

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen des PARK7  
Parkinsongenprodukts DJ-1**

Karin Görner

aus

Essen

2006

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Christian Haass betreut und von Herrn Prof. Dr. Patrick Cramer vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 5.7.2006

.....

(Karin Görner)

Dissertation eingereicht am 8.8.2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Haass

Mündliche Prüfung am 10.10.2006

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

***Differential effects of Parkinson's disease-associated mutations on stability and folding of DJ-1***

**Görner K**, Holtorf E, Odoj S, Nuscher B, Yamamoto A, Regula JT, Beyer K, Haass C, Kahle PJ  
*J. Biol. Chemistry*, 2004 Feb 20;279(8):6943-51

***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***

Neumann M, Müller V, **Görner K**, Kretschmar HA, Haass C, Kahle P J  
*Acta Neuropathol (Berl)*. 2004 Jun;107(6):489-96

***The C-terminal helix-kink-helix motif is essential for protein stability and survival-promoting activity of DJ-1***

**Görner K**, Holtorf E, Waak J., Pham T-T, Vogt-Weisenhorn D M, Wurst W, Haass C, and Kahle P J  
*J. Biol. Chemistry*, 2006 May, in revision

Die Publikationen befinden sich im Anhang.

## Abkürzungsverzeichnis

AK	<b>Antikörper</b>
Akt	<i>Stark transformierender Retrovirus <b>AKT8</b> in T-Zelllymphomen von Nagetieren</i>
Amp	<b>Ampizillin</b>
aN	Aminopeptidase
ANK	<b>Ankyrin</b>
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
Ask-1	Apoptosesignal-regulierende <b>Kinase-1</b>
ATP	Adenosyltriphosphat
BCA	<b>Bicinchoninic acid</b> <i>Bicinchoninsäure</i>
BSA	<b>Bovine serum albumin</b> <i>Rinderserumalbumin</i>
CAT	<b>Catalase</b> <i>Katalase</i>
CBD	<b>Corticobasale Demenz</b>
CD	<b>Circular dichroism</b> <i>Zirkulärdichroismus</i>
CHIP	Carboxy-terminal <b>HSP70</b> Interagierendes <b>Protein</b>
Ci	Curie
CK	<b>Casein-Kinase</b>
COMT	<b>Catechol-O-Methyltransferase</b>
COR	<b>C-terminal of Roc</b>
Cp	<b>Crossing point</b>
cpm	<b>Counts per minute</b>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
CHX	<b>Cycloheximid</b>
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
Da	Dalton
D-β-HB	<b>D-β-Hydroxybutyrat</b>
Δex 1-5	Deletion von Exon 1-5
DJBP	<b>DJ-1 Bindungsprotein</b>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b>
DNA	<b>Desoxyribonucleic acid</b> <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DTT	<b>Dithiothreitol</b>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<b>Ethylendiamintetraacetat</b>
EndoH	<b>Endoglykosidase H</b>
ER	Endoplasmatisches <b>Retikulum</b>
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte <b>Kinase</b>
ESI-MS	Elekrospray-Ionisations- <b>Massenspektrometrie</b>
FCS	<b>Fetal calf serum</b> <i>Fötales Kälberserum</i>
FWD	<b>Forward</b> <i>Vorwärtsprimer</i>

## Abkürzungsverzeichnis

GβL	<b>G</b> -protein <b>β</b> -subunit-like protein <i>G-Protein ähnlich der β-Untereinheit</i>
GCL	<b>G</b> lutamat <b>C</b> ystein <b>L</b> igase
GFP	<b>G</b> rün <b>f</b> luoreszierendes <b>P</b> rotein
GSH	<b>G</b> lutathion
Grx	<b>G</b> lutathionperoxidase
GSK 3β	<b>G</b> lycogen <b>S</b> ynthase <b>K</b> inase 3β
γ-GT	<b>γ</b> - <b>G</b> lutamyltransferase
GTP	<b>G</b> uanidyl <b>t</b> riphosphat
h	<b>H</b> uman
HDAC	<b>H</b> istone <b>D</b> eacetylase <b>C</b> omplex <i>Histondeacetylase-Komplex</i>
HEK	<b>H</b> uman <b>E</b> mbyronic <b>K</b> idney cells <i>Menschliche embryonale Nierenzellen</i>
HIPK-1	<b>H</b> omöodomäne- <b>I</b> nteraktions <b>p</b> roteink <b>i</b> nase- <b>1</b>
HSF-1	<b>H</b> itzeschock- <b>T</b> ranskriptions <b>f</b> aktor- <b>1</b>
HSP70	<b>H</b> itzeschock <b>P</b> rotein <b>70</b>
IBR	<b>I</b> n <b>b</b> etween <b>R</b> ING finger <i>Zwischen zwei RING-Fingern</i>
IgG	<b>I</b> mmunglobulin <b>G</b>
IF	<b>I</b> mmun <b>f</b> luoreszenz
ILK- 1	<b>I</b> ntegrin- <b>L</b> inked <b>K</b> inase 1 <i>Integrin-verknüpfte Kinase</i>
IP	<b>I</b> mmun <b>p</b> räzipitation
IPTG	<b>I</b> sopropyl- <b>β</b> - <b>D</b> -thiogalactosid
JNK	c- <b>J</b> un <b>N</b> - <b>T</b> erminale <b>K</b> inase
LDH	<b>L</b> actat <b>d</b> ehydrogenase
LIF	<b>L</b> eukämie <b>i</b> nhibitorischer <b>F</b> aktor
LK	<b>L</b> ewy- <b>K</b> örper
LN	<b>L</b> ewy- <b>N</b> eurit
LRRK-2	<b>L</b> eucinreiche <b>R</b> epeatkinase- <b>2</b>
m	<b>M</b> aus
MALDI-TOF	<b>M</b> atrix <b>A</b> ssisted <b>L</b> aser <b>D</b> esorbtion <b>I</b> onisation <b>T</b> ime <b>O</b> f <b>F</b> light
MAO	<b>M</b> ono <b>a</b> minoxidase
MAPKKK	<b>M</b> itogen- <b>a</b> ktiviert <b>e</b> <b>K</b> inase <b>K</b> inase <b>K</b> inase
MBP	<b>M</b> yelin <b>b</b> asisches <b>P</b> rotein
MPTP	<b>1</b> - <b>M</b> ethyl- <b>4</b> - <b>p</b> henyl- <b>1,2,3,6</b> -tetrahydro <b>p</b> yridin
mRNA	<i>m</i> essenger- <b>R</b> ibonucleic acid <i>Boten-Ribonukleinsäure</i>
mTOR	<b>M</b> ammalian <b>t</b> arget <b>o</b> f rapamycin <i>Ziel von Rapamycin in Säugetieren</i>
MS	<b>M</b> assenspektrometrie
MSA	<b>M</b> ulti- <b>S</b> ystem- <b>A</b> trophie
NAC	<b>N</b> on- <b>A</b> myloid <b>C</b> omponent of plaques <i>Nicht amyloidartige Komponente aus Ablagerungen</i>
NEM	<b>N</b> - <b>E</b> thyl <b>m</b> aleimid
NF-κB	<b>N</b> ukleärer <b>F</b> aktor- <b>κ</b> <b>B</b>
NP-40	<b>N</b> onidet <b>P</b> - <b>40</b>
N-Terminus	<b>A</b> mino- <b>T</b> erminus eines Proteins oder Peptids

## Abkürzungsverzeichnis

OA	<b>O</b> cadaic <b>A</b> cid <i>Okadasäure</i>
OD	<b>O</b> ptische <b>D</b> ichte
6-OHDA	<b>6-Hydroxy Dopamin</b>
ORF	<b>O</b> pen reading frame <i>Offenes Leseraster</i>
PAGE	<b>P</b> olyacrylamid <b>G</b> eleelektrophorese
Pael-R	<b>P</b> arkin-assoziierter endothelinartiger <b>R</b> ezeptor
PBS	<b>P</b> hosphate <b>B</b> uffered <b>S</b> aline <i>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung</i>
PCR	<b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction <i>Polymerasekettenreaktion</i>
PDK1	<b>P</b> hosphatidylinositol- <b>d</b> ependent <b>k</b> inase1 <i>Phosphatidylinositol abhängige Kinase</i>
PET	<b>P</b> ositron <b>E</b> missionstomographie
PH	<b>P</b> leckstrin <b>H</b> omologie
PHLPP	<b>P</b> H-Domäne <b>L</b> eucin-reiche <b>P</b> rotein <b>P</b> hosphatase
PIAS	<b>P</b> roteininhibitoren von aktiviertem <b>S</b> TAT
PI-3K	<b>P</b> hosphatidylinositol- <b>3</b> <b>K</b> inase
PI-4,5-P2	<b>P</b> hosphatidylinositol(bis)phosphat
PI-3,4,5-P3	<b>P</b> hosphatidylinositol(tris)phosphat
PK	<b>P</b> arkinsonsche <b>K</b> rkrankheit
PKA	<b>P</b> roteinkinase <b>A</b>
PKB/Akt	<b>P</b> roteinkinase <b>B</b>
PKC	<b>P</b> roteinkinase <b>C</b>
PP2A	<b>P</b> rotein <b>P</b> hosphatase <b>2A</b>
Prx	<b>P</b> eroxiredoxin
PSF	<b>P</b> yrimidin tract-Bindungsprotein assoziierter <b>S</b> plicingfaktor
PSP	<b>P</b> rogressive supranuclear <b>p</b> alsy <i>Progressive supranukleäre Blickparese</i>
PTEN	<b>P</b> hosphatase und <b>t</b> ensin homologer Tumorsuppressor
PTP	<b>P</b> hosphotyrosinphosphatasen
PVDF	<b>P</b> oly(vinyliden <b>d</b> ifluoride)
PI3K	<b>P</b> hosphatidylinositol <b>3-K</b> inase
PINK-1	<b>P</b> TEN- <b>i</b> nduzierte <b>K</b> inase 1
REV	<b>R</b> everse <i>Rückwärtsprimer</i>
Rictor	<b>R</b> apamycin- <b>i</b> nsensitive companion of <b>m</b> TOR <i>Rapamycin insensitiver Partner von mTOR</i>
RING	<b>R</b> eally interesting new gene
RNA	<b>R</b> ibonucleic acid <i>Ribonukleinsäure</i>
RNAi	<b>R</b> NA- <b>I</b> nterferenz
ROC	<b>R</b> as of complex protein
ROS	<b>R</b> eactive <b>o</b> xxygen <b>s</b> pecies <i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>
RT	<b>R</b> everse <b>T</b> ranskriptase
SDS	<b>S</b> odiumdodecylsulfat <i>Natriumdodecylsulfat</i>
siRNA	<b>S</b> mall interfering <b>R</b> NA

## Abkürzungsverzeichnis

SNpc	Substantia Nigra <b>p</b> ars <b>c</b> ompacta
SOD	Superoxid- <b>D</b> ismutase
STAT	<b>S</b> ignaltransduktor und <b>A</b> ktivator der <b>T</b> ranskription
SUMO	<b>S</b> mall <b>u</b> biquitin-like <b>m</b> odifier <i>Kleiner ubiquitinartiger Modifikator</i>
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TBST	<b>T</b> ris <b>B</b> uffered <b>S</b> aline containing <b>T</b> ween 20 <i>Tris-gepufferte Kochsalzlösung supplementiert mit Tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'- <b>T</b> etramethylethylendi <b>a</b> min
TH	<b>T</b> yrosin <b>H</b> ydroxylase
Tris	<b>T</b> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	<b>T</b> hioredoxin
TUDCA	<b>T</b> auroursodeoxycholic <b>a</b> cid
UCH-L1	<b>U</b> biquitin <b>C</b> arboxy-terminale <b>H</b> ydrolase L1
UBL	<b>U</b> biquitin like <i>Ubiquitinähnlich</i>
UPD	<b>U</b> nique <b>p</b> arkin <b>d</b> omain <i>Einzigartige Parkin-Domäne</i>
U/min	<b>U</b> mdrehung/ <b>M</b> inute
U/ $\mu$ l	<b>U</b> nits/ <b>M</b> ikroliter
UPS	<b>U</b> biquitin- <b>P</b> roteasom- <b>S</b> ystem
VTA	<b>V</b> entrales <b>t</b> egmentales <b>A</b> real
WB	<b>W</b> estern <b>B</b> lot
wt	<b>W</b> ildtyp
Y2H	<b>Y</b> east <b>2</b> - <b>H</b> ybrid <i>Hefe-2-Hybrid</i>
ZT	<b>Z</b> immertemperatur

<i>Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Einbuchstabencode</i>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
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

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>14</b>
<i>1.1 Allgemeine Einführung in die Parkinsonsche Krankheit (PK).....</i>	<i>14</i>
<i>1.2 Neuropathologische Charakteristika der PK.....</i>	<i>17</i>
<i>1.3 Parkinson assoziierte Gene .....</i>	<i>18</i>
1.3.1 Dominante Gene.....	21
1.3.1.1 $\alpha$ -SYNUCLEIN .....	21
1.3.1.2 LRRK-2.....	22
1.3.2 Rezessive Gene.....	23
1.3.2.1 Parkin.....	23
1.3.2.2 UCH-L1 .....	25
1.3.2.3 DJ-1.....	25
1.3.2.4 PINK-1 .....	25
<i>1.4 Vermutete zelluläre Mechanismen bei der PK.....</i>	<i>26</i>
1.4.1 Oxidativer Stress .....	26
1.4.1.1 Einfluss von ROS auf Signaltransduktion.....	26
1.4.1.2 Mitochondriale Dysfunktion und Tiermodelle .....	30
1.4.2 Proteasomale Fehlfunktion .....	31
<i>1.5 Das PARK7-Gen DJ-1.....</i>	<i>32</i>
1.5.1 Mutationen und Polymorphismen im DJ-1 Gen .....	33
1.5.2 Die DJ-1-Superfamilie strukturverwandter Proteine .....	34
1.5.3 Struktur des DJ-1-Proteins und seiner Strukturhomologen .....	35
1.5.4 Neuropathologie von DJ-1 .....	38
1.5.5 Funktion von DJ-1 .....	39
1.5.6 DJ-1 Knock-out-Tiermodelle .....	43
<b>2. Ziele der Doktorarbeit .....</b>	<b>46</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>48</b>
<i>3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>48</i>
3.1.1 Molekularbiologie .....	48
3.1.2 Zellkultur.....	48

3.1.3 Proteinbiochemie .....	48
3.2 <i>Chemikalien und Lösungen</i> .....	49
3.2.1 Molekularbiologie.....	49
3.2.2 Zellkultur .....	50
3.2.3 Proteinbiochemie .....	51
3.3 <i>Antikörper (AK)</i> .....	53
3.4 <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	54
3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	54
3.4.2 Agarosegel-Elektrophorese .....	55
3.4.3 Isolierung und Aufreinigung der DNA-Fragmente .....	55
3.4.4 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen .....	55
3.4.5 Ligation der DNA in entsprechende Plasmide .....	55
3.4.6 Herstellung des kompetenten Bakterienstamms DH5 $\alpha$ .....	56
3.4.7 Transformation des Ligationsprodukts in kompetente <i>E. coli</i> .....	56
3.4.8 Glycerinstocks von Bakterienklonen .....	56
3.4.9 DNA-Isolierung aus Bakterienklonen in einer Minipräparation und anschließende Analyse.....	56
3.4.10 Maxipräparation von positiven Bakterienklonen.....	57
3.4.11 Gerichtete Mutagenese.....	57
3.4.11.1 C-terminal V5-markierte DJ-1 Mutanten .....	57
3.4.11.2 N-terminal Myc-markierte DJ-1-Mutanten .....	59
3.4.12 RNA-Isolation und RT-PCR .....	61
3.4.12.1 RNA-Extraktion nach der Trizolmethode .....	61
3.4.12.2 Allgemeine Beschreibung der Reversen Transkriptase (RT)-PCR.....	61
3.4.12.3 Allgemeine Beschreibung der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) .....	61
3.4.13 DNA Isolierung aus Gewebe und Zellen zur Genotypisierung .....	62
3.4.14 Genotypisierung von DNA-Proben aus DJ-1 Knock-out-Mäusen .....	62
3.5 <i>Zellkultur</i> .....	63
3.5.1 Kultivierung von Zellen .....	63
3.5.2 Poly-L-Lysin-beschichtete Zellkulturschalen .....	65
3.5.3 Transiente Transfektion von Zellen mit Lipofectamin 2000.....	65
3.5.4 Stabile Transfektion von HEK 293E- und MN9D-Zellen .....	65
3.5.5 Zelllyse zur Proteinisolation.....	66

3.5.6 Stabiler und transienter Knock-down von DJ-1 mit Hilfe von siRNA (short interfering RNA) .....	66
3.5.7 Anlegen und Immortalisieren von MEF-Zellkulturen.....	67
3.5.8 Lentivirale Transduktion von MEF-Zellen .....	68
3.6 <i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....	68
3.6.1 Allgemeine Methoden.....	68
3.6.1.1 Proteinkonzentration nach Bradford .....	68
3.6.1.2 Proteinkonzentration nach dem Bicinchoninic Acid Assay (BCA) .....	69
3.6.1.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	69
3.6.1.4 Western Blot Analyse .....	71
3.6.1.5 „Strippen“ von Western Blots .....	71
3.6.1.6 Antikörper .....	72
3.6.1.7 Coomassie-Blaufärbung von Polyacrylamid-Gelen .....	72
3.6.1.8 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen.....	72
3.6.1.9 Ponceau S-Färbung von Western Blots .....	72
3.6.1.10 Analyse radioaktiv markierter Proteine .....	72
3.6.1.11 Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine.....	73
3.6.1.12 Immunpräzipitation (IP).....	73
3.6.2 Stabilitätsstudien der DJ-1-Mutanten .....	74
3.6.2.1 Metabolische Markierung von DJ-1-Mutanten („Pulse-Chase“-Experimente).....	74
3.6.2.2 Inhibitorexperimente für die Proteinsynthese und den Proteinabbau von DJ-1 .....	75
3.6.3 Expressionsmuster und Lokalisationsstudien von DJ-1 .....	75
3.6.3.1 IF-Studien zur Lokalisation von DJ-1 in Zellen.....	75
3.6.3.2 Expressionsmuster in Organen und Hirnregionen der Maus.....	76
3.6.4 Funktionelle Studien von DJ-1.....	76
3.6.4.1 Proteaseinhibitoren und lysosomale Inhibition von DJ-1 .....	76
3.6.4.2 Zytotoxizitätsstudien von DJ-1 in Zellen unter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Einfluss .....	77
3.6.4.3 Akt Phosphorylierung .....	77
3.6.4.4 Ask-1 Immunokomplex-Kinase-Assay .....	78
3.6.4.5 Sumoylierungsstudien von DJ-1.....	78
3.6.5 Biophysikalische Untersuchungen von DJ-1 .....	79

3.6.5.1 Expression und Reinigung von DJ-1 in <i>E. coli</i> .....	79
3.6.5.2 Qualitätskontrolle der rekombinanten Proteine durch Elektrospray- Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	81
3.6.5.3 CD-Messungen .....	81
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>82</b>
4.1 <i>Expressionsmuster von DJ-1 in vivo</i> .....	82
4.1.1 DJ-1-AK.....	82
4.1.2 Immunfluoreszenzstudien zur Lokalisation von DJ-1 in verschiedenen Zellkompartimenten.....	84
4.1.3 Expression von DJ-1 in der Zelle .....	86
4.1.4 Expressionsmuster von DJ-1 in Organen der Maus.....	87
4.2 <i>Stabilitätsstudien von DJ-1 und seinen Mutanten</i> .....	88
4.2.1 Expression von DJ-1 und seinen pathogenen Mutanten in verschiedenen Zelllinien .....	88
4.2.2 RT-PCR von [wt]DJ-1/V5 und den Mutanten [L166P]DJ-1/V5 und [E64D]DJ- 1/V5 .....	91
4.2.3 Inhibition der Synthese von DJ-1 mit Cycloheximid (CHX).....	91
4.2.4 „Pulse-Chase“-Experimente zur Bestimmung des Umsatzes von [wt]DJ-1 und seinen Mutanten .....	92
4.2.5 Inhibition des proteasomalen oder proteolytischen Abbaus von DJ-1 .....	93
4.2.5.1 Untersuchungen mit dem Proteasomhemmer MG132 .....	94
4.2.5.2 Proteaseinhibitoren Leupeptin und E64 .....	95
4.2.5.3 Lysosomale Inhibition mit NH <sub>4</sub> Cl .....	96
4.2.5.4 Autoproteolytischer Abbauweg von DJ-1 .....	97
4.3 <i>Mutagenesestudien von DJ-1 C-terminalen Mutanten im Zellkultursystem</i> .....	99
4.3.1 Design von DJ-1 C-terminalen Mutanten .....	100
4.3.2 “Steady state” und “Pulse-Chase“-Experimente der C-terminalen DJ-1- Mutanten .....	101
4.3.3 Inhibitorexperimente zur Blockierung des Proteasoms .....	106
4.3.3.1 Hemmung des Proteasoms mit Epoxomycin.....	106
4.3.4 Quantitative und semiquantitative RT-PCR Studien der DJ-1 C-terminalen Mutanten .....	108

4.3.5 Dimerbildung der DJ-1 C-terminalen Mutanten .....	109
4.4 Herstellung einer DJ-1 Knock-out-Zelllinie für funktionelle Studien.....	110
4.4.1 Knock-down von endogenem DJ-1 im Zellkultursystem .....	111
4.4.2 DJ-1 GeneTrap ES-Zellen.....	113
4.4.3 Expression von DJ-1 in DJ-1 Knock-out-Mäusen .....	115
4.4.4 Herstellung von MEF-Zellen aus DJ-1 Knock-out-Mäusen .....	116
4.5 Funktionelle Studien von DJ-1.....	118
4.5.1 Effekte von DJ-1 auf H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Zytotoxizität .....	118
4.5.2 Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden nach oxidativer Stressinduktion .....	121
4.5.3 Sumoylierung von DJ-1 .....	126
4.6 Biophysikalische Untersuchungen von DJ-1 .....	128
4.6.1 Bakterielle Expression von DJ-1-Protein.....	129
4.6.2 Messung der Sekundärstrukturelemente von DJ-1 mittels CD-Spektroskopie.	131
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>134</b>
5.1 Charakterisierung des DJ-1-Proteins und seiner Mutanten .....	134
5.2 Strukturelle Besonderheiten des DJ-1-Proteins und seiner C-terminalen Mutanten .....	137
5.3 Stabilität der C-terminalen DJ-1-Mutanten .....	138
5.4 Abbaumechanismen des DJ-1-Proteins.....	141
5.5 Dimerbildung von [wt]DJ-1 und seinen Mutanten .....	145
5.6 Funktion von DJ-1 in verschiedenen subzellulären Bereichen.....	146
5.6.1 Zytoplasmatische Funktion von DJ-1 .....	146
5.6.1.1 Funktion von DJ-1 in der oxidativen Stressantwort .....	146
5.6.1.2 Einfluss von ROS in der antioxidativen Verteidigung und der Signaltransduktion.....	147
5.6.1.3 DJ-1 als antioxidatives Protein oder Intermediat in Signal- transduktionskaskaden.....	153
5.6.2 Funktion von DJ-1 im Zellkern .....	158
5.6.3 Mitochondriale Funktion von DJ-1 .....	160

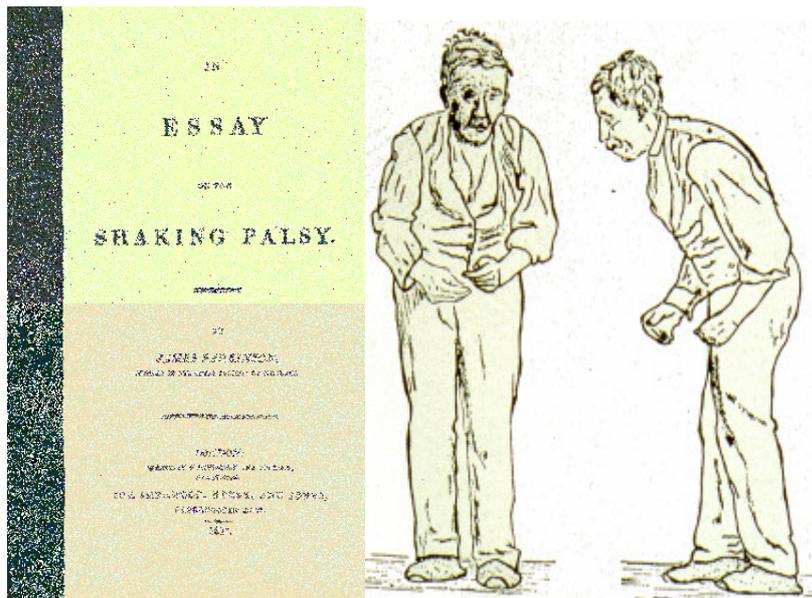
*5.7 Relevanz der Charakterisierung von DJ-1 für die PK und andere Erkrankungen . 162*

<b>6. Ausblick .....</b>	<b>165</b>
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>168</b>
<b>8. Literatur .....</b>	<b>170</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>181</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>182</b>
<b>Anhang: Publikationen .....</b>	<b>183</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung in die Parkinsonsche Krankheit (PK)

1817 beschrieb James Parkinson, ein britischer Arzt, erstmals in seinem „Essay on the Shaking Palsy“ (Abhandlung über die Schüttellähmung) einen Patienten, der die typischen klinischen Symptome zeigte, die aus einer Reihe primärer motorischer Störungen bestehen, die mit der PK einhergehen (vgl. Abbildung 1).



**Abbildung 1: Erste Dokumentation der Symptome eines Parkinson Patienten durch James Parkinson**

Die erste Dokumentation über einen Parkinson-Patienten „Essay on the Shaking Palsy“ geschrieben von James Parkinson, 1817.

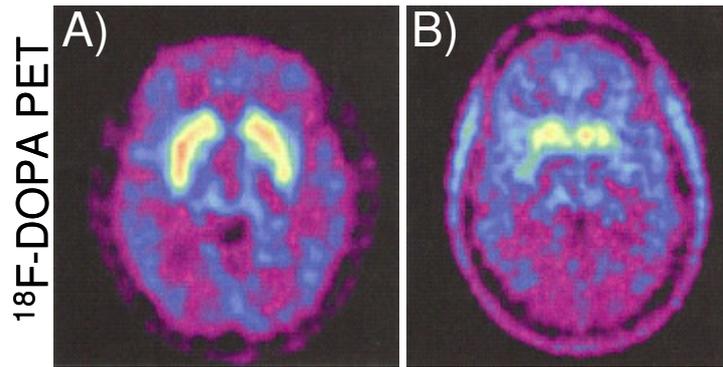
Die Krankheit beginnt schleichend und weitgehend unspezifisch. Oft fängt es mit Schulter- oder Nackenschmerzen an. Depressive Verstimmungen sind auch ein häufiges Anfangssyndrom. Die Auswirkung der Krankheit zeigt sich in Bewegungsstörungen bis hin zur kompletten Bewegungslosigkeit. Die Kardinalsymptome 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).

Die PK beginnt im allgemeinen im Alter zwischen 40 und 70 Jahren. In den westlichen Ländern leidet ungefähr 1% der 65jährigen an der PK, die Erkrankungshäufigkeit steigt mit zunehmendem Alter. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (ca. 3:2) (Nussbaum et al., 2003); (Dawson et al., 2003). Somit ist die PK die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimerschen Krankheit.

## Einleitung

Nur etwa 10% der PK-Fälle sind monogen vererbt (Dauer et al., 2003). Der Rest ist zurückzuführen auf genetische Risikofaktoren, Umwelteinflüsse, oder Toxine wie z.B. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), ein Nebenprodukt bei der Synthese einer heroинartigen Designerdroge, Paraquat, ein Herbizid oder Rotenon, ein Insektizid (Lang et al., 1998a; Lang et al., 1998b). Lange glaubte man, dass die PK nicht genetisch bedingt sei, da die meisten Fälle sporadisch auftraten. Daher konzentrierte sich die experimentelle PK-Forschung anfangs auf Toxin-induzierte Tier- und Zellkulturmodelle, die die typischen neuropathologischen Merkmale der PK hervorrufen konnten. Die vier bekannten Toxin-Modelle sind 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), MPTP, Paraquat und Rotenon und werden unter Kapitel 1.4.1.2 genauer beschrieben. Erst die Ergebnisse von Zwillingsstudien eineiiger und zweieiiger Zwillinge zeigten, dass bei Patienten, bei denen die Krankheit unter 50 Jahre auftritt, eineiige Zwillinge eine höhere Konkordanzrate zeigten als zweieiige. Obwohl die PK eine Alterserkrankung ist, gibt es durchaus auch Fälle von juvenilem (<20 Jahre) oder früh beginnendem Parkinson (30-40 Jahre). Diese Formen sind meist erblich bedingt (Nussbaum et al., 2003; Pankratz et al., 2004).

Die Ursachen für die Erkrankung sind noch nicht vollständig verstanden. Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra pars compacta (SNpc) und Störung der nigrostriatalen Verbindung sind verantwortlich für die lokomotorischen Symptome der PK. Klinisch wird die klassische PK als Krankheit beschrieben, die oben genannte Symptome aufweist und eine verminderte Dopaminkonzentration im Striatum zeigt. Dieser Verlust an dopaminergen Neuronen kann in bildgebenden Verfahren wie der Positron Emissionstomographie (PET) gezeigt werden. Dabei wird die Dopamintransporterdichte durch die Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -Dopa gemessen und je nach Stärke der radioaktiven Strahlung die Regionen des Hirns in unterschiedlichen Farbabstufungen dargestellt (vgl. Abbildung 2).



**Abbildung 2: PET Abbildung des Hirns eines Parkinsonpatienten im Vergleich zu einem Kontrollhirn**

A) Kontrollhirn eines gesunden Patienten mit regelrechter Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -Dopa im Striatum (starke Gelbfärbung) B) Hirn eines Parkinsonpatienten mit verminderter Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -Dopa im Striatum (verminderte Gelbfärbung) (Dekker et al., 2004).

Die endgültige Diagnose kann aber erst post-mortem vorgenommen werden. Die neuropathologischen Charakteristika sind zusätzlich zum Verlust der dopaminergen Neurone in der SNpc so genannte Lewy-Körperchen (LK). Diese neuronalen Einschlüsse wurden von Friedrich Lewy 1912 erstmals beschrieben (Forman et al., 2005) und bestehen aus aggregierten, unlöslichen Proteinen sowie Lipidbestandteilen. Die genauen molekularen und zellulären Mechanismen der Pathogenese liegen aber weitgehend im Unklaren.

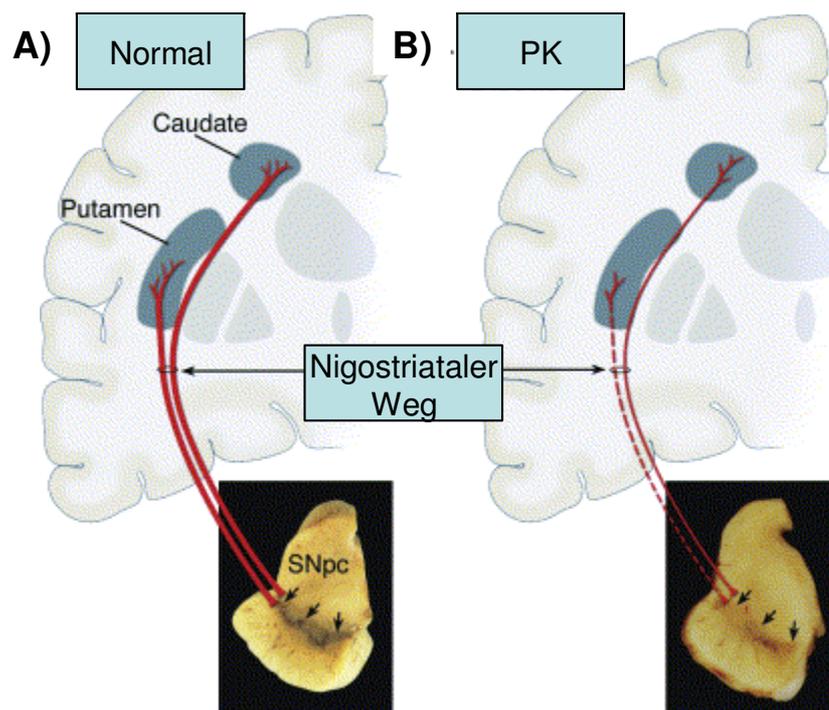
Eine ätiologische Einteilung der bekannten Parkinsonfälle erfolgt folgendermaßen: 1.) sporadische bzw. idiopathische, 2.) familiäre und 3.) sekundäre Parkinsonfälle. 80% der Parkinsonfälle sind idiopathische Fälle wie von James Parkinson beschrieben. Familiäre Parkinsonfälle, die erblich bedingt sind, treten dagegen seltener auf. Sekundärer Parkinson wird durch Toxine, Medikamente, Tumoren, Traumata, Durchblutungsstörungen oder Infektionen hervorgerufen (Dauer et al., 2003).

Die Therapiemöglichkeiten von Parkinsonpatienten beschränken sich auf eine Linderung der langsam fortschreitenden Krankheit. Eine ursächliche Heilung ist jedoch heute nicht möglich. Die häufig angewandte medikamentöse Therapie besteht im Wesentlichen darin, steigende Konzentrationen von L-Dopa, einer Vorstufe der Dopaminbiosynthese, zu verabreichen. Damit soll der Verlust des Neurotransmitters Dopamin ausgeglichen werden und die Kardinalsymptome gelindert werden. Diese Methode wird vor allen Dingen bei Patienten über 70 Jahren angewandt. Bei jüngeren Patienten verabreicht man sogenannte Dopamin-Agonisten, für die mehr Bindungsstellen für Dopamin im Gehirn zur Verfügung stehen (Djaldetti et al., 2002). Wenn diese Behandlung versagt kombiniert man die Dopamin-Agonisten mit Hemmstoffe von Enzymen, die den Abbau von Dopamin hemmen

wie zum Beispiel Cathechol-O-Methyltransferase (COMT)-Hemmer oder Monoaminoxidase (MAO)-B-Hemmer. Chirurgische Eingriffe erfolgen nur, wenn die medikamentösen Verfahren nicht mehr greifen oder wenn erhöhter Tremor vorliegt, der anders nicht behandelt werden kann. Die tiefe Hirnstimulation beruht auf Einsatz von Elektroden, die im Nucleus subthalamicus oder Globus pallidus des Gehirns eines Parkinsonpatienten eingeführt werden und zur Stimulation der Neurotransmitter angeschaltet sind (Volkman, 2004).

## 1.2 Neuropathologische Charakteristika der PK

Die pathologischen Merkmale der PK sind zum einen der Verlust nigrostriataler dopaminerger Neurone sowie das Auftreten von intraneuronalen zytoplasmatischen proteinhaltigen Einschlüssen, LK. Die Nervenbahnen von der SNpc zum Putamen sind stark gestört und die Nervenendigungen degenerieren im Laufe der Zeit immer weiter (vgl. Abbildung 3).



**Abbildung 3: Neuropathologie der PK**

Schematische Darstellung der A) normalen nigrostriatalen Verbindung zwischen SNpc und dem Putamen bzw. Nucleus caudatus (dicke durchgehende Linie) und B) der degenerierten Projektion von Neuronen eines Parkinsonpatienten (gestrichelte Linie in rot) (Dauer et al., 2003).

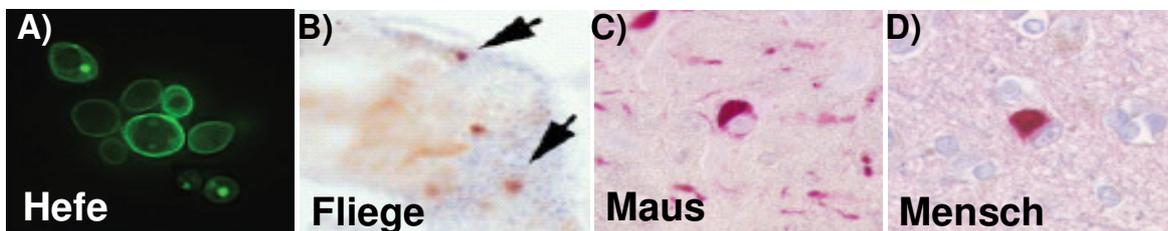
Die mesolimbischen dopaminergen Neurone, welche sich gegenüber der SNpc im ventralen tegmental Areal (VTA) befinden, sind weniger von dem Verlust der Neurone betroffen (Uhl et al., 1985).

## Einleitung

Das Schwinden der dopaminergen Neurone kann man unter anderem an der Depigmentierung der SNpc erkennen, die beim gesunden Menschen durch Neuromelanin schwarz gefärbt ist (Marsden, 1983) (vgl. Abbildung 3). Wenn die typischen Leitsymptome (vgl. Kapitel 1.1) im Patienten auftreten, sind normalerweise schon 60% der dopaminergen Neurone der SNpc degeneriert.

Es sind aber auch in anderen Hirnregionen Neurone durch das Fortschreiten der Krankheit betroffen. Nicht-dopaminerge Neurotransmitter, wie noradrenerge, serotonerge oder cholinerge Neurone sind in ihrem Wirkungsbereich gestört, aber diese Läsionen korrelieren klinisch gesehen nicht so stark mit lokomotorischen Symptomen wie der Verlust der dopaminergen Neurone in der SNpc (Dauer et al., 2003).

Ein zweites pathologisches Merkmal der PK sind die LK, die auch bei der LK-Variante der Alzheimerschen Krankheit und reiner LK-Demenz auftreten (Gibb et al., 1988). Diese eosinophilen, sphärischen Einschlüsse sind ca. 15µm groß, besitzen einen dichten Kern aus  $\alpha$ -Synuclein-Fibrillen und vielen weiteren Komponenten wie z. B. Ubiquitin, Hitzeschockproteinen und Neurofilamenten welche von einem blassen Halo begrenzt sind. LK können experimentell durch Überexpression von  $\alpha$ -Synuclein in verschiedensten Spezies induziert werden (vgl. Abbildung 4).



**Abbildung 4: Immunohistologie von LK und Lewy-Neuriten (LN) in verschiedenen Spezies**

Mikroskopische Bilder von Proteineinschlüssen in der A) Hefe (Outeiro et al., 2003), B) der Fliege (Feany et al., 2000), C) der Maus ) und D) dem Menschen (von M. Neumann, LMU München, zur Verfügung gestellt).

Die wichtigste pathophysiologische Auffälligkeit eines Parkinsonpatienten, nämlich oxidativ modifizierte Proteine und Lipide, die letztendlich zur Schädigung der Mitochondrien und damit zum Zelltod führen, werden im Kapitel 1.4 auf zellulärer Ebene näher ausgeführt.

### **1.3 Parkinson assoziierte Gene**

Ein Hauptrisikofaktor für die PK ist das Alter. Lange Zeit glaubte man, dass Umweltfaktoren als zweiter Risikofaktor eine große Rolle in der PK spielen (Dekker et al., 2003b). Die Genetik spielte eine untergeordnete Rolle. Allerdings bemerkte man dann,

## Einleitung

dass Parkinsonpatienten oftmals betroffene Verwandte hatten und in weiteren Studien wurden Familien identifiziert und charakterisiert, die eine Vererbung nach Mendel aufwiesen (Marder et al., 2003). Gezielte Suche in einzelnen betroffenen Familien, die an Parkinson leiden, ergab seit 1997 10 Gene, die mit der PK segregieren. Diese Gene sind in Tabelle 1 aufgeführt.

## Einleitung

Locus	Gen	Chromosom	Proteinfunktion	Vererbung	Referenz
PARK1	<i>α-SYNUCLEIN</i> <b>Punktmutation</b>	4q21	Stabilisierung und Freisetzung synaptischer Vesikel	dominant	(Polymeropoulos et al., 1997)
PARK2	<i>PARKIN</i>	6q25.2-27	Ubiquitin Ligase	rezessiv	(Kitada et al., 1998)
PARK3	?	2p13	?	dominant	(Gasser et al., 1998)
PARK4	<i>α-SYNUCLEIN</i> <b>genomische Multiplikationen</b>	4q21	Stabilisierung und Freisetzung synaptischer Vesikel	dominant	(Singleton et al., 2003)
PARK5	<i>UCH-L1</i>	4p14-15	Ubiquitin hydrolase/ligase	dominant	(Leroy et al., 1998)
PARK6	<i>PINK-1</i>	1p35-36	Mitochondriale Protein Kinase	rezessiv	(Valente et al., 2004)
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p36	Oxidative Stressantwort	rezessiv	(Bonifati et al., 2003a; Bonifati et al., 2003b; Bonifati et al., 2003c)
PARK8	<i>LRRK-2</i>	12p11.2-q13.1	Zytosolische Proteinkinase	dominant	(Paisan-Ruiz et al., 2005; Zimprich et al., 2004)
PARK10	?	1p32	?	dominant	(Hicks et al., 2002)
PARK11	<i>GIGYF2?</i>	2q34	Insulin Rezeptor Signaltransduktion?	dominant	(Pankratz et al., 2003)

**Tabelle 1: 10 bekannte Loci und Gene, die mit monogen vererbten PK assoziiert sind.**

Die 6 bekanntesten, mit der PK assoziierten Gene und deren Produkte,  $\alpha$ -Synuclein, Parkin, Ubiquitin Carboxyl-terminale Hydrolase-L1 (UCH-L1), PTEN-induzierte Kinase-1

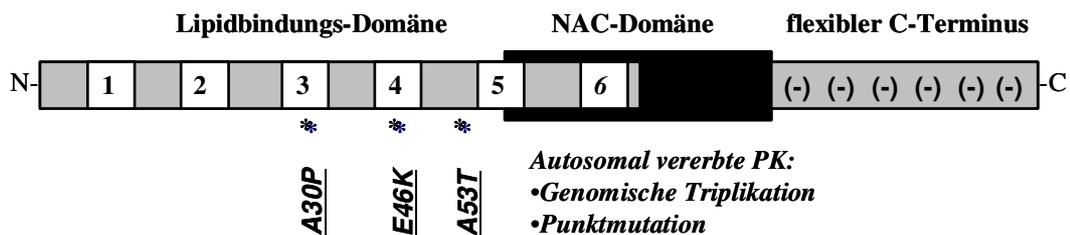
(PINK-1), DJ-1 und Leucin-reiche Repeat Kinase-2 (LRRK-2) werden nun kurz beschrieben.

### 1.3.1 Dominante Gene

#### 1.3.1.1 $\alpha$ -SYNUCLEIN

Das erste Gen, welches im Zusammenhang mit Parkinson gefunden wurde, war  $\alpha$ -SYNUCLEIN. 1997 identifizierten Polymeropoulos und Kollegen eine dominante Mutation im  $\alpha$ -SYNUCLEIN Gen, welche in einer kleinen Anzahl von griechisch-sizilianischen Familien auftrat, die A53T Mutante (Polymeropoulos et al., 1997).

Die Synucleine bilden eine Protein-Familie bestehend aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein.  $\alpha$ -Synuclein ist nativ ungefaltet, besitzt eine  $\alpha$ -helikale N-terminale Domäne (60 Aminosäuren (AS)), eine ungefaltete azide C-terminale Domäne (40 AS) und eine hydrophobe NAC-Domäne (non-amyloid component of plaques) (40 AS). Diese NAC-Domäne besitzt die Eigenschaft zu aggregieren (Bodles et al., 2004) (vgl. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des PARK1-Genprodukts  $\alpha$ -Synuclein**

Die einzelnen Domänen von  $\alpha$ -Synuclein sind hervorgehoben: Die N-terminale Lipidbindungs-Domäne mit 6 imperfekten Wiederholungen folgender AS: KTKEGV, die leicht aggregierbare NAC-Domäne und der flexible azide C-Terminus. Sterne markieren Punktmutationen, die mit der PK segregieren: A30P, E46K und A53T (Quelle: Kahle et al., 2002).

Eine monomere ungefaltete Struktur von  $\alpha$ -Synuclein in Lösung befindet sich im Gleichgewicht mit einer gefalteten, strukturierten Form von  $\alpha$ -Synuclein an Vesikeln (Nuscher et al., 2004). Dort bindet der  $\alpha$ -helikale N-Terminus inklusive der NAC-Domäne an die Vesikel, während der C-Terminus ungefaltet bleibt. Somit scheint  $\alpha$ -Synuclein beim Transport oder der Freisetzung von synaptischen Vesikeln im Gehirn involviert zu sein, wo es auch am meisten exprimiert wird (Abeliovich et al., 2000).

Wird das Gleichgewicht aber durch vermehrte Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein zu Oligomeren bzw. Protofibrillen und Fibrillen, einer Ansammlung von sehr unlöslichen Proteinpolymeren, gestört, können diese sich zu großen Proteineinschlüssen vereinigen, die

dann die LK bilden (Crowther et al., 2000). Diese sind typisch für die Parkinsonpathologie und andere so genannte  $\alpha$ -Synucleinopathien (Sampathu et al., 2003).

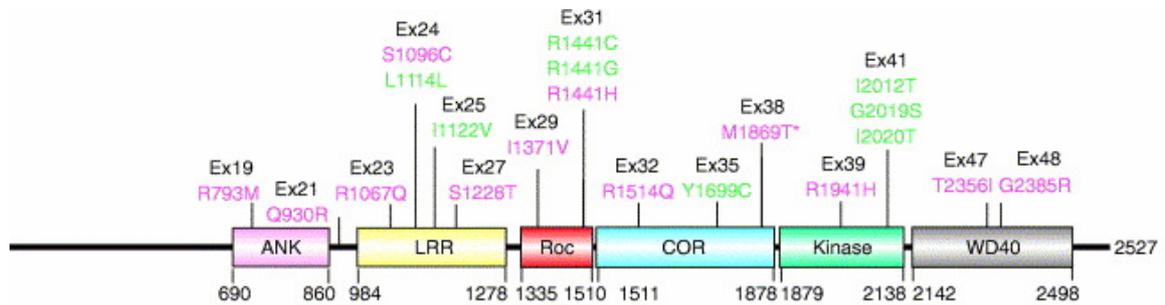
Die Fähigkeit zur Aggregation ist erhöht vor allem bei den 4 bekannten  $\alpha$ -Synuclein-Mutanten, die mit der PK assoziiert sind: A53T, E46K, A30P und genomische Multiplikationen des Wildtyps. Erhöhte Gendosis fördert wahrscheinlich die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein, welche ein sowohl konzentrations- als auch nukleationsabhängiger Prozess ist (Eriksen et al., 2003). Zusätzlich zu den bekannten Mutanten scheint auch eine erhöhte Phosphorylierung am Serin 129 in der C-terminalen Domäne von  $\alpha$ -Synuclein zu einer verstärkten Aggregation und Bildung von Fibrillen zu führen. Diese post-translationalen Modifikationen wurden in Hirnen von Parkinsonpatienten im größeren Maße festgestellt (Fujiwara et al., 2002).

Es ist stark umstritten, ob die zuerst geformten Oligomere, die Protofibrillen oder die sich später im Aggregationsprozess bildenden Fibrillen toxisch für die Zelle sind. Die Protofibrillen können ringförmige Strukturen bilden, die porenartige Eigenschaften haben und die Membranen von Vesikeln zerstören können (Volles et al., 2003), während die Bildung von LK und fibrillärem  $\alpha$ -Synuclein stark mit der PK assoziiert ist.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass  $\alpha$ -Synuclein in der Regulation von synaptischen Vesikeln eine Rolle spielen könnte und Hauptbestandteil der LK ist. Außerdem scheint  $\alpha$ -Synuclein zu Aggregation und Fibrillenbildung zu neigen, wenn entweder Mutationen vorliegen wie im Fall von [A53T]- und [E46K]- $\alpha$ -Synuclein oder post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen.

### **1.3.1.2 *LRRK-2***

LRRK-2, auch Dardarin genannt, ist erst kürzlich im Zusammenhang mit der PK entdeckt worden (Funayama et al., 2002; Paisan-Ruiz et al., 2005; Zimprich et al., 2004). *LRRK-2* ist ein aus 51 Exons bestehendes Gen, welches ein extrem großes Protein mit einer molekularen Masse von 286kDa codiert. Es besteht aus mehreren funktionellen Domänen: eine Ankyrin-Domäne, eine leucinreiche Wiederholung von AS, eine MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase), Roc (Ras in complex proteins), COR (C-terminal of Roc), und eine WD40 Domäne (Taylor et al., 2006) (vgl. Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des PARK8-Genprodukts LRRK-2**

Die einzelnen funktionellen Domänen des LRRK-2-Proteins sind farbig hervorgehoben: Ankyrin (ANK), Leucinreiche Wiederholung (LRR), Roc-, COR-, Kinase- und eine WD40-Domäne. Mutationen, die nachweislich mit der PK segregieren sind in pink hervorgehoben, mit grün sind Mutationen markiert, über die es noch keine Informationen gibt (Quelle: Taylor et al., 2006).

Es sind 19 verschiedene Mutationen bekannt, die autosomal-dominant vererbten Parkinson hervorrufen. Mutationen im *LRRK-2*-Gen sind die häufigsten in spät auftretenden familiären autosomal-dominanten Parkinsonfällen. Dabei ist die häufigste Aminosäuresubstitution die G2019S Mutation in der Kinasedomäne. Mutationen in der Kinasedomäne scheinen die Kinaseaktivität zu erhöhen (Gloeckner et al., 2006; West et al., 2005). Die physiologische Funktion von LRRK-2 und seine Rolle in der PK ist bisher völlig unklar. Patienten mit LRRK-2-Mutationen zeigen typische Symptome des idiopathischen Parkinson, die typischerweise erstmalig im Alter zwischen 50 und 60 Jahren auftreten. Die pathologischen Merkmale sind sehr unterschiedlich und uneinheitlich (Wszolek et al., 2004).

## 1.3.2 Rezessive Gene

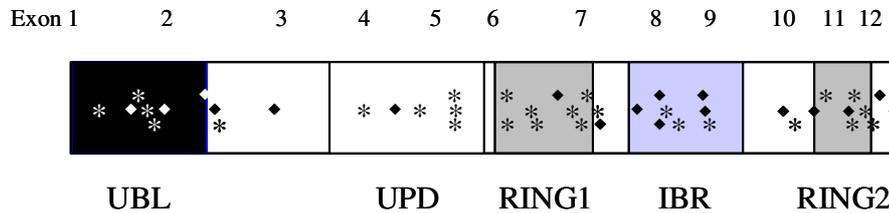
### 1.3.2.1 *Parkin*

Kitada und Kollegen identifizierten das erste rezessive Parkinsongen *PARKIN* (Kitada et al., 1998). Patienten mit einer der zahlreichen *Parkin*-Mutationen, die mit der PK assoziiert sind, können sehr jung sein, wenn die ersten Symptome auftauchen (<20 Jahre). *Parkin*-Mutationen sind weitaus die häufigsten Ursachen für familiären Parkinson (ca. 50%) (Lücking et al., 2000).

*Parkin* ist eine E3-Protein-Ubiquitin-Ligase (Shimura et al., 2000). Es wird vermutet, dass sie im proteasomalen Abbau von fehlgefalteten und beschädigten Proteinen involviert ist. E3-Ligasen binden Ketten aus Ubiquitinmolekülen, die über Lysine verbunden sind, an

## Einleitung

Zielproteine, welche dann vom Proteasom erkannt und abgebaut werden. Parkin enthält eine spezielle Anordnung von RING-Domänen, die eine Klasse von E3 Ligasen definiert, und eine ubiquitinähnliche Domäne (vgl. Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des PARK2-Genprodukts Parkin**

Parkin besteht aus einer ubiquitinähnlichen Domäne (UBL), einer einzigartigen Parkindomäne (UPD), zwei Ringfingerdomänen (RING1 und RING2) und einer Domäne zwischen den Ringfingern (IBR). Sterne und Rauten markieren Mutationen, die mit der PK einhergehen (Quelle: Kahle et al., 2004).

Der genaue Mechanismus, wie Parkin die Ubiquitinierung seiner Substrate vornimmt, ist nicht klar, was zum Teil daran liegt, dass die Struktur von Parkin noch nicht aufgeklärt ist (Cookson, 2005). Man kennt einige mögliche Substrate, die von Parkin erkannt und dann abgebaut werden, darunter synaptische Proteine 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  $\alpha$ -Synuclein dem Proteasom zuführt (Shimura et al., 2001), konnte nicht bestätigt werden.

Parkin bindet an das „Carboxy-terminale 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 (Przedborski, 2003).

Andere Substrate für Parkin wie CDCrel1 oder der Parkin-assoziierte endothelinartige Rezeptor (Pael-R) verursachen bei Überexpression Zelltod nigraler Neurone, wenn Parkinmutanten eingesetzt werden (Dong et al., 2003). Erstaunlicherweise fand man weder in Parkin<sup>-/-</sup>-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).

### **1.3.2.2 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 Ligaseaktivität und stützt damit die Vermutung, dass ein nicht intaktes proteasomales System für die PK kritisch ist (Dauer et al., 2003).

