäuse zur Genotypisierung eingefroren. Die Zellen wurden dissoziiert, indem sie mechanisch durch zwei Netze mit der Maschenweite 210 μm und 135 μm gepresst wurden. Die dissoziierten Zellen wurden bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugiert und anschließend in warmem DMEM mit 10 % FCS (PAA Laboratories) und 10 units/ml PenicillinG / 10 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycinsulfat (Biochrom) aufgenommen und in einer Konzentration von 300000 lebenden Zellen/*well* in 24 well-Platten ausgesät. Das Medium wurde an jedem siebten Tag gewechselt. Für die Experimente wurden 14 - 23 Tage alte Kulturen verwendet.

3.4.3 Kortikale Neuronenkulturen

Kortikale Neuronenkulturen aus wt- und *Dj-1^{-/-}*-Mäusen wurden anhand eines modifizierten Protokolls von Lin und Kollegen (Lin et al., 2000) angelegt. Jedes Gehirn wurde hierbei separat behandelt und für eine einzelne Kultur verwendet. Neugeborene Mäuse (jünger als 24 h) wurden durch Dekapitation getötet. Die Gehirne wurden herauspräpariert und die Kortizes isoliert. Zusätzlich wurden Gewebeproben der Mäuse zur Genotypisierung eingefroren. Alle folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, unter der Sterilbank auf Eis ausgeführt. Die Kortizes wurden zweimal mit HBSS-Medium gewaschen und für 10 min in 0.0625 % Trypsin/0.0025 % EDTA in HBSS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe zehnmals mit einer 10 ml-Pipette trituiert und dann für 5 min auf Eis gelagert, damit sich undissoziierte Gewebestücke absetzen können. Der Überstand wurde abgenommen und in 1 ml kaltes Neuronenmedium gegeben. Das Pellet wurde wieder in 0.5 ml HBSS aufgenommen und mit einer 10 ml-Pipette trituiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Überstand abgenommen und zum vorherigen Überstand zugegeben. Dieser Vorgang wurde noch viermal wiederholt, wobei das Gewebe diesmal mit einer P1000-Pipette tri-

tuert wurde. Die gesammelten Überstände wurden durch ein 40 μm -Zellsieb gefiltert und anschließend in einer Dichte von 50000 vitalen Zellen/ml in Neuronenmedium auf einer Lage konfluenten Astrozyten ausgesät. Nach einer Stunde wurde das Medium gegen 1 ml frisches Neuronenmedium ausgetauscht. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

3.4.4 Transiente Transfektion

HEK 293 E- und MEF-Zellen wurden mit Fugene 6 (Roche) nach Anleitung des Herstellers transfiziert. Für ein *well* einer 6 well-Platte wurde 1 μg Plasmid-DNA verwendet, für eine 6 cm-Platte 2 μg und für eine 10 cm-Platte 6 μg DNA. Es wurde ein Fugene/DNA-Verhältnis von 4.5:1 eingesetzt. Die Zellen wurden 36 - 48 h nach der Transfektion für Experimente verwendet.

3.4.5 Stabil retransfizierte *Dj-1*^{-/-}-MEF

500000 *Dj-1*^{-/-}-MEF wurden in einer 10 cm-Platte ausgesät. 12 Stunden später wurden sie mit [wt]DJ-1, verschiedenen DJ-1-Mutanten oder dem Leervektor pcDNA3.1-Zeo (Invitrogen) transfiziert. 48 h später wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Nach einer Woche wurden die übriggebliebenen Zellen abtrypsinisiert und in einer Dichte von 0.5 Zellen/*well* in 96 *well*-Platten ausgesät. Die Einzelklone wurden expandiert und expressionsgleiche Klone anhand von Western Blot und RT-PCR ausgewählt.

3.4.6 Lentivirale Transduktion

Zur Transduktion von primären Astrozytenkulturen wurden lentivirale Vektoren verwendet. Folgende lentivirale Konstrukte wurden freundlicherweise von Veerle Baekelandt (KU Leuven, Belgien) zu Verfügung gestellt:

pCHMWS-[wt]DJ-1

pCHMWS-GFP

Primäre Astrozyten wurden in einer Konzentration von 20000 Zellen /well in einer 96 well-Platte ausgesät. 24 Stunden später wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einer Virenverdünnung (1:6 in DMEM / 10% FCS + P/S) für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Viren gewaschen und die Zellen für weitere 24 Stunden in DMEM / 10 % FCS + Penicillin/Streptomycin inkubiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

3.4.7 Poly D-Lysin- und Kollagen-beschichtete Deckgläschen

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Diese wurden vorher mit Poly D-Lysin und Kollagen beschichtet, damit die Zellen besser haften können. Die Deckgläschen wurden zuerst jeweils 60 min mit 1 M HCl, 1 M NaOH und zweimal ddH₂O gewaschen. Nach dem Trocknen wurden sie für 5 min mit einer 100 µg/ml Poly D-Lysin-Lösung (Sigma) inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit ddH₂O wurden sie unter UV-Licht sterilisiert. Im zweiten Schritt wurden die Deckgläschen mit Kollagen beschichtet. Hierzu wurden sie für 30 min mit 25 µg/ml Kollagen/PBS inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit PBS wurden die Deckgläschen bei 4°C gelagert.

3.4.8 Zelllyse zur Proteinisolation

Das Medium wurde abgesaugt und kaltes PBS zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden auf Eis mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein Plastikröhrchen überführt. Nach dem Abzentrifugieren bei 1400 rpm und 4°C für 5 min wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 100 - 200 µl Lysepuffer aufgenommen und durch Vortexen resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Danach wurde das Lysat für 15 min bei 18000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Konzentration der Proteinlösung bestimmt (siehe 3.3.1 auf Seite 88).

3.5 Statistische Auswertung

Jedes gezeigte Experiment wurde mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Bei Experimenten mit Primärkulturen wurden voneinander unabhängige Kulturen für Replikaexperimente verwendet. Western Blots zeigen jeweils repräsentative Experimente. Resultate in Abbildungen sind - falls nicht anders angegeben - Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen. Zur statistischen Auswertung wurde eine ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Post-hoc-Test mit Hilfe des Programms InStat 3.05 (GraphPad Software) durchgeführt (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4 Ergebnisse

4.1 Strukturelle und funktionelle Untersuchung der oxidierbaren Aminosäurereste von DJ-1

4.1.1 Strukturelle Untersuchung der oxidierten Reste

DJ-1 wird durch die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert (Görner et al., 2007). Es ist deshalb anzunehmen, dass die Oxidation von einer oder mehrerer Aminosäuren als ‘molekularer Schalter‘ wirkt (Claiborne et al., 1999). DJ-1 enthält acht oxidierbare Reste, drei Cystein- und fünf Methioninreste, die alle hochkonserviert sind (Abbildung 4.1). Es ist bereits bekannt, dass Cystein-106 leicht oxidierbar (Kinumi et al., 2004) und für die Aktivität von DJ-1 notwendig ist (Canet-Aviles et al., 2004; Meulener et al., 2006). Cystein-106 liegt im vermuteten aktiven Zentrum in einer gespannten Konformation. Obwohl es im Zentrum der DJ-1-Kristallstruktur liegt, ist es sehr leicht oxidierbar (Honbou et al., 2003; Tao und Tong, 2003; Wilson et al., 2003; Witt et al., 2008). Um den Einfluss von C-106 auf die Aktivität von DJ-1 zu untersuchen, wurde das Cystein gegen ein nichtoxidierbares Alanin ausgetauscht. Es wird angenommen, dass die Aktivität von DJ-1 von der Oxidationsstufe von C-106 abhängt (Canet-Aviles et al., 2004; Kinumi et al., 2004; Choi et al., 2006). Die Oxidation des Cystein-106 führt zur Einführung zusätzlicher Sauerstoffe und negativer Ladungen (Abbildung 4.2). Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden an der Position 106 zusätzliche negative Ladungen und Sauerstoffatome eingeführt, um ein Modell für die verschiedenen Oxidationsstufen von C-106 zu erhalten (Abb. 4.2). Dies erfolgte durch die Mutagenese von C-106 zu 1 bis 3 Aspartat- bzw Glutamat-Resten. Die beiden anderen Cysteinreste (Cystein-46 und Cystein-53) sind in der Peripherie des DJ-1-Dimers lokalisiert (Abb. 4.1). Auch diese beiden Reste wurden zu Alanin mutagenisiert. Zusätzlich wurden die Doppelmutante C53A/C106A und die Dreifachmutante

			1	17	26	
DJ-1	(H. s)	1	-----	MASKRALVILA-KGAEEMETVIPVDVMRRRAGIKVTVAGLA--	GKDPV	44
DJ-1	(C. a)	1	-----	MASKRALVILA-KGAEEMETVIPVDVMRRRAGIKVTIAGLA--	GKDPV	44
DJ-1	(R. n)	1	-----	MASKRALVILA-KGAEEMETVIPVDIMRRRAGIKVTVAGLA--	GKDPV	44
DJ-1	(M. m)	1	-----	MASKRALVILA-KGAEEMETVIPVDVMRRRAGIKVTVAGLA--	GKDPV	44
DJ-1	(G. g)	1	-----	MASKRALVILA-KGAEEMETVIPTDVMRRRAGIKVTVAGLT--	GKEPV	44
DJ-1	(X. l)	1	-----	MAGKRALVILA-KGAEEMETVIPTDVMRRRAGIKVTVAGLS--	GKDPV	44
DJ-1	(D. r)	1	-----	MAGKRALVILA-KGAEEMETVIPVDVMRRRAGIAVTVAGLA--	GKEPV	44
DJ-1 .b	(D. m)	1	MVFFGFPPQISRHF	SKFTKM-SKSALVILA-PGAEEMEFI	IAADVLRRRAGIKVTVAGLN--	GAEAV
DJ-1 .1	(C. e)	1	-----	MAQKSALI ILAAEGAEEM	EVII TGDVLARGEIRVVYAGLD--	GAEPV
YajL	(E. c)	1	-----	M-SASALVCLA-PGSEETEAVT	TIDLLVRGGIKVTTASVADGNLAI	45
			46	53	106	
DJ-1	(H. s)	45	QCSR	RDVVICPDASLED	AKKEGPPYDVVVLPGGNLGAQNLS	ESA
DJ-1	(C. a)	45	QCSR	RDVVICPDASLED	AKKEGPPYDVVVLPGGNLGAQNLS	ESA
DJ-1	(R. n)	45	QCSR	RDVVICPDTSLEE	AKTQGPYDVVVLPGGNLGAQNLS	ES
DJ-1	(M. m)	45	QCSR	RDVVICPDTSLED	AKTQGPYDVVVLPGGNLGAQNLS	ES
DJ-1	(G. g)	45	QCSR	RDVVICPDASLED	AKKEGPPYDVIVLPGGNLGAQNLS	ESA
DJ-1	(X. l)	45	QCSR	RDVVICPDTSLEE	ARTQGPYDVVVLPGGNLGAQNLS	ES
DJ-1	(D. r)	45	QCSR	REVMICPDSSLED	AHKQGPYDVVVLPGGLLGAQNLS	ES
DJ-1 .b	(D. m)	62	KCSR	DVQILPDTSLA	QVAVSD-KFDVVVLPGGLGGS	NAM
DJ-1 .1	(C. e)	46	KCAR	GAHIVPDVKLE	DVETE-KFDVIVLPGGQPGS	N
YajL	(E. c)	46	TCSR	GVKLLADAPL	VEVA-DGEYDVIVLPGGIK	GA
			133	134		
DJ-1	(H. s)	110	-TALLAHEIGFGSKV	TTHPLAKDKMMNGGH	TYSEN	VEKDGLI--LTSRGP
DJ-1	(C. a)	110	-TALLAHEIGFGSKV	TTHPLAKDKMMNGGH	TYSEN	VEKDGLI--LTSRGP
DJ-1	(R. n)	110	-TALLAHEVGF	GCKVTSHP	PLAKDKMMNGSH	YSSES
DJ-1	(M. m)	110	-TALLAHEVGF	GCKVTSHP	PLAKDKMMNGSH	YSSES
DJ-1	(G. g)	110	-TALLAHGIGFGSKV	ITHPLAKDKMMNGA	HICYSES	VEKDGNI--LTSRGP
DJ-1	(X. l)	110	-TALTVHGVGIGK	TITHPLAKDKI	VNPDQYK	SEER-VVKDENF--ITSRGP
DJ-1	(D. r)	110	-TALLAHGIAYG	STVTTTHPGAKDKMMAGD	H	YKSEAR-VQK
DJ-1 .b	(D. m)	126	-TVLAKHG	VASGKSLTSYPSM	KPQLVN--NYSYVDDKT	VVKDGNL--ITSRGP
DJ-1 .1	(C. e)	110	-IALLSHG	-VKAELVTSHP	SVKEKLEKGG-YK	YSEDR-VVVS
YajL	(E. c)	110	ATVLP	PHDIFPIGNMTGF	P	TLKDKI---PAEQWLDKR-VVWDARV
DJ-1	(H. s)	171	ALNGKEVAAQVKAP	LVLKD-----	189	
DJ-1	(C. a)	171	ALNGKEVAAQVKAP	LVLKD-----	189	
DJ-1	(R. n)	171	ALSGKDMANQVKAP	LVLKD-----	189	
DJ-1	(M. m)	171	ALVGKDMANQVKAP	LVLKD-----	189	
DJ-1	(G. g)	171	ALMGKEVAEQVKAP	LILKD-----	189	
DJ-1	(X. l)	171	TLLGKEVAEQVK	PLLLK-----	189	
DJ-1	(D. r)	171	ELMGAEVAAQVKAP	LILKD-----	189	
DJ-1 .b	(D. m)	190	ELACKEKQEVAK	L	LVAYN-----	205
DJ-1 .1	(C. e)	169	LLEGKDKATSLI	APMLLKL-----	187	
YajL	(E. c)	171	LLVGREKAHEVA	S	QLVMAAGIYNY	196

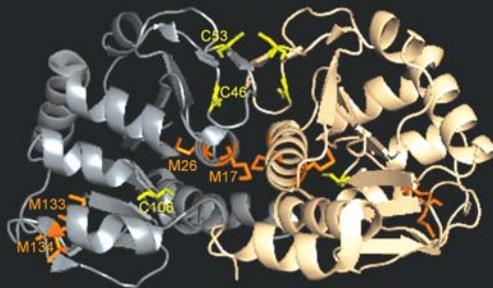


Abbildung 4.1 – Positionen der Cysteine und Methionine in DJ-1

Die DJ-1-Aminosäuresequenz einiger Vertebraten wurde verglichen: Mensch (*Homo sapiens*, H.s), Affe (*Cercopithecus aethiops*, C.a), Ratte (*Rattus norvegicus*, R.n), Maus (*Mus musculus*, M.m), Huhn (*Gallus gallus*, G.g), Frosch (*Xenopus laevis*, X.l), Fisch (*Danio rerio*, D.r). Zum Vergleich wurden die Sequenzen der Invertebratenhomologe DJ-1b der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*, D.m) und DJ-1.1 des Wurms (*Caenorhabditis elegans*, C.e) als auch das bakterielle Homolog YajL (*Escherichia coli*, E.c) hinzugenommen. Die fünf Methionine und drei Cysteine sind orange bzw gelb markiert. In der gleichen Farbe sind auch die Aminosäuren in der Kristallstruktur des DJ-1-Dimers markiert.

C46S/C53S/C106A gebildet.

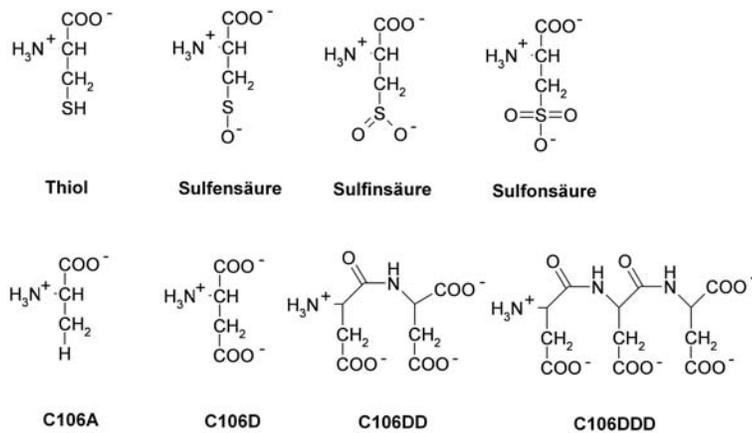


Abbildung 4.2 – Oxidationsmutanten

obere Reihe: Oxidationsstufen von Cystein. Das Thiol ist die reduzierte Form, die Sulfonsäure die am stärksten oxidierte Form.

untere Reihe: Aspartatvarianten der Oxidationsmutanten.

Neben den vorher beschriebenen Cysteinen besitzt DJ-1 auch noch vier Methionine, die potentiell ebenfalls regulatorisch oxidiert werden könnten (Hoshi und Heinemann, 2001). Methionin-17 ist in allen Eukaryonten konserviert. Es liegt an der Kontaktfläche der Dimere (Honbou et al., 2003). Methionin-26 ist Teil einer α -Helix im Inneren des Proteins (Lakshminarasimhan et al., 2008). Die homozygote Mutation M26I wurde mit der Parkinsonkrankheit assoziiert (Abou-Sleiman et al., 2003). Die Methionine an Position 133 und 134 sind nur in höheren Vertebraten konserviert, aber spezifisch in den Gehirnen von Parkinsonpatienten oxidiert (Choi et al., 2006). Alle Methionine wurden zu nichtoxidierbaren Isoleucinen mutagenisiert.

Die Mutagenese aller oxidierbaren Reste zu nichtoxidierbaren Alanin bzw Isoleucin soll die Frage beantworten, welcher oxidierbare Rest für die Aktivierung von DJ-1 notwendig ist.

Wenn die genannten Cysteinmutanten im HEK293-Zellkultursystem transient exprimiert werden, zeigt sich, dass die Cysteinreste 53 und 106 nicht notwendig für die Stabilität des Proteins sind (Abbildung 4.3 A+B). Die Bandenstärke von [C53A]DJ-1 und [C106A]DJ-1 unterscheidet sich nicht von [wt]DJ-1. Die Proteinexpression von

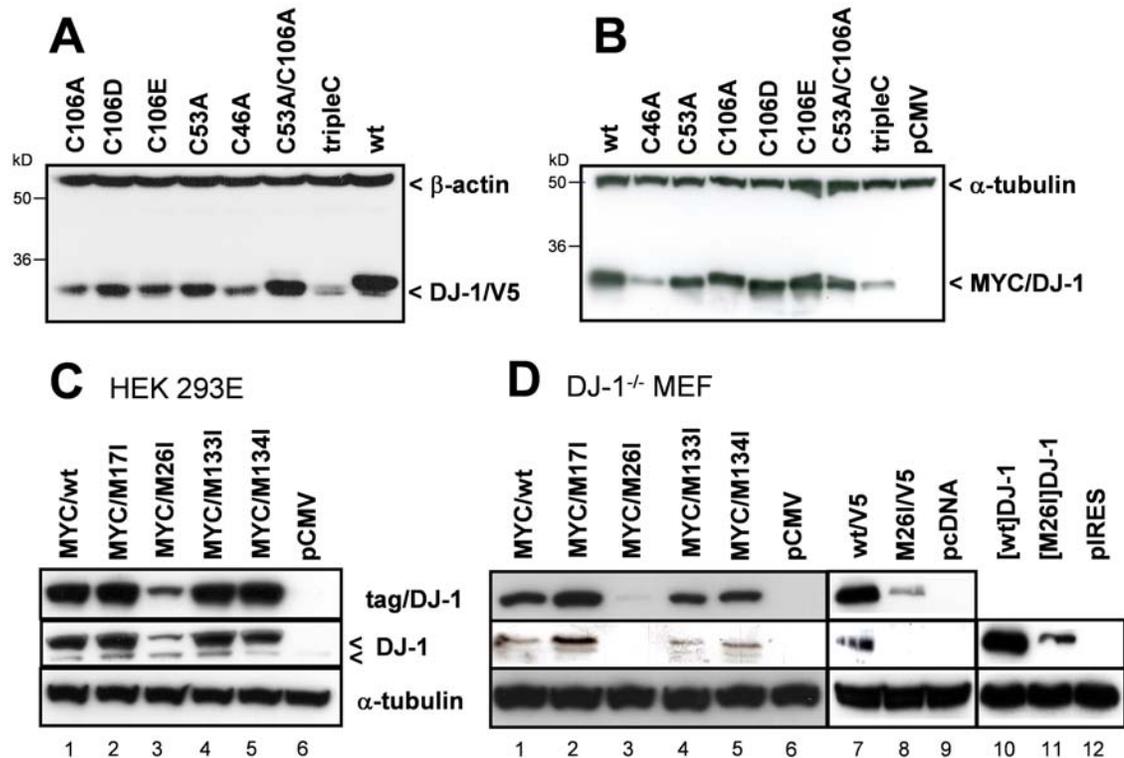


Abbildung 4.3 – Expression der oxidationsdefizienten Mutanten

(A) HEK 293 T wurden transient mit C-terminal V5-getaggten DJ-1-Mutanten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der DJ-1-Mutanten erfolgte mit einem V5-Antikörper, die Ladungskontrolle mit einem β -Actin-Antikörper.

(B) HEK 293 E wurden transient mit N-terminal MYC-getaggten DJ-1-Mutanten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der DJ-1-Mutanten erfolgte mit einem MYC-Antikörper, die Ladungskontrolle mit einem α -Tubulin-Antikörper.

(C) HEK 293 E wurden transient mit N-terminal MYC-getaggten DJ-1-Mutanten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der DJ-1-Mutanten erfolgte mit einem MYC-Antikörper, transfiziertes und endogenes DJ-1 wurde mit dem 3E8-Antikörper nachgewiesen und die Ladungskontrolle mit einem α -Tubulin-Antikörper.

(D) *Dj-1*^{-/-}-MEF wurden transient mit N-terminal MYC-getaggten DJ-1-Mutanten im pCMV-myc-Vektor (Spur 1 - 6), C-terminal V5-getaggten DJ-1-Mutanten im pcDNA3.1-Vektor (Spur 7 - 9) und ungetaggten DJ-1-Mutanten im pIRES-Vektor (Spur 10 - 12) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der DJ-1-Mutanten erfolgte mit einem MYC-Antikörper und dem 3E8-Antikörper. Die Ladungskontrolle erfolgte mit einem α -Tubulin-Antikörper.

[C46A]DJ-1 und der Dreifachmutante sind dagegen - unabhängig von der Art und der Position des Epitopmarkers - deutlich reduziert. Der Einfluss von Cystein-46 auf die Stabilität von DJ-1 wurde weiter untersucht. Die geringere Proteinmenge lässt sich nicht durch eine geringere mRNA-Menge erklären, wie durch semiquantitative RT-PCR gezeigt wurde (Abbildung 4.4) Für keines der untersuchten Konstrukte unterscheidet sie sich signifikant von der mRNA-Menge von [wt]DJ-1. Mit Hilfe von quantitativen *Pulse Chase*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Protein sowohl in HEK293E als auch in *Dj-1*^{-/-}-MEF sehr instabil ist. Die Halbwertszeit von MYC-[C46A]DJ-1 ist mit 2 h wesentlich geringer als die Halbwertszeit von MYC-[wt]DJ-1 mit 15 h (Abbildung 4.5).

Diese Experimente zeigen, dass C46 im Gegensatz zu C53 und C106 wichtig für die Stabilität von DJ-1 ist.

Die verschiedenen Methioninmutanten haben eine unterschiedliche Stabilität bei transienter Expression in HEK293E und *Dj-1*^{-/-}-MEF (Abbildung 4.3C+D). Sowohl MYC-[M17I]DJ-1 als auch MYC-[M133I]DJ-1 und MYC-[M134I]DJ-1 werden genauso stark exprimiert wie MYC-[wt]DJ-1. Besonders die Expression von [M17I]DJ-1 überrascht, da M17 im Bereich der Dimerkontaktfläche liegt. MYC-[M26I]DJ-1 zeigt dagegen eine deutlich geringere Bandenstärke als [wt]DJ-1. Tendenziell scheint dieser Effekt von der Anwesenheit und Position des Epitopmarkers abzuhängen. Unmarkiertes [M26I]DJ-1 (4.3D, Spur 11) exprimiert im Vergleich zu [wt]DJ-1 stärker als N-terminal MYC- (4.3D, Spur 3) oder C-terminal V5-getaggetes [M26I]DJ-1 (4.3D, Spur 8). Zusätzlich zeigt sich, dass die Expression von der verwendeten Zelllinie abhängt. In HEK293E (4.3C, Spur 3), die endogenes DJ-1 haben, ist das Signal für [M26I]DJ-1 stärker als in *Dj-1*^{-/-}-MEF (4.3D, Spur 3), wo keine stabilisierenden Heterodimere ausgebildet werden können. Dies wird auch durch die *Pulse Chase*-Experimente bestätigt (Abbildung 4.5). In HEK293E hat MYC-[M26I]DJ-1 eine Halbwertszeit von 2.6 ± 0.6 h und in *Dj-1*^{-/-}-MEF von 1.9 ± 0.1 h im Vergleich zu [wt]DJ-1 mit 15 h. Die mRNA-Mengen unterscheiden sich auch hier nicht signifikant (Abbildung 4.4) von [wt]DJ-1.

Das PK-mutierte M26 ist somit der einzige Methioninrest von DJ-1, der für die Stabilität des Proteins wichtig ist.

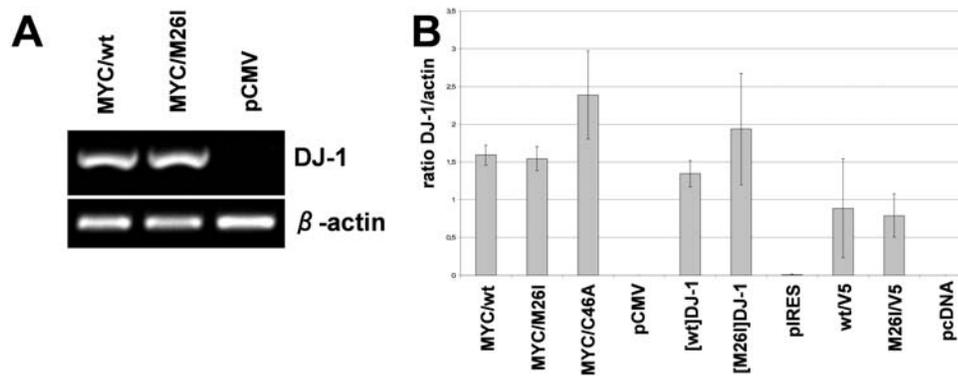


Abbildung 4.4 – RT-PCR der instabilen DJ-1-Mutanten

Dj-1^{-/-} MEF wurden transient mit verschiedenen DJ-1-Konstrukten transfiziert. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und die Expressionslevel von DJ-1 und β -Actin mit RT-PCR bestimmt (A). Die Expression von DJ-1 wurde quantifiziert und auf die mRNA-Menge von β -Actin normalisiert (B).

4.1.2 Funktionelle Untersuchung der oxidierten Reste

4.1.2.1 Cysteinmutanten

DJ-1 wird durch die Oxidation einer oder mehrerer Aminosäuren aktiviert. Eine Funktion von DJ-1, die von der Anwesenheit von ROS und damit wahrscheinlich von seiner Oxidation abhängt, ist die Bindung an ASK1 (Junn et al., 2005; Görner et al., 2007). Dies wurde zunächst verwendet, um den funktionellen Einfluss der oxidierbaren Aminosäurereste zu untersuchen. Hierzu wurden die verschiedenen DJ-1-Mutanten mit ASK1 kotransfiziert und die Co-Immunpräzipitation untersucht.

Wie bereits früher gezeigt wurde (Canet-Aviles et al., 2004), kann [C106A]DJ-1 nicht mehr aktiviert werden. Es bindet deshalb weder in An- noch in Abwesenheit von H₂O₂ an ASK1 (Abbildung 4.6 A,D). Um den Einfluss von Cystein-106 auf die Bindung von DJ-1 an ASK1 weiter zu untersuchen, wurde dieses Experiment mit den Modellverbindungen für oxidiertes C-106 (siehe Abb. 4.2) durchgeführt (Abbildung 4.6 B). Weder [C106D]DJ-1 noch [C106E]DJ-1 binden in Ab- oder Anwesenheit von H₂O₂ an ASK1. Die Substitution mit einem Aspartat bzw. Glutamat ist somit kein Modell für oxidiertes DJ-1. Im Gegensatz dazu binden sowohl [C106DD]DJ-1 und [C106EE]DJ-1 als auch [C106DDD]DJ-1 und [C106EEE]DJ-1 konstitutiv an ASK1. Die Einführung von

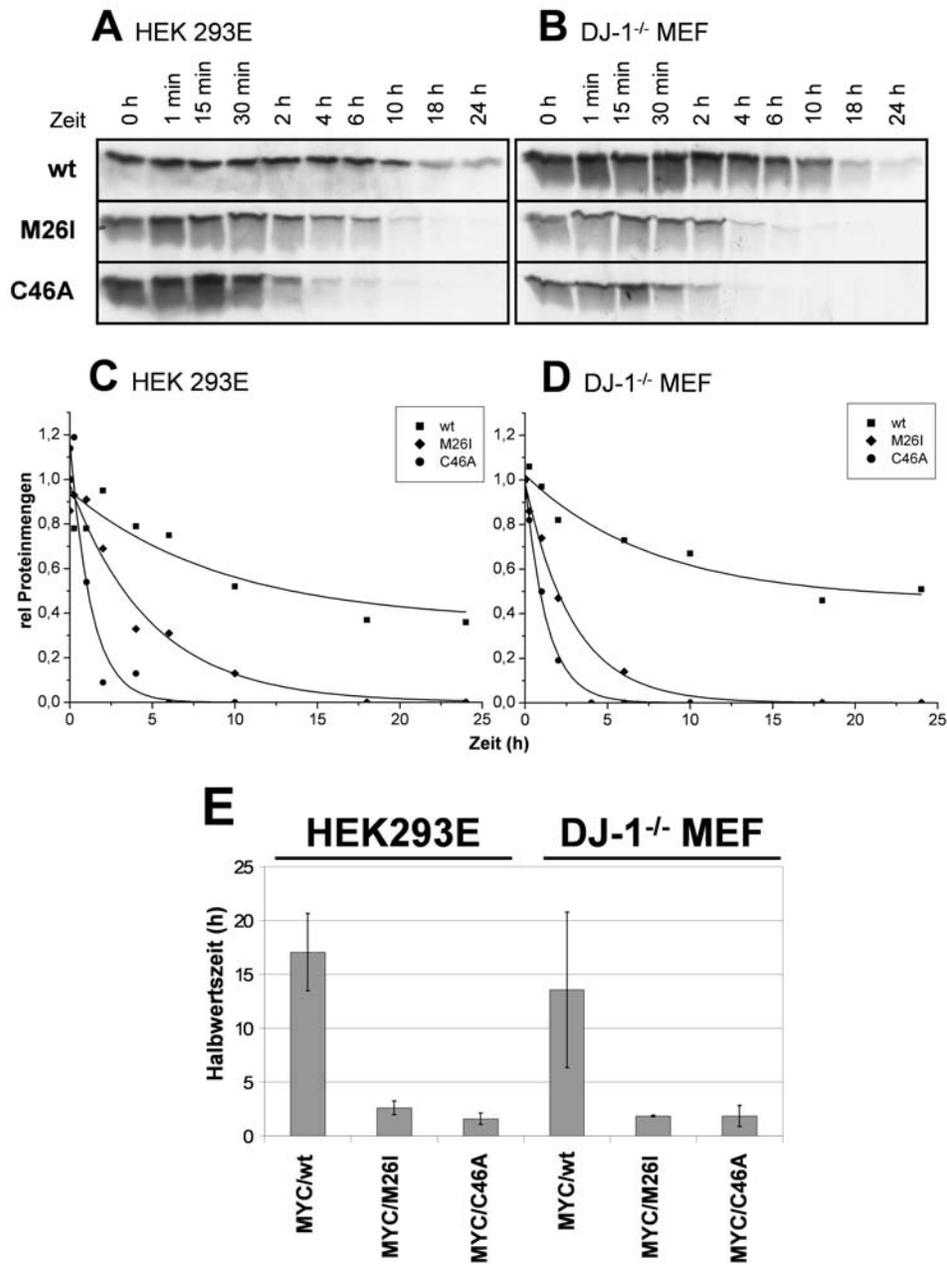


Abbildung 4.5 – Untersuchung der Stabilität der DJ-1-Mutanten

HEK 293E (A,C) und *Dj-1*^{-/-}-MEF (B,D) wurden mit pCMV-[wt]DJ-1, pCMV-[M26I]DJ-1 oder pCMV-[C46A]DJ-1 transfiziert und radioaktiv markiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Menge an radioaktiv markiertem DJ-1 bestimmt.

Aus den in Abbildung C und D präsentierten Kurven wurde die Halbwertszeit der DJ-1-Mutanten nach der Formel $y=e^{-kt}$ berechnet (E).