### **1.3.2.3 DJ-1**

DJ-1 codiert ein ubiquitär zytosolisch lokalisiertes, hoch konserviertes Protein, welches eine Rolle in unterschiedlichsten zellulären Mechanismen zu spielen scheint (Bandmann, 2004; Cookson, 2003b). Es gibt verschiedene Mutationen, die mit der PK assoziiert sind. Die beiden pathologisch gesehen aggressivsten Mutanten sind eine Deletion von Exon 1-5 (Dekker et al., 2003a) und die Punktmutation L166P (Bonifati et al., 2003a; Bonifati et al., 2003b). Beide Mutanten bewirken einen Funktionsverlust, der schlimme Auswirkungen für den Patienten hat und in den typischen Parkinsonsymptomen resultieren. DJ-1 scheint in der oxidativen Stressantwort eine entscheidende Rolle zu spielen und Zellen gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu schützen und damit Schädigungen der Mitochondrien abzuwehren (Canet-Aviles et al., 2004; Martinat et al., 2004; Moore et al., 2005). Eine ausführlichere Beschreibung von DJ-1 folgt in Kapitel 1.5.

### **1.3.2.4 PINK-1**

PINK-1 enthält eine Serin/Threonin-Kinasedomäne, ähnlich den  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin (CaM)-Kinasen (Valente et al., 2004). Die Aktivität der Kinase ist bisher experimentell nur autokatalytisch gezeigt worden (Beilina et al., 2005), es wurden bisher weder Substrate noch Interaktoren gefunden. PINK-1 besitzt zusätzlich ein N-terminales mitochondriales Lokalisationssignal und ist hauptsächlich in Mitochondrien zu finden (Valente et al., 2004). Es scheint Zellen vor Apoptose zu schützen, wenn man sie proteasomalen Inhibitoren oder oxidativem Stress aussetzt (MacKeigan et al., 2005; Petit et al., 2005). Rezessive Mutanten, welche in oder um die Kinasedomäne herum mutiert sind, haben keine Schutzfunktion. Dies konnte aber nur in Zellkultur gezeigt werden (Hatano et al.,

2004). *PINK-1* ist zusammen mit *DJ-1* das erste Gen, welches die PK in Zusammenhang mit mitochondrialen Schäden bzw. Schädigung von Zellen durch fehlenden Schutz vor oxidativem Stress bringt. *PINK-1* Knock-out-Fliegen zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie Parkin Knock-out-Fliegen, der auf Muskeldegeneration und Defiziten in der mitochondrialen Atmungskette zurückzuführen ist. Parkin Überexpression heilt den *PINK-1* Knock-out Phänotyp, allerdings nicht umgekehrt. Beide Proteine scheinen im selben Signalweg zu wirken, wobei *PINK-1* oberhalb von Parkin agiert (Clark et al., 2006; Park et al., 2006).

### **1.4 Vermutete zelluläre Mechanismen bei der PK**

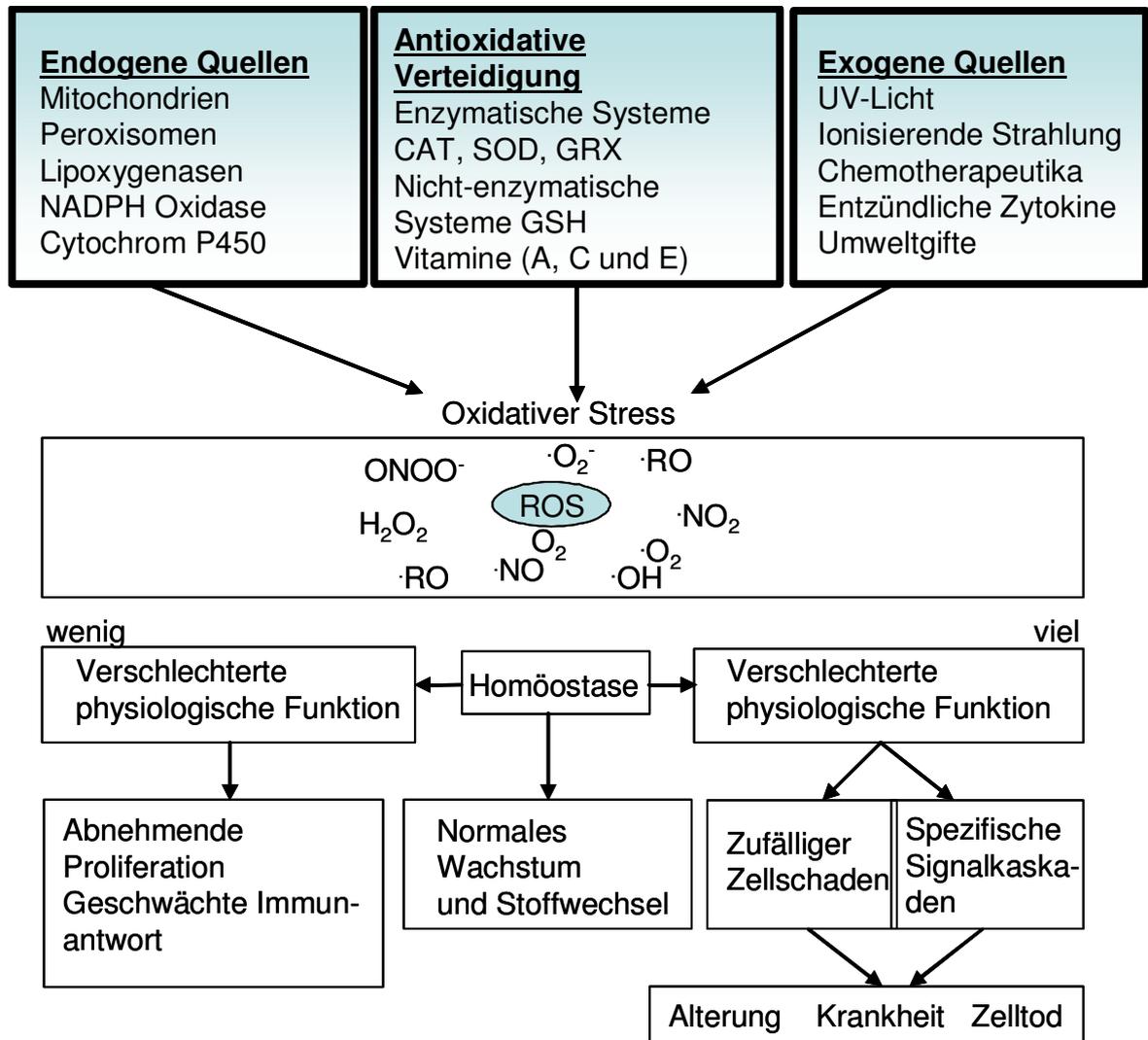
Die rezessiven Gene lassen einen mechanistischen Zusammenhang mit oxidativem Stress und dem UPS vermuten. Daher ist es wichtig diese molekularen Mechanismen genauer zu untersuchen, was im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

#### **1.4.1 Oxidativer Stress**

##### **1.4.1.1 Einfluss von ROS auf Signaltransduktion**

Bei der PK sind insbesondere die Mitochondrien, die eine der Hauptenergiequellen von Neuronen darstellen, erheblich in ihrer Funktion gestört (Jenner, 2003b). Dabei ist die Aktivität von Komplex I und III in der Atmungskette entscheidend verändert. Von Komplex I werden normalerweise zwei Elektronen über das Coenzym Q zum Komplex III übertragen. Dort werden die Elektronen weiter auf Cytochrom c transferiert und zum Komplex IV transportiert. Manchmal jedoch werden einzelne Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen und nicht wie vorgesehen auf Cytochrom c. Dabei entstehen extrem reaktive Sauerstoffradikale wie z. B. Superoxidradikalanionen ( $O_2^-$ ). ROS sind reaktive Sauerstoffspezies, die eine schädliche Form des Sauerstoffs darstellen. Zu den ROS gehören freie Radikale wie z. B. Superoxid-Radikale ( $O_2^-$ ), Hydroxyl-Radikale ( $HO^\cdot$ ), Peroxylradikal von Lipiden ( $LOO^\cdot$ ) und Alkoxyradikal von Lipiden ( $LO^\cdot$ ), stabile molekulare Oxidantien wie z. B. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Lipidhydroperoxid (LOOH), Ozon ( $O_3$ ) und die hypochlorige Säure ( $OCl$ ) und angeregte Sauerstoffmoleküle z. B. Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ). Diese können dann von einem Netzwerk aus antioxidativen Systemen wie z. B. Glutathion (GSH) und Glutathionperoxidasen (Grx), Katalasen (CAT) oder Superoxid-Dismutasen (SOD) eliminiert werden. Dabei steht die Bildung von ROS und die Vernichtung durch das Netzwerk aus antioxidativen Enzymen in einem sehr

sensiblen Gleichgewicht. Ist das sensible Gleichgewicht einmal durch eine Fehlfunktion gestört, kann das für die Zelle verheerende Folgen haben (Finkel et al., 2000) (vgl. Abbildung 8).



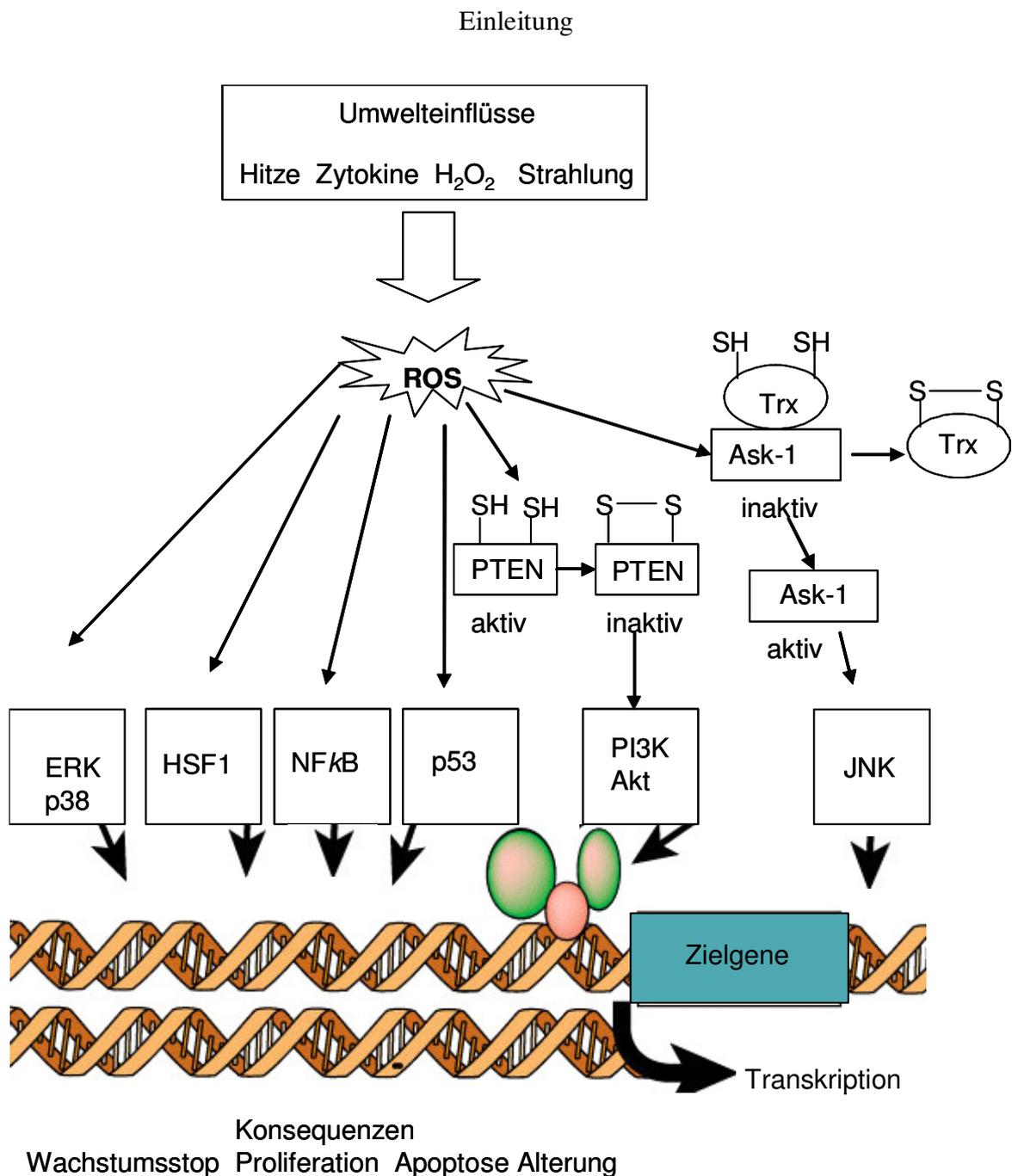
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Quelle oxidativen Stresses und der zellulären Antwort der Zelle auf ROS**

ROS werden als Folge von intrazellulärem Metabolismus in Mitochondrien und Peroxisomen genauso wie von verschiedenen zytosolischen Enzymsystemen generiert. Dazu kommen noch eine Anzahl von externen Agenzien, die die ROS-Produktion bewirken können. Ein sehr sensibles System aus enzymatischen und nicht-enzymatischen antioxidativen Verteidigungssystemen reguliert den ROS-Spiegel und hält die physiologische Homöostase aufrecht. Bei geringen ROS-Mengen kann es zu Störungen bei der Proliferation und Verteidigung von Fremdkörpern kommen, bei zu hohem Anteil an oxidativen Spezies kann es zu einer beschleunigten Alterung oder Zelltod kommen.

Die oxidative Polymerisierung von Dopamin zu Neuromelanin macht die SNpc zu einer Region im Gehirn, die erhöhtem oxidativem Basalstress ausgesetzt ist. In post-mortem-Studien von Parkinsonpatienten wurde anhand der Detektion von durch Oxidation modifizierte Lipide, Proteine und DNA (Jenner, 2003b; Jenner et al., 1998) eine Erhöhung

## Einleitung

dieses Basalstresses in der SNpc gemessen. Dieser oxidative Stress scheint zumindest mitverantwortlich für das Sterben der dopaminergen Neurone in dieser Hirnregion zu sein. Ob dies die Ursache oder Folge von anderen Prozessen ist, ist noch unklar. Tatsache ist, dass in der SNpc der Parkinsonpatienten ein reduzierter Anteil des antioxidativem GSH, sowie aufgrund von mitochondrialen Fehlfunktionen auch ein erhöhter Anteil von ROS zu finden ist (Pearce et al., 1997). ROS müssen nicht immer schädlich oder tödlich für die Zelle sein. Die ROS-Produktion ist zum Beispiel wichtig für die Phagozytose von schädlichen Eindringlingen. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in verschiedenen Signalkaskaden. Bei der Stimulation von Zellen durch Wachstumsfaktoren wie z. B. Insulin wird zytosolisches ROS gebildet (Seo et al., 2005). Dies wiederum ist involviert in komplexe Phosphorylierungskaskaden, wie z. B. drei mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) Signalkaskaden (extrazelluläre Signal-regulierende Kinase (ERK)), c-Jun N-Terminus-Kinase (JNK), p38<sup>MAPK</sup>, Akt sowie der Regulation des nuklearen Faktors-κB (NFκB) und Hitzeschock-Transkriptionsfaktors-1 (HSF-1), die letztendlich über zelluläres Überleben oder Tod entscheiden (Yoon et al., 2002) (vgl. Abbildung 9).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung von Signalwegen, die in Antwort auf oxidativen Stress hauptsächlich angeschaltet werden**

ROS, welches entweder außerhalb der Zelle produziert wurde oder intrazellulär in Antwort auf externe Stimuli, kann verschiedene Signalkaskaden indirekt über Akt und MAPK aktivieren und Transkriptionsfaktoren: HSF-1, NFκB und p53 direkt durch Phosphorylierung anschalten.

Oxidative Spezies scheinen den ERK- und Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg durch Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Viele Rezeptoren zeigten eine erhöhte Phosphorylierung nach direkter Behandlung mit oxidativen Agenzien (Wang et al., 2002). Es wird vermutet, dass Phosphatasen, die wichtig für die Dephosphorylierung von Wachstumsrezeptoren sind, durch Oxidation ihrer katalytischen Cysteine inaktiviert

werden, wie im Falle der Phosphatase und des tensin homologen Tumorsuppressors (PTEN) (vgl. Abbildung 9). Die Phosphatase PTEN ist ein direkter Gegenspieler von PI3K und somit ein wichtiger negativer Modulator des Akt-Signalwegs (Leslie et al., 2003).

Im Falle des JNK-Signaltransduktionsweges wird Apoptosesignal-regulierende Kinase-1 (Ask-1) durch Thioredoxin (Trx), ein Protein, welches den Redoxstatus der Zelle reguliert, gebunden und inaktiviert. Ask-1 ist ein oberhalb von JNK liegender Aktivator der anti-apoptotischen Kaskade (vgl. Abbildung 9). Bei steigendem oxidativem Stress wird Trx an freien Cysteinen oxidiert, der Komplex aus Ask-1 und Trx dissoziiert und setzt die katalytisch aktive, Apoptose-vermittelnde Kinase Ask-1 frei (Saitoh et al., 1998).

Diese feinregulierten und sensiblen Systeme können also schon bei kleinen Störungen aus dem Gleichgewicht geraten und zur Zerstörung von DNA, Lipiden und Proteinen führen. Dies wiederum beeinträchtigt die Mitochondrienfunktion und ruft noch mehr oxidativen Stress hervor, so dass ein „Teufelskreis“ entsteht (Stadtman, 1992).

### **1.4.1.2 Mitochondriale Dysfunktion und Tiermodelle**

Ein Hinweis, dass die intakte Funktion der Mitochondrien von großer Bedeutung ist, zeigen die mit Neurotoxinen wie 6-OHDA, MPTP, Rotenon und Paraquat behandelten Tiere, die ähnliche pathologische Veränderungen zeigen wie im idiopathischen PK beim Menschen. Diese Toxin-behandelten Tiermodelle werden nun im Folgenden beschrieben:

6-OHDA, ein Derivat des Dopamins, war das erste chemische Agens, welches neurotoxische Effekte auf catecholaminerge Nervenbahnen hervorrief (Jonsson et al., 1975; Sachs et al., 1975). Es wurde ein hoher Verlust von Dopamin im Striatum (80-90%) durch direkte Injektion von 6-OHDA erzielt sowie spezifische motorische Defizite bei den Tieren festgestellt (Betarbet et al., 2002). Charakteristische LK wurden nicht gefunden. Das Toxin reichert sich selektiv in dopaminergen Neuronen an und führt zum Zelltod, vermutlich herbeigeführt durch oxidativen Stress und dessen Folgeerscheinungen und Fehlfunktion der Mitochondrien (Hastings et al., 1996). Dieses Toxinmodell wird häufig für pharmakologische Screens verwendet.

Das erste Neurotoxin, welches im Menschen typische Parkinsonsymptome hervorrief, war ein Nebenprodukt einer heroartigen Designerdroge, MPTP, welche ein Inhibitor des Komplexes I der Atmungskette ist (Bloem et al., 1990). MPTP selbst ist nicht toxisch, aber es kann leicht über die Blut-Hirnschranke ins Hirn gelangen und wird dort metabolisch zu einem sehr viel aktiveren Toxin, 1-Methyl-4-phenylpyridinium-Ion (MPP<sup>+</sup>), umgewandelt. MPP<sup>+</sup> ist ein Substrat für den Dopamintransporter, wird somit in dopaminerge Neurone

transportiert und blockiert dort die Atmungskette (Greenamyre et al., 2001). Dieses Toxin ist in der Lage auch im Tiermodell (Mäuse, Katzen und Primaten) Parkinsonsyndrome als Folge von nigrostriataler dopaminerger Degeneration zu erzeugen, die ähnlich wie im sporadischen Parkinson sind und erfolgreich mit L-Dopa behandelt werden können (Langston et al., 1999). Auch hier, ähnlich wie bei 6-OHDA, ist keine LK-Pathologie vorhanden (Forno et al., 1986). Das MPTP-Modell repräsentiert das best-untersuchte Tiermodell für PK.

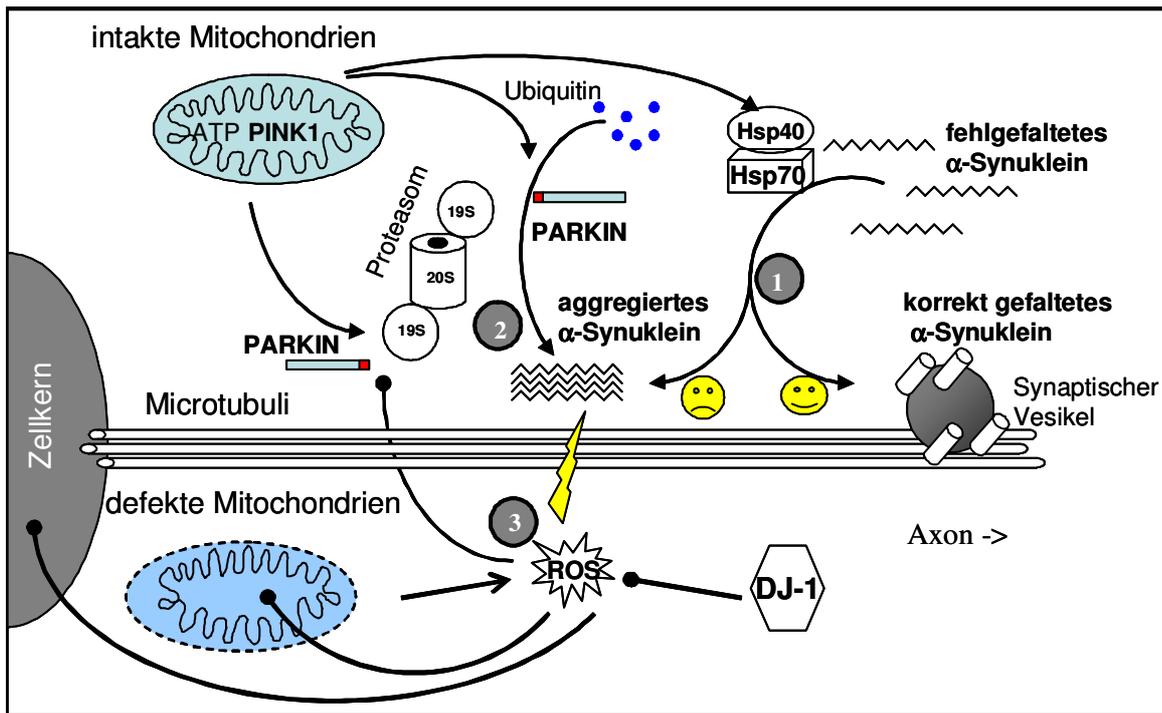
Die beiden Umweltgifte Rotenon, ein Herbizid, und Paraquat, ein Insektizid, sind ebenfalls Inhibitoren des Komplexes I der Atmungskette, was eine erhöhte Produktion von Superoxidradikalen und damit oxidativen Stress hervorruft (Day et al., 1999). Paraquat ist strukturell ähnlich zu  $MPP^+$ , sehr hydrophil und scheint nicht so leicht über die Blut-Hirnschranke ins Hirn zu gelangen, während Rotenon sehr lipophil ist und leicht ins Hirn gelangen kann, wo es an derselben Stelle am Komplex I der Atmungskette bindet wie  $MPP^+$  (Dauer et al., 2003). Sowohl Paraquat als auch Rotenon sind Risikofaktoren für PK (Liou et al., 1997). Beide Toxine führen in Mäusen und Ratten zu einer selektiven Degeneration nigrostriataler dopaminerger Neurone und  $\alpha$ -Synuclein-positiven Einschlüssen (Betarbet et al., 2000; McCormack et al., 2002).

### **1.4.2 Proteasomale Fehlfunktion**

Eine zweite Fehlfunktion, die mit dem erhöhten Sterben dopaminerger Neurone in Zusammenhang gebracht wurde, ist das gestörte Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Wenn das zentrale Abbausystem für zytosolische Proteine, das Proteasom nicht voll aktiv ist, sammeln sich eine Reihe toxischer oder fehlgefalteter Proteine an. Dies kann zu Aggregation von Proteinen führen welche zur LK-Bildung beitragen und im direkten Zusammenhang zur PK stehen.

Die Störung des proteasomalen Systems kann durch Mutationen in Parkinson-assoziierten Genen hervorgerufen werden wie z. B. im Falle der Parkin E3-Ligase, deren mutierte Formen fehlgefaltete Proteine nicht mehr ubiquitinylieren und somit nicht mehr dem Proteasom zuführen können (vgl. Kapitel 1.3.2.1). Zum anderen ist oxidativer Stress ein Faktor, der zu einer geringeren Aktivität des Proteasoms führen kann. Die Untereinheit PA700, der Aktivator des 26S Proteasoms, ist ein ATP-abhängiges Enzym. Wenn diese aber durch oxidative Schädigung oder Blockierungen innerhalb der Atmungskette ihr Membranpotential nicht mehr aufrecht erhalten können und damit weniger ATP produzieren, kann also das Proteasom empfindlich in seiner Funktion gestört werden

(Jenner, 2003a; Jenner et al., 1998; McNaught et al., 2003). Weiter von ATP abhängig sind die Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp40, welche bei der Proteinfaltung eine große Rolle spielen. Die Beeinträchtigung der Mitochondrien durch oxidativen Stress führt also zu einer Energieverminderung und inaktiviert die beiden Hauptverteidigungslinien gegen die Proteinfehlfaltung, das Proteasom und die Hitzeschockproteine. DJ-1 scheint in diesem Zusammenhang als Protektor gegen die sich vermehrt bildenden ROS zu agieren (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der molekularen Vorgänge bei der PK**

Schematische Darstellung der Konsequenzen defekter Mitochondrien mit erhöhtem ROS-Spiegel und einer Erniedrigung der Aktivität von Parkin. Wenn das proteasomale System intakt ist, Parkin aktiv ist und der oxidative Stress gering, entsteht weniger fehlgefaltetes α-Synuclein, da es durch die Hitzeschockproteine Hsp70/40 korrekt gefaltet wird und an synaptische Vesikel binden kann (Punkt 1). Bei erhöhtem oxidativem Stress wird fehlgefaltetes α-Synuclein vermehrt angehäuft und durch das deaktivierte proteasomale System nicht abgebaut, so dass sich größere aggregierte Fibrillen anlagern (Punkt 2). DJ-1 kann als ein weiteres Verteidigungssystem durch Oxidation der aktiven Cysteine oder durch Aktivierung anderer antioxidativer Verteidigungssysteme die Zelle vor erhöhter ROS schützen (Punkt 3) (Quelle: Kahle, 2004).

Es gibt einen engen Zusammenhang zwischen oxidativen Spezies und Proteinmetabolismus, daher muss man beide Prozesse als Ursache für die PK in Betracht ziehen.

### 1.5 Das PARK7-Gen DJ-1

Da sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit DJ-1 und seiner Funktion beschäftigt, wird das PARK7 Genprodukt DJ-1 im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.5.1 Mutationen und Polymorphismen im *DJ-1* Gen

Es gibt zwei DJ-1-Mutationen, die eindeutig mit der PK segregieren und typische Parkinsonsymptome hervorrufen. Die eine Mutation ist eine Deletionsmutante von DJ-1 in einer niederländischen Familie (Dekker et al., 2003c) und eine Punktmutation in einer italienischen Familie (Bonifati et al., 2003b). Die Deletionsmutante enthält eine Deletion von 14kb, welche Exon 1-5 ( $\Delta$ ex 1-5) umfasst. Bei der Punktmutation ist ein Leucin an der Position 166 in der G-Helix am C-Terminus durch den Helixbrecher Prolin ersetzt. Die klinischen Daten der beiden Familien zeigten, dass der pathogene Phänotyp sehr früh mit 30-40 Jahren beginnt und nur sehr langsam voranschreitet. Die Kardinalsymptome lassen sich gut mit L-Dopa behandeln (vgl. Kapitel 1.1).

Obwohl die Häufigkeit von DJ-1 Mutationen nur bei 1-2% der Parkinsonfälle liegt, wurden noch eine Reihe anderer Punktmutationen, Deletionsmutationen, sowie Polymorphismen, die nicht eindeutig mit der Krankheit assoziiert sind, gefunden (vgl. Tabelle 2).

Mutation	Vererbung	Effekt	Population	Referenzen
L166P	Homozygot	Protein-stabilität	Italienisch	Bonifati et al. (2003)
14-kb del	Homozygot	Verlust des Produkts	Holländisch	Bonifati et al. (2003)
M26I	Homozygot	Unbekannt	Ashkenazi Jüdisch	Abou-Sleiman et al. (2003)
D149A	Heterozygot	Unbekannt	Afro-Karibisch	Abou-Sleiman et al. (2003)
IVS6-1 G-C	Heterozygot	Abweichendes Transkript	Hispanisch	Hague et al. (2003)
c.56delC c.57 G-A	Heterozygot	Protein-Verkürzung	Hispanisch	Hague et al. (2003)
A104T	Heterozygot	Unbekannt	Latino	Hague et al. (2003)
Ex5-7del	Heterozygot	Abweichendes Transkript	Südtirol (Norditalien)	Hedrich et al. (2004)
E64D	Homozygot	Thermische Rigidität (vgl. 4.6.2)	Türkisch	Hering et al. (2004)
IVS5+2-12del	Heterozygot	Abweichendes Transkript	Russisch	Hedrich et al. (2004)

**Tabelle 2: Auflistung der bekannten Mutationen von DJ-1, sowie deren Effekte, Vererbung und Population (Abou-Sliema et al., 2003; Abou-Sliema et al., 2004; Bonifati et al., 2003b; Hague et al., 2003; Heydrich et al., 2004; Hering et al., 2004).**

Neben  $\Delta$ ex1-5 und L166P ist noch die E64D-Mutation in einer türkischen Familie hervorzuheben. Diese homozygote Mutante weist zwar wie auch die anderen

## Einleitung

verbleibenden Mutanten in Tabelle 2 keine eindeutige Pathologie auf, aber es existieren klinische Daten, die auf den Verlust dopaminergener Neurone hinweisen (Hering et al., 2004). In [<sup>18</sup>F]-β-CIT Studien, konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Menge Dopamintransporter im Striatum des Indexpatienten gefunden wurde. Seine homozygote Schwester, die noch keine Parkinsonsymptome aufwies, hatte dieselbe Reduzierung, während ein heterozygoter Bruder eine normale Verteilung des Transporters zeigte. Dies zeigt, dass die Mutation E64D keine vollständige Penetranz aufweist und es sich hierbei um einen harmlosen Polymorphismus handeln könnte.

### 1.5.2 Die DJ-1-Superfamilie strukturverwandter Proteine

Das *DJ-1*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 1p36, dem *PARK7* Locus, und besteht aus 8 Exons. Der aus 570bp bestehende offene Leserahmen (ORF) kodiert ein aus 189 AS bestehendes Protein, welches eine Masse von ca. 20kDa aufweist (Bonifati et al., 2003b).

DJ-1 gehört der ThiJ/PfpI-Superfamilie an, welche aus bakteriellen Proteasen, Katalasen und Chaperonen besteht. Die ThiJ/PfpI/DJ-1-Sequenz ist in sämtlichen Organismen, Eukaryoten wie auch Prokaryoten hoch konserviert (vgl. Abbildung 11), besonders an Schlüsselpositionen, die mit der Funktion von DJ-1 zusammenhängen (vgl. Kapitel 1.5.5). Hier wird die extrem gute Konservierung des C-Terminus des DJ-1-Proteins (Bandopadhyay et al., 2004), bestehend aus zwei Helices (G und H, AS 161-189), hervorgehoben, da dieser für spätere Experimente von besonderer Bedeutung ist.

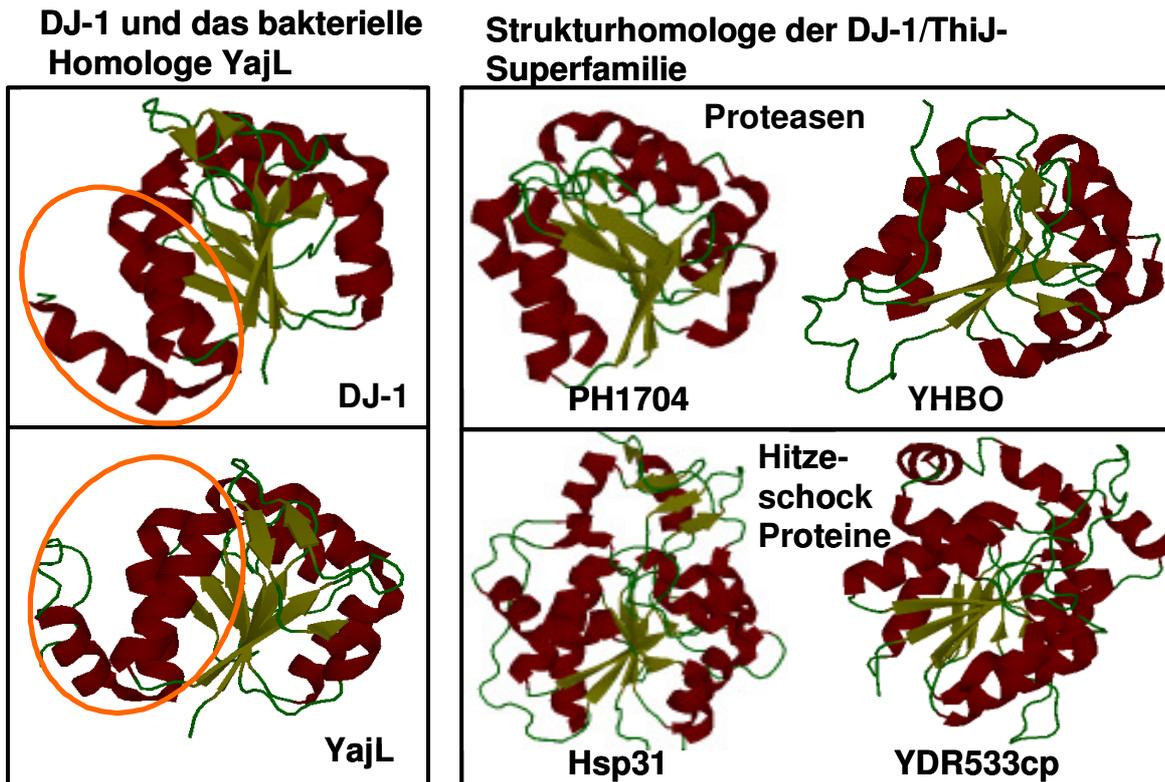
	G-Helix	H-Helix
E. c. YajL...	AIDFGLKIIDLLV	GREKAHEVASQLVMAA-
C. e. DJ-1a...	AFEFALKIVELLE	GKDKATSLIAPMLLKL
C. e. DJ-1b...	AFEFALKIVETLE	GPEKTNSLLKPLCLAK
D. m. DJ-1a...	TFDFALKITEQLV	GAEVAKEVAKAMLWTYKP
D. m. DJ-1b...	AYEFALKIAEELAG	KEKVVQEVAKGLLVAYN
D. r. DJ-1...	SFEFALTIVEELM	GAEVAAQVKAPLILKD
X. l. DJ-1...	SFEFALEIVCTLL	GKEVAEQVKTPLVLKD
G. g. DJ-1...	SFEFGLAIVEALM	GKEVAEQVKAPLILKD
M. m. DJ-1...	SFEFALAIVEALV	GKDMANQVKAPLVLKD
R. n. DJ-1...	SFEFALAIVEALS	GKDMANQVKAPLVLKD
H. s. DJ-1...	SFEFALAIVEALN	GKEVAAQVKAPLVLKD

**Abbildung 11: Konservierte Aminosäuresequenzen des C-Terminus der DJ-1/ThiJ-Homologen in verschiedenen Spezies**

Darstellung von Aminosäuresequenzen des extremen C-Terminus des DJ-1-Proteins (AS 161-189) unterschiedlicher Spezies nach aufsteigender evolutionäre Reihenfolge: *Escherichia coli* (E. c.) (Bakterium), *Caenorhabditis elegans* (C. e.) (Nematode), *Drosophila melanogaster* (D. m.) (Frucht-Fliege), *Darius rerio* (D. r.) (Zebrafisch), *Xenopus laevis* (X. l.) (Krallenfrosch), *Gallus gallus* (G. g.) (Hahn), *Mus musculus* (M. m.) (Maus), *Rattus norvegicus* (R. n.) (Ratte), *Homo sapiens* (H. s.) (Mensch). Sowohl für *Drosophila melanogaster* als auch *Caenorhabditis elegans* gibt es zwei DJ-1 Isoformen, die mit 1a und 1b bezeichnet wurden.

### 1.5.3 Struktur des DJ-1-Proteins und seiner Strukturhomologen

DJ-1 gehört zu der ThiJ/DJ-1-Superfamilie. Es besitzt ein flavodoxinartiges Gerüst bestehend aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern in einer Sandwichkonfiguration. Es gibt 4 Strukturhomologe in *E. coli*: das Hitzeschockprotein Hsp31, das funktionell unbekannte Protein SCRP 27a, die Cystein-Protease YhbO und YajL, das bakterielle Homologe zu DJ-1. Zusätzlich gibt es noch Homologe in Archaeobakterien: die intrazellulären Proteasen in thermophilen Mikroorganismen wie *Pyrococcus horikoshii* und *furiosus* PhPI oder PfPI und das Hefehomologe zu Hsp31: YDR533Cp, welches als Antwort auf verschiedene Stressbedingungen in erhöhtem Maße transkribiert wird wie z. B. Hitzeschock, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung oder Akkumulation von missgefalteten Proteinen (Cookson, 2003a; Wilson et al., 2003b; Wilson et al., 2005; Wilson et al., 2004) (vgl. Abbildung 12).



**Abbildung 12: DJ-1 und die Homologen der DJ-1/ThiJ-Superfamilie**

Die flavodoxinähnliche Grundstruktur aller Homologen ist durch  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter gekennzeichnet. PH1704 und YHBO sind bakterielle Cystein-Proteasen, YajL besitzt die größte Homologie zu DJ-1, die Funktion ist aber unbekannt, während Hsp31 und YDR533cp, das Hefehomologe, als Hitzeschockproteine fungieren. Der zusätzliche  $\alpha$ -helicale C-Terminus, das Helix-Knick-Helix Motiv, das DJ-1 und YajL von den anderen Homologen unterscheidet, ist orange umkreist.

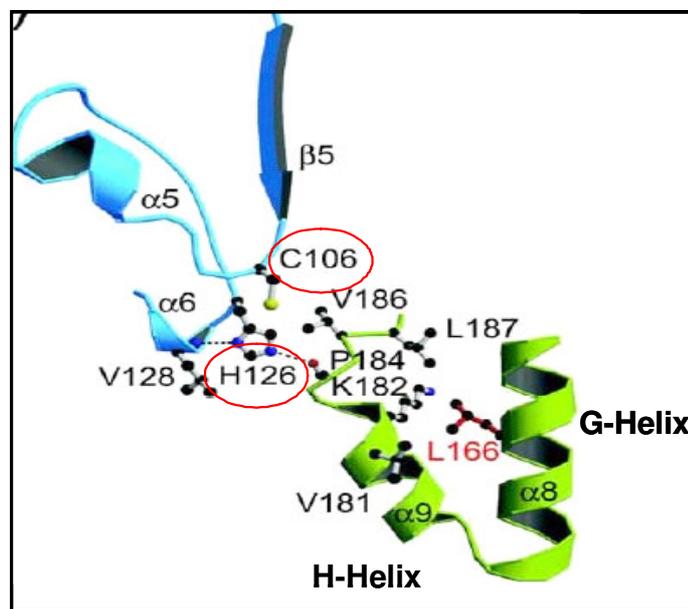
Alle Mitglieder der Superfamilie sind in einer multimeren Struktur aktiv. Dabei weisen DJ-1 und YajL beide eine dimere Quartärstruktur auf. Ein C-terminales Strukturelement, bestehend aus zwei Helices und einem Knick, das Helix-Knick-Helix Motiv, unterscheidet DJ-1 und sein bakterielles Homologe von den anderen ähnlichen Strukturhomologen der Superfamilie. Auf dieses Motiv wird im Laufe der Arbeit noch genauer eingegangen.

Alle Homologen besitzen einen so genannten „nukleophilen Ellbogen“, der aus einer energetisch unvorteilhaften Konformation aus  $\beta$ -Faltblatt, Turn und  $\alpha$ -Helix besteht. Dieser stellt das katalytische Nukleophil in vielen Proteinen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung dar. An der scharfen Biegung dieses „nukleophilen Ellbogens“ befindet sich zusätzlich ein reaktives Cystein an der Position 106, welches leicht oxidiert werden kann (Wilson et al., 2003b; Wilson et al., 2005). Kristallstrukturdaten zeigen, dass das reaktive Cystein des DJ-1-Proteins leicht vom Luftsauerstoff entweder in eine Cystein-Sulfensäure (CysSOH), Cystein-Sulfinsäure (Cys-SO<sub>2</sub>H) oder Cystein-Sulfonsäure (Cys-SO<sub>3</sub>H) oxidiert werden kann (Canet-Aviles et al., 2004; Kinumi et al., 2004). Dieses leicht zu oxidierende Cystein

## Einleitung

ist zusätzlich Teil eines möglichen katalytischen Zentrums aus Cystein, Histidin und Aspartat oder Glutamat im Falle von Hsp31 und PH1704 (Du et al., 2000; Quigley et al., 2003).

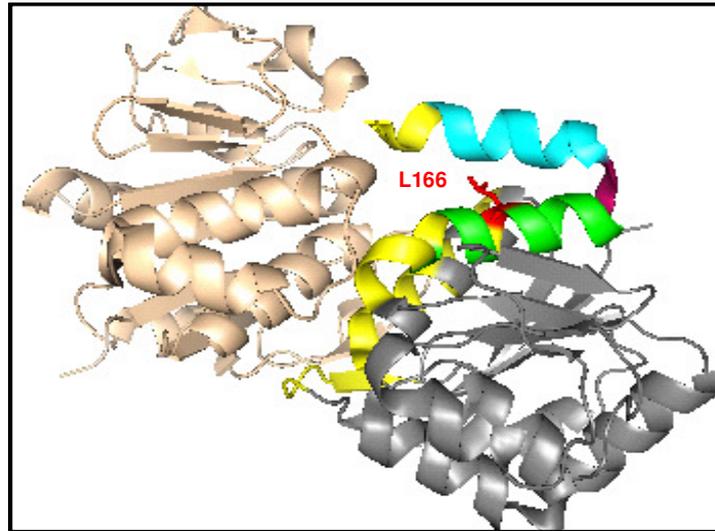
DJ-1 Kristallstrukturdaten deuten ein mögliches katalytisches Zentrum an, bestehend aus Cystein-106 und Histidin-126. Allerdings fehlt ein Nukleophil in erreichbarer Nähe zu den beiden genannten AS, um die katalytische Triade von Cystein-Proteasen zu komplettieren (Honbou et al., 2003; Lee et al., 2003b; Tao et al., 2003; Wilson et al., 2003b). Der Zugang zu dem aktiven Zentrum ist zudem durch den  $\alpha$ -helikalen C-Terminus blockiert, so dass Substrate ohne konformationelle Änderung des Proteins nicht in die Nähe des Zentrums gelangen können (Honbou et al., 2003) (vgl. Abbildung 13).



**Abbildung 13: Strukturelle Darstellung des möglichen aktiven Zentrums von DJ-1, blockiert durch die  $\alpha$ -Helices des C-Terminus**

Das reaktive Cystein-106 und Histidin-126 sind rot eingekreist. Zwei  $\alpha$ -Helices (G und H) blockieren den Zugang zum Zentrum. Die G-Helix trägt die schwerwiegende pathogene Mutante L166P (rot) (Honbou et al., 2003).

Der C-Terminus des DJ-1-Proteins ist Teil der Dimerberührungsfläche, welche sehr großflächig ist und ca.  $2600\text{\AA}^2$  beträgt (Wilson et al., 2005). Interessanterweise befindet sich die pathogene Mutante L166P in der C-terminalen Domäne (vgl. Abbildung 14).



**Abbildung 14: Dimerstruktur von DJ-1**

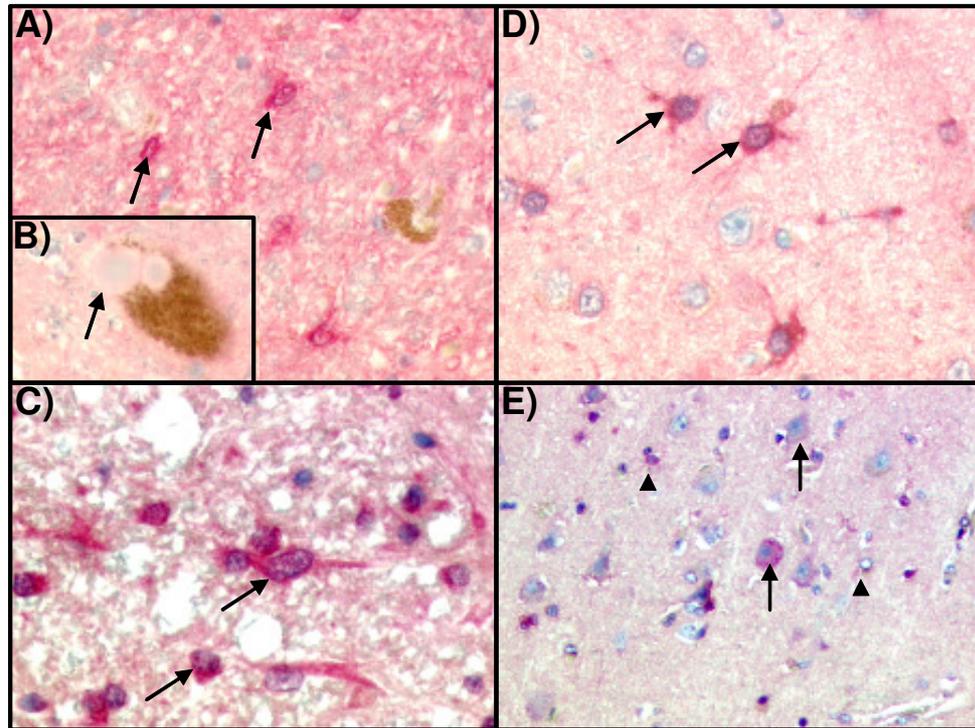
Ein Homomer ist grau, das andere Homomer ist braun gefärbt. Der C-Terminus, bestehend aus H-Helix (blau), G-Helix (grün), sowie Knick (violett), ist hervorgehoben. Die G-Helix trägt die pathogene Mutante L166 (rot). Die Dimerkontaktfläche ist gelb markiert.

### 1.5.4 Neuropathologie von DJ-1

Da es zur Zeit noch kein post-mortem-Hirnmateriale von Parkinsonpatienten gibt, die eine DJ-1-Mutation aufweisen, wurden erste neuropathologische Untersuchungen zur Expression von DJ-1 in Patienten mit akuten sowie chronischen Neurodegenerationen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass DJ-1 nicht in LK und LN wie in typischen  $\alpha$ -Synucleinopathien zu finden war (vgl. Abbildung 15B). Stattdessen colokalisierte DJ-1 mit  $\alpha$ -Synuclein und Tau in glialen und neuronalen Einschlüssen von Alzheimerpatienten, Patienten mit der Pick'schen Krankheit und MSA-Patienten (Neumann et al., 2004; Rizzu et al., 2004). Tau ist ebenfalls ein Protein, welches leicht aggregiert und in phosphorylierter Form in Einschlüssen vor allen Dingen in Demenzpatienten wie Alzheimer, corticobasaler Demenz und frontotemporalen Demenz (FTD) auftritt.

Der hervorstechendste neuropathologische Befund war die starke Immunfärbung von DJ-1 in Astrozyten, die aufgrund ihrer ausgeprägten sternförmigen Morphologie als reaktive Astrozyten identifiziert wurden (Bandopadhyay et al., 2004; Neumann et al., 2004). Reaktive Astrozyten üben im Gegensatz zu den stützenden Astrozyten eine Schutzfunktion gegenüber den benachbarten Neuronen aus und verteidigen diese vor erhöhtem oxidativem Stress (Heales et al., 2004). Es wurden sowohl in  $\alpha$ -Synuclein transgenen Mäusen (vgl. Abbildung 15C) als auch in Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen (vgl.

Abbildung 15A, D) immunopositives DJ-1 in reaktiven Astrozyten gefunden (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15: DJ-1 Immunreaktivität in humanen  $\alpha$ -Synucleinopathien und transgenen Mäusen**

A) SNpc-Schnitte von Parkinsonpatienten wurden mit dem monoklonalen 3E8 DJ-1-Antikörper (AK) (vgl. Tabelle 3) angefärbt und zeigen starke Immunreaktion (siehe Pfeile), während B) keine Färbung mit LK auftritt (siehe Pfeil). C) Reaktive Astrozyten im Rückenmark einer 8 Monate alten  $\alpha$ -Synuclein-Maus, die mit dem polyklonalen SN1132 AK (vgl. Tabelle 3) angefärbt wurde (siehe Pfeile), D) Die frontale weiße Substanz in MSA-Patienten zeigt 3E8-positive reaktive Astrozyten (siehe Pfeile). E) Schwache neuronale (siehe Pfeile) und gliale (siehe Pfeilköpfe) Färbung von DJ-1 im Kontrollhirn mit 3E8 AK (Neumann et al., 2004).

Das Auftreten von DJ-1 in reaktiven Astrozyten von Parkinsonpatienten ist ein interessanter Aspekt, dessen Bedeutung im nächsten Kapitel klarer wird, in dem die Funktion von DJ-1 als ein zytoprotektives Protein näher beschrieben wird.

### 1.5.5 Funktion von DJ-1

Ursprünglich wurde DJ-1 als ein neues potentielles Onkogen identifiziert, welches NIH3T3-Zellen in Anwesenheit von H-Ras transformiert (Nagakubo et al., 1997). Zwei weitere Gruppen klonierten Rattenhomologe von DJ-1, SP22 bzw. CAP-1, als ein Protein, dessen Expression in Spermien nach Verabreichung von Toxinen, die Unfruchtbarkeit verursachen, stark vermindert wurde (Klinefelter et al., 1997; Wagenfeld et al., 1998). Außerdem wurde unabhängig von den oben genannten Studien DJ-1 als Teil eines Multiproteinkomplexes kloniert, welches RNA bindet und stabilisiert (Hod et al., 1999).

## Einleitung

Erst 2003 wurde DJ-1 in Zusammenhang mit der PK gebracht, als Dekker und Bonifati (Bonifati et al., 2003b; Dekker et al., 2003c) zwei verschiedene Mutationen fanden, die eindeutig mit der Krankheit einhergingen (vgl. Kapitel 1.5.1).

Zu diesem Zeitpunkt wurden große Anstrengungen unternommen, die genaue zelluläre Funktion von DJ-1 zu ergründen. In Yeast 2-Hybridstudien (Y2H) wurde nach Interaktionspartnern von DJ-1 gesucht, und einer der Interaktoren war PIASx- $\alpha$ , Mitglied einer Familie von PIAS-Proteinen, Proteininhibitoren von aktiviertem STAT (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription). Diese Proteinfamilie inhibiert Zytokinsignale (Liu et al., 1998; Starr et al., 1999). PIASx- $\alpha$  unterdrückt die Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors (AR) und fungiert gleichzeitig als eine E3-Ligase des small ubiquitin-like modifiers, SUMO. SUMO wird wie Ubiquitin an Substrate konjugiert und markiert diese dann für nachfolgende Prozesse (Hay, 2005). Im Falle von DJ-1 wurde gezeigt, dass PIASx- $\alpha$  am Lysin-130 sumoylieren kann. Gleichzeitig beeinflusste DJ-1 die Aktivität des AR positiv und verdrängte PIASx- $\alpha$  als Bindungspartner des AR (Niki et al., 2003b; Shinbo et al., 2005; Takahashi et al., 2001b). Des Weiteren ist DJ-1 ein positiver Regulator von p53 (Shinbo et al., 2005), während Pyrimidin-tract-Bindungsprotein-assoziiertes Splicingfaktor (PSF) negativ reguliert wird (Xu et al., 2005). DJ-1 scheint also ein Modulator für transkriptionelle Prozesse zu sein, allerdings sind die Studien schlecht reproduzierbar und nicht gut etabliert.

Die Strukturhomologie von DJ-1 zum Chaperon Hsp31 in *E. coli* und YDR533Cp in der Hefe, der Protease YhbO in *E. coli* und PH1704 in *Pyrococcus hiroshii* (vgl. Kapitel 1.5.3), führen zu der Vermutung, dass DJ-1 eine Chaperon- bzw. Proteasefunktion haben könnte, was aber nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte (Lee et al., 2003b; Olzmann et al., 2004). Zudem ist aufgrund der Kristallstrukturdaten nur ein katalytisches Zentrum aus zwei Komponenten vorhanden, welches aus einem Cystein-106 und Histidin-126 besteht; während das Nucleophil fehlt, welches die katalytische Triade von PH1704-artigen Cysteinproteasen vervollständigen würde (vgl. Kapitel 1.5.3).

Unter bestimmten Redox-Bedingungen kann DJ-1 als Chaperon agieren und die  $\alpha$ -Synucleinaggregation verhindern. Es wurde sowohl in DJ-1 knock-out murinen embryonalen Stammzellen als auch in Maus-Neuroblastomazellen gezeigt, dass das Fehlen von DJ-1 bzw. die pathogene Mutante [L166P]DJ-1 eine  $\alpha$ -Synucleinaggregation nach oxidativer Behandlung der Zellen hervorruft (Shendelman et al., 2004). Außerdem konnte in dopaminergen Neuronen gezeigt werden, dass nach Transfektion des pathogenen leicht

## Einleitung

aggregierbaren [A53T] $\alpha$ -Synuclein-Konstrukts mehr Oligomere gebildet werden als durch eine zusätzliche Cotransfektion mit [wt]DJ-1. Gleichzeitig wurde als Sekundäreffekt in [wt]DJ-1 cotransfizierten Zellen eine erhöhte Menge des Chaperons Hsp70 festgestellt, welches die Aggregation von Proteinen verhindert (Zhou et al., 2005).

Die wohl am häufigsten bestätigte Funktion von DJ-1 ist Zytoprotektion nach oxidativer Stressinduktion. Diese Schutzfunktion konnte in dopaminergen Rattenzellen und primären dopaminergen Neuronen gezeigt werden. Die DJ-1-Überexpression konnte vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 6-OHDA schützen im Gegensatz zur Überexpression der pathogenen Mutante [L166P]DJ-1. Gleichzeitig wurde die Glutathion (GSH)-Menge in der Zelle gesteigert. GSH ist ein Tripeptid, bestehend aus einem Cystein, einem Glycin und einem Glutamat, welches die Zelle vor oxidativem Stress schützt und durch Oxidation an freien Cysteinen ROS eliminiert. Es konnte in Reverse Transkriptase (RT)-PCR-Studien gezeigt werden, dass die Expression der Glutamat-Cystein-Ligase (GCL), das für die GSH-Biosynthese geschwindigkeitsbestimmende Enzym, erhöht war (Zhou et al., 2005).

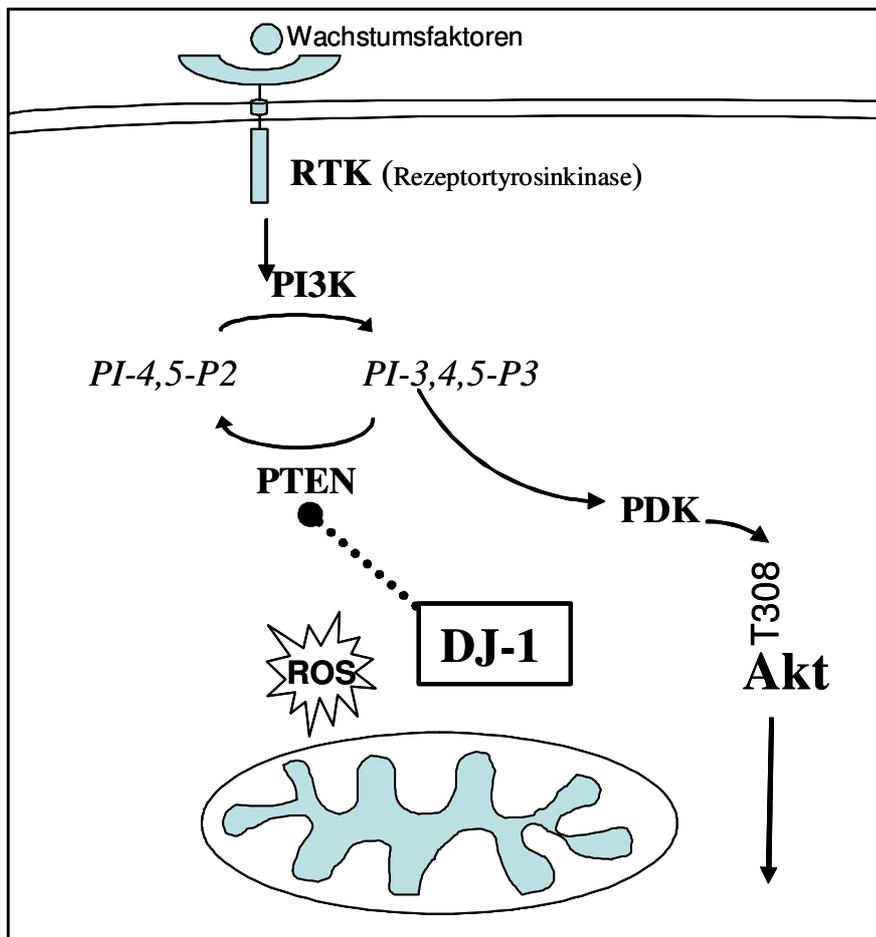
In verschiedenen Zellkulturmodellen konnte die Zytoprotektivität von DJ-1 weiter untermauert werden (Martinat et al., 2004; Taira et al., 2004; Yokota et al., 2003). In 2D-Gelelektrophoresestudien wurde festgestellt, dass sich der isoelektrische Punkt (pI) nach Behandlung von Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum azideren pI verschiebt (Mitsumoto et al., 2001; Taira et al., 2004). Das heißt, dass DJ-1 dabei oxidiert worden sein muss und die dabei entstandenen Cystein- oder Methionin-Sulfinsäuren und -Sulfonsäuren den pI in den sauren Bereich verschieben. Bei genaueren Untersuchungen im Massenspektrometer wurde festgestellt, dass zunächst der reaktivste Cysteinrest C106 oxidiert und dann bei höherer Konzentration und längerer oxidativer Stressexposition auch die beiden verbleibenden Cysteine C46 und C53 zur Cystein-Sulfinsäure und Cystein-Sulfonsäure oxidiert wurden (Kinumi et al., 2004). Für DJ-1 als zytoprotektives Protein würde dies bedeuten, dass es durch seine Oxidation durch ROS Zellen vor dem Tod schützen kann.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass DJ-1 als antioxidativ schützendes Protein fungiert, bieten die DJ-1 knock-out Tiermodelle in *Drosophila*, *C. elegans* und Maus (vgl. Kapitel 1.5.6). Außerdem scheint DJ-1 in verschiedenen Zellkulturmodellen nach oxidativer Stressinduktion vermehrt mit Mitochondrien zu colokalisieren (Blackinton et al., 2005; Jin et al., 2005; Li et al., 2005).

Zusätzlich zu der zytoprotektiven Funktion von DJ-1 wurde in *Drosophila* auch ein Zusammenhang von DJ-1 und dem PI-3K/Akt-Signaltransduktionsweg gefunden (Kim et al., 2005a; Yang et al., 2005). Zunächst wurde DJ-1 als ein Antagonist des

## Einleitung

Tumorsuppressors PTEN gefunden. Gleichzeitig ist PTEN die Lipidphosphatase, die den PI3K/Akt-Signalweg deaktiviert, indem es Phosphatidylinositol(tris)phosphat (PI-3,4,5-P3) in Phosphatidylinositol(bis)phosphat (PI-4,5-P2) verwandelt. Damit wird eine Phosphorylierung des Akt-Proteins durch die Phosphatidylinositol-abhängige Kinase (PDK) verhindert und die anti-apoptotische-Kaskade wird unterbrochen (vgl. Abbildung 16).



**Abbildung 16: Schematische Darstellung des „pro-survival“-PI3K/Akt-Signalwegs**

Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) durch Ligandenbindung von Wachstumsfaktoren an den Rezeptor führt zu einer Aktivierung von Akt durch dessen Phosphorylierung mit Hilfe der PDK. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade werden mitogene sowie apoptotische Gene an- bzw. abgeschaltet. PTEN als Gegenspieler von DJ-1 dephosphoryliert PI-3,4,5-P3 und verhindert die Aktivität der Akt-Kinase.

Da DJ-1 ein Gegenspieler von PTEN ist, kann es diesen zytoprotektiven Signalweg positiv beeinflussen. Auch hier sind ROS von Bedeutung, da es bekannt ist, dass Phosphatasen wie PTEN leicht oxidiert werden können und damit deaktiviert werden (Lee et al., 2002; Meng et al., 2002). Auf den Akt-Signalweg wird in der Diskussion im Kapitel 5.6.1 noch genauer eingegangen.

Zusätzlich zur positiven Modulation des mitogenen zytoprotektiven Akt-Signalweges wurde gezeigt, dass DJ-1 Apoptose-vermittelnde Effektorinasen hemmen kann. In Y2H-Screens wurde das pro-apoptotische „death associated“ Protein Daxx identifiziert (Junn et al., 2005), welches normalerweise nach Stressinduktion an Ask-1 bindet. Es wird durch Phosphorylierung durch die Homöodomäne-Interaktionsproteinkinase-1 (HIPK-1) aktiviert, was zu einer Translokation von Daxx ins Zytoplasma und einer Aktivierung von Ask-1 führt (Sekito et al., 2006).

DJ-1 scheint also in verschiedenen zellulären Prozessen wie der Apoptose, der Onkogenese, der Transkription, der RNA Stabilität und der Zytoprotektion involviert zu sein. Allerdings sind die genauen molekularen Zusammenhänge noch ungeklärt.

### **1.5.6 DJ-1 Knock-out-Tiermodelle**

Um die Funktion von DJ-1 genauer zu untersuchen, wurden verschiedene knock-out-Tiermodelle etabliert.

Goldberg und Kollegen generierten eine der ersten DJ-1 Knock-out-Mäuse, denen Exon 2-7 fehlten. Diese waren fertil, gesund und zeigten keine Abnormalitäten in der Menge an Dopamin in der SN (Goldberg et al., 2005). Erst in elektrophysiologischen Studien und Verhaltenstests wurde festgestellt, dass die Knock-out-Mäuse hyperaktiv waren, was auf eine erhöhte Dopaminaufnahme durch die Dopamintransporter zurückgeführt wurde. Striatale Hirnschnittkulturen wurden elektrisch stimuliert und der Strom, der durch elektrochemische Oxidation des freigesetzten Dopamins erzeugt wurde, wurde mit einer zweiten Elektrode in der Nähe gemessen. Der Stromfluss war deutlich reduziert in DJ-1 Knock-out-Mäusen im Vergleich zu wt-Mäusen. Pharmakologische Hemmung des Dopamintransporters führte zu einer Erhöhung des Stromflusses. Da die Expression des Dopamintransporters nicht hochreguliert wurde, was in quantitativen real time RT-PCR Studien gezeigt wurde, scheint eine erhöhte Aktivität der Dopamintransporter und damit eine erhöhte Dopaminaufnahme der Grund für den geringen Stromfluss und damit die Hyperaktivität der Mäuse sein. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass eine Störung in der rezeptorvermittelten Aufnahme von Dopamin zu einem Ungleichgewicht des Dopaminpools und des veränderten Verhaltens in DJ-1 Knock-out-Mäusen führen könnte.

Kim und Mitarbeiter konnten in Knock-out-Mäusen, bei denen Exon 3-5 des DJ-1-Gens fehlten, unter normalen Zuchtbedingungen keinen Phänotyp feststellen. Allerdings wurde eine erhöhte Toxizität von Tyrosin-Hydroxylase (TH)-positiven Neuronen in knock-out-Mäusen gefunden, die mit MPTP behandelt wurden (Kim et al., 2005b). TH ist das

## Einleitung

geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Dopamin-Biosynthese. Eine adenovirale Überexpression von [wt]DJ-1, nicht aber [L166P]DJ-1 konnte in der SNpc die MPTP-Überempfindlichkeit der Knock-out-Mäuse abwenden.

In *C. elegans* wurde ebenfalls eine erhöhte Sensitivität und Angreifbarkeit durch Komplex I-Inhibitoren wie Rotenon in DJ-1 Knock-out-Würmern hervorgerufen im Vergleich zu Kontrollwürmern. Das erhöhte Sterben der Würmer nach Rotenonzugabe konnte komplett verhindert werden, indem diese mit D- $\beta$ -Hydroxybutyrat (D- $\beta$ -HB) und Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) behandelt wurden (Ved et al., 2005). D- $\beta$ -HB erhöht den Succinatspiegel und ist eine zweite Substratquelle für Komplex II, während TUDCA Apoptose verhindert. Beide Substanzen waren in diesem Modell nötig, um eine mitochondriale Fehlfunktion durch Inhibition von Komplex I der Atmungskette wieder aufzuheben.

Sowohl in Nematoden als auch in *Drosophila* gibt es zwei Homologe des DJ-1-Gens. In *Drosophila* weist DJ-1a eine größere Sequenzhomologie zum humanen DJ-1 auf als DJ-1b. Durch Ausschalten des *DJ-1a*-Gens, wurde ein letaler Phänotyp generiert (Yang et al., 2005). Dieser Befund zeigte, dass DJ-1a offensichtlich ein essentielles Gen in *D. melanogaster* ist. Um den letalen Phänotyp zu umgehen, wurde ein GAL4-Promotor verwendet, der DJ-1a-Expression in speziellen Gewebe- und Zelltypen und in verschiedenen Stadien erlaubt. Induktion von DJ-1a-interfering RNA (RNAi) in das sich entwickelnde Auge mittels eines GMR-GAL4-Promotors produzierte einen schweren Augenphänotyp in der Fliege. GMR-GAL4 sorgt für eine Genexpression in postmitotischen Zellen im Auge. Anfärbung des Auges mit entsprechenden Markern zeigte Verluste von Photorezeptorneuronen in einigen Ommatidien. Im dorsomedialen Cluster (DMC) (Choi et al., 2004), wurde ebenfalls ein erhöhtes Sterben dopaminerger Neurone gefunden, nachdem in diesen Zellen RNAi mit dem Ddc-GAL4 Promotor induziert wurde. Anschließend wurde versucht den Augenphänotyp mittels Kandidatengen und Signaltransduktionswegen, die in der Regulation des Zellüberlebens eine Rolle spielen, zu heilen. Dabei stellte sich heraus, dass transgene Expression der Kinase Akt das erhöhte neuronale Sterben reduzieren konnte (Yang et al., 2005). Ebenso konnte von einer unabhängigen Gruppe gezeigt werden, dass DJ-1 ein Antagonist von PTEN ist und somit die Akt-Signalkaskade de-reprimieren kann (Kim et al., 2005a).

Ein Fehlen des *DJ-1*-Gens scheint nur bei Manipulationen von außen, wie erhöhtem oxidativem Stress und mitochondrialer Fehlfunktion, durch entsprechende Inhibitoren einen Phänotyp auszubilden (Kim et al., 2005b). Nur in der Fliege kann man durch

## Einleitung

gezieltes Ausschalten des *DJ-1*-Gens in verschiedenen Geweben und Zellstadien einen Phänotyp erzeugen, der dann durch genauere Untersuchungen der molekularen Vorgänge in direkte Verbindung mit dem Akt-Signaltransduktionsweg gebracht wurde (Yang et al., 2005).

Diese Erkenntnisse aus den Knock-out-Tiermodellen tragen weiter dazu bei, die Funktion von DJ-1 und dessen Rolle in der PK bzw. der oxidativen Stressantwort weiter zu verstehen und aufzuklären.

## 2. Ziele der Doktorarbeit

Die Funktionen von DJ-1 sind nach wie vor unklar. Die Überempfindlichkeit gegenüber Neurotoxinen von DJ-1 Knock-out-Tiermodellen sowie histologische Befunde von DJ-1-Induktion in Astrozyten bei Neurodegeneration deuten auf eine Beteiligung von DJ-1 an Stressantworten im Gehirn hin. Doch bleibt es nach wie vor ein großes Rätsel, über welchen molekularen Mechanismus das Fehlen des *DJ-1*-Gens oder eine Prolinmutation an der Position 166 zu einem verstärkten Sterben dopaminerger Neurone und den typischen Kardinalsymptomen im Parkinsonpatienten führen kann.

Ausgangspunkt der vorliegenden Studie war die Aufklärung der Kristallstruktur von DJ-1, welche einen Durchbruch zum molekularen Verständnis des DJ-1-Proteins darstellte. Nur ein vollständig intaktes DJ-1-Dimer scheint voll funktionsfähig zu sein, wie es für [wt]DJ-1 der Fall ist. Das C-terminale Helix-Knick-Helix Motiv scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, da es zum einen Teil der Dimerberührungsfläche ist, zum anderen befindet sich in der G-Helix die Mutante L166P, die mit der PK assoziiert ist. Zudem versperrt der C-Terminus vermutlich den Zugang zum möglichen aktiven Zentrum, in dem sich das leicht oxidierbare Cystein-106, welches in der Stressantwort eine zentrale Rolle spielen könnte, befindet.

Die Struktur-Funktionsbeziehung und die Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von DJ-1 sind zentrale Teile der hier vorliegenden Doktorarbeit. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf die Eigenschaften von DJ-1 in der oxidativen Stressantwort gelegt, die nicht nur in der PK eine Rolle spielen, sondern ganz allgemein in stress-induzierten Prozessen wie zum Beispiel bei der Alterung, der Arteriosklerose, bei Krebs und Diabetes von Wichtigkeit sind.

Im Folgenden werden konkrete Fragestellungen aufgelistet, die im Laufe der Doktorarbeit beantwortet wurden:

- 1) Wie beeinflusst die Topologie des extremen C-Terminus die Stabilität des DJ-1-Proteins?
- 2) Ist die Besonderheit des  $\alpha$ -helicalen C-Terminus im Vergleich zu seinen Strukturhomologen in *E. coli* von zentraler funktioneller bzw. struktureller Bedeutung?
- 3) Gibt es Hinweise auf bedeutsame konformationelle Änderungen, die das mögliche aktive Zentrum freilegen?

## Ziel der Doktorarbeit

- 4) Ist die Instabilität der pathogenen Mutante [L166P]DJ-1 ein transkriptionelles Problem oder liegt es an der veränderten Proteinstruktur?
- 5) Welches proteolytische System ist verantwortlich für den beschleunigten Abbau von [L166P]DJ-1 und kann man es hemmen?
- 6) Wie ist der genaue molekulare Mechanismus von DJ-1 als Protektor, Aktivator oder Inhibitor von apoptotischen oder „pro-survival“-Signaltransduktionskaskaden nach oxidativer Stressbehandlung?
- 7) Wie funktioniert der zelluläre protektive Abwehrmechanismus von DJ-1 in oxidativer Umgebung?
- 8) Welche subzellulären Domänen sind für die jeweiligen Funktionen von DJ-1 essentiell?

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 3.1.1 Molekularbiologie

Geräte/Materialien	Firma
Benchtop Mikrozentrifuge	Eppendorf
Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories Products
Light Cycler Version 1.0	Roche
Mikrowelle	Bosch
Schüttler	B. Braun Biotech International
Thermocycler (Mastercycler personal)	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
UV-Schirm	Laborgeräte Vetter GmbH

#### 3.1.2 Zellkultur

Geräte/Materialien	Firma
Autoklav 3850-EL	Systec Labortechnik
Deckgläser	Menzel-Gläser
Einwegpipetten	Sarstedt
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Leica DMRB
Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories Products
Objektträger	Menzel-Gläser
Pipettierhilfe	Eppendorf
Plastikröhrchen	Eppendorf
Skalpelle	B. Braun Aesculap AG+Co KG
Sterilbank	Heraeus Instruments
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zellkulturschalen: 96well, 24well, 6well, 6cm, 10cm	Nunc
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments

#### 3.1.3 Proteinbiochemie

Geräte/Materialien	Firma
Biofuge pico	Heraeus Instruments
Blottingkammer	Biorad
CD-Spektrometer	Jasko J-810
Centricon	Millipore
Eppendorfgefäß	Eppendorf
ESI-MS	Voyager DE STR
Filme: Super RX (chemilumineszente Signale), Super XM (Autoradiographie)	Fuji
French-press	Thermo Spectronic
Gelkammer	Biorad
Geltrockner	Savant

## Material und Methoden

Gläserner Homogenisator	B. Braun
HiLoad Superdex 75-Säule	Amersham Biosciences
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiovert 200M
Nickel-Nitrilotriessigsäure Superflow-Säule	Amersham Biosciences
PhosphorImager	Molecular Dynamics
96well Platten für Proteinbestimmung	Nunc
Photometer	Tecom Spectra
PVDF Immobilon, Transfermembran	Milipore
Überkopfschüttler	Scientific Industries Inc
Ultrazentrifuge Optima LE 80K	Beckmann
Spannungsquelle	Biorad
Teflon-Pistill	B. Braun
Whatmanpapier	Schleicher + Schuell
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann

### 3.2 Chemikalien und Lösungen

#### 3.2.1 Molekularbiologie

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Agarose		Amersham Biosciences
LB-Agarplatten	1 % Tryptone, 0,5% Yeast Extract und 0,5% NaCl in dH <sub>2</sub> O. pH 7,0 mit NaOH einstellen, 15 g/l Agar zusetzen und bei 120 °C und 1,2 bar für 20 min autoklavieren. Auf ca. 50 °C Abkühlen, Ampicillin zusetzen und Platten gießen	
Ampizillin		Roth
ATL Puffer		Qiagen
6xDNA Ladepuffer	30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau und 0,25% Xylencyanol FF in dH <sub>2</sub> O	
DNA T4 Ligase (5U/µl)		Roche
DNA T4 Ligasepuffer		Roche
DNAeasy Kit		Qiagen
DNA-Leiter (100bp)		Invitrogen
Fast Mix	Taq Polymerase, Reaktionspuffer, SybrGreen, dNTP	Roche
dNTP	10mM	Roche
LB Medium mit Ampicillin	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl pH=7.0, autoklavieren, 100µg/ml Ampicillin versetzt	
Nucleo Spin Extract Kit		Macherey-Nagel
Nucleobond AX 500 Kit		Macherey-Nagel
2,5xPCR Reaktionspuffer	0,06U/µl Taq Polymerase, 3,75mM MgCl <sub>2</sub> , Taq Polymerasepuffer	Eppendorf
peqGoldDNAPure		peqLab
Proteinase K		Qiagen
Pwo-Polymerase (1U/µl)		Roche
10x Pwo Polymerase Reaktionspuffer		Roche
SuperScriptII Kit		Invitrogen
T4 PNK		Metabion
T4-Polynukleotidkinase (PNK)-Puffer		Metabion

## Material und Methoden

Taq Polymerase (1U/ $\mu$ l)		Roche
10x Taq Polymerase Reaktionspuffer		Roche
TBE Puffer	9mM Tris-Borat und 2mM EDTA in dH <sub>2</sub> O	
Transformationspuffer	50mM CaCl <sub>2</sub> , 15% Glycerin, 10mM PIPES (Piperazin-1,4-bis (2- ethansulfonsäure) pH=6,6 (steril)	

### 3.2.2 Zellkultur

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
„Chase“-Medium	DMEM, 10% FCS, 1% 50U/ml Penicillin/50 $\mu$ g/ml Streptomycin, 2mM Methionin/Cysteinlösung	
Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)		Invitrogen
Fetal Calf Serum (FCS) für Embryonale Stammzellen <i>Fötales Kälberserum</i>		PAN-Biotech
Fetal Calf Serum (FCS) für alle anderen Medien <i>Fötales Rinderserum</i>		Invitrogen
G418 (200 $\mu$ g/ml)		Invitrogen
HAM's F12/DMEM	Mischung 1:1	Invitrogen
L-Glutamin (200mM)		Invitrogen
Gelatine	0.1% Lösung in dH <sub>2</sub> O	
HEPES (1M)		Invitrogen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)		Sigma
Horse Serum (HS) <i>Pferdeserum</i>		Invitrogen
Leukämie inhibitorischer Faktor (LIF) (10 <sup>7</sup> U/ml)		Chemicon
Lipofectamin 2000		Invitrogen
Medium für ES-Zellen	DMEM, 15% FCS, 2,2*10 <sup>5</sup> U/ml LIF, 12mM HEPES, 300 $\mu$ M $\beta$ - Mercaptoethanol, 6ml MEM, 1,2ml L-Glutamin, 1% P/S, 100 $\mu$ M nicht essentielle AS	
$\beta$ -Mercaptoethanol (50mM)		Invitrogen
Methionin/Cysteinlösung (400mM)		Roche
Minimal Essential Medium (MEM)		Sigma
NEB Puffer	100mM Kaliumacetat, 30mM HEPES pH=7.4, 2mM Magnesiumacetat	
Nicht-essentielle Aminosäuren (10mM)		Invitrogen
Oligofectamin		Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (P/S) (5000U/ml P, 5mg/ml S)		Invitrogen
PBS (steril)	140 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 1,75 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 mit HCl eingestellt in dH <sub>2</sub> O (autoklaviert)	
Poly-L-Lysin (100 $\mu$ g/ml)		Sigma
Promix	[ <sup>35</sup> S]Methionin/Cystein 175MBq in 500 $\mu$ l	Amersham Biosciences

## Material und Methoden

Proteaseinhibitor (PI) Complete	1Tablette in 1ml H <sub>2</sub> O lösen, 1:500 für Lysepuffer ansetzen	Roche
„Pulse“-Medium	MEM, 1% P/S, Promix	
TNE	10mM Tris pH=7,5, 250mM NaCl, 1mM EDTA	
TransIT TKO		Mirus
Trypsin-EDTA (1x)	0,5g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA	Invitrogen
Zeocin (200µg/ml)		Invitrogen

### 3.2.3 Proteinbiochemie

Chemikalie	Zusammensetzung	Firma
Acrylamid	40% Acrylamid-Bis-Acrylamid 37,5:1 in H <sub>2</sub> O	Q-BioGene
Amplify		Uptima, Interchim
APS (Ammonium Persulfat)	10% Stammlösung in dH <sub>2</sub> O	Roche
ATP	10mM in H <sub>2</sub> O	Roche
BCA Kit		Uptima, Interchim
Blockierungspuffer für Western Blot (WB)	5% Magermilchpulver in TBST	
Blocklösung für Immunfluoreszenz (IF)	1% Bovines Serumalbumin (BSA) in PBS	
Bovines Serumalbumin (BSA)		Uptima, Interchim
Complete PI (Proteinase Inhibitor)		Roche
Coomassielösung	0,25% Coomassie brillant blue, 40% Methanol, 10% Essigsäure	
Cycloheximid (CHX)	100µg in 1ml H <sub>2</sub> O lösen	Sigma-Aldrich
Cytotox Assaypuffer		Promega
Cytotox Stoplösung		Promega
E64 (10µM)		Sigma-Aldrich
ECLplus	Chemiluminiszenzreagenz A und B (Verdünnung 1:40)	Amersham
Eindeckellösung / Mowiol	15 (w/v) Mowiol 4-88 (Höchst), 50mg/ml DABCO in PBS	Kremer-Pigmente
Elektrophoresepuffer	25mM Tris, 0,2M Glycin, 0,1% SDS	
Entfärbelösung	10% Essigsäure, 25% Isopropanol	
Epoxomycin	1µM in DMSO	Calbiochem
Elutionspuffer	10mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 100mM NaCl (pH=7,5)	
γ-[ <sup>32</sup> P]ATP	150MBq in 150µl	Amersham Biosciences
Insulin	1µM in 0,01% HCl	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	100mM Stammlösung in H <sub>2</sub> O, verd. 1:1000 in LB-Medium	Roth
1x Kinasepuffer	25mM Tris pH=7,5, 5mM β-Glycerophosphat, 2mM DTT, 0,1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 10mM MgCl <sub>2</sub>	Cell Signaling
6x Lämmli-puffer -DTT	2% SDS, 60mM Tris pH=6,8, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau-Natriumsalz	
6x Lämmli-puffer +DTT	2% SDS, 60mM Tris pH=6,8, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau-Natriumsalz, 250mM DTT	
Leupeptin	50µM in H <sub>2</sub> O	Roche
Lysepuffer	1% Triton, TNE, Complete PI	Lysepuffer
Lysepuffer mit Phosphataseinhibitoren, N-Ethylmaleimid (NEM)	TNE, Complete PI, 1% NP-40, 100mM NaF, 10mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , 200µM NaVO <sub>3</sub> , 10mM NEM	
Myelin basisches Protein (MBP)		Sigma-Aldrich
MG132	10µM in DMSO	Calbiochem

## Material und Methoden

Mitotracker	CMXH <sub>2</sub> Ros	Molecular Probes
NEM	1M Stammlösung in Ethanol	Sigma-Aldrich
NaF	1M Stammlösung in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
NH <sub>4</sub> Cl	20mM Stammlösung in H <sub>2</sub> O	Merck
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	1M Stammlösung in H <sub>2</sub> O	Merck
NaVO <sub>3</sub>	2mM Stammlösung in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
NP-40/Igepal	10% (w/v) Stammlösung in dH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Nickel-Nitrilotriessigsäure Säulenmaterial		Qiagen
Organlysepuffer	2,3ml Saccharose (80%), 102mM DTT, Complete PI, 17,54ml 2xTE (2mM EDTA, 25mM Tris pH=7.4)	
Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG	1mg/ml Stammlösung in 12,5mM Natriumphosphat pH=7,6, 312mM NaCl, BSA, 20µg/ml Gentamycin	Promega
Peroxidase-gekoppelte anti-Maus IgG	1mg/ml Stammlösung in 12,5mM Natriumphosphat pH=7,6, 312mM NaCl, BSA, 20µg/ml Gentamycin	Promega
Ponceau S	0,1% (w/v) in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Protein Assay Kit		Biorad
Protein A Sepharose (PAS)	2mg PAS in 1ml 20% Ethanol lösen, 30µl PAS pro IP, vorher mit Lysepuffer gewaschen	Sigma-Aldrich
Protein G Sepharose (PGS)	2mg PGS in 1ml 20% Ethanol lösen, 30µl PGS pro IP, vorher mit Lysepuffer gewaschen	Amersham Biosciences
Proteinstandard: SeeBlue		Invitrogen
Puffer für Sammelgel	0.5M Tris-HCl pH=6,8	
Puffer für Trenngel	1.5M Tris-HCl pH=8,8	
SDS	10% Stammlösung in dH <sub>2</sub> O	Calbiochem
Silberfärbelösung Bio-Rad Silver Stain kit		Biorad
Stabilpuffer	5% Glycerin, 3mM DTT, 150mM NaCl, 20mM Tris (pH=8,0)	
„Stripping“-Puffer	62,5mM Tris-HCl, pH=6,7, 2% SDS, 0,7% β-Mercaptoethanol	
STEN	150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=7,6, 2mM EDTA, 0,2% NP-40	
STEN NaCl	500mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=7,6, 2mM EDTA, 0,2% NP-40	
STEN SDS	150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=7,6, 2mM EDTA, 0,2% NP-40, 0,1% SDS	
TBST	0,3M NaCl, 10mM Tris-HCl pH=7,6, 0,3% Triton X-100	
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin)		Merck
TNE	10mM Tris pH=7,4, 200mM NaCl, 1mMEDTA	
Transfer-Puffer	25mM Tris, 0,2M Glycin	
Triton X-100		Merck
Uptilight	Chemiluminiszenzreagenz A und B (Verdünnung: 1:20)	Uptima, Interchim

### 3.3 Antikörper (AK)

Detektiertes Protein	Spezies	IF	WB	IP	Firma
Akt	Kaninchen	1:100	1:1000	1:100	Cell Signaling
[T308-PO <sub>4</sub> ]Akt	Kaninchen	1:80	1:500	-	Cell Signaling
β-Aktin	Maus Klon AC-74	-	1:1000	-	Sigma
Ask-1	Kaninchen	1:500	1:1000	1:100	Santa Cruz
β-Catenin	Maus Klon 14	-	1:1000	-	BD Transduction Laboratories
DJ-1	Kaninchen	1:200	1:1000	1:100	Alphagenix
DJ-1 (1mg/ml)	Maus Klon 3E8	1:200	2,5µg/ml	-	Stressgen
DJ-1 (SN1130)	Kaninchen	1:200	1:1000	1:100	Prof. Peter Heutink
DJ-1 (SN1132)	Kaninchen	1:200	1:1000	1:100	Prof. Peter Heutink
DJ-1 (3407/3408)	Kaninchen Serum	1:200	1:1000	1:100	Eurogentec
β-Galactosidase (lacZ)	Maus	-	1:1000	-	Roche
GAPDH	Maus Klon 6C5	1:1000	1:4000	-	Ambion
HA-tag Anti-HA-Peroxidase (10U)	Maus Klon 3F10	-	50mU/ml	-	Roche
Myc-tag	Maus Klon 9E10	1:500	1:1000	1:400	Univ. Iowa hybridoma bank
Myc-tag	Kaninchen	1:200	1:1000	1:200	Santa Cruz
His-tag	Maus	-	1:1000	-	Qiagen
p53 (PAB 1801)	Maus Klon 11B2-C	1:100	1:500	1:100	Santa Cruz Biotechnol.

## Material und Methoden

PTEN	Kaninchen	1:100	1:1000	1:100	Cell Signaling
$\alpha$ -Tubulin	Maus Klon B5-1-2	-	1:2000	-	Sigma-Aldrich
V5-tag	Maus	1:500	1:5000	1:1000	Invitrogen

**Tabelle 3:** Liste mit Verdünnungen der im Western Blot (WB), der Immunfluoreszenz (IF) oder der Immunpräzipitation (IP) verwendeten Primärantikörpern. Alle AK wurden in Blockierungspuffer verdünnt.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für alle DJ-1 Mutanten wurde die cDNA von [wt]DJ-1V5/His als Vorlage verwendet, welche Peter Heutink (FU, Amsterdam) freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat. Falls keine anderen Angaben zur PCR gemacht werden, wurde das Pwo-DNA-Polymerase-Kit (Roche) und folgender Ansatz verwendet:

1 $\mu$ l cDNA Template (ca. 1 $\mu$ g)

1 $\mu$ l 3'-Oligonukleotid (100 $\mu$ M)

1 $\mu$ l 5'-Oligonukleotid (100 $\mu$ M)

1 $\mu$ l dATP-, dGTP-, dCTP-, dTTP-Mix (jeweils 10mM)

2,5  $\mu$ l Polymerase Pwo (1U/ $\mu$ l)

5 $\mu$ l Pwo-Reaktionspuffer komplett (10x)

mit dH<sub>2</sub>O auf 50 $\mu$ l Endvolumen auffüllen.

Die PCR-Ansätze wurden gemischt und in dem Thermocycler mit folgendem Programm prozessiert:

<b>95°C</b>	<b>5min</b>
30 Zyklen:	
95°C	30sek
52°C	50sek
70°C	30sek
<b>70°C</b>	<b>10min</b>

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1-2% (w/v) Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel 3.4.2). Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.4.3), mit entsprechenden Restriktionsenzymen inkubiert (vgl. Kapitel 3.4.4) und in die gewünschten Expressionsvektoren subkloniert (vgl. Kapitel 3.4.5). Die Konstrukte wurden bei GATC Biotech sequenziert.

### **3.4.2 Agarosegel-Elektrophorese**

Zur elektrophoretischen Trennung von linearisierten DNA-Fragmenten, überspiralierter 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 in einer Endkonzentration von 1µg/ml versetzt. Die Lösung wurde in eine Agarosegelkammer gegossen und ein Ladetaschenkamm eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Eine 100bp-DNA-Leiter diente zum Größenvergleich. Die DNA-Fragmente wurden bei 120V aufgetrennt.

### **3.4.3 Isolierung und Aufreinigung der DNA-Fragmente**

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell auf dem UV-Schirm ausgeschnitten und mit dem Nucleo Spin Extract Kit (Machery-Nagel) nach Anleitung des Herstellers aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt.

### **3.4.4 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen**

1µg aufgereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid-DNA wurde mit 10U entsprechendem Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Endvolumen von 30µl über Nacht bei 37°C im Inkubator verdaut. Die DNA-Fragmente wurden anschließend auf ein Gel aufgetragen (vgl. Kapitel 3.4.2), isoliert und gereinigt (vgl. Kapitel 3.4.3).

### **3.4.5 Ligation der DNA in entsprechende Plasmide**

Das verdaute und gereinigte DNA-Fragment wurde in das entsprechend linearisierte Plasmid mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (5U/µl) und entsprechendem Puffer inseriert. 100-200ng des Plasmids und 1-2µg DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 20µl angesetzt. Die Ligation erfolgte 1h bei Zimmertemperatur (ZT). Danach wurde der vollständige Ligationsansatz in den kompetenten *E. coli* Stamm DH5α

transformiert (vgl. Kapitel 3.4.7). Kompetente *E. coli* Zellen wurden nach Standardprotokoll (vgl. Kapitel 3.4.6) hergestellt.

### **3.4.6 Herstellung des kompetenten Bakterienstamms DH5 $\alpha$**

DH5 $\alpha$  wurden in 3ml LB-Medium ohne Ampicillin für 2-3h bis zu einer optischen Dichte von 0,2 bei 600nm Wellenlänge ( $OD_{600} = 0,2$ ) bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Die Bakterien wurden in einem Volumen von 200ml LB-Medium aufgenommen und nochmal 2-3h ( $OD_{600}=0,2$ ) inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis 10min lang gekühlt und anschließend mit 5000g/min 10min lang bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100ml Transformationspuffer resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde erneut mit 5000g/min, 10min lang bei 4°C zentrifugiert und in 10ml Transformationspuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden in 400 $\mu$ l Aliquots abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

### **3.4.7 Transformation des Ligationsprodukts in kompetente *E. coli***

Das Ligationsprodukt und eine Plasmidkontrolle ohne DNA-Fragment wurden mit 200 $\mu$ l DH5 $\alpha$  bei 4°C 10min lang inkubiert. Die Bakterien wurden 1min lang 42°C Hitzeschock ausgesetzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden sie auf LB-Agarplatten mit 100 $\mu$ g/ml Ampizillin (LB/Amp) ausgestrichen und über Nacht im Inkubator bei 37°C inkubiert. Die einzelnen Klone auf den LB/Amp-Platten wurden wie unter Kapitel 3.4.9 beschrieben weiterbehandelt.

### **3.4.8 Glycerinstocks von Bakterienklonen**

Ein Klon von der LB-Agarplatten wurde mit einer sterilen Pipettenspitzen entnommen und in 3ml LB-Medium + 100 $\mu$ g/ml Amp bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 600 $\mu$ l Bakteriensuspension mit 400 $\mu$ l einer 50%-Glycerinlösung gemischt und bei -80°C zur Lagerung eingefroren.

### **3.4.9 DNA-Isolierung aus Bakterienklonen in einer Minipräparation und anschließende Analyse**

Ein Bakterienklon auf der LB-Platte (vgl. Kapitel 3.4.7) wurde am nächsten Tag entnommen und die DNA in einer Mini-Präparation (Kit von Machery-Nagel) isoliert und mit Hilfe von Nucleospin-Säulen (Macherey-Nagel) nach Vorschrift des Herstellers gereinigt.

Die DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen auf positive Inserts untersucht (vgl. Kapitel 3.4.4) und dann zur Sequenzierung an GATC Biotech geschickt.

### **3.4.10 Maxipräparation von positiven Bakterienklonen**

Für größere DNA-Mengen wurde eine Maxipräparation mit dem Nucleobond AX 500 Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt.

### **3.4.11 Gerichtete Mutagenese**

#### **3.4.11.1 C-terminal V5-markierte DJ-1 Mutanten**

Es wurden folgende Mutanten mittels zweier PCR-Reaktionen hergestellt:

[L166P]DJ-1, [L166E]DJ-1, [V169P]DJ-1, [V169A]DJ-1, [V169I]DJ-1, [A178P]DJ-1, [V181P]DJ-1, [K182P]DJ-1, [L185P]DJ-1, [L187P]DJ-1 und die PK-assoziierte Mutante [E64D]DJ-1 (Hering et al., 2004).

Dabei wurde [wt]DJ-1V5/His als Vorlage verwendet und zwei unabhängige PCR-Reaktionen nach oben genannten Bedingungen (vgl. Kapitel 3.4.1) mit den Primern aus Tabelle 4 durchgeführt. Anschließend wurden beide PCR-Produkte als Vorlage für eine weitere PCR mit den Primern NcoI\_FWD und BamHI\_V5\_REV (siehe Tabelle 4) verwendet.

## Material und Methoden

<b>Mutation</b>	<b>Vorwärtsprimer</b>	<b>Rückwärtsprimer</b>
L166P	5'-CTTCGAGTTTGC GCCTGCAATTGTTGAA-3'	5'-TTCAACAATTGCAGGCGCAA ACTC AAG-3'
L166E	5'-CTTCGAGTTTGC GGAAGCAATTGTTGAA-3'	5'-TTCAACAATTGCTTCGGCAA ACTCGA AG-3'
V169P	5'-CGCTTGCAATTCCTGAAGCCCTGAA-3'	5'-TTCAGGGCTTCAGGAATTGCAAGCG-3'
V169I	5'-CGCTTGCAATTATTGAAGCCCTGAA-3'	5'-TTCAGGGCTTCAATAATTGCAAGCG-3'
V169A	5'-GCTTGCAATTGCTGAAGCCCTGAA-3'	5'-TTCAGGGCTTCAGCAATTGCAAGC-3'
A178P	5'-AAGGAGGTGCCGGCTCAAGTGA-3'	5'-TCACTTGAGCCGGCACCTCCTT-3'
V181P	5'-GCGGCTCAACCGAAGGCTCCA-3'	5'-TGGAGCCTTCGGTTGAGCCGC-3'
K182P	5'-GCTCAAGTGCCGGCTCCACTTGTT-3'	5'-ACAAGTGGAGCCGGCACTTGAGC-3'
L185P	5'-TGAAGGCTCCACCTGTTCTTAAAGAC-3'	5'-ATCTGGATCCGTCTTTAAGAACAGGT GGAGCCTT-3'
L187P	5'-CTCCACTTGTTCTTAAAGACAAGGG-3'	5'-ATCTGGATCCGTCTTTAGGAACAAGTG GAGCCTT-3'
ΔN173 /G174	5'-TTGAAGCCCTGAAGGAGGTGGCGG-3'	5'-CCGCCACCTCCTTCAGGGCTTCAA-3'
[ΔG/H]	5'-CCCGAATTCATGGGAATGGCTTCCAAA A GAGCT-3'	5'-AAAGCGGCCGCATTCAGGGCTTCAACA ATTGCAAGC-3'
[ΔH]	5'-CCCGAATTCATGGGAATGGCTTCCAAAAG AGCT-3'	5'-AAAGCGGCCGCGGTCCCAGGCCCCC-3'
E64D	5'-ATGCAAAAAAAGAGGACCATATGATGT GG-3'	5'-CCACATCATATGGTCCTCTTTTTTTTG CAT-3'

**Tabelle 4: Mutageneseprimer für C-terminal V5-markierte und N-terminal Myc-markierte DJ-1-Mutanten**

Das PCR-Programm wurde dann wie folgt geändert:

1 Zyklus	
Denaturierung	94°C, 5min
Amplifikation	52°C, 5min
Elongation	72°C, 5min
Denaturierung	94°C, 5min
30 Zyklen	
Denaturierung	94°C, 30sek
Amplifikation	52°C, 50sek
Elongation	72°C, 50sek
+ 1µl Taq Polymerase	
Verlängerte Elongation	72°C, 10min

Der 1. Zyklus vor der eigentlichen PCR diente dazu, die beiden PCR-Produkte amplifizieren zu können, da die beiden DNA-Stränge bei hohen Temperaturen getrennt werden und die Primer Zugang zu den Einzelsträngen haben. Dann wurde die eigentliche PCR (vgl. Kapitel 3.4.1) durchgeführt und am Ende wurde zusätzlich Taq Polymerase (1U/μl) dazugegeben, um einen T/A-Überhang zu gewährleisten. Dieser erlaubt die anschließende Ligation in den Klonierungsvektor pcDNA3.1/V5/His TOPO (vgl. Kapitel 3.4.5). Die Ligation des PCR-Produkts und Transformation in *E.coli*-Bakterien erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers des pcDNA3.1/V5/His TOPO Klonierungskits (Invitrogen).

Zur Beurteilung der Oxidierbarkeit und Stabilität von DJ-1 wurden Cystein-Mutanten generiert, die wie oben beschrieben, hergestellt wurden. Folgende Konstrukte wurden mit den in Tabelle 5 aufgeführten Primern amplifiziert: C106A, C106D, C106E, C46A, C53A, C106A/C53S und C106A/C46S/C53S.

<b>Mutation</b>	<b>Vorwärtsprimer</b>	<b>Rückwärtsprimer</b>
C106A	5'-CCGCCATCGCTGCAGGTC-3'	5'-GACCTGCAGCGATGGCGG-3'
C106D	5'-CCGCCATCGATGCAGGTC-3'	5'-GACCTGCATCGATGGCGG-3'
C106E	5'-CCGCCATCGAGGCAGGTC-3'	5'-GACCTGCCTCGATGGCGG-3'
C46A	5'-CCAGTACAGGCTAGCCGTGATG-3'	5'-CATCACGGCTAGCCTGTACT GG-3'
C53A	5'-ATGTGGTCATTGCTCCTGATGCC AG-3'	5'-CTGGCATCAGGAGCAATGACCA CAT-3'
C46S	5'-CCAGTACAGTCTAGCCGTGATG-3'	5'-CATCACGGCTAGACTGTACT GG-3'
C53S	5'-ATGTGGTCATTTCTCCTGATGCCAG-3'	5'-CTGGCATCAGGAGAAATGAC CACAT-3'

**Tabelle 5: Mutagenesepimer für C-terminal V5-markierte DJ-1-Cystein-Mutanten**

Die PCR-Produkte wurden anschließend ebenfalls mit den Primern NcoI-FWD und BamHI-V5\_REV wie oben beschrieben amplifiziert und in den pcDNA3.1/V5/HIS TOPO-Klonierungsvektor ligiert.

### 3.4.11.2 N-terminal Myc-markierte DJ-1-Mutanten

Es wurden folgende DJ-1 pcDNA3.1-Konstrukte (vgl. Kapitel 3.4.11.1) als Vorlage für eine Subklonierung in das pCMV-Plasmid verwendet: [L166P]DJ-1/V5, [L166E]DJ-1/V5, [V169P]DJ-1/V5, [V169I]DJ-1/V5, [K182P]DJ-1/V5, [L185P]DJ-1/V5. [wt]DJ-1/V5 diente als Vorlage für Myc/[wt]DJ-1, Myc/[ΔH]DJ-1, Myc/[ΔG/H]DJ-1 und Myc/[ΔN173/G174]DJ-1.

## Material und Methoden

Diese Konstrukte wurden mit den Primern EcoRI\_FWD und NotI\_REV (vgl. Tabelle 6) mit Standard-PCR Bedingungen (vgl. Kapitel 3.4.1) amplifiziert und wie unter Kapitel 3.4.5 und 3.4.7 beschrieben in den pCMV-Vektor kloniert (vgl. Tabelle 7).

Konstrukt	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Human DJ-1/V5	NcoI_FWD: 5'-AACCATGGGAATGGCTTCCAAAAG AGCTCTG-3'	BamHI_V5_REV: 5'-CGCGGATCCGATGCTTTAAGAA CAAGTGGAGCC-3'
Human Myc/DJ-1	EcoRI_FWD: 5'-ACGAATTCATGGCTTCCAAAAGAG CTCTGGT-3'	NotI_REV: 5'-ATTGCGGCCGCGTCTTTAAGAACAA GTGGAGCC-3'
Human DJ-1	NcoI_FWD: 5'-AACCATGGGAATGGCTTCCAAA GAGCTCTG-3'	BamHI_REV: 5'-AAATGGATCCGGTCCCAGGCC CC-3'

**Tabelle 6: Subklonierungsprimer für DJ-1-Konstrukte**

Name des Plasmids	Konstrukte in dem Plasmid	Einsetzbarkeit der Plasmide	Herkunft
pcDNA3.1/V5/His TOPO	DJ-1/V5	Säugerzellen	Invitrogen
pCMV	Myc/DJ-1	Säugerzellen	Clontech
pQE60	DJ-1/V5 und DJ-1/V5/His	<i>E. coli</i>	Qiagen
pSuper	DJ-1 knock-down	Säugerzellen	Prof. Thomas Tuschl (Rockefeller Universität, New York)
pcDNA 3.1 Zeocin	Selektionsmarker für Knock-down	Säugerzellen	Invitrogen
pcDNA4/Myc/His B	PIAS $\alpha$	Säugerzellen	Invitrogen
pMSSVLT		Säugerzellen	Prof. Paul Saftig (Biochemisches Institut, Kiel)

**Tabelle 7: Verwendete Plasmide für verschiedene Konstrukte**

### **3.4.12 RNA-Isolation und RT-PCR**

#### **3.4.12.1 RNA-Extraktion nach der Trizolmethode**

RNA aus Zellen oder Gewebe mit Hilfe des peqGold RNAPure Kits (PeqLab) nach der Vorschrift des Herstellers extrahiert.

#### **3.4.12.2 Allgemeine Beschreibung der Reversen Transkriptase (RT)-PCR**

Die unter Kapitel 3.4.12.1 isolierte RNA wurde mit dem SuperSkriptII-Kit (Invitrogen) in cDNA umgewandelt und konnte anschließend als Template für verschiedene PCR-Ansätze verwendet werden.

100-500ng der isolierten RNA, 1µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500µg/ml), 1µl dNTPs (10mM) wurden mit dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 12µl aufgefüllt, vermischt und 5min bei 65°C in einem Thermocycler inkubiert. Die Mischung wurde auf Eis gestellt, mit 4µl 5xFirstStrand-Puffer, 2µl DTT (0,1M) und 1µl RNaseOUT (40U/µl) versetzt und bei 42°C 2min lang im Thermocycler inkubiert. 1µl SuperScriptII wurde bei ZT vorsichtig zugesetzt und der Ansatz weitere 50min bei 42°C inkubiert, bevor die Reaktion 10min bei 70°C abgestoppt wurde.

Für die anschließende PCR wurden die Oligonukleotide aus Tabelle 6 verwendet.

#### **3.4.12.3 Allgemeine Beschreibung der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR)**

Aus 50ng mRNA, isoliert aus HEK 293T-Zellen (vgl. Kapitel 3.4.12.1), wurde cDNA mittels der RT-PCR Methode (vgl. Kapitel 3.4.12.2) generiert.

Diese cDNA wurde als Vorlage für eine quantitative PCR im LightCycler (Roche) verwendet. Die cDNA aller C-terminalen V5-markierten DJ-1-Mutanten (vgl. Tabelle 4) wurden als Vorlage verwendet und mit den DJ-1-spezifischen Oligonukleotiden NcoI\_FWD und BamHI\_V5\_REV (vgl. Tabelle 6) amplifiziert. In einem parallelen Ansatz wurde als Standard β-Aktin mit Hilfe der Oligonukleotide β-Aktin\_FWD (5'-CATGGAGAAAATCTGGCACCACACC-3') und β-Aktin\_REV (5'-TGGCCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3') amplifiziert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Wasser statt Template cDNA. Der Master-Mix für die PCR bestand aus je 0,1µl der beiden genannten Oligonukleotide (100µM), 14,8µl dH<sub>2</sub>O, 4µl Fast Mix (Fast Start DNA Taq Polymerase, Reaktionspuffer, SybrGreen und dNTPs, Roche). Diese Mischung wurde in eine vorgekühlte LightCycler-Kapillare pipettiert und mit je 1µl cDNA (50ng/µl) oder dH<sub>2</sub>O gemischt. Jede Kapillare wurde mit einem Stopper versehen und in

## Material und Methoden

einen Adapter überführt, der anschließend in eine Standard Benchtop-Mikrozentrifuge gestellt wurde und bei 700g 5sek lang zentrifugiert wurde. Das LightCycler-Karussell mit den Kapillaren wurde in das Instrument gestellt, und folgendes Programm wurde gestartet:

Prä-Inkubation:	95°C	10 min
45 Zyklen:		
Amplifikation:	95°C	10sek
	57°C	10sek
	72°C	10sek
Schmelzkurve		
Denaturierung:	95°C	20°C/sek
Amplifikation	65°C	15sek
Schmelzen	95°C	0.1°/sek
Abkühlen	40°C	0:30sek

Mit der LightCycler Software Version 4.0 wurden die Temperaturen des Crossing points (Cp) berechnet und Schmelz- und Amplifikationskurven erstellt.

### 3.4.13 DNA Isolierung aus Gewebe und Zellen zur Genotypisierung

DNA aus embryonalen Maushirnen und MEF-Zellen (vgl. Kapitel 3.5.7) wurde mit dem DNeasy Kit (Qiagen) isoliert.

Dazu wurden Maushirne in 360µl ATL-Puffer gegeben und mit 40µl Proteinase K versehen. Diese Gewebemischung wurde auf einem Thermomixer bei 55°C und 700U/min über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Hälfte des gelösten Hirnmaterials mit 200µl AI Puffer und 200µl Ethanol nach den Vorschriften des Herstellers weiterbehandelt. MEF-Zellen wurden aus einer 6cm-Zellkulturschale trypsiniert, abzentrifugiert (vgl. Kapitel 3.5.5) und in 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K auf dem Thermomixer bei 55°C und 700U/min etwa 10-20min lang geschüttelt, bis das Zellmaterial sich gelöst hat. Anschließend wurde nach den Vorschriften des Herstellers weiterverfahren.

### 3.4.14 Genotypisierung von DNA-Proben aus DJ-1 Knock-out-Mäusen

Die in Kapitel 3.4.13 isolierte genomische DNA wurde verwendet, um mittels einer PCR zu prüfen, ob die zugehörigen embryonalen Mausfibroblastenzellen (MEF) von heterozygoten oder homozygoten knock-out-Embryonen stammen.

## Material und Methoden

Es wurde folgender PCR-Ansatz mit den unten angegebenen Oligonukleotiden durchgeführt, die entweder [wt]DJ-1-DNA oder die verkürzte DNA der Knock-out DJ-1-Mutante amplifizieren:

10µl 2,5x PCR Reaktionspuffer

0,5µl mt\_REV 5'-CGGTACCAGACTCTCCCATC-3' (10µM)

0,5µl wt\_FWD 5'-AGGCAGTGGAGAAGTCCATC-3' (10µM)

0,5µl wt\_REV 5'-AACATACAGACCCGGGATGA-3' (10µM)

1µl DNA (50ng/µl)

Mit dH<sub>2</sub>O wurde die PCR-Reaktion auf 25µl aufgefüllt.

Die Lösung wurde gemischt und in einen Thermocycler gestellt, welcher vorher wie folgt programmiert wurde:

Initiale-Denaturierung	94°, 4min
35 Zyklen	
Denaturierung	94°C, 30sek
Amplifikation	58°C, 40sek
Elongation	72°C, 1min
Verlängerte Elongation	72°C, 7min

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 1% Agarosegel aufgetragen (vgl. 3.4.2).