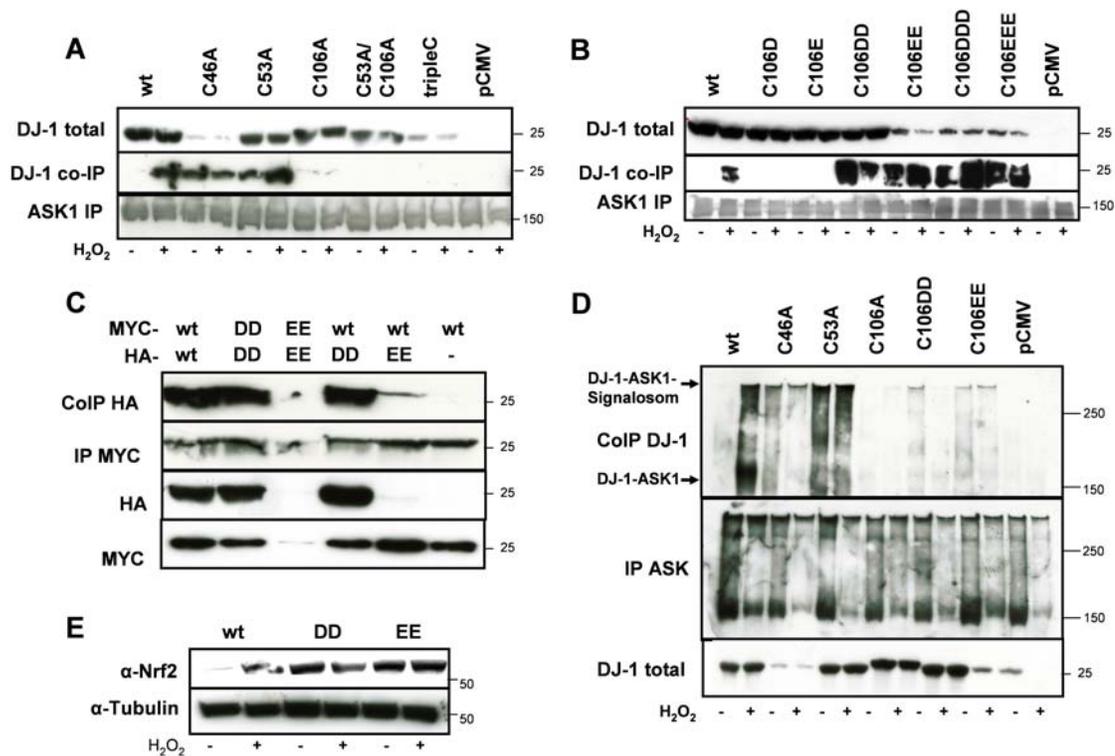


Abbildung 4.6 – Funktionelle Untersuchung der Cysteinmutanten

HEK 293 E wurden transient mit pcDNA3-ASK1-HA und [wt]DJ-1, den angegebenen Cysteinmutanten oder dem Leervektor pCMV-myc (**A,B,D**) bzw den MYC- und HA-getaggten [wt]-DJ-1, [C106DD]DJ-1, [C106EE]DJ-1 und dem Leervektor pCMV-HA (**C**) transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für 30 min mit oder ohne 1 mM H_2O_2 inkubiert (**A,B,D**) oder unbehandelt gelassen (**C**). Die Zellen wurden lysiert und eine anti-HA-Immünpräzipitation (**A,B,D**) bzw anti-MYC-Immünpräzipitation (**C**) durchgeführt. Die Expression der DJ-1-Mutanten wurde anhand der Zelllysate getestet. Die Immünpräzipitate wurden reduzierend (**A,B,C**) bzw nichtreduzierend (**D**) aufgekocht, mit SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-DJ-1-, anti-MYC-, anti-HA- und anti-ASK1-Antikörpern untersucht.

E) Stabil retransfizierte *Dj-1*^{-/-}-MEF wurden für 60 min mit oder ohne 500 μ M H_2O_2 inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und gleiche Proteinmengen mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Antikörpern gegen Nrf2 und Tubulin untersucht.

zwei Aspartatresten führt also zu einer Mutante, die so stark exprimiert wie [wt]DJ-1 ist und konstitutiv an ASK1 bindet. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Bindung von [C106DD]DJ-1 und [C106EE] funktionell relevant ist. Wenn ASK1 aktiviert wird, bildet es ein Signalosom mit einem Molekulargewicht von über 3000 kDa. Es ist zu vermuten, dass DJ-1 entweder die Ausbildung dieses Signalosoms verhindert oder in dieses eingebaut wird, um die Bindung von Effektorproteinen zu verhindern. Dies wurde mit einer nichtreduzierenden Co-Immunpräzipitation untersucht (Abbildung 4.6 D). In Abwesenheit von H_2O_2 ist kein Signal für [wt]DJ-1 in der CoIP detektierbar. Mit H_2O_2 dagegen migriert es mit monomerem ASK1 und hochmolekularen Komplexen, die ebenfalls ASK1-positiv sind. [C106A]DJ-1 als Negativkontrolle kann weder ohne noch mit H_2O_2 in der CoIP detektiert werden. Alle vier konstitutiv bindenden Mutanten, [C46A]DJ-1, [C53A]DJ-1, [C106DD]DJ-1 und [C106EE]DJ-1 sind in der CoIP detektierbar und migrieren mit ASK1. Hieraus lässt sich vermuten, dass DJ-1 über eine Disulfidbindung in das ASK1-Signalosom eingebaut wird. Die Oxidationsmutanten [C106DD]DJ-1 und [C106EE]DJ-1 haben ein schwächeres Signal als [wt]DJ-1 in der CoIP. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass sie sehr fest nicht-kovalent an ASK1 binden, aber keine Disulfidbindung über C106 eingehen können. Die Simulation höherer Oxidationsstufen in [C106DD]DJ-1 scheint somit dem aktivierten Zustand von DJ-1 zu ähneln und zu konstitutiv aktiven Mutanten zu führen.

Die konstitutive Aktivität von [C106DD]DJ-1 und [C106EE]DJ-1 wurde noch in einem zweiten funktionellen Assay getestet. Clements et al. (2006) haben berichtet, dass DJ-1 bei oxidativem Stress den antioxidativen Transkriptionsfaktor Nrf2 stabilisiert. Eine konstitutiv aktive Mutante sollte den Transkriptionsfaktor auch ohne oxidativen Stress stabilisieren. In stabil mit [wt]DJ-1 retransfizierten *Dj-1*^{-/-}-MEF konnte ohne H_2O_2 kaum Nrf2-Signal detektiert werden, während nach der Inkubation mit H_2O_2 Nrf2 stabilisiert wird (Abbildung 4.6E). In den Zellen, die mit [C106DD]DJ-1 bzw. [C106EE]DJ-1 retransfiziert wurden, findet sich auch ohne H_2O_2 Nrf2. Das Signal kann auch durch die Zugabe von H_2O_2 nicht weiter verstärkt werden. Diese Experimente zeigen, dass die beiden Mutanten tatsächlich konstitutiv aktiv sind. [C106DD]DJ-1 ist so stabil wie [wt]DJ-1, während [C106EE]DJ-1 wesentlich instabiler ist. Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Stabilität der beiden Mutanten ist das unterschiedliche Dimerisierungsverhalten, da die Ausbildung von stabilen Dimeren als Voraussetzung

für die Stabilität von DJ-1 angesehen wird (Ito et al., 2006). [C106DD]DJ-1 bildet wie [wt]DJ-1 stabile Homodimere sowie Heterodimere mit [wt]DJ-1 (Abbildung 4.6C). [C106EE]DJ-1 dagegen bildet weder stabile Homo- noch Heterodimere. Dies könnte die Ursache für die geringere Stabilität von [C106EE]DJ-1 sein.

Diese Experimente zeigen, dass [C106DD]DJ-1 und [C106EE]DJ-1 funktionelle und konstitutiv aktive Mutanten und somit ein Modell für oxidiertes DJ-1 sind.

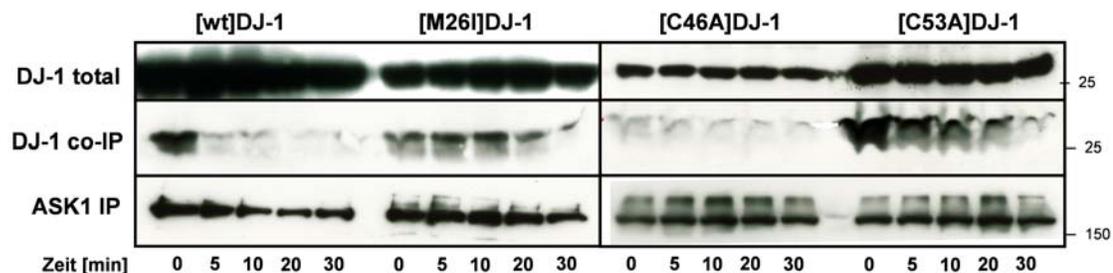


Abbildung 4.7 – Ablösungskinetik verschiedener DJ-1-Mutanten von ASK1

HEK 293 E wurden transient mit pcDNA3-ASK1-HA und pCMV-myc-[wt]DJ-1, [M26I]DJ-1, [C46A]DJ-1 oder [C53A]DJ-1 transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für 3 min mit 1 mM H_2O_2 inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen für die angegebene Zeit in Medium ohne H_2O_2 inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und eine anti-HA-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-DJ-1- und anti-ASK1-Antikörpern untersucht.

Überraschenderweise binden die peripheren Cysteinmutanten [C46A]DJ-1 und [C53A]DJ-1 beide sowohl in An- als auch in Abwesenheit von H_2O_2 an ASK1 (Abbildung 4.6A). Hierbei ist besonders bemerkenswert, dass [C46A]DJ-1 trotz seiner deutlich geringeren Proteinmenge in gleichem Umfang an ASK1 bindet wie [wt]DJ-1 und [C53A]DJ-1. Diese Entdeckung konnte auch unter nichtreduzierenden Bedingungen bestätigt werden (Abbildung 4.6D). Sowohl [C46A]DJ-1 als auch [C53A]DJ-1 werden in An- und Abwesenheit von H_2O_2 in höhermolekulare ASK-Komplexe eingebaut. Die beiden Mutanten binden jedoch nicht konstitutiv an ASK1, da ein basaler Stress in Form eines Mediumwechsels notwendig ist (Abbildung 4.8). Wenn die Zellen ohne vorherigen Mediumwechsel geerntet werden, bindet [C53A]DJ-1 nicht an ASK1. Um zu untersuchen, ob die beiden Mutanten leichter an ASK1 binden oder langsamer abdissoziieren, wurden kotransfizierte HEK293E für 3 min mit H_2O_2 gestresst, das H_2O_2 entfernt und

die Zellen für verschiedene Zeiten weiter inkubiert. Hierbei zeigt sich, dass [wt]DJ-1 innerhalb der ersten 5 Minuten vollständig aus dem Komplex abdissoziiert. [C46A]DJ-1 und [C53A]DJ-1 bleiben über den gesamten beobachteten Zeitraum gebunden und dissoziieren wesentlich langsamer von ASK1 ab (Abbildung 4.7).

[C46A]DJ-1 und [C53A]DJ-1 sind somit Mutanten, die leichter aktivierbar sind als [wt]DJ-1 und langsamer aus dem ASK1-Signalosom diffundieren.

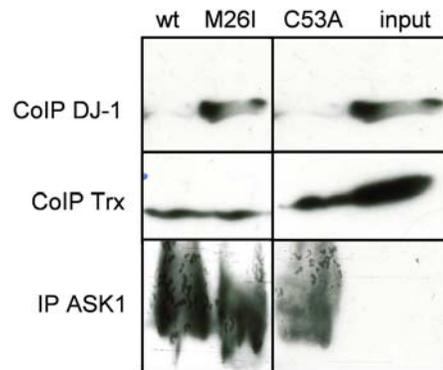


Abbildung 4.8 – [C53A]DJ-1, aber nicht [M26I]DJ-1, benötigt basalen Stress zur Bindung an ASK1

HEK 293E wurden transient mit pcDNA3-ASK1-HA und pCMV-MYC-[wt]DJ-1, pCMV-MYC-[M26I]DJ-1 oder pCMV-MYC-[C53A]DJ-1 transfiziert. 36 h später wurden die Zellen lysiert und ASK1 mit anti-HA-Agarose immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern gegen DJ-1, Thioredoxin und ASK1 untersucht.

4.1.2.2 Methioninmutanten

Die oxidationsdefizienten Mutanten von Methionin-17, Methionin-133 und Methionin-134 binden wie [wt]DJ-1 oxidationsabhängig an ASK1 (Abbildung 4.9 A). Die Oxidation dieser Reste ist somit nicht verantwortlich für die Aktivierung von DJ-1. [M26I]DJ-1 bindet ebenfalls an ASK1, aber interessanterweise sowohl in An- als auch in Abwesenheit von H_2O_2 . Diese Bindung findet auch in vollständiger Abwesenheit von oxidativem Stress statt (Abbildung 4.8). Wie [C46A]DJ-1 und [C53A]DJ-1 und im Gegensatz zu [wt]DJ-1 dissoziiert [M26I]DJ-1 auch nur sehr langsam von ASK1 ab (Abbildung 4.7). Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Mutanten kann [M26I]DJ-1 mit Trx 1

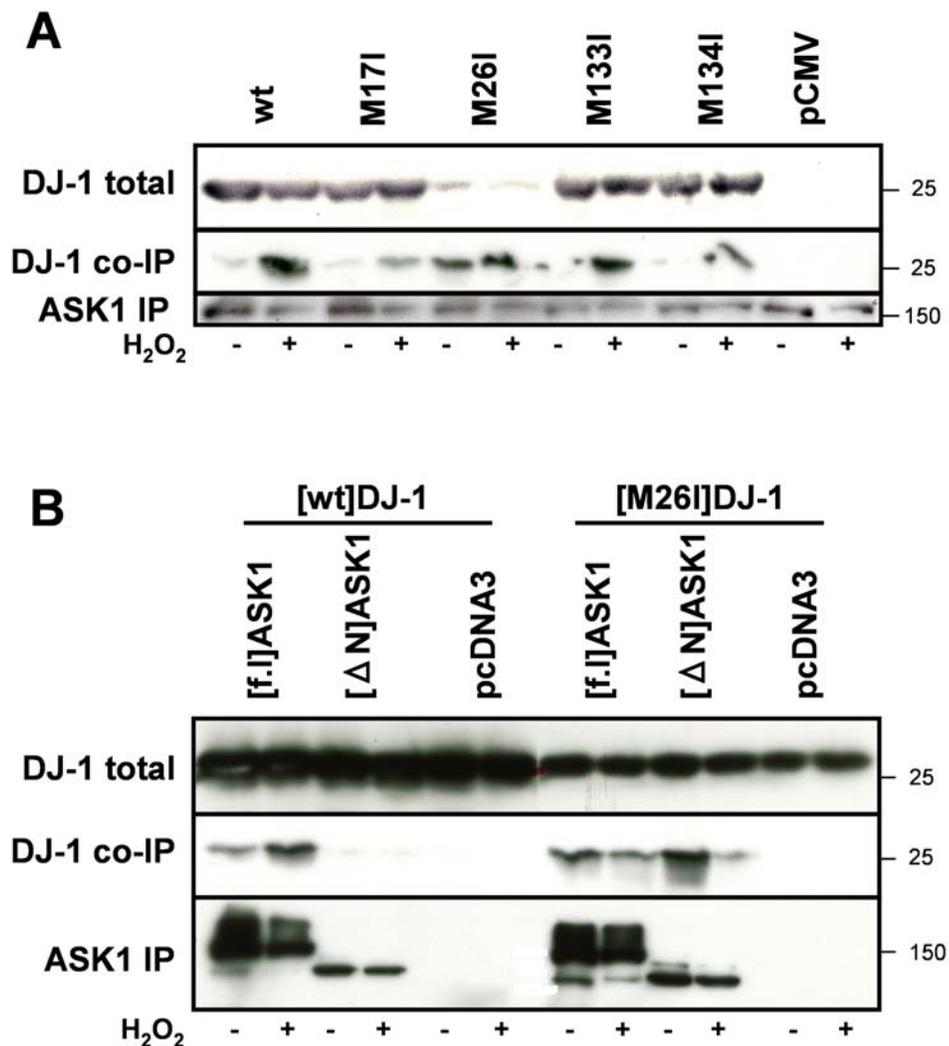


Abbildung 4.9 – Einfluss der Methioninreste von DJ-1 auf die Bindung von ASK1

A) HEK 293 E wurden transient mit pcDNA3-ASK1-HA und [wt]DJ-1, den Cysteinmutanten M17I, M26I, M133I, M134I oder dem Leervektor pCMV-myc transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für 30 min mit oder ohne 1 mM H₂O₂ inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und eine anti-HA-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Expression der DJ-1-Mutanten wurde anhand der Zellysate getestet. Die Immunpräzipitate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-DJ-1- und anti-ASK1-Antikörpern untersucht.

B) HEK 293 E wurden transient mit pCMV-myc-[wt]DJ-1 oder [M26I]DJ-1 und Vollängen-ASK1 [f.]ASK1, Δ1-648-ASK1 [ΔN]ASK1 oder dem Leervektor pcDNA3 transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für 30 min mit oder ohne 1 mM H₂O₂ inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und eine anti-HA-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-DJ-1- und anti-ASK1-Antikörpern untersucht.

gleichzeitig ASK1 binden, obwohl vermutet wird, dass Trx 1 und DJ-1 die gleiche Bindungsstelle an ASK1 besetzen (Görner et al., 2007). Um zu untersuchen, ob [M26I]DJ-1 eine andere Bindungsstelle besetzt als [wt]DJ-1, wird die Bindung an eine N-terminale Deletionsmutante von ASK1 ($[\Delta N]$ ASK, Saitoh et al. (1998)) getestet (Abbildung 4.9 B). Bei dieser wurden die Aminosäuren 1-648 deletiert, die die Bindungsstelle von Thio-redoxin beinhalten (Saitoh et al., 1998; Fujino et al., 2007). [wt]DJ-1 und [M26I]DJ-1 binden beide [fl]ASK1. [wt]DJ-1 kann die Deletionsmutante $[\Delta N]$ ASK nicht mehr binden, [M26I]DJ-1 dagegen schon. Die PK-assoziierte Mutante [M26I]DJ-1 besetzt also nicht-oxidationsabhängig eine andere, falsche DJ-1-Bindungsstelle an ASK1. Diese liegt in der C-terminalen Hälfte von ASK1.

4.1.2.3 Oxidierbare Reste beeinflussen die Cytoprotektivität von DJ-1

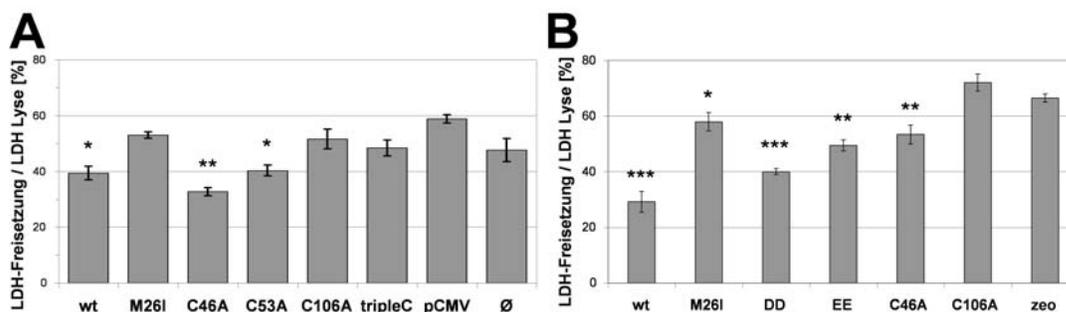


Abbildung 4.10 – Zytotoxizität der DJ-1-Mutanten

10000 transient transfizierte (A) oder stabil retransfizierte (B) *Dj-1*^{-/-}-MEF wurden in einer 96 well-Platte ausgesät. 24 h später wurden die Zellen für 16 h mit 10 μ M (A) oder 20 μ M (B) H₂O₂ inkubiert. Die Zytotoxizität wurde über die LDH-Freisetzung gemessen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichung von Triplikatbestimmungen, jeweils repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die Bindung von DJ-1 an ASK1 ist notwendig, um die Aktivität von ASK1 und damit den proapoptotischen ASK-Signalweg zu unterdrücken (Junn et al., 2005; Görner et al., 2007). Eine Bindung von DJ-1 an ASK1 sollte folglich mit einer cytoprotektiven Wirkung korrelierbar sein. Transient retransfizierte *Dj-1*^{-/-}-MEF wurden mit H₂O₂ gestresst und der Zelltod durch die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH)

gemessen (Abbildung 4.10A). Im Vergleich zu untransfizierten Zellen zeigen die mit MYC-[wt]DJ-1 transfizierten Zellen einen um ein Drittel reduzierten Zelltod, während die Transfektion mit dem Leervektor keinen Effekt zeigt. In Korrelation mit der Bindung an ASK1 (Abbildung 4.6) kann [C106A]DJ-1 den Zelltod nicht signifikant verringern. Die gleiche Korrelation lässt sich auch für die Dreifachmutante TripelC finden. Die Mutation der peripheren Cysteine verändert die cytoprotektiven Eigenschaften von DJ-1 nicht. Beide Mutanten können den Zelltod signifikant auf einen ähnlichen Wert wie [wt]DJ-1 reduzieren. PK-assoziiertes [M26I]DJ-1 wirkt, obwohl es an ASK1 bindet, nicht cytoprotektiv.

Die transient retransfizierten *Dj-1*^{-/-}-MEF hatten eine Transfektionseffizienz von 26 ± 2% (Daten nicht gezeigt). Um diese geringe Transfektionseffizienz zu umgehen, wurde die Cytotoxizitätsstudie mit stabil retransfizierten *Dj-1*^{-/-}-MEF wiederholt (Abbildung 4.10B). [wt]DJ-1 zeigt auch hier einen starken cytoprotektiven Effekt. Die Cytoprotektion von [C46A]DJ-1 kann in diesen Zellen ebenfalls bestätigt werden. Die konstitutiv bindenden Mutanten [C106DD]DJ-1 und [C106EE]DJ-1 reduzieren beide den Zelltod signifikant, wobei die stabilere Mutante [C106DD]DJ-1 einen stärker protektiven Effekt hat. Die Tatsache, dass diese beiden Mutanten keinen so starken zytoprotektiven Effekt wie [wt]DJ-1 haben, lässt sich durch die in Abschnitt 4.1.2.1 gemachten Beobachtungen erklären. Beide Mutanten werden zwar in das ASK1-Signalosom eingebaut, binden aber nicht kovalent und deshalb nicht so fest wie [wt]DJ-1. Dies könnte ihren zytoprotektiven Effekt verringern. [M26I]DJ-1 hat nur eine sehr geringe protektive Wirkung. Dies bestätigt das Ergebnis aus den transient transfizierten Zellen.

[wt]DJ-1 wie auch die Cysteinmutanten [C46A]DJ-1, [C53A]DJ-1, [C106DD]DJ-1 und [C106EE]DJ-1 schützen die Zellen vor oxidativem Stress. Die nichtaktivierbare Mutante [C106A]DJ-1 und die PK-assoziierte Mutante [M26I]DJ-1 können die Zellen nicht schützen.

4.1.2.4 Funktionelle Charakterisierung von [M26I]DJ-1

[M26I]DJ-1 bindet konstitutiv an ASK1 (Abbildung 4.9), jedoch an eine andere Bindungsstelle als [wt]DJ-1 (Abbildung 4.9B). Da die Mutante außerdem nicht cytopro-

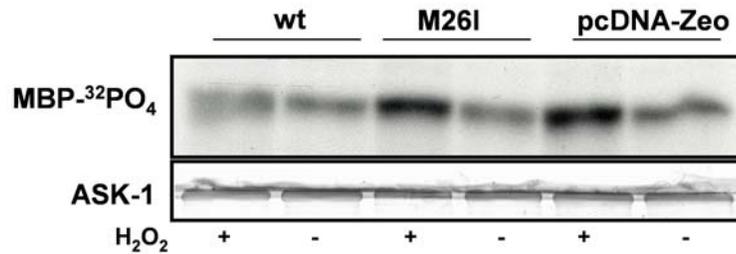


Abbildung 4.11 – Immunkomplexkinaseassay von ASK1

Dj-1^{-/-}-MEF, stabil retransfiziert mit [wt]DJ-1, [M26I]DJ-1 und dem Leervektor pcDNA3.1, wurden in antibiotikafreiem Medium ausgesät. 48 h später wurden die Zellen für 30 min mit oder ohne 500 μ M H₂O₂ inkubiert und die Aktivität von ASK1 durch einen Immunkomplexkinaseassay bestimmt.

tektiv wirkt (Abbildung 4.10), stellt sich die Frage, ob sie trotz der Bindung die Aktivität von ASK1 unterdrücken kann. Hierzu wurde ein Immunkomplexkinaseassay von ASK1 in Anwesenheit von [wt]DJ-1, [M26I]DJ-1 und dem Leervektor durchgeführt (Abbildung 4.11). Wie bereits früher gezeigt wurde (Junn et al., 2005; Görner et al., 2007), unterdrückt [wt]DJ-1 die Aktivität von ASK1 vollständig, während sich mit dem Leervektor keinerlei Suppression der ASK-Aktivität zeigt. [M26I]-DJ-1 kann wie der Leervektor die Aktivität von ASK1 nicht unterdrücken. Ein nachgeschalteter Effekt der ASK-Aktivierung ist die Translokation von DAXX aus dem Zellkern ins Cytosol (Ko et al., 2001; Song und Lee, 2003). Um zu untersuchen, ob sich die eingeschränkte Funktionalität von [M26I]DJ-1 auch auf die Translokation von DAXX auswirkt, wurde der Einfluss von DJ-1 auf die Translokation von DAXX bei oxidativem Stress analysiert (Abbildung 4.12). Es wurde berichtet, dass DJ-1 die Translokation von DAXX aus dem Zellkern verhindert (Junn et al., 2005). [wt]DJ-1 verhindert die verstärkte Translokation von überexprimiertem FLAG-DAXX in *Dj-1*^{-/-}-MEF in Anwesenheit von H₂O₂. Weder [M26I]DJ-1 noch der Leervektor können die Translokation verhindern. [M26I]DJ-1 ist somit in allen getesteten Assays nicht funktionell.

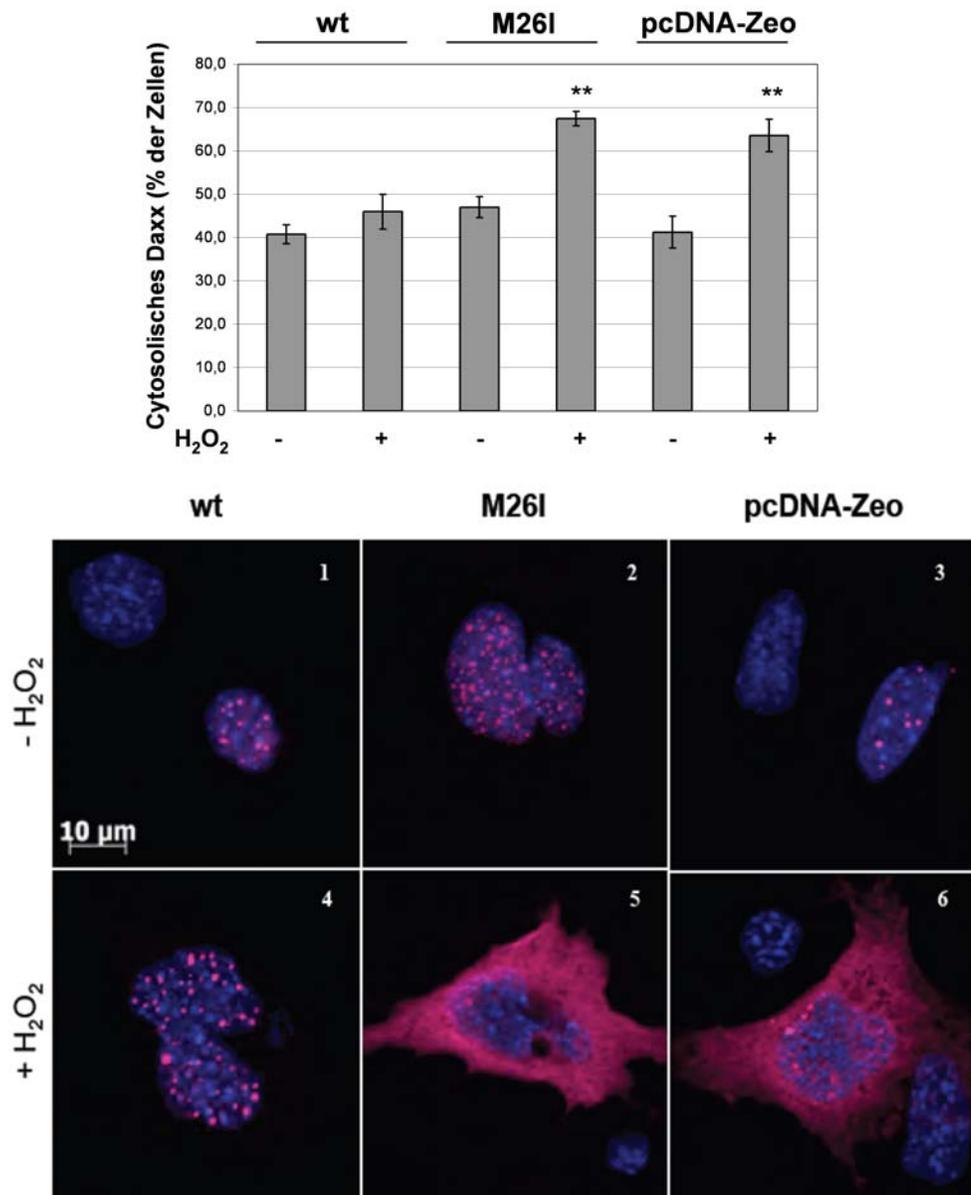


Abbildung 4.12 – [M26I]DJ-1 unterdrückt die DAXX-Translokation nicht

Dj-1^{-/-} MEF stabil retransfiziert mit [wt]DJ-1, [M26I]DJ-1 und dem Leervektor pcDNA3.1-zeo wurden auf Deckgläschen ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit pRK5-Flag-Daxx transfiziert. Weitere 24 h später wurden die Zellen für 30 min mit oder ohne 500 µM H₂O₂ behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und mit einem Flag-Antikörper angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde untersucht, ob eine Translokation von DAXX ins Cytosol stattgefunden hat. Für jeden Datenpunkt wurden 50 transfizierte Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

4.2 Mechanismus der ASK-Regulation durch DJ-1

4.2.1 Kinetik der DJ-1-Bindung

DJ-1 bindet oxidationsabhängig an ASK1 und unterdrückt dessen Aktivität (Görner et al., 2007). Der regulatorische Mechanismus ist bisher noch unklar. Trx1 wird als Hauptregulator von ASK1 angesehen (Saitoh et al., 1998; Fujino et al., 2007). Da dieses oxidationsabhängig von ASK1 abdissoziiert, ist ein Zusammenhang mit der Bindung von DJ-1 denkbar. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293E, die mit ASK1 und DJ-1 cotransfiziert waren, für unterschiedliche Zeiten mit H₂O₂ inkubiert und die Co-Immunpräzipitation von DJ-1 und Trx1 mit ASK1 überprüft (Abbildung 4.13). Im ungestressten Zustand bindet Trx1 an ASK1, während DJ-1 nicht gebunden wird. Nach Zugabe von H₂O₂ dissoziiert Trx1 sofort ab, sodass es nach 5 min Inkubationszeit nicht mehr nachweisbar ist. DJ-1 bindet ab einer H₂O₂-Inkubationszeit von 5 min und ist ca 30 min lang maximal an ASK1 gebunden.

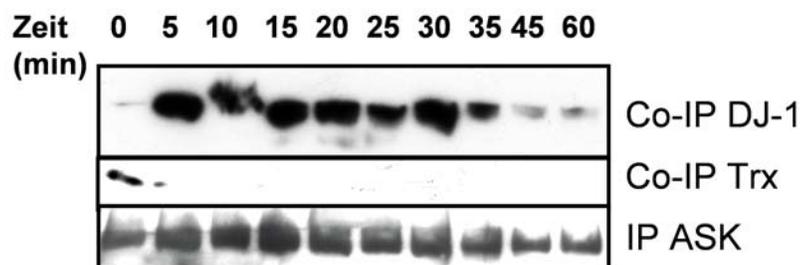


Abbildung 4.13 – Co-Immunpräzipitation von DJ-1 und Trx1 mit ASK1

HEK 293 E wurden transient mit pcDNA3-ASK1-HA und pCMV-myc-[wt]DJ-1 transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit oder ohne 1 mM H₂O₂ inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und eine anti-HA-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-DJ-1-, anti-Trx1- und anti-ASK1-Antikörpern untersucht.