### **3.5 Zellkultur**

#### **3.5.1 Kultivierung von Zellen**

Humane-Embryonale-Nierenzellen (HEK 293T), Affen-Nierenzellen (COS7), Ratten-Phäochromozytomzellen (PC12), MEF-Zellen, menschliche Neuroblastomazellen des Zellklons SH-SY5Y, murine immortalisierte dopaminerge Zellen (MN9D) und murine embryonale Stammzellen (ES) wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C in einem Inkubator kultiviert (vgl. Tabelle 8). Die entsprechenden Medien und Bedingungen sind ebenfalls in Tabelle 8 aufgeführt.

## Material und Methoden

<b>Zelllinie</b>	<b>Organismus</b>	<b>Medien</b>	<b>Firma</b>
ES Embryonale Stammzellen	Maus	DMEM + 15% FCS, 1,2mM L-Glutamin + 12mM HEPES + 1x nicht essentielle AS + 1% P/S + 600µM Mercaptoethanol + LIF	Prof. Wurst (GSF, München)
COS7 Nierenzellen	Affe	DMEM + 10% FCS + 1% P/S	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion
HEK 293E Embryonale Nierenzellen (enthält Ebnavirus)	Mensch	DMEM + 10% FCS + 1% P/S	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion
HEK 293T Embryonale Nierenzellen (enthält SV40 Virus)	Mensch	DMEM + 10% FCS + 1% P/S	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion
MEF Embryonale Fibroblasten	Maus	DMEM + 10% FCS + 1% P/S	Selbst angelegt
MN9D Immortalisierte DA- Neurone	Maus	Ham's F12/ DMEM + 10% FCS + 1% P/S	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion
PC12 Phäochromozytom- zellen	Ratte	DMEM + 10% FCS + 5% HS + 1% P/S	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion
SH-SY5Y Neuroblastomazellen	Mensch	Ham`s F12/ DMEM + 10% FCS + 1% P/S	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion

**Tabelle 8: Verwendete Zelllinien und Medien**

Die Zellen wurden in 10cm-Zellkulturschalen in verschiedenen Verdünnungen ausgesät und im Inkubator gezüchtet. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin von der Kulturschale gelöst. Nach der Zugabe von 2ml Medium und einem Transfer in ein 15ml-Röhrchen wurde zentrifugiert (5min, 1000g/min in der Megafuge-Zentrifuge von Heraeus Instruments). Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in entsprechendem Medium verdünnt und auf frische Zellkulturschalen für weitere Kultivierungen oder anstehende Experimente ausgesät.

### **3.5.2 Poly-L-Lysin-beschichtete Zellkulturschalen**

Für IF-Studien (vgl. Kapitel 3.6.3.1) wurden mit Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser verwendet, um die Zellen zu kultivieren. Poly-L-Lysin ist ein Polymer aus mehreren Lysinen, an denen Zellen besser haften können als auf dem unbeschichteten Glas.

Die Deckgläser wurden zunächst in Ethanol gewaschen und autoklaviert (120°C, 1,2bar, 20min). Dann wurden sie in eine Zellkulturschale gelegt, mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (10µg/ml) bedeckt und 2-3h lang bei ZT inkubiert. Anschließend wurden sie 5x mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und in Wasser aufbewahrt. Es wurde alles steril durchgeführt.

### **3.5.3 Transiente Transfektion von Zellen mit Lipofectamin 2000**

Das Transfektionsreagens Lipofectamin 2000 (Invitrogen) wurde zunächst mit Plasmid-DNA in einem DNA:Lipid-Verhältnis 1:2,5 vorinkubiert. Bei 80-90% Konfluenz wurden damit Zellen nach den Vorschriften des Herstellers transfiziert. Nach 24 bis 48h Inkubation wurden die transient transfizierten Zellen für die entsprechenden Experimente verwendet.

### **3.5.4 Stabile Transfektion von HEK 293E- und MN9D-Zellen**

Die stabile Transfektion wurde ebenfalls mit Lipofectamin 2000 durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.3). Im Unterschied zur transienten Transfektion wurde die cDNA vor der Verwendung linearisiert. Folgende Konstrukte wurden stabil transfiziert: [wt]DJ-1/V5, [L166P]DJ-1/V5, [E64D]DJ-1/V5 und [C106A]DJ-1/V5 im pcDNA3.1/V5/His TOPO-Vektor, der eine Neomycinresistenz besitzt. Das Antibiotikum Geneticin (G-418), ein Analog des Neomycinsulfats, wurde als Selektionsreagenz verwendet. 24 bis 48h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und das Pellet in 1ml Medium resuspendiert. Es wurden je 5µl, 10µl, 25µl, 50µl, 100µl, 250µl und 500µl der Suspension gemacht und in 10cm-Zellkulturschalen ausgesät. Dem Standardmedium (vgl. Tabelle 8) wurde zusätzlich 0,4mg/ml G-418 zur Selektion der transfizierten Klone zugesetzt. Auf den Schalen wuchsen nach 2-3 Wochen einzelne Zellklone, die mit einer Sterilpipette in eine 24-well-Zellkulturschale überführt wurden. Dort wurden sie bis zur Konfluenz kultiviert, in zwei 6cm-Zellkulturschale transferiert, wobei die eine weiter kultiviert wurde und die andere mittels Proteinisolation (vgl. Kapitel 3.5.5) auf Expression des exogenen Proteins getestet wurde.

Positive Zellklone wurden dann in 10cm-Schalen ausgesät und mit Hilfe des Selektionsmediums von 0,2mg/ml G-418 weiterkultiviert.

### 3.5.5 Zellyse zur Proteinisolation

Zellen wurden trypsiniert und pelletiert (vgl. Kapitel 3.5.1). Das Pellet wurde in 1ml PBS aufgenommen und bei 6000g/min für 5min abzentrifugiert. 100 bis 500µl Lysepuffer wurden zu dem Pellet gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut homogenisiert. Zur Lyse wurde 20min auf Eis inkubiert und 10min bei 13000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfröhrchen überführt und eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt (vgl. Kapitel 3.6.1.1).

### 3.5.6 Stabiler und transienter Knock-down von DJ-1 mit Hilfe von siRNA (short interfering RNA)

Für einen Knock-down von endogenem DJ-1 wurden zwei verschiedene technische Ansätze gewählt. Die erste Methode besteht aus einem Vektor (pSuper), dessen Insertion für siRNA-ähnliche DNA-Transkripte kodiert, die unter Kontrolle eines Polymerase III H1-RNA-Promotors stehen. Das genspezifische Insert wurde folgendermaßen hergestellt: Eine aus 19 Nukleotiden bestehende Sequenz, die im Zieltranskript, hier DJ-1, von der Firma Metabion gewählt wurde, wurde durch einen Spacer getrennt und mit der revers komplementären Sequenz verbunden. Das resultierende RNA-Transkript nimmt eine 19 Basenpaare lange „Stem-loop-Struktur“ an, indem es eine interne Faltung mit sich selbst eingeht (Brummelkamp et al., 2002).

Die Firma Metabion lieferte 2x64bp lange Oligomere (0,04µM), die die Basenpaare 270-289 des DJ-1-Proteins betrafen, zum Einbau in den Vektor pSuper. Zunächst wurden die Oligonukleotide in 50µl dH<sub>2</sub>O gelöst, und je 1µl von beiden Oligonukleotiden wurde mit 48µl Amplifizierungspuffer (NEB-Puffer) gemischt. Das Ganze wurde 4min bei 95°C, anschließend 10min bei 70°C inkubiert und langsam auf 4°C heruntergekühlt. Die Oligonukleotide und der pSuper-Vektor wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Hind III verdaut (vgl. Kapitel 3.4.4). Für die Phosphorylierung des Konstruktes und des Vektors wurden je 2µl des Verdaus mit 1µl T4 PNK-Puffer, 1µl 1mM ATP, 1µl T4 PNK und 5µl dH<sub>2</sub>O versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10min bei 70°C inaktiviert. Das phosphorylierte DNA-Konstrukt wurde dann in den pSuper-Vektor ligiert und in DH5α transformiert (vgl. Kapitel 3.4.5 und 3.4.7).

Klone wurden genommen und auf positive Inserts getestet (vgl. Kapitel 3.4.9). Dieses Konstrukt wurde dann mit Hilfe von Lipofectamin 2000 transient in HEK 293T-Zellen transfiziert (vgl. Kapitel 3.5.3). Zusätzlich wurden stabile Klone erzeugt, indem pSuper

zusammen mit pcDNA3 Zeocin in einem Verhältnis 10:1 transfiziert wurde (vgl. Kapitel 3.5.4). Das Plasmid pcDNA3 Zeocin musste zusätzlich zu pSuper in die HEK 293E-Zellen transfiziert werden, da dieser keine Selektionskassette besitzt. Es wurden Verdünnungen wie unter Kapitel 3.5.4 beschrieben hergestellt, die Zellen ausgesät und Kolonien, die gegen das Antibiotikum Zeocin (200µg/ml) resistent waren, in größere Zellkulturschalen transferiert. Anschließend wurden einzelne Klone auf ihre Knock-down-Effizienz überprüft.

Die zweite Methode für den Knock-down von DJ-1 besteht aus einer direkten Transfektion von siRNA. Hierfür lieferte die Firma Dharmacon siRNA (40µM), die gegen die Basenpaare 414-434 des *DJ-1*-Gens gerichtet waren. Es wurde eine 6well-Schale mit HEK 293T-Zellen ausgesät und bei 50-60% Konfluenz transfiziert. Als Transfektionsagens wurde Oligofectamin gewählt. Es wurden 48µl OptiMEM und 12µl Oligofectamin 10min lang bei ZT und 6µl siRNA und 200µl OptiMEM in parallelen Ansätzen inkubiert. Beide Ansätze wurden vereinigt und 20min bei ZT inkubiert. Die Mischung wurde mit 128µl OptiMEM aufgefüllt und auf die Zellen verteilt.

Es wurde ein zweites Transfektionsreagenz verwendet, um die Transfektionseffizienz zu steigern. Dazu wurden 200µl OptiMEM und 6µl TransIT TKO 10min bei ZT inkubiert. Anschließend wurden die siRNA-Proben, die vorher 1:20 verdünnt wurden, dazugegeben und der Ansatz weitere 20min bei ZT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen verteilt.

Die oben beschriebene Transfektion mit Oligofectamin und TransIT TKO wurde noch einmal wiederholt. Dabei wurden die Zellen erneute ausgesät (vgl. Kapitel 3.5.1) und nach der oben beschriebenen Methode behandelt. Die Mehrfachtransfektion diente zur Steigerung der Knock-down-Effizienz.

### **3.5.7 Anlegen und Immortalisieren von MEF-Zellkulturen**

Maus-Embryonen (Embryonalstadium E12-E15) wurden aus den anästhesierten, schwangeren Mäusen herauspräpariert und einzeln in Schalen mit PBS gelegt. Die Embryohülle wurde entfernt, der Kopf abgetrennt, das Gehirn entnommen und für die Genotypisierung (vgl. Kapitel 3.4.14) eingesetzt.

Nach Entfernen der roten Organe wie Herz, Leber und Milz wurden die Körper der Embryonen in eine 6well-Zellkulturschale gelegt, in der 600µl DMEM mit 50% FCS vorgelegt war. Der Körper wurde mit einem sterilen Skalpell zerkleinert, die Schalen in einen Inkubator gestellt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Aus den zerschnittenen

Gewebeteilen wuchsen MEF-Zellen. Die Zellen wurden erst in 6cm-Schalen und sobald sie konfluent waren in 10cm-Schalen überführt,. Das Serum-Supplement wurde nach 3 Tagen auf 30% FCS und nach weiteren 3 Tagen auf 10% FCS reduziert.

Anschließend wurden die Zellen in 6cm-Schalen ausgesät und immortalisiert. Hierfür wurden die Zellen mit Lipofectamin 2000 und 4 $\mu$ g eines Plasmids pMSSVLT (vgl. Tabelle 7), welches das SV40 large T Antigen trägt, transfiziert (vgl. Kapitel 3.5.3). Nach ca. 40 bis 50 Passagen wurden die Zellen für weitere transiente Transfektionen und anschließende Experimente verwendet.

### **3.5.8 Lentivirale Transduktion von MEF-Zellen**

Freundlicherweise wurden uns folgende lentiviralen Vektoren von Prof. Aebischer (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt: GFP (grün fluoreszierendes Protein) /[wt]DJ-1, GFP/[L166P]DJ-1 (unpubliziert) und GFP-Kontrollvektor (Deglon et al., 2002).

Viren eignen sich besonders für den Gentransfer in schwer transfizierbare Zellen, wie primäre MEF-Zellen oder ES-Zellen. Die Transduktion der Zellen wurde in einem speziell dafür hergerichteten S2-Laboratorium durchgeführt. Die Viren wurden schnell aufgetaut und in Wasser wie folgt verdünnt: 1:50, 1:100, 1:500. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Viren sollte vermieden werden, da die Transduktionseffizienz sinken könnte. Die primären MEF-Zellen wurden in 24well-Schalen ausgesät und mit den entsprechenden Verdünnungen in einem doppelten Ansatz transduziert. Die Zellen waren hierfür ca. 60-70% konfluent. Da der lentivirale Einbau in die Zelle ein sehr schneller Prozess ist, konnte das Medium nach 6h gewechselt werden. Nach 48h wurde die Transduktionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Anschließend wurde eine Proteinlyse (vgl. Kapitel 3.5.5) durchgeführt, um die transduzierten DJ-1-Konstrukte proteinbiochemisch nachweisen zu können (vgl. Kapitel 3.6.1.3 und 3.6.1.4).

## **3.6 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.6.1 Allgemeine Methoden**

#### **3.6.1.1 Proteinkonzentration nach Bradford**

Nach der Proteinisolation aus Zellen (vgl. Kapitel 3.5.5.) wurde die Gesamtproteinmenge mit Hilfe des Protein Assay Kits (Biorad) nach der Methode von Bradford gemessen. Dazu wurden 498 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O mit 2 $\mu$ l Proteinlysat vermischt, 400 $\mu$ l dieser Proteinmischung mit 200 $\mu$ l einer 1:4 Mischung des Protein-assay Kits und dH<sub>2</sub>O in eine Einwegküvette gegeben

und 5min inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 595nm wurde anschließend die Extinktion gemessen. Parallel wurde unter Verwendung einer BSA-Standardlösung eine Kalibrierkurve erstellt, mit Messpunkten zwischen 2 und 10µg BSA. Anhand der linearen Eichkurve wurde die gesuchte Gesamtproteinmenge berechnet.

### **3.6.1.2 Proteinkonzentration nach dem Bicinchoninic Acid Assay (BCA)**

Je 10µl einer verdünnten Proteinlösung wurden in einer Doppelbestimmung auf je 200µl einer 50:1 Verdünnung aus BCassay-Reagenz A und B (Uptima, Interchim) versetzt. Zusätzlich wurden Verdünnungen einer BSA-Standardlösung zwischen 50µg/ml und 1,5mg/ml in einer Doppelbestimmung angesetzt und mit demselben BCA-Reagenz versetzt. Die Proben wurden 30min lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562nm photometrisch bestimmt und daraus die Proteinkonzentration der Probe durch Extrapolation der Eichkurve ermittelt.

### **3.6.1.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die eindimensionale Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen und trennt diese nach ihrer molekularen Größe auf. Zur SDS-PAGE wurde das Minigelsystem von Biorad verwendet, welches einen Sammelgelbereich von 1cm und einen Trenngelbereich von 7cm aufweist. Es wurden Gele mit 10 Probenfächerchen und einer Dicke von 0,75mm oder Gele mit 15 Probenfächerchen und 1,5mm Dicke eingesetzt.

Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel ist in Tabelle 9 angegeben. Dabei bewirkt die steigende Acrylamidkonzentration eine erhöhte Vernetzung des Gels und damit eine verbesserte Auftrennung von kleinen Proteinen. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden 15%ige dicke Gele verwendet, die im Bereich zwischen 20 bis 30kDa gut auftrennen und daher zum Nachweis von DJ-1 geeignet sind.

## Material und Methoden

<b>Trenngel</b>	<b>10%</b>	<b>12,5%</b>	<b>15%</b>
dH <sub>2</sub> O	12,88ml	10,76ml	7,6ml
30% Acrylamid	10,8ml	12,84ml	16ml
1,5M Tris pH=8,8	8ml	8ml	8ml
10% SDS	320µl	320µl	320µl
TEMED	16µl	16µl	16µl
10% APS	108µl	108µl	108µl
<b>Sammelgel</b>			
dH <sub>2</sub> O	5,6ml	5,6ml	5,6ml
30% Acrylamid	1,6ml	1,6ml	1,6ml
0,5M Tris pH=6,8	2,5ml	2,5ml	2,5ml
10% SDS	100µl	100µl	100µl
TEMED	10µl	10µl	10µl
10% APS	33,2µl	33,2µl	33,2µl

**Tabelle 9: Zusammensetzung für je 4 dicke Gele mit entsprechender Polyacrylamidkonzentration**

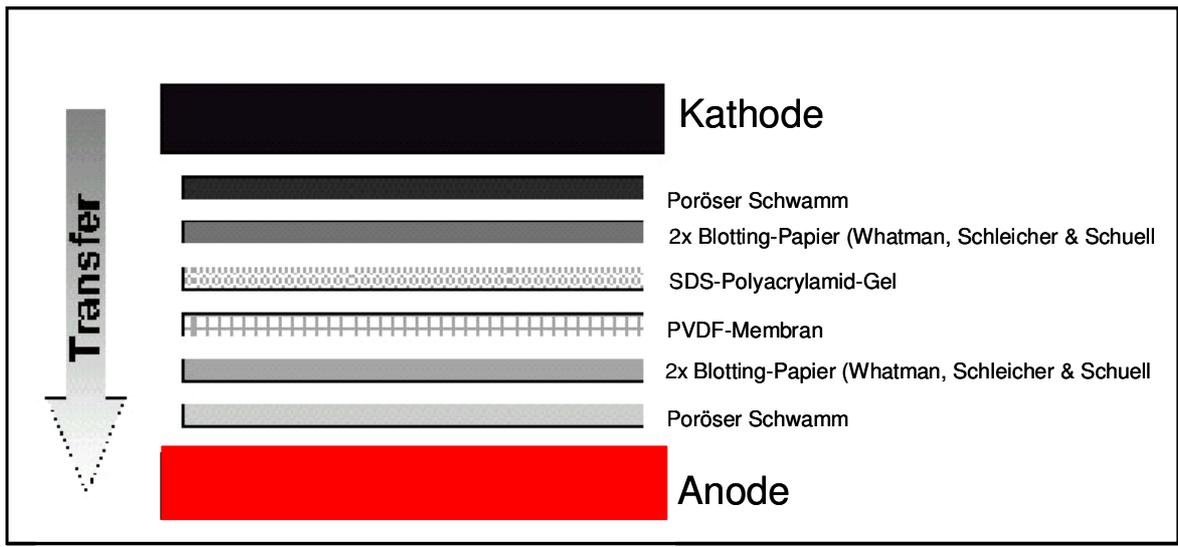
Die Gelplatten wurden der Herstellerbeschreibung entsprechend in den Gießständer eingebaut, mit Trenngel-Lösung bis ca. 2cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes befüllt, und die obere Schicht mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde das Isopropanol dekantiert, mit einem Whatmanpapier die restliche Flüssigkeit aufgesaugt und die Sammelgel-Lösung auf das Trenngel pipettiert. Ein entsprechender Probenkamm wurde eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die entsprechende Gelkammer eingebaut und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Der Kamm wurde entfernt.

Die Proteinproben wurden, wenn nichts anderes angegeben ist, auf 25µg/µl Gesamtproteinmenge eingestellt und mit 20µl 6fach Lämmli-puffer versetzt. Die Proben wurden dann bei 95°C 5min lang gekocht und bei 13000g/min 1min lang zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Probentaschen des Gels pipettiert.

Als Molekulargewichtsstandard wurden 5µl Standardproteinmarker geladen. Die Gelkammer wurde mit einer Spannungsquelle verbunden und die Elektrophorese bei einer Spannung von 120V durchgeführt.

### 3.6.1.4 Western Blot Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese in einer Transferkammer auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) transferiert, die vorher kurz mit Methanol benetzt und in Transfer-Puffer inkubiert wurde. Die verwendeten porösen Schwämme und Blotting-Papiere (Whatman, Schleicher & Schuell) wurden vor dem Transfer ebenfalls in Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transferaufbau ist im Folgenden dargestellt (vgl. Abbildung 17).



**Abbildung 17: Versuchsanordnung zum Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran**

Nach dem Elektrotransfer bei 0.4A konstantem Strom wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h bei ZT in Blockierungspuffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 1h bei ZT oder über Nacht bei 4°C mit in Blockierungspuffer verdünntem primärem AK inkubiert (vgl. Tabelle 3). Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST erfolgte die Inkubation der Membran mit dem passenden Peroxidase-gekoppelten sekundären AK (vgl. 3.6.1.6) für 45min bei ZT. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen. Zum Nachweis wurden je nach Stärke der Chemilumineszenz-Signale entweder Uptilight (Uptima, Interchim) für stärkere Signale oder ECLplus (Amersham) für schwächere Signale nach den Beschreibungen des Herstellers verwendet und auf Röntgenfilmen (Super RX) detektiert.

### 3.6.1.5 „Strippen“ von Western Blots

Um eine PVDF-Membran nach dem Blotten mit verschiedenen AK zu analysieren, wurden diese in „Stripping“-Puffer bei 50°C 30min lang im Wasserbad geschwenkt. Anschließend

wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen und erneut für einen immunchemischen Nachweis verwendet (vgl. Kapitel 3.6.1.4).

### **3.6.1.6 Antikörper**

In Kapitel 3.3 sind die verwendeten AK mit den entsprechenden Verdünnungen für alle Anwendungen beschrieben. Beide Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus IgG und anti-Kaninchen IgG) wurden 1:10000 in Blockierungspuffer verdünnt.

Zur Herstellung des polyklonalen DJ-1-spezifischen AK 3407 und 3408 wurde rekombinantes DJ-1-Protein in *E. coli* hergestellt und gereinigt (vgl. Kapitel 3.6.5.1) und an die Firma Eurogentec geschickt. Je 400µg des aufgereinigten Proteins wurden zur Immunisierung zweier Kaninchen (3407 und 3408) verwendet. Nach dem Immunisierungsplan der Firma Eurogentec erfolgte nach je zwei Wochen eine erste und zweite Auffrischung der Injektionen und nach einem Monat bzw. drei Monaten die dritte und vierte Auffrischung. Drei oder vier Tage nach der Injektion wurden Serumproben entnommen, die als Primärantikörper im Western Blot getestet wurden.

### **3.6.1.7 Coomassie-Blaufärbung von Polyacrylamid-Gelen**

Zum Gesamtproteinnachweis wurden Gele in einer Coomassielösung 30min lang bei ZT geschwenkt. Danach wurde mit Entfärbelösung 4-5Std oder über Nacht entfärbt, zweimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und auf einem Gelrockner bei 80°C 1h getrocknet.

### **3.6.1.8 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen**

Zum Proteinnachweis von Proteinmengen bis zu 50ng wurde eine Silberlösung (Biorad) verwendet. Die Färbung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Anschließend wurde das Gel wie unter Kapitel 3.6.1.7 beschrieben, getrocknet.

### **3.6.1.9 Ponceau S-Färbung von Western Blots**

Zum Gesamtproteinnachweis auf Western Blots wurde Ponceau S verwendet. Western Blot-Membran wurden 10 Minuten mit einer Ponceau-S-Lösung geschwenkt und mit Wasser so lange gewaschen, bis die Proteinbanden auf den Blots gut zu erkennen waren.

### **3.6.1.10 Analyse radioaktiv markierter Proteine**

Es wurden zwei Radio-Isotope zur Markierung von Proteinen eingesetzt: <sup>35</sup>S in Form einer Cystein/Methionin-Mischung (Promix) in „Pulse-Chase“-Experimenten (vgl. Kapitel

3.6.2.1) und  $^{32}\text{P}$  in Form von ATP, welches in *in vitro* Kinase-Experimenten (vgl. Kapitel 3.6.4.4) verwendet wurde.

Radioaktiv markierte Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Signalverstärkung, des niederenergetischen Strahlers  $^{35}\text{S}$  wurden Gele 30min in Fixierlösung und anschließend 30min in Amplify inkubiert. Nach 1h bei  $80^{\circ}\text{C}$  im Gelrockner wurde ein Röntgenfilm (BioMax Super XM) zum Nachweis der radioaktiv markierten Proteine auf das Gel gelegt und in einer Filmkassette bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

Gele, deren aufgetrennte Proteine inkorporiertes  $^{32}\text{P}$ -Signal trugen, wurden mit Coomassie gefärbt (vgl. Kapitel 3.6.1.7), entfärbt und auf dem Gelrockner getrocknet. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (BioMax, Super XM) auf das Gel aufgelegt und bei ZT bis zur gewünschten Signalintensität belichtet.

### **3.6.1.11 Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine**

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden nach Trocknen auf dem Gelrockner und der Entwicklung eines Filmes (vgl. Kapitel 3.6.1.10) im PhoshoImager quantifiziert. Die Gele wurden in eine PhosphoImager-Kassette gelegt und mit einer radioaktivitätssensitiven Folie inkubiert. Diese Folie kann radioaktive Signale aufnehmen und erlaubt eine Auswertung im PhosphoImager. Die radioaktiven Banden mit Hilfe der Software ImageQuant quantifiziert. Die Messungen wurden in Mehrfachbestimmungen durchgeführt, Mittelwerte gebildet, Standardabweichungen berechnet, statistisch mit dem Student t-test ausgewertet und anschließend mit dem Microsoft-Programm Excel grafisch dargestellt.

### **3.6.1.12 Immunpräzipitation (IP)**

Zur Anreicherung eines gewünschten Proteins wurden IPs durchgeführt, dabei bindet das gewünschte Protein an einen spezifischen AK, der seinerseits an eine immobile Phase (Protein A-Sepharose für polyklonale AK bzw. Protein G-Sepharose für monoklonale AK) anhaftet. Hierfür wurden Gesamtzelllysate mit  $30\mu\text{l}$  immobiliser Phase versetzt und 1h bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die immobile Phase bzw. unspezifisch daran gebundene Proteine wurden bei  $6000\text{g}/\text{min}$  5min lang abzentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde mit der entsprechenden AK-Menge (vgl. Tabelle 3) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend 1-2h mit  $30\mu\text{l}$  der entsprechenden immobilisen Phase versetzt.

Der Überstand wurde bei 6000g/min 5min lang abzentrifugiert und, wenn nichts anderes angegeben ist, je einmal mit je 500µl STEN-NaCl-Puffer, 500µl STEN-SDS-Puffer und STEN-Puffer gewaschen. Die IP wurde in 40µl 2x Lämmli-puffer aufgenommen, bei 95°C für 5min inkubiert und abzentrifugiert (13000g/min, 1min). Anschließend wurden die Proben auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen (vgl. Kapitel 3.6.1.3) und auf einen Western Blot transferiert (vgl. Kapitel 3.6.1.4) oder mit Coomassielösung gefärbt (vgl. Kapitel 3.6.1.7).

### **3.6.2 Stabilitätsstudien der DJ-1-Mutanten**

#### **3.6.2.1 Metabolische Markierung von DJ-1-Mutanten („Pulse-Chase“-Experimente)**

HEK 293T-Zellen wurden in 6cm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert und transient mit DJ-1 C-terminalen Mutanten transfiziert (vgl. Kapitel 3.5.3). Nach 24h wurden diese Zellen mit je 2ml „Pulse“-Medium für 1h vorinkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit je 3ml „Pulse“-Medium versetzt, welches 7,5MBq/ml [<sup>35</sup>S]Cystein/Methionin enthielt. Nach 3h Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2ml „Chase“-Medium gewaschen und anschließend mit 3ml „Chase“-Medium für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit 800µl Lysepuffer versetzt. Das Lysat wurde von der Zellkulturschale gespült, in ein Eppendorfröhrchen überführt und auf Eis 15min lang inkubiert. Anschließend wurde das Lysat vom proteinhaltigen Überstand bei 13000g/min 10min abzentrifugiert, um die unlöslichen Zellreste abzutrennen

Diese Prozedur wurde direkt nach der Zugabe des „Chase“-Mediums nach 2h, 5h, 10h und 24h wiederholt. Das markierte DJ-1-Protein wurde mit dem AK anti-V5 in einer IP (vgl. Kapitel 3.6.1.12) isoliert. Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt, ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel aufgelegt (vgl. Kapitel 3.6.1.10) und quantifiziert (vgl. Kapitel 3.6.1.11). Die Halbwertszeit metabolisch markierter Proteine wurde durch nicht-lineare Regression ( $y=e^{-kt}$ ) der ImagQuant-Werte mit dem Programm ORIGIN errechnet.

### **3.6.2.2 Inhibitorexperimente für die Proteinsynthese und den Proteinabbau von DJ-1**

HEK 293T-, SH-SY5Y- und MN9D-Zellen (vgl. Tabelle 8) wurden in 6cm-Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert (vgl. Kapitel 3.5.1). Es wurden eukaryotische DJ-1-Expressionskonstrukte in entsprechenden Mengen mit Lipofectamin 2000 transient transfiziert (vgl. Kapitel 3.5.3). Nach 48h wurden die transfizierten Zellen mit folgenden Inhibitoren behandelt: 100µg/ml Cycloheximid (CHX), 10µM MG132 oder 1µM Epoxomycin. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen in dem unter Kapitel 3.5.5 beschriebenen Lysepuffer lysiert und die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode gemessen (vgl. Kapitel 3.6.1.1). Je 25µg Gesamtproteinmenge wurden für eine 15% SDS-PAGE verwendet und anschließend Western Blots durchgeführt (vgl. Kapitel 3.6.1.3 und 3.6.1.4). Die Membranen wurden sequenziell mit spezifischen AK gegen DJ-1, einem Standardprotein ( $\alpha$ -Tubulin oder  $\beta$ -Aktin) als Ladekontrolle und  $\beta$ -Catenin als Positivkontrolle für die Wirksamkeit der Proteasominhibitoren Epoxomycin und MG132 (vgl. Tabelle 3) detektiert.

### **3.6.3 Expressionsmuster und Lokalisationsstudien von DJ-1**

#### **3.6.3.1 IF-Studien zur Lokalisation von DJ-1 in Zellen**

HEK 293T- und COS7-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät (vgl. Kapitel 3.5.2) und auf diesen mit Lipofectamin 2000 nach der Vorschrift des Herstellers transfiziert (vgl. Kapitel 3.5.3). 48h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 4% Paraformaldehyd 20min bei ZT fixiert. Danach wurde erneut 3x mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellen 0,1% Triton X-100 auf die Deckgläser pipettiert. Nach 5min Inkubation und weiterem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser in eine mit Alufolie umhüllte Zellkulturschale auf Parafilm gelegt und mit 100µl Blocklösung bedeckt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach 1h Inkubationszeit wurde die Lösung vorsichtig abpipettiert und mit 100µl in Blocklösung verdünntem Primärantikörper inkubiert (vgl. Tabelle 3). Die Primärantikörperlösung wurde anschließend abgesaugt, und die Zellen wurden 5x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 100µl 1:300 (anti-Kaninchen, polyklonal) oder 1:500 (anti-Maus, monoklonal) in Blocklösung verdünnte Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper (Alexa 555 und Alexa 488) gegen die IgG-Spezies der Primärantikörper auf die Zellen pipettiert und 1h bei Dunkelheit inkubiert. Alexa555

emittiert nach Anregung mit 553nm Fluoreszenz bei 568nm (rotes Licht), Alexa 488 hat eine Anregungswellenlänge von 493nm und emittiert bei 520nm (grünes Licht). Nach 4x Waschen mit PBS und einmal mit dH<sub>2</sub>O, wurden die Deckgläschen mit dem Zellpräparat nach unten mit einem Tropfen Eindeckellösung (Moviol) auf einen Objektträger gepresst. Die Fluoreszenzpräparate wurden nach dem Aushärten der Eindeckellösung im Leica DMRB Fluoreszenzmikroskop mit dem 100/1.3 Immersionsöl-Objektiv betrachtet. Mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera wurden mit der Software MetaView Imaging Aufnahmen gemacht.

### **3.6.3.2 Expressionsmuster in Organen und Hirnregionen der Maus**

Es wurden verschiedene Organe einer Mäusesektion sowie Hirnteile von DJ-1 Knock-out-Mäusen und DJ-1-Kontrollmäusen in einem Organlysepuffer homogenisiert. Dazu wurde ein motorisierter gläserner Homogenisator mit einem Teflon-Pistill verwendet. Anschließend wurde 1% Triton X-100 zu dem Homogenat gegeben und mehrfach durch eine sehr feine Nadel (23gauge) passiert. Das Lysat wurde mit 80.000g/min 1h bei 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert und 15µg des Überstands auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (vgl. Kapitel 3.6.1.3). Anschließend wurden die Proteine auf dem SDS-Gel auf einen Western Blot transferiert (vgl. Kapitel 3.6.1.4) und mit entsprechenden Antikörpern (vgl. Tabelle 3) detektiert.

### **3.6.4 Funktionelle Studien von DJ-1**

#### **3.6.4.1 Proteaseinhibitoren und lysosomale Inhibition von DJ-1**

HEK 293T-Zellen wurden in 6cm-Schalen ausgesät und transient mit DJ-1-Expressionskonstrukten transfiziert (vgl. Kapitel 3.5.3). Nach 48h wurden die Zellen mit folgenden Proteaseinhibitoren behandelt: 50µM Leupeptin, 10µM E64 oder mit 20mM NH<sub>4</sub>Cl als lysosomalen Inhibitor. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde Protein aus den Zellen isoliert (vgl. Kapitel 3.5.5). Die Gesamtproteinmenge wurde nach der Bradfordmethode bestimmt (vgl. Kapitel 3.6.1.1) und Proteinproben gleicher Konzentration auf ein Gel aufgetragen. Nach einem anschließenden Western Blot wurden die Membranen immunchemisch untersucht (vgl. Kapitel 3.6.1.3 und 3.6.1.4).

### **3.6.4.2 Zytotoxizitätsstudien von DJ-1 in Zellen unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Einfluss**

Homozygote DJ-1 Knock-out-MEF-Zellen (vgl. Kapitel 3.5.7) wurden in 6cm-Schalen ausgesät und mit N-terminal- bzw. C-terminal-markierten DJ-1-Mutanten transfiziert (vgl. 3.5.3). Nach 24h wurden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml Medium resuspendiert und bei einer Verdünnung von 1:1000 in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Je 10000-20000 Zellen wurden pro Vertiefung in einer 96well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden erneut 24h kultiviert und 15h mit 20µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit 9% Triton X-100 45min im Inkubator in einer Vierfachbestimmung lysiert. Je 50µl Überstand von lysierten und nicht lysierten Zellen wurde in eine frische 96well-Platte überführt und 30min lang mit je 50µl Cytotox96-Assaypuffer im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50µl Stopplösung abgestoppt. Bei einer Wellenlänge von 490nm wurde die Extinktion der einzelnen Proben in einem Photometer gemessen. Die Proben wurden in einer Vierfachbestimmung gemessen und die Zytotoxizität prozentual berechnet. Dabei wurden die Extinktionen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen relativ zu den mit Triton X-100 lysierten Zellen als Maximalwert der maximal mögliche LDH-Ausschüttung berechnet und der Mittelwert bestimmt. Die Werte wurden prozentual berechnet und in einem Säulendiagramm mit Fehlerindikatoren grafisch mit dem Microsoft-Programm Excel dargestellt.

### **3.6.4.3 Akt Phosphorylierung**

Homozygote DJ-1 Knock-out-MEF-Zellen wurden in 6cm-Schalen ausgesät und mit N-terminal-markierten DJ-1-Mutanten transfiziert (vgl. Kapitel 3.5.1 und 3.5.3). Die Zellen wurden über Nacht mit Medium ohne Glucose behandelt und ein Teil 5min lang mit 1µM Insulin behandelt, während der andere Teil unbehandelt blieb. In weiteren Versuchen wurden die Zellen direkt für 30min mit 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, während der andere Teil unbehandelt blieb. Anschließend wurden behandelte und unbehandelte Zellen auf Eis gestellt, mit PBS gewaschen und mit je 800µl Lysepuffer plus Phosphataseinhibitor und NEM versetzt. Das Lysat wurde in Eppendorfgefäße überführt, 15min auf Eis gestellt und 10min mit 13000g/min bei 4°C abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde nach der Bradfordmethode die Gesamtproteinmenge bestimmt (vgl. Kapitel 3.6.1.1). Es wurden je 40µg Protein auf je 4 SDS-Polyacrylamid Gele aufgetragen (3x 15% SDS, 1x 10% SDS). Die Proben des 10% SDS-Gels wurden mit Lämmli-puffer ohne DTT versetzt und nicht

aufgekocht, um oxidierte und nicht oxidierte Proteinaddukte zu trennen. Die übrige Proteinlösung wurde in einer IP wie unter Kapitel 3.6.4.4 beschrieben, weiterbehandelt.

### 3.6.4.4 Ask-1 Immunokomplex-Kinase-Assay

Die übrige Proteinlösung wurde wie unter Kapitel 3.6.4.3 beschrieben mit je 30µl PAS und Ask-1-AK (vgl. Tabelle 3) versetzt und über Nacht im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die IP-Proben mit 6000g/min 5min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dazu wurden die Proben dreimal mit Lysepuffer, einmal mit dH<sub>2</sub>O und einmal mit Kinasepuffer gewaschen. Das Pellet wurde anschließend mit 27µl 1xKinasepuffer, 1µl 10mM ATP, 1µl 10MBq/µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP und 1µl 10µg/µl Myelin basisches Protein (MBP) als Substrat für die *in vitro* Phosphorylierung versetzt. Die Proben wurden 20min bei 37°C inkubiert und anschließend die Reaktionen mit je 10µl 6x Lämmli-puffer gestoppt. Die Proben wurden 5min bei 95°C aufgekocht, abzentrifugiert und auf zwei dünne 15% SDS-Polyacrylamid Gele aufgetragen. Ein Gel wurde mit Coomassielösung behandelt (vgl. Kapitel 3.6.1.7) und die Proteine des anderen Gels auf eine PVDF-Membran geblottet (vgl. Kapitel 3.6.1.4). Das Coomassie-gefärbte Gel wurde anschließend im Geltrockner getrocknet, und ein Röntgenfilm aufgelegt (vgl. Kapitel 3.6.1.10). Die Membran wurde mit DJ-1-spezifischen und Ask-1-spezifischen AK detektiert (vgl. Tabelle 3, vgl. Kapitel 3.6.1.4). Dabei wurden die AK sequentiell mit „Stripping“-Puffer abgelöst, um nacheinander alle Proteine detektieren zu können (vgl. Kapitel 3.6.1.5).

### 3.6.4.5 Sumoylierungsstudien von DJ-1

Sumoylierungsstudien von DJ-1 *in vitro* und *in vivo* wurden freundlicherweise von Andreas Ledl (Arbeitskreis Prof. Stefan Jentsch, Max-Planck-Institut, München) vorgenommen. Für die *in vitro*-Sumoylierungsstudien wurde eine *in vitro*-Translation mit dem TNT quick coupled reticulocyte lysate system Kit (Promega) unter Verwendung von radioaktivem Schwefel durchgeführt. Die SUMOylierungsreaktion erfolgte in einem 20µl-Ansatz mit 2µl [<sup>35</sup>S]-markiertem Translationsprodukt mit 100ng E1, 10-100ng Ubc9, 0-1000ng PIASx $\alpha$  und 3µg SUMO in Modifikationspuffer (50mM Tris pH 7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP) für 2h bei 30°C. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt und die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt (vgl. Kapitel 3.6.2.1).

Die *in vivo*-Sumoylierungsstudien wurden in HeLa-Zellen durchgeführt, welche transient in 6well-Schalen mit [wt]DJ-1/V5 bzw. [K130R]DJ-1/V5 und SUMO-HA sowie p53 und SUMO/HA als Positivkontrolle transfiziert wurden. Nach 36 bis 48h wurden die Zellen durch direkte Zugabe von 250µl 1xSDS-Probenpuffer pro 6well-Vertiefung lysiert und 5min bei 95°C aufgeköcht. 5-20µl des Zelllysats wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Modifikation mittels anti-V5 AK für die DJ-1-Konstrukte und anti-p53 AK (vgl. Tabelle 3) für die Positivkontrolle im Western Blot nachgewiesen.

Die Mutante [K130R]DJ-1/V5 mit defekter SUMOylierungskonsensusstelle wurde über eine gerichtete Mutagenese generiert (vgl. Kapitel 3.4.11.1), wobei die Primer der ersten beiden PCRs folgendermaßen gewählt wurden: K130R\_FWD 5'-CACCTCTTGCTAGAGACAAAATGATGA-3' und BamHI\_V5\_REV bzw. NcoI\_DJ-1\_FWD und K130R\_REV 5'-TCATCATTTTGTCTCTAGCAAGAGGGTG-3'. Das Konstrukt wurde nach der zweiten PCR mit den Primern NcoI\_FWD und BamHI\_V5\_REV (vgl. Tabelle 6) in den Vektor pcDNA3.1/V5/His/TOPO subkloniert (vgl. Kapitel 3.4.11).

In IF-Studien (vgl. Kapitel 3.6.3.1) wurden [wt]DJ-1/V5 und [K130R]DJ-1/V5 mit PIASx $\alpha$ /Myc in HEK 293T-Zellen cotransfiziert und die Lokalisation von DJ-1 bestimmt. Die SUMO-Ligase PIASx- $\alpha$ /Myc wurde mit folgenden Primern in einer PCR amplifiziert: PIASx- $\alpha$ \_EcoRI\_pcDNA4Myc\_FWD 5'-TCCGAATTCATGGCGGATTTTCGAAGAGTTGAG-3' und PIASx- $\alpha$ \_XhoI\_pcDNA4Myc\_REV 5'-TCGATTACTCGAGGTCCAATGAGATGATTTTCAGGAATGTTACT-3'. Als Vorlage wurde cDNA aus HEK 293T-Zellen verwendet. Dazu wurde RNA aus HEK 293T-Zellen isoliert (vgl. Kapitel 3.4.12.1) und revers transkribiert (vgl. Kapitel 3.4.12.2). Das PCR-Produkt wurde in den pcDNA4/Myc/HisB-Vektor (vgl. Tabelle 7) ligiert (vgl. Kapitel 3.4.1 und 3.4.5).

### 3.6.5 Biophysikalische Untersuchungen von DJ-1

#### 3.6.5.1 Expression und Reinigung von DJ-1 in *E. coli*

[wt]DJ-1/V5 und [E64]DJ-1/V5 wurden mit den Oligonukleotiden NcoI\_FWD und BamHI\_REV (vgl. Tabelle 6) in einer PCR amplifiziert (vgl. Kapitel 3.4.1) und in den pQE-60 Vektor, der einen C-terminalen HIS-tag enthält, subkloniert (vgl. Tabelle 7). Diese prokaryotischen Expressionskonstrukte wurden verwendet, um sie in *E. coli* BL21/RIL-Bakterien zu transformieren, die zuvor kompetent gemacht wurden (vgl. Kapitel 3.4.6). Die Protease-defizienten BL21/RIL-Bakterien exprimieren größere Mengen des

## Material und Methoden

gewünschten Proteins als die für Plasmidsynthese optimierten DH5 $\alpha$ -Bakterien (vgl. Kapitel 3.4.7). Positive Bakterienklone, die auf einer LB/Amp-Platte über Nacht gewachsen sind, wurden inkubiert und ein Teil davon als Glycerinstock angelegt (vgl. Kapitel 3.4.8).

Eine Pipettenspitze dieses bakteriellen Glycerinstocks wurde über Nacht in 100ml LB-Medium, mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillinlösung angeimpft und bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die 100ml Bakterienkultur in 1l LB-Medium überführt und erneut bei 37°C im Schüttler inkubiert. 400 $\mu$ l Bakterienkultur wurden zwischendurch abgenommen und die OD<sub>600</sub> gemessen. Bei einer optimalen OD<sub>600</sub> zwischen 0.5-0.7 wurde das LB-Medium mit 100 $\mu$ M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) versetzt und für 5h erneut im Schüttler inkubiert. IPTG induziert die Expression des gewünschten Proteins, indem es an den lacZ-Suppressor bindet und vom vorgeschalteten lac-Operon dissoziiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1.7 bis 1.9 wurden die Bakterien mit 4500g/min bei 4°C in einer Beckmanzentrifuge 10min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in PBS plus Proteaseinhibitoren resuspendiert. Die Bakterien wurden zweimal in einer French-press bei einem Druck von 1000psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer konnten anschließend bei 55000rpm, 4°C 1h lang in einer Ultrazentrifuge abzentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand durch einen 0,22 $\mu$ m-Einwegfilter gespritzt und auf eine Nickel-Nitrilotriessigsäure Superflow-Säule aufgetragen. Das DJ-1/His-Fusionsprotein, welches über seinen His-tag von der Nickelsäule gebunden wurde, wurde anschließend in einem Gradienten von 20mM-500mM Imidazol eluiert. Die Fraktionen des DJ-1 Peaks wurden gesammelt und in einem Dialyseröhrchen (Centricon) in einer Beckmanzentrifuge mit 4000rpm bei 4°C bis auf 2ml druckdialysiert. Das Konzentrat wurde auf eine HiLoad Superdex 75 Säule geladen und mit Stabilpuffer bzw. Elutionspuffer eluiert. Der Elutionspuffer ist im Gegensatz zum Stabilpuffer DTT- und Glycerin-frei. Der Stabilpuffer ist für die Lagerung über längere Zeiträume ideal, während der Elutionspuffer für die CD-Messung besser geeignet ist, da DTT die CD-Messung stört. Für die anschließenden CD-Messungen wurde daher Elutionspuffer (vgl. Kapitel 3.6.5.3) verwendet.

Es wurden Coomassiegele und Western Blots von den gereinigten Proteinen angefertigt (vgl. Kapitel 3.6.1.7 und 3.6.1.4) sowie eine Qualitätskontrolle im ESI-Massenspektrum durchgeführt (vgl. Kapitel 3.6.5.2).

### **3.6.5.2 Qualitätskontrolle der rekombinanten Proteine durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)**

Gereinigtes DJ-1-Protein wurde zur Massenspektrometrie an Dr. Jörg Regula und Dr. Lars Israel (Proteinanalytik, LMU, München) weitergeleitet. Die Proben wurden auf 0,01 bis 0,5mg/ml verdünnt und mit 0,1% Trifluoressigsäure in dH<sub>2</sub>O versetzt. 2µl der Lösung wurden mit 1µl Sinapinsäure gemischt und mit 0,4% Trifluoressigsäure in 30% Acetonitril als Matrix abgesättigt. 1µl wurde auf eine Stahlplatte getropft und im ESI-MS gemessen. Die Massenspektren wurden im linearen Modus mit einem Voyager DE STR Massenspektrometer mit 25000V aufgenommen.

### **3.6.5.3 CD-Messungen**

Das gereinigte DJ-1-Protein wurde in 10mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 100mM NaCl (pH=7,5) auf 5µg/ml verdünnt. 200µl des Verdünnungspuffers wurden als Blindwert in eine 0,1cm-Quarzküvette pipettiert und in einem J-810 CD Spektrometer bei einer Wellenlänge von 300-190nm gescannt. Anschließend wurde die verdünnte DJ-1-Lösung mit denselben Parametern gemessen. Das CD-Spektrum zeigte eine Kurve, die die relative Verteilung von  $\alpha$ -Helices zu  $\beta$ -Faltblatt und Knäuel-Verteilung wiedergibt. Anschließend wurden Temperaturgradienten von 25°C bis 80°C erzeugt und bei ausgewählten Temperaturen CD-Spektren gemessen. Gleichzeitig wurden Schmelzkurven des Proteins aufgenommen. Sekundärstrukturelemente wurden mit der Jasco JWSSE-480 Software berechnet.

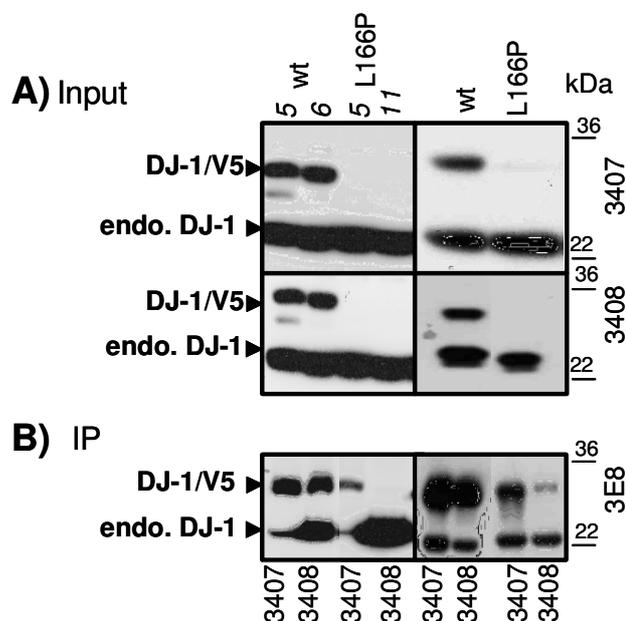
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Expressionsmuster von DJ-1 *in vivo*

Da es für die Charakterisierung von DJ-1 von Bedeutung ist, zu wissen, in welchen Organen und speziell in welchen Hirnarealen dieses Protein lokalisiert ist, wurden zunächst Expressionsmuster in der Maus als Modellorganismus untersucht. Des Weiteren erstreckten sich die Expressionsstudien auf die einzelnen Zellkompartimente bzw. auf die subzelluläre Verteilung, da die nachfolgenden Untersuchungen zumeist in Zellkultursystemen durchgeführt wurden. Dabei wurden vergleichend Studien von [wt]DJ-1 und der erst beschriebenen Mutante [L166P]DJ-1 durchgeführt.

#### 4.1.1 DJ-1-AK

Es wurden 5 verschiedene AK für die Detektion von DJ-1 verwendet. AK gegen das Volllängenprotein wurden gemacht, indem mit rekombinantem, gereinigtem [wt]DJ-1/His Kaninchen immunisiert wurden (vgl. Kapitel 3.6.1.6). Die Antiseren 3407 und 3408 reagierten spezifisch und sensitiv mit endogenem und transfiziertem DJ-1 (vgl. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Test der DJ-1-Antiseren 3407/3408 in stabil und transient transfizierten HEK 293-Zellen**

A) Western Blots von stabilen [wt]DJ-1/V5-Zellklonen 5 und 6, sowie [L166P]DJ-1/V5-Zellklonen 5 und 11 (linke Spalte) bzw. von transient mit [wt]DJ-1/V5 und L166P]DJ-1/V5 transfizierten HEK 293T-Zellen (rechte Spalte) wurden direkt mit dem polyklonalen AK 3407 und 3408 getestet. B) IP mit den polyklonalen DJ-1-AK 3407 und 3408 wurden mit dem DJ-1-spezifischen monoklonalen AK 3E8 detektiert.

## Ergebnisse

Die beiden polyklonalen AK SN1132 und SN1130 wurden freundlicherweise von Prof. Peter Heutink (Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Beide AK sind gegen Peptidsequenzen des DJ-1-Proteins gerichtet. SN1132 ist gegen den C-Terminus gerichtet, Aminosäuresequenz 174-189, und SN1130 gegen die mittlere Region des DJ-1 Proteins, Aminosäuresequenz 138-151. Ein weiterer polyklonaler AK der Firma Alphagenix gegen das Volllängenprotein wurde von Dr. Stephen Hall zur Verfügung gestellt und erkennt endogenes DJ-1 besser als DJ-1 mit einem V5-tag. Der monoklonale 3E8-AK wurde uns zunächst von Prof. Hiroyoshi Ariga (Sapporo, Japan) überlassen, ist aber mittlerweile kommerziell erhältlich bei der Firma Stressgen und erkennt kein mäuseliches DJ-1 (vgl. Tabelle 10).

AK	Spezies	WB	IP	IF	Bemerkung
Alphagenix	m, h	++	+	k. A.	Erkennt endogenes DJ-1 besser als transfiziertes DJ-1
3E8	h	+++	-	-	Erkennt murines DJ-1 und das Konstrukt [E64D]DJ-1 nicht
3407	m, h	+++	+++	-	
3408	m, h	++	++	-	Kreuzreagiert mit einer Reihe unspezifischer Banden
SN1130 (synthetisches Peptid gegen AS 138-151)	m, h	++	+	-	Erkennt endogenes DJ-1 besser als C-terminal markierte, transfizierte DJ-1/V5-Konstrukte
SN1132 (synthetisches Peptid gegen AS 174-189)	m, h	++	+	+	Erkennt C-terminal markierte, transfizierte DJ-1/V5-Konstrukte besser als endogenes DJ-1

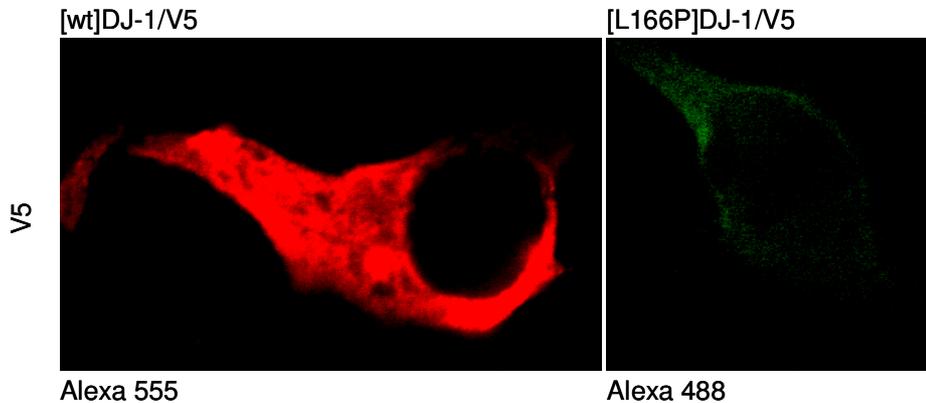
**Tabelle 10: Güte der DJ-1-spezifischen AK im WB, IF und IP**

Erklärungen der Zeichen und Abkürzungen in der Tabelle: m: Maus, h: Human, -: schlecht, +: befriedigend, ++: gut, +++: sehr gut, k. A.: keine Angaben

Endogenes DJ-1 wird bei einer molekularen Größe von ca. 22kDa detektiert, während transfiziertes DJ-1 mit einem C-terminalen V5-tag bei ca. 30kDa zu finden ist (vgl. Abbildung 18).

#### 4.1.2 Immunfluoreszenzstudien zur Lokalisation von DJ-1 in verschiedenen Zellkompartimenten

Als erstes wurde die DJ-1-Verteilung in der Zelle mit Hilfe der IF in HEK 293T-Zellen getestet (vgl. Kapitel 3.6.3.1) (vgl. Abbildung 19).

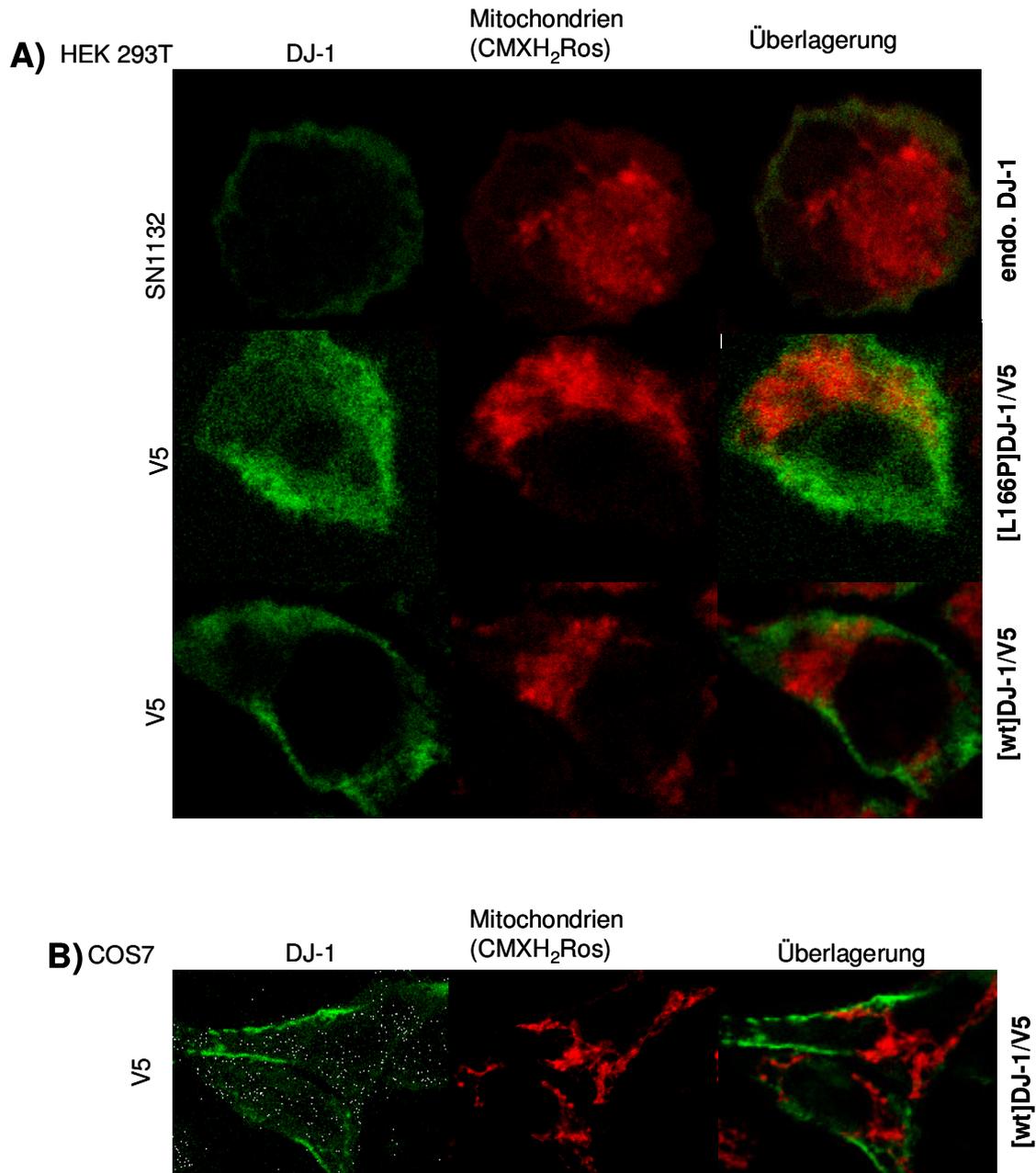


**Abbildung 19: IF von transient transfiziertem DJ-1 in HEK 293T Zellen**

Expression von V5-markiertem [wt]DJ-1 (linkes Bild) und [L166P]DJ-1 (rechtes Bild) in HEK 293T-Zellen, detektiert mit einem V5-AK und einem fluorophorgebundenen Zweitantikörper (Alexa 555, rot bzw. Alexa 488, grün).

Es wird sichtbar, dass sowohl [wt]DJ-1/V5 als auch [L166P]DJ-1/V5 zum großen Teil im Zytoplasma lokalisiert sind.

In der Literatur wurde eine Colokalisation von DJ-1 mit Mitochondrien beschrieben (Canet-Aviles et al., 2004; Zhang et al., 2005). DJ-1 könnte als zytoprotektives Protein Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien haben. Es ist daher für die folgenden Experimente interessant und wichtig, beurteilen zu können, ob in dem hier verwendeten Zellsystem DJ-1 an oder in den Mitochondrien lokalisiert ist. Zur Untersuchung der Colokalisation wurde Mitotracker, ein Fluoreszenzfarbstoff, der speziell Mitochondrien anfärbt, verwendet (vgl. Abbildung 20).



**Abbildung 20: DJ-1-Expression in transient transfizierten HEK 293T- und COS7-Zellen und Co-lokalisierung in Mitochondrien mit Hilfe der IF.**

A) Endogenes DJ-1 wurde mit AK SN1132 angefärbt (obere Reihe), transfiziertes [L166P]DJ-1/V5 (mittlere Reihe) und [wt]DJ-1/V5 (untere Reihe) mit V5-AK, jeweils gefolgt von Alexa 488-gekoppeltem Zweitantikörper (grün). Zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals wurde die Belichtungszeit bei den [L166P]DJ-1 transfizierten Zellen verdoppelt im Vergleich zu [wt]DJ-1 transfizierten Zellen. Colokalisation mit einem mitochondrialen Marker (CMXH<sub>2</sub>Ros, 592nm, rot) in HEK 293T-Zellen wurde per konfokaler Mikroskopie beurteilt.

B) Expression von [wt]DJ-1/V5 (V5-AK und Alexa 488, grün) in COS7-Zellen und Co-Lokalisation mit dem mitochondrialen Marker CMXH<sub>2</sub>Ros (592nm, rot).

Aus den in Abbildung 20 gezeigten IF geht hervor, dass sowohl endogenes DJ-1 als auch transient transfiziertes [wt]DJ-1/V5 und [L166P]DJ-1/V5 nicht mit den Mitochondrien in HEK 293T-Zellen colokalisieren (vgl. Abbildung 20A). Dies ist kein zellspezifisches

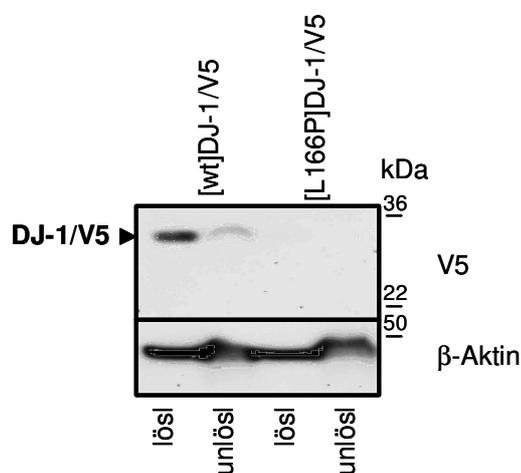
## Ergebnisse

Phänomen, da das [wt]DJ-1/V5-Konstrukt auch in COS7-Zellen transient transfiziert wurde und ebenfalls nicht in den Mitochondrien zu finden ist (vgl. Abbildung 20B). Die Mitochondrien der COS7-Zellen lassen sich besser mit dem Mitotracker CMXH<sub>2</sub>ROS anfärben als die viel kleineren und schlechter sichtbaren Mitochondrien der HEK 293T-Zellen.

### 4.1.3 Expression von DJ-1 in der Zelle

Als Standardzellensystem für weiterführende Charakterisierungen des DJ-1-Proteins wurden zunächst HEK 293T-Zellen gewählt, die einfach in der Kultivierung und Transfektion sind und daher zur Untersuchung der DJ-1-Expression am besten geeignet waren.

Zunächst stellte sich die Frage nach der Löslichkeit von DJ-1 im Vergleich zu seiner pathogenen Mutante L166P bzw. der Tendenz beider Proteine zur Aggregation. Dazu wurden [wt]DJ-1/V5 und [L166P]DJ-1/V5 transient in HEK 293T-Zellen transfiziert und diese in Lysepuffer (vgl. Kapitel 3.2.3) aufgenommen, der 1% des Detergens Triton X-100 enthält. Nach der Zentrifugation wurde das unlösliche Zellpellet in 6xLämmli-puffer (vgl. Kapitel 3.2.3) aufgenommen. Die löslichen und unlöslichen DJ-1-Fractionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-V5 AK analysiert (vgl. Abbildung 21).



**Abbildung 21: Verteilung von [wt]DJ-1 und [L166P]DJ-1 in HEK 293T-Zellen in Triton-löslichen und -unlöslichen Fraktionen**

[wt]DJ-1/V5 (linke Spuren) und [L166P]DJ-1/V5 (rechte Spuren) wurden transient in HEK 293T-Zellen transfiziert. Es wurde dann in Lysepuffer mit Zusatz von 1% Triton X-100 lysiert. Die löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf einem Immunoblot mit anti-V5 (obere Reihe) auf die Expression von [L166P]DJ-1 und [wt]DJ-1 und mit  $\beta$ -Aktin (untere Reihe) auf gleiche Proteinmengen überprüft.

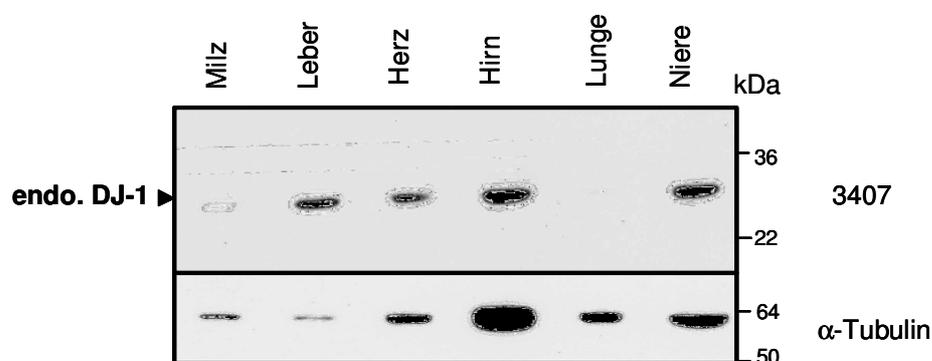
## Ergebnisse

In den unlöslichen Fraktionen waren nur wenig [wt]DJ-1 und gar kein [L166P]DJ-1 nachweisbar. Der Hauptteil des [wt]DJ-1-Proteins war in der löslichen Fraktion zu finden, während [L166P]DJ-1-Proteinexpression kaum nachweisbar war.

Zusammen mit den IF-Studien kann festgehalten werden, dass DJ-1 ein lösliches Protein ist, welches hauptsächlich im Zytoplasma, aber nicht im Kern oder den Mitochondrien lokalisiert ist.

### 4.1.4 Expressionsmuster von DJ-1 in Organen der Maus

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Organe der Maus auf die Expression von DJ-1 überprüft. Diverse Organe wurden aus einer Maus seziiert, homogenisiert und dann direkt auf ein 15% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (vgl. Kapitel 3.6.3.2), geblottet (vgl. Kapitel 3.6.1.4) und mit  $\alpha$ -Tubulin als Ladekontrolle und dem polyklonalen AK 3407 detektiert, welcher endogenes DJ-1 sehr sensitiv erkennt (vgl. Tabelle 10). Da  $\alpha$ -Tubulin sehr unterschiedlich in den einzelnen Organen verteilt ist, wird hier das Verhältnis der Proteinexpression von  $\alpha$ -Tubulin zu DJ-1 zu Grunde gelegt, um eine Aussage über die Verteilung von DJ-1 in den einzelnen Mausorganen zu treffen. Milz und Lunge enthalten weniger DJ-1-Protein, während Herz, Hirn und vor allen Dingen Niere und Leber recht viel DJ-1 exprimieren (vgl. Abbildung 22).

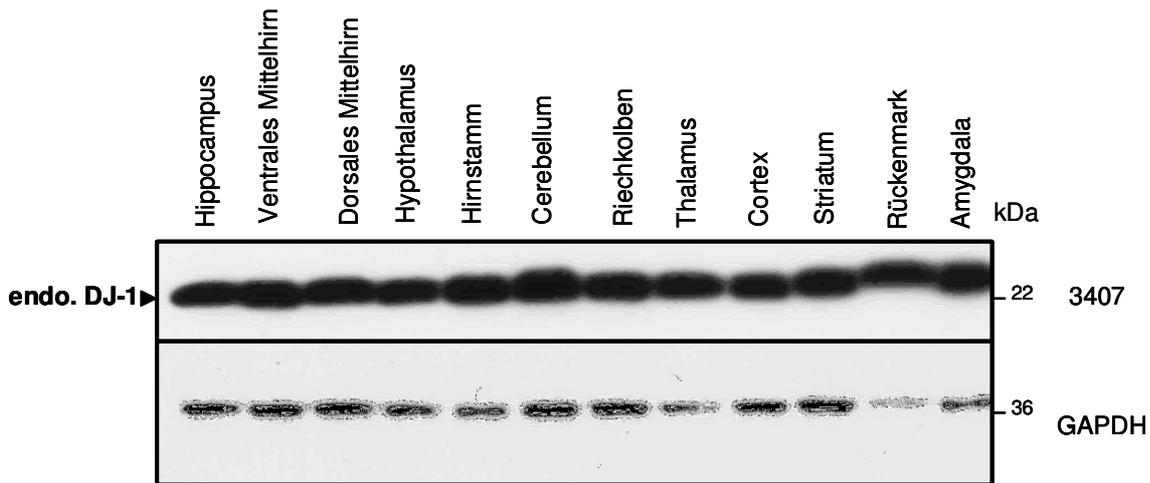


**Abbildung 22: Verteilung von DJ-1 in verschiedenen Organen der Maus**

DJ-1-Expression in Mausorganen wurde mit dem polyklonalen DJ-1-spezifischen AK 3407 (obere Reihe) und als Ladekontrolle mit einem monoklonalen  $\alpha$ -Tubulin-AK (untere Reihe) überprüft.

Ebenso wurden diverse Hirnareale der Maus seziiert, homogenisiert und direkt auf ein 15% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (vgl. Abbildung 23). Das in Abbildung 23 dargestellte Expressionsmuster zeigt eine ubiquitäre Verteilung von DJ-1 in allen Hirnarealen.

## Ergebnisse



**Abbildung 23: Verteilung von DJ-1 in verschiedenen Hirnarealen der Maus**

DJ-1-Expression wurde mit dem polyklonalen DJ-1-spezifischen AK 3407 (obere Reihe) und als Ladekontrolle einem monoklonalen GAPDH-AK (untere Reihe) getestet.

## 4.2 Stabilitätsstudien von DJ-1 und seinen Mutanten

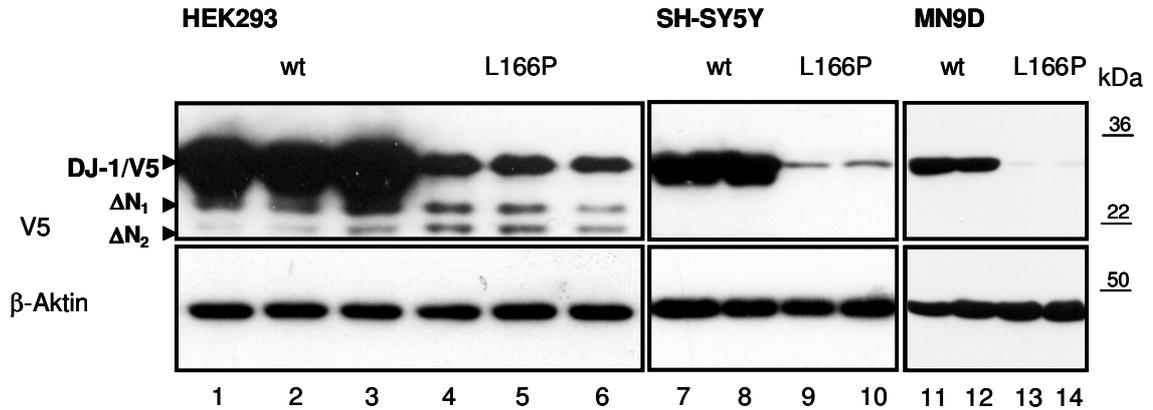
### 4.2.1 Expression von DJ-1 und seinen pathogenen Mutanten in verschiedenen Zelllinien

Es wurde gezeigt, dass DJ-1 ein lösliches Protein ist, welches in Zellen und Geweben unter Basalbedingungen nicht in unlöslichen Aggregaten zu finden ist. Es war schon bei der Charakterisierung der AK von DJ-1 auffällig, dass [L166P]DJ-1 schwerer nachzuweisen war als [wt]DJ-1 (vgl. Kapitel 4.1). In einer genaueren Analyse wurde daher im nächsten Versuch die Expression von [wt]DJ-1/V5 im Vergleich zu der pathogenen Mutante [L166P]DJ-1/V5 in transient transfizierten Zellsystemen getestet. Dazu wurden die Standardzelllinie HEK 293T verwendet sowie zwei neuronale Zelllinien: die Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y und die immortalisierten dopaminergen neuronalen MN9D-Zellen. Diese neuronalen Zellen ähneln mehr den dopaminergen Neuronen, die bei der PK degenerieren, und sind somit geeignetere Modelle, um Parkinson-relevante Gene zu untersuchen.

Zellen wurden mit den oben genannten Plasmiden transient transfiziert, und Triton X-100-Lysate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt. In der Immunoblot-Analyse wird deutlich, dass [wt]DJ-1/V5 wesentlich stärker exprimiert wird als [L166P]DJ-1/V5 (vgl. Abbildung 24). Bei längerer Belichtungszeit der Filme sind Abbauprodukte des wt- und des mutierten Proteins zu erkennen. Der AK, der gegen den C-terminalen V5-tag gerichtet ist, detektiert in nicht-neuronalen HEK 293T-Zellen zwei N-terminal verkürzte DJ-1 Spezies ( $\Delta N_1$  und

## Ergebnisse

$\Delta N_2$ ), aber nicht in SH-SY5Y- oder MN9D-Zellen. Somit gibt es offensichtlich zellspezifische proteolytische Prozessierungen der DJ-1-Konstrukte.

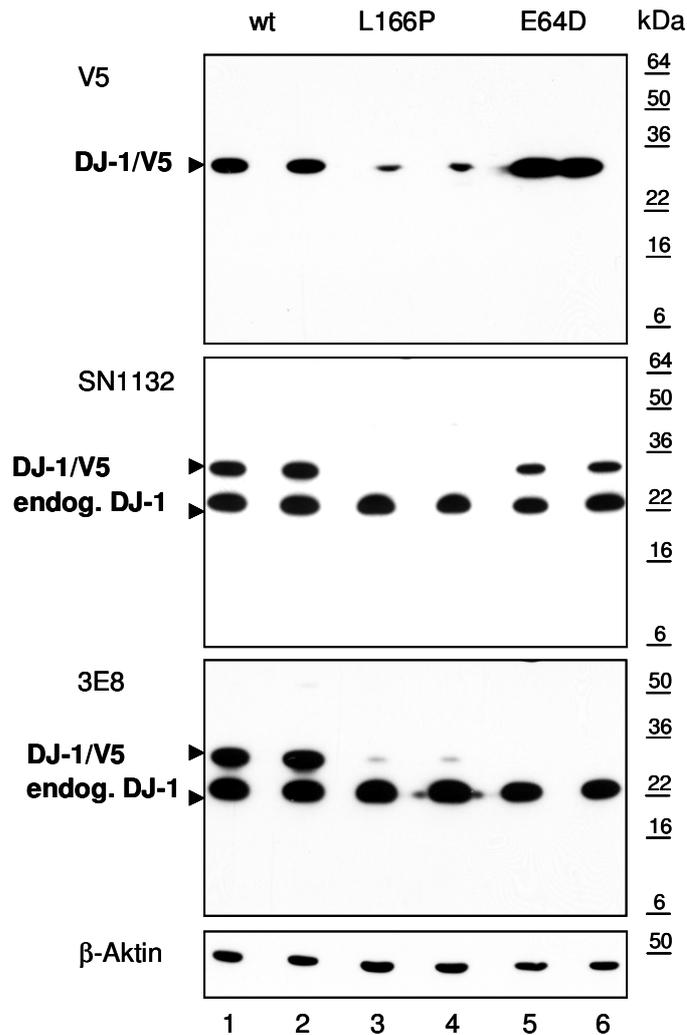


**Abbildung 24: Expression von transient transfizierten DJ-1-Konstrukten in HEK 293T-, MN9D- und SH-SY5Y-Zellen**

HEK 293T- (linke Spalte), SH-SY5Y- (mittlere Spalte) und MN9D- (rechte Spalte) Zellen wurden mit [wt]DJ-1/V5 (Spuren 1-3, 7-8, 11-12), [L166P]DJ-1/V5 (Spuren 4-6, 9-10, 13-14) transient transfiziert. Die Expression wurde mit dem monoklonalen V5-AK detektiert (obere Reihe) und als Proteinstandard wurde  $\beta$ -Aktin gewählt (untere Reihe). Molekulargewichtsstandards sind an der rechten Seite der Abbildung angezeigt, während N-terminale Abbaubanden, die unterhalb der DJ-1 Volllängenbande laufen, an der linken Seite markiert wurden ( $\Delta N_1$ ,  $\Delta N_2$ ).

In einem zweiten Versuch wurde zusätzlich zu den oben genannten Konstrukten eine weitere PK-Mutante, [E64D]DJ-1/V5, transient in HEK 293T-Zellen transfiziert und SDS-PAGE unterzogen. Im anschließenden Western Blot wurden außer dem tag-spezifischen anti-V5 noch DJ-1-spezifische AK verwendet. Es wurde deutlich, dass in HEK 293T-Zellen das Verhältnis endogener DJ-1 Expression zu transient transfiziertem [wt]DJ-1/V5 in etwa gleich oder höher ist, was für ein recht stark exprimiertes endogenes DJ-1 Protein spricht. Dies wurde auch in anderen Zelllinien beobachtet (vgl. Abbildung 35). Die unterschiedliche Expression von [wt]DJ-1/V5 und seiner Mutante [L166P]DJ-1/V5 konnte sowohl mit monoklonalem 3E8-AK als auch mit dem polyklonalen SN1132-AK (vgl. Tabelle 10) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 25). Die Expression von [E64D]DJ-1/V5 ist ähnlich stark wie die von [wt]DJ-1/V5.

## Ergebnisse



**Abbildung 25: Expressionsspiegel von wt und mutiertem DJ-1 in HEK 293T-Zellen**

HEK 293T-Zellen wurden in Duplikaten mit [wt]DJ-1/V5 (Spur 1 und 2), [L166P]DJ-1/V5 (Spur 3 und 4) oder [E64D]DJ-1/V5 (Spur 5 und 6) transient transfiziert. Es wurden je 20µg Gesamtproteinmenge (50µg im Falle von [L166P]DJ-1/V5) auf ein 15% Gel aufgetragen, geblottet und anschließend mit den links bezeichneten AK detektiert: anti-V5, SN1132, 3E8 und als Ladekontrolle β-Aktin (vgl. Tabelle 3).

Der 3E8-AK kann bemerkenswerterweise das Expressionskonstrukt [E64D]DJ-1/V5 nicht detektieren, so dass die AS E64 im DJ-1-Protein vermutlich eine kritische Determinante des Epitops dieses AK ist (vgl. Abbildung 25). Dies wurde auch von (Miller et al., 2005) bei genaueren Untersuchungen des 3E8-AK festgestellt.

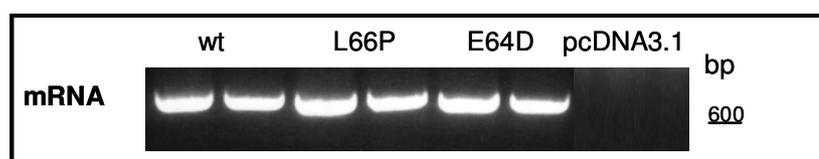
Die dramatische Reduktion der Expression des [L166P]DJ-1/V5-Konstrukts im Vergleich zu [wt]DJ-1/V5 und [E64D]DJ-1/V5 ist nicht nur ein Phänomen in transient transfizierten Zellen, sondern wurde auch in stabil exprimierenden Zellklonen in HEK 293T-Zellen festgestellt (vgl. Abbildung 18).

Für die nachfolgenden Studien wurde das transient exprimierende System verwendet, da es flexibler in verschiedenen Zelltypen einsetzbar ist und für die anschließende

Mutagenesestudie nicht jedes Mal neue stabile Klone generiert werden mussten. Wie in den Duplikaten in Abbildung 25 gezeigt wurde, ist die Reproduzierbarkeit der Expressionsspiegel von transient transfizierten DJ-1-Konstrukten sehr hoch.

#### 4.2.2 RT-PCR von [wt]DJ-1/V5 und den Mutanten [L166P]DJ-1/V5 und [E64D]DJ-1/V5

Um festzustellen, ob die verminderte Expression der L166P-Mutante auf verminderte mRNA-Mengen zurückzuführen ist, wurden semi-quantitative RT-PCR-Experimente durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.12.2). Der Rückwärtsprimer wurde so gewählt, dass dieser in der tag-Sequenz des DJ-1/V5-Konstruktes bindet (BamHI\_V5\_REV, vgl. Tabelle 6) und somit kein endogenes DJ-1 amplifiziert. Die RNA-Menge von sowohl wt als auch mutierten DJ-1-Konstrukten ist identisch (vgl. Abbildung 26). Daraus kann geschlossen werden, dass eine Instabilität der L166P-Mutante auf Proteinebene vorliegt.



**Abbildung 26: RT-PCR von DJ-1-Konstrukten**

[wt]DJ-1/V5, [L166P]DJ-1/V5 und [E64D]DJ-1/V5 sowie eine Vektorkontrolle von pcDNA3.1 wurden in Duplikaten in HEK 293T-Zellen transfiziert und RNA nach der Trizolmethode (vgl. Kapitel 3.4.12.1) isoliert. Eine anschließende RT-PCR von DJ-1-transgener RNA wurde mit den Primern NcoI\_FWD und BamHI\_REV durchgeführt (vgl. Tabelle 6) und diese auf einem 1% Agarosegel analysiert.

#### 4.2.3 Inhibition der Synthese von DJ-1 mit Cycloheximid (CHX)

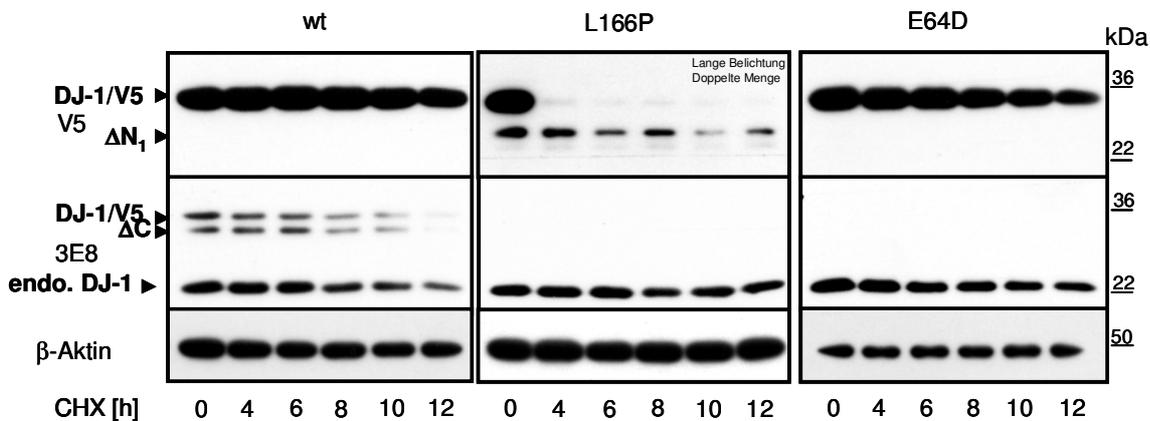
Um der Frage nachzugehen, was [L166P]DJ-1/V5 so instabil macht, wurde zunächst untersucht, ob die Proteinsynthese blockiert oder der Proteinabbau beschleunigt ist. Dafür wurden in folgenden Untersuchungen entsprechende Inhibitoren eingesetzt.

Als erstes wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von CHX inhibiert. CHX ist ein Antibiotikum, welches in höheren Dosen auch die eukaryotische Translation durch Bindung an das zytosolische 80S-Ribosom blockiert.

HEK 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden [wt]DJ-1/V5, [L166P]DJ-1/V5 und [E64D]DJ-1/V5 transfiziert und über einen Zeitraum von 0h, 4h, 6h, 8h, 10h und 12h mit CHX behandelt. Die Proteinmengen von [wt]DJ-1/V5 und [E64D]DJ-1/V5 sind im Western Blot innerhalb der 12-stündigen Behandlung fast unverändert (vgl. Abbildung 27). Nach 8h erkennt man eine geringe Abnahme der Proteinmengen, die im Falle der E64D-Mutante etwas ausgeprägter ist. Im Vergleich dazu ist [L166P]DJ-1/V5 nach 4h schon

## Ergebnisse

nicht mehr zu detektieren. Die Anfangsexpression von [L166P]DJ-1/V5 ist beim Beginn der Inhibitorbehandlung (t=0h) der [wt]DJ-1/V5-Expression gleichgesetzt worden, indem die doppelte Menge an Protein aufgetragen wurde. Trotzdem ist die Mutante schon nach kurzer Zeit nicht mehr im Western Blot nachweisbar. Mit dem V5-AK, der den C-Terminus des Fusionsproteins erkennt, wird zudem die N-terminale Prozessierung von [L166P]DJ-1 sichtbar, die über 12h stabil ist. Die Expression von mutiertem DJ-1 hat keinen bedeutenden Einfluss auf den Umsatz von endogenem DJ-1. Dies wurde mit dem monoklonalen AK 3E8 detektiert, der wie schon unter Kapitel 4.2.1 erwähnt die Mutante E64D nicht erkennt (vgl. Abbildung 27).



**Abbildung 27: Blockierung der Proteinsynthese mit CHX**

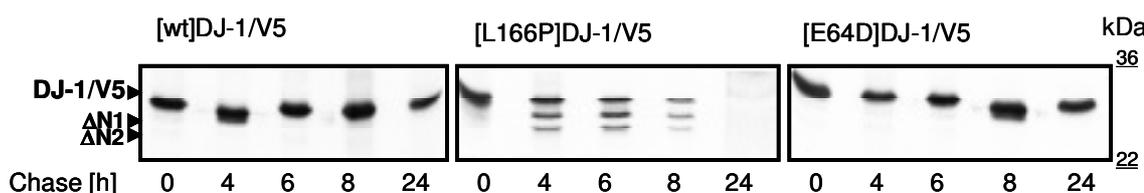
V5-markiertes [wt]DJ-1 (linke Spalte), [L166P]DJ-1 (mittlere Spalte) oder [E64D]DJ-1 (rechte Spalte) wurde transient in HEK 293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden innerhalb der angegebenen Zeitintervalle mit 100µg/ml CHX behandelt. Je 20µg Gesamtprotein (50µg für [L166P]DJ-1/V5) wurde im Western Blot mit folgenden AK detektiert: V5 (obere Reihe), 3E8 (mittlere Reihe) und β-Aktin als Ladekontrolle (untere Reihe).

Auffällig ist, dass der 3E8-AK im Laufe der Behandlung mit CHX für [wt]DJ-1/V5 ebenfalls eine Abbaubande zeigt, die aber C-terminal prozessiert sein muss, da sie mit dem C-terminalen V5-AK nicht detektierbar war. Trotzdem ist [wt]DJ-1/V5 unter Blockierung der Proteinsynthese länger stabil als [L166P]DJ-1/V5.

### 4.2.4 „Pulse-Chase“-Experimente zur Bestimmung des Umsatzes von [wt]DJ-1 und seinen Mutanten

Da schon in Abbildung 27 ein beschleunigter Proteinabbau von [L166P]DJ-1 festgestellt wurde, sollte dies in „Pulse-Chase“-Experimenten noch einmal verifiziert werden, wobei mit dieser Methode nicht nur die Synthese von Proteinen, sondern auch deren Abbau verfolgt werden kann. Transient transfizierte DJ-1 Konstrukte in HEK 293T-Zellen wurden mit einer Mischung aus radioaktivem [<sup>35</sup>S]Cystein/Methionin „Pulse“-Medium 3h

metabolisch markiert und mit nicht-radioaktivem „Chase“-Medium bis zu 24h behandelt. Die ungewöhnlich hohe „Pulse“-Zeit musste gewählt werden, weil DJ-1 sich nur sehr schwer markieren lässt und eine Zeit von mindestens 3h notwendig war. Anschließend wurden Zelllysate mit V5-AK präzipitiert und über SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. Kapitel 3.6.1.12). [Wt]DJ-1/V5 ist innerhalb der ersten 4-8h stabil, mit einem leichten Expressionsverlust nach 24h (vgl. Abbildung 28). Während [E64D]DJ-1 fast ebenso stabil ist wie [wt]DJ-1, ist die Degradation von [L166P]DJ-1 innerhalb der ersten 4h erheblich beschleunigt. Die N-terminalen Abbaubanden  $\Delta N_1$  und  $\Delta N_2$  zeigen sich schon nach 4h, was auf einen schnellen N-terminalen Abbau schließen lässt (vgl. Abbildung 28). [L166P]DJ-1 wird genauso effizient translatiert wie [wt]DJ-1, zum „Chase“-Zeitpunkt von 0h liegen hier gleiche Proteinmengen vor. Aus dem „Pulse-Chase“- und dem CHX-Experiment wird deutlich, dass die geringeren Expressionsniveaus von [L166P]DJ-1 nicht etwa auf eine Regulation auf transkriptioneller Ebene zurückzuführen sind, sondern dass die Mutante einem beschleunigtem Abbauprozess unterliegt.



**Abbildung 28: Beschleunigter Abbau von [L166P]DJ-1 in „Pulse-Chase“-Experimenten**

HEK 293T-Zellen wurden transient mit [wt]DJ-1/V5 oder den Mutanten [L166P]DJ-1/V5 bzw. [E64D]DJ-1/V5 transfiziert und radioaktiv markiert. Das Verdrängen der radioaktiven Cystein- und Methioninreste wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

#### 4.2.5 Inhibition des proteasomalen oder proteolytischen Abbaus von DJ-1

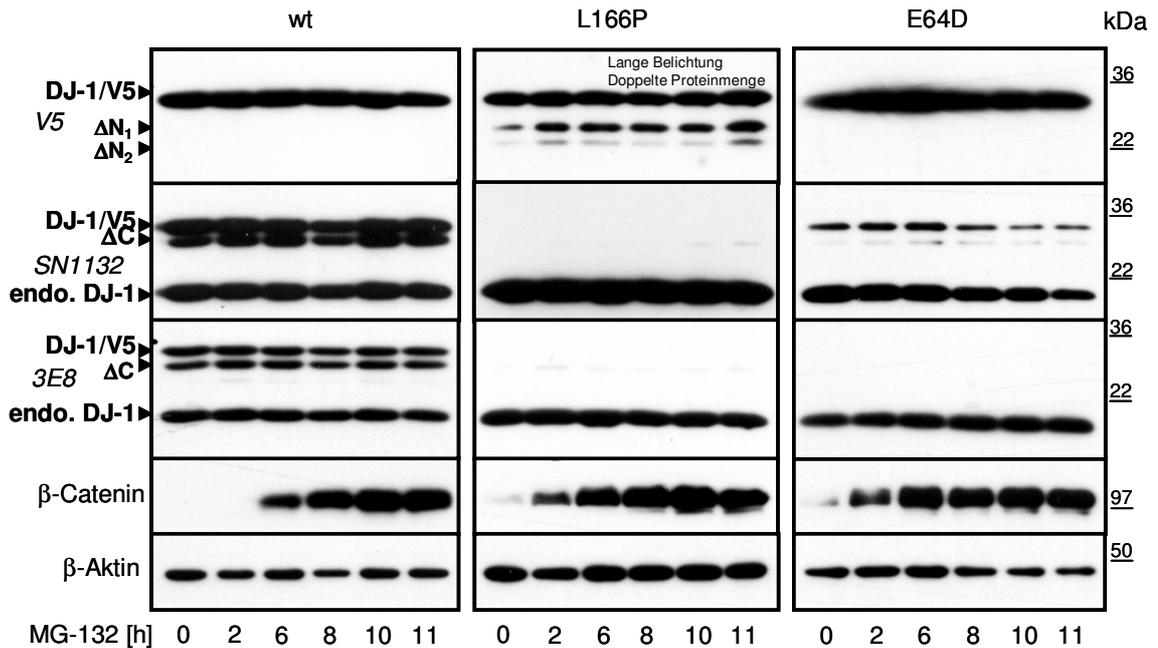
Für einen beschleunigten Abbau von [L166P]DJ-1/V5 sind verschiedene Mechanismen denkbar. Dies wäre einerseits proteasomaler Abbau, bei dem die Zelle erkennt, dass es sich um ein fehlgefaltetes Protein handelt. Dieses wird ubiquitiniert, dem Proteasom zugeführt und dort in kleine Peptidsequenzen zerschnitten. Andererseits können auch spezifische oder unspezifische Proteasen das Protein degradieren oder es wird autoproteolytisch abgebaut. Eine weitere Möglichkeit besteht in einem autophagischen Abbau, der das Lysosom einbezieht, welches kleine Proteine und Peptide hydrolytisch spaltet. Diese verschiedenen Abbauewege werden nun im Folgenden durch Hemmung der entsprechenden molekularen Mechanismen untersucht.

#### 4.2.5.1 Untersuchungen mit dem Proteasomhemmer MG132

Der erste Inhibitor, der experimentell in HEK 293T-Zellen getestet wurde, war MG132. Dieses membran-permeable Aldehyd kann die Aktivität der Threoninreste von zwei der drei katalytischen Zentren des Proteasoms reversibel inhibieren, nämlich die chymotryptische und die azide postglutamyl-peptidhydrolytische Stelle. Allerdings handelt es sich dabei um einen eher unspezifischen Inhibitor, da auch lysosomale Proteasen gehemmt werden können.

HEK 293T-Zellen wurden mit [wt]DJ-1/V5, [L166P]DJ-1/V5 und [E64D]DJ-1/V5 transient transfiziert und nach zwei Tagen je 2h, 6h, 8h, 10h und 11h mit 10 $\mu$ M MG132 behandelt. MG132 entwickelte einen toxischen Effekt auf die HEK 293T-Zellen bei einer Behandlung von mehr als 11h, daher wurde dieser Zeitpunkt als Endpunkt für die proteasomale Inhibition festgelegt. [Wt]DJ-1 ist ein extrem stabiles Protein und wird kaum vom Proteasom abgebaut, so dass man eine Akkumulation des DJ-1-Proteins nach 11-stündiger MG132-Behandlung nicht beobachten kann (vgl. Abbildung 29). Eine Akkumulation von endogenem DJ-1 war ebenfalls in den HEK 293T-Zellen nicht festzustellen. Auch die Mutante [E64D]DJ-1 besitzt eine lange Halbwertszeit und wird nicht durch MG132 stabilisiert. Im Gegensatz dazu wird die sehr instabile Mutante [L166P]DJ-1 zumindest teilweise durch den proteasomalen Inhibitor stabilisiert. Allerdings erfolgt die Akkumulation des Proteins nicht direkt, wie man aufgrund der Instabilität der Mutante vermuten könnte, sondern verzögert. Lediglich die N-terminalen Abbaubanden werden direkt stabilisiert (vgl. Abbildung 29). Zur Kontrolle der effektiven Blockierung des proteasomalen Systems wurde die Akkumulation des Kontrollproteins  $\beta$ -Catenin verfolgt, das vom Proteasom rasch abgebaut wird.

## Ergebnisse



**Abbildung 29: Proteasomale Inhibition von transient transfizierten Zellen mit MG132**

HEK 293T-Zellen wurden mit folgenden DJ-1-Konstrukten wt (linke Spalte), L166P (mittlere Spalte) oder E64D (rechte Spalte) transient transfiziert und mit 10 $\mu$ M MG132 während der unten angegebenen Zeitintervalle behandelt. Es wurden je 20 $\mu$ g Gesamtproteinlysate auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt (50 $\mu$ g für L166P) und im Western Blot mit den links bezeichneten AK detektiert: V5, SN1132, 3E8 für DJ-1,  $\beta$ -Catenin als Kontrolle für Proteasomhemmung und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle.

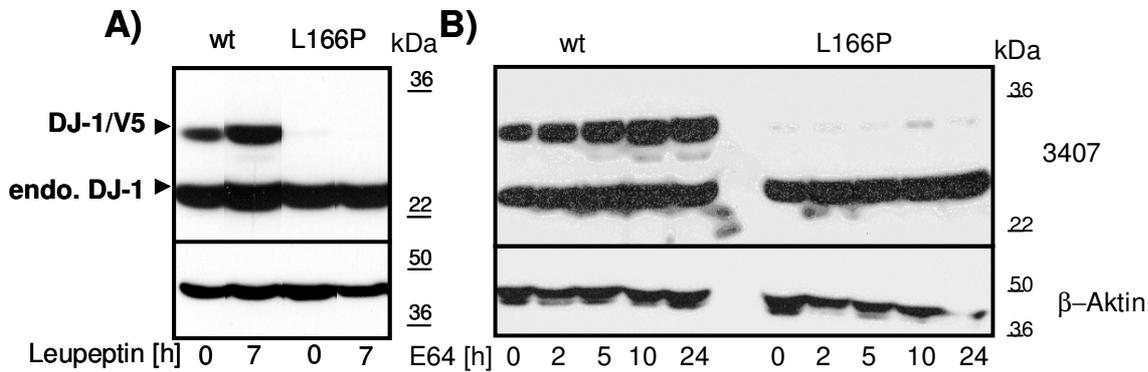
### 4.2.5.2 Proteaseinhibitoren Leupeptin und E64

Nach Inhibition des Proteasoms kommt es noch immer zu einem Abbau des [L166P]DJ-1, daher kommen als Ursache der Instabilität der Mutante noch andere, nicht-proteasomale Abbauwege in Frage, die im Folgenden untersucht wurden. Zunächst wurden zelluläre Cystein-Proteasen mit den Inhibitoren Leupeptin und E64 gehemmt. Es wurden erneut HEK 293T-Zellen transient mit DJ-1-Konstrukten transfiziert und 7h lang mit 50 $\mu$ g/ml Leupeptin oder 24h lang mit 10 $\mu$ M E64 behandelt. Leupeptin ist ein zellgängiges Peptidylaldehyd, welches Cystein-Proteasen, aber auch Serin-Proteasen, inhibiert und reversibel wirkt. E64 ist ein Epoxysuccinyl-Derivat, welches irreversibel spezifische Cystein-Proteasen inhibiert, indem das aktive Thiol einer Cystein-Protease das C3-Atom des Oxiranrings angreift, welcher sich dann öffnet und kovalent am katalytischen Zentrum gebunden bleibt.

Die Hemmung von Cystein- und Serin-Proteasen mit Leupeptin führte im Falle von wt-transfizierten Zellen zu einer leichten Akkumulation, während im Falle von L166P-transfizierten Zellen keine Anhäufung von DJ-1 zu beobachten war (vgl. Abbildung 30). Nach 10-24h langer Behandlung mit E64 konnte man eine leichte Anhäufung von DJ-1,

## Ergebnisse

sowohl [wt]DJ-1 als auch [L166P]DJ-1 erkennen, allerdings ist diese sehr schwach ausgeprägt.



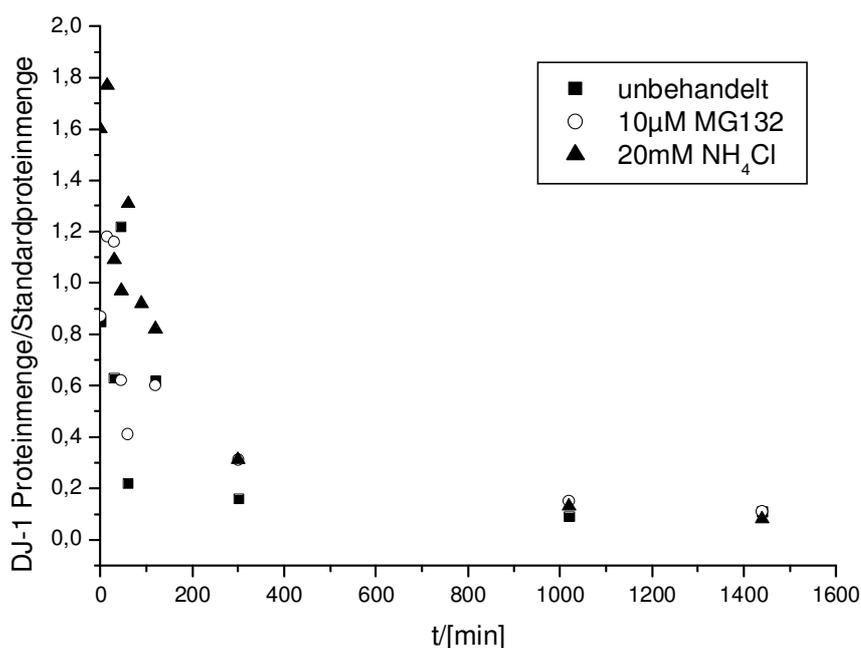
**Abbildung 30: Proteaseinhibition in transient transfizierten HEK 293T-Zellen mit Leupeptin und E64**

HEK 293T-Zellen wurden transient mit 4 µg [wt]DJ-1/V5 und [L166P]DJ-1/V5 transfiziert. A) Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 7h mit 50 µg/ml Leupeptin inkubiert oder unbehandelt belassen. Lysate (20 µg) wurden auf einem 15% SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot mit polyklonalem 3407 DJ-1-AK (obere Reihe) bzw. β-Aktin (untere Reihe) detektiert. B) Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 µM E64 behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Lysate (20 µg) wurden auf einem 15% SDS Gel aufgetragen und im Western Blot mit polyklonalem 3407 DJ-1-AK (obere Reihe) bzw. β-Aktin (untere Reihe) detektiert.

### 4.2.5.3 Lysosomale Inhibition mit NH<sub>4</sub>Cl

Nachdem sowohl der proteasomale Inhibitor MG132 als auch der Cystein- und Serin-Proteasehemmer Leupeptin den beschleunigten Abbau von [L166P]DJ-1 nicht stoppen konnten, könnte es sich hier noch um einen autophagischen, lysosomalen Abbauweg handeln. Zur Hemmung der sauren Hydrolasen im Lysosom wurde NH<sub>4</sub>Cl eingesetzt, welches den niedrigen pH in Lysosomen abpuffert. Dazu wurden „Pulse-Chase“-Experimente durchgeführt wie unter Kapitel 4.2.4 beschrieben. Allerdings wurden die Zellen während des „Chase“ mit 20 mM NH<sub>4</sub>Cl sowie zum Vergleich mit 10 µM MG132 behandelt. Die Proteinmenge von [L166P]DJ-1/V5 veränderten sich nicht merklich bei Zugabe des unspezifischen lysosomalen Inhibitors NH<sub>4</sub>Cl im Vergleich zu unbehandelten Zellen. In einem Diagramm wurde die Intensität des markierten DJ-1-Proteins in Abhängigkeit der Zeit dargestellt und mit dem Computerprogramm Origin ausgewertet (vgl. Abbildung 31). Die abfallenden Kurven von unbehandelten und behandelten L166P transfizierten Zellen liegen aufeinander und zeigen keine großen Unterschiede in den Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$  (unbehandelt) = 100min,  $t_{1/2}$  (NH<sub>4</sub>Cl) = 198min und  $t_{1/2}$  (MG132) = 112min).

## Ergebnisse



**Abbildung 31: „Pulse-Chase“-Experiment mit Zusatz von Proteaseinhibitoren in transfizierten DJ-1 HEK 293T-Zellen**

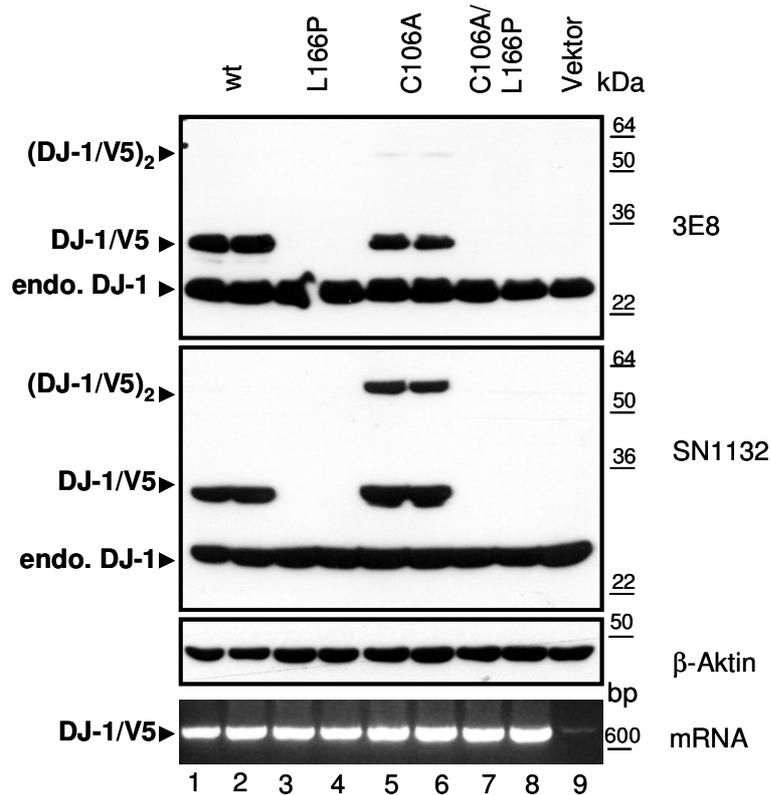
HEK 293T-Zellen wurden transient mit [L166P]DJ-1/V5 transfiziert und für 3h mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein metabolisch markiert. Anschließend wurden die Proben mit nicht-radioaktivem Medium („Chase“-Medium) für den angegebenen Zeitraum ohne Inhibitor oder mit 10µM MG132 bzw. 20mM NH<sub>4</sub>Cl inkubiert. Zellen wurden lysiert, mit V5-AK immunpräzipitiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. <sup>35</sup>S-Signale wurden im PhosphorImager und mit dem Programm ImageQuant quantifiziert und gegen „Chase“-Zeiten aufgetragen.

### 4.2.5.4 Autoproteolytischer Abbauweg von DJ-1

Da DJ-1 ein mögliches katalytisches Zentrum besitzt mit einer PH1704-typischen Anordnung von C106 (vgl. Kapitel 1.5.3), liegt die Vermutung nahe, dass DJ-1 sich selbst autoproteolytisch abbauen könnte.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Cysteinrest an der Stelle 106 durch ein Alanin in einer gezielt gesetzten Mutagenese sowohl im [wt]DJ-1 als auch im [L166P]DJ-1 Konstrukt ersetzt (vgl. Kapitel 3.4.11.1, Tabelle 5). Die Expression von [wt][C106A]DJ-1/V5 in transient transfizierten HEK 293T-Zellen war nicht verschieden zu [wt]DJ/V5 (vgl. Abbildung 32).