4.2.2 DJ-1 bindet an aktiviertes ASK1

Trx1 und Peroxiredoxin-1 wurden in der Literatur als Interaktoren von ASK1, die beide die Aktivierung unterdrücken, beschrieben (Saitoh et al., 1998; Kim et al., 2008). Beide sorgen für eine verminderte ASK-Phosphorylierung an Thr838. Da DJ-1 wahrscheinlich nach dem Ablösen von Trx1 dessen Bindungsstelle einnimmt (Abbildung 4.9B und

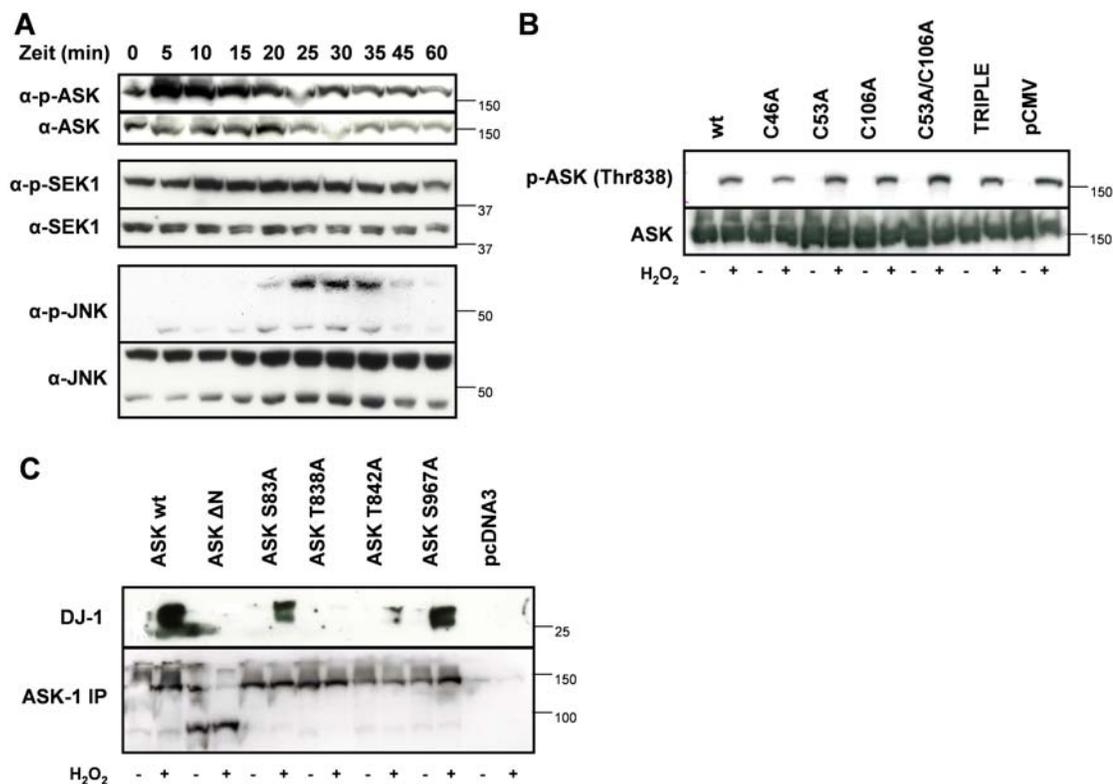


Abbildung 4.14 – Einfluss von DJ-1 auf die ASK-Phosphorylierung

A HEK 293 E wurden transient mit pcDNA3-ASK1-HA und pCMV-myc-[wt]DJ-1 transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit oder ohne 1 mM H₂O₂ inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-phospho-ASK (Thr838)-, anti-ASK1-, anti-phospho-SEK1, anti-SEK1, anti-phospho-JNK und anti-JNK-Antikörpern untersucht.

B HEK 293 E wurden transient mit pcDNA3-ASK1-HA und den angegebenen DJ-1-Mutanten bzw dem Leervektor pCMV-myc transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für 30 min mit oder ohne 1 mM H₂O₂ inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-phospho-ASK (Thr838)- und anti-ASK1-Antikörpern untersucht.

C HEK 293 E wurden transient mit pCMV-myc-[wt]DJ-1 und [wt]ASK1, verschiedenen phosphorylierungsdefizienten Mutanten, [Δ N]ASK als Negativkontrolle oder dem Leervektor pcDNA3 transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen für 30 min mit oder ohne 1 mM H₂O₂ inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und eine anti-HA-Immünpräzipitation durchgeführt. Die Immünpräzipitate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-DJ-1- und anti-ASK1-Antikörpern untersucht.

4.13), ist ein ähnlicher Regulationsmechanismus vorstellbar. Aus diesem Grund wurde die DJ-1-Abhängigkeit der ASK-Phosphorylierung untersucht (Abbildung 4.14). In Abwesenheit von oxidativem Stress ist ASK1 nicht phosphoryliert. Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit (Abb. 4.14 A) zeigt, dass in ASK- und DJ-1-überexprimierenden Zellen innerhalb von 5 min H_2O_2 eine Phosphorylierung von ASK1 detektierbar ist. Diese bleibt während des gesamten Beobachtungszeitraums bestehen. Interessanterweise ist SEK1/MKK4, ein Substrat von ASK1, auch in Anwesenheit von oxidativem Stress nur minimal phosphoryliert. Die nachgeschaltete Kinase JNK zeigt dagegen ein normales ROS-abhängiges Phosphorylierungsprofil. Die Phosphorylierung von ASK1 unterscheidet sich auch nicht in Abhängigkeit von der überexprimierten DJ-1-Mutante (4.14B). Die ASK-bindenden und zytoprotektiven DJ-1-Konstrukte [wt]DJ-1, [C46A]DJ-1 und [C53A]DJ-1 zeigen keinen Unterschied in der ASK-Phosphorylierung zum Leervektor pCMV und den inaktiven Mutanten [C106A]DJ-1, [C53A,C106A]DJ-1 und der Dreifachmutante TripleC. DJ-1 unterdrückt somit anscheinend die Kinaseaktivität von ASK1, nicht aber die Phosphorylierung von ASK1 in Anwesenheit von H_2O_2 .

Da DJ-1 die aktivierende Phosphorylierung von ASK an Thr838 nicht beeinflusst, stellt sich die Frage, ob die regulierende Phosphorylierung von ASK1 überhaupt einen Einfluss auf die Bindung von DJ-1 hat. ASK1 hat vier regulatorische Phosphorylierungsstellen. Ser83 wird durch AKT2 phosphoryliert und inhibiert die Aktivität von ASK1 (Yuan et al., 2003), Thr838 ist die aktivierende Autophosphorylierungsstelle (Tobiume et al., 2002) und Ser967 ist im inaktiven Zustand phosphoryliert (Zhang et al., 1999). Im aktivierten Zustand wird zusätzlich zu Thr838 noch Thr842 phosphoryliert (Tobiume et al., 2002). Alle vier Phosphorylierungsstellen wurden zu Alanin mutiert und auf die Bindung von DJ-1 hin untersucht (Abbildung 4.14C). Wie bereits vorher gezeigt wurde, bindet DJ-1 oxidationsabhängig an [wt]ASK1, während es die Deletionsmutante [Δ]ASK nicht bindet. Sowohl [S83A]ASK1 wie auch [S967A]ASK1 werden wie [wt]ASK1 von DJ-1 oxidationsabhängig gebunden. Interessanterweise kann DJ-1 [T838A]ASK1 nicht mehr binden und auch die Bindung an [T842A]ASK1 ist deutlich schwächer. Intakte Phosphorylierungsstellen im aktiven Zentrum von ASK1 sind somit eine Voraussetzung für die Bindung von DJ-1.

In den Kapiteln 4.1 und 4.2 dieser Studie wurde die Zytotoxizität von DJ-1 bestätigt. Die Oxidation von Cystein-106 wurde als essentiell für die Aktivität von DJ-1

identifiziert. Die Aktivität wird zusätzlich durch die peripheren Cysteine C46 und C53 moduliert. Die Zytoprotektivität von DJ-1 wird unter anderem über die Unterdrückung der ASK1-Aktivität vermittelt. DJ-1 unterdrückt hierbei nicht die Phosphorylierung von ASK1, sondern wird in das ASK1-Signalosom eingebaut und verhindert wahrscheinlich die Bindung von Effektorproteinen wie DAXX und TRAF.

4.3 Untersuchung der Regulation der Entzündungsantwort von Astrozyten durch DJ-1

4.3.1 Etablierung von primären Astrozyten- und Neuronenkulturen

Das PK-assoziierte Protein DJ-1 könnte nicht nur zellautonom in Neuronen protektiv wirken, sondern auch indirekt durch Wirkungen in Astrozyten. Dies wird unterlegt durch neuropathologische Befunde. DJ-1 wird in ruhenden Astrozyten nur schwach exprimiert. In reaktiven Astrozyten ist DJ-1 dagegen sehr stark hochreguliert (Bandopadhyay et al., 2004; Neumann et al., 2004). Seine Funktion in diesen Zellen ist jedoch unbekannt. Um sie zu untersuchen, wurden astrozytenreiche Primärkulturen (APC) aus *Dj-1*^{-/-}-Mäusen und wt-Wurfgeschwistern angelegt (Abbildung 4.15A-D). Die Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Wurst am Helmholtz-Zentrum München durch die *Gene trap*-Methode generiert. Hierbei wurde der N-terminale Teil des *Dj-1*-Gens durch LacZ ersetzt. Das entstandene Fusionsprotein ist instabil und wird schnell abgebaut. Die Mäuse haben, wie auch alle anderen bisher publizierten *DJ-1*^{-/-}-Mäuse, keinen Phänotyp (siehe Kap. 1.2.4).

Die Kulturen bestehen zu über 95 % aus Astrozyten, wie durch Immunfluoreszenzfärbung gegen GFAP gezeigt wurde (Abbildung 4.15A). Da Mikroglia auf die gleichen Stimulanzen reagieren wie Astrozyten, sollte der Mikrogliaanteil in den Kulturen möglichst gering sein. APC wurden mit einem Antikörper gegen den mikrogliaspezifischen Marker CD11b angefärbt (Ford et al., 1995) und im FACS untersucht (Abbildung 4.15B). Hierbei zeigte sich, dass die Kulturen einen Mikroglia-Anteil von 0.6 ± 0.2 % (n=3) enthalten.

Die Astrozyten aus wt-Tieren sind immunpositiv für DJ-1 (Abbildung 4.15C). In den Astrozyten aus *Dj-1*^{-/-}-Mäusen kann kein DJ-1 detektiert werden (Abbildung 4.15D).

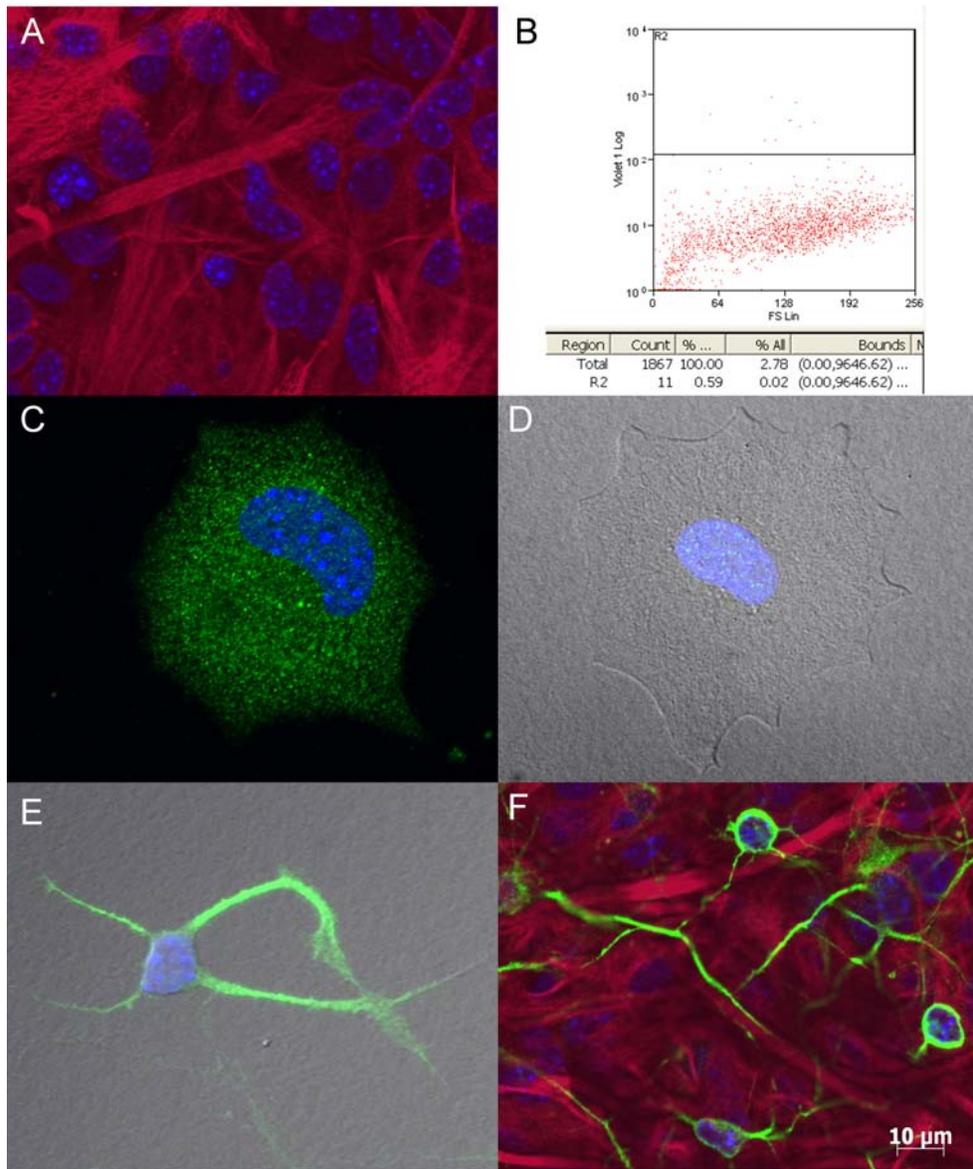


Abbildung 4.15 – Charakterisierung der Primärkulturen

A Primäre Astrozytenkulturen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Nach 14 Tagen in Kultur wurden sie mit einem Antikörper gegen GFAP und einem Alexa-568 gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt.

B 18 Tage alte primäre Astrozytenkulturen wurden abtrypsiniert, mit dem Mikroglia-Marker CD11b angefärbt und im FACS untersucht.

Primäre Astrozytenkulturen aus wt- (**C**) und *Dj-1*^{-/-}-Mäusen (**D**) auf Deckgläschen wurden mit einem Antikörper gegen DJ-1 und einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt.

E Primäre Neuronenkulturen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Nach 3 Tagen in Kultur wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen MAP2 und einem Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt.

F Neuron-Astrozyten-Kokulturen wurden nach 3 Tagen mit anti-GFAP und anti-Kaninchen Alexa-568 und anti-MAP2 mit anti-Maus Alexa-488 gefärbt.

Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 gefärbt (**A,C-F**).

Sowohl in ko- als auch in wt-Astrozyten findet sich eine unspezifische Kernfärbung, die unabhängig vom verwendeten DJ-1-Antikörper ist.

Zur Untersuchung des Einflusses von reaktiven Astrozyten auf Neuronen wurden primäre kortikale Neuronenkulturen aus *Dj-1^{-/-}*-Mäusen und wt-Geschwistertieren etabliert. Diese wurden durch eine Färbung gegen den neuronenspezifischen Marker MAP2 charakterisiert (Abbildung 4.15E). Nach drei Tagen in Kultur zeigen die Zellen bereits die charakteristische Morphologie von Neuronen mit klar ausgebildeten Neuriten.

4.3.2 Regulation proinflammatorischer Marker

Reaktive Astrozyten sind ein wichtiger Marker für Entzündungen im Gehirn, aber auch ein neuropathologisches Kardinalsymptom bei neurodegenerativen Erkrankungen (Pekny und Nilsson, 2005; McGeer und McGeer, 2008). Eine Vermutung ist deshalb, dass DJ-1 an der Regulation dieser Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Als Modell für neuroinflammatorische Reaktionen wird die Inkubation der Astrozyten mit Lipopolysacchariden (LPS) aus *E. coli*, einem Agonisten des TLR4, verwendet (Akira et al., 2001). Die Aktivierung von TLR4 führt zur Produktion von NO und zur Expression pro- und antiinflammatorischer Gene (Akira et al., 2001).

4.3.2.1 DJ-1 reguliert nicht die Expression von ICAM-1

Ein proinflammatorisches Gen, welches durch LPS induziert wird, ist der Oberflächenmarker *Intercellular cell adhesion molecule 1* (ICAM-1/CD54, Lee et al. (2000)). ICAM-1 wird auch stark von reaktiven Astrozyten in den Gehirnen von PD-Patienten exprimiert (Miklossy et al., 2006). Um den Einfluss von DJ-1 auf die Expression von ICAM-1 zu untersuchen, wurden primäre Astrozytenkulturen aus *Dj-1^{-/-}*-Mäusen und wt-Geschwistertieren für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS inkubiert (Abbildung 4.16). Die Inkubation mit LPS führt zu einem signifikanten Anstieg der ICAM-1-positiven Astrozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen, die nur mit Optimem-Inkubationsmedium inkubiert wurden. Der Prozentsatz ICAM-1-positiver Zellen verdoppelt sich von ca 30 % in Abwesenheit von LPS auf 70 % in Anwesenheit von LPS. Dieser Anstieg ist jedoch im untersuchten Konzentrationsbereich nicht

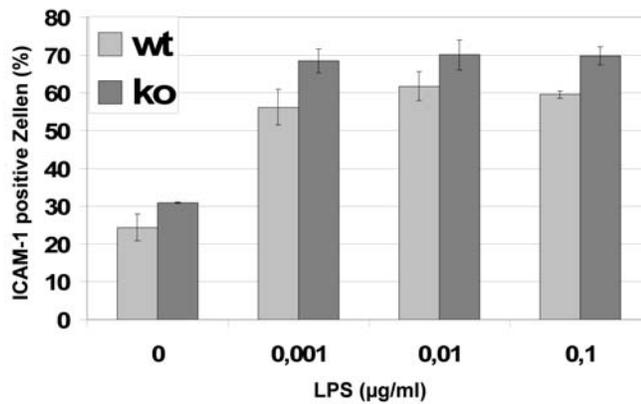


Abbildung 4.16 – FACS-Analyse der ICAM-1-positiven Astrozyten

Primäre Astrozytenkulturen aus *Dj-1*^{-/-}- und wt-Mäusen wurden für 48 h mit LPS in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen ICAM-1 (CD54) gefärbt und im FACS untersucht. Angegeben sind die Durchschnittswerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

konzentrationsabhängig. DJ-1 hat keinen Einfluss auf die Induktion von ICAM-1 in Astrozyten. Auch wenn eventuell ein leichter Trend zu erkennen ist, dass ko-Astrozyten mehr ICAM-1 exprimieren, kann kein signifikanter Unterschied zwischen wt- und *Dj-1*^{-/-}-APC festgestellt werden.

Die Expression von ICAM-1 wird durch LPS induziert, aber nicht durch DJ-1 reguliert.

4.3.2.2 DJ-1 reguliert die Produktion von NO

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Signalmolekül, welches sowohl autokrin als auch parakrin wirken kann. Seine Hauptwirkung liegt in der Aktivierung der Guanylatzyklase (Guix et al., 2005). Reaktive Astrozyten produzieren NO bei Stimulation mit LPS. Hier dient es vor allem der Immunantwort gegen bakterielle Infektionen. Massive Produktion von NO führt zum Tod umliegender Zellen (Guix et al., 2005). APC wurden mit LPS behandelt und das Abbauprodukt von NO, Nitrit (NO₂⁻), im Überstand quantifiziert. Sowohl in wt- als auch ko-APC induziert die Inkubation mit LPS für 48 h die Produktion von NO (Abbildung 4.17A); diese nimmt konzentrationsabhängig zu. Die

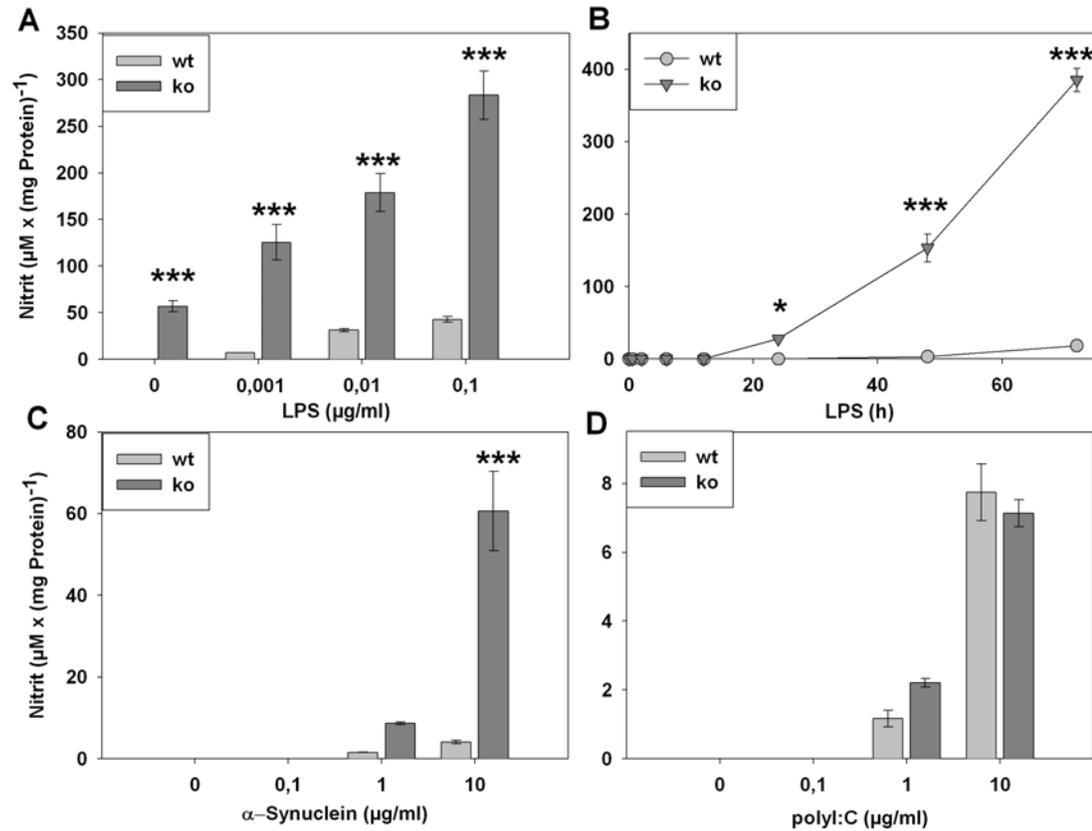


Abbildung 4.17 – DJ-1 reguliert die Produktion von NO

Primäre Astrozytenkulturen wurden für 48 h mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (A), für die angegebenen Zeiten mit 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (B) und für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen an α -Synuclein (C) oder polyI:C (D) inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Nitritkonzentration bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf die Proteinmenge pro *well* normalisiert. Angegeben sind die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung aus Triplikatbestimmungen repräsentativer Experimente.

Akkumulation von NO ist sehr stark vom Genotyp abhängig. Die ko-APC produzieren im Vergleich zu wt-APC eine um den Faktor 10 größere Menge NO. Dieses Verhältnis trifft für alle eingesetzten LPS-Konzentrationen zu. Über die Zeit betrachtet beginnt die Produktion von NO nach ca 12 h (Abbildung 4.17B). Bereits nach 24 h ist ein signifikanter Unterschied zwischen wt- und ko-Astrozyten zu sehen. Dieser Unterschied nimmt im Laufe der Inkubationszeit weiter zu, ohne bei der maximalen Inkubationszeit von 72 h ein Plateau erreicht zu haben.

Zusätzlich wurden die Zellen mit α -Synuclein behandelt. Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass α -Synuclein Astroglieose induzieren kann und die Expression von ICAM-1 und IL-6 stimuliert (Croisier und Graeber, 2006; Klegeris et al., 2006). Die Inkubation von wt- und ko-APC mit zunehmenden Mengen α -Synuclein führt zu einer konzentrationsabhängigen Akkumulation von Nitrit (Abbildung 4.17C). Diese ist vom Genotyp abhängig. Auch mit α -Synuclein als Stressor produzieren die ko-APC die zehnfache Menge NO im Vergleich zu den wt-APC. α -Synuclein ist jedoch ein weniger potentes proinflammatorisches Agens, da im Vergleich zu LPS die absoluten Mengen an produziertem NO deutlich geringer sind.

Astrozyten exprimieren vor allem TLR3 und haben nur wenige TLR4-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Farina et al., 2005). TLR3-Rezeptoren erkennen doppelsträngige RNA, wie sie bestimmte Viren besitzen (Lee et al., 2007). Um zu untersuchen, ob DJ-1 die TLR3-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst, wurden APC mit dem künstlichen TLR3-Agonisten polyI:C inkubiert und die NO-Produktion bestimmt (Abbildung 4.17D). Die Inkubation mit polyI:C führt zu einer geringen Produktion von NO im Vergleich zu LPS oder α -Synuclein. Zwischen wt- und ko-APC findet sich kein Unterschied in der NO-Produktion. Es scheint somit, dass DJ-1 die TLR3-vermittelte Signaltransduktion nicht beeinflusst.

Diese Resultate zeigen, dass DJ-1 inflammatorische Prozesse in Astrozyten reguliert und die übermäßige Produktion von NO verhindert.

4.3.2.3 DJ-1 reguliert selektiv Zytokine

Von der Vielzahl pro- und antiinflammatorischer Zytokine werden vor allem IL1 β , IL-6 und TNF α von Astrozyten produziert (Eddleston und Mucke, 1993; Lee et al., 1995).

Zusätzlich produzieren sie Wachstumsfaktoren wie NGF (Ridet et al., 1997). Um zu untersuchen, ob die Expression dieser Gene von DJ-1 reguliert wird, wurden *Dj-1^{-/-}*- und wt-APC für 48 h mit LPS inkubiert, die RNA isoliert und die Expression der Gene mit semiquantitativer RT-PCR untersucht (Abbildung 4.18A). Alle untersuchten inflammatorischen Marker wurden nach Zugabe von LPS in den Astrozyten induziert. Interessanterweise zeigt sich eine unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeit für die untersuchten Marker und Genotypen.

Die Expression von IL-6 steigt für die mittleren untersuchten Konzentrationen (0.001 - 0.01 $\mu\text{g/ml}$) sowohl in wt- als auch in ko-APC. Für diese beiden Konzentrationen ist kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Menge zwischen wt- und ko-APC sichtbar (Abb. 4.18 C). Für die höchste untersuchte Konzentration (0.1 $\mu\text{g/ml}$) steigt die mRNA-Menge in den ko-APC weiter an, während sie sich in den wt-APC nicht von der Menge bei 0.01 $\mu\text{g/ml}$ unterscheidet. Die ko-APC haben bei 0.1 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikant größere IL-6-Expression als die wt-APC. Die Expression von IL-6 ist somit konzentrations- und genotypabhängig. Nur für die höchste LPS-Konzentration exprimieren die ko-APC mehr IL-6. Der gefundene Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Expression von IL-6 auf mRNA-Ebene sollte auch durch unterschiedliche Proteinmengen zu bestätigen sein. Um dies zu überprüfen, wurde die IL-6-Konzentration im Überstand nach Inkubation mit LPS durch einen spezifischen ELISA nachgewiesen (Abbildung 4.18D). Die Produktion von IL-6 wurde durch LPS stimuliert. Auch auf Proteinebene zeigt sich für die größte eingesetzte LPS-Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen wt- und ko-APC. Ko-APC produzierten im Inkubationszeitraum von 48 h doppelt so viel IL-6 wie wt-APC. Für die niedrigeren LPS-Konzentrationen zeigt sich wie auf mRNA-Ebene kein Unterschied.

Die Expression von IL-1 β hängt ebenfalls stark von der eingesetzten LPS-Konzentration ab (Abb. 4.18 A,B). In den ko-APC wird die IL-1 β -Expression durch LPS stark induziert, wobei aber kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen vorliegt. In den wt-APC wird IL-1 β für die mittleren LPS-Konzentrationen (0.001 - 0.01 $\mu\text{g/ml}$) nur schwach exprimiert. Die mRNA-Menge ist für diese beiden Konzentrationen signifikant geringer als in ko-APC. Für die höchste LPS-Konzentration steigt die Expression auf die Menge der ko-APC an. Der *knockout* von *Dj-1* zeigt somit nur für die mittleren Konzentrationen einen Effekt auf die IL-1 β -Expression.

TNF α wird sowohl in wt- als auch in ko-APC induziert. In den wt-APC ist jedoch nur eine Expression bei der höchsten eingesetzten LPS-Konzentration (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) detektierbar, während sie in den ko-APC konzentrationsabhängig ansteigt. Bei 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS ist die mRNA-Menge bei beiden Genotypen ungefähr gleich. Es liegt also eine ähnliche Abhängigkeit von der Konzentration und vom Genotyp vor wie bei IL-1 β .

NGF wird durch alle eingesetzten LPS-Konzentrationen induziert (Abb. 4.18 A). Die mRNA-Menge hängt hierbei nicht von der eingesetzten LPS-Konzentration ab. Es ist auch kein Unterschied zwischen den Genotypen feststellbar.

Aus den unterschiedlichen Effekten des *Dj-1-knockouts* auf die Expression der Zytokine und Wachstumsfaktoren lässt sich schließen, dass die Gene durch unterschiedliche Signalwege reguliert werden bzw ein Gen abhängig von der LPS-Konzentration von unterschiedlichen Signalwegen reguliert wird und DJ-1 nur einen Teil dieser Signalwege beeinflusst.

4.3.2.4 DJ-1 reguliert die Expression von COX-2

Prostaglandine sind neben NO wichtige Signalmoleküle, die bei Entzündungen und neurodegenerativen Prozessen ausgeschüttet werden (Hunot und Hirsch, 2003; Minghetti, 2004). Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Prostaglandinsynthese ist COX-2 (Smith et al., 1996). Um herauszufinden, ob DJ-1 auch die Synthese der Prostaglandine beeinflusst, wurde die Expression von COX-2 in wt- und ko-APC nach Induktion mit LPS durch RT-PCR untersucht (Abbildung 4.18A). Die Expression von COX-2 wird sowohl in wt- wie auch in ko-APC durch LPS induziert. Für beide Genotypen zeigt sich für die untersuchten Konzentrationen keine Konzentrationsabhängigkeit in der Expression. Für alle eingesetzten Konzentrationen ist die Expression in den ko-APC stärker als in den wt-APC. Dies zeigt, dass DJ-1 die Prostaglandinsynthese in reaktiven Astrozyten über die Regulation von COX-2 beeinflussen könnte.

4.3.3 DJ-1 reguliert die NO-Produktion durch die Expression von iNOS

Wie in Kapitel 4.3.2.2 festgestellt wurde, beeinflusst DJ-1 die Produktion von NO in reaktiven Astrozyten. Es ist zu vermuten, dass dies wie bei den Prostaglandinen

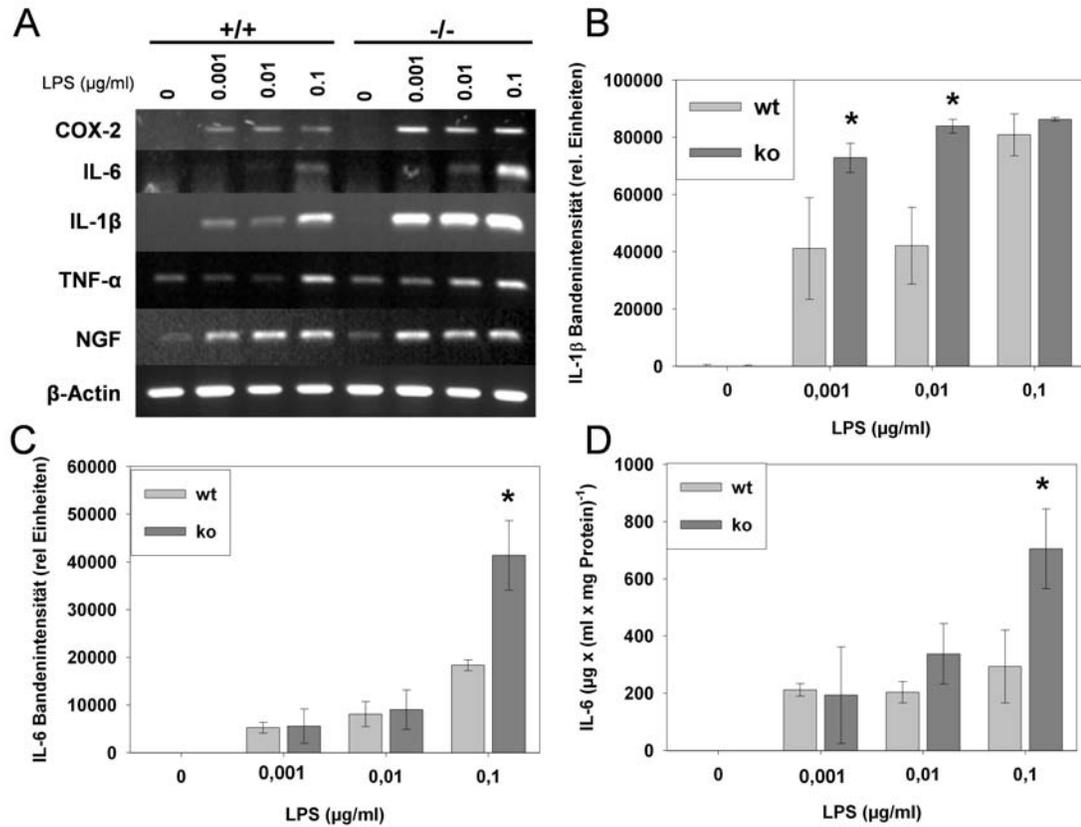


Abbildung 4.18 – Expression inflammatorischer Marker

Primäre Astrozyten aus *Dj-1*^{-/-}-Mäusen und wt-Geschwistertieren wurden für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen LPS inkubiert und anschließend die RNA isoliert (A,B,C). Die Expression der inflammatorischen Marker wurde mit spezifischen Primern untersucht (A). Die Expression von Interleukin-1β (B) und Interleukin-6 (C) wurde densitometrisch bestimmt und auf die β-Actin-Menge normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. D) Die Menge an sekretiertem IL-6 wurde im Überstand mit einem spezifischen ELISA bestimmt und auf die Proteinmenge im *well* normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung eines repräsentativen Experiments.