## Ergebnisse



**Abbildung 32: Expression von C106-mutierten DJ-1 Konstrukten, [wt]DJ-1 im Vergleich zu [L166P]DJ-1**

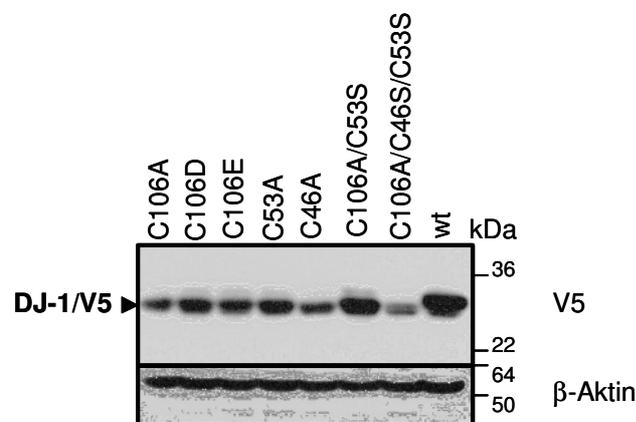
HEK 293T-Zellen wurden transient mit [wt]DJ-1/V5 (Spuren 1, 2), [L166P]DJ-1/V5 (Spuren 3, 4), [C106A]DJ-1/V5 (Spuren 5, 6), [C106A/L166P]DJ-1/V5 (Spuren 7, 8) oder pcDNA3.1 TOPO-Vektor (Spur 9) transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Lysate auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und der Western Blot mit den rechts angegebenen AK analysiert: 3E8, SN1132 und  $\beta$ -Aktin. RT-PCR (untere Reihe) wurden von parallel isolierten RNA-Proben zur Demonstrierung einer gleichmäßigen Transkription der transfizierten DJ-1-Konstrukte gemacht.

Durch eine Mutation des Cysteins im möglichen katalytischen Zentrum zu einem katalytisch inaktivem Alanin und eine gleichzeitige Mutation von Leucin 166 zu einem Helix-Brecher Prolin, sollte geprüft werden, ob diese Doppelmutante vor einem katalytischen Abbau geschützt ist. Diese Doppelmutante, [C106A/L166P]DJ-1, konnte jedoch die dramatisch reduzierte DJ-1-Proteinmenge im Vergleich zur Einfachmutante [L166P]DJ-1 nicht steigern. Die mRNA-Mengen waren bei allen Konstrukten identisch (vgl. Abbildung 32), was erneut den Effekt auf Proteinebene unterstreicht. Der beschleunigte Abbauprozess von [L166P]DJ-1 scheint also keine Autoproteolyse zu sein, sondern andere Gründe zu haben, wie zum Beispiel eine unspezifische Hydrolyse.

Es sind zusätzlich zu den DJ-1-Monomeren auch noch DJ-1-Dimere detektiert worden (vgl. Abbildung 32). Vor allen Dingen die Mutante C106A zeigt eine Dimerbande bei 50kDa. Die Dimerisierung von DJ-1 wird im Kapitel 4.3.5 genauer behandelt.

## Ergebnisse

Da DJ-1 drei Cysteine besitzt, wurden die zwei weiteren Cysteine-46 und -53 ebenso zu Alanin mutiert und eine Doppelmutante aus C106A/C53S bzw. eine Tripelmutante C106A/C46S/C53S generiert. Man kann deutlich erkennen, dass die Mutation an der Stelle Cystein-46 das Protein leicht destabilisiert im Vergleich zu der Cysteinmutante C53A. Die Tripelmutante ist ähnlich instabil wie L166P (vgl. Abbildung 33). Diese Destabilisierung von C46A scheint daran zu liegen, dass C46 an der Dimerkontakfläche liegt und ein intaktes Dimer für die Stabilität von DJ-1 von entscheidender Bedeutung ist (vgl. Kapitel 5.5). Eine Mutation von C106 zu Aspartat ist etwas stabiler als eine Mutation zu Alanin oder Glutamat (vgl. Abbildung 33). Insgesamt ist aber vor allen Dingen die Stabilität der Tripelmutante und C46A stark reduziert im Vergleich zu [wt]DJ-1.



**Abbildung 33: Stabilität von Cysteinmutationen im DJ-1-Proteins**

Es wurden folgende DJ-1/V5-Konstrukte in HEK 293T-Zellen transfiziert: [wt]DJ-1, [C106A]DJ-1, [C106D]DJ-1, [C106E]DJ-1, [C46A]DJ-1, [C53A]DJ-1, [C106A/C53S]DJ-1, [C106A/C46S/C53S]DJ-1. Nach 48h wurden die Zellen lysiert, auf einem 15% Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-V5-AK bzw. der Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin detektiert.

### **4.3 Mutagenesestudien von DJ-1 C-terminalen Mutanten im Zellkultursystem**

Der beschleunigte Abbau von [L166P]DJ-1 konnte weder durch erhöhten proteasomalen Abbau, noch durch Proteasen, lysosomalen Abbau oder Autokatalyse erklärt werden.

Aufgrund dieses ungewöhnlichen Verhaltens von [L166P]DJ-1 wurde diese Mutation in den nachfolgenden Kapiteln genauer untersucht. Dabei wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob die Sekundärstruktur entscheidend für die DJ-1-Stabilität ist. Die Substitution von L166 zu Prolin führt eine Helix-brechende AS ein. Alternativ könnte die aliphatische Seitenkette von L166 eine wichtige Rolle für die Sekundärstruktur spielen. Mit Hilfe des dreidimensionalen Strukturprogramms PyMol, welches Kristallstrukturdaten

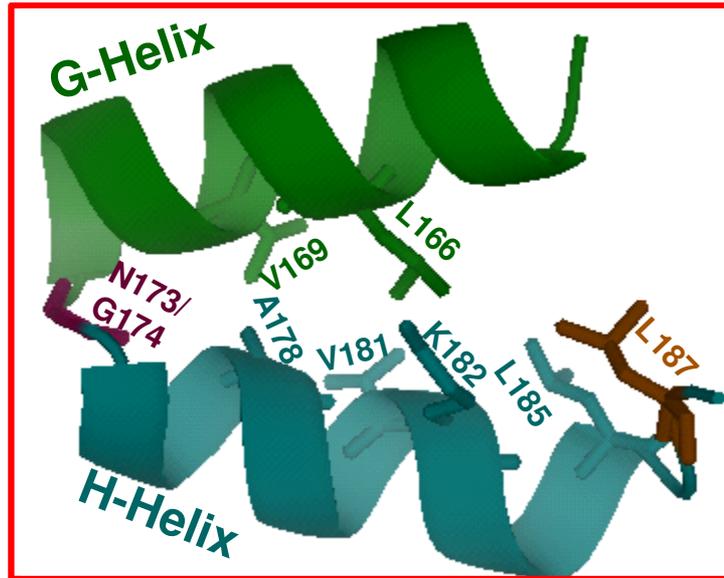
## Ergebnisse

als Basis für eine Visualisierung von Proteinen zu Grunde legt, wurde der C-Terminus des DJ-1-Proteins modelliert. Dieser C-Terminus besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices (G-Helix und H-Helix). Diese sind durch einen scharfen 2 AS langen turn getrennt, gefolgt von 3 strukturlos angeordneten AS am extremen C-Terminus. Die dreidimensionale Struktur des DJ-1-C-Terminus wurde daraufhin im Dali-Programm mit anderen strukturell ähnlichen Motiven der Proteindatenbank PDB abgeglichen. Dali ist ein Strukturprogramm, welches Teile eines Proteins oder ganze Proteine in ihrer dreidimensionalen Struktur mit anderen Proteinen oder Motiven aus der PDB-Datenbank vergleicht und Übereinstimmungen sucht. Da nur eine kleine Anzahl von strukturell ähnlichen Motiven für den DJ-1-C-Terminus gefunden wurde und diese sich meist nicht am C-Terminus befinden, sondern inmitten von größeren Proteinkomplexen von Transportproteinen oder Teil der transkriptionellen Polymerase-Maschinerie sind, wurde dieses besondere Element Helix-Knick-Helix Motiv genannt (vgl. Kapitel 1.5.3). Dieser spezielle C-Terminus des DJ-1-Proteins hebt sich strukturell von den Homologen der DJ-1/ThiJ-Superfamilie durch seine zusätzliche Helix ab (vgl. Kapitel 1.5.3) und große Teile davon sind extrem konserviert (vgl. Abbildung 11). Im Folgenden wird das Heli-Knick-Helix Motiv genauer untersucht.

### 4.3.1 Design von DJ-1 C-terminalen Mutanten

Das Helix-Knick-Helix Motiv wurde systematisch mutagenisiert. Es sollte untersucht werden, ob Prolin als Seitenkette verantwortlich für die Destabilisierung von L166P ist oder die Position L166 einen Einfluß auf die Instabilität hat.

Dabei wurden sowohl weitere Helix-brechende Prolinmutationen eingeführt, die ähnliche Eigenschaften wie L166P haben könnten, als auch Mutationen eingeführt, die das Protein nicht destabilisieren sollten (vgl. Abbildung 34).



G-Helix Mutanten	H-Helix Mutanten	Andere Mutanten
L166P	A178P	$\Delta$ N173/G174
L166E	V181P	L187P
V169P	K182P	
V169A	L185P	
V169I		

**Abbildung 34: Schematische Abbildung der gewählten C-terminalen DJ-1-Punktmutationen**

Es wurden verschiedene Mutationen gewählt, die die Topologie des C-terminalen Helix-Knick-Helix Motivs beeinflussen sollten. Mutationen in der G-Helix wurden grün gefärbt: L166P, V169P, L166E, V169A, V169I und Mutationen in der H-Helix wurden blau gefärbt: A178P, V181P, K182P, L185P. Der Knick mit der AS N173 und der absolut konservierten Aminosäure G174 ist violett und eine AS außerhalb der H-Helix: L187P ist braun markiert.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener AS am C-Terminus auf die Stabilität des DJ-1-Proteins wurden die in Abbildung 34 dargestellten Mutationen per Fehlpaarungsprimer-PCR kloniert (vgl. Kapitel 3.4.11).

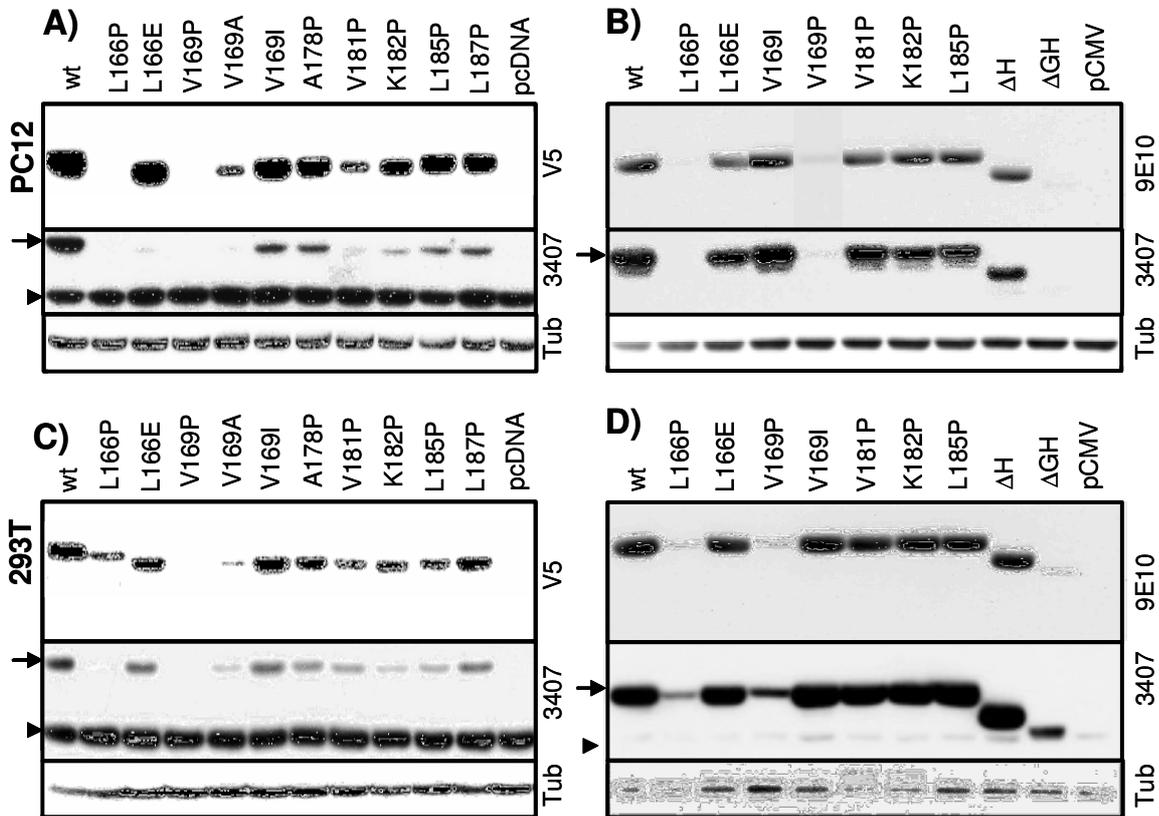
Diese synthetischen DJ-1-Mutanten wurden mit einem C-terminalen V5-tag oder mit einem N-terminalen Myc-tag versehen. Die N-terminal-markierten DJ-1-Expressionskonstrukte wurden durch zwei verkürzte DJ-1-Mutanten ergänzt, in denen die H-Helix ([ $\Delta$ H]DJ-1) oder der komplette C-Terminus ([ $\Delta$ G/H]DJ-1) deletiert wurden.

#### 4.3.2 “Steady state” und “Pulse-Chase”-Experimente der C-terminalen DJ-1-Mutanten

Die unter Kapitel 4.3.1 genannten Mutanten wurden in HEK 293T- und PC12-Zellen transient transfiziert. Nach 48h wurde die Expression aller Konstrukte mit AK gegen den N-terminalen Myc-tag und C-terminalen V5-tag im Western Blot bestimmt. Dabei stellte

## Ergebnisse

sich heraus, dass die G-Helix-brechende [V169P]DJ-1-Mutante genauso instabil ist wie [L166P]DJ-1, da die Expression dieser Mutante unabhängig von der Epitopmarkierung und vom Zelltyp kaum im Western Blot mit DJ-1-spezifischen AK zu detektieren ist. Während die Proteinexpression von L166E und V169I viel höher ist als die von L166P und V169P (vgl. Abbildung 35).



**Abbildung 35: Expression der verschiedenen C-terminalen DJ-1-Mutanten in PC12- und HEK 293T-Zellen**

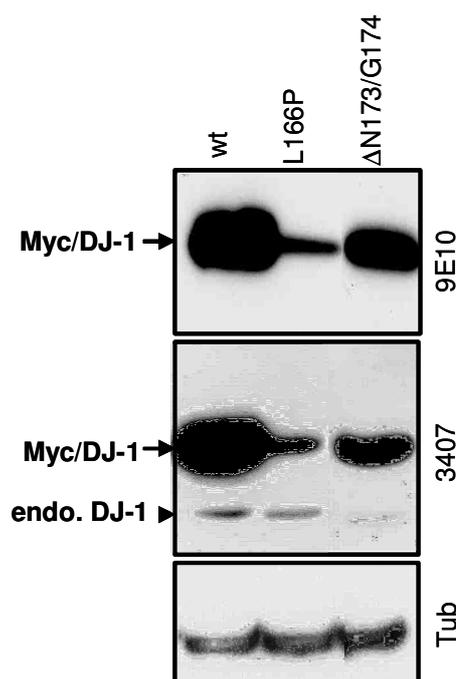
A, B) PC12- oder C, D) HEK 293T-Zellen wurden transient mit den oben genannten Konstrukten transfiziert mit C-terminalem V5-tag (A, C) und N-terminalem Myc-tag (B, D) oder Vektorkontrollen. Die DJ-1-Expression wurde im Zelllysat auf einem Western Blot mit den rechts bezeichneten AK bestimmt: anti-V5 oder 9E10 gegen den Myc-tag, AK 3407 gegen DJ-1,  $\alpha$ -Tubulin (Tub) als Ladekontrolle, (Pfeile markieren DJ-1/Myc- oder DJ-1/V5-Konstrukte, Pfeilköpfe markieren endogenes DJ-1).

Dies bedeutet, dass der nachteilige Effekt von L166P nicht auf das Fehlen der hydrophoben Seitenkette Leucin zurückzuführen ist, sondern auf die Art der Mutation zu einem Prolin in der G-Helix. Eine mögliche Erklärung für die nicht-destabilisierende Wirkung von L166E ist eine Interaktion zwischen dem positiv geladenen Glutamatrest von L166E mit dem negativ geladenen Aminosäurerest Lysin-182 auf der gegenüberliegenden Helix (vgl. Abbildung 34). Ebenso ist eine Substitution eines hydrophoben Aminosäurerestes Valin an der Stelle 169 zu Isoleucin stabiler als eine Substitution zu Alanin, eine verkürzte hydrophobe Seitenkette. Diese mögliche Interaktion wird durch den

## Ergebnisse

Knick, der durch die AS Asparagin-173 und Glycin-174 hervorgerufen wird, ermöglicht, indem sich die beiden Helices im C-Terminus entsprechend annähern. Es scheint also hydrophobe Wechselwirkungen in der Nähe der Knickumgebung zu geben, die Auswirkungen auf die Stabilität des Proteins haben.

Erstaunlicherweise führt die Deletion des Knicks, die Eliminierung der beiden AS N173 und G174, des Helix-Knick-Helix Motivs ebenfalls zu einer Destabilisierung des DJ-1-Proteins. Der Knick, der durch die AS Glycin einen Winkel von 55° hervorruft, ist ebenso wichtig für die Proteinstabilität wie die G-Helix (vgl. Abbildung 36).



**Abbildung 36: Expression von [wt]DJ-1, [L166P]DJ-1 und [ $\Delta$ N173/G174]DJ-1 in HEK 293T-Zellen**

Myc/[wt]DJ-1, Myc/[L166P]DJ-1 und Myc/[ $\Delta$ N173/G174]DJ-1 wurden in HEK 293T-Zellen transient transfiziert. Die DJ-1-Expression wurde im Zelllysat auf einem Western Blot mit den rechts bezeichneten AK bestimmt und als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin (Tub) verwendet (untere Reihe), (Pfeile markieren Myc/DJ-1-Konstrukte, Pfeilköpfe markieren endogenes DJ-1).

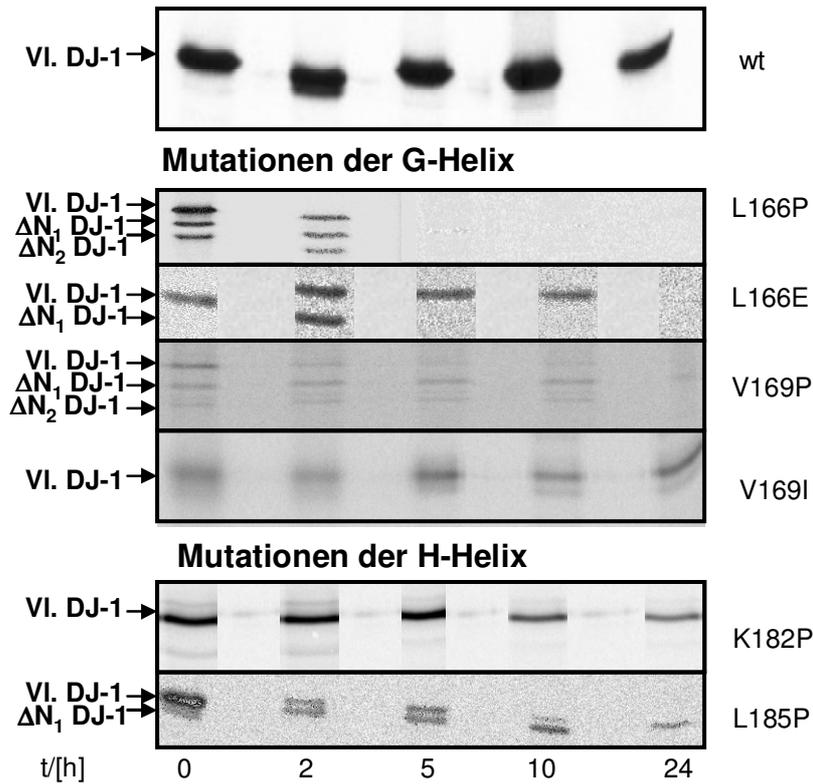
Im Gegensatz zu den dramatischen Effekten der G-Helix-brechenden Prolinmutanten sind die Proteinexpressionen der Prolinmutanten der H-Helix nur leicht reduziert (vgl. Abbildung 35). Die Deletion der H-Helix ( $\Delta$ H) vermindert die Expression nur leicht, während die Wegnahme der gesamten C-terminalen Domäne ( $\Delta$ G/H) zu einer stark reduzierten Proteinmenge führt, genauso wie dies bei den G-Helix-brechenden Mutanten L166P und V169P der Fall ist (vgl. Abbildung 35).

„Pulse-Chase“-Experimente in HEK 293T-Zellen belegten, dass [wt]DJ-1/V5 ein sehr stabiles Protein ist, welches eine Halbwertszeit von >24h hat, während [L166P]DJ-1/V5

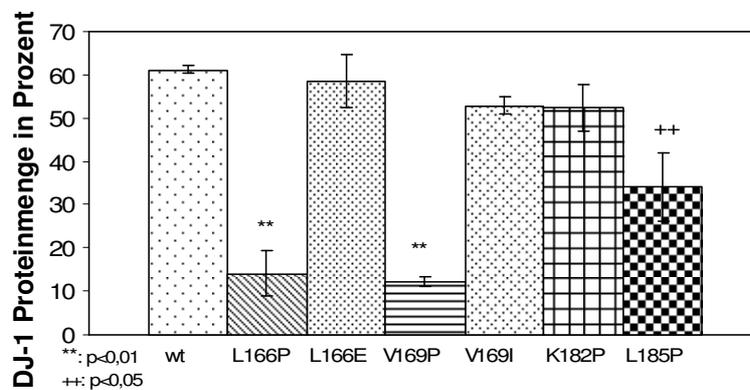
## Ergebnisse

nach ca 5h degradiert ist und die N-terminalen Abbaubanden stabilisiert werden. Dies wurde schon in Abbildung 28 gezeigt. Die künstliche G-Helix-brechende Mutante [V169P]DJ-1/V5 wurde genauso schnell abgebaut wie die pathologische Parkinson-Mutante [L166P]DJ-1/V5 (vgl. Abbildung 37). Allerdings ist die Expression von [L166P]DJ-1/V5 und [V169P]DJ-1/V5 zum Zeitpunkt t=0 sehr gering. Dies hat möglicherweise mit den Versuchsbedingungen zu tun, da der „Pulse“ 3h lang durchgeführt wurde und daher schon ein Großteil der sehr instabilen DJ-1-Mutanten abgebaut ist. Kürzere „Pulse“-Zeiten haben zur Folge, dass eine messbare Inkorporation von [<sup>35</sup>S]Methionin/Cystein nicht stattfinden kann.

## Ergebnisse



### B)



**Abbildung 37: „Pulse-Chase“-Experiment von C-terminalen DJ-1-Mutanten**

HEK 293T-Zellen wurden transient mit den angegebenen DJ-1/V5-Mutanten transfiziert. Nach 3-stündigem „Pulse“ mit einer Mischung aus [<sup>35</sup>S]Methionin/Cystein wurden die Zellen mit nicht-radioaktiven schwefelhaltigen AS behandelt und zu den angegebenen Zeiten lysiert (vgl. Kapitel 3.6.2.1). A) Nach der Lyse wurde mit den Proteinproben und V5-AK eine IP durchgeführt. Es wurden autoradiografische Filme entwickelt. Volllängenbanden (VI.) von L166P und V169P sind nur zwischen 0-2h zu sehen (mit einem Pfeil gekennzeichnet), dann tauchen N-terminale Abbaubanden auf (ΔN<sub>1</sub> und ΔN<sub>2</sub>), die ebenfalls mit Pfeilen gekennzeichnet sind. Die anderen Mutanten sind >10h stabil.

B) Intensitäten von DJ-1 VI. wurden zum Zeitpunkt 10h mit dem Programm ImageQuant quantifiziert und in Relation zum Zeitpunkt t=0h gesetzt. Aus drei verschiedenen Experimenten wurden Mittelwerte gebildet, der Standardfehler wurde bestimmt und mit dem Student t-test p-Werte bestimmt.

Während die G-Helix-Brecher schon nach 2-5h abgebaut sind und nur noch N-terminale Abbaubanden zeigen, sind sowohl [L166E]DJ-1/V5 als auch [V169I]DJ-1/V5 deutlich länger stabil (ca. 10h). Die H-Helix-brechenden Mutanten K182P und L185P scheinen auch stabiler zu sein als die G-Helix-Brecher. Allerdings ist L185P signifikant instabiler als K182P, wenngleich nicht so betroffen wie G-Helix-Brecher (vgl. Abbildung 37).

### 4.3.3 Inhibitorexperimente zur Blockierung des Proteasoms

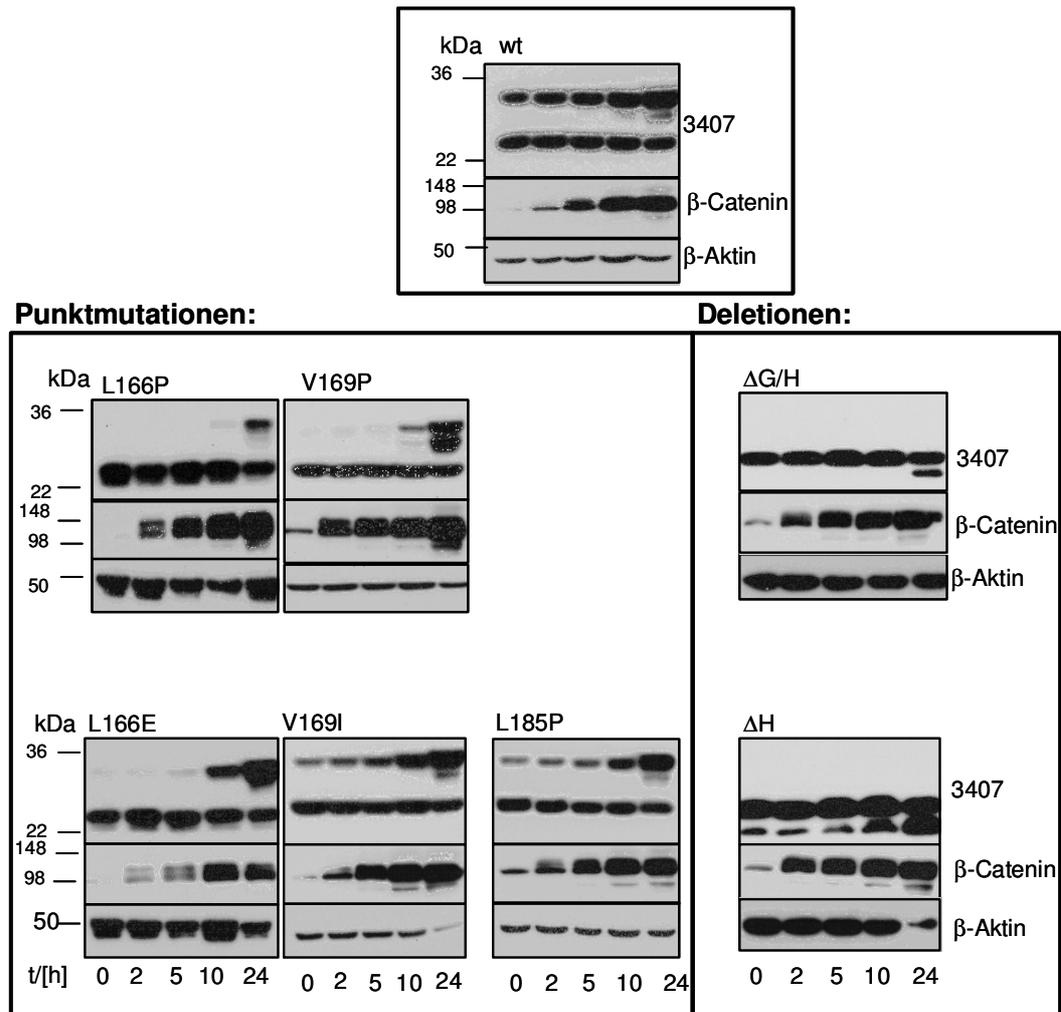
#### 4.3.3.1 Hemmung des Proteasoms mit Epoxomycin

Da DJ-1 sehr empfindlich auf Veränderungen der Sekundärstruktur am C-Terminus reagiert, stellt sich erneut die Frage: Wie verändert die Substitution von AS in der G-Helix die Stabilität des ganzen Proteins? Wird das aktive Zentrum um das Cystein 106 durch ein Abknicken der sperrigen Helices am C-Terminus freigelegt? Gelangen hydrophobe Reste aus dem Inneren des Proteins in Kontakt mit der wässrigen Lösung, so dass [L166P]DJ-1 vom UPS als falsch gefaltetes Molekül erkannt wird und dann beschleunigt abgebaut wird? Unter Kapitel 4.2.5.1 wurde das erste Mal geprüft, ob Hemmung der Proteasomaktivität mit MG132 den Abbau von L166P verhindern kann. Dies war nicht der Fall. Leider konnten die Zellen mit diesem Inhibitor nur maximal 11h inkubiert werden, danach wirkte er toxisch auf die Zellen. Aus diesem Grunde soll nun mit dem effektiveren Proteasomhemmer Epoxomycin erneut über einen längeren Zeitraum getestet werden, welchen Einfluss das Proteasom auf den beschleunigten Abbau von mutiertem DJ-1 hat.

Epoxomycin ist sehr viel spezifischer für proteasomale Hemmung als das Aldehyd MG132, da es als Epoxyketon sowohl mit der Hydroxyl- als auch der Aminogruppe des katalytisch aktiven N-terminalen Threonins im Proteasom zu einem cyclischen Morphinaddukt reagiert (vgl. Kapitel 4.2.5.1). Dieser einzigartige Mechanismus sorgt dafür, dass Epoxomycin keine anderen Cystein- oder Serin-Proteasen inhibieren kann, da diese keinen freien N-Terminus in der Nähe des nukleophilen Zentrums besitzen. Außerdem bindet Epoxomycin irreversibel an die katalytisch aktive chymotryptische Seite und ist nicht so toxisch wie MG132. MG132 wird dagegen zwar sehr schnell von der Zelle aufgenommen, bindet aber eher langsam, hemmt unspezifisch eine Reihe von Cystein- und Serin-Proteasen und ist reversibel.

In diesem Experiment wurden HEK 293T-Zellen mit [wt]DJ-1/V5 und den verschiedenen C-terminalen DJ-1-Mutanten transient transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit 1 $\mu$ M Epoxomycin in den angegebenen Zeitintervallen behandelt (vgl. Abbildung 38).

## Ergebnisse



**Abbildung 38: Epoxomycinbehandlung von C-terminalen DJ-1-Mutanten in HEK 293T-Zellen**

C-terminale DJ-1-Mutanten wurden transient in HEK 293T-Zellen transfiziert. Nach 24h wurden diese mit 1 $\mu$ M Epoxomycin für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Lysate wurden auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit den rechts angegebenen AK detektiert: AK 3407 für DJ-1,  $\beta$ -Catenin als Positivkontrolle für die Aktivität des Proteasominhibitors Epoxomycin und  $\beta$ -Aktin zur Kontrolle äquivalenter Proteinmengen.

[Wt]DJ-1/V5 ist über 24h hindurch gleichmäßig stabil exprimiert und scheint kaum vom Proteasom abgebaut zu werden. Die Proteinmengen der beiden G-Helix-brechenden Mutanten V169P, L166P und der Deletionsmutante  $\Delta$ G/H, bei der der gesamte C-Terminus fehlt, werden nach 10h bis 24h erheblich angehäuft (vgl. Abbildung 38), erreichen aber niemals das Niveau von [wt]DJ-1/V5, was bei einem vollständigen proteasomalen Abbau der Fall sein sollte. Die H-Helix-brechende Mutante L185P, die  $\Delta$ H-Deletionsmutante und die G-Helix nicht destabilisierende Mutante V169I sind weniger stark vom proteasomalen ACCESSION\_offen, während L166E vergleichsweise stark stabilisiert wird, was später näher diskutiert wird (vgl. Kapitel 5.4). Es ist eine merkbare Akkumulation der Proteinmengen nach 10h sichtbar, die aber weit weniger stark ausfällt als für die G-Helix-brechenden Mutanten. Erstaunlich ist, dass Akkumulation aller DJ-1-Mutanten erst nach

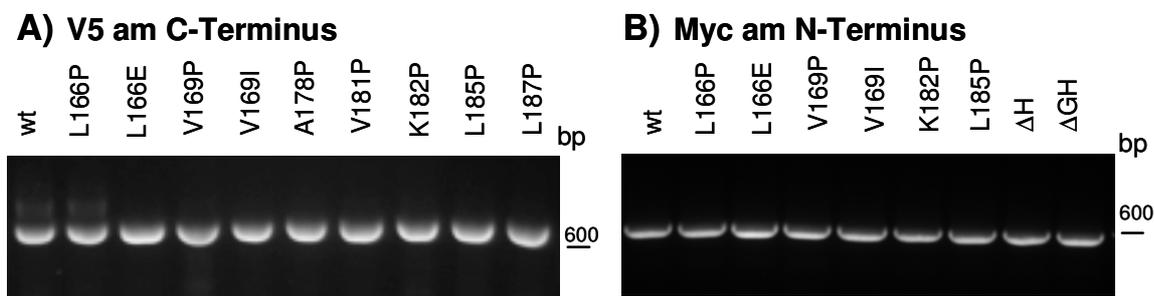
## Ergebnisse

Mutanten. Erstaunlich ist, dass Akkumulation aller DJ-1-Mutanten erst nach 10h beginnt, obwohl das Kontrollprotein  $\beta$ -Catenin schon nach 2h wieder stabilisiert wird.

Nach den erneuten Untersuchungen mit einem spezifischeren Proteasominhibitor und einer Inhibition über einen längeren Zeitraum bestätigt sich die anfängliche Vermutung, dass die beschleunigte Degradation von [L166P]DJ-1 und der anderen G-Helix-brechenden Mutante V169P nur zum Teil auf beschleunigtem proteasomalem Abbau beruht. Vielleicht gibt es mehrere zelluläre Abbaumechanismen, die sich überlagern.

### 4.3.4 Quantitative und semiquantitative RT-PCR Studien der DJ-1 C-terminalen Mutanten

Um zu demonstrieren, dass der Verlust der Proteinmenge der G-Helix-brechenden Mutanten nicht auf eine Instabilität der mRNA zurückzuführen ist, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurden PC12- und HEK 293T-Zellen transient mit den unter Kapitel 4.3.1 genannten DJ-1-Mutanten transfiziert und nach 48h mit Hilfe der Trizolmethode (vgl. Kapitel 3.4.12.1) die gesamte RNA isoliert. Anschließend wurde in einer RT-PCR die Menge an DJ-1-mRNA quantifiziert (vgl. Abbildung 39).



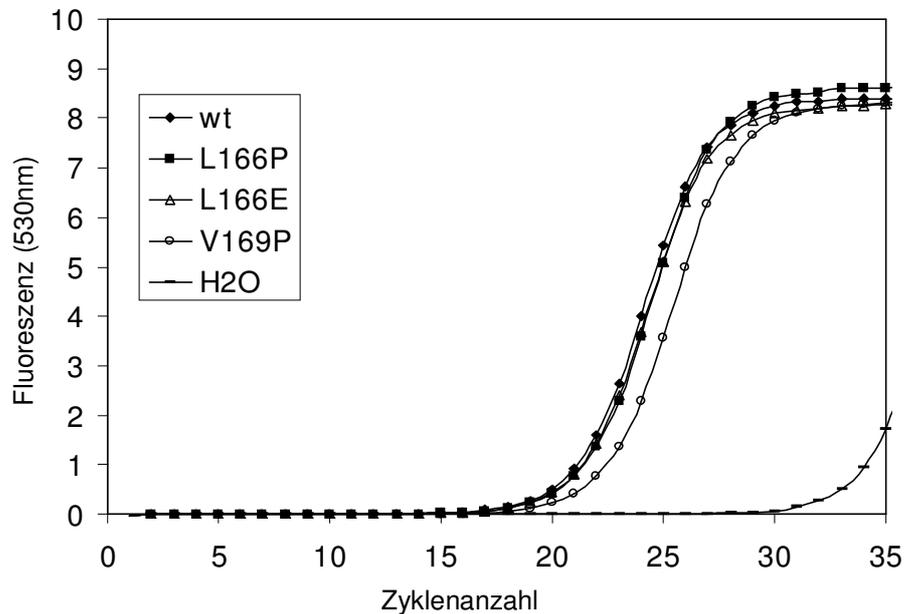
**Abbildung 39: RT-PCR von DJ-1 C-terminalen Mutanten**

Die gesamte RNA wurde aus HEK 293T-Zellen isoliert, die mit den angegebenen Mutanten mit A) C-terminalem V5-tag und B) N-terminalem Myc-tag transient transfiziert worden sind. Nach einer RT-PCR (vgl. Kapitel 3.4.12.2) mit folgenden Primern: NcoI\_FWD und BamHI\_V5\_REV (V5-Konstrukte) bzw. EcoRI\_FWD und  $\Delta$ G/H\_REV (Myc Konstrukte) (vgl. Tabelle 4 und Tabelle 6), wurden die Amplifikate auf einem Agarosegel analysiert.

Da diese Art der RT-PCR nur semiquantitative Ergebnisse liefert, wurden zur Bestätigung zusätzlich quantitative PCR-Experimente im Light Cycler durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.12.3). Durch präzise Amplifikationskurven, die in Echtzeit ausgewertet wurden, kann man kleinste Änderungen an DNA-Mengen unterscheiden. Mit dieser exakten qRT-PCR-Methode bestätigten sich die semiquantitativen RT-PCR-Ergebnisse. Amplifikationskurven von [L166P]DJ-1/V5, [L166E]DJ-1/V5 und [V169P]DJ-1/V5,

## Ergebnisse

unterschieden sich nicht von [wt]DJ-1/V5, d. h. die Menge an DJ-1-mRNA war in allen Zellen gleich (vgl. Abbildung 40).



**Abbildung 40: qRT-PCR der G-Helix Mutanten und [wt]DJ-1/V5**

48h nach transients Transfektion mit folgenden Konstrukten: [wt]DJ-1/V5, [L166P]DJ-1/V5, [L166E]DJ-1/V5, [V169P]DJ-1/V5 wurde die gesamte RNA aus Zellen extrahiert und anschließend revers transkribiert. Die Proben wurden dann in einem Light Cycler mit folgenden Primern amplifiziert: NcoI\_FWD und BamHI\_V5\_REV. Aus dem Einbau von SybrGreen resultierende Echtzeit-Amplifikationskurven sind in obigem Diagramm dargestellt.

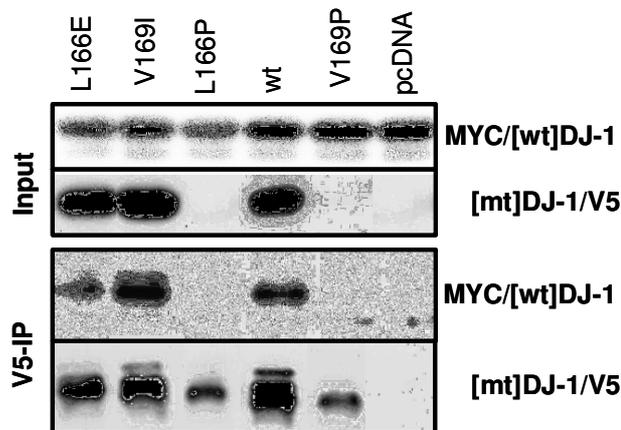
G-Helix-brechende Mutanten scheinen somit DJ-1 auf Proteinebene zu destabilisieren. Im Nachfolgenden wurde die Frage angegangen, ob die Destabilisierung von C-terminalen DJ-1-Mutanten mit möglichen Störungen der Tertiärstruktur zusammenhängt.

### 4.3.5 Dimerbildung der DJ-1 C-terminalen Mutanten

Da DJ-1 hauptsächlich als funktionelles Dimer vorliegt (vgl. Kapitel 1.5.3), besteht eine sehr enge Beziehung zwischen Funktion und struktureller Integrität des Proteins. Es ist daher von großer Wichtigkeit zu untersuchen, ob die C-terminalen DJ-1-Mutanten Dimere bilden können oder nicht. Für L166P ist aus der Literatur schon bekannt, dass durch die Zerstörung des C-Terminus, der Bestandteil der Dimerkontaktfläche ist, keine Dimerisierung möglich ist (vgl. Kapitel 1.5.3). Für alle anderen Mutanten mag die Fähigkeit zur Dimerisierung weitere Hinweise darauf geben, wie stark die Struktur von DJ-1 und damit vermutlich auch dessen Funktion durch Manipulationen am C-Terminus beeinträchtigt ist.

## Ergebnisse

Um die Dimerisierung der C-terminalen DJ-1-Mutanten zu untersuchen, wurden HEK 293T-Zellen gleichzeitig mit zwei verschiedenen Epitop-markierten DJ-1-Spezies transfiziert: Myc/[wt]DJ-1 sowie [wt]DJ-1/V5 bzw. G-Helix und H-Helix Mutanten mit V5-tag. Nach 48h wurden Zelllysate hergestellt und mit dem monoklonalen V5-AK (vgl. Kapitel 3.6.1.12) immunpräzipitiert. Myc/[wt]DJ-1 wurde mit [wt]DJ-1/V5 als Heterodimer copräzipitiert. Die beiden wt-Proteine bilden also Heterodimere. Die niedrigen Mengen der instabilen G-Helix-brechenden Mutanten werden durch die IP mit V5-AK effizient angereichert. Allerdings wird das stabile Myc/[wt]DJ-1 Protein hier nicht copräzipitiert (vgl. Abbildung 41).



**Abbildung 41: Co-IP von DJ-1-Konstrukten mit V5-tag und cotransfiziertem Myc/[wt]DJ-1**

Die oben gekennzeichneten DJ-1/V5 Konstrukte wurden zusammen mit Myc/[wt]DJ-1 in HEK 293T-Zellen transfiziert und mit dem monoklonalen V5-AK immunpräzipitiert. Rohlysate (obere 2 Reihen) und die IP (untere 2 Reihen) wurden auf 15% SDS-Gele geladen und mit folgenden AK detektiert: V5-AK und Myc-AK.

Die destabilisierten G-Helix-brechenden Mutanten sind demnach nicht in der Lage, ein Heterodimer mit [wt]DJ-1 zu bilden, während die G-Helix nicht-brechenden Mutanten L166E und V169I dies können.

Nun ist die entscheidende Frage, ob die fehlende Fähigkeit Dimere zu bilden die G-Helix-brechenden Mutanten so stark einschränkt, dass sie auch ihre normale Funktion nicht mehr ausüben können. Dazu wurden im Folgenden verschiedene funktionelle Studien durchgeführt, in denen dieser Frage nachgegangen werden soll.

### **4.4 Herstellung einer DJ-1 Knock-out-Zelllinie für funktionelle Studien**

Die Funktion eines Proteins wird oft dadurch untersucht, dass die Konsequenzen des Funktionsverlustes ermittelt werden. Dies ist *in vivo* z. B. in einem knock-out Tiermodell

## Ergebnisse

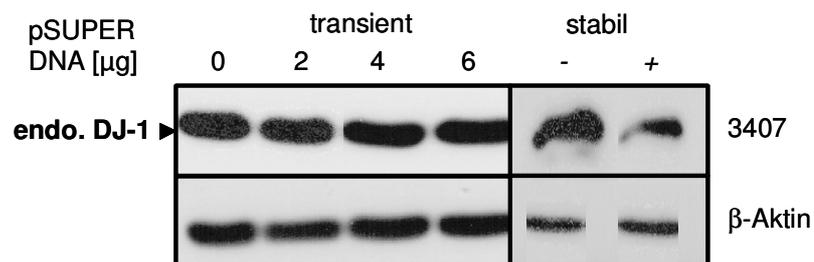
oder in einem Zellkulturmodell möglich. Dazu wird eine Zelllinie generiert, die möglichst wenig oder gar kein endogenes Protein mehr exprimiert. Hiermit können zelluläre Fehlfunktionen direkt untersucht werden. Wenn man diese Fehlfunktionen dann wieder aufheben kann, indem man das wt-Protein in die Zelle hineintransfiziert, hat man ein gutes funktionelles System, in dem man verschiedene Mutanten testen kann.

Leider ist DJ-1 wie anfangs erwähnt in fast allen Zelllinien sehr stark exprimiert, so dass man eine effiziente Methode finden muss, um die Expression von DJ-1 gezielt auszuschalten. Hier wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: Bei der ersten Methode wurde small interfering RNA (siRNA) verwendet, um die endogene DJ-1-Expression zu reduzieren (vgl. Kapitel 3.5.6). Der andere Weg bestand darin, DJ-1<sup>-/-</sup> embryonale Stammzellen zu verwenden oder Fibroblastenkulturen von DJ-1<sup>-/-</sup> Mausembryonen herzustellen. Diese beiden Techniken werden im Folgenden mit den jeweiligen Vor- und Nachteilen beschrieben.

### 4.4.1 Knock-down von endogenem DJ-1 im Zellkultursystem

Zunächst wurden zwei verschiedene Knock-down-Verfahren im Zellkultursystem ausprobiert.

Synthetische Oligonukleotide, die gegen Abschnitt 270-289bp von DJ-1 gerichtet sind, wurden in den Expressionsvektor pSUPER ligiert. Bei einer transienten Transfektion in HEK 293T-Zellen sollte das DJ-1-Protein aufgrund von RNA-Interferenz vermindert exprimiert werden (vgl. Kapitel 3.5.6). Leider konnte aber nur eine sehr schwache Reduktion des endogenen DJ-1 festgestellt werden (vgl. Abbildung 42).



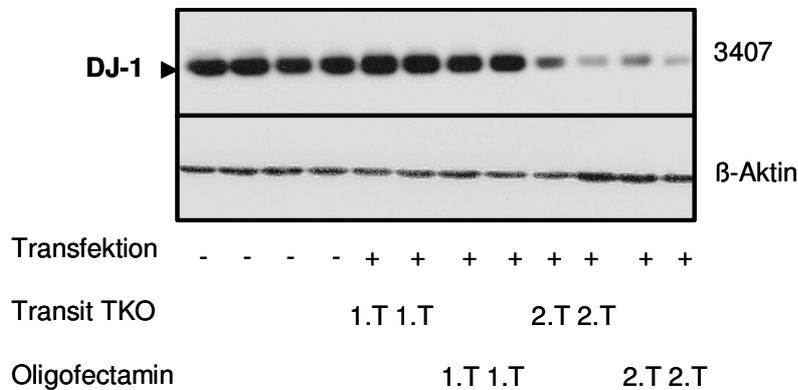
**Abbildung 42: Transiente und stabile Transfektion mit siRNA im pSuper Vektor in HEK 293T-Zellen**

HEK 293T-Zellen wurden mit den angezeigten DNA-Mengen des pSUPER-Vektors mit siRNA-Inserts transient transfiziert (linke Spalte), bzw. pcDNA3.1 mit Zeocinselektionsmarker cotransfiziert mit Leervektor (-) oder pSUPER (+) und nach 3 Wochen Selektion Mischkulturen der stabilen Zellklone etabliert (rechte Spalte). Die entsprechenden Zelllysate wurden auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit dem polyklonalen DJ-1-spezifischen AK 3407 (obere Reihe) und β-Aktin als Ladekontrolle (untere Reihe) detektiert.

## Ergebnisse

Da eine transiente Transfektion nicht immer eine ausreichende Effizienz erzielen kann, wurden stabile Zellklone hergestellt, indem zusätzlich zu dem Vektor pSUPER noch ein Vektor mit Selektionsmarker transfiziert wurde (vgl. Kapitel 3.5.4). Bei diesen stabilen Klonen konnte ein ca. 50%iger Knock-down beobachtet werden (vgl. Abbildung 42).

Eine andere Methode ist die direkte transiente Transfektion von siRNA-Duplexen. Es wurde folgende Targetsequenz ausgewählt: 414-434bp. Diese siRNA wurde direkt in HEK 293T-Zellen entweder mit Oligofectamin oder Transit TKO (vgl. Kapitel 3.5.6) transient transfiziert. Bei beiden Reagenzien handelte es sich um Lipidgemische, die speziell für RNA-Transfektionen geeignet sind. Beide Methoden wurden ausprobiert, wobei nach der 1. Transfektion noch kein Verlust des endogenen DJ-1-Signals detektiert werden konnte (vgl. Abbildung 43).



**Abbildung 43: Transiente Transfektion von siRNA Duplexen mit Oligofectamin oder Transit TKO in HEK 293T-Zellen**

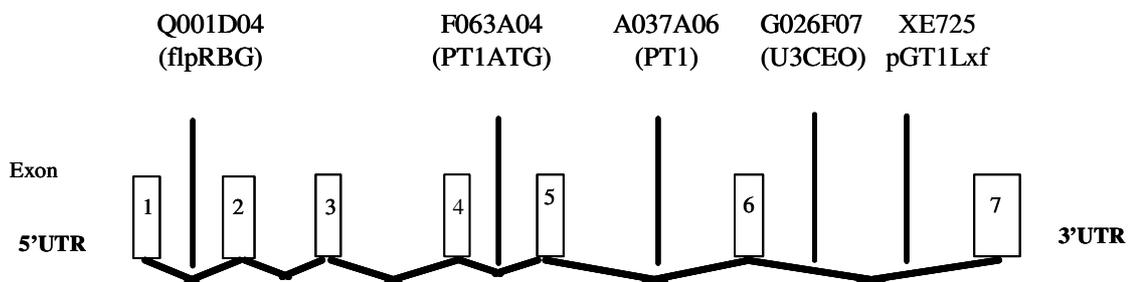
siRNA-Duplexe wurden in HEK 293T-Zellen mit Hilfe von Oligofectamin oder Transit TKO nach den Vorschriften des Herstellers transient transfiziert. Die Transfektion wurde immer in Duplikaten durchgeführt und einmal (1.T) bzw. ein zweites Mal nach 2 Tagen transfiziert (2.T). Die Knock-down-Effizienz wurde nach Lysierung und Transfer auf PVDF-Membranen mit den anti-DJ-1 AK 3407 (obere Reihe) bestimmt. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin (untere Reihe).

Die besten Resultate wurden erzielt, nachdem die siRNA zweimal nacheinander in HEK 293T-Zellen transfiziert worden war. Dabei wurden die Zellen nach der ersten Transfektion am nächsten Tag neu ausgesät und wiederum einen Tag später transfiziert. Man kann eine deutliche Reduktion des endogenen DJ-1 erkennen (vgl. Abbildung 43).

Da erst nach einer zweifachen transienten Transfektion die Expression von DJ-1 in erheblicher Menge reduziert werden konnte, war diese Methode nicht sonderlich praktikabel für die nachfolgenden funktionellen Studien. Aus diesem Grunde wurden Zellkulturen von DJ-1 Knock-out Mäusen angelegt.

#### 4.4.2 DJ-1 GeneTrap ES-Zellen

Die ES-Zellen, mit denen DJ-1 Knock-out-Mäuse generiert wurden, wurden von Thomas Floss (Arbeitskreis Prof. Wolfgang Wurst, GSF, München) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit dem sogenannten GeneTrap-Verfahren hergestellt, bei dem sich eine Reporter/Selektorkassette zufällig in das Genom einbaut. Der Vorteil ist, dass man gleichzeitig ein Gen mutieren kann und durch den Reporter, in diesem Fall lacZ, das Gen identifizieren kann. Allerdings hat man keinen Einfluss auf den Ort der Integration der Kassette im Genom. So wurden 5 Zellklone mit einer Integration im *DJ-1*-Gen generiert (vgl. Abbildung 44). Dabei stellte sich heraus, dass der Klon Q001D04 am besten für einen Knock-down geeignet wäre, da dieser sehr nah am N-Terminus des *DJ-1*-Gens integriert wurde und damit ein Großteil des *DJ-1*-Gens nicht mehr intakt ist.



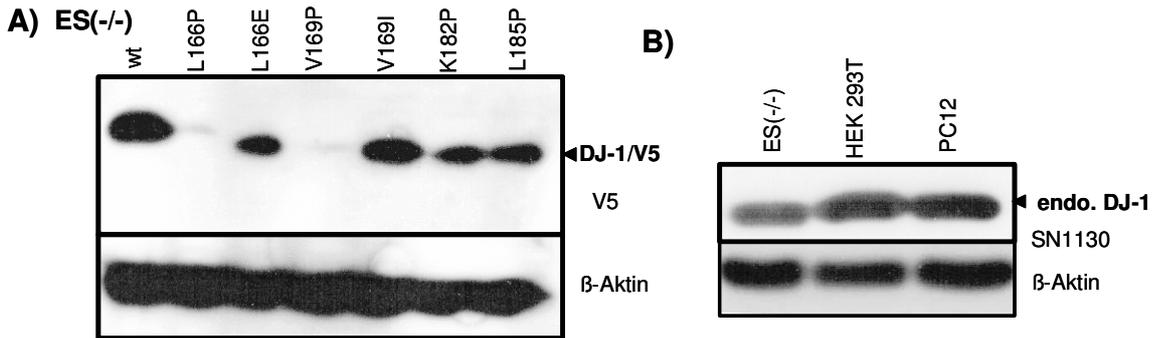
**Abbildung 44: Schematische Darstellung der Integration der Reporter/Selektorkassette ins *DJ-1*-Gen mit Hilfe der GeneTrap-Methode**

Abbildung des 7 Exons umfassenden *DJ-1*-Gens. An den entsprechenden Stellen sind die fünf verschiedenen Integrationsorte der Reporter/Selektorkassette markiert.

Es wurden Zellkulturen von ES(-/-)-Zellen (Klon Q001D04) angelegt, bei dem sich die Reporter/Selektorkassette zwischen Exon 1 und 2 integrierte. Die aus diesem Klon resultierenden ES-Zellen sollten dann für die funktionellen Studien des DJ-1-Proteins zu Hilfe genommen werden.

Es sollte zunächst überprüft werden, ob sich diese Zellen effizient transfizieren lassen, um sie für funktionelle Studien verwenden zu können. Außerdem sollte das Expressionsmuster der C-terminalen Mutanten getestet werden und mit den stabil und instabil exprimierenden Konstrukten in HEK 293T- und PC12-Zellen verglichen werden (vgl. Abbildung 35). Die ES-Zellen wurden transient mit den entsprechenden C-terminalen DJ-1-Mutanten und [wt]DJ-1/V5 transfiziert. Die Transfektionseffizienz war deutlich schlechter als bei den HEK 293T-Zellen (vgl. Abbildung 45).

## Ergebnisse



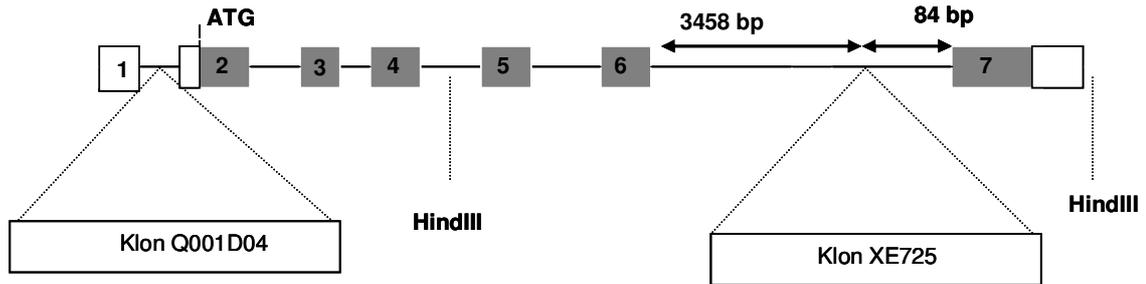
**Abbildung 45: Transiente Transfektion von DJ-1-Konstrukten in ES(-/-)-Zellen und Überprüfung der endogenen DJ-1-Expression.**

A) Die angegebenen DJ-1-Konstrukte wurden in ES(-/-)-Zellen transient transfiziert. Lysate wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit dem monoklonalen V5-AK (obere Reihe) auf die Expression der DJ-1-Konstrukte und mit  $\beta$ -Aktin (untere Reihe) als Ladekontrolle getestet. B) Endogenes DJ-1 wurde in ES(-/-)-Zellen mit dem polyklonalen DJ-1-spezifischen SN1130 AK (obere Reihe) getestet und mit der Expressionsmenge von DJ-1 in PC12- bzw. HEK 293T-Zellen verglichen. Gleichmässige Proteinladung wurde in einer Western Immunoreaktion mit  $\beta$ -Aktin bestätigt (untere Reihe).

Die relativen Expressionsmengen der DJ-1-Konstrukte waren genauso wie beim Auftragen der direkten Lysate in HEK 293T-Zellen und PC12-Zellen (vgl. Abbildung 35). Die G-Helix-brechenden Mutanten waren kaum exprimiert, während die H-Helix-Brecher ähnlich stabil waren wie [wt]DJ-1 (vgl. Abbildung 45A). Allerdings wurde mit polyklonalem AK auch endogenes DJ-1 in den ES(-/-)-Zellen visualisiert. Im Vergleich zu PC12- und HEK 293T-Zelllysate waren die Proteinmengen zwar reduziert, aber sichtbar (vgl. Abbildung 45B). Die Integration in Intron 1 lässt den ORF intakt und erlaubt eine zumindest schwache Expression von DJ-1. Die ES-Zellen waren demnach für die funktionellen Studien nicht brauchbar.

Alle 5 ES-Zellklone wurden in Blastozysten injiziert, um daraus Knock-out-Mäuse herzustellen. Leider stellte sich heraus, dass nicht der Klon Q001D04, sondern Zellklon XE725 keimbahngängig war und damit nur dieser für den DJ-1-Knock-out verwendet werden konnte. Die Reporter/Selektor-Kassette beim Klon XE725 wurde ziemlich weit am C-terminalen Ende des *DJ-1*-Gens eingebaut, zwischen Exon 6 und 7, so dass noch ein großer Teil des Gens intakt ist (vgl. Abbildung 46).

## Ergebnisse

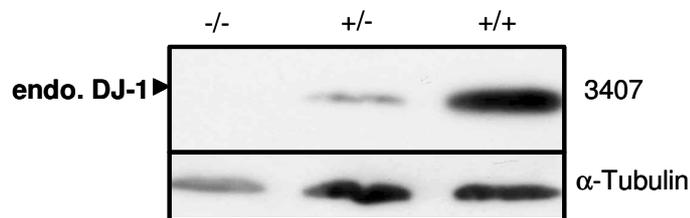


**Abbildung 46: Schematische Darstellung der Integration der Reporter/Selektorkassette in das *DJ-1*-Gen mit Hilfe der GeneTrap-Methode**

In das *DJ-1*-Gen, bestehend aus Exon 1-7, wurde mit Hilfe des GeneTrap-Verfahrens zwischen Exon 1 und 2 bzw. Exon 6 und 7 eine  $\beta$ -Galactosidasekassette eingebaut.

### 4.4.3 Expression von DJ-1 in DJ-1 Knock-out-Mäusen

Um die Expression von DJ-1 in der Knock-out-Maus zu überprüfen, wurden Hirnlysate einer homozygoten  $DJ-1^{-/-}$  und heterozygoten  $DJ-1^{+/-}$ -Maus sowie einer  $DJ-1^{+/+}$ -Kontrollmaus des gleichen Inzuchtstamms hergestellt. Auf einem Western Blot war die Expression von endogenem DJ-1 deutlich reduziert, und in der homozygoten Knock-out-Maus gar kein endogenes DJ-1-Protein detektiert worden (vgl. Abbildung 47).



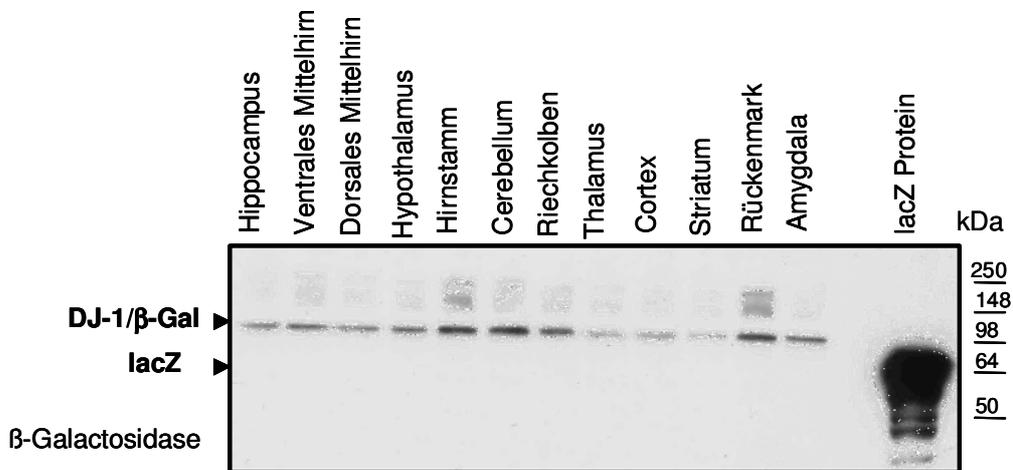
**Abbildung 47: Endogene DJ-1-Expression in Gesamthirnlysaten von DJ-1 Knock-out-Kontrollmäusen**

Gesamthirnlysate aus homozygoten  $DJ-1^{-/-}$ , heterozygoten  $DJ-1^{+/-}$  Knock-out-Mäusen und Kontrollmäusen wurden isoliert, mit Organlysepuffer homogenisiert (vgl. Kapitel 3.6.3.2) und auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt. Auf einem Immunoblot wurde mit dem AK 3407 die Expression von endogenem DJ-1 analysiert (obere Reihe). Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet (untere Reihe).

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Integration der Reporter/Selektorkassette in der DJ-1 Knock-out-Maus, in diesem Fall ein DJ-1/ $\beta$ -Gal-Fusionsprodukt, erfolgreich war. Dazu wurden verschiedene Hirnregionen einer DJ-1 Knock-out-Maus isoliert, homogenisiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das DJ-1/ $\beta$ -Gal-Fusionsprotein konnte anschließend auf einem Immunoblot mit einem  $\beta$ -Galactosidase-AK nachgewiesen werden. Man kann die Verschiebung des Fusionsproteins zu höherer molekularer Masse im

## Ergebnisse

Vergleich zu einem lacZ-Kontrollprotein deutlich erkennen. Da DJ-1/ $\beta$ -Gal-Fusionsprotein vom endogenen DJ-1-Promotor getrieben wird, sieht man die Verteilung von DJ-1 in den verschiedenen Hirnregionen der Maus (vgl. Abbildung 48).



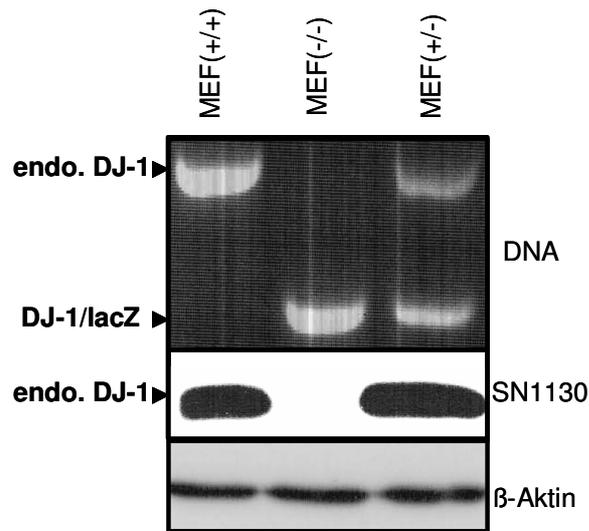
**Abbildung 48: Expression von DJ-1/ $\beta$ -Gal-Fusionsprotein in verschiedenen Hirnregionen der DJ-1 Knock-out-Maus**

Lysate von oben bezeichneten Hirnregionen, die aus einer DJ-1 Knock-out Maus isoliert wurden, wurden auf einem Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit einem  $\beta$ -Galactosidase-AK auf das DJ-1-Fusionsprotein mit der lacZ-Reporter/Selektorkassette untersucht. Als Positivkontrolle diente lacZ (letzte Spur).

### 4.4.4 Herstellung von MEF-Zellen aus DJ-1 Knock-out-Mäusen

Weder siRNA-Methoden noch die ES-Zellen des Klons Q001D04 haben zum gewünschten Erfolg geführt, die endogene DJ-1-Expression völlig auszuschalten. Allerdings war in den Gehirnen der Knock-out-Mäuse aus dem Klon XE725 kein endogenes DJ-1 mehr nachweisbar. Es ist daher davon auszugehen, dass auch in den anderen Geweben DJ-1 nicht mehr exprimiert wird. Eine Zelllinie aus diesen Mäusen wäre also für funktionelle Studien gut geeignet. Zum Anlegen von MEF-Zellkulturen wurden DJ-1 Knock-out-Mäusen 15-17 Tage nach Fertilisation Embryonen entnommen und Fibroblasten präpariert (vgl. Kapitel 3.5.7). Für Genotypisierungen wurde genomische DNA der Zellen und Hirne der einzelnen Embryonen extrahiert. Es wurden PCRs mit Primern durchgeführt, die das DJ-1-Fusionskonstrukt als 230bp-Amplifikat und endogenes DJ-1 als 430bp-Bande sichtbar machen (vgl. Abbildung 49). Es wurde nur in den Proteinlysaten von heterozygoten MEF(-/+) und wt-MEF(+/-) endogene DJ-1-Expression festgestellt, aber nicht in den MEF(-/-) Zellen.

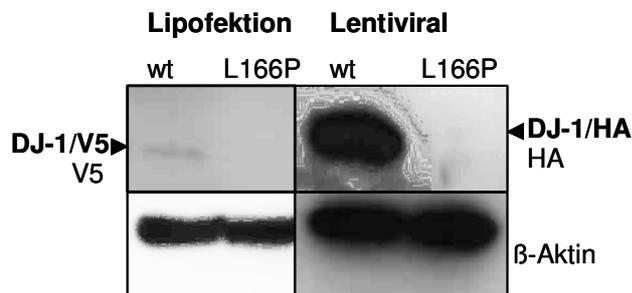
## Ergebnisse



**Abbildung 49: Genotypisierung von MEF(+/-)-, MEF(+/-)- und MEF(-/-)-Zellen auf DNA- und Proteinebene**

Aus MEF-Zellen wurde genomische DNA isoliert (vgl. Kapitel 3.4.13) und auf das *DJ-1*-Fusionsgen in Knock-out-MEF-Zellen bzw. das endogene *DJ-1*-Gen in einer PCR mit entsprechenden Primern (vgl. Kapitel 3.4.14) untersucht (obere Reihe). Von den MEF-Zellen wurden auch Proteinlysate hergestellt, auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit dem DJ-1-spezifischen AK SN1130 auf endogene DJ-1-Expression untersucht (mittlere Reihe). Gleichmässige Proteinladung wurde mit  $\beta$ -Aktin AK bestätigt (untere Reihe).

MEF-Zellkulturen wurden durch Transfektion mit dem largeT-Onkogen immortalisiert. Nach 20 Passagen wurde zum ersten Mal die Transfizierbarkeit getestet. Die Lipofektionseffizienz erwies sich als sehr niedrig, zu diesem Zeitpunkt konnten MEF-Zellklone nur mit lentiviralen Vektoren transduziert werden (vgl. Abbildung 50). Lenti-[wt]DJ-1/HA führte zu einem deutlich sichtbaren Western Blot-Signal, während lenti-[L166P]DJ-1/HA wiederum nicht exprimiert wurde (vgl. Abbildung 50).

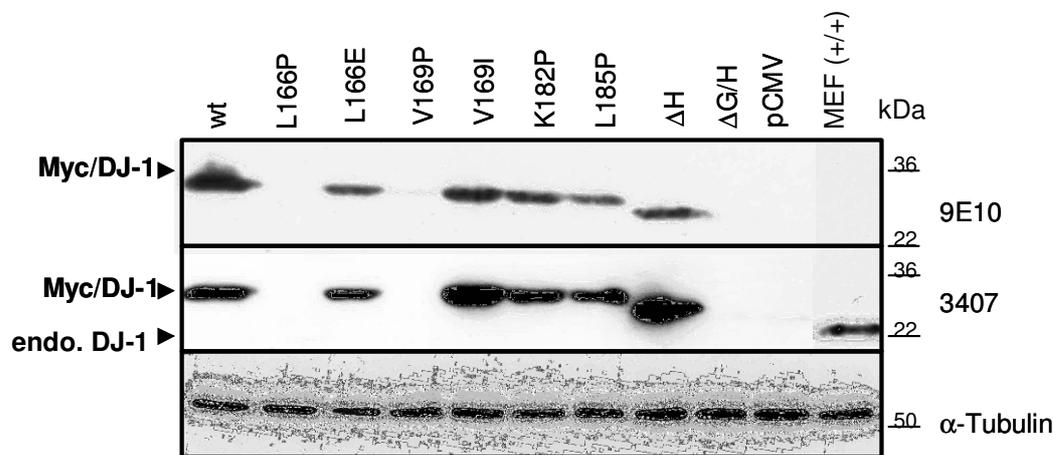


**Abbildung 50: Lipofektion und lentivirale Transduktion in MEF(-/-)-Zellen**

MEF(-/-)-Zellen wurden mit [wt]DJ-1/V5- und [L166P]DJ-1/V5-Konstrukten in Lipofectamin transient transfiziert (linke Spalte). Zum Vergleich wurde mit lenti-[wt]DJ-1/HA und lenti-[L166P]DJ-1/HA transduziert (rechte Spalte). 48h später wurden die Zellen lysiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit jeweiligem AK analysiert.

## Ergebnisse

Erfahrungsgemäß lassen sich immortalisierte MEF-Zellen mit zunehmender Passage immer besser transfizieren. Tatsächlich war nach 40 Passagen eine erneute Lipofektion mit Myc/DJ-1-Konstrukten sehr viel effizienter (vgl. Abbildung 51). Das relative Expressionsmuster ist ähnlich wie in HEK 293T- und PC12-Zellen (vgl. Abbildung 35).



**Abbildung 51: Transiente Transfektion von DJ-1/Myc -Konstrukten in MEF(-/-)-Zellen**

Die oben angegebenen Myc/DJ-1-Mutanten wurden in MEF(-/-)-Zellen transient transfiziert und nach 48h wurden Proteinlysate hergestellt. Diese wurden auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen. Anschließend wurden sie auf Western Blots transferiert und mit dem 9E10 anti-Myc (obere Reihe), dem DJ-1-spezifischen polyklonalen 3407 AK (mittlere Reihe) und als Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin (untere Reihe) detektiert.

Viel wichtiger war darüber hinaus, dass in der Knock-out-Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie kein endogenes DJ-1 detektierbar war, so dass diese Zelllinie für die nachfolgenden funktionellen Studien als Modellsystem verwendet wurde.

## 4.5 Funktionelle Studien von DJ-1

### 4.5.1 Effekte von DJ-1 auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Zytotoxizität

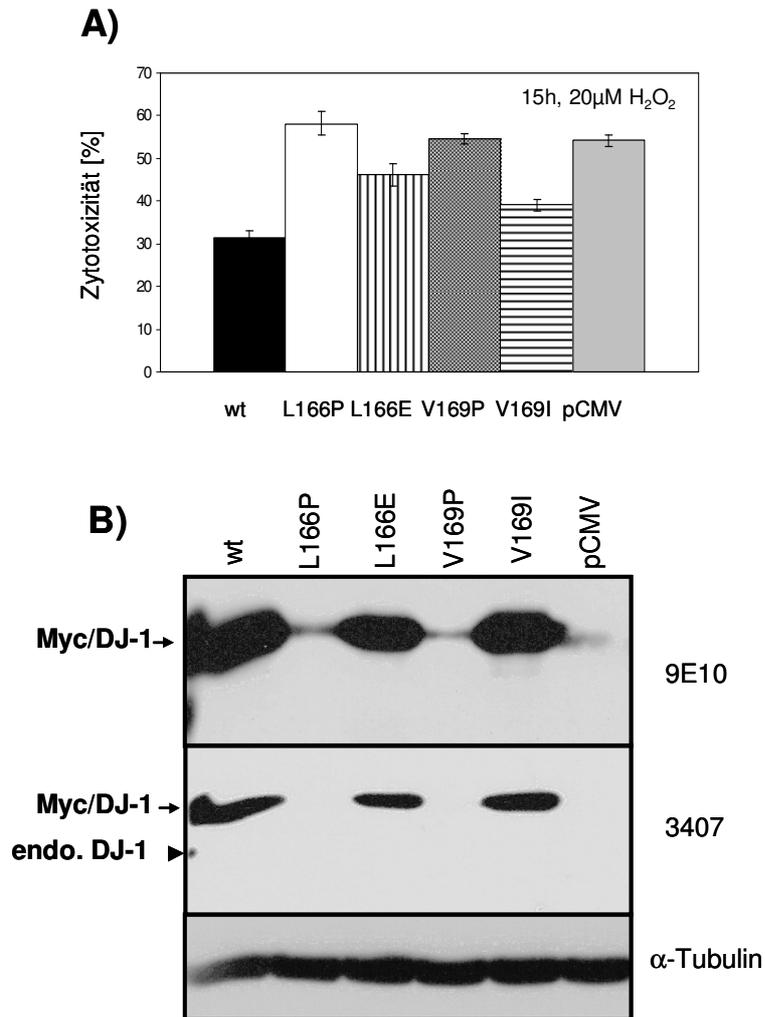
Es wurde mehrfach gezeigt, dass DJ-1 in der oxidativen Stressantwort eine große Bedeutung zukommt (Choi et al., 2006; Kinumi et al., 2004; Martinat et al., 2004; Nishinaga et al., 2005; Shendelman et al., 2004; Taira et al., 2004; Takahashi-Niki et al., 2004; Zhou et al., 2005). Daher wurde als erstes funktionelles Experiment ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängiger Zytotoxizitätsassay etabliert. Dabei wurden MEF(-/-)-Zellen transient mit DJ-1-Konstrukten transfiziert und nach 48h mit 20  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> weitere 15h behandelt. Zellen, die unter diesen Bedingungen absterben, setzen den Inhalt des Zytosols in das Medium frei, darunter auch das Lactatdehydrogenaseenzym (LDH). In dem hier verwendeten Assay wandelt die freigesetzte LDH ein in dem Substratmix enthaltenes Tetrazoliumsalz in einer 30-minütigen enzymatischen Reaktion in ein rotes Formazanprodukt um. Die Intensität der

## Ergebnisse

Rotfärbung ist proportional zu der Anzahl lysierter Zellen (vgl. Abbildung 52). Je intensiver die Färbung desto zytotoxischer ist der Effekt für die Zellen. Bei einer Wellenlänge von 490nm im sichtbaren Bereich wird mit einem Photometer in einem 96well-Lesegerät die Absorption gemessen. Zur Ermittlung der maximalen LDH-Freisetzung (100%-Wert) wurde jeweils ein Duplikat der Zellen mit 9% Triton lysiert und auf die gleiche Art gemessen.

Dieser Versuch wurde sowohl mit N-terminal Myc-markierten DJ-1-Konstrukten als auch C-terminal V5-markierten DJ-1-Konstrukten durchgeführt. Von fünf unabhängigen Experimenten ist eines stellvertretend in Abbildung 52 dargestellt. Dabei wurde sowohl die DJ-1-Expression von Proteinlysaten im Western Blot mit spezifischen AK detektiert, als auch mit denselben Proben der Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Die LDH-Freisetzung der einzelnen Konstrukte wurde in Bezug auf den Maximalwert der LDH-Freisetzung in einer Vierfachbestimmung in Relation gesetzt und die Zytotoxizität in Prozent angegeben.

## Ergebnisse



**Abbildung 52: Zytotoxizität nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung von transient DJ-1 transfizierten MEF(-/-)-Zellen**

A) MEF(-/-)-Zellen wurden mit den angezeigten Myc/DJ-1-Konstrukten transient transfiziert und 15h mit 20µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. LDH-Freisetzung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen und im prozentualen Verhältnis zur maximalen LDH-Freisetzung für jedes Konstrukt dargestellt. B) Lysate der einzelnen Konstrukte wurden auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit dem monoklonalen AK 9E10 anti-Myc (obere Reihe), dem DJ-1-spezifischen 3407 AK (mittlere Reihe), und anti-α-Tubulin (untere Reihe) getestet.

Man kann an der im Vergleich zur Vektorkontrolle um etwa 50% reduzierten Menge an freigesetztem LDH erkennen, dass [wt]DJ-1 die Zelle vor oxidativem Stress schützt (vgl. Abbildung 52). Dagegen haben die G-Helix-brechenden Mutanten diese Fähigkeit verloren. Die G-Helix-Mutanten, die nicht destabilisierend wirken ([L166E]DJ-1 und [V169I]DJ-1) sind protektiver als die G-Helix-brechenden Mutanten [L166P]DJ-1 und [V169P]DJ-1. Das bedeutet, dass die G-Helix-brechenden Mutanten aufgrund ihrer destabilisierenden Wirkung die vollständige Funktion des Proteins im Schutz gegen oxidativen Stress nicht mehr ausführen können. Man kann also in diesem ersten funktionellen Versuch schon eine starke Struktur/Funktionsbeziehung erkennen.

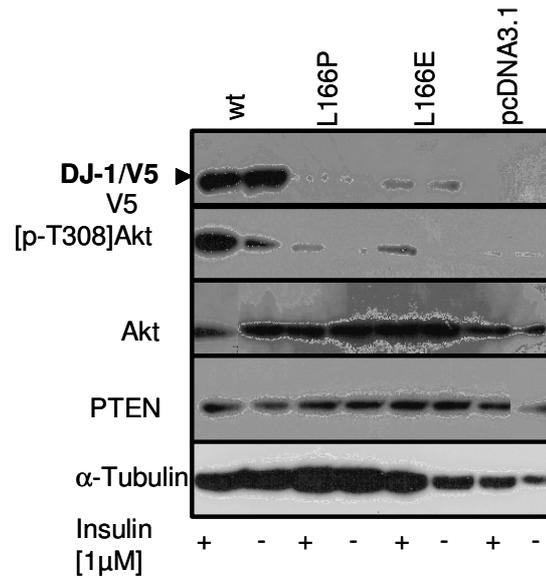
#### **4.5.2 Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden nach oxidativer Stressinduktion**

Im vorigen Experiment wurde eine deutliche protektive Funktion des DJ-1-Proteins vor oxidativem Stress gezeigt. Es schließt sich die Frage an, ob es sich dabei um eine direkte Funktion von DJ-1 handelt oder um eine indirekte. Einerseits könnte DJ-1 ROS durch direkte Oxidation eliminieren und damit als Radikalfänger fungieren, oder es könnte indirekt beteiligt sein und redox-induzierte Signaltransduktionskaskaden induzieren (vgl. Kapitel 1.5.5).

Um diese Frage zu beantworten, wurde der Einfluss von DJ-1 auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte Aktivierung von Akt und Ask-1 gleichzeitig bestimmt. MEF(-/-)-Zellen wurden transient mit DJ-1/V5-Konstrukten transfiziert. Nach 30h wurden die Zellen über Nacht (ca. 15h) in Medium ohne Glucose behandelt, um den zellulären Metabolismus auf Ruhezustand zu bringen. Am nächsten Tag wurden sie 2min lang mit 1µM Insulin behandelt. Anschließend wurden Lysate in Anwesenheit von Phosphataseinhibitor hergestellt (vgl. Kapitel 3.6.4.3). Nach SDS-PAGE wurden Western Blots mit folgenden AK detektiert: polyklonaler Akt AK, polyklonaler [pThr308]Akt AK, polyklonaler PTEN AK, V5 AK und α-Tubulin AK (vgl. Tabelle 3).

Insulinbindung an seine Rezeptor-Tyrosinkinase stimuliert Akt (vgl. Abbildung 16). In Lysaten von Zellen, die mit [wt]DJ-1 transfiziert wurden, findet man eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt vor, welches am Threonin-308 phosphoryliert wurde. Alle anderen Konstrukte weisen entweder keine phosphorylierte Akt-Form auf (L166P, pcDNA3.1) oder eine verminderte Phosphorylierung (L166E) (vgl. Abbildung 53).

## Ergebnisse



**Abbildung 53: Einfluss transients Transfektion mit DJ-1/V5-Konstrukten auf den Akt-Signalweg in Insulin-behandelten MEF(-/-)-Zellen**

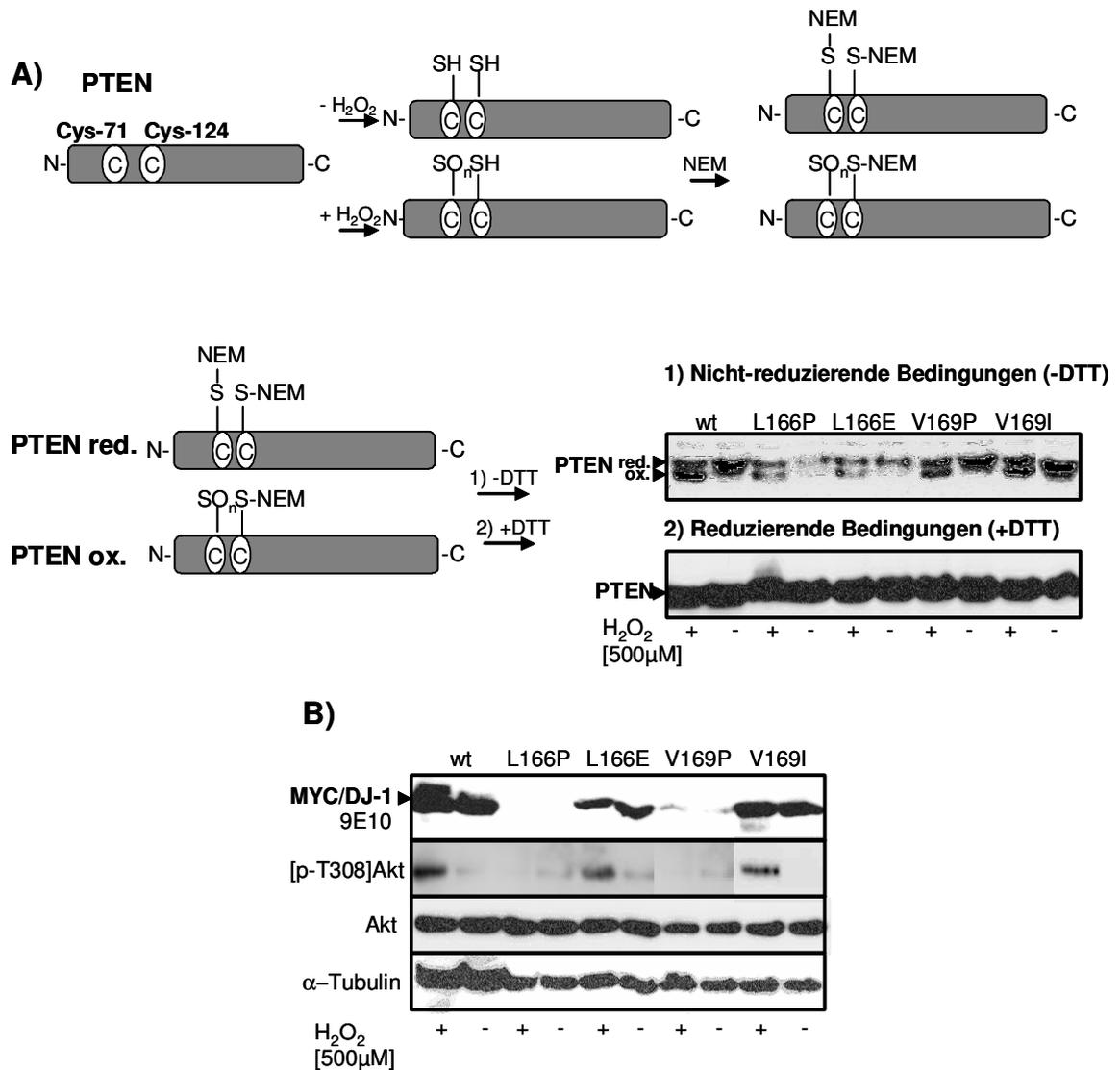
MEF(-/-)-Zellen wurden transient mit [wt]DJ-1/V5, [L166P]DJ-1/V5, [L166E]DJ-1/V5 oder pcDNA3.1 transfiziert. Nach 30h wurden die Zellen 15h lang mit Medium ohne Glucose inkubiert und anschließend 2min lang mit 1μM Insulin stimuliert (+) oder nicht stimuliert (-). Die Zellen wurden lysiert, auf 15% SDS-Gelen aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit den links bezeichneten AK getestet: monoklonaler V5 AK, polyklonaler [pThr308]Akt AK, polyklonaler Akt AK, polyklonaler PTEN AK und α-Tubulin AK.

Da die Insulinstimulation transients geringste Mengen ROS für physiologische Redox-Signaltransduktionen in der Zelle erzeugt (Seo et al., 2005) und in dem Zytotoxizitäts-Assay ein direkter Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf das Überleben von [wt]DJ-1-transfizierten Zellen gemessen wurde, wurde der Akt-Assay mit toxischen Mengen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wiederholt. Dazu wurden MEF(-/-)-Zellen transient mit Myc/DJ-1-Konstrukten transfiziert und nach 48h 30min mit 500μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert, wobei der Lysepuffer zusätzlich zu den Phosphataseinhibitoren auch N-Ethylmaleimid (NEM) enthielt. Die Lysate wurden dann auf einem SDS Gel aufgetrennt, auf einen Western Blot transferiert und mit AK gegen ausgewählte Akt-Signaltransduktionsproteine getestet (vgl. Abbildung 54).

Zunächst wurde der Einfluß von DJ-1 auf den Oxidationszustand von PTEN bestimmt. Die katalytischen Cysteine der Phosphatase PTEN reagieren sehr empfindlich auf zellulären oxidativen Stress, was einen wesentlichen Einfluss auf den redox-sensitiven Akt-Signalweg hat. In einem biochemischen Derivatisierungsassay wurden Zelllysate mit NEM versetzt, welches irreversibel an freie Cysteine bindet. Da PTEN zwei aktive Cysteine besitzt, Cystein-71 und Cystein-124, (vgl. Abbildung 54A), können diese leicht kovalent

## Ergebnisse

an NEM binden. Nur reduziertes, aktives PTEN kann zu NEM-Addukten reagieren, die in SDS-PAGE langsamer laufen als die oxidierten Formen von PTEN (vgl. Abbildung 54A).



**Abbildung 54: Einfluss transientscher Transfektion mit Myc/DJ-1-Konstrukten auf den Akt-Signalweg in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten MEF(-/-)-Zellen**

A) Schematische Darstellung der Oxidation von PTEN an den zwei aktiven Cysteinen-71 und -124 unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) und NEM-Zusatz. MEF(-/-)-Zellen wurden transient mit den angegebenen Myc/DJ-1-Konstrukten transient transfiziert und mit 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30min lang behandelt. Die Zellen wurden lysiert, auf einem 10% SDS-Gel und einem 15% SDS-Gel aufgetrennt. Das 10% SDS-Gel wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) geladen, so dass man eine reduzierte obere PTEN-Bande und eine oxidierte untere PTEN-Bande mit dem polyklonalen PTEN-AK unterscheiden kann. Das 15% Gel wurde unter reduzierenden Bedingungen geladen (+DTT) und mit dem polyklonalen PTEN-AK detektiert B) Vier weitere Gele wurden unter reduzierenden Bedingungen geladen (+DTT). Immunoblots wurden mit den links bezeichneten AK analysiert: monoklonaler anti-Myc 9E10 AK, polyklonaler [pThr308]Akt AK, polyklonaler Akt AK, und α-Tubulin AK.

Nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Intoxikation liegt etwa die Hälfte von PTEN in einer irreversiblen oxidierten Form vor, die nicht mehr mit NEM reagiert. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen, d. h. die Proben werden mit Lämmli-puffer ohne DTT versetzt, kann man auf einem SDS-Gel

## Ergebnisse

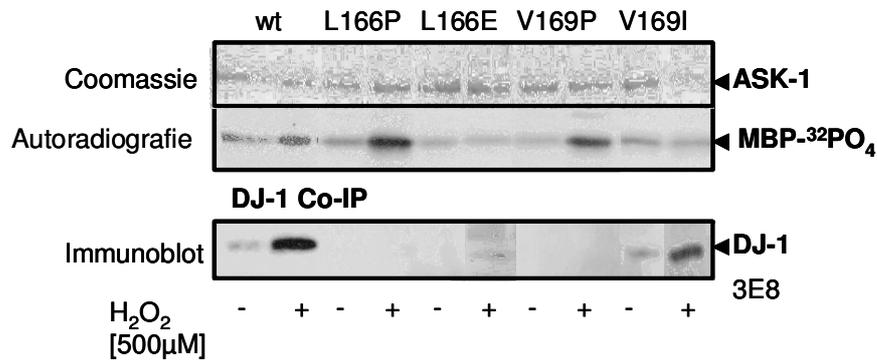
zwischen der oxidierten Form des PTEN (Cystein-SO<sub>n</sub>) und der reduzierten Form (Cystein-NEM) gut unterscheiden und somit Aussagen über den Redoxstatus von PTEN treffen (vgl. Abbildung 54A1). Da kein Unterschied im Auftreten von oxidierten und reduzierten PTEN-Banden bei den in Abbildung 54A1 obere Reihe angegebenen DJ-1-Konstrukten zu erkennen ist, hat DJ-1 keinen Einfluss auf den Redoxstatus von PTEN. Das heißt, dass DJ-1 die Oxidation von PTEN nicht revertieren kann. Die PTEN-Gesamtmenge ist wie in Abbildung 54A2 untere Reihe gezeigt ist in allen DJ-1-transfizierten Proben gleich.

In der reduzierten Form ist PTEN aktiv und kann die Phosphorylierung von Akt verhindern. Aus diesem Grunde tritt bei allen Konstrukten unter nicht gestressten Bedingungen keine Phosphorylierung von Akt auf, was auf dem Western Blot zu erkennen ist, der mit dem phosphospezifischen Akt-AK [p-T308]Akt analysiert wurde (vgl. Abbildung 54B, 2. Reihe). Auffällig ist, dass neben dem wt nur die nicht destabilisierenden Konstrukte [wt]DJ-1, [L166E]DJ-1 und [V169I]DJ-1 eine erhöhte Phosphorylierung in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen zeigen. Die Helix-brechenden Mutanten [L166P]DJ-1 und [V169P]DJ-1 zeigen keine Phosphorylierung von Akt. Also wird unter diesen Bedingungen wohl die „pro-survival“-Kaskade nicht aktiviert. Die Akt-Menge ist in allen Proben gleich, so dass der Unterschied in der Phosphorylierung von Akt nicht aufgrund von schwankenden Akt-Mengen zu begründen ist (vgl. Abbildung 54B, 3. Reihe).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass DJ-1 Teil einer Signaltransduktionskaskade sein könnte, stammte von Junn und Kollegen, die einen Einfluß von DJ-1 auf die pro-apoptotische Kinase Ask-1 zeigen konnten (Junn et al., 2005). Dieser Einfluß sollte mit der Knock-out MEF-Zelllinie und einer transienten Transfektion der C-terminalen DJ-1-Konstrukte überprüft werden. Dazu wurden Aliquots derselben oben beschriebenen Lysate in einer IP mit dem polyklonalen Ask-1 AK und Protein A Sepharose als immobiliser Phase versetzt (vgl. Kapitel 3.6.1.12). Nach dem Waschen der IP wurden *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen mit radioaktivem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP als Phosphatquelle und MBP als experimentelles Ask-1-Substrat angesetzt. Nach 20min Reaktionszeit bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von Lämmli-Puffer gestoppt, der Ansatz aufgetragen, das Gel getrocknet und der Einbau von radioaktivem Phosphat mittels Autoradiografie visualisiert (vgl. Kapitel 3.6.4.4) (vgl. Abbildung 55). Man kann deutlich erkennen, dass Ask-1 in den Zellen, die mit G-Helix-brechenden Mutanten transfiziert wurden, deutlich aktiver ist und MBP stark phosphorylieren kann. Dies bedeutet, dass sowohl [L166P]DJ-1 als auch

## Ergebnisse

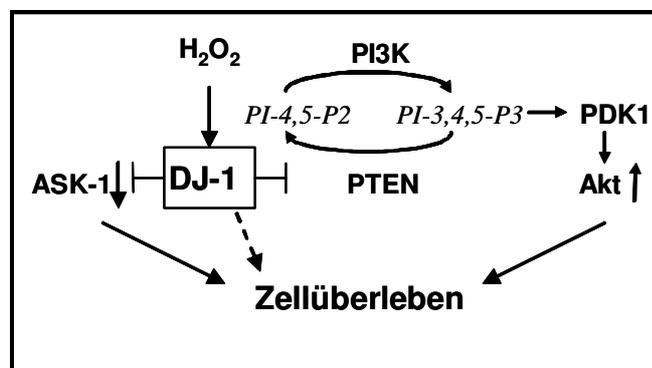
[V169P]DJ-1 Ask-1 nicht unterdrücken können und die Zelle der apoptotischen Signaltransduktionskaskade ausliefern.



**Abbildung 55: Immunokomplex-Kinaseassay für Ask-1 in transfizierten, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten MEF(-/-)-Zellen**

Aus denselben Lysaten von Abbildung 54 wurde Ask-1 immunpräzipitiert, gewaschen, mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP sowie dem Substrat MBP inkubiert. Es wurden zwei SDS Gele davon gemacht. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und getrocknet (obere Reihe). Anschließend wurden auf einem Röntgenfilm Banden visualisiert (mittlere Reihe), während das andere Gel auf PVDF-Membranen transferiert und mit dem DJ-1-spezifischen 3E8 AK analysiert wurde (untere Reihe).

Zusätzlich wurde die IP noch auf einem Immunoblot mit DJ-1-spezifischem AK detektiert, um zu testen, ob eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen DJ-1 und Ask-1 vorliegt. Da nur [wt]DJ-1 und [V169I]DJ-1 mit Ask-1 copräzipitiert, scheint auch nur dort eine direkte Bindung vorzuliegen und die Ask-1-Aktivität in diesen Zellen reduziert zu sein (vgl. Abbildung 55). Diese direkte Interaktion ist nur unter oxidativen Bedingungen zu beobachten. DJ-1 bindet nur im oxidierten Zustand an Ask-1 und hemmt dessen Aktivität. DJ-1 scheint also gleichzeitig einen Einfluß auf den „pro-survival“-Akt-Signalweg als auch die apoptotische Ask-1-Signaltransduktionskaskade zu haben, was in der folgenden schematischen Abbildung zusammengefasst dargestellt wird (vgl. Abbildung 56).



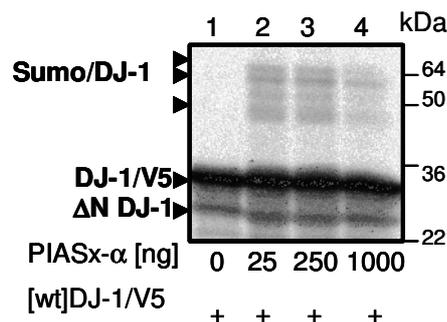
**Abbildung 56: Schematische Darstellung der möglichen Funktion von DJ-1 nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung**

DJ-1 könnte nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung oxidiert werden und entweder direkt für eine Protektion der Zelle sorgen, indem es H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eliminiert oder es könnte Signaltransduktionskaskaden induzieren. Dabei inhibiert es Ask-1-Aktivität oder aktiviert Akt und trägt dabei indirekt zum Überleben der Zelle bei.

### 4.5.3 Sumoylierung von DJ-1

Akt phosphoryliert unter anderem Transkriptionsfaktoren, die an der Produktion von Apoptosegenen beteiligt sind (Song et al., 2005). Darüber hinaus wurde direkte transkriptionelle Modulatoraktivität für DJ-1 beschrieben. Möglicherweise spielen dabei Sumoylierungen eine Rolle. In der Literatur ist beschrieben, dass DJ-1 mit SUMO-Ligasen interagiert und sumoyliert werden kann (Shinbo et al., 2005; Takahashi et al., 2001b). Dies beeinflusst die Regulation der Transkription von AR und p53, einem Tumorsuppressorgen. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Mutation an der AS 130 von einem Lysin zu einem Arginin die Sumoylierung von DJ-1 unterdrückt (Shinbo et al., 2006).

Um genauer beurteilen zu können, welche Funktion DJ-1 in seiner sumoylierten Form einnimmt, wurden Sumoylierungsstudien von DJ-1 *in vitro* und *in vivo* vorgenommen. Die Sumoylierung *in vitro* wurde mit [<sup>35</sup>S]-markiertem, *in vitro* translatiertem [wt]DJ-1/V5 vorgenommen. Durch Zugabe der für die Sumoylierung wichtigen Enzyme E1 für die Aktivierung, E2, Ubc9, für die Konjugation der SUMO-Moleküle und der E3-Ligase PIASx-α/Myc sowie SUMO wurde die Sumoylierung von [wt]DJ-1 bei 30°C 2h lang durchgeführt. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Lämmli-Puffer wurden die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Banden autoradiografisch visualisiert (vgl. Kapitel 3.6.4.5). Es ist gut zu erkennen, dass eine SUMO-Modifikation von [wt]DJ-1/V5 ohne PIASxα nicht vorhanden ist (vgl. Abbildung 57, Spur 1), während die Spuren 2-4 mit Zugabe der E3-Ligase PIASx-α deutlich sumoylierte DJ-1-Banden zeigen (vgl. Abbildung 57, Spur 2-4).



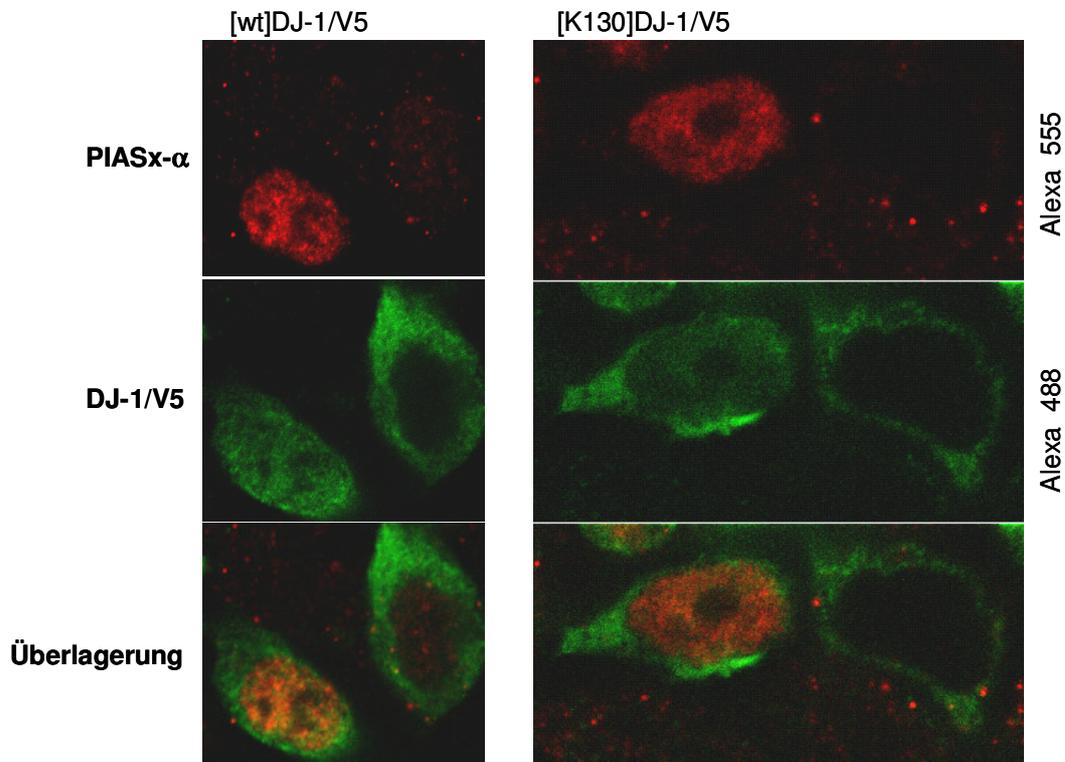
**Abbildung 57: Nachweis von SUMO-Modifikationen von DJ-1 *in vitro***

[Wt]DJ-1/V5 wurde in HeLa-Zellen transfiziert, RNA isoliert und mit TNT Reticolouzyten-Lysat (Promega) *in vitro* translatiert. *In vitro* translatiertes [<sup>35</sup>S]-markiertes Lysat wurde mit folgenden Enzymen: E1, Ubc9 und PIASx-α (Spur 2-4) in folgenden Mengen: 0ng (Spur 1), 25ng (Spur 2), 250ng (Spur 3), 1000ng (Spur 4) sowie SUMO und ATP versetzt. Nach 2h Inkubation bei 30°C wurden die Lysate auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und autoradiografisch ausgewertet.



## Ergebnisse

ist (rote Färbung), während DJ-1 diffus im Zytoplasma verteilt ist (grüne Färbung). Auch hier kann man keinen Unterschied zwischen [wt]DJ-1 und [K130]DJ-1 transfizierten Zellen erkennen.



**Abbildung 59: IF von DJ-1/V5-Konstrukten cotransfiziert mit PIASx- $\alpha$  in HEK 293T-Zellen**

HEK 293T-Zellen wurden mit [wt]DJ-1/V5 (linke Spalte) bzw. [K130R]DJ-1/V5 (rechte Spalte) und PIASx- $\alpha$ /Myc cotransfiziert und 30h nach der Transfektion für die IF präpariert (vgl. Kapitel 3.6.3.1). Die Zellen wurden mit anti-V5 bzw. anti-Myc 9E10 AK inkubiert und anschließend mit Fluorophor-gebundenem Zweitantikörper visualisiert (Alexa 555, rot (PIASx- $\alpha$ ) bzw. Alexa 488 grün (DJ-1/V5)).

Man kann festhalten, dass DJ-1 mit Hilfe von PIASx- $\alpha$  in den Zellkern transportiert wird. Allerdings bleibt unklar, ob dies sumoylierungsabhängig geschieht, weil auch die Mutante [K130R]DJ-1, die an der vorhergesagten Sumoylierungsstelle mutiert wurde, in den Kern transferiert wird, oder blosse Protein-Protein-Interaktion DJ-1 Kerntranslokation in cotransfizierten Zellen bewirkt. Es ist zudem fraglich, ob die Sumoylierungsstelle 130 die einzige modifizierbare Stelle ist, und ob es in der Mutante tatsächlich zu einer schwächeren Sumoylierung von DJ-1 kommt.

### **4.6 Biophysikalische Untersuchungen von DJ-1**

Die Besonderheit der C-terminalen Domäne, bestehend aus einer G- und einer H-Helix, die das mögliche aktive Zentrum von DJ-1 blockieren und die pathogene Mutation L166P enthalten (vgl. Kapitel 1.5.3) wurde versucht biophysikalisch zu untersuchen. Das in

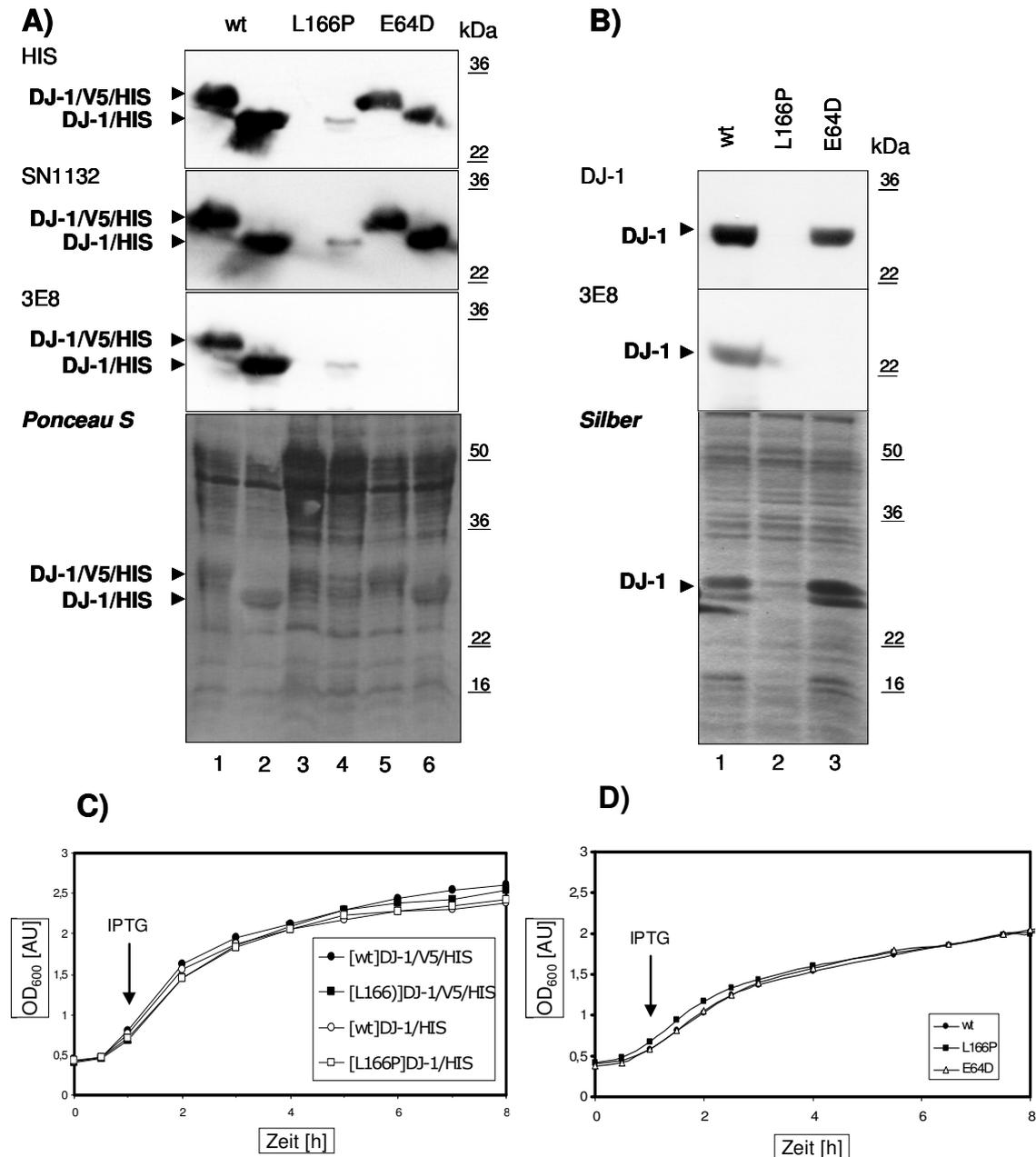
Kapitel 4.3 erwähnte Motiv Helix-Knick-Helix sollte genauer in seiner Struktur analysiert werden.