über die Regulation eines Syntheseeenzyms erfolgt. NO wird durch drei NO-Synthasen (NOS1, NOS2, NOS3) produziert (Guix et al., 2005; Murphy und Gibson, 2007). NOS2, auch induzierbare NOS (iNOS) genannt, ist die wichtigste NO-Synthase für die LPS-induzierte Produktion von NO (Lee et al., 1995; Murphy und Gibson, 2007). Es wurde deshalb untersucht, ob DJ-1 die Induktion von iNOS und damit die Menge des Enzyms beeinflusst. Die RT-PCR-Untersuchung von LPS-inkubierten wt- und ko-APC zeigt, dass iNOS durch LPS konzentrationsabhängig induziert wird und in ko-APC drei- bis zehnmal mehr iNOS-mRNA nachgewiesen werden kann (Abb. 4.19 A,B). Dieser Befund lässt sich per Western Blot auch auf Proteinebene bestätigen (Abb. 4.19 C,D). Sowohl in wt- als auch in ko-APC ist iNOS ab 12 h Inkubationszeit nachweisbar. In den wt-Zellen ist die maximale Expression nach 24 h zu beobachten, während nach 48 h kein Protein mehr nachweisbar ist. In ko-APC ist die iNOS-Menge sowohl nach 12 h wie auch nach 24 h signifikant größer als in wt-APC. Zusätzlich nimmt die Expression nach 48 h nicht ab, sondern bleibt auf gleichem Niveau. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Produktion von NO in den wt- und ko-APC (Abb. 4.17).

Es stellt sich des Weiteren die Frage, ob nur iNOS an der DJ-1-regulierten NO-Produktion beteiligt ist. Um dies zu klären, wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des spezifischen iNOS-Inhibitors 1400W (Garvey et al., 1997) inkubiert (Abb. 4.19D). Dieser kann die LPS-induzierte NO-Produktion sowohl in wt- als auch in ko-Zellen konzentrationsabhängig unterdrücken. Unter Sättigungsbedingungen (10 μ M 1400W) ist die NO-Produktion vollständig unterdrückt. Zusätzlich wurde die Expression von NOS1 (Daten nicht gezeigt) und NOS3 in wt- und ko-APC nach Inkubation mit und ohne LPS untersucht (Abbildung 4.19B). Weder NOS1 noch NOS3 werden in den APC durch LPS induziert. Es findet sich auch kein Unterschied in der Expression zwischen wt- und ko-Zellen. Es ist also anzunehmen, dass NOS1 und NOS3 keinen oder nur einen minimalen Einfluss haben.

Diese Experimente zeigen, dass DJ-1 die Produktion von NO über die Expression von NOS2 reguliert.

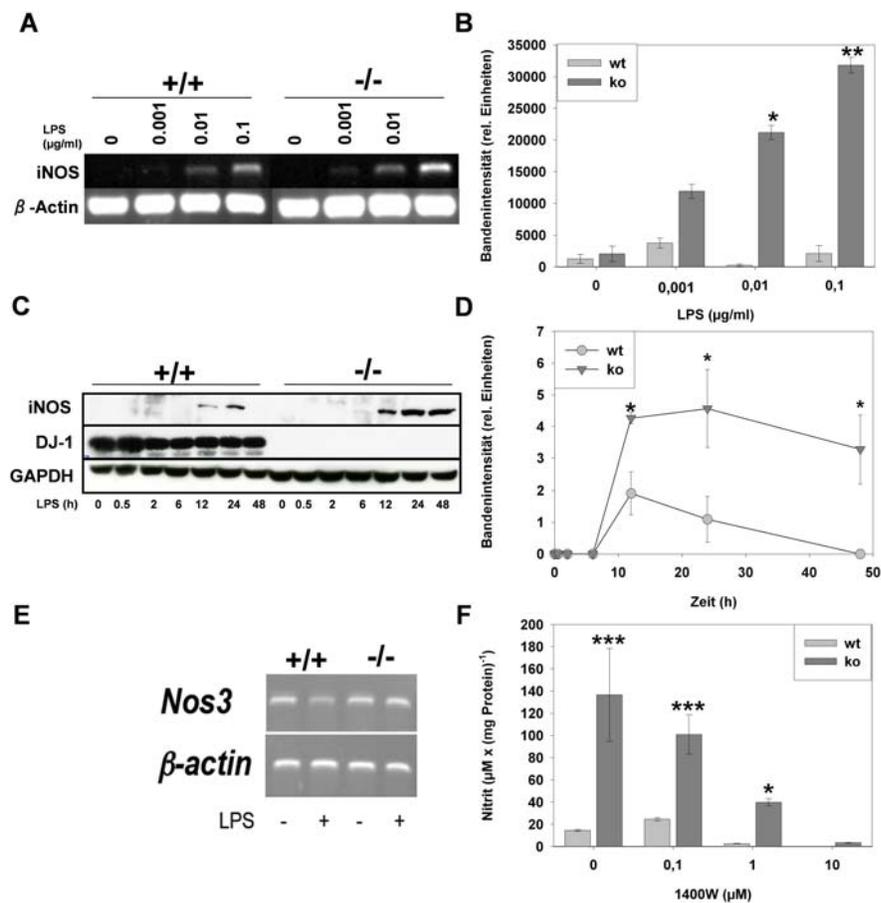


Abbildung 4.19 – DJ-1 reguliert die Expression von iNOS

A,B) Primäre Astrozytenkulturen aus wt- und *Dj-1*^{-/-}-Mäusen wurden 48 h lang mit LPS in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Die Expression von *Nos2* wurde mit spezifischen Primern untersucht (**A**) und die Expression anhand von drei unabhängigen Experimenten densitometrisch bestimmt (**B**). Angegeben sind die Durchschnittswerte ± Standardfehler.

C,D) APC wurden für die angegebenen Zeiten mit 0.1 µg/ml LPS inkubiert, lysiert und gleiche Proteinmengen auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotting auf eine PVDF-Membran wurde diese mit Antikörpern gegen iNOS, DJ-1 und GAPDH untersucht (**C**). Drei unabhängige Experimente wurden densitometrisch ausgewertet und die Expression von iNOS bestimmt (**D**). Angegeben sind die Durchschnittswerte ± Standardfehler.

E) Primäre Astrozytenkulturen aus wt- und *Dj-1*^{-/-}-Mäusen wurden 48 h lang mit LPS in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Die Expression von *Nos3* wurde mit spezifischen Primern untersucht.

F) APC wurden für 30 min mit den angegebenen Konzentrationen 1400W vorinkubiert und anschließend für 48 h mit 0.1 µg/ml LPS und den jeweiligen 1400W-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Medium bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf die Proteinmenge pro *well* normalisiert. Angegeben sind die Durchschnittswerte ± Standardabweichung aus Triplikatabbestimmungen eines repräsentativen Experiments.

4.3.4 Retransfektion mit lenti-DJ-1 normalisiert die NO-Produktion in *Dj-1*^{-/-}-Astrozyten

Das Problem von *knockout*-Modellen ist manchmal, dass durch die Manipulation eines Gens sekundäre Effekte auftreten, die nicht auf den Verlust des Genprodukts zurückzuführen sind. Um auszuschließen, dass die übermäßige NO-Produktion solch ein Artefakt ist, wurden *Dj-1*^{-/-}-Astrozyten lentiviral mit [wt]DJ-1 oder einem GFP-Kontrollvektor transduziert und anschließend mit LPS inkubiert (Abbildung 4.20). GFP-transduzierte ko-APC produzieren etwa viermal so viel NO wie die gleiche Anzahl wt-APC. Ko-APC, die mit [wt]DJ-1 transduziert wurden, produzieren fast die gleiche Menge NO wie die wt-APC. Daraus ist zu schließen, dass der Phänotyp tatsächlich durch den Verlust von DJ-1 ausgelöst wird.

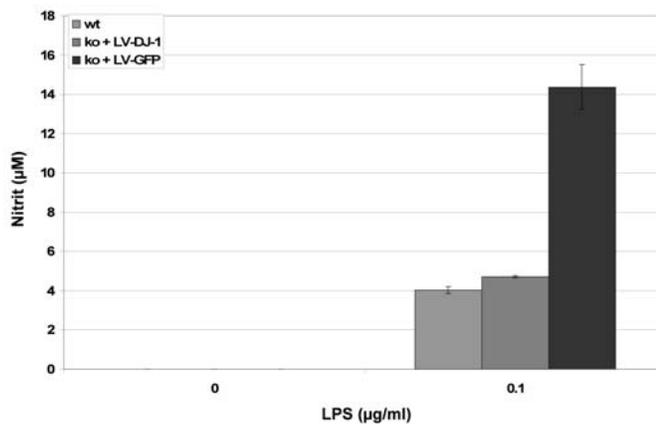


Abbildung 4.20 – NO-Produktion von APC nach lentiviraler Transduktion

Dj-1^{-/-} Astrozyten wurden lentiviral mit [wt]DJ-1 oder GFP transduziert. 48 h später wurden die Zellen für 48 h mit oder ohne 0.1 µg/ml LPS inkubiert und die NO-Produktion gemessen.

4.3.5 Regulatorischer Mechanismus von DJ-1

4.3.5.1 DJ-1 reguliert p38^{MAPK}, aber nicht NFκB

Da NOS2 hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, ist anzunehmen, dass DJ-1 einen der übergeordneten Signalwege beeinflusst (Silva et al., 1997; Murphy, 2000). Die beiden Hauptsignalwege, die durch LPS aktiviert werden, sind der MAP-

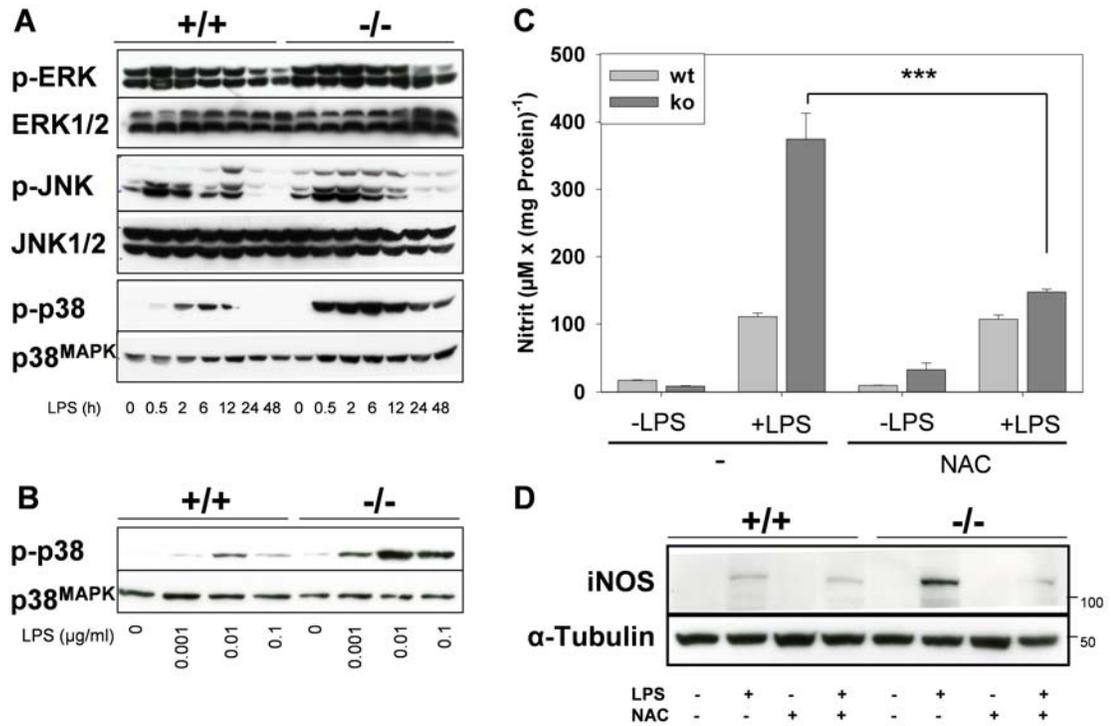


Abbildung 4.21 – Aktivierung von Signalkaskaden durch LPS

Astrozyten von *Dj-1*^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren wurden für die angegebenen Zeiten mit 0.1 µg/ml LPS (A) bzw mit den angegebenen Konzentrationen LPS für 30 min (B) inkubiert und die Zellen anschließend lysiert. Die Lysate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit den angegebenen Antikörpern untersucht.

Astrozyten von *Dj-1*^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren wurden für 30 min mit oder ohne 1 mM N-Acetyl-Cystein (NAC) inkubiert und anschließend mit oder ohne 0.1 µg/ml LPS in fortwährender Anwesenheit von NAC für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Überstand bestimmt (C), die Zellen lysiert und die Lysate auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit den angegebenen Antikörpern untersucht (D).

Kinase-Signalweg und der NF κ B-Signalweg (Akira et al., 2001; Kumar et al., 2003; Matsuzawa et al., 2005). Es ist bereits bekannt, dass DJ-1 den JNK/p38-Signalweg reguliert (Junn et al., 2005; Mo et al., 2008). Die Aktivität der MAP-Kinase-Signalwege wurde in An- und Abwesenheit von DJ-1 untersucht (Abbildung 4.21). Der MAP-Kinase-Signalweg verzweigt sich in drei Signalkaskaden, den ERK-Signalweg, den JNK-Signalweg und den p38-Signalweg (Zhang und Dong, 2007). Die Aktivität der drei Schlüsselenzyme ERK, JNK und p38 wurde anhand ihrer Phosphorylierung im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern gemessen. Alle drei Enzyme werden durch LPS aktiviert, was sich in einer verstärkten Phosphorylierung nach Zugabe von LPS äußert. ERK wird nur schwach aktiviert, während JNK und p38 wesentlich stärker phosphoryliert werden. Die JNK1/2-Phosphorylierung hat ihren Höhepunkt nach 2 h und geht nach 24 h wieder auf ihr Basalniveau zurück. Zwischen wt- und ko-APC zeigt sich, wenn überhaupt, nur ein minimaler Unterschied. Interessanterweise zeigt sich für p38 ein starker Unterschied zwischen wt- und *Dj-1*^{-/-}-Astrozyten. Bei beiden Genotypen ist das erste phospho-p38-Signal nach 30 min zu detektieren und hat seinen Höhepunkt bei 6 h. In den ko-APC ist das Signal jedoch ca. dreimal so stark. Ausserdem bleibt der Signalweg wesentlich länger aktiv. Während in den wt-APC nach 24 h kein phospho-p38 mehr nachgewiesen werden kann, ist in den ko-APC auch nach 48 h noch ein deutliches Signal zu detektieren.

Da einige der beobachteten Unterschiede zwischen wt- und ko-APC von der LPS-Konzentration abhängen, während andere davon unabhängig sind, wurde auch der Einfluss der LPS-Konzentration auf die Phosphorylierung von p38^{MAPK} untersucht (Abbildung 4.21 B). Für alle untersuchten LPS-Konzentrationen ist das Signal für die ko-APC stärker als für die wt-APC. Interessanterweise haben sowohl wt- als auch ko-APC ihre maximale p38-Phosphorylierung bei einer LPS-Konzentration von 0.01 μ g/ml. Für die höchste Konzentration ist das Phosphorylierungssignal in den ko-APC ungefähr gleich stark, während es in den wt-APC sogar etwas abnimmt. Dies überrascht, da p38^{MAPK}-abhängige Effekte wie die Produktion von NO über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ansteigen. Eine Erklärung könnte sein, dass die maximale Phosphorylierung von p38^{MAPK} zeitlich früher erreicht wird, je höher die LPS-Konzentration ist.

Der zweite wichtige Signalweg, der durch LPS aktiviert wird, ist der NF κ B-Signalweg.

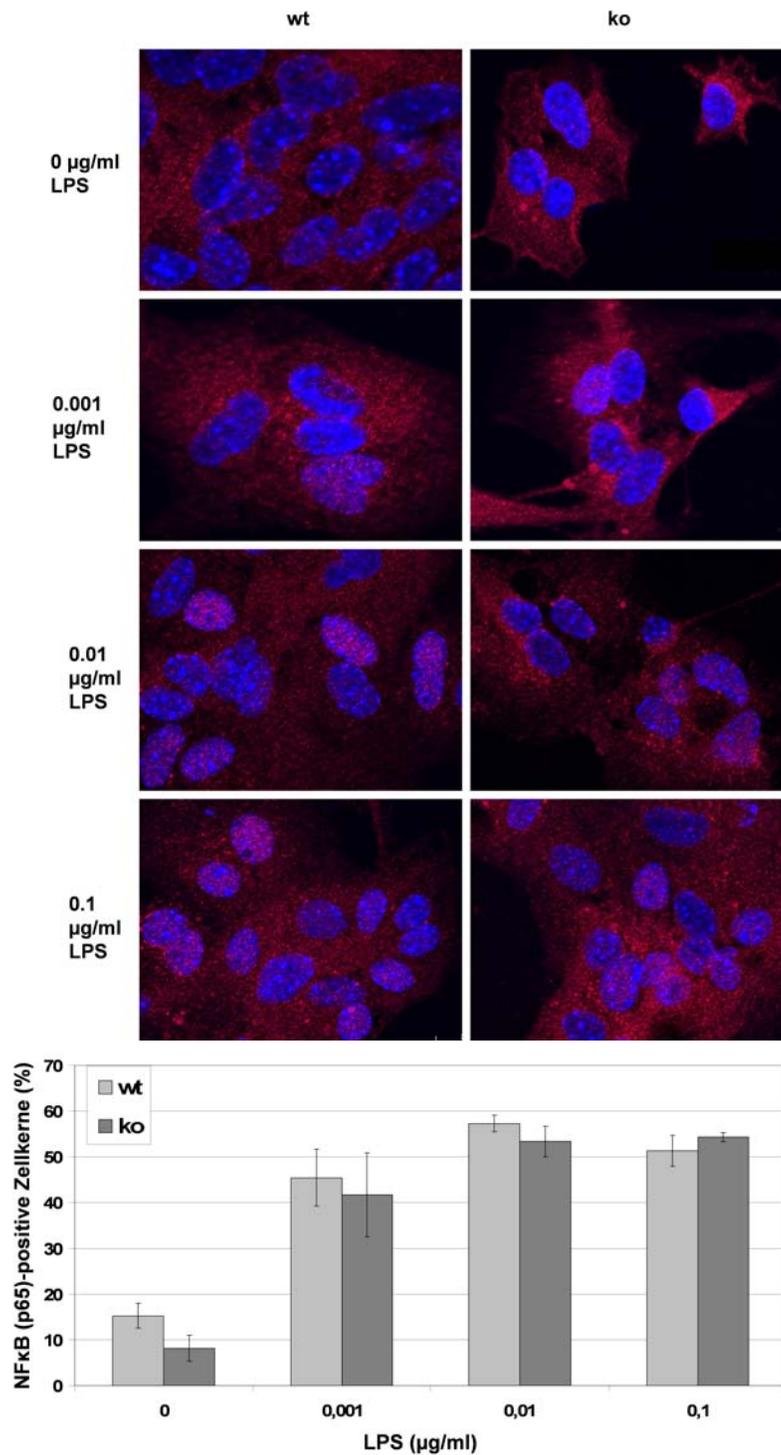
Seine Aktivität kann durch die Translokation der p65-Untereinheit vom Cytosol in den Zellkern bestimmt werden (Baeuerle und Baltimore, 1988). Der Signalweg wird durch LPS aktiviert, was durch die verstärkte Translokation von p65 nach Zugabe von LPS sichtbar wird (Abbildung 4.22). Für keine der eingesetzten LPS-Konzentrationen kann jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen wt- und ko-APC gefunden werden.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalwege nach LPS-Stimulation ROS-abhängig ist (Matsuzawa et al., 2005) und DJ-1 in Makrophagen nach LPS-Stimulation oxidiert wird (Mitsumoto und Nakagawa, 2001). Um den Einfluss von ROS in den LPS-behandelten Astrozytenkulturen zu untersuchen, wurden diese mit 1 mM N-Acetyl-Cystein (NAC) vorbehandelt und anschließend mit LPS und NAC inkubiert (Abb. 4.21 C+D). Inkubation mit NAC verringert die NO-Produktion in den ko-APC signifikant, während die wt-APC keine Änderung in der NO-Produktion zeigen. Die verminderte NO-Produktion wird durch eine verringerte Induktion von NOS2 in den NAC-behandelten ko-APC verursacht (Abb. 4.21 D).

Aus den Aktivitätsmessungen der verschiedenen Signalwege ist zu schließen, dass nur der p38-vermittelte MAP-Kinase-Signalweg in Astrozyten von DJ-1 beeinflusst wird und dieser Effekt ROS-abhängig ist.

4.3.5.2 Inhibition der p38^{MAPK} verhindert übermäßige iNOS-Stimulation in *Dj-1*^{-/-}-Astrozyten

Falls die überschießende Aktivität des p38^{MAPK}-Signalwegs in den *Dj-1*^{-/-}-Astrozyten für die verstärkte Expression von iNOS und die übermäßigen Produktion von NO verantwortlich ist, sollte dieser Phänotyp durch einen p38-spezifischen Inhibitor rückgängig gemacht werden können. APC aus wt- und ko-Mäusen wurden mit dem p38-Inhibitor SB203580 (Cuenda et al., 1995) bzw. dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle und LPS behandelt (Abbildung 4.23). Bei der Inkubation mit DMSO und LPS bestätigen sich die bereits gemachten Beobachtungen (Abbildung 4.17), dass die ko-Astrozyten ein Vielfaches an NO im Vergleich zu den wt-Astrozyten produzieren (Abb. 4.23A). In Anwesenheit von SB203580 und LPS wird die produzierte NO-Menge sowohl in ko- als auch in wt-APC signifikant verringert. Die ko-APC produzieren nur noch ca. 10% NO im Vergleich zur Kontrolle, die wt-APC ca. 20%, sodass beide Genotypen eine un-



Abbildungung 4.22 – Aktivierung des NF κ B-Signalwegs durch LPS

APC auf Deckgläschen wurden für 3 h mit den angegebenen LPS-Konzentrationen behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen die p65-Untereinheit von NF κ B angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde untersucht, ob eine Translokation von NF κ B in den Zellkern stattgefunden hat. Für jeden Datenpunkt wurden 50 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

gefähr gleich große basale Menge NO produzieren, die nicht p38-kontrolliert ist. Diese Beobachtungen lassen sich auch mit der Induktion von iNOS korrelieren (Abb. 4.23B). In Anwesenheit von DMSO und LPS wird iNOS in wt-Zellen schwach und in ko-Zellen stark induziert. Mit SB203580 wird diese Induktion in wt- und ko-Zellen unter die Nachweisgrenze verringert.

Die Expression von NOS2 und die damit verbundene Produktion von NO ist somit p38^{MAPK}-kontrolliert. Da die basale NO-Menge in wt- und ko-APC gleich groß ist, lässt sich daraus schließen, dass DJ-1 seinen Effekt über p38^{MAPK} ausübt.

Auf die mRNA-Mengen inflammatorischer Marker hat SB203580 unterschiedliche Wirkungen (Abbildung 4.23C). Wie auch schon auf Proteinebene und beim Reaktionsprodukt NO gesehen, wird die Expression von iNOS sowohl in wt- als auch in ko-APC vollständig durch den p38-Inhibitor unterdrückt. Auch die Expression von IL-6 wird bei der eingesetzten LPS-Konzentration von 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durch SB203580 verringert. Weder in wt- noch in ko-APC verschwindet die mRNA jedoch vollständig, sondern es bleibt ein Restsignal, welches in den ko-APC stärker ist als in den wt-Zellen. Vorläufige Resultate zeigen, dass SB203580 für niedrigere Konzentrationen keinen Effekt auf die IL-6-mRNA-Menge hat (Daten nicht gezeigt). Für NGF zeigt sich ein uneinheitliches Bild. In den ko-Zellen unterdrückt SB203580 die Induktion von NGF, während in den wt-Zellen keine Induktion und auch kein Effekt von SB203580 detektierbar ist. Die Expression von IL-1 β wird durch LPS stark induziert, wobei auch hier, wie bereits in Abbildung 4.18 zu sehen war, für die eingesetzte LPS-Konzentration von 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kein Unterschied zwischen den Genotypen feststellbar ist. Der p38-Inhibitor hat weder in wt- noch in ko-Zellen einen Einfluss auf die mRNA-Menge. Vorläufige Resultate zeigen jedoch, dass der p38-Inhibitor für niedrigere LPS-Konzentrationen die mRNA-Menge verringert (Daten nicht gezeigt). Auch für TNF α induziert LPS sowohl in den wt- als auch in den ko-Zellen die Expression, es findet sich jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen und auch kein Effekt von SB203580.

Da die gleichen inflammatorischen Marker durch DJ-1 und den p38-Inhibitor SB203580 beeinflusst werden, bestätigt sich mit diesen Resultaten, dass DJ-1 vor allem den p38^{MAPK}-Signalweg reguliert.

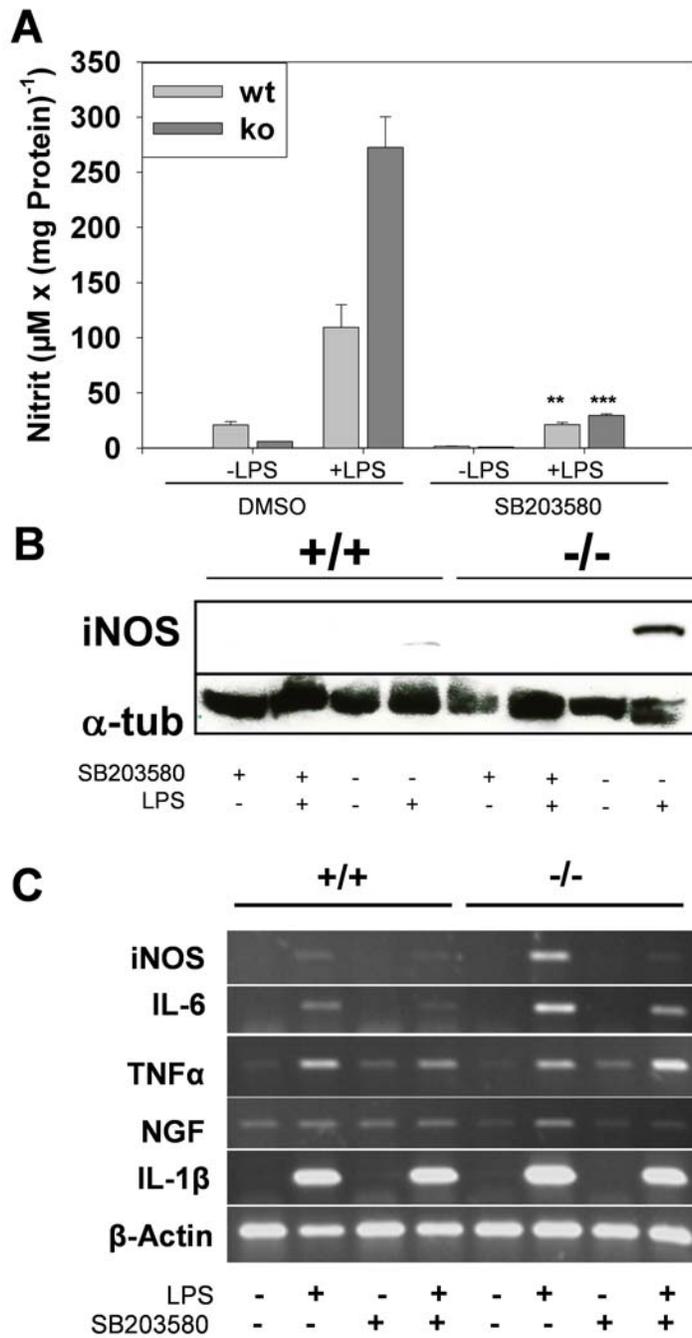


Abbildung 4.23 – Inhibition der p38-Aktivität mit SB203580

Astrozyten von *Dj-1*^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren wurden für 30 min mit 50 µM SB203580 oder DMSO vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich mit oder ohne 0.1 µg/ml LPS für weitere 48 h inkubiert. **A)** Die vollständige RNA wurde isoliert und die Expression der angegebenen Gene mit spezifischen Primern untersucht. **B+C)** Das produzierte NO wurde im Überstand nachgewiesen (**B**) und die Zellen lysiert. Das Lysat wurde auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen iNOS und GAPDH untersucht (**C**).

4.3.5.3 Die Regulation von p38^{MAPK} ist in *C. elegans* konserviert

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* ist ein Modellorganismus, in dem der MAP-Kinase-Signalweg konserviert ist (Aballay et al., 2003). *C. elegans* besitzt zwei Homologe zu DJ-1, in denen wichtige Strukturmerkmale des humanen DJ-1 konserviert sind (Abbildung 4.1 und Bandyopadhyay und Cookson (2004)). Auch in *C. elegans* kann der p38-Signalweg durch gram-negative Bakterien induziert werden (Aballay et al., 2003). Hierzu sind spezielle, humanpathogene Stämme wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Enterococcus faecalis* nötig, die an die Würmer verfüttert werden. Um zu untersuchen, ob das *C. elegans*-Homolog von DJ-1 die Aktivität des p38-Homologs PMK-1 unterdrücken kann, wurden wt N2-Würmer und *djr-1/2-knockout*-Würmer mit *E. coli* OP50 oder *Pseudomonas aeruginosa* für 24 h gefüttert und anschließend die Phosphorylierung von PMK-1 gemessen (Abbildung 4.24 A). *Djr1/2*-defiziente Würmer zeigten eine wesentlich stärkere Phosphorylierung von p38 als N2-Würmer, nachdem sie mit *P. aeruginosa* gefüttert worden sind. Dies belegt, dass die Regulation des p38-Signalwegs durch DJ-1 evolutionär konserviert ist.

Der ASK-p38-Signalweg wirkt in *C. elegans*, anders als für Vertebraten typisch, antiapoptotisch. Deshalb sollte eine verstärkte Aktivität dieses Signalwegs zu einer verstärkten Resistenz gegenüber humanpathogenen Bakterien führen. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Inhibition des Signalwegs die Würmer schneller sterben lässt (Kim et al., 2002). Um die Hypothese des protektiven Effekts des DJ-1-*knockouts* zu testen, wurden Wildtyp N2-Würmer, *djr-1/2-knockout* und als Kontrolle NSY-*knockout* (ASK-Homolog)- bzw SEK-*knockout* (MKK3-Homolog) auf *Pseudomonas aeruginosa* inkubiert (Tan et al., 1999) und die Zahl der lebenden und toten Würmer nach bestimmten Zeitintervallen bestimmt (Abbildung 4.24 B). Wie bereits in der Literatur beschrieben (Aballay et al., 2003), sterben die SEK- und NSY-ko-Würmer innerhalb der ersten drei Tage, während von den N2-Würmern innerhalb des gleichen Zeitraums nur 10 % sterben und am Ende des Beobachtungszeitraums von sieben Tagen noch ca 40 % der Würmer leben. Für die *djr-1/2-ko*-Würmer zeigt sich kein signifikanter Unterschied zu den N2-Würmern während des gesamten Beobachtungszeitraums. Der Verlust von DJ-1 hat somit keinen zusätzlichen protektiven Effekt für die Würmer. Diese Experimente zeigen, dass DJ-1 ein negativer Regulator des p38-Signalwegs in *C. elegans* ist, aber nicht zu einer längeren Lebensdauer der Würmer beiträgt.

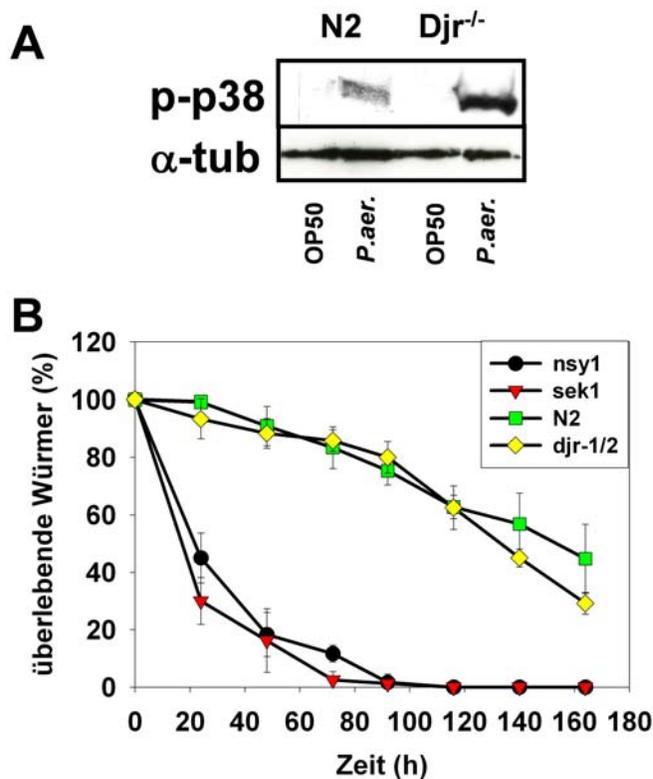


Abbildung 4.24 – Einfluss von DJ-1 auf die Immunantwort von *C. elegans*

A Der *C. elegans* Wildtyp-Stamm (N2) und die Deletionsmutante der DJ-1-Homologe *djr-1.1(tm918);djr-1.2(tm1346)* wurden auf *E.coli* OP50 oder *P. aeruginosa* inkubiert. Nach 24 h wurden die Würmer lysiert, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde mit phospho-p38 und α -Tubulin als Ladungskontrolle untersucht. Da der Antikörper gegen humanes p38 im Gegensatz zum phosphospezifischen Antikörper das *C. elegans*-Homolog nicht erkennt, wurde α -Tubulin als Ladekontrolle verwendet.

B Die *C. elegans*-Stämme N2, *djr-1.1/2*, SEK und NSY wurden auf *P. aeruginosa* inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Anzahl der lebenden und toten Würmer bestimmt.

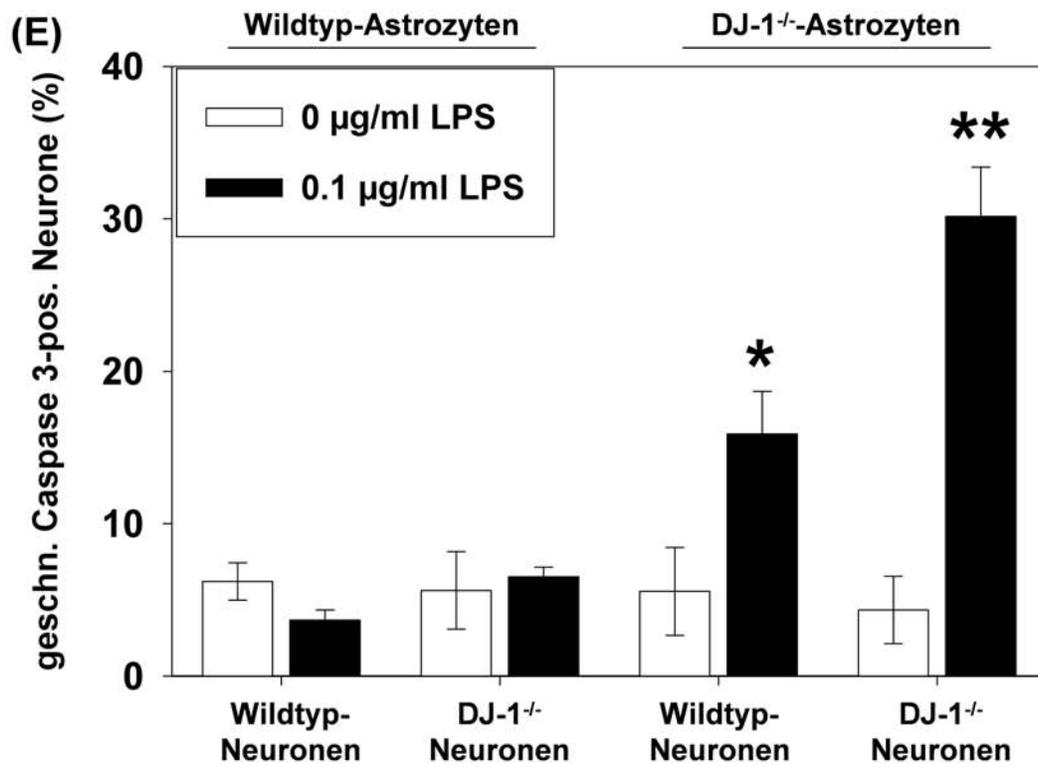
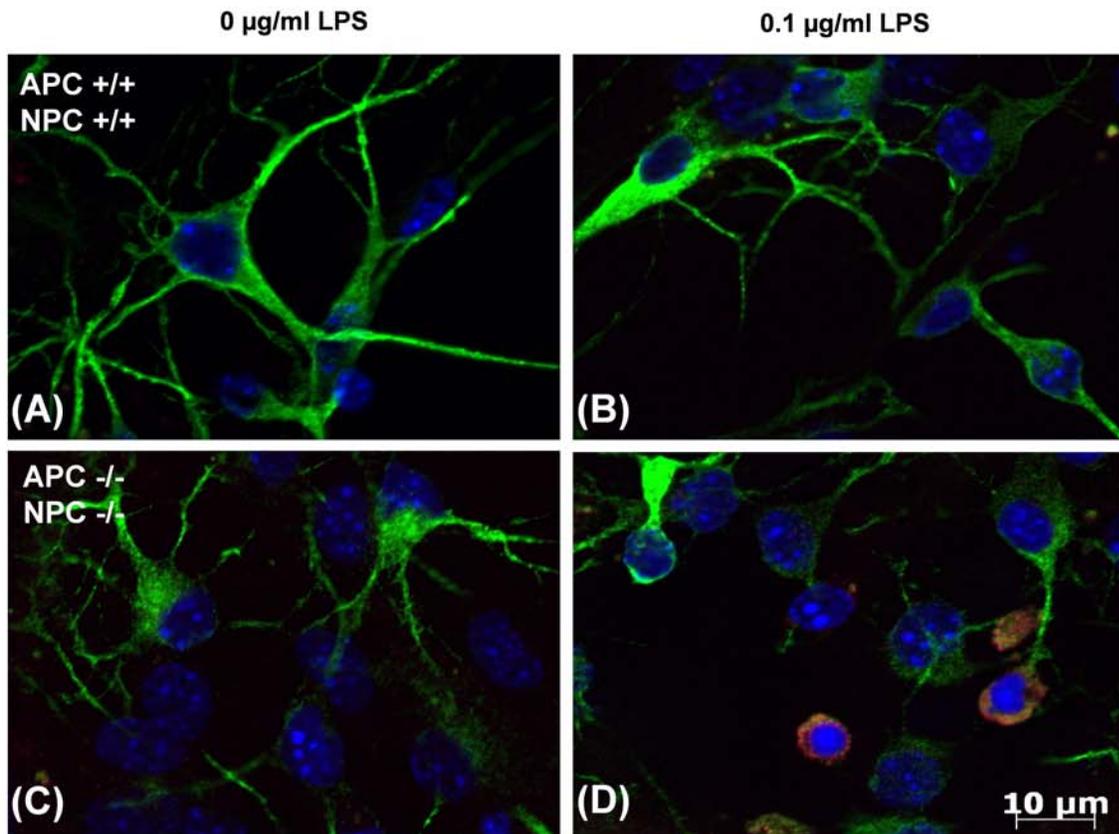
4.3.6 Astrozyten-Neuronen-Kokulturen

NO wirkt cytotoxisch auf Neurone. Die Überproduktion von NO durch Mikroglia oder Astrozyten schädigt die umliegenden Neurone (Brown, 2007). Astrozyten-Neuronen-Kokulturen (Abbildung 4.15F) dienen als Modell für diese neurodegenerativen Prozesse. Primäre kortikale Neurone aus *Dj-1^{-/-}*- und wt-Mäusen wurden auf konfluente

Lagen von wt- und ko-APC ausgesät und die Kokulturen mit oder ohne LPS inkubiert. Anschließend wurden die Neuronen auf geschnittene Caspase-3, einem Apoptosemarker (Nicholson et al., 1995), untersucht (Abbildung 4.25). Neuronen auf wt-APC zeigten sowohl ohne als auch mit LPS eine normale Morphologie ohne degenerierte Neurite (Abb. 4.25 A+B). Der Prozentsatz apoptotischer Zellen unterscheidet sich nicht zwischen LPS- und nicht LPS-behandelten Kulturen (Abb. 4.25 E). LPS selbst ist also nicht cytotoxisch für Neurone. Da auch kein Unterschied zwischen wt- und ko-Neuronen festzustellen ist, reagieren diese auch nicht unterschiedlich empfindlich auf LPS. Neuronen auf ko-APC dagegen haben einen signifikant höheren Prozentsatz geschnittene Caspase3-positiver Zellen (Abb. 4.25 E). Bei wt-Neuronen verdoppelt sich der Prozentsatz bei LPS-Behandlung gegenüber unbehandelten Zellen. Ko-Neurone haben sogar sechsmal mehr apoptotische Zellen als die unbehandelten Kontrollzellen. Sie reagieren also noch empfindlicher auf NO als wt-Neurone. Auch morphologisch ist zu erkennen, dass die reaktiven ko-Astrozyten die Neurone schädigen (Abb. 4.25 C+D). Sowohl wt- als auch ko-Neurone haben einen signifikanten Anteil an Zellen mit fragmentierten oder ganz fehlenden Neuriten.

Da der Verlust von DJ-1 einen besonders starken Effekt auf die Produktion von NO hat, ist zu vermuten, dass die Überproduktion von NO für die Neurone zytotoxisch wirkt. Um dies zu untersuchen, wurden die Astrozyten-Neuronen-Kokulturen mit dem iNOS-Inhibitor 1400W und LPS inkubiert (Abb. 4.25 F). Die Inkubation mit 1400W reduziert sowohl die Zahl apoptotischer wt- als auch ko-Neurone signifikant, wenn diese auf ko-APC kultiviert werden. Dies bestätigt, dass vor allem NO das zytotoxische Agens ist.

Die verstärkte Produktion von NO und Zytokinen in ko-APC hat somit einen zytotoxischen Effekt auf kokultivierte Neurone, der durch den Verlust von DJ-1 in den Neuronen noch verstärkt wird.



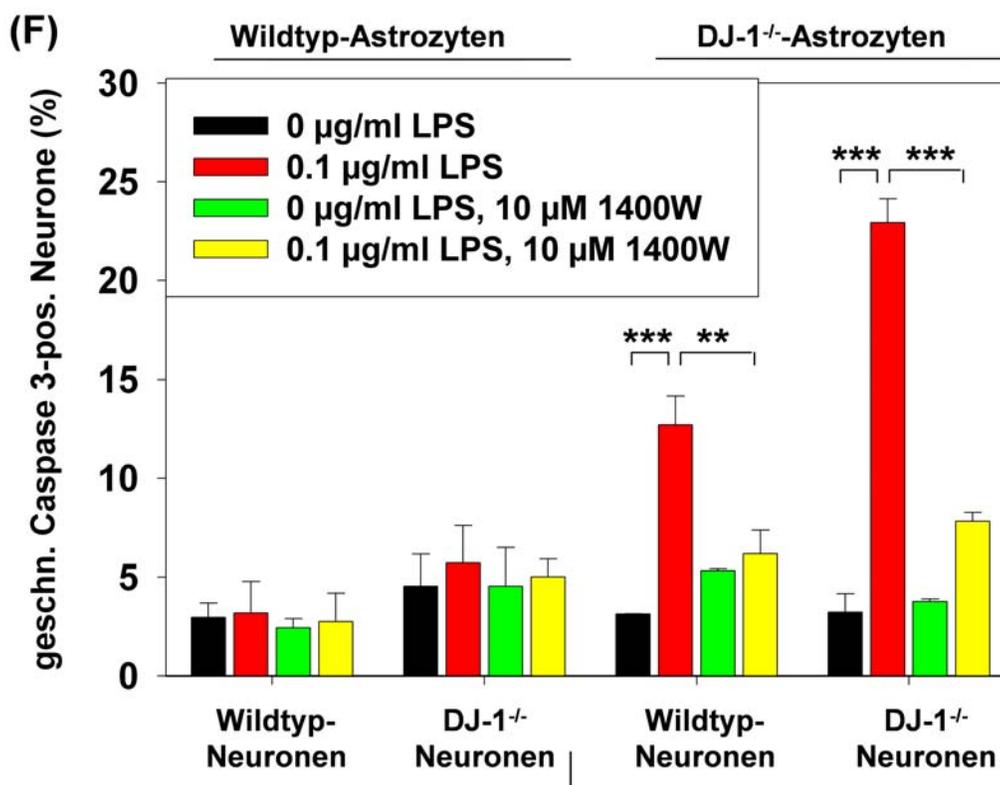


Abbildung 4.25 – Aktivierte ko-Astrozyten wirken zytotoxisch auf ko-kultivierte Neurone

Primäre kortikale Neuronen aus *Dj-1^{-/-}*-Mäusen oder wt-Geschwistertieren wurden auf einer konfluenten Schicht wt- oder ko-Astrozyten ausgesät. Nach drei Tagen in Kultur wurden die Kokulturen für 24 h mit (B,D) oder ohne (A,C) 0.1 μg/ml LPS inkubiert. Die Kulturen wurden mit einem Antikörper gegen geschnittene Caspase3 und anti-Kaninchen-Alexa568 zur Identifikation apoptotischer Zellen und zusätzlich mit dem Neuronenmarker MAP2 und anti-Maus Alexa488 angefärbt. Zur Quantifizierung wurden 50-100 MAP2-positive Zellen auf geschnittene Caspase-3 untersucht (E). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden.

F) Im selben experimentellen Aufbau wurden die Kokulturen für 30 min mit oder ohne 10 μM 1400W vorinkubiert, bevor sie für 24 h mit oder ohne 0.1 μg/ml LPS in fortwährender Anwesenheit von 1400W inkubiert wurden. Die Analyse und Quantifizierung erfolgte wie oben beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden.

5 Diskussion

5.1 Die oxidierbaren Reste beeinflussen die Stabilität und Funktionalität von DJ-1

Mutationen im PARK7-Gen tragen nur zu einem geringen Teil zu den familiären Parkinson-Erkrankungen bei (Abou-Sleiman et al., 2004). DJ-1 ist jedoch auch für die Parkinson-Erkrankung im Allgemeinen wichtig, da es an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist, von denen man annimmt, dass sie der Pathologie der PD zugrunde liegen (Abeliovich und Beal, 2006). Eine der wichtigsten Funktionen ist der Schutz der Zelle vor oxidativem Stress (Yang et al., 2005; Lavara-Culebras und Paricio, 2007; Lev et al., 2008a,b). Um den Mechanismus der oxidativen Aktivierung von DJ-1 zu erforschen und die beteiligten oxidierbaren Reste zu identifizieren, wurden alle oxidierbaren Reste von DJ-1 mutagenisiert. Es wurde gezeigt, dass Cystein-106 absolut notwendig für die Bindung an ASK-1 und die cytoprotektive Wirkung bei oxidativem Stress ist. Die peripheren Cysteine 46 und 53 dagegen modulieren die Aktivität von DJ-1. Des Weiteren wurde für die parkinsonassoziierte Mutante [M26I]DJ-1 eine verringerte Stabilität, eine nichtfunktionelle Bindung an ASK-1 und eine fehlende Cytoprotektivität nachgewiesen.

5.1.1 Cysteinreste

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass C106 essentiell für die Bindung von DJ-1 an ASK-1 ist und die Zytrotektivität vermittelt. Dies stimmt mit den meisten vorher publizierten Berichten überein, die C106 als funktionell wichtigsten Rest identifiziert haben (Canet-Aviles et al., 2004; Takahashi-Niki et al., 2004; Meulener et al., 2006; Hulleman et al., 2007; Blackinton et al., 2009). Nur in einer Publikation wurde C53

als Schlüsselrest für die redoxabhängige Chaperonaktivität und Zytoprotektivität von DJ-1 identifiziert (Shendelman et al., 2004), während Mo et al. (2008) C46 als den wichtigsten Cysteinrest für die DJ-1-vermittelte Suppression von MEKK1 sehen. In Anwesenheit von oxidativem Stress wird DJ-1 am Cystein-106 oxidiert (Mitsumoto und Nakagawa, 2001; Mitsumoto et al., 2001; Canet-Aviles et al., 2004; Kinumi et al., 2004; Zhou et al., 2006; Tsuboi et al., 2008). Die meisten Studien identifizierten die Sulfinsäure von C-106 als Hauptoxidationsprodukt (Canet-Aviles et al., 2004; Zhou et al., 2006; Tsuboi et al., 2008; Blackinton et al., 2009). Tsuboi et al. (2008) identifizierten neben der Sulfinsäure auch gleiche Anteile der weniger stark oxidierten Sulfensäure. Nur in einem Bericht wurde C-106 in Form der vollständig oxidierten Sulfonsäure gefunden (Kinumi et al., 2004). In der vorliegenden Studie wurde versucht, die oxidierte Form von DJ-1 durch das Einführen zusätzlicher Sauerstoffe an Position 106 zu modellieren. Die Substitution von Cystein-106 durch Aspartat oder Glutamat führt zu einer nichtoxidierbaren, inaktiven Mutante, die die gleichen Eigenschaften wie [C106A]DJ-1 hat. Interessanterweise ergibt die Substitution mit zwei Aspartat eine stabile, konstitutiv an ASK-1 bindende Mutante, die die zytoprotektiven Eigenschaften von DJ-1 behält. Die Ladungsverteilung und Polarität in [C106DD]DJ-1 scheint somit den Verhältnissen in [C106SO₂H]DJ-1 zu ähneln.

Es ist anzunehmen, dass die Oxidation von C106 zur Sulfensäure alleine nicht ausreicht, um eine Aktivierung von DJ-1 und eine Bindung an ASK1 zu erreichen. Vermutlich muss es zusätzlich noch zu einer Konformationsänderung kommen, die das inmitten der globulären DJ-1-Dimerstruktur verborgene Cystein-106 exponiert und die Interaktion mit Bindungspartnern erlaubt. Diese Konformationsänderung muss in den konstitutiv aktiven Mutanten gegeben sein. Die Aufklärung der Kristallstruktur von DJ-1 hat ergeben, dass die Seitenkette von Cystein-106 im Verbindungsstück zwischen dem β -Faltblatt 7 und der α -Helix E lokalisiert ist. Im Kristall liegt C106 in einer gespannten Konformation vor (Tao und Tong, 2003). Die Oxidation von C106 hat keinen Effekt auf die Konformation von DJ-1, da einige der publizierten Kristallstrukturen mit oxidiertem C106, andere jedoch mit reduziertem C106 erstellt worden sind und kein Unterschied festgestellt wurde (Wilson et al., 2003). Einen Hinweis auf die nötige Konformationsänderung geben eventuell die strukturellen Veränderungen, die die Substitution des Cystein durch zwei bis drei Aspartat bzw. Glutamat hervorrufen könnten. Der Einbau

der zusätzlichen Aminosäuren führt zu einer Verlängerung des Verbindungsstücks. Da dieses bereits in einer gespannten Konformation vorliegt, wird diese Aufweitung Konsequenzen auf die Sekundärstruktur haben. Da C106 in einer schmalen Tasche liegt und Wechselwirkungen mit dem gegenüberliegenden E18 eingeht (Blackinton et al., 2009), wird sich die Aufweitung des Verbindungsstücks zusätzlich auf die Tertiärstruktur auswirken. Wie diese Veränderungen aussehen, ist jedoch schwierig vorherzusagen. Wichtiger als die Veränderungen in der Kristallstruktur sind wahrscheinlich die strukturendynamischen Veränderungen. Die zusätzlichen negativen Ladungen des oxidierten Cysteins bzw. der beiden Aspartat- oder Glutamatreste erlauben die Ausbildung neuer ionischer Wechselwirkungen, fördern aber auch Abstoßungsreaktionen mit anderen negativ geladenen Seitenketten. Hierdurch wird die Beweglichkeit der Konformation eingeschränkt oder erweitert. Außerdem erlauben oder schränken die negativen Ladungen unter Umständen Rotationsbewegungen ein. Falls die Hypothese des Abbaus von oxidiertem DJ-1 stimmt (siehe Kap. 1.2.3.4), dann führt die Oxidation von Cystein-106 zu einer Beeinflussung des gesamten Moleküls, die den stabilisierenden Effekt des Helix-Knick-Helix-Motivs aufhebt. Untersuchungen ließen sich solche Effekte mit Hilfe von CD-Spektroskopie oder NMR, die die Dynamik des Moleküls in Lösung beschreiben. Auch die Mutanten [C106EE]DJ-1, [C106DDD]DJ-1 und [C106EEE]DJ-1 binden konstitutiv an ASK-1, sind jedoch wesentlich instabiler als [C106DD]DJ-1. Die Einführung von zusätzlichen und größeren Aminosäuren in die ohnehin schon gespannte Konformation des aktiven Zentrums (Honbou et al., 2003; Tao und Tong, 2003; Wilson et al., 2003) sorgt für eine empfindliche Störung der Stabilität. Dies zeigt sich auch darin, dass [C106DD]DJ-1 weiterhin sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden kann, während [C106EE]DJ-1 als Monomer vorliegt. Die Dimerisierung von DJ-1 wird als Voraussetzung für die Stabilität des Proteins angesehen (Ito et al., 2006). Die konstitutive Aktivität und Funktionalität dieser Cysteinmutanten wird durch ihre Stabilisierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 (Clements et al., 2006) deutlich. Während [wt]DJ-1 diesen nur in Anwesenheit von ROS stabilisiert, können sowohl [C106DD]DJ-1 als auch [C106EE]DJ-1 ihn in An- als auch in Abwesenheit von oxidativem Stress stabilisieren. Höhere Oxidationsstufen von Cystein-106 aktivieren die zytoprotektive Funktion von DJ-1 und sie werden am besten durch die künstliche Mutante [C106DD]DJ-1 imitiert. Cystein-106 ist nicht für die Stabilität von DJ-1 notwendig. Dagegen ist die Mutante

[C46A]DJ-1 deutlich instabiler als [wt]DJ-1. Dies wurde bereits in einer früheren Publikation berichtet (Canet-Aviles et al., 2004). Ito et al. (2006) zeigen, dass [C46A]DJ-1 nicht mehr dimerisieren kann, was in dieser Publikation allerdings keinen Einfluss auf die Proteinmenge zu haben scheint. [C53A]DJ-1 ist, wie bereits früher beschrieben, so stabil wie [wt]DJ-1 (Canet-Aviles et al., 2004; Ito et al., 2006). Sowohl C46 als auch C53 beeinflussen die Bindung von DJ-1 an ASK-1. Die Mutanten [C46A]DJ-1 und [C53A]DJ-1 binden beide in An- und Abwesenheit von H_2O_2 an ASK-1. Diese Bindung ist abhängig von einem intakten C106, da die Doppelmutante [C53A,C106A]DJ-1 und die Dreifachmutante [C46S,C53S,C106A]DJ-1 nicht an ASK-1 bindet. Die konstitutive Bindung von [C46A]DJ-1 und [C53A]DJ-1 kann, zumindest teilweise, durch eine verlangsamte Abdissoziation der Mutanten von ASK-1 erklärt werden. Zwei Hypothesen könnten eine Erklärung für dieses Verhalten liefern (Abbildung 5.1). Zum einen können die peripheren Cysteine als zusätzliche Redoxcenter angesehen werden (Abb. 5.1A). Diese fangen ROS auf dem Weg zu C106, welches im Inneren der Kristallstruktur liegt (Honbou et al., 2003; Tao und Tong, 2003; Wilson et al., 2003; Witt et al., 2008), ab, wodurch dieses langsamer oxidiert wird. Für diese Hypothese spricht, dass die Mutanten einen basalen ROS-Stress durch einen Mediumwechsel für eine konstitutive Bindung benötigen. Dagegen spricht allerdings die Beobachtung, dass in [wt]DJ-1 C106 vor den peripheren Cysteinen oxidiert wird (Kinumi et al., 2004). Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass die peripheren Cysteine wie das ‘auflösende Cystein‘ bei Trx1 wirken (Holmgren, 1995; Powis und Montfort, 2001). Dieses Cystein ist ein wichtiger Bestandteil des katalytischen Mechanismus von Trx1. Hierbei greift Cystein-32 (Nummerierung für humanes Trx1) die zu reduzierende Disulfidbindung nukleophil unter Ausbildung eines gemischten Disulfids an. Das Disulfid wird dann durch einen weiteren nukleophilen Angriff von Cystein-35 aufgelöst unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbindung. Dieser Mechanismus wurde auch für die Regulation von ASK-1 durch Trx1 vorgeschlagen (Nadeau et al., 2007). Cystein-46 oder Cystein-53 könnten intramolekular als auflösendes Cystein wirken (5.1B). Hierzu wäre aber eine starke Konformationsänderung notwendig, da die C-Helix zwischen C106 und den peripheren Cysteinen liegt (Witt et al., 2008). Es ist jedoch vorstellbar, dass DJ-1 entweder als Dimer an ASK-1 bindet und es zu einer intermolekularen Reduktion kommt oder mehrere DJ-1-Moleküle im ASK-1-Oligomer gebunden sind, die wiederum intermoleku-

lar reduzieren (Abb. 5.1B). Weitere Forschung ist notwendig, um zu klären, inwieweit diese Hypothesen die konstitutive Bindung von [C46A]DJ-1 und [C53A]DJ-1 erklären können. Eine Möglichkeit wäre, zu untersuchen, ob diese Mutanten den Transkriptionsfaktor Nrf2 in Abwesenheit von ROS stabilisieren. Falls sie leichter oxidiert werden, sollten sie ihn stabilisieren können. Falls sie jedoch nicht leichter oxidiert werden, sondern nur schlechter von ASK1 ablösen, sollte dies ihre Stabilisierungsfähigkeit für Nrf2 nicht beeinflussen.

5.1.2 M26I

Der pathologische Effekt der verschiedenen PK-assoziierten DJ-1-Mutanten ist in einigen Fällen, wie bei [M26I]DJ-1, nicht klar. Bei einigen Mutanten kommt es zu einer Destabilisierung des Proteins. Dies zeigt sich am deutlichsten bei [L166P]DJ-1 (Macedo et al., 2003; Miller et al., 2003; Moore et al., 2003; Görner et al., 2004; Olzmann et al., 2004). Weniger eindeutig sind die Berichte bei [M26I]DJ-1 (Abou-Sleiman et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass [M26I]DJ-1 im Vergleich zu [wt]DJ-1 instabil ist. Diese Instabilität hängt sowohl vom verwendeten Epitopmarker als auch davon ab, ob endogenes [wt]DJ-1 zur Ausbildung von Heterodimeren vorhanden ist. In Abwesenheit von heterodimerisierendem [wt]DJ-1 verringert sich die Stabilität signifikant. Dieses Modell spiegelt sehr gut den Zustand in einem homozygoten Mutationssträger wider, wie er von Abou-Sleiman et al. (2003) beschrieben wurde. Bisherige Berichte in der Literatur zeigen ein uneinheitliches Bild der [M26I]-Stabilität. Eine proteasomale Destabilisierung wurde bei stabil mit FLAG-[M26I]DJ-1 transfizierten Maus NIH3T3-Zellen (Takahashi-Niki et al., 2004), transient mit [M26I]DJ-1-V5-HIS transfizierten M17 Neuroblastomazellen und mit unmarkiertem [M26I]DJ-1 in Ratten-PC12-Zellen (Blackinton et al., 2005) gefunden. Im Gegensatz dazu wurde in transient mit [M26I]DJ-1-FLAG transfizierten CHO- und HEK293-Zellen (Baulac et al., 2004; Herrera et al., 2007) sowie in transient mit [M26I]DJ-1-MYC-HIS transfizierten SH-SY5Y-Zellen (Moore et al., 2003) kein Einfluss der Mutation auf die Stabilität des Proteins gefunden. Keine der bisher publizierten Studien hat jedoch den Effekt der Heterodimerisierung auf die Stabilität von [M26I]DJ-1 untersucht. Die meisten Studien stimmen darin überein, dass [M26I]DJ-1 weiterhin Dimere ausbilden kann (Moore

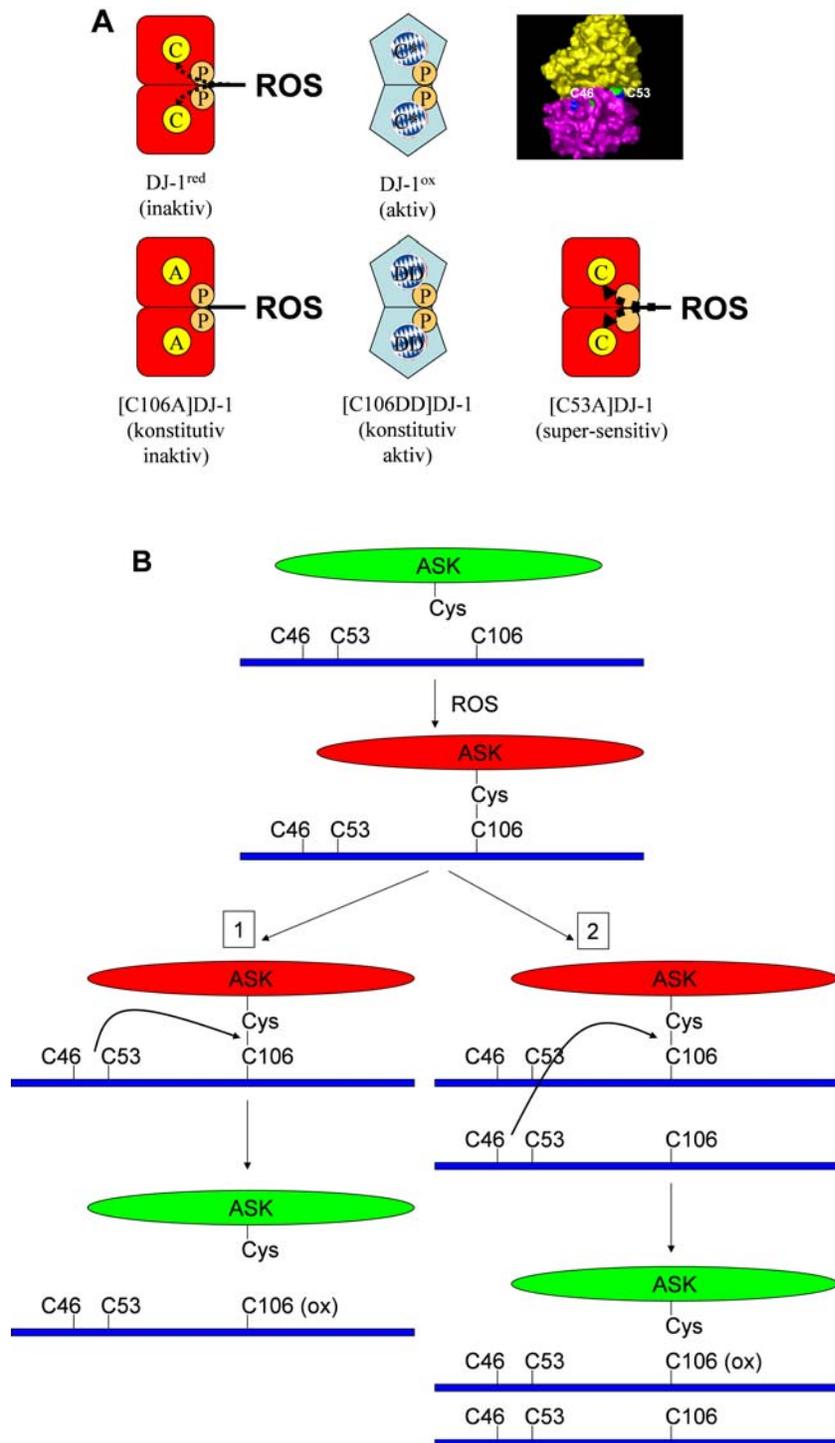


Abbildung 5.1 – Modelle für Redoxaktivität von C46 und C53

A Modell der zusätzlichen Redoxcenter. Eingezeichnet ist das zentrale Cystein-106 (C), seine aktivierte oxidierte Form (C*) bzw die Mutanten C106A (A) und C106DD (DD) und die peripheren Cysteine 46 und 53 (P).

B Modell der auflösenden Cysteine. ASK-1 liegt in einer aktivierbaren (grün) und einer aktivierten, aber von DJ-1 inhibierten Form (rot) vor. DJ-1 (blau) ist mit seinen Cysteinresten dargestellt.

et al., 2003; Baulac et al., 2004; Takahashi-Niki et al., 2004; Blackinton et al., 2005; Herrera et al., 2007). Für rekombinantes [M26I]DJ-1-HIS wurde dagegen eine Verringerung der Stabilität und eine Störung der Dimerisierung berichtet (Hulleman et al., 2007). M26 ist Teil einer α -Helix, die Teil des hydrophoben Kerns von DJ-1 ist. Bei der Mutation von Methionin zu Isoleucin handelt es sich um eine sehr konservative Substitution. Bei einigen Invertebraten und Bakterien liegt an dieser Position das strukturell sehr ähnliche Leucin (Abbildung 4.1). Durch Röntgenstrukturanalyse und NMR konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mutation zu lokalen Strukturstörungen und Packungsdefekten im hydrophoben Kern führt (Lakshminarasimhan et al., 2008; Malgieri und Eliezer, 2008), welche die Instabilität des Proteins zur Folge haben.

Die Mutante [M26I]DJ-1 bindet konstitutiv an ASK-1, jedoch an eine nichtfunktionelle Bindungsstelle am C-Terminus von ASK-1. Der Effekt der M26I-Mutation auf die Funktionalität von DJ-1 wurde bisher noch von keiner Studie untersucht, obwohl es schon mehrere Untersuchungen zur Zytoprotektivität von [M26I]DJ-1 gab. In dieser Arbeit wurde eine deutlich reduzierte Zytoprotektivität für [M26I]DJ-1 gegenüber oxidativem Stress in transient und stabil transfizierten *Dj-1*^{-/-}-MEF gezeigt. Zwei Studien haben den Einfluss der Mutation auf den zytoprotektiven Effekt von DJ-1 untersucht. In stabil mit [M26I]DJ-1-MYC-HIS transfizierten SH-SY5Y-Zellen wurde eine geringere Zytoprotektivität bei einer verringerten Stabilität des Proteins gefunden (Xu et al., 2005), während in primären dopaminergen Neuronen, die mit lenti-[M26I]DJ-1 transduziert wurden, eine geringere Zytoprotektivität bei ungefähr gleichen Proteinmengen vorlag (Liu et al., 2008a).

In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die pathologische Wirkung von [M26I]DJ-1 nicht nur durch seine geringere Stabilität und damit die geringere Proteinmenge verursacht wird, sondern dass [M26I]DJ-1 durch seine Bindung an eine nichtregulatorische Stelle von ASK1 die Aktivität dieser proapoptotischen Kinase nicht unterdrücken kann. Zusätzlich wird der Zelle durch die starke konstitutive Bindung von [M26I]DJ-1 weiteres Protein entzogen, welches für andere regulatorische Mechanismen nicht mehr zur Verfügung steht. Diese verschiedenen Punkte tragen gemeinsam zur Pathologie der M26I-Mutation bei.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie gezeigt, dass Cystein-106 der wichtigste oxi-

dierbare Rest und notwendig für die Bindung an ASK1 und die cytoprotektive Funktion von DJ-1 ist. Die peripheren Cysteine 46 und 53 sowie die PD-assoziierte Mutante M26I tragen zur Ausbildung stabiler Homodimere bei und modulieren die oxidationsabhängige Aktivierung von DJ-1. Die gestörte oxidationsabhängige Aktivierung könnte zur Pathogenese der M26I-Mutantenträger beitragen und einen generellen Einfluss auf die Parkinsonerkrankung haben.

5.2 Mechanismus der ASK-Regulation durch DJ-1

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass DJ-1 die Aktivität von ASK1 reprimiert. Dies ist eine Bestätigung zweier früherer Studien (Junn et al., 2005; Görner et al., 2007). Der molekulare Mechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt. Der Mechanismus des wichtigsten negativen Regulators von ASK1, Trx1, ist dagegen bekannt (Saitoh et al., 1998; Fujino et al., 2007; Nadeau et al., 2007). Aus der Beobachtung, dass DJ-1 und Trx1 nicht gleichzeitig an ASK1 binden können und der Entdeckung, dass DJ-1 wie Thioredoxin an den N-Terminus von ASK1 bindet, ergibt sich die Vermutung, dass DJ-1 die gleiche Bindungsstelle einnimmt wie Thioredoxin. Da außerdem beide Proteine redoxaktiv sind, könnte ihnen ein ähnlicher Regulationsmechanismus zugrunde liegen. Fujino et al. (2007) haben gezeigt, dass die Überexpression von Trx1 zu einer verminderten Phosphorylierung von ASK1 führt. Für DJ-1 konnte in der vorliegenden Studie kein Einfluss auf die ASK1-Phosphorylierung gefunden werden. Stattdessen ist die Phosphorylierung von ASK1 sogar eine Voraussetzung für die Bindung von DJ-1. Nadeau et al. (2007) berichteten, dass Trx1 ASK1 durch die Ausbildung von Disulfidbrücken reprimiert. Auch DJ-1 bildet Disulfidbrücken mit ASK1 aus. Die disulfidvermittelte Oligomerisierung von ASK1 scheint somit eine notwendige Voraussetzung für die Aktivität von ASK zu sein und die Ausbildung von Heterodisulfiden ein genereller Mechanismus zur Reprimierung der ASK-Aktivität.

Song und Lee (2003) haben ein Modell für die DAXX-vermittelte Aktivierung von ASK1 vorgeschlagen. Anhand dieses Modells soll hier eine Hypothese für den Mechanismus der DJ-1-vermittelten Regulation von ASK1 vorgeschlagen werden (Abbildung 5.2), welche auf eigenen Daten und Angaben aus der Literatur beruht:

ASK1 bindet im Grundzustand Trx1 (Saitoh et al., 1998). Durch oxidativen Stress

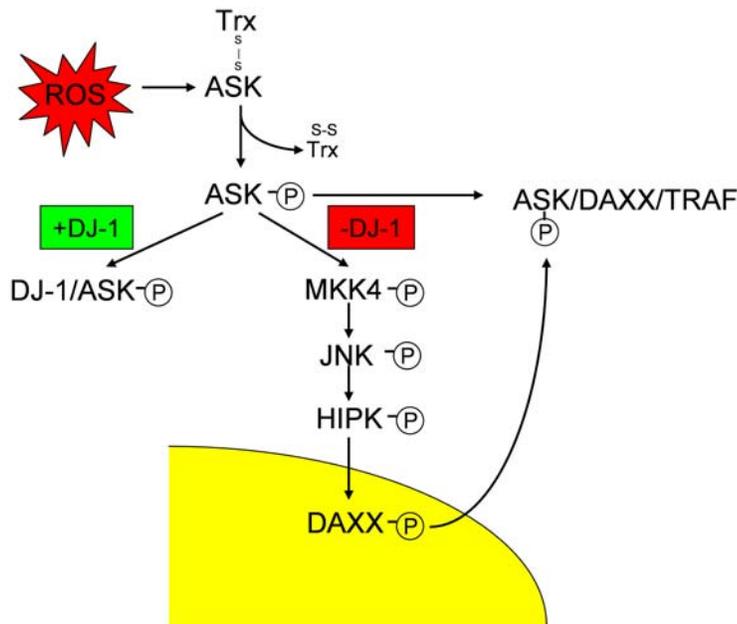


Abbildung 5.2 – Modell zur Regulation von ASK1 durch DJ-1

wird die Bindung zwischen ASK1 und Thioredoxin unter Ausbildung eines intramolekularen Thioredoxindisulfids gelöst, und dieses dissoziiert ab (Saitoh et al., 1998; Fujino et al., 2007; Nadeau et al., 2007). Daraufhin wird ASK1 an Thr838 autophosphoryliert (Tobiume et al., 2002). DJ-1 tritt dann an die Stelle von Thioredoxin und bildet gemischte Disulfide mit ASK1. Die weitere Aktivierung von ASK1 ist damit unterdrückt. In Abwesenheit von funktionellem DJ-1 kann ASK1 die MAP-Kinasekinase MKK4 phosphorylieren. Wie in dieser Studie und von Mo et al. (2008) gezeigt wurde, wird MKK4 in Anwesenheit von DJ-1 kaum phosphoryliert. Aktives MKK4 kann wiederum die MAP-Kinase JNK phosphorylieren und aktivieren. In der vorliegenden Arbeit konnte keine DJ-1-vermittelte Suppression der JNK-Phosphorylierung gezeigt werden. In anderen Studien (Mo et al., 2008) wurde dagegen eine verringerte JNK-Phosphorylierung gefunden. Dies könnte daran liegen, dass H_2O_2 ein sehr starker und unspezifischer Stressor ist, wodurch alternative, ASK1-unabhängige Signalwege aktiviert werden, die ebenfalls zu einer Phosphorylierung von JNK führen. Der nächste Schritt im Aktivierungsmechanismus von ASK1 ist die Translokation von HIPK1 aus dem Zellkern ins Zytosol, wo es von JNK phosphoryliert wird. Aktive HIPK1 geht zurück in den Kern, wo sie DAXX phosphoryliert (Ecsedy et al., 2003). Die Phosphorylie-

zung von DAXX an Serin668 ist eine notwendige Voraussetzung für die Translokation ins Cytosol, wo DAXX mit ASK1 interagiert und ein Signalosom bildet (Chang et al., 1998; Ko et al., 2001). In dieser Studie wie auch in einer vorherigen Studie (Junn et al., 2005) wurde gezeigt, dass DJ-1 die Translokation von DAXX ins Cytosol verhindert. Aufgrund des vorgeschlagenen Mechanismus verhindert DJ-1 nicht die initiale Aktivierung durch Phosphorylierung von Thr838, sondern die Ausbildung des Signalosoms, also die Rekrutierung von Kofaktoren wie DAXX, TRAF2 und TRAF6.

Auch wenn die aufgeführten Beobachtungen sehr stark für die vorgeschlagene Hypothese sprechen, können alternative Mechanismen nicht ausgeschlossen werden. Junn et al. (2005) haben einen alternativen Mechanismus vorgeschlagen. Da DJ-1 auch direkt mit DAXX interagiert, gehen sie davon aus, dass DJ-1 direkt die Translokation von DAXX ins Cytosol verhindert und somit die Ausbildung des Signalosoms verhindert. Dieses Modell kann jedoch nicht die Interaktion von DJ-1 mit ASK1 erklären. Außerdem haben meine eigenen Beobachtungen gezeigt, dass auch Mutanten, die erwiesenermaßen die ASK1-Aktivität nicht unterdrücken, wie [M26I]DJ-1 und [C106A]DJ-1, an DAXX binden (Daten nicht gezeigt). Es stellt sich deshalb die Frage, ob diese Interaktion eine Bedeutung für die Regulation von ASK1 hat. Weitere Experimente sind notwendig, um die Frage des korrekten Mechanismus zu klären. Eine Möglichkeit wäre der Einsatz von konstitutiv aktivem MKK4. Wenn die Regulation oberhalb von MKK4 geschieht, sollte der Effekt durch konstitutiv aktives MKK4 aufgehoben werden. Ist die Regulation aber unterhalb von MKK4, sollte DJ-1 auch weiterhin einen reprimierenden Effekt haben. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines milden Stressors wie ROS, die durch UV-Bestrahlung oder Glucoseentzug entstehen. Diese erlauben eventuell eine genauere Untersuchung der beteiligten Kinasen.

5.3 Regulation der Neuroinflammation durch DJ-1

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass DJ-1 eine Schlüsselrolle in der Regulation der astrozytären Entzündungsantwort spielt. Der Parkinson-assoziierte Verlust von DJ-1 führt demnach nicht nur zu einer Beeinträchtigung des antioxidativen und antiapoptotischen Schutzes von Neuronen, sondern entzieht den Astrozyten auch einen ihrer Hauptregulatoren der potentiell neurotoxischen Inflammationsreaktion. Es wurde

entdeckt, dass der Verlust von DJ-1 in Astrozyten zu einer übermäßigen Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die verstärkte Induktion von NOS2 führt. Zusätzlich werden COX-2 und IL-6 in *Dj-1^{-/-}*-Astrozyten stärker durch LPS induziert als in wt-Astrozyten. Diese Effekte entstehen durch eine Hyperstimulation des p38-Signalwegs. Die übermäßige Produktion von NO und Prostaglandinen durch NOS2 bzw COX-2 und IL-6 werden als wichtige inflammatorische Faktoren angesehen, die den Fortschritt der Parkinsonkrankheit verstärken (Hunot und Hirsch, 2003).

DJ-1 ist ubiquitär exprimiert. Im Gehirn findet es sich vor allem in Neuronen und Astrozyten (Bandopadhyay et al., 2004; Bader et al., 2005). Für primäre Astrozytenkulturen gibt es abweichende Berichte über die Expression von DJ-1 (Bandopadhyay et al., 2004; Yanagida et al., 2006; Nagashima et al., 2008). Eine starke Immunreaktivität für DJ-1 wurde in reaktiven Astrozyten von Patienten mit chronischen und akuten neurodegenerativen Erkrankungen und in einem transgenen α -Synuclein-Mausmodell (Bandopadhyay et al., 2004; Neumann et al., 2004; Rizzu et al., 2004; Mullett und Hinkle, 2008) sowie in gemischten Hippocampus-Kulturen gefunden (Nagashima et al., 2008). In der hier beschriebenen Studie wurde eine starke Expression von DJ-1 in primären Astrozyten aus ganzen Mäusegehirnen detektiert. Diese wurde durch die Inkubation mit LPS nicht weiter verstärkt. DJ-1 war somit immer in den Kontrollastrozyten aus wt-Mäusen vorhanden und der Verlust von DJ-1 führte zu einer Deregulation der inflammatorischen Antwort. Die primären Astrozytenkulturen enthielten weniger als 1 % Mikrogliakontaminationen und es gibt so gut wie keine Hinweise darauf, dass DJ-1 in Mikroglia exprimiert wird (Bader et al., 2005; Yanagida et al., 2006). Auch wenn zusätzliche Effekte von DJ-1 in Mikroglia nicht mit vollständiger Sicherheit ausgeschlossen werden können, so zeigt diese Studie doch die wichtige Rolle von DJ-1 in reaktiven Astrozyten.

5.3.1 DJ-1 unterdrückt die Produktion von Stickstoffmonoxid

Der Verlust von DJ-1 führt zu einer LPS-induzierten übermäßigen Produktion von NO in primären Astrozyten. Der allgemeine Tenor der Literatur ist, dass die Stimulation von wt-Astrozyten mit LPS alleine zu keiner oder nur zu einer sehr geringen Produktion von NO führt (Kitamura et al., 1998; Pawate et al., 2004). Dies ist kon-

sistent mit der vorliegenden Studie, in der die Kontrollastrozyten aus wt-Tieren im Vergleich zu *Dj-1^{-/-}*-Astrozyten nur sehr geringe Mengen NO produzieren. Dies unterstreicht, wie wichtig DJ-1 für die Regulation der NO-Produktion in Astrozyten ist. Wie in dieser Studie gezeigt und auch bereits früher in der Literatur berichtet wurde, ist die Typ II NO-Synthase (induzierbare NO-Synthase, iNOS) vor allem für die LPS-induzierte Produktion von NO verantwortlich (Silva et al., 1997; Guix et al., 2005; Brown, 2007). NOS2 wird vor allem auf transkriptioneller Ebene reguliert (Guix et al., 2005), wobei das Protein nur eine kurze Halbwertszeit hat (Kolodziejcki et al., 2004). Generell ist es so, dass die produzierte Menge NO direkt von der iNOS mRNA-Menge abhängt. *Dj-1^{-/-}*-Astrozyten exprimieren iNOS wesentlich stärker als wt-Astrozyten, wie sowohl auf mRNA wie auch auf Proteinebene gezeigt wurde. Mit qRT-PCR wurde gezeigt, dass die ko-APC eine 8-fach stärkere Induktion von iNOS haben als wt-APC (Waak et al., 2009). Dies korreliert gut mit der um den Faktor 10 stärkeren Produktion von NO. Es ist somit anzunehmen, dass DJ-1 NOS2 auf transkriptioneller Ebene reguliert. Da es aber auch einzelne Berichte über eine posttranskriptionale Regulation von NOS2 gibt (Prabhakar, 1998; Ratovitski et al., 1999), können weitere Regulationsmechanismen von DJ-1 auf translationaler oder posttranslationaler Ebene nicht ausgeschlossen werden. In Astrozyten werden auch die konstitutiv exprimierten Formen der NO-Synthase, eNOS und nNOS, exprimiert. eNOS kann ebenfalls in geringem Maße durch LPS induziert werden (Guix et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass NOS1 und NOS3 in den Astrozyten durch LPS nicht induziert wird. Da NOS1 und NOS3 aber vor allem durch Regulation der enzymatischen Aktivität und nur sekundär auf transkriptioneller Ebene reguliert werden (Guix et al., 2005), kann dies ihren Einfluss nicht vollständig ausschliessen. Durch die Anwendung des iNOS-spezifischen Inhibitors 1400W (Garvey et al., 1997) konnte jedoch gezeigt werden, dass nur iNOS für die LPS-induzierte Produktion von NO in den APC verantwortlich ist.

Neben LPS stimuliert auch α -Synuclein die Produktion von NO in primären Astrozytenkulturen. α -Synuclein wurde bereits früher als proinflammatorischer Stressor beschrieben (Klegeris et al., 2006; Gao et al., 2008; McGeer und McGeer, 2008; Su et al., 2008). Die produzierte Menge NO ist jedoch im Vergleich zur LPS-induzierten Stimulation deutlich geringer. Dies steht im Einklang mit Klegeris et al. (2006), die die Auswirkung von α -Synuclein auf die Expression von IL-6 und ICAM-1 unter-

sucht und eine geringere Expression dieser proinflammatorischen Marker im Vergleich zu LPS-stimulierten Astrozyten gefunden haben. Auch mit α -Synuclein als Stressor produzieren APC aus *Dj-1*^{-/-}-Mäusen etwa zehnmal mehr NO als die APC aus wt-Geschwistertieren. Die beteiligten Rezeptoren und aktivierten Signalwege bei der α -Synuclein-induzierten Immunreaktion sind bisher unbekannt. Aus der auffälligen Korrelation zwischen LPS- und α -Synuclein-behandelten APC in der DJ-1-Regulation ergibt sich die Vermutung, dass α -Synuclein wie LPS an TLR4 bindet und die Signalkaskade über die Aktivierung von p38 verläuft. Gleichzeitig kann TLR3 als Rezeptor für α -Synuclein ausgeschlossen werden, da die nachgeschalteten Signalwege dieses Rezeptors DJ-1-insensitiv sind. Der fehlende Einfluss von DJ-1 auf die TLR3-vermittelte Signaltransduktion ist aus der Tatsache erklärbar, dass dieser Signalweg vor allem über NF κ B-Translokation verläuft (Park et al., 2006; Kim et al., 2008). Wie in dieser Studie gezeigt wurde, beeinflusst DJ-1 den NF κ B-Signalweg nicht. In der Literatur wurde jedoch auch die p38-abhängige Expression von NOS2 durch TLR3-Agonisten in Schwann-Zellen (Lee et al., 2000) und Makrophagen (Steer et al., 2006; Pindado et al., 2007) beschrieben. Meine Ergebnisse sind konsistent mit Untersuchungen von *Ask*^{-/-}-Makrophagen. In diesem Modellsystem konnten Matsuzawa et al. (2005) zeigen, dass ASK-1 nicht durch die Inkubation der Zellen mit polyI:C aktiviert wird. Der ASK-p38-Signalweg scheint für TLR3-Agonisten auch in Astrozyten nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5.3.2 Differentielle Regulation proinflammatorischer Marker

Astrozyten produzieren verschiedene proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, wenn sie mit LPS inkubiert werden. Die wichtigsten proinflammatorischen Marker sind IL-6, IL-1 β , TNF α und NGF (Ridet et al., 1997). Alle untersuchten proinflammatorischen Marker werden in den primären Astrozytenkulturen nach Zugabe von LPS induziert. Dies steht im Einklang mit bereits publizierten Studien, die die LPS-induzierte Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α (Pawate et al., 2004; Carpentier et al., 2005; Krasowska-Zoladek et al., 2007) bzw des Wachstumsfaktors NGF (Galve-Roperh et al., 1997; Xiong et al., 1999; Pehar et al., 2004) beschreiben. DJ-1 reguliert die proinflammatorischen Marker unterschiedlich. Die Expression von

TNF α unterscheidet sich, wenn überhaupt, nur minimal in den *Dj-1* wt- und ko-Zellen. Die Regulation dieses Gens läuft in Astrozyten größtenteils über einen p38^{MAPK}-unabhängigen Signalweg, wie in dieser Studie gezeigt wurde, da keine Beeinflussung der Induktion durch den p38-Inhibitor SB203580 gefunden werden konnte. Dies bestätigt eine frühere Studie (Lee et al., 2000), die zwar einen Einfluss von SB203580 auf die TNF α -Expression in Mikroglia, nicht aber in Astrozyten gefunden hat. Die Signalwege, die in Astrozyten zur Induktion von TNF α führen, sind weitgehend unerforscht. Die fehlende Regulation von TNF α zeigt jedoch, dass der *knockout* von DJ-1 nicht zu einer generellen Dysregulation der Zytokinexpression führt, sondern spezifisch den ASK1-p38-Signalweg beeinflusst. DJ-1 hat keinen Einfluss auf die Expression von NGF. In den *Dj-1*^{-/-}-APC wird so viel NGF exprimiert wie in den wt-Kontrollzellen. Galve-Roperh et al. (1997) haben die Expression von NGF in Astrozyten untersucht. Sie vermuteten eine Beteiligung von MAP-Kinase-Signalwegen, da sich die Expression mit Apigenin unterdrücken ließ. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass Apigenin ein NF κ B-Inhibitor ist (Nicholas et al., 2007). Da die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs nicht von DJ-1 oder der LPS-Konzentration abhängt, erklärt dies den fehlenden Einfluss von DJ-1 auf die NGF-Expression und die fehlende Konzentrationsabhängigkeit. Hierdurch wird die Hypothese von Mullett und Hinkle (2008), dass eine verringerte Expression von neurotrophen Faktoren für die verringerte Neuroprotektivität von *Dj-1*^{-/-}-Astrozyten verantwortlich ist, zumindest für NGF und IL-6 nicht bestätigt.

Besonders auffällig ist die gegensätzliche Regulation von IL-6 und IL-1 β . Während die Expression von IL-6 bei geringen LPS-Konzentrationen nicht von DJ-1 abhängt, produzieren *Dj-1*^{-/-}-APC bei hohen LPS-Konzentrationen signifikant mehr IL-6. Die Expression von IL-1 β dagegen hängt bei niedrigen LPS-Konzentrationen von der Anwesenheit von DJ-1 ab, während für hohe Konzentrationen kein Unterschied in der Expression zwischen wt- und ko-APC feststellbar ist. Die Regulation von IL-6 lässt sich teilweise über die beteiligten Signalwege erklären. Die LPS-induzierte Expression von IL-6 wird sowohl über den MAP-Kinase-Signalweg als auch über den NF κ B-Signalweg vermittelt (Hirotani et al., 2005; Jang et al., 2008). Wie in dieser Studie gezeigt wurde, ist die Aktivität des DJ-1-regulierten p38-Signalwegs proportional zur eingesetzten LPS-Konzentration. Der NF κ B-Signalweg hat für alle eingesetzten LPS-Mengen die gleiche maximale Aktivität. Hieraus leitet sich die Hypothese ab, dass bei niedrigen LPS-

Konzentrationen die IL-6-Expression vor allem durch den DJ-1-insensitiven NF κ B-Signalweg reguliert wird, bei höheren LPS-Konzentrationen aber der DJ-1-regulierte p38-Signalweg dominiert. Durch dieses Modell ließe sich die Konzentrationsabhängigkeit der DJ-1-Regulation erklären. Das Modell steht im Einklang mit vorherigen Studien. Untersuchungen an Makrophagen aus *Ask1*^{-/-}-Mäusen und wt-Geschwistertieren haben für geringe LPS-Konzentrationen keinen Unterschied in der IL-6-Expression zwischen den Genotypen gezeigt, während für höhere LPS-Konzentrationen eine signifikant erniedrigte IL-6-Expression in den ASK1-ko-Zellen festgestellt wurde (Matsuzawa et al., 2005).

5.3.3 Mechanismus der DJ-1-Regulation

Durch die Inkubation von primären Astrozytenkulturen mit LPS werden hauptsächlich zwei Signalwege angeschaltet: der NF κ B-Signalweg und der MAP-Kinase-Signalweg (Kumar et al., 2003; Tsatsanis et al., 2006). Diese beiden Signalwege wurden auf eine Beeinflussung durch DJ-1 hin untersucht. Der NF κ B-Signalweg wird in den APC aktiviert, es findet sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen *Dj-1*^{-/-}- und wt-APC. Bei der Analyse der MAP-Kinasen zeigt sich eine starke Beeinflussung der p38-Aktivität durch DJ-1. Der Signalweg ist sowohl länger als auch stärker aktiviert. Die negative Regulation der MAP-Kinase-Signalwege durch DJ-1 wird in dieser Arbeit wie auch mehrfach in der Literatur beschrieben. Junn et al. (2005), Görner et al. (2007) wie auch die vorliegende Arbeit beschreiben die *Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1* (ASK1) als molekulares Ziel der ROS-abhängigen DJ-1-Regulation, während Mo et al. (2008) MEKK1 als Regulationspunkt von DJ-1 in UV-bestrahlten Zellen identifiziert haben. Zusätzlich gibt es Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Komponenten des MAP-Kinase-Signalwegs auf die Immunantwort immunkompetenter Zellen. Matsuzawa et al. (2005) untersuchten die angeborene Immunität in *ASK1*^{-/-}-Mäusen. In dieser Studie wurde eine selektive Beeinflussung der p38^{MAPK}-Aktivität, aber kein Einfluss auf JNK oder NF κ B gefunden. Matsuzawa et al. (2005) zeigen, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen nach LPS-Stimulation in Makrophagen ROS-abhängig ist. Dies korreliert gut mit der vorliegenden Arbeit, in der diese ROS-Abhängigkeit bestätigt wurde. Der Phänotyp der *DJ-1*^{-/-}-APC wird durch NAC vollständig unterdrückt. Dies ist eine

weitere Bestätigung, dass der MAP-Kinase-Signalweg das regulatorische Ziel von DJ-1 ist. Auch die Analyse proinflammatorischer Marker zeigt starke Korrelationen. Sowohl die NOS2-Expression als auch die IL-6- und IL-1 β -Produktion ist in den *Ask1*^{-/-}-Zellen reduziert. Diese Phänokopie lässt die Vermutung zu, dass die DJ-1-vermittelte Regulation der angeborenen Immunität über eine Regulation von ASK1 verläuft. In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von MKK3 auf die LPS-induzierte Aktivierung von p38 untersucht (Inoue et al., 2006). In dieser Studie wurde gezeigt, dass der *knockout* von MKK3 keinen Einfluss auf die LPS-induzierte p38-Phosphorylierung und IL-6 bzw IL-1 β -Expression hat. Aus der vorliegenden Arbeit und den Vorarbeiten aus der Literatur ergibt sich folgendes Modell für die DJ-1-regulierte LPS-Stimulation von Astrozyten (Abbildung 5.3):

DJ-1 supprimiert die Aktivität von ASK1. Das Fehlen von DJ-1 führt zu einer Hyperaktivität von ASK1. Dieses Signal wird dann über die Aktivierung von MKK6 und eventuell MKK3 an p38^{MAPK} weitergegeben, was die Hyperphosphorylierung von p38 verursacht. Weder die Aktivität von ASK1 noch die Phosphorylierung von MKK3 und MKK6 konnte wegen fehlender spezifischer Antikörper experimentell bestimmt werden. Weitere Experimente sind also nötig, um dieses Modell zu validieren.

5.3.4 Zytotoxische Wirkung

Diese Studie hat gezeigt, dass der Verlust von DJ-1 in Astrozyten zu einer übermäßigen Produktion von NO und Cytokinen führt. Dies hat wiederum das Absterben kortikaler Neuronen, die mit den Astrozyten kokultiviert werden, zur Folge. Diese Apoptose wird vermutlich durch die übermäßige Produktion von NO, Prostaglandinen und proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst. Besonders die proapoptotische Wirkung von NO wurde ausführlich untersucht (Heales et al., 2004; Guix et al., 2005; Brown, 2007; Calabrese et al., 2007; Gao et al., 2008). Die Studien gehen davon aus, dass NO mit Superoxidradikalen, die von der neuronalen NADPH-Oxidase bzw Cytochrom c-Oxidase gebildet werden, reagiert und das resultierende Peroxinitrit das eigentliche zytotoxische Agens ist, welches zelluläre Proteine nitrosyliert und damit inaktiviert (Heales et al., 2004; Brown, 2007; Calabrese et al., 2007). *Dj-1*^{-/-}-Neuronen reagieren besonders empfindlich auf Astroglie. Dies ist über den zytotoxischen Mechanismus von NO erklärbar. Die verstärkte Produktion von NO führt zu einem Anstieg des oxidativen

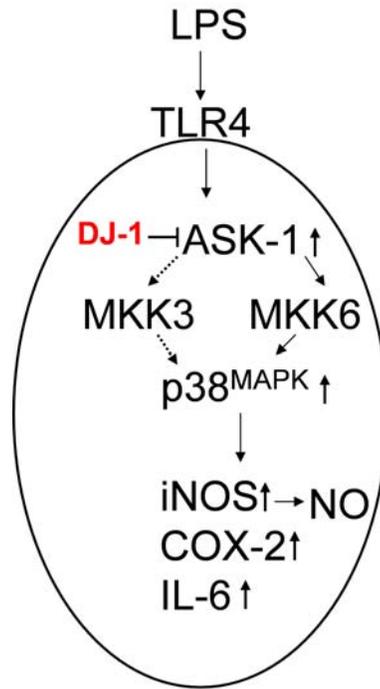


Abbildung 5.3 – Modell für den DJ-1-Regulationsmechanismus

Stress in Form von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) und ROS in Neuronen. Da der Verlust von DJ-1 Zellen wesentlich empfindlicher gegenüber oxidativem Stress macht (Martinat et al., 2004; Taira et al., 2004; Yang et al., 2005; Görner et al., 2007; Lavara-Culebras und Paricio, 2007; Mo et al., 2008), kommt es zu einem verstärkten Zelltod im Vergleich zu wt-Neuronen. Weil in Patienten mit DJ-1-Mutationen sowohl Astrozyten als auch Neuronen betroffen sind, wird auch in diesen die astrozytenvermittelte Neurodegeneration noch weiter verstärkt. In einer aktuellen Studie wurde die Frage untersucht, inwieweit DJ-1 in Astrozyten kokultivierte Neurone gegen oxidativen Stress schützt (Mullett und Hinkle, 2008). Die Autoren zeigen, dass der *knockdown* von DJ-1 in Astrozyten kokultivierte Neurone empfindlicher gegen das ROS-produzierende Toxin Rotenon macht. Sie postulieren, dass der Schutz über lösliche Faktoren erfolgt, ohne diese näher zu charakterisieren. Es ist somit anzunehmen, dass nicht nur die verstärkte Produktion inflammatorischer Mediatoren, sondern auch die verringerte Produktion neuroprotektiver Substanzen zum Absterben der kokultivierten Neurone beiträgt. Die vorliegende Studie zeigt, dass die übermäßige Produktion von NO hauptsächlich für das Absterben der Neurone verantwortlich ist. Es ist jedoch zu vermuten, dass auch Zyto-

kine und Prostaglandine einen gewissen Einfluss haben. Die Untersuchungen mit dem iNOS-Inhibitor 1400W wurden mit einer Inkubationszeit von 24 h durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wird NOS2 maximal exprimiert, während die Zytokine und COX-2 ihre maximale Expression erst nach 48 h erreichen (Daten nicht gezeigt). Es ist deshalb anzunehmen, dass bei längeren Inkubationszeiten der Einfluss von Prostaglandinen und Zytokinen stärker wird.

5.3.5 Einfluss von DJ-1 auf die Immunantwort von *C.elegans*

Um den Einfluss von DJ-1 auf die Immunantwort in einem einfachen Tiermodell zu untersuchen, wurden *djr1.1/djr1.2*-Doppelknockoutmutanten in *C. elegans* generiert. Der Nematode *C. elegans* zeigt eine Immunantwort, wenn er mit humanpathogenen Bakterien gefüttert wird. Diese Immunantwort wird über TLR-Rezeptoren und eine Signalkaskade unter Beteiligung der ASK- und p38-Homologe vermittelt (Kim et al., 2002; Aballay et al., 2003). Die DJ-1-ko-Würmer zeigen eine stärkere p38-Phosphorylierung als die wt-Kontrollen. Der angeschaltete ASK-p38-Signalweg hat in *C. elegans* eine antiapoptotische Wirkung. Eine Hyperaktivierung dieses Signalwegs sollte also zu einer verstärkten Resistenz gegen humanpathogene Bakterien führen. *Knockout*-Mutanten, die den Signalweg unterbrechen, wie SEK- und NSY-Mutanten, sorgen für ein verstärktes Sterben der Würmer in Anwesenheit dieser Bakterien (Kim et al., 2002). In der vorliegenden Studie konnte keine verstärkte Resistenz gegen *P. aeruginosa* gefunden werden, während die SEK- und NSY-Mutanten wesentlich schneller starben. Es ist anzunehmen, dass die maximale Lebensdauer der Würmer in diesem Experiment nicht durch die Bakterien, sondern durch andere Faktoren bestimmt wird, die durch die Hyperstimulation des ASK-p38-Signalwegs nicht beeinflusst wird. Zusammenfassend ergibt dieses Experiment, dass DJ-1 ein evolutionär konservierter Regulator des p38-Signalwegs und der angeborenen Immunität ist.

Diese Studie hat DJ-1 als evolutionär konservierten Regulator der angeborenen Immunität identifiziert. Durch die Hyperstimulation des p38-Signalwegs kommt es zu einer verstärkten Expression von iNOS, COX-2 und proinflammatorischen Cytokinen. Dies führt zu neurodegenerativen Prozessen, die wahrscheinlich durch die übermäßige Pro-

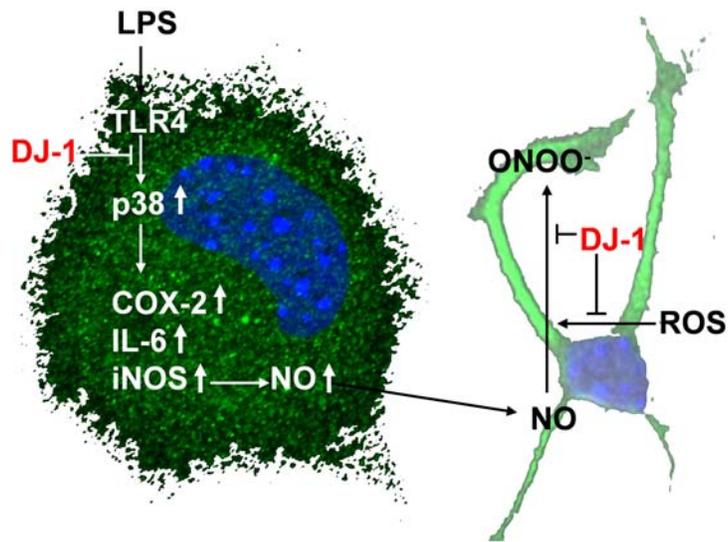


Abbildung 5.4 – DJ-1 reguliert neuroinflammatorische Prozesse in Astrozyten

duktion von NO, Prostaglandinen und Cytokinen ausgelöst werden (Abbildung 5.4). Diese neuroinflammatorischen Prozesse tragen zur allgemeinen Pathologie der Parkinsonerkrankung bei.

6 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des PK-assoziierten Proteins DJ-1 untersucht. Auch wenn in dieser Arbeit bereits viele Fragen beantwortet werden konnten, so gibt es dennoch Aspekte, die im Rahmen dieser Studie nicht vollständig aufgeklärt werden konnten.

Es wurde die Rolle der oxidierbaren Reste für die Stabilität und Funktion von DJ-1 untersucht. Cystein-106 wurde als notwendige Aminosäure für die Aktivierung und Funktion von DJ-1 identifiziert. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die peripheren Cysteine an Position 46 und 53 die Aktivität von DJ-1 modulieren. Wie diese Modulation funktioniert, ist noch nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit wurden zwei Modelle vorgeschlagen, nach welchem Mechanismus die Modulation ablaufen könnte (Abbildung 5.1). Um entscheiden zu können, welches Modell am ehesten der Wirklichkeit entspricht, sind weitere Informationen nötig. So ist es wichtig zu erfahren, in welcher Oxidationsstufe die drei Cysteine in Anwesenheit von sehr geringen Mengen von ROS vorliegen. Wenn die peripheren Cysteine tatsächlich Cystein-106 gegen ROS abschirmen, dann sollten sie oxidiert sein, während Cystein-106 als Thiol vorliegt. Diese Untersuchung ließe sich mit Hilfe von Massenspektrometrie durchführen. Um das zweite Modell zu überprüfen, wäre es wichtig, die Struktur des ASK1-DJ-1-Komplexes zu kennen. Dieses Modell geht von starken strukturellen Veränderungen im DJ-1-Molekül bei der Bindung an ASK1 aus. Falls diese in der Kristallstruktur sichtbar sind, wäre dies ein Hinweis darauf, dass dieses Modell stimmen kann.

Nicht nur die Interaktion von ASK1 und DJ-1 in Bezug auf die peripheren Cysteine, sondern auch der generelle Mechanismus der ASK1-Reprimierung durch DJ-1 wirft noch einige Fragen auf. Die in dieser Arbeit vorgeschlagene Hypothese ist zwar nach den bisher bekannten Informationen plausibel, benötigt aber noch weitere Überprüfung, um als Modell bestätigt zu werden. Die nichtreduzierende SDS-PAGE hat zwar

einen starken Hinweis darauf geliefert, dass DJ-1 in das ASK1-Signalosom eingebaut wird. Um dies wirklich zu überprüfen, müssen die ASK1-Komplexe durch Gelfiltration aufgereinigt werden und auf die Anwesenheit von DJ-1 untersucht werden. Auch die Konsequenzen, die der Einbau von DJ-1 in den ASK1-Komplex hat, sind noch nicht bestätigt. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass DJ-1 die Phosphorylierung von ASK1 nicht beeinflusst. Es ist deshalb anzunehmen, dass es die Komposition des ASK1-Signalosoms verändert. Die Untersuchung der Komplexe ist schwierig, da es für die wichtigen Effektorproteine wie DAXX und TRAF6 keine Antikörper gibt, die das endogene Protein erkennen. Eventuell würden auch hier massenspektrometrische Untersuchungen helfen. Eine weitere wichtige Frage im Zusammenhang mit ASK1-Regulation durch DJ-1 ist der Einfluss der DAXX-DJ-1-Interaktion, die von Junn et al. (2005) als regulatorischer Angriffspunkt beschrieben wurde. Wenn das von mir vorgeschlagene Modell stimmt, dann sollte der DJ-1-Effekt durch die Expression von konstitutiv aktiven nachgeschalteten Kinasen wie MKK4 oder JNK aufgehoben werden können. Falls der regulatorische Punkt jedoch DAXX ist, dann sollte diese Überexpression keinen Effekt auf die DJ-1-vermittelte Repression von ASK1 haben. Unabhängig von der ASK1-Regulation könnte die DAXX-DJ-1-Interaktion aber auch andere regulatorische Effekte haben. Vorläufige Experimente zeigen, dass DJ-1 die Sumoylierung von DAXX beeinflusst. Das Ziel zukünftiger Experimente ist es, diesen Einfluss näher zu untersuchen und die funktionellen Konsequenzen für die Zelle zu bestimmen. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Identifizierung der SUMO-Ligase, die DAXX sumoyliert. Auch wenn bereits viele Aspekte über den zytoprotektiven Mechanismus von DJ-1 bekannt sind, sind doch noch viele Experimente notwendig, um ein vollständiges Bild zu erhalten.

In dieser Studie wurde DJ-1 als evolutionär konservierter Regulator der angeborenen Immunität identifiziert. Dies geschieht durch die Repression des TLR4-ASK1-p38-Signalwegs. LPS wird in der Literatur als TLR4-Agonist beschrieben. Es gibt jedoch einzelne Berichte, dass auch TLR2 daran beteiligt sein könnte. Für α -Synuclein fehlt die Bestätigung, dass die Aktivierung der Astrozyten über TLR4 erfolgt. Die Spezifität von LPS und α -Synuclein für TLR4 kann durch den Einsatz des TLR4-spezifischen Inhibitors Polymyxin B bzw die Inkubation von *Tlr4*^{-/-}-Astrozyten mit diesen Stressoren getestet werden. Der genaue Angriffspunkt der DJ-1-Regulation konnte jedoch

nicht identifiziert werden. Aus den bisherigen Untersuchungen der MAPK-Regulation durch DJ-1 in dieser Arbeit ist zu schließen, dass die Regulation über ASK1 läuft. Die Bestätigung ist experimentell sehr schwierig, da für Immunkomplexkinaseassays große Mengen Protein benötigt werden, die aus Primärkulturen nur schwierig zu gewinnen sind. Diese Limitation kann eventuell durch die Immortalisierung von primären Astrozyten umgangen werden, sofern diese Zellen die gleichen Eigenschaften wie die primären Zellen haben. Hierdurch würden die entsprechenden Mengen an Zellen zur Verfügung stehen, um die Aktivität von ASK1 nach Stimulation mit LPS zu untersuchen. Eine weitere Frage, die diese Studie aufgeworfen hat, ist die nach dem Mechanismus, der zum Absterben kokultivierter Neurone führt. Der Verlust von DJ-1 sorgt für die verstärkte Produktion mehrerer neurotoxischer Substanzen: NO, Zytokine und Prostaglandine. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die verschiedenen Substanzen haben, sind mehrere experimentelle Aufbauten denkbar. Durch den Einsatz des iNOS-Inhibitors 1400W wurde bereits gezeigt, dass NO ein wichtiger, wenn nicht gar der wichtigste Mediator der LPS-vermittelten Neurotoxizität ist. Um den Anteil der Zytokine an der Zytotoxizität herauszufinden, können Neurone mit konditioniertem Astrozytenmedium inkubiert werden. Hierzu werden Astrozyten mit LPS stimuliert, worauf diese NO, Zytokine und Prostaglandine produzieren. Da von diesen Stoffen nur Zytokine länger stabil sind, sollten nur Zytokine einen Effekt auf Neurone haben, wenn diese mit dem konditionierten Medium inkubiert werden. Durch dieses Experiment lässt sich der Anteil der zweiten Komponente untersuchen.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Parkinson-assoziierten Proteins DJ-1 anhand seiner Reprimierung des ASK1-JNK/p38MAPK-Signalwegs untersucht. Es wurde von uns bereits früher gezeigt, dass DJ-1 ASK1 bindet und seine Aktivität reprimiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, welche oxidierbaren Aminosäurereste von DJ-1 für seine Aktivierung und die Bindung an ASK1 notwendig sind. Es wurde gezeigt, dass Cystein-106 der wichtigste oxidierbare Rest und notwendig für die Bindung an ASK1 und die cytoprotektive Funktion von DJ-1 ist. Die Oxidation von Cys-106 kann durch die konstitutiv aktiven Mutanten [C106DD]DJ-1 und [C106EE]DJ-1 simuliert werden. Die peripheren Cysteine 46 und 53 sowie die PD-assoziierte Mutante M26I tragen zur Ausbildung stabiler Homodimere bei. Cys-46 und Cys-53 modulieren die oxidationsabhängige Aktivierung von DJ-1. Die PK-assoziierte Mutante [M26I]DJ-1 hat eine verringerte Proteinestabilität, eine gestörte oxidationsabhängige Aktivierung und bindet nicht-funktionell an ASK1. Dies könnte zur Pathogenese der M26I-Mutantenträger beitragen und einen generellen Einfluss auf die Parkinsonerkrankung haben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Mechanismus der ASK1-Reprimierung durch DJ-1 erforscht. DJ-1 unterdrückt oxidationsabhängig die Aktivität von ASK1. Die geschieht durch einen disulfidbrückenabhängigen Einbau in das ASK1-Signalosom. Hierbei wird nicht die Phosphorylierung von ASK1 beeinflusst, sondern die Rekrutierung von Effektorproteinen. Dieser Vorgang verhindert dann die vollständige Aktivierung des ASK1-Signalosoms.

Im dritten Teil der Arbeit wurde DJ-1 als evolutionär konservierter Regulator der angeborenen Immunität identifiziert. Der Verlust von DJ-1 in Astrozyten führt zu einer Hyperstimulation des p38^{MAPK}-Signalwegs. Die anderen MAP-Kinase-Signalwege werden kaum und der NF κ B-Signalweg wird überhaupt nicht beeinflusst. Die Hyperaktivi-

tät des p38^{MAPK}-Signalwegs resultiert in einer ca zehnfach stärkeren Produktion von Stickstoffmonoxid durch eine verstärkte Expression der induzierbaren NO-Synthase. Weitere Effekte des DJ-1-Verlusts sind die verstärkte Induktion von COX-2 und den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und IL-6. Die Deregulation der astrozytären Entzündungsantwort führt zu einem verstärkten Absterben kokultivierter kortikaler Neurone. Die Neuroinflammation ist somit ein wichtiger Faktor in den neurodegenerativen Prozessen, die durch den Verlust von DJ-1 ausgelöst werden. Die Reprimierung des ASK1-p38-Signalwegs wurde somit als wichtige Komponente des zytoprotektiven Mechanismus von DJ-1 bei neuroinflammatorischen Prozessen identifiziert.

Literaturverzeichnis

- Aballay, A., Drenkard, E., Hilbun, L. R. und Ausubel, F. M. (2003). Caenorhabditis elegans innate immune response triggered by Salmonella enterica requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Curr Biol* 13(1):47–52.
- Abdallah, J., Caldas, T., Kthiri, F., Kern, R. und Richarme, G. (2007). YhbO protects cells against multiple stresses. *J Bacteriol* 189(24):9140–4.
- Abeliovich, A. und Beal, M. F. (2006). Parkinsonism genes: culprits and clues. *J Neurochem* 99(4):1062–72.
- Abou-Sleiman, P. M., Healy, D. G., Quinn, N., Lees, A. J. und Wood, N. W. (2003). The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54(3):283–6.
- Abou-Sleiman, P. M., Healy, D. G. und Wood, N. W. (2004). Causes of Parkinson's disease: genetics of DJ-1. *Cell Tissue Res* 318(1):185–8.
- Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. und Wood, N. W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7(3):207–19.
- Akira, S., Takeda, K. und Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2(8):675–80.
- Aleyasin, H., Rousseaux, M. W., Phillips, M., Kim, R. H., Bland, R. J., Callaghan, S., Slack, R. S., Durrin, M. J., Mak, T. W. und Park, D. S. (2007). The Parkinson's disease gene DJ-1 is also a key regulator of stroke-induced damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47):18748–53.
- Anand, V. S., Reichling, L. J., Lipinski, K., Stochaj, W., Duan, W., Kelleher, K., Pungaliya, P., Brown, E. L., Reinhart, P. H., Somberg, R., Hirst, W. D., Riddle, S. M. und Steven, P. B. (2009). Investigation of leucine-rich repeat kinase 2 : enzymological properties and novel assays. *Febs J* 276(2):466–78.
- Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. P. und Chilcote, T. J. (2006). Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of alpha-Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease. *J Biol. Chem.* 281(40):29739–29752.
- Anderson, P. C. und Daggett, V. (2008). Molecular Basis for the Structural Instability of Human DJ-1 Induced by the L166P Mutation Associated with Parkinsons Disease. *Biochemistry* 47(36):9380–9393.
- Annesi, G., Savettieri, G., Pugliese, P., D'Amelio, M., Tarantino, P., Ragonese, P., Bella, V. L., Piccoli, T., Civitelli, D., Annesi, F., Fierro, B., Piccoli, F., Arabia,

- G., Caracciolo, M., Candiano, I. C. C. und Quattrone, A. (2005). DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex. *Ann Neurol* 58(5):803–7.
- Bader, V., Zhu, X. R., Lubbert, H. und Stichel, C. C. (2005). Expression of DJ-1 in the adult mouse CNS. *Brain Res* 1041(1):102–11.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988). Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappaB transcription factor. *Cell* 53(2):211–217.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. und Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120(4):483–495.
- Bandopadhyay, R., Kingsbury, A. E., Cookson, M. R., Reid, A. R., Evans, I. M., Hope, A. D., Pittman, A. M., Lashley, T., Canet-Aviles, R., Miller, D. W., McLendon, C., Strand, C., Leonard, A. J., Abou-Sleiman, P. M., Healy, D. G., Ariga, H., Wood, N. W., de Silva, R., Revesz, T., Hardy, J. A. und Lees, A. J. (2004). The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson’s disease. *Brain* 127(Pt 2):420–30.
- Bandy, B. und Davison, A. J. (1990). Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* 8(6):523–39.
- Bandyopadhyay, S. und Cookson, M. R. (2004). Evolutionary and functional relationships within the DJ1 superfamily. *BMC Evol Biol* 4:6.
- Batelli, S., Albani, D., Rametta, R., Polito, L., Prato, F., Pesaresi, M., Negro, A. und Forloni, G. (2008). DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson’s disease and involvement of HSP70. *PLoS ONE* 3(4):e1884.
- Baulac, S., LaVoie, M. J., Strahle, J., Schlossmacher, M. G. und Xia, W. (2004). Dimerization of Parkinson’s disease-causing DJ-1 and formation of high molecular weight complexes in human brain. *Mol Cell Neurosci* 27(3):236–46.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V. und Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson’s disease. *Nat Neurosci* 3(12):1301–6.
- Blackinton, J., Ahmad, R., Miller, D. W., van der Brug, M. P., Canet-Aviles, R. M., Hague, S. M., Kaleem, M. und Cookson, M. R. (2005). Effects of DJ-1 mutations and polymorphisms on protein stability and subcellular localization. *Brain Res Mol Brain Res* 134(1):76–83.
- Blackinton, J., Lakshminarasimhan, M., Thomas, K. J., Ahmad, R., Greggio, E., Raza, A. S., Cookson, M. R. und Wilson, M. A. (2009). Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1. *J. Biol. Chem.* im Druck:M806599200.
- Bodles, A. M. und Irvine, G. B. (2004). Alpha-synuclein aggregation. *Protein Pept Lett* 11(3):271–9.

- Bogaerts, V., Nuytemans, K., Reumers, J., Pals, P., Engelborghs, S., Pickut, B., Corsmit, E., Peeters, K., Schymkowitz, J., Deyn, P. P. D., Cras, P., Rousseau, F., Theuns, J. und Broeckhoven, C. V. (2008). Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease. *Hum Mutat* 29(6):832–40.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J. W., Vanacore, N., van Swieten, J. C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C. M., Oostra, B. A. und Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299(5604):256–9.
- Braak, H., Tredici, K. D., Rub, U., de Vos, R. A., Steur, E. N. J. und Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24(2):197–211.
- Bronstein, D. M., Perez-Otano, I., Sun, V., Sawin, S. B. M., Chan, J., Wu, G. C., Hudson, P. M., Kong, L. Y., Hong, J. S. und McMillian, M. K. (1995). Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res* 704(1):112–6.
- Brown, G. C. (2007). Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5):1119–21.
- van der Brug, M. P., Blackinton, J., Chandran, J., Hao, L.-Y., Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Martindale, J., Xie, C., Ahmad, R., Thomas, K. J., Beilina, A., Gibbs, J. R., Ding, J., Myers, A. J., Zhan, M., Cai, H., Bonini, N. M., Gorospe, M. und Cookson, M. R. (2008). RNA binding activity of the recessive parkinsonism protein DJ-1 supports involvement in multiple cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29):10244–10249.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A. und Stella, A. M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8(10):766–75.
- Canet-Aviles, R. M., Wilson, M. A., Miller, D. W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M. J., Ringe, D., Petsko, G. A. und Cookson, M. R. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfenic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(24):9103–8.
- Carpentier, P. A., Begolka, W. S., Olson, J. K., Elhofy, A., Karpus, W. J. und Miller, S. D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* 49(3):360–74.
- Chandran, J. S., Lin, X., Zapata, A., Hoke, A., Shimoji, M., Moore, S. O., Galloway, M. P., Laird, F. M., Wong, P. C., Price, D. L., Bailey, K. R., Crawley, J. N., Shippenberg, T. und Cai, H. (2008). Progressive behavioral deficits in DJ-1-deficient mice are associated with normal nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 29(3):505–14.
- Chang, H. Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H. und Baltimore, D. (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281(5384):1860–3.

- Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K. und Tsuruo, T. (1999). ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* 18(1):173–80.
- Choi, J., Sullards, M. C., Olzmann, J. A., Rees, H. D., Weintraub, S. T., Bostwick, D. E., Gearing, M., Levey, A. I., Chin, L. S. und Li, L. (2006). Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem* 281(16):10816–24.
- Chung, K. K., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (2003). New insights into Parkinson's disease. *J Neurol* 250 Suppl 3:III15–24.
- Chung, K. K., Zhang, Y., Lim, K. L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C. A., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 7(10):1144–50.
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., E. J. Crane, r., Charrier, V. und Parsonage, D. (1999). Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* 38(47):15407–16.
- Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Yoo, S. J., Hay, B. A. und Guo, M. (2006). Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441(7097):1162–6.
- Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W. und Ting, J. P. (2006). DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41):15091–6.
- von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J. M., Lim, K. L., Sasaki, M., Hess, E. J., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (2004). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29):10744–10749.
- Consilvio, C., Vincent, A. M. und Feldman, E. L. (2004). Neuroinflammation, COX-2, and ALS—a dual role? *Exp Neurol* 187(1):1–10.
- Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M. und P. T. Lansbury, J. (2001). Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294(5545):1346–9.
- Correale, J. und Villa, A. (2004). The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol* 251(11):1304–16.
- Croisier, E. und Graeber, M. B. (2006). Glial degeneration and reactive gliosis in alpha-synucleinopathies: the emerging concept of primary gliodegeneration. *Acta Neuropathol* 112(5):517–30.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R. und Lee, J. C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letters* 364(2):229–233.

- Dauer, W. und Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39(6):889–909.
- Dawson, T. M. und Dawson, V. L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302:819 – 822.
- Diamond, P., McGinty, A., Sugrue, D., Brady, H. und Godson, C. (1999). Regulation of leukocyte trafficking by lipoxins. *Clin Chem Lab Med* 37:293–297.
- Drew, P. D., Storer, P. D., Xu, J. H. und Chavis, J. A. (2005). Hormone regulation of microglial activation: relevance to multiple sclerosis. *Brain Res Rev* 48:322–327.
- Duan, X., Kelsen, S. G. und Merali, S. (2008). Proteomic Analysis of Oxidative Stress-Responsive Proteins in Human Pneumocytes: Insight into the Regulation of DJ-1 Expression. *J Proteome Res* 7(11):4955–4961.
- Duronio, V. (2008). The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 415(3):333–344.
- Ecsedy, J. A., Michaelson, J. S. und Leder, P. (2003). Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 23(3):950–60.
- Eddleston, M. und Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes—Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54(1):–36.
- Ehringer, H. und 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* 38:1236–9.
- Elbaz, A., Bower, J. H., Maraganore, D. M., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Ahlskog, J. E., Schaid, D. J. und Rocca, W. A. (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol* 55(1):25–31.
- Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmstrom, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H. H., Gasser, T., Kruger, R., Winklhofer, K. F., Vogel, F., Reichert, A. S., Auburger, G., Kahle, P. J., Schmid, B. und Haass, C. (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27(45):12413–8.
- Fan, J., Ren, H., Fei, E., Jia, N., Ying, Z., Jiang, P., Wu, M. und Wang, G. (2008). Sumoylation is critical for DJ-1 to repress p53 transcriptional activity. *FEBS Lett* 582(7):1151–6.
- Farina, C., Krumbholz, M., Giese, T., Hartmann, G., Aloisi, F. und Mehl, E. (2005). Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol* 159(1-2):12–19.
- Farooqui, A. A., Horrocks, L. A. und Farooqui, T. (2007). Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* 101(3):577–99.

- Ford, A. L., Goodsall, A. L., Hickey, W. F. und Sedgwick, J. D. (1995). Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein- reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 154(9):4309–4321.
- Forno, L. S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(3):259–72.
- Frank-Cannon, T. C., Tran, T., Ruhn, K. A., Martinez, T. N., Hong, J., Marvin, M., Hartley, M., Trevino, I., O'Brien, D. E., Casey, B., Goldberg, M. S. und Tansey, M. G. (2008). Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *J Neurosci* 28(43):10825–10834.
- Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K. und Ichijo, H. (2007). Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol* 27(23):8152–63.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K. und Iwatsubo, T. (2002). alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4(2):160–4.
- Fukui, H. und Moraes, C. T. (2008). The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci* 31(5):251–6.
- Furukawa, Y., Vigouroux, S., Wong, H., Guttman, M., Rajput, A. H., Ang, L., Briand, M., Kish, S. J. und Briand, Y. (2002). Brain proteasomal function in sporadic Parkinson's disease and related disorders. *Ann Neurol* 51(6):779–82.
- Galter, D. (2008). Parkinson's Disease: recent progress. *FEBS Journal* 275(7):1369–1369.
- Galve-Roperh, I., Malpartida, J. M., Haro, A., Brachet, P. und Diaz-Laviada, I. (1997). Regulation of nerve growth factor secretion and mRNA expression by bacterial lipopolysaccharide in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 49(5):569–75.
- Gao, H. M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J. S. und Liu, B. (2002). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 81(6):1285–97.
- Gao, H. M., Kotzbauer, P. T., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M. (2008). Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci* 28(30):7687–98.
- Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J. R. und Knowles, R. G. (1997). 1400W Is a Slow, Tight Binding, and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric-oxide Synthase in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 272(8):4959–4963.
- Gasser, T. (2007). Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 22(S17):S343–S350.

- Gautier, C. A., Kitada, T. und Shen, J. (2008). Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(32):11364–11369.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290(5493):985–9.
- Goldberg, M. S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T. A., Kitada, T., Costa, C., Tong, Y., Martella, G., Tschertter, A., Martins, A., Bernardi, G., Roth, B. L., Pothos, E. N., Calabresi, P. und Shen, J. (2005). Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* 45(4):489–96.
- Gorbatyuk, O. S., Li, S., Sullivan, L. F., Chen, W., Kondrikova, G., Manfredsson, F. P., Mandel, R. J. und Muzyczka, N. (2008). The phosphorylation state of Ser-129 in human a-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(2):763–768.
- Görner, K., Holtorf, E., Odoy, S., Nuscher, B., Yamamoto, A., Regula, J. T., Beyer, K., Haass, C. und Kahle, P. J. (2004). Differential Effects of Parkinson’s Disease-associated Mutations on Stability and Folding of DJ-1. *J. Biol. Chem.* 279(8):6943–6951.
- Görner, K., Holtorf, E., Waak, J., Pham, T. T., Vogt-Weisenhorn, D. M., Wurst, W., Haass, C. und Kahle, P. J. (2007). Structural determinants of the C-terminal helix-kink-helix motif essential for protein stability and survival promoting activity of DJ-1. *J Biol Chem* 282(18):13680–91.
- Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B. und Pallanck, L. J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7):4078–4083.
- Greggio, E., Zambrano, I., Kaganovich, A., Beilina, A., Taymans, J.-M., Daniels, V., Lewis, P., Jain, S., Ding, J., Syed, A., Thomas, K. J., Baekelandt, V. und Cookson, M. R. (2008). The Parkinson Disease-associated Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Is a Dimer That Undergoes Intramolecular Autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283(24):16906–16914.
- Guix, F. X., Uribealago, I., Coma, M. und Munoz, F. J. (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76(2):126–52.
- Hague, S., Rogaeva, E., Hernandez, D., Gulick, C., Singleton, A., Hanson, M., Johnson, J., Weiser, R., Gallardo, M., Ravina, B., Gwinn-Hardy, K., Crawley, A., George-Hyslop, P. H. S., Lang, A. E., Heutink, P., Bonifati, V., Hardy, J. und Singleton, A. (2003). Early-onset Parkinson’s disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol* 54(2):271–4.
- Hamprecht, B. und Löffler, F. (1985). Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol* 109:341–5.

- Hays, S. (1998). Therapeutic approaches to the treatment of neuroinflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 4:335–348.
- Heales, S. J., Lam, A. A., Duncan, A. J. und Land, J. M. (2004). Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res* 29(3):513–9.
- Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M. und Wood, N. W. (2004). Genetic causes of Parkinson’s disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res* 318(1):189–94.
- Healy, D. G., Falchi, M., O’Sullivan, S. S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C. P., Goldwurm, S., Ferreira, J. J., Tolosa, E., Kay, D. M., Klein, C., Williams, D. R., Marras, C., Lang, A. E., Wszolek, Z. K., Berciano, J., Schapira, A. H. V., Lynch, T., Bhatia, K. P., Gasser, T., Lees, A. J. und Wood, N. W. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson’s disease: a case-control study. *The Lancet Neurology* 7(7):583–590.
- Hedrich, K., Djarmati, A., Schafer, N., Hering, R., Wellenbrock, C., Weiss, P. H., Hilker, R., Vieregge, P., Ozelius, L. J., Heutink, P., Bonifati, V., Schwinger, E., Lang, A. E., Noth, J., Bressman, S. B., Pramstaller, P. P., Riess, O. und Klein, C. (2004). DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 62(3):389–94.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., Du-Bois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a Mitochondrial Apoptotic Serine Protease That Disrupts Inhibitor of Apoptosis Protein-Caspase Interaction. *J. Biol. Chem.* 277(1):432–438.
- Hering, R., Strauss, K. M., Tao, X., Bauer, A., Voitalla, D., Mietz, E. M., Petrovic, S., Bauer, P., Schaible, W., Muller, T., Schols, L., Klein, C., Berg, D., Meyer, P. T., Schulz, J. B., Wollnik, B., Tong, L., Kruger, R. und Riess, O. (2004). Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7). *Hum Mutat* 24(4):321–9.
- Herrera, A. J., Castano, A., Venero, J. L., Cano, J. und Machado, A. (2000). The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 7(4):429–47.
- Herrera, F. E., Zucchelli, S., Jezierska, A., Lavina, Z. S., Gustincich, S. und Carloni, P. (2007). On the Oligomeric State of DJ-1 Protein and Its Mutants Associated with Parkinson Disease: A COMBINED COMPUTATIONAL AND IN VITRO STUDY. *J. Biol. Chem.* 282(34):24905–24914.
- Hicks, A. A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H. S., Sainz, J., Frigge, M. L., Kong, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K. und Sveinbjornsdottir, S. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson’s disease. *Ann Neurol* 52(5):549–55.
- Hirotsu, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S. und Takeda, K. (2005). The Nuclear I κ B Protein I κ BNS Selectively

- Inhibits Lipopolysaccharide-Induced IL-6 Production in Macrophages of the Colonic Lamina Propria. *J Immunol* 174(6):3650–3657.
- Hirsch, E. C., Breidert, T., Rousset, E., Hunot, S., Hartmann, A. und Michel, P. P. (2003). The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:214–28.
- Holmgren, A. (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3(3):239–43.
- Honbou, K., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Niki, T., Taira, T., Ariga, H. und Inagaki, F. (2003). The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *J Biol Chem* 278(33):31380–4.
- Hoshi, T. und Heinemann, S. (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* 531(Pt 1):1–11.
- Huai, Q., Sun, Y., Wang, H., Chin, L.-S., Li, L., Robinson, H. und Ke, H. (2003). Crystal structure of DJ-1/RS and implication on familial Parkinson's disease. *FEBS Letters* 549(1-3):171–175.
- Hulleman, J. D., Mirzaei, H., Guigard, E., Taylor, K. L., Ray, S. S., Kay, C. M., Regnier, F. E. und Rochet, J. C. (2007). Destabilization of DJ-1 by Familial Substitution and Oxidative Modifications: Implications for Parkinson's Disease. *Biochemistry* 46(19):5776–5789.
- Hunot, S. und Hirsch, E. C. (2003). Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S49–58; discussion S58–60.
- Huynh, D. P., Scoles, D. R., Nguyen, D. und Pulst, S. M. (2003). The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum. Mol. Genet.* 12(20):2587–2597.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. und Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275(5296):90–4.
- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.-I. und Takahashi, R. (2002). CHIP Is Associated with Parkin, a Gene Responsible for Familial Parkinson's Disease, and Enhances Its Ubiquitin Ligase Activity. *Molecular Cell* 10(1):55–67.
- Inoue, T., Boyle, D. L., Corr, M., Hammaker, D., Davis, R. J., Flavell, R. A. und Firestein, G. S. (2006). Mitogen-activated protein kinase kinase 3 is a pivotal pathway regulating p38 activation in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14):5484–5489.
- Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M. und Walsh, D. M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* 14(7-8):451–64.

- Ischiropoulos, H. (2003). Oxidative modifications of alpha-synuclein. *Ann N Y Acad Sci* 991:93–100.
- Ito, G., Ariga, H., Nakagawa, Y. und Iwatsubo, T. (2006). Roles of distinct cysteine residues in S-nitrosylation and dimerization of DJ-1. *Biochem Biophys Res Commun* 339(2):667–72.
- Jang, S., Kelley, K. W. und Johnson, R. W. (2008). Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(21):7534–9.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(4):368–376.
- Janssens, S. und Beyaert, R. (2003). Functional Diversity and Regulation of Different Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK) Family Members. *Mol Cell* 11(2):293–302.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S26–36; discussion S36–8.
- Jeong, H., Kim, M. S., Kwon, J., Kim, K. S. und Seol, W. (2006). Regulation of the transcriptional activity of the tyrosine hydroxylase gene by androgen receptor. *Neurosci Lett* 396(1):57–61.
- Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B. S., Zhao, X., Ichijo, H. und Mouradian, M. M. (2005). Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(27):9691 – 9696.
- Kahle, P. J. (2008). alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115(1):87–95.
- Kahle, P. J., Haass, C., Kretzschmar, H. A. und Neumann, M. (2002). Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J Neurochem* 82(3):449–57.
- Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L. L., Miyazono, K., Ichijo, H. und Bazenet, C. E. (2000). Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol Cell Biol* 20(1):196–204.
- Kawai, T. und Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol* 19(1):24–32.
- Kim, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F. und Chao, M. V. (2001a). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 21(3):893–901.
- Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F. E., Garsin, D. A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Tan, M. W. und Ausubel, F. M. (2002). A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* 297(5581):623–6.

- Kim, G. M., Xu, J., Xu, J. M., Song, S. K., Yan, P., Ku, G., Xu, X. M. und Hsu, C. Y. (2001b). Tumor necrosis factor receptor deletions reduces nuclear factor-kappa B activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 21:6617–6625.
- Kim, H., Yang, E., Lee, J., Kim, S. H., Shin, J. S., Park, J. Y., Choi, S. J., Kim, S. J. und Choi, I. H. (2008). Double-stranded RNA mediates interferon regulatory factor 3 activation and interleukin-6 production by engaging Toll-like receptor 3 in human brain astrocytes. *Immunology* 124(4):480–8.
- Kim, R. H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G. C., DeLuca, C., Liepa, J., Zhou, L. und Snow, B. (2005a). DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 7(3):263–273.
- Kim, R. H., Smith, P. D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M. P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A. J., Kalia, S. K., Horne, P., Westaway, D., Lozano, A. M., Anisman, H., Park, D. S. und Mak, T. W. (2005b). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(14):5215–5220.
- Kinumi, T., Kimata, J., Taira, T., Ariga, H. und Niki, E. (2004). Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 317(3):722–8.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. und Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392(6676):605–8.
- Kitamura, Y., Matsuoka, Y., Nomura, Y. und Taniguchi, T. (1998). Induction of inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in rat glial cells. *Life Sci* 62(17-18):1717–21.
- Klegeris, A., Giasson, B. I., Zhang, H., Maguire, J., Pelech, S. und McGeer, P. L. (2006). Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells. *Faseb J* 20(12):2000–8.
- Ko, Y. G., Kang, Y. S., Park, H., Seol, W., Kim, J., Kim, T., Park, H. S., Choi, E. J. und Kim, S. (2001). Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm. *J Biol Chem* 276(42):39103–6.
- Kolodziejki, P. J., Koo, J. S. und Eissa, N. T. (2004). Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and cotranslational down-regulation by dimerization inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52):18141–6.
- Kotaria, N., Hinz, U., Zechel, S. und von Bohlen Und Halbach, O. (2005). Localization of DJ-1 protein in the murine brain. *Cell Tissue Res* 322(3):503–7.
- Krasowska-Zoladek, A., Banaszewska, M., Kraszpulski, M. und Konat, G. W. (2007). Kinetics of inflammatory response of astrocytes induced by TLR 3 and TLR4 ligation. *J Neurosci Res* 85(1):205–12.

- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Eppelen, J. T., Schöls, L. und Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18(2):106–8.
- Kumar, S., Boehm, J. und Lee, J. C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2(9):717–26.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–5.
- Lakshminarasimhan, M., Maldonado, M. T., Zhou, W., Fink, A. L. und Wilson, M. A. (2008). Structural impact of three Parkinsonism-associated missense mutations on human DJ-1. *Biochemistry* 47(5):1381–92.
- Lakso, M., Vartiainen, S., Moilanen, A. M., Sirvio, J., Thomas, J. H., Nass, R., Blakely, R. D. und Wong, G. (2003). Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem* 86(1):165–72.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. und Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219(4587):979–80.
- Langston, J. W., Forno, L. S., Tetrud, J., Reeves, A. G., Kaplan, J. A. und Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46(4):598–605.
- Latourelle, J., Sun, M., Lew, M., Suchowersky, O., Klein, C., Golbe, L., Mark, M., Growdon, J., Wooten, G. F., Watts, R., Guttman, M., Racette, B., Perlmutter, J., Ahmed, A., Shill, H., Singer, C., Goldwurm, S., Pezzoli, G., Zini, M., Saint-Hilaire, M., Hendricks, A., Williamson, S., Nagle, M., Wilk, J., Massood, T., Huskey, K., Laramie, J., DeStefano, A., Baker, K., Itin, I., Litvan, I., Nicholson, G., Corbett, A., Nance, M., Drasby, E., Isaacson, S., Burn, D., Chinnery, P., Pramstaller, P., Alhinti, J., Moller, A., Ostergaard, K., Sherman, S., Roxburgh, R., Snow, B., Slevin, J., Cambi, F., Gusella, J. und Myers, R. (2008). The Gly2019Ser mutation in LRRK2 is not fully penetrant in familial Parkinson's disease: the GenePD study. *BMC Medicine* 6(1):32.
- Lautier, C., Goldwurm, S., Duerr, A., Giovannone, B., Tsiaras, W. G., Pezzoli, G., Brice, A. und Smith, R. J. (2008). Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) Gene at the PARK11 Locus in Familial Parkinson Disease. *Am J Hum Genet* 82(4):822–833.
- Lavara-Culebras, E. und Paricio, N. (2007). *Drosophila* DJ-1 mutants are sensitive to oxidative stress and show reduced lifespan and motor deficits. *Gene* 400(1-2):158–165.
- Lee, H., Park, C., Cho, I.-H., Kim, H. Y., Jo, E.-K., Lee, S., Kho, H.-S., Choi, S.-Y., Oh, S. B., Park, K., Kim, J. S. und Lee, S. J. (2007). Double-stranded RNA induces iNOS gene expression in Schwann cells, sensory neuronal death, and peripheral nerve demyelination. *Glia* 55(7):712–722.

- Lee, S. C., Dickson, D. W. und Brosnan, C. F. (1995). Interleukin-1, Nitric Oxide and Reactive Astrocytes. *Brain Behav Immun* 9(4):345–354.
- Lee, S. J., Drabik, K., Wagoner, N. J. V., Lee, S., Choi, C., Dong, Y. und Benveniste, E. N. (2000). ICAM-1-induced expression of proinflammatory cytokines in astrocytes: involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* 165(8):4658–66.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D. und Polymeropoulos, M. H. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395(6701):451–2.
- Lev, N., Ickowicz, D., Barhum, Y., Lev, S., Melamed, E. und Offen, D. (2008a). DJ-1 protects against dopamine toxicity. *J Neural Transm* .
- Lev, N., Ickowicz, D., Melamed, E. und Offen, D. (2008b). Oxidative insults induce DJ-1 upregulation and redistribution: implications for neuroprotection. *Neurotoxicology* 29(3):397–405.
- Li, H. M., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Arigo, S. M. M. und Arigo, H. (2005). Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radic Res* 39(10):1091 – 1099.
- Lim, K. L. und Tan, J. M. (2007). Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochem* 8(Suppl 1):S13.
- Lin, J. W., Ju, W., Foster, K., Lee, S. H., Ahmadian, G., Wyszynski, M., Wang, Y. T. und Sheng, M. (2000). Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat Neurosci* 3(12):1282–90.
- Liu, F., Hindupur, J., Nguyen, J. L., Ruf, K. J., Zhu, J., Schieler, J. L., Bonham, C. C., Wood, K. V., Davisson, V. J. und Rochet, J.-C. (2008a). Methionine sulfoxide reductase A protects dopaminergic cells from Parkinson's disease-related insults. *Free Radic Biol Med* 45(3):242–255.
- Liu, F., Nguyen, J. L., Hulleman, J. D., Li, L. und Rochet, J. C. (2008b). Mechanisms of DJ-1 neuroprotection in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 105(6):2435–2453.
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. und Kyriakis, J. M. (2000). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol* 20(6):2198–208.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H. A., Liu, Z. und P. T. Lansbury, J. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111(2):209–18.
- Lücking, C. B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., Michele, G. D., Gasser, T., Harhangi, B. S., Meco, G., Deneffe, P., Wood, N. W., Agid, Y. und Brice, A. (2000). Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *N Engl J Med* 342(21):1560–1567.

- Macedo, M. G., Anar, B., Bronner, I. F., Cannella, M., Squitieri, F., Bonifati, V., Hoogeveen, A., Heutink, P. und Rizzu, P. (2003). The DJ-1L166P mutant protein associated with early onset Parkinson's disease is unstable and forms higher-order protein complexes. *Hum Mol Genet* 12(21):2807–16.
- MacLeod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K. und Abeliovich, A. (2006). The Familial Parkinsonism Gene LRRK2 Regulates Neurite Process Morphology. *Neuron* 52(4):587–593.
- Malgieri, G. und Eliezer, D. (2008). Structural effects of Parkinson's disease linked DJ-1 mutations. *Protein Sci* 17(5):855–68.
- Manning-Bog, A. B., Caudle, W. M., Perez, X. A., Reaney, S. H., Paletzki, R., Isla, M. Z., Chou, V. P., McCormack, A. L., Miller, G. W., Langston, J. W., Gerfen, C. R. und Dimonte, D. A. (2007). Increased vulnerability of nigrostriatal terminals in DJ-1-deficient mice is mediated by the dopamine transporter. *Neurobiol Dis* 27(2):141–50.
- Marsden, C. D. (1983). Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 19:121–41.
- Martin, L. J. (2008). DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 67(5):377–87.
- Martinat, C., Shendelman, S., Jonason, A., Leete, T., Beal, M. F., Yang, L., Floss, T. und Abeliovich, A. (2004). Sensitivity to oxidative stress in DJ-1 deficient dopamine neurons: an ES-derived cell model of primary parkinsonism. *PLoS Biology* 2(11):1754 – 1763.
- Martins, L. M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N. F., Lemoine, N. R., Savopoulos, J., Gray, C. W., Creasy, C. L., Dingwall, C. und Downward, J. (2002). The Serine Protease Omi/HtrA2 Regulates Apoptosis by Binding XIAP through a Reaper-like Motif. *J. Biol. Chem.* 277(1):439–444.
- Martins, L. M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P., Abuin, A., Grau, E., Geppert, M., Livi, G. P., Creasy, C. L., Martin, A., Hargreaves, I., Heales, S. J., Okada, H., Brandner, S., Schulz, J. B., Mak, T. und Downward, J. (2004). Neuroprotective Role of the Reaper-Related Serine Protease HtrA2/Omi Revealed by Targeted Deletion in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 24(22):9848–9862.
- Mata, I. F., Wedemeyer, W. J., Farrer, M. J., Taylor, J. P. und Gallo, K. A. (2006). LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 29(5):286–293.
- Matsuzawa, A. und Ichijo, H. (2008). Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta* 1780(11):1325–1336.
- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. und Ichijo, H. (2005). ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 6(6):587–92.

- McCormack, A. L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A. B., Thiffault, C., Langston, J. W., Cory-Slechta, D. A. und Monte, D. A. D. (2002). Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 10(2):119–27.
- McGeer, P. L. und McGeer, E. G. (2008). Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23(4):474–83.
- McNaught, K. S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P. und Olanow, C. W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 179(1):38–46.
- McNaught, K. S., Jackson, T., JnoBaptiste, R., Kapustin, A. und Olanow, C. W. (2006). Proteasomal dysfunction in sporadic Parkinson's disease. *Neurology* 66(10 Suppl 4):S37–49.
- McNaught, K. S., Perl, D. P., Brownell, A. L. und Olanow, C. W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56(1):149–62.
- Mena, M. A. und de Yebenes, J. G. (2008). Glial Cells as Players in Parkinsonism: The Good, the Bad, and the Mysterious Glia. *Neuroscientist* 14(6):544–560.
- Meulener, M. C., Xu, K., Thomson, L., Ischiropoulos, H. und Bonini, N. M. (2006). Mutational analysis of DJ-1 in *Drosophila* implicates functional inactivation by oxidative damage and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33):12517–22.
- Miklossy, J., Doudet, D. D., Schwab, C., Yu, S., McGeer, E. G. und McGeer, P. L. (2006). Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Exp Neurol* 197(2):275–83.
- Miller, D. W., Ahmad, R., Hague, S., Baptista, M. J., Canet-Aviles, R., McLendon, C., Carter, D. M., Zhu, P.-P., Stadler, J., Chandran, J., Klinefelter, G. R., Blackstone, C. und Cookson, M. R. (2003). L166P Mutant DJ-1, Causative for Recessive Parkinson's Disease, Is Degraded through the Ubiquitin-Proteasome System. *J. Biol. Chem.* 278(38):36588–36595.
- Mills, R. D., Sim, C. H., Mok, S. S., Mulhern, T. D., Culvenor, J. G. und Cheng, H. C. (2008). Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem* 105(1):18–33.
- Minghetti, L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(9):901–10.
- Minghetti, L., Ajmone-Cat, M. A., Beradinis, M. A. D. und Simone, R. D. (2005). Microglial activation in chronic neurodegeneration diseases: roles of apoptotic neurons and chronic stimulation. *Brain Res Rev* 48:251–256.
- Mitsumoto, A. und Nakagawa, Y. (2001). DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res* 35(6):885–93.

- Mitsumoto, A., Nakagawa, Y., Takeuchi, A., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Takanezawa, Y. (2001). Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radic Res* 35(3):301–10.
- Miyazaki, I. und Asanuma, M. (2008). Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama* 62(3):141–50.
- Mo, J. S., Kim, M. Y., Ann, E. J., Hong, J. A. und Park, H. S. (2008). DJ-1 modulates UV-induced oxidative stress signaling through the suppression of MEKK1 and cell death. *Cell Death Differ* 15(6):1030–41.
- Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28:57 – 87.
- Moore, D. J., Zhang, L., Dawson, T. M. und Dawson, V. L. (2003). A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization. *Journal of Neurochemistry* 87(6):1558–1567.
- Mullett, S. J. und Hinkle, D. A. (2008). DJ-1 knock-down in astrocytes impairs astrocyte-mediated neuroprotection against rotenone. *Neurobiol Dis* .
- Murphy, S. (2000). Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29(1):1–13.
- Murphy, S. und Gibson, C. L. (2007). Nitric oxide, ischaemia and brain inflammation. *Biochemical Society Transactions* 035(5):1133–1137.
- Nadeau, P. J., Charette, S. J., Toledano, M. B. und Landry, J. (2007). Disulfide Bond-mediated Multimerization of Ask1 and Its Reduction by Thioredoxin-1 Regulate H₂O₂-induced c-Jun NH₂-terminal Kinase Activation and Apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 18(10):3903–3913.
- Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K. und Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 40(1):1–6.
- Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S. M. M. und Ariga, H. (1997). DJ-1, a Novel Oncogene Which Transforms Mouse NIH3T3 Cells in Cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 231(2):509–513.
- Nagashima, R., Sugiyama, C., Gotoh, Y., Yoneyama, M., Kuramoto, N., Taira, T., Ariga, H. und Ogita, K. (2008). Altered expression of DJ-1 in the hippocampal cells following in vivo and in vitro neuronal damage induced by trimethyltin. *Neurosci Lett* 440(3):232–6.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H. und Togari, A. (2000a). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* (60):277–90.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H. und Togari, A. (2000b). Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* (58):143–51.

- Neumann, M., Muller, V., Gorner, K., Kretzschmar, H. A., Haass, C. und Kahle, P. J. (2004). Pathological properties of the Parkinson's disease-associated protein DJ-1 in alpha-synucleinopathies and tauopathies: relevance for multiple system atrophy and Pick's disease. *Acta Neuropathol* 107(6):489–96.
- Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M. A., Voss, O. H., Gavrilin, M. A., Wewers, M. D., Guttridge, D. C., Grotewold, E. und Doseff, A. I. (2007). Apigenin Blocks Lipopolysaccharide-Induced Lethality In Vivo and Proinflammatory Cytokines Expression by Inactivating NF-kappaB through the Suppression of p65 Phosphorylation. *J Immunol* 179(10):7121–7127.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T.-T., Yu, V. L. und Miller, D. K. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376(6535):37–43.
- Niki, T., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M. und Ariga, H. (2003). DJBP: a novel DJ-1-binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ-1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex. *Mol Cancer Res* 1(4):247–61.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. und Ichijo, H. (1998). ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* 2(3):389–95.
- Noda, M., Kettenmann, H. und Wada, K. (2006). Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system. *Biol Chem* 387:167–171.
- Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J. und Ichijo, H. (2005). Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem* 280(44):37033–40.
- Nutt, J. G. und Wooten, G. F. (2005). Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 353(10):1021–7.
- Olanow, C. W. (2007). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease–2007. *Mov Disord* 22 Suppl 17:S335–42.
- Olzmann, J. A., Brown, K., Wilkinson, K. D., Rees, H. D., Huai, Q., Ke, H., Levey, A. I., Li, L. und Chin, L. S. (2004). Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem* 279(9):8506–15.
- Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simon, J., van der Brug, M., de Munain, A. L., Aparicio, S., Gil, A. M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J. R., Nicholl, D., Carrera, I. M., Pena, A. S., de Silva, R., Lees, A., Marti-Masso, J. F., Perez-Tur, J., Wood, N. W. und Singleton, A. B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44(4):595–600.
- Palacino, J. J., Sagi, D., Goldberg, M. S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J. und Shen, J. (2004). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in parkin-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 279(18):18614–18622.

- Pankratz, N. und Foroud, T. (2007). Genetics of Parkinson disease. *Genet Med* 9(12):801–11.
- Park, C., Lee, S., Cho, I.-H., Lee, H. K., Kim, D., Choi, S.-Y., Oh, S. B., Park, K., Kim, J. S. und Lee, S. J. (2006). TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: Differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression. *Glia* 53(3):248–256.
- Paterna, J. C., Leng, A., Weber, E., Feldon, J. und Bueler, H. (2007). DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice. *Mol Ther* 15(4):698–704.
- Pawate, S., Shen, Q., Fan, F. und Bhat, N. R. (2004). Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res* 77(4):540–51.
- Pearce, R. K., Owen, A., Daniel, S., Jenner, P. und Marsden, C. D. (1997). Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 104(6-7):661–77.
- Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J. S., Estevez, A. G. und Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89(2):464–73.
- Pekny, M. und Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50(4):427–34.
- Perez, F. A. und Palmiter, R. D. (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(6):2174–2179.
- Phillis, J. W., Horrocks, L. A. und Farooqui, A. A. (2006). Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* 52(2):201–243.
- Pindado, J., Balsinde, J. und Balboa, M. A. (2007). TLR3-Dependent Induction of Nitric Oxide Synthase in RAW 264.7 Macrophage-Like Cells via a Cytosolic Phospholipase A2/Cyclooxygenase-2 Pathway. *J Immunol* 179(7):4821–4828.
- Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R. J., McDonald, N., Wood, N. W., Martins, L. M. und Downward, J. (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 9(11):1243–1252.
- Poirier, L. J. und Sourkes, T. L. (1965). Influence of the Substantia Nigra on the Catecholamine Content of the Striatum. *Brain* 88:181–92.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Iorio, G. D., Golbe, L. I. und Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276(5321):2045–7.

- Powis, G. und Montfort, W. R. (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:421–55.
- Prabhakar, N. R. (1998). Endogenous carbon monoxide in control of respiration. *Respir Physiol* 114(1):57–64.
- Ratovitski, E. A., Bao, C., Quick, R. A., McMillan, A., Kozlovsky, C. und Lowenstein, C. J. (1999). An Inducible Nitric-oxide Synthase (NOS)-associated Protein Inhibits NOS Dimerization and Activity. *J. Biol. Chem.* 274(42):30250–30257.
- Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A. und Gage, F. H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20(12):570–7.
- de Rijk, M. C., Launer, L. J., Berger, K., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Baldere-schi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C. und Hofman, A. (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54(11 Suppl 5):S21–3.
- Rizzu, P., Hinkle, D. A., Zhukareva, V., Bonifati, V., Severijnen, L. A., Martinez, D., Ravid, R., Kamphorst, W., Eberwine, J. H., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. und Heutink, P. (2004). DJ-1 colocalizes with tau inclusions: a link between parkinsonism and dementia. *Ann Neurol* 55(1):113–8.
- Rothwell, N. J. (1999). Annual review prize lecture cytokines, killers in the brain? *J Physiol (London)* 514:3–17.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. und Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 17(9):2596–606.
- Sakaguchi-Nakashima, A., Meir, J. Y., Jin, Y., Matsumoto, K. und Hisamoto, N. (2007). LRK-1, a C. elegans PARK8-Related Kinase, Regulates Axonal-Dendritic Polarity of SV Proteins. *Curr Biol* 17(7):592–598.
- Savitt, J. M., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest* 116(7):1744–54.
- Schmidt, E., Seifert, M. und Baumeister, R. (2007). Caenorhabditis elegans as a model system for Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 4(2-3):199–217.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P. E., Williams, R. J., Cadenas, E. und Rice-Evans, C. (2002). MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 23(5):861–880.
- Sekine, Y., Takeda, K. und Ichijo, H. (2006). The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases. *Curr Mol Med* 6(1):87–97.
- Serhan, C. und Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nature Immunol* 6:1191–1197.
- Shang, H., Lang, D., Jean-Marc, B. und Kaelin-Lang, A. (2004). Localization of DJ-1 mRNA in the mouse brain. *Neurosci Lett* 367(3):273–277.

- Sharma, M., Mueller, J. C., Zimprich, A., Lichtner, P., Hofer, A., Leitner, P., Maass, S., Berg, D., Durr, A., Bonifati, V., Michele, G. D., Oostra, B., Brice, A., Wood, N. W., Muller-Myhsok, B., Gasser, T. und on Genetic Susceptibility in Parkinson's, D. E. C. (2006). The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations. *J Med Genet* 43(7):557–562.
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T. und Abeliovich, A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol* 2(11):e362.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. und Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25(3):302–5.
- Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S. und Selkoe, D. J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293(5528):263–9.
- Silva, J. D., Pierrat, B., Mary, J.-L. und Lesslauer, W. (1997). Blockade of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Inhibits Inducible Nitric-oxide Synthase Expression in Mouse Astrocytes. *J. Biol. Chem.* 272(45):28373–28380.
- da Silveira, S. A., Schneider, B. L., Cifuentes-Diaz, C., Sage, D., Abbas-Terki, T., Iwatsubo, T., Unser, M. und Aebischer, P. (2008). Phosphorylation Does Not Prompt, Nor Prevent, the Formation of alpha-synuclein Toxic Species in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Hum. Mol. Genet.* ddn417.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J. und Gwinn-Hardy, K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302(5646):841.
- Smith, W. L., Garavito, R. M. und DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271(52):33157–33160.
- Song, J. J. und Lee, Y. J. (2003). Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 signal in Daxx trafficking and ASK1 oligomerization. *J Biol Chem* 278(47):47245–52.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. und Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6469–73.
- Springer, W., Hoppe, T., Schmidt, E. und Baumeister, R. (2005). A Caenorhabditis elegans Parkin mutant with altered solubility couples alpha-synuclein aggregation to proteotoxic stress. *Hum. Mol. Genet.* 14(22):3407–3423.
- Stark, G. (2005). Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol* 205(1):1–16.

- Steer, S. A., Moran, J. M., Christmann, B. S., Leonard B. Maggi, J. und Corbett, J. A. (2006). Role of MAPK in the Regulation of Double-Stranded RNA- and Encephalomyocarditis Virus-Induced Cyclooxygenase-2 Expression by Macrophages. *J Immunol* 177(5):3413–3420.
- Strauss, K. M., Martins, L. M., Plun-Favreau, H., Marx, F. P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J. B. und Krüger, R. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 14(15):2099–2111.
- Su, X., Maguire-Zeiss, K. A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K. und Federoff, H. J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 29(11):1690–1701.
- Sun, D., Newman, T. A., Perry, V. A. und Weller, R. O. (2004). Cytokine-induced enhancement of autoimmune inflammation in the brain and spinal cord: implications for multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:374–384.
- Sydow, O. (2008). Parkinson's disease: recent development in therapies for advanced disease with a focus on deep brain stimulation (DBS) and duodenal levodopa infusion. *FEBS Journal* 275(7):1370–1376.
- Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S. M., Takahashi, K. und Ariga, H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5(2):213–8.
- Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Kishida, S., Li, X., Stark, G. R. und Matsumoto, K. (2001). Interleukin-1 (IL-1) Receptor-Associated Kinase Leads to Activation of TAK1 by Inducing TAB2 Translocation in the IL-1 Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 21(7):2475–2484.
- Takahashi, K., Taira, T., Niki, T., Seino, C., Iguchi-Ariga, S. M. und Ariga, H. (2001). DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor. *J Biol Chem* 276(40):37556–63.
- Takahashi-Niki, K., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M. und Ariga, H. (2004). Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 320(2):389–97.
- Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Kishida, S., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. und Ichijo, H. (2004). Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation. *EMBO Rep* 5(2):161–6.
- Tan, M. W., Mahajan-Miklos, S. und Ausubel, F. M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2):715–20.
- Tansey, M. G., McCoy, M. K. und Frank-Cannon, T. C. (2007). Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 208(1):1–25.
- Tao, X. und Tong, L. (2003). Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem* 278(33):31372–9.

- Tenner, A. J. (1998). C1q receptors: regulating specific functions of phagocytic cells. *Immunobiology* 199(2):250–64.
- Tenner, A. J. (1999). Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr Opin Immunol* 11(1):34–41.
- Terzioglu, M. und Galter, D. (2008). Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. *FEBS Journal* 275(7):1384–1391.
- Tobiume, K., Saitoh, M. und Ichijo, H. (2002). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol* 191(1):95–104.
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M. und Margioris, A. N. (2006). Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* 38(10):1654–61.
- Tsuboi, Y., Munemoto, H., Ishikawa, S., Matsumoto, K., Iguchi-Ariga, S. M. und Ariga, H. (2008). DJ-1, a causative gene product of a familial form of Parkinson's disease, is secreted through microdomains. *FEBS Lett* 582(17):2643–9.
- Uhl, G. R., Hedreen, J. C. und Price, D. L. (1985). Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 35(8):1215–8.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Turco, D. D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G. und Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304(5674):1158–60.
- Ved, R., Saha, S., Westlund, B., Perier, C., Burnam, L., Sluder, A., Hoener, M., Rodrigues, C. M., Alfonso, A., Steer, C., Liu, L., Przedborski, S. und Wolozin, B. (2005). Similar patterns of mitochondrial vulnerability and rescue induced by genetic modification of alpha-synuclein, parkin, and DJ-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 280(52):42655–68.
- Volles, M. J. und Lansbury, P. T. (2003). Zeroing in on the Pathogenic Form of alpha-Synuclein and Its Mechanism of Neurotoxicity in Parkinson's Disease. *Biochemistry* 42(26):7871–7878.
- Waak, J., Weber, S. S., Schell, H., Waldenmaier, A., Görner, K., Alunni-Fabbroni, M., Vogt-Weisenhorn, D. M., Pham, T.-T., Reumers, V., Baekelandt, V., Wurst, W. und Kahle, P. J. (2009). Regulation of astrocyte inflammatory responses by the Parkinson's disease-associated gene DJ-1. *Faseb J* .
- Wagenfeld, A., Gromoll, J. und Cooper, T. G. (1998). Molecular Cloning and Expression of Rat Contraception Associated Protein 1 (CAP1), a Protein Putatively Involved in Fertilization. *Biochem Biophys Res Commun* 251(2):545–549.
- Wagoner, N. J. V. und Benveniste, E. N. (1999). Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* 100(1-2):124–139.

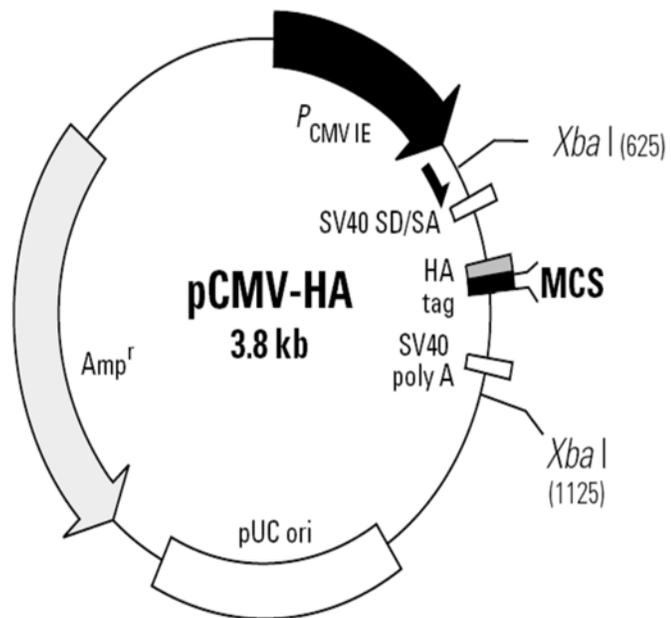
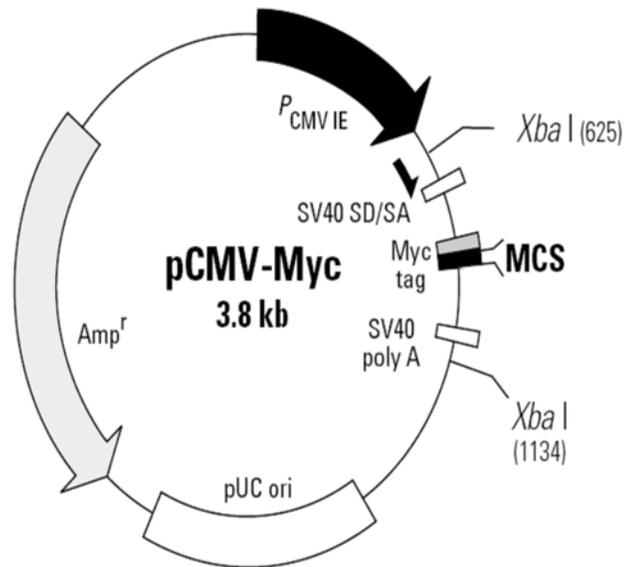
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F. und Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 27(5):494–506.
- Walle, L. V., Lamkanfi, M. und Vandenabeele, P. (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ* 15(3):453–60.
- Wang, T. H., Wang, H. S., Ichijo, H., Giannakakou, P., Foster, J. S., Fojo, T. und Wimalasena, J. (1998). Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem* 273(9):4928–36.
- Wang, Y., Chandran, J. S., Cai, H. und Mattson, M. P. (2008). DJ-1 is essential for long-term depression at hippocampal CA1 synapses. *Neuromolecular Med* 10(1):40–5.
- Weintraub, D., Comella, C. L. und Horn, S. (2008). Parkinson's disease—Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care* 14(2 Suppl):S40–8.
- Wichmann, T. und DeLong, M. R. (1999). Neurobiology: Oscillations in the basal ganglia. *Nature* 400(6745):621–622.
- Wilson, M. A., Collins, J. L., Hod, Y., Ringe, D. und Petsko, G. A. (2003). The 1.1-Å resolution crystal structure of DJ-1, the protein mutated in autosomal recessive early onset Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16):9256–61.
- Witt, A. C., Lakshminarasimhan, M., Remington, B. C., Hasim, S., Pozharski, E. und Wilson, M. A. (2008). Cysteine pKa depression by a protonated glutamic acid in human DJ-1. *Biochemistry* 47(28):7430–40.
- Wszolek, Z. K., Pfeiffer, R. F., Tsuboi, Y., Uitti, R. J., McComb, R. D., Stoessl, A. J., Strongosky, A. J., Zimprich, A., Muller-Mylhok, B., Farrer, M. J., Gasser, T., Calne, D. B. und Dickson, D. W. (2004). Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology* 62(9):1619–1622.
- Wu, S. M., Patel, D. D. und Pizzo, S. V. (1998). Oxidized α_2 -macroglobulin differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation. *J Immunol* 161:4356–4365.
- Xiong, H., Yamada, K., Jourdi, H., Kawamura, M., Takei, N., Han, D., Nabeshima, T. und Nawa, H. (1999). Regulation of Nerve Growth Factor Release by Nitric Oxide through Cyclic GMP Pathway in Cortical Glial Cells. *Mol Pharmacol* 56(2):339–347.
- Xu, J., Zhong, N., Wang, H., Elias, J. E., Kim, C. Y., Woldman, I., Pifl, C., Gygi, S. P., Geula, C. und Yankner, B. A. (2005). The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Hum Mol Genet* 14(9):1231–41.
- Yamaguchi, H. und Shen, J. (2007). Absence of dopaminergic neuronal degeneration and oxidative damage in aged DJ-1-deficient mice. *Mol Neurodegener* 2:10.

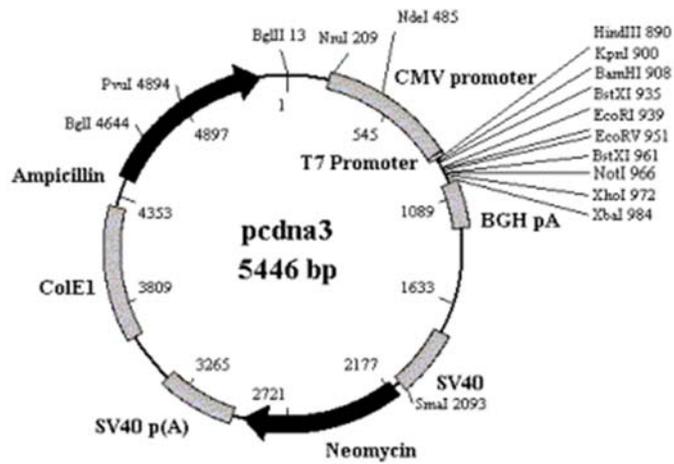
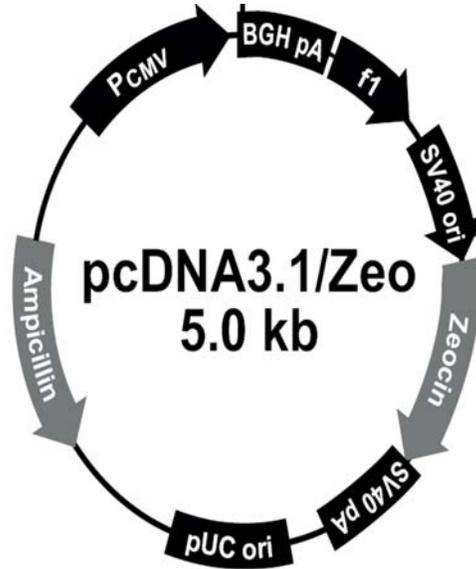
- Yanagida, T., Takata, K., Inden, M., Kitamura, Y., Taniguchi, T., Yoshimoto, K., Taira, T. und Ariga, H. (2006). Distribution of DJ-1, Parkinson's disease-related protein PARK7, and its alteration in 6-hydroxydopamine-treated hemiparkinsonian rat brain. *J Pharmacol Sci* 102(2):243–7.
- Yang, W., Chen, L., Ding, Y., Zhuang, X. und Kang, U. J. (2007). Paraquat induces dopaminergic dysfunction and proteasome impairment in DJ-1-deficient mice. *Hum Mol Genet* 16(23):2900–10.
- Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M. E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M. F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R. und Lu, B. (2005). Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38):13670–13675.
- Youdim, M. B., Edmondson, D. und Tipton, K. F. (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7(4):295–309.
- Yuan, Z. Q., Feldman, R. I., Sussman, G. E., Coppola, D., Nicosia, S. V. und Cheng, J. Q. (2003). AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance. *J Biol Chem* 278(26):23432–40.
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Tortosa, E. G., del Ser, T., Munoz, D. G. und de Yebenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55(2):164–73.
- Zhang, L., Chen, J. und Fu, H. (1999). Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15):8511–5.
- Zhang, L., Shimoji, M., Thomas, B., Moore, D. J., Yu, S.-W., Marupudi, N. I., Torp, R., Torgner, I. A., Ottersen, O. P., Dawson, T. M. und Dawson, V. L. (2005). Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 14(14):2063–2073.
- Zhang, Y. und Dong, C. (2007). Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 64(21):2771–89.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K. K., Huang, H., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(24):13354–13359.
- Zhong, N., Kim, C. Y., Rizzu, P., Geula, C., Porter, D. R., Pothos, E. N., Squitieri, F., Heutink, P. und Xu, J. (2006). DJ-1 transcriptionally up-regulates the human tyrosine hydroxylase by inhibiting the sumoylation of pyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor. *J Biol Chem* 281(30):20940–8.
- Zhou, W. und Freed, C. R. (2005). DJ-1 upregulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T a-synuclein toxicity. *J Biol Chem* 280(52):43150–43158.

- Zhou, W., Zhu, M., Wilson, M. A., Petsko, G. A. und Fink, A. L. (2006). The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. *J Mol Biol* 356(4):1036–48.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., Strom, T. M., Wszolek, Z. K. und Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44(4):601–7.

8 Anhang

Vektoren





Akademische Lehrer

Name	Fachbereich	Universität
Albert, Klaus	Organische Chemie	Tübingen
Bardele, Christian	Zoologie	Tübingen
Beilharz, Manfred	Mikrobiologie	Perth (Australien)
Beyer, Ernst	Biochemie	Tübingen
Bisswanger, Hans	Biochemie	Tübingen
Bohley, Peter	Biochemie	Tübingen
Dodt, Gabriele	Biochemie	Tübingen
Dringen, Ralf	Biochemie	Tübingen/Bremen
Großmann, Alexander	Physik	Tübingen
Guppy, Michael	Biochemie	Perth (Australien)
Häfelinger, Günther	Organische Chemie	Tübingen
Hamprecht, Bernd	Biochemie	Tübingen
Heidenreich, Olaf	Zellbiologie	Tübingen
Lindner, Ekkehard	Anorganische Chemie	Tübingen
Maier, Martin	Organische Chemie	Tübingen
Mayer, Wolfgang	Botanik	Tübingen
Ninnemann, Helga	Biochemie	Tübingen
Nordheim, Alfred	Zellbiologie	Tübingen
Oberhammer, Heinz	Physikalische Chemie	Tübingen
Pommer, Helmut	Mathematik	Tübingen
Probst, Hansgeorg	Biochemie	Tübingen
Reutter, Klaus	Anatomie	Tübingen
Robinson, Stephen	Neurowissenschaften	Melbourne (Australien)
Sarrazin, Wolfram	Biochemie	Tübingen
Schott, Herbert	Organische Chemie	Tübingen
Steinbrück, Günther	Zoologie	Tübingen
Strähle, Joachim	Anorganische Chemie	Tübingen
Voelter, Wolfgang	Biochemie	Tübingen
Wagner, Gerhard	Physik	Tübingen
Weser, Ulrich	Anorganische Chemie / Biochemie	Tübingen
Whelan, Jim	Biochemie	Perth (Australien)
Wohlleben, Wolfgang	Mikrobiologie	Tübingen
Zeller, Klaus-Peter	Organische Chemie	Tübingen