Dabei stellte sich die Frage, ob dieser C-Terminus für eventuelle Substratbindungen oder Interaktionen mit anderen Proteinen flexibel ist und wie ein Scharnier bewegt werden kann. Es wurden zunächst CD-Studien unter verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um eine eventuelle Veränderung der Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Knäuel-Verteilung zu messen.

### **4.6.1 Bakterielle Expression von DJ-1-Protein**

Für strukturelle Untersuchungen wurde ein rekombinantes DJ-1-Protein mit einem His-tag im pQE60, einem prokaryotischen Expressionsvektor, hergestellt und in BL21/RIL-Bakterien transformiert, die speziell für größere rekombinante Proteinexpressionen geeignet sind (vgl. Kapitel 3.6.5.1). Dabei wurde das [wt]DJ-1/His bzw. His/V5-Konstrukt und die pathogenen Mutanten [E64D]DJ-1/His bzw. His/V5 und [L166P]DJ-1/His bzw. His/V5 sowie die DJ-1-Konstrukte ohne Affinitätsmarker exprimiert. Die Bakterien wurden lysiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt (vgl. Abbildung 60A, B). Man kann deutlich erkennen, dass auch bakterielles rekombinantes L166P sehr instabil ist und in nur sehr geringen Mengen exprimiert wird. Um zu testen, ob das mutierte Protein für die Zellen toxisch ist, wurden Wachstumskurven von [wt]DJ-1, [L166P]DJ-1 und [E64D]DJ-1 aufgenommen. Dabei wurde die optische Dichte, die die Anzahl von Bakterien pro Volumen angibt, in den angegebenen Zeitintervallen gemessen und diese in Abhängigkeit der Zeit in einem Diagramm dargestellt (vgl. Abbildung 60C, D). Die Bakterien, die das mutierte [L166P] exprimierten, zeigten ein normales Wachstumsverhalten.

## Ergebnisse



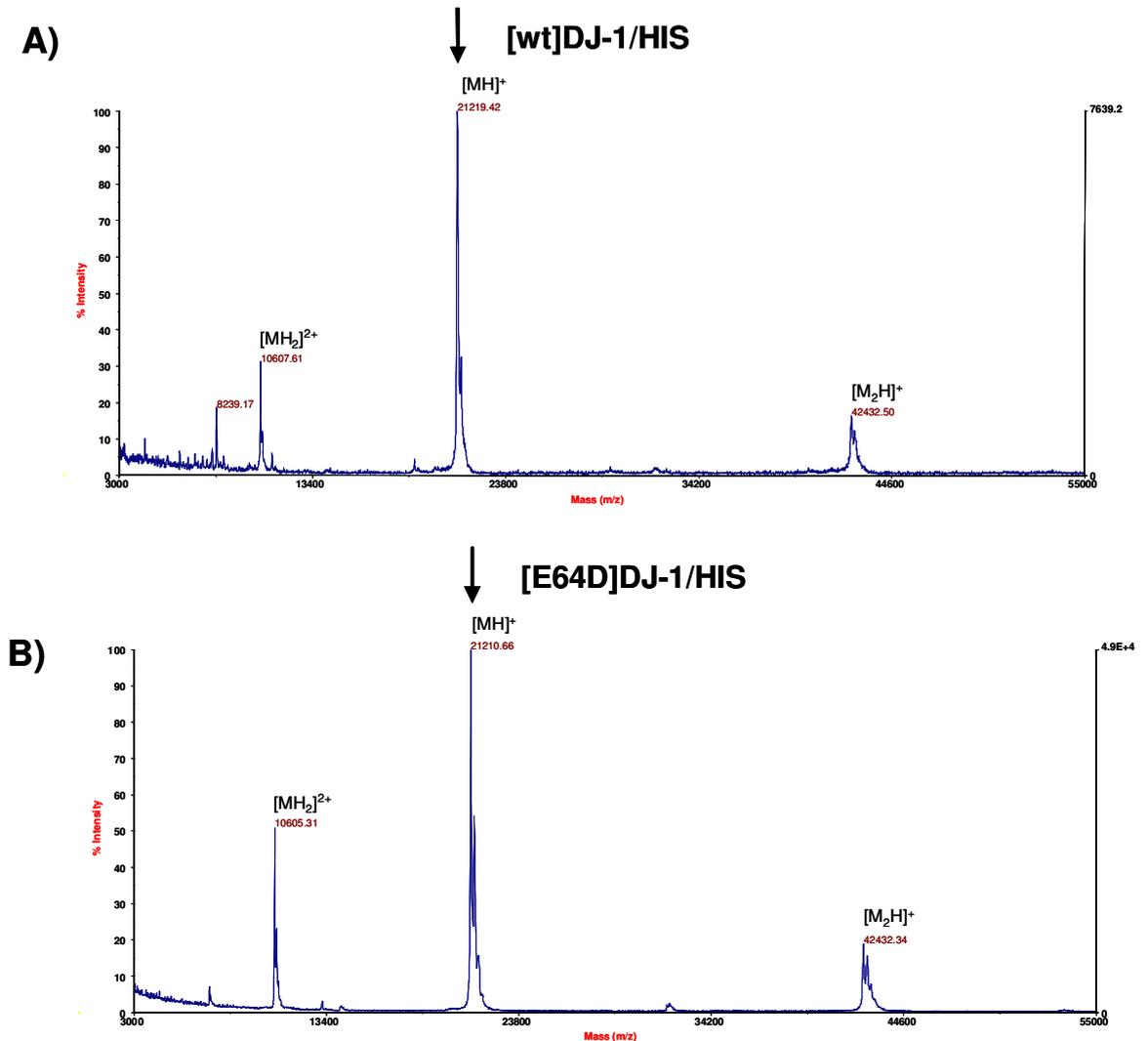
**Abbildung 60: Expression und Reinigung von DJ-1 und seinen Mutanten in *E. coli***

[Wt]DJ-1/His, [L166P]DJ-1/His, [E64D]DJ-1/His und dieselben Konstrukte mit einem: A) V5/His-tag bzw. B) ohne tag wurden rekombinant exprimiert. Die *E. coli*-Lysate wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Western Blots wurden mit den links bezeichneten AK gegen den HIS-tag, polyklonalem SN1132 AK und monoklonalem 3E8 AK gegen DJ-1 detektiert (obere Reihe). Gesamtprotein wurde auf dem Blot mit A) Ponceau S bzw. B) auf dem Gel mit Silber gefärbt (untere Reihe). C, D) Das Bakterienwachstum der DJ-1 Konstrukte in Abhängigkeit von der Zeit wurde anhand der OD<sub>600</sub> gemessen. Nach 1h wurde die rekombinante Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Pfeil) induziert.

[Wt]DJ-1/His und [E64D]DJ-1/His wurden nun in einem 1l-Ansatz hergestellt. Nach der beschriebenen Reinigung über eine NTA-Superflow-Säule und anschließender Gel-Chromatografie über die HiLoad Superdex 75-Säule (vgl. Kapitel 3.6.5.1) wurden 2-3mg DJ-1-Protein gewonnen. Die Qualität des DJ-1-Proteins wurde mittels MS überprüft. Die

## Ergebnisse

Massenspektren zeigten zu 90% reines DJ-1 Protein bei der erwarteten molekularen Masse von 21.2kDa (vgl. Abbildung 61). Es wurden zusätzlich zu monomerem DJ-1 auch noch die jeweiligen Dimere bei 42kDa gemessen. Die Fähigkeit zur Bildung von Dimeren wurde in Co-IP-Studien schon gezeigt (vgl. Kapitel 4.3.5). [L166P]DJ-1His konnte leider nicht in diesem Großmaßstab hergestellt werden, da es nicht stabil genug exprimiert wurde.



**Abbildung 61: Massenspektren von rekombinantem gereinigtem [wt]DJ-1/His und [E64D]DJ-1/His**

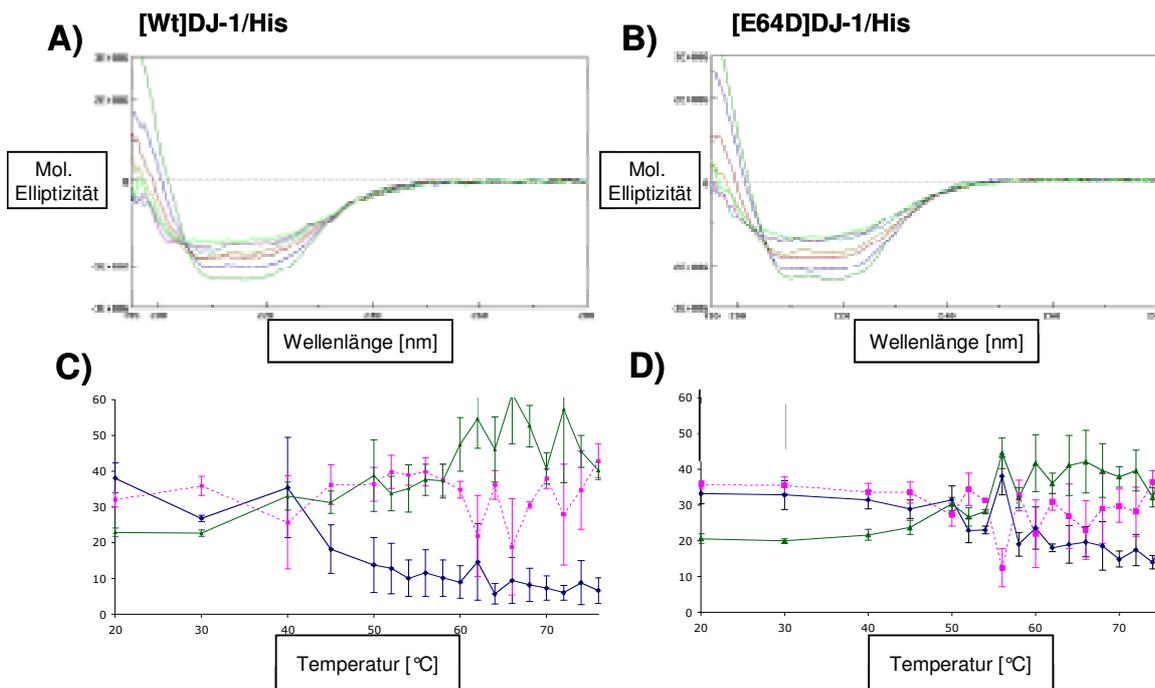
A) [wt]DJ-1/His und B) [E64D]DJ-1/His wurden exprimiert und gereinigt und im MS auf ihre molekulare Masse und Reinheit überprüft. Die Hauptpeaks sind monoionisiertes [MH\*], di-ionisiertes [MH<sub>2</sub><sup>+</sup>] und dimeres [M<sub>2</sub>H<sup>+</sup>] DJ-1-Protein.

### 4.6.2 Messung der Sekundärstrukturelemente von DJ-1 mittels CD-Spektroskopie

2μM [wt]DJ-1/His und 5μM [E64D]DJ-1/His der unter Kapitel 4.6.1 hergestellten rekombinanten DJ-1-Konstrukte wurden im CD-Spektrometer bei 20°C auf

## Ergebnisse

Sekundärstrukturelemente untersucht. Dabei wurde die folgende Verteilung gemessen:  $33 \pm 3\%$   $\alpha$ -Helix,  $36 \pm 1\%$   $\beta$ -Blatt,  $21 \pm 1\%$  Knäuel ( $n = 4$ ). Diese Daten korrelieren sehr gut mit den Kristallstrukturdaten beider DJ-1-Konstrukte (Honbou et al., 2003; Lee et al., 2003b; Tao et al., 2003; Wilson et al., 2003a). Bei einer Temperaturerhöhung von 20°C-40°C veränderte sich die Struktur der beiden DJ-1-Konstrukte nicht merklich. Allerdings veränderte sich die Sekundärstruktur von [wt]DJ-1/His zwischen 40-50°C, indem  $\alpha$ -helikale Anteile zugunsten von Knäuel-Strukturelementen abnahmen. Bei [E64D]DJ-1/His zeigte sich diese Änderung erst bei einer Temperatur zwischen 50°-60°C. Bei 60°C fingen beide Proteine an zu präzipitieren, und bei 80°C wurde eine irreversible Denaturierung der beiden rekombinanten DJ-1-Proteine gemessen (vgl. Abbildung 62). Bis zu 40°C scheinen beide DJ-1-Proteine eine ähnliche Verteilung von Sekundärstrukturelementen zu besitzen. Die Mutante [E64D]DJ-1 scheint allerdings starrer als [wt]DJ-1 zu sein und nicht die Intermediärstruktur bei 50°-60°C auszubilden zu können.



**Abbildung 62: Analyse von Sekundärstrukturelementen von rekombinantem [E64D]DJ-1 und [wt]DJ-1 unter steigenden Temperaturen**

A, C) [wt]DJ-1/His und B, D) [E64D]DJ-1/His wurden in Bakterien exprimiert, gereinigt und im CD-Spektrometer gemessen. Die bei aufsteigenden Temperaturen gemessenen Spektren wurden in einem Diagramm dargestellt, wobei die molare Elliptizität gegen die gemessene Wellenlänge aufgetragen wurde. Die farbigen Kurven gehören zu folgenden Temperaturen: dunkelgrün 20°C, dunkelblau 45°C, rot 56°C, gelb 60°C, hellblau 66°C, rosa 70°C und hellgrün 76°C (A, B). In C und D sind die errechneten Strukturanteile in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen (blau:  $\alpha$ -Helix, rosa:  $\beta$ -Faltblatt, grün: Knäuel). Dabei repräsentiert jeder Datenpunkt den Durchschnittswert von drei unabhängigen Experimenten mit C) [wt]DJ-1/His und vier Experimenten mit D) [E64D]DJ-1/His. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

## Ergebnisse

Aus den oben gezeigten Experimenten kann man folgendes schlussfolgern: Die Struktur von E64D scheint insgesamt etwas starrer zu sein als [wt]DJ-1, da eine höhere thermische Energie zur Entfaltung benötigt wurde. Möglicherweise sind hier Teile des Proteins nicht flexibel genug, um bestimmte funktionelle Aufgaben zu erfüllen. Da E64D in seiner pathologischen Wirkung eher unauffällig war, könnten solche Sekundärstruktur-Analysen mögliche Hinweise auf die Fehlfunktion dieser Mutante geben.

## 5. Diskussion

### **5.1 Charakterisierung des DJ-1-Proteins und seiner Mutanten**

Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde DJ-1 erstmals mit der PK in Zusammenhang gebracht (Bonifati et al., 2003b), so dass die ersten Untersuchungen, die in dieser Arbeit beschrieben sind, maßgeblich zum Verständnis der Rolle von DJ-1 in der PK beitragen.

PARK7-Mutationen im *DJ-1*-Gen verursachen autosomal-rezessiv vererbte PK, wobei die Deletion von Exon 1-5 und die Punktmutation L166P zu den pathologisch gesehen schwerwiegendsten Mutationen gehören, die mit der PK assoziiert sind. Dagegen war die zu dieser Zeit neue türkische Mutation E64D (Hering et al., 2004), die bisher nur in einem Patienten zum Ausbruch der PK führte, viel subtiler in ihrer Wirkung. In PET-Studien konnte eine Reduzierung von dopaminergen Neuronen im Striatum festgestellt werden. Dies war auch bei der Schwester des Patienten der Fall, wobei diese keine typischen PK-Symptome zeigte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden (Görner et al., 2004), dass die [L166P]DJ-1-Proteinexpression in Zellen sowohl eukaryotischen als auch prokaryotischen Ursprungs dramatisch reduziert war. Zur weiteren Untersuchung der Ursache für diese beeinträchtigte Proteinexpression wurden „Pulse-Chase“-Experimente durchgeführt, die eine stark verkürzte Halbwertszeit von [L166P]DJ-1 im Vergleich zu [wt]DJ-1 zeigten. Inhibitorexperimente, die die Proteinsynthese oder den Proteinabbau verhindern sollten, konnten allerdings keine plausible Erklärung für die erhöhte Instabilität der Mutante liefern.

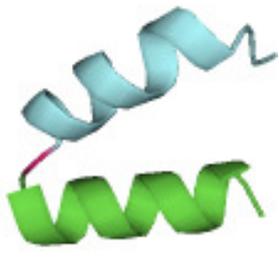
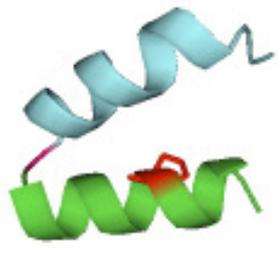
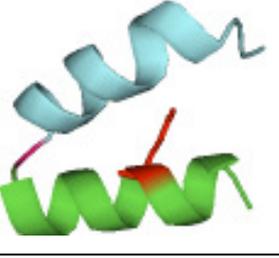
E64D hingegen schien sowohl in eukaryotischen Zellen stabil exprimiert zu werden als auch rekombinant in seiner stabilen Dimerformation aufzutreten. Erst unter thermisch denaturierenden Bedingungen konnten mittels CD-Spektroskopie kleine Unterschiede in der  $\alpha$ -helikalen und Knäuel-Umfaltung im Vergleich zu [wt]DJ-1 festgestellt werden. Das wird so interpretiert, dass E64D eine starrere Struktur besitzt als [wt]DJ-1. E64D scheint keine offensichtlichen destabilisierenden Effekte aufzuweisen wie die Mutation L166P, sondern eher subtile Einflüsse zu besitzen, welche z. B. Auswirkungen auf eine veränderte Protein-Interaktion haben könnten.

Anschließend an diese Untersuchungen stellte sich die Frage, worin die Besonderheit des absolut konservierten Leucin-166 besteht. Ist bei der Parkinson-Mutation die Entfernung der aliphatischen Leucinseitenkette inmitten des C-terminalen Helix-Knick-Helix-Motivs

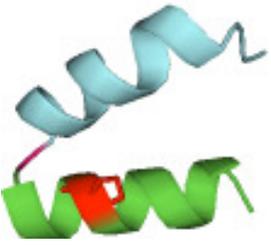
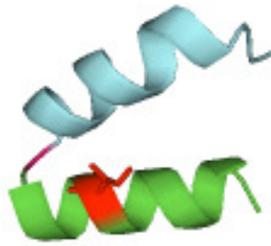
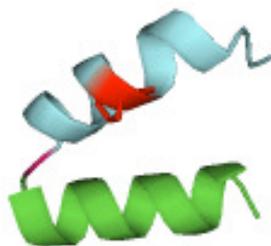
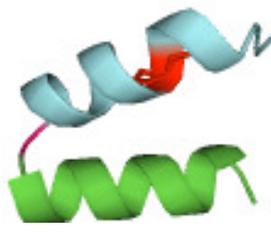
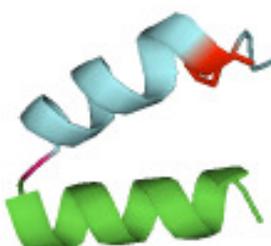
## Diskussion

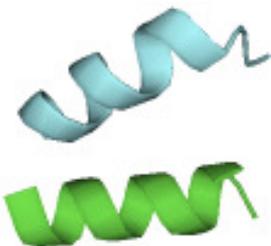
entscheidend oder bewirkt die Einführung eines Helix-brechenden Prolins eine Störung der Struktur?

Die C-terminale Domäne, die aus zwei durch einen scharfen Knick getrennte  $\alpha$ -Helices besteht, die die Position L166 beinhalten und Teil der Dimerkontaktfläche ist, wurde systematisch mutiert. Die Mutanten und ihre Eigenschaften in der direkten Proteinexpression bzw. nach Behandlung der Zellen mit entsprechenden Inhibitoren sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet (vgl. Tabelle 11). Weiter wurden diese Mutanten auf ihre Funktionalität hin untersucht. Da DJ-1 protektive Funktionen nach oxidativer Stressbehandlung zeigte (Canet-Aviles et al., 2004; Junn et al., 2005; Kim et al., 2005b; Martinat et al., 2004; Taira et al., 2004; Zhou et al., 2005), wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toxizität als funktioneller Assay gewählt.

Mutation	Protein-expression	Proteasom-inhibitor	„Pulse-Chase“ (Proteinmenge nach 10h „Chase“-Zeit in Prozent)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Zytotoxizität in Prozent
Wt 	+++	kein Einfluss	sehr stabil (61%)	protektiv (32%)
L166P 	-	keine vollständige Stabilisierung nach 24h	instabil (14%)	nicht protektiv (58%)
L166E 	+	vollständige Stabilisierung	stabil (53%)	leicht protektiv (46%)

## Diskussion

<p><b>V169P</b></p> 	-	keine vollständige Stabilisierung nach 24h	instabil (12%)	nicht protektiv (55%)
<p><b>V169I</b></p> 	++	vollständige Stabilisierung	stabil (53%)	protektiv (39%)
<p><b>V181P</b></p> 	+	vollständige Stabilisierung	stabil (50%)	k. A.
<p><b>K182P</b></p> 	++	vollständige Stabilisierung	stabil (53%)	leicht protektiv (48%)
<p><b>L185P</b></p> 	+	vollständige Stabilisierung	stabil (42,5%)	leicht protektiv (50%)

$\Delta N173/G174$ 	-	k. A.	k. A.	k. A.
$\Delta H$ 	+	vollständige Stabilisierung	k. A.	k. A.
$\Delta GH$	-	keine vollständige Stabilisierung nach 24h	k. A.	k. A.

**Tabelle 11: Stabilitätsstudien und funktionelle Eigenschaften C-terminaler DJ-1-Mutanten**

Mutationen im Helix-Knick-Helix Motiv sind schematisch dargestellt (Punktmutationen sind rot markiert). Zusammenfassend sind Stabilität in „Pulse-Chase“-Experimenten und im direkten Western Blot sowie Einfluss proteasomaler Inhibition und zytoprotektive Aktivitäten gegen  $H_2O_2$  aufgeführt (k. A.: keine Angaben).

## **5.2 Strukturelle Besonderheiten des DJ-1-Proteins und seiner C-terminalen Mutanten**

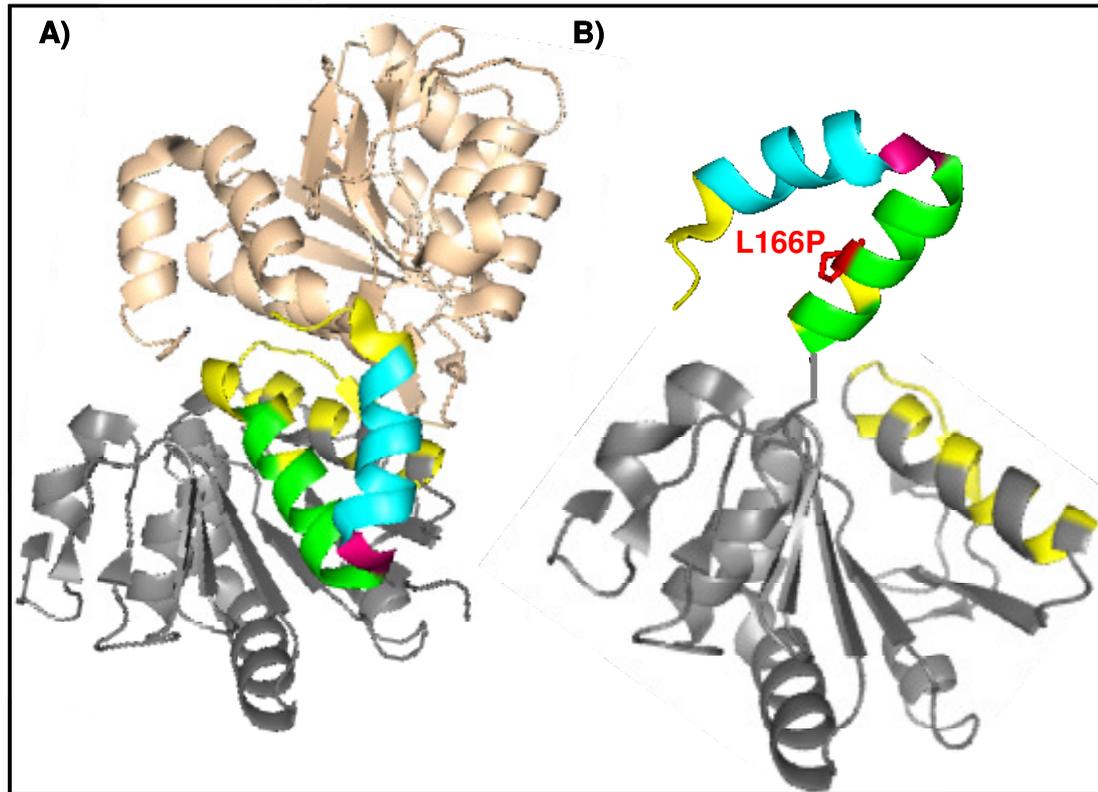
DJ-1 ist Mitglied der DJ-1/ThiJ-Superfamilie, die aus einer Reihe bakterieller Hitzeschockproteine und Proteasen besteht und strukturell sehr homolog ist (Cookson, 2003a; Wilson et al., 2005). Die flavodoxinartige Grundstruktur einer  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt/ $\alpha$ -Helix-Sandwichstruktur haben die Homologen mit dem DJ-1-Protein gemeinsam. Zusätzlich ist ein mögliches Protease-katalytisches Zentrum teilweise im DJ-1-Protein konserviert. Obwohl keine Glutamatseitenkette in erreichbarer Nähe zu dem Histidin-126 und Cystein-106 des DJ-1-Proteins zu finden ist, um die katalytische Triade zu komplettieren, könnte dieses Zentrum in einer möglichen katalytischen Diade ausreichend aktiv sein (Cookson, 2003a; Wilson et al., 2003a). Allerdings ist dieses Zentrum durch den C-Terminus, das Helix-Knick-Helix Motiv, abgeschirmt, so dass ein möglicher Zugang erschwert würde. Dieses C-terminale Motiv unterscheidet das DJ-1-

Protein von seinen Strukturhomologen und ist außerdem sehr konserviert in den verschiedensten Spezies zu finden (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 12).

Aufgrund dieser Besonderheit beschäftigte sich diese Arbeit genauer mit diesem Strukturelement, welches zum einen die stark destabilisierende L166P-Mutation trägt und zum anderen einen großen Teil der Dimerfläche ausmacht (vgl. Abbildung 14). Die Dimerisierung scheint ein wichtiges Merkmal für die Stabilität des DJ-1-Proteins und seine volle Funktionsfähigkeit zu sein. Im Folgenden wird das Dimerisierungsverhalten sowie die Stabilität und Funktion der verschiedenen C-terminalen DJ-1-Mutanten diskutiert.

### ***5.3 Stabilität der C-terminalen DJ-1-Mutanten***

Die Lokalisation von L166 in der Mitte der G-Helix und die Substitution eines Leucins zu einem Prolin, einem Helixbrecher, lässt vermuten, dass der C-Terminus durch eine solche Mutation strukturell verändert wird und als Folge dessen auch das Dimer zerstört werden könnte (vgl. Abbildung 63). Die Dimerkontaktfläche ist  $2600\text{\AA}^2$  groß, und der C-Terminus macht einen großen Teil der Kontaktfläche aus (vgl. Kapitel 1.5.3), so dass eine Zerstörung der Tertiärstruktur im C-Terminus durch eine Prolinmutation einen Großteil der Kontaktfläche vernichtet und eine Dimerisierung erschwert wird (vgl. Abbildung 63B).



**Abbildung 63: Schematische Darstellung der A) Dimerformation von DJ-1 verglichen mit der B) hypothetischen Monomerformation von L166P**

A) Schematische Darstellung der Dimerstruktur von DJ-1. Ein Monomer ist braun, das andere grau angefärbt. Die grün gefärbte Helix im Helix-Knick-Helix Motiv ist die G-Helix, die H-Helix ist blau gefärbt, und die Dimerkontaktfläche ist gelb hervorgehoben.

B) Hypothetische Darstellung der Zerstörung des C-terminalen Helix-Knick-Helix Motivs und der Dimerkontaktfläche durch eine Mutation von Leucin an der Stelle 166 zu Prolin.

Dieselbe Annahme gilt auch für eine Prolin-Mutation an der Stelle V169 und genauso für Helix-brechende Mutationen in der H-Helix. Für die Mutante V169P stellte sich die Voraussage, dass diese ebenfalls instabil ist, als zutreffend heraus (vgl. Abbildung 35). Für die H-Helix-brechenden Mutanten A178P, V181P, K182P, L185P jedoch stimmte dies nicht. Diese sind nicht besonders stark in ihrer Stabilität reduziert im Vergleich zu [wt]DJ-1. Genauso wenig ist die Proteinstabilität einer Mutante verändert, der die H-Helix komplett fehlt. Im Gegensatz dazu führt die vollständige Deletion des C-Terminus genauso zu einer Proteininstabilität wie die G-Helix-brechenden Mutationen L166P und V169P. Bemerkenswerterweise erwies sich der extrem konservierte Knick im C-Terminus (N173/G174) als sehr wichtig für die strukturelle Stabilisierung. Deletion des Knicks, die Deletionsmutante  $\Delta$ N173/G174, ruft eine Destabilisierung im Vergleich zu [wt]DJ-1 hervor (vgl. Abbildung 36).

## Diskussion

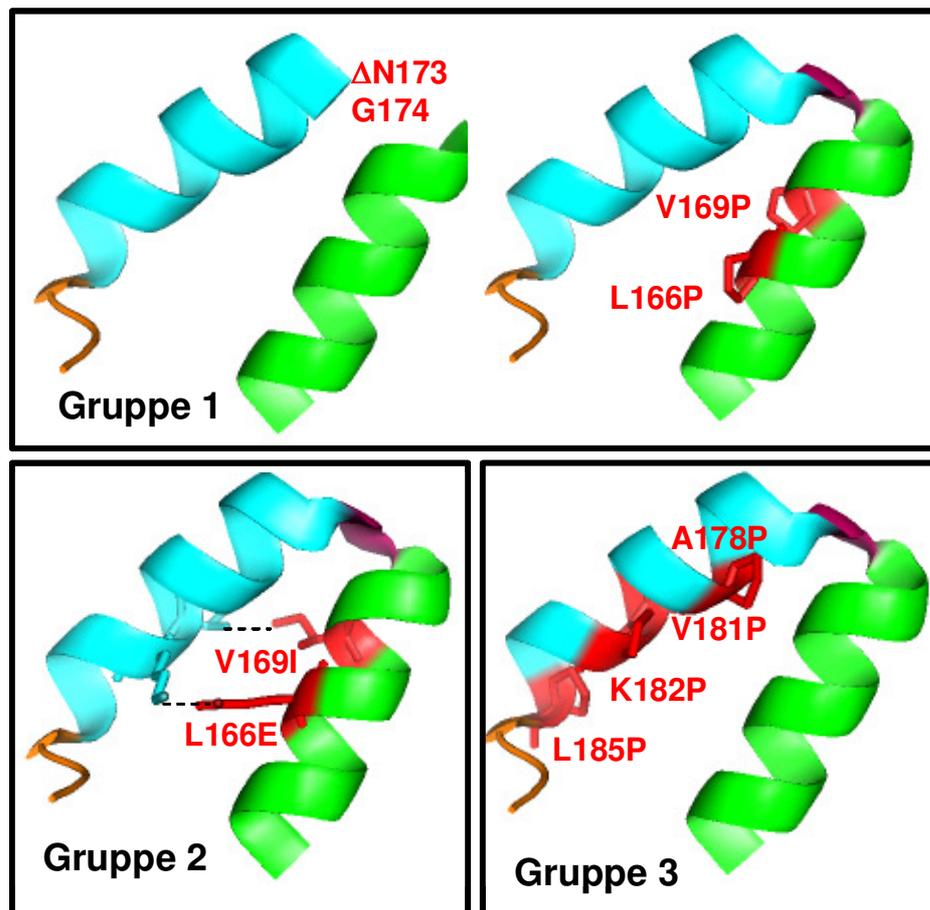
Aufgrund dieser Experimente ist es sehr wahrscheinlich, dass durch die Manipulation an der G-Helix oder der Knick-Region eine umfassende konformationelle Änderung im DJ-1-Protein hervorgerufen wird. Zusätzlich scheint die Dimerisierungsfähigkeit an dieser Kontaktstelle nicht mehr vollständig intakt zu sein, was zu einer Destabilisierung führt (vgl. Kapitel 5.5). Dies bewirkt vermutlich, dass hydrophobe Seitenketten im Inneren des DJ-1-Proteins in Kontakt mit der wässrigen Lösung kommen, und so das Protein von Chaperonen als falsch gefaltet erkannt wird (Li et al., 2005). Eine Rückfaltung des fehlgefalteten DJ-1-Proteins scheint erfolglos zu sein, und somit sollte das Protein dann dem UPS zugeführt und abgebaut werden. Experimente mit Proteasomhemmern ergaben jedoch kein einheitliches Bild (Blackinton et al., 2005; Görner et al., 2004; Lee et al., 2003b; Miller et al., 2003; Moore et al., 2003; Olzmann et al., 2004), so dass zusätzliche Abbauege nicht ausgeschlossen werden können (vgl. Kapitel 5.4). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Sensitivität der G- und der H-Helix sowie der Knickregion ist die, dass das Helix-Knick-Helix Motiv eine Art flexible Einheit bildet, die an einem Scharnier befestigt ist und bei bestimmten äußeren Einwirkungen wegklappen kann, um den Weg für mögliche Bindungspartner, Substrate oder eben einen beschleunigten Abbau zu öffnen. Bei den G-Helix-brechenden Mutanten ist dieser Mechanismus nicht möglich, weil der Zugang dauerhaft geöffnet ist und das Wegschwingen gar nicht nötig ist und somit das Protein ständig für den Abbau vorgesehen ist. Offenbar ist auch der Knick mit den AS N173 und G174 für diesen Vorgang entscheidend, während die H-Helix offensichtlich keinen großen Einfluss darauf hat (vgl. Abbildung 11).

Um diesen Mechanismus experimentell belegen zu können, wurde rekombinantes [wt]DJ-1 hergestellt und im CD-Spektrometer bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Es konnte ein konformationeller Wechsel von  $\alpha$ -Helix zu Knäuel bei ca. 50°C festgestellt werden, wobei aber nicht bestimmt werden konnte, welche  $\alpha$ -Helices betroffen sind. Dies sollte dann anhand von dreifach isotopenmarkiertem DJ-1 im NMR-Spektrometer gemessen werden, worauf im Ausblick (vgl. Kapitel 6) näher eingegangen wird.

Es wurden zusätzlich zu den sehr instabilen Mutationen in der G-Helix drei weitere Substitutionen vorgenommen, die eine stabilere Expression erzeugten, dazu gehörten die Mutanten V169A, V169I und L166E. Wahrscheinlich können diese Aminosäurereste mit den Resten der gegenüberliegenden H-Helix interagieren. Der Glutamatrest der L166E Mutante könnte mit dem Lysinrest K182 in der H-Helix eine Salzbrücke bilden. Dagegen bewirkt eine Mutation von Valin zu Alanin an der Stelle 169 keine so stabile

Proteinexpression wie eine Substitution durch Isoleucin. Die verlängerte Kohlenstoffkette des Isoleucins scheint den Zwischenraum zwischen der G-Helix und der H-Helix besser auszufüllen und mit dem Valinrest 181 der gegenüberliegenden H-Helix besser zu wechselwirken.

Im Folgenden sind die einzelnen Mutanten je nach dem Einfluss ihrer Seitenkette auf die Stabilität des DJ-1-Proteins in drei verschiedene Gruppen eingeteilt (vgl. Abbildung 64):



**Abbildung 64: Einteilung der DJ-1-Mutationen in drei Gruppen aufgrund ihrer Stabilität**

Schematische Darstellung der DJ-1-Mutationen und deren Aufteilung in drei Gruppen. Dabei werden die Mutanten in destabilisierende Mutanten (Gruppe 1), nicht destabilisierende Mutanten (Gruppe 2) und Mutanten, die keine Beeinflussung der Stabilität zeigen (Gruppe 3) eingeteilt.

Zu den Gruppen gehören folgende Mutanten: Gruppe 1:  $\Delta$ G/H (nicht gezeigt),  $\Delta$ N173/G174, L166P, V169P; Gruppe 2: L166E, V169I, V169A (nicht gezeigt) und Gruppe 3: A178P, V181P, K182P, L185P, L187P (nicht gezeigt),  $\Delta$ H (nicht gezeigt).

#### **5.4 Abbaumechanismen des DJ-1-Proteins**

Sowohl die Expression der DJ-1 C-terminalen Mutanten im direkten Western Blot als auch die „Pulse-Chase“-Experimente zeigten deutlich, dass die G-Helix-brechenden Mutanten sehr viel instabiler sind und eine geringere Halbwertszeit haben als ihre Kontrollmutanten

## Diskussion

L166E und V169I oder auch die H-Helix-brechenden Mutanten (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 37). Zusätzlich konnte durch quantitative und semi-quantitative RT-PCR ausgeschlossen werden, dass eine Instabilität der RNA vorliegt (vgl. Abbildung 39 und Abbildung 40). Daher stellt sich die Frage, woher die Protein-Instabilität kommt bzw. welche möglichen Abbauwege für den beschleunigten Abbau verantwortlich sind.

Es zeigte sich in den verschiedenen neuronalen und nicht-neuronalen Zellsystemen eine unterschiedliche Prozessierung von proteolytisch verkürzten Fragmenten. In HEK 293T-Zellen traten eine Reihe N-terminaler verkürzter Fragmente auf, die in neuronalen SH-SY5Y- und MN9D-Zellen in der Stärke nicht zu finden waren (vgl. Abbildung 24). Dies galt sowohl für [wt]DJ-1 als auch für die pathogene Mutante [L166P]DJ-1, die viel stärker vom Abbau betroffen war.

Eine C-terminale Prozessierung konnte nicht beobachtet werden, da N-terminal Epitop-markierte Konstrukte keine zusätzlichen verkürzten Fragmente im direkten Western Blot von Zelllysaten zeigten (vgl. Abbildung 35B und D). Dieselben N-terminalen verkürzten Fragmente tauchten entsprechend auch in den „Pulse-Chase“-Experimenten auf, wobei diese teilweise stabilisiert wurden im Gegensatz zu der Vollängenbande, die schon nach ca. 2h-5h vollständig degradiert war (vgl. Abbildung 37). Da die dramatisch reduzierte Proteinexpression der G-Helix-brechenden Mutanten sowohl in Säugerzellen (vgl. Abbildung 35) als auch in *E. coli*-Bakterien zu beobachten ist (vgl. Abbildung 60), scheint es sich um einen Abbauprozess zu handeln, der sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten zu finden ist.

Die meisten Proteine, die fehlgefaltet, kurzlebig, mutiert oder durch Oxidation beschädigt sind, werden ubiquitiniert und dem proteasomalen System zugeführt, welches diese dann zu kleinen Peptiden proteolytisch abbaut (Hochstrasser, 1996). Das Proteasom, welches ein Multienzymsystem ist und aus drei katalytischen Zentren besteht, einer chymotryptischen, tryptischen und post-glutamyl hydrolytischen Einheit (Hershko et al., 1992), kann man mit selektiven Inhibitoren blockieren.

Mit C-terminal Epitop-markierten DJ-1-Konstrukten transient transfizierte HEK 293T-Zellen wurden mit dem äußerst effektiven, permeablen und irreversiblen Inhibitor Epoxomycin bis zu 24h behandelt. Für [wt]DJ-1 ergab sich keine sichtbare Änderung in der Proteinmenge. Vor allen Dingen die G-Helix-brechenden Mutanten bzw. die Deletionsmutante  $\Delta G/H$  zeigten eine erhöhte Proteinakkumulation, die mit der Anhäufung des Kontrollproteins  $\beta$ -Catenin korrelierte (vgl. Abbildung 38). Diese Proteinakkumulation erreichte aber auch nach 24h Inkubation mit dem Inhibitor nicht die

## Diskussion

Menge von [wt]DJ-1, was zu erwarten wäre, wenn der Abbauprozess alleine von der Aktivität des Proteasoms abhängig gewesen wäre. Die G-Helix-nicht-brechenden Mutanten L166E und V169I sind deutlich weniger vom proteasomalen Abbau betroffen. Allerdings scheint auch hier im Einklang mit der Proteinkonzentration des Kontrollproteins  $\beta$ -Catenin nach 10h eine deutliche Anhäufung nicht abgebauten Proteins stattzufinden. Dabei sammelt sich deutlich mehr [L166E]DJ-1 an als vergleichsweise [V169I]DJ-1. Es gibt also auch innerhalb der drei Gruppen (vgl. Abbildung 64) unterschiedliche Auswirkungen der Mutanten auf den proteasomalen Abbau. Dasselbe gilt auch für die H-Helix-brechenden Mutanten und die Deletionsmutante  $\Delta$ H, die ebenfalls erst nach 10h Inhibitorinkubation verstärkt auf die Inaktivität des Proteasoms reagieren, was wiederum mit der Menge an  $\beta$ -Catenin korreliert. Auch dort gibt es leichte Unterschiede in der Proteinakkumulation, so dass die Proteinmenge von [L185P]DJ-1 etwas geringer ist als jene von [ $\Delta$ H]DJ-1.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass trotz der Proteinakkumulation nach spätestens 24h Inkubation mit Epoxomycin zumindest die G-Helix-brechenden Mutanten die Proteinmenge von [wt]DJ-1 nicht erreichen. Daher scheint zwar das Proteasom zum Teil einen Einfluss auf den verstärkten Abbau von L166P und V169P zu haben, aber wahrscheinlich ist noch ein anderer Abbauweg überlagert oder zumindest teilweise beteiligt.

Um dies weiter zu überprüfen wurden Zellen, die mit [L166P]DJ-1 transfiziert waren, mit MG132 inkubiert, einem weiteren proteasomalen Inhibitor, der nicht nur das Proteasom hemmt, sondern auch Caspasen im Lysosom und außerdem reversibel ist. Parallel wurde derselbe Versuchsaufbau gewählt und anstatt MG132 Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) verwendet, welches die sauren Hydrolasen im Lysosom und Endosom durch seinen basischen Charakter inhibieren sollte. Die Abbaukinetik von [ $\text{S}^{35}$ ]Cystein/Methionin-markiertem DJ-1 wurde im „Pulse-Chase“-Experiment gemessen. Diese Behandlung aus einem proteasomalen Inhibitor MG132 und einem basischen Reagenz  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , welches die Aktivität von aziden Enzymen im Lysosom und Endosom hemmen soll, sollte die Frage beantworten, ob zwei sich überlagernde Abbauwege mit unterschiedlicher Kinetik beteiligt sind. Da durch die Proteasominhibitorstudien gezeigt werden konnte, dass [L166P]DJ-1 erst nach 24h verstärkt angehäuft wird, scheint der proteasomale Abbau eine langsamere Kinetik zu haben. Aus den „Pulse-Chase“-Experimenten ging aber hervor, dass L166P eine Halbwertszeit von  $<2\text{h}$  hat, so dass es einen zusätzlichen schnelleren Abbauweg geben muss. Somit sollte mit dem oben genannten Experiment geprüft werden, ob es einen

## Diskussion

schnelleren lysosomalen und ein langsameren proteasomalen Abbauweg gibt. Dies wurde aber nicht bestätigt, da in den entsprechenden „Pulse-Chase“-Experimenten keine verstärkte Akkumulation der Mutante auftrat und die Kinetik beider Abbauwege identisch war. Es handelte sich um eine Reaktion 1. Ordnung, so dass man nicht auf überlagernde Prozesse schließen kann (vgl. Abbildung 31). Zu demselben Ergebnissen kamen Miller und Kollegen, die in direkten Western Blots nur eine teilweise Stabilisierung von L166P durch proteasomale Inhibitoren sehen konnten, aber keinen Einfluss von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  feststellen konnten (Miller et al., 2003).

Im weiteren Verlauf der Studie wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass es sich bei den G-Helix-brechenden Mutanten um einen autoproteolytischen Abbauprozess handelt. Da DJ-1 ein katalytisch aktives Zentrum aus einem Cystein-106 und einem Histidin-126 besitzt, könnte diese Kombination eventuell ausreichend sein, um seine volle Aktivität als Protease ausüben zu können (vgl. Kapitel 5.3). Da durch die Mutation am C-Terminus des DJ-1-Proteins das Helix-Knick-Helix Motiv nicht mehr voll intakt ist und der Zugang zum aktiven Zentrum somit möglicherweise frei ist, könnten sich L166P und auch V169P selbst abbauen. Diese Vermutung konnte aber widerlegt werden, da weder durch Mutation des Cysteins-106 zu einem Alanin die Stabilität von [wt]DJ-1 erhöht werden konnte noch durch die Doppelmutante L166P/C106A eine Stabilisierung des DJ-1-Proteins erzeugt werden konnte (vgl. Abbildung 32). Die ursprüngliche Hypothese, dass entweder durch Wegschwingen des Helix-Knick-Helix Motivs durch Bindungspartner oder veränderte äußere Bedingungen wie z. B. vermehrte ROS oder Manipulation am C-Terminus der Zugang zum möglichen aktiven Zentrum erleichtert würde und ein kontrollierter Abbau stattfinden könnte, wurde damit entkräftet. Zudem ist inzwischen aus der Literatur bekannt, dass DJ-1 eine nur schwache Proteaseaktivität besitzt, die nicht sehr spezifisch ist (Olzmann et al., 2004).

Da DJ-1 in der oxidativen Stressantwort eine Rolle spielt, wurden oxidierbare Cysteine im DJ-1-Protein genauer untersucht. Außer dem Cystein-106, welches im möglichen katalytischen Zentrum des DJ-1-Proteins liegt, gibt es noch zwei weitere Cysteine, die oxidierbar sind. Diese Cysteine wurden zu Alanin mutiert. Zunächst wurde die Stabilität im direkten Western Blot untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass C46A deutlich instabiler als C53A war (vgl. Abbildung 33). Dimerisierungsstudien konnten zeigen, dass C46A deutlich schwächere Dimerisierungsfähigkeiten besitzt als C53A (Ito et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass C46A instabiler war als C53A und die Tripelmutante aus C106A/C46S/C53S ähnlich instabil wie L166P war (vgl. Abbildung

33). Aus strukturellen Betrachtungen lässt sich diese Tatsache erklären, da C46A direkt an der Dimerisierungskontaktfläche lokalisiert ist und somit eine Bildung der stabilen Dimerformation gestört ist.

Es lässt sich also allgemein feststellen, dass der Verlust der Dimerformation, was für die Mutanten L166P, V169P, ΔG/H und C46A zutreffend ist, ein wichtiger Grund dafür zu sein scheint, dass diese Proteine als Monomere sofort verstärkt abgebaut werden. Die Dimerbildung von DJ-1 wird nun im folgenden Abschnitt diskutiert.

### ***5.5 Dimerbildung von [wt]DJ-1 und seinen Mutanten***

Es konnte mittlerweile von diversen Gruppen mittels Röntgenstrukturanalyse, Gelfiltration und Co-IP gezeigt werden, dass [wt]DJ-1 hauptsächlich als Dimer existiert, während [L166P]DJ-1 als Monomer vorliegt (Baulac et al., 2004; Macedo et al., 2003; Moore et al., 2003; Moore et al., 2005; Olzmann et al., 2004; Wilson et al., 2003a). Da die Dimerfläche ca.  $2600\text{\AA}^2$  ausmacht, muss eine Mutation in der Kontaktfläche eine sehr starke konformationelle Veränderung bewirken, damit eine Dimerisierung nicht mehr oder nur vermindert stattfinden kann. Da der C-Terminus, bestehend aus dem Helix-Knick-Helix Motiv, einen großen Teil der Dimerfläche ausmacht (vgl. Abbildung 63), ist leicht nachzuvollziehen, dass eine Zerstörung der Struktur des C-Terminus zu einer Verminderung oder gar Aufhebung der Dimerisierungs-Fähigkeit führen kann. Die so entstehenden Monomere werden vermutlich aufgrund ihrer Fehlfaltung eher von Chaperonen erkannt. Diese Helferproteine helfen fehlgefalteten Proteinen sich wieder zurückzufalten oder führen diese dem proteasomalen System zu. Da der Abbauweg wie unter Kapitel 5.4 schon beschrieben nicht vollständig geklärt ist, kann darüber nur spekuliert werden. Wichtig aber ist, dass die Dimerkonformation die stabile Form von DJ-1 zu sein scheint und es vor einem beschleunigten Abbau schützt. Dies konnte an den synthetischen, destabilisierenden DJ-1-Mutanten in Co-IP-Experimenten in HEK 293T-Zellen bestätigt werden. Dabei wurden diese Mutanten als DJ-1/V5 mit Myc/[wt]DJ-1-Konstrukten cotransfiziert und dann mit dem V5-AK immunpräzipitiert. Es konnte gezeigt werden, dass zwar [L166P]DJ-1/V5 und [V169P]DJ-1/V5 angereichert werden konnten, aber es konnten keine Heterodimere aus Myc/[wt]DJ-1 und den G-Helix-brechenden V5-Konstrukten im Western Blot detektiert werden (vgl. Abbildung 41). [wt]DJ-1/V5, [V169I]DJ-1/V5 und [L166E]DJ-1/V5 zeigten dagegen eine Co-IP mit Myc/[wt]DJ-1, also war eine Dimerbildung mit diesen Mutanten möglich. Trotz einer nur kurzen Präzipitation von 1h wurden N-terminale verkürzte Fragmente für alle drei Konstrukte detektiert. Diese

betreffen aber nicht den entscheidend bei der Dimerisierung beteiligten C-Terminus, so dass man diese vernachlässigen kann.

Die Dimerbildung ist für ein voll funktionsfähiges DJ-1-Protein eine wichtige Voraussetzung. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Funktionalität der DJ-1-Mutanten untersucht. Die funktionellen Assays, die hier verwendet wurden und die dazu beitragen sollten, die Funktion von DJ-1 besser zu verstehen, werden nun im nächsten Abschnitt diskutiert.

### **5.6 Funktion von DJ-1 in verschiedenen subzellulären Bereichen**

Da unterschiedliche Funktionen für DJ-1 in verschiedenen subzellulären Bereichen wie im Zytoplasma als antioxidatives Protein und Intermediat in pro- oder anti-apoptotischen Signaltransduktionskaskaden, im Zellkern als Regulator der Transkription und assoziiert mit Mitochondrien als Verteidigungssystem gegen ROS (vgl. Kapitel 1.5.5) gezeigt werden konnten, werden diese im Folgenden je nach subzellulärer Lokalisation ausführlicher diskutiert.

#### **5.6.1 Zytoplasmatische Funktion von DJ-1**

##### **5.6.1.1 Funktion von DJ-1 in der oxidativen Stressantwort**

Es ist mittlerweile vielfach gezeigt worden, dass die Cysteine des DJ-1 stark zu Oxidation neigen. Das wurde sowohl in der Kristallstruktur demonstriert, da eine reduzierte Form von DJ-1 praktisch nicht herzustellen war, da das reaktivste der drei Cysteine C106 schon vom Luftsauerstoff in eine Sulfensäure (-SOH) oder Sulfinsäure (-SO<sub>2</sub>H) verwandelt wurde (Wilson et al., 2003a). Die 2D-Gelelektrophorese von DJ-1 zeigte nach einer Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine deutliche Verschiebung des pI zu azideren pI-Werten. Dabei wurde auch festgestellt, dass zunächst C106 oxidiert wird, gefolgt von den Cysteinen C46 und C53, die erst bei längerer Exposition oder erhöhter Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert werden (Kinumi et al., 2004).

Die Vermutung, dass DJ-1 exprimierende Zellen vor oxidativem Stress schützen, wurde mehrfach in Zellkulturexperimenten bestätigt. Dabei wurde ein Knock-down von DJ-1 mittels siRNA vorgenommen, mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst und über eine Re-Transfektion von [wt]DJ-1 ein Sterben der Zellen verhindert (Martinat et al., 2004; Taira et al., 2004).

In entsprechenden Knock-out-Mausmodellen wurde erst nach Behandlung dieser Tiere mit dem parkinsonverursachendem Toxin MPTP oder nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein

vermehrter Verlust der dopaminergen Neuronen festgestellt, während nicht gestresste Knock-out-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp zeigten (Kim et al., 2005b).

Das erste funktionelle Experiment in dieser Arbeit zur Frage, ob die G-Helix-brechenden DJ-1-Mutanten nicht nur instabile Monomere sind, sondern auch funktionelle Defizite aufweisen, war aufgrund der bekannten antioxidativen Fähigkeit von DJ-1 ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zytotoxizitätstest. Um den Einfluss des ubiquitären endogenen DJ-1 zu eliminieren, wurden immortalisierte MEF-Zellkulturen angelegt, die aus DJ-1 Knock-out-Mausembryonen generiert wurden. Diese Knock-out-Zellen wurden dann mit den entsprechenden DJ-1-Konstrukten transfiziert und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Die Zytotoxizität wurde dabei bestimmt und es stellte sich heraus, dass [wt]DJ-1, [V169I]DJ-1 und [L166E]DJ-1 eine protektive Wirkung auf die Zellen hatten, im Gegensatz zu [L166P]DJ-1 und [V169P]DJ-1 (vgl. Abbildung 52). Zum ersten Mal konnte also gezeigt werden, dass nicht nur L166P die zytoprotektive Funktion von DJ-1 nicht mehr ausüben kann, sondern auch die synthetische Mutante V169P. Damit ist also nicht nur die Stelle L166 entscheidend für eine solche Fehlfunktion verantwortlich, sondern anscheinend der Verlust der Integrität der quartären DJ-1-Proteinstruktur, die dann zu einer „loss of function“ Mutation führt.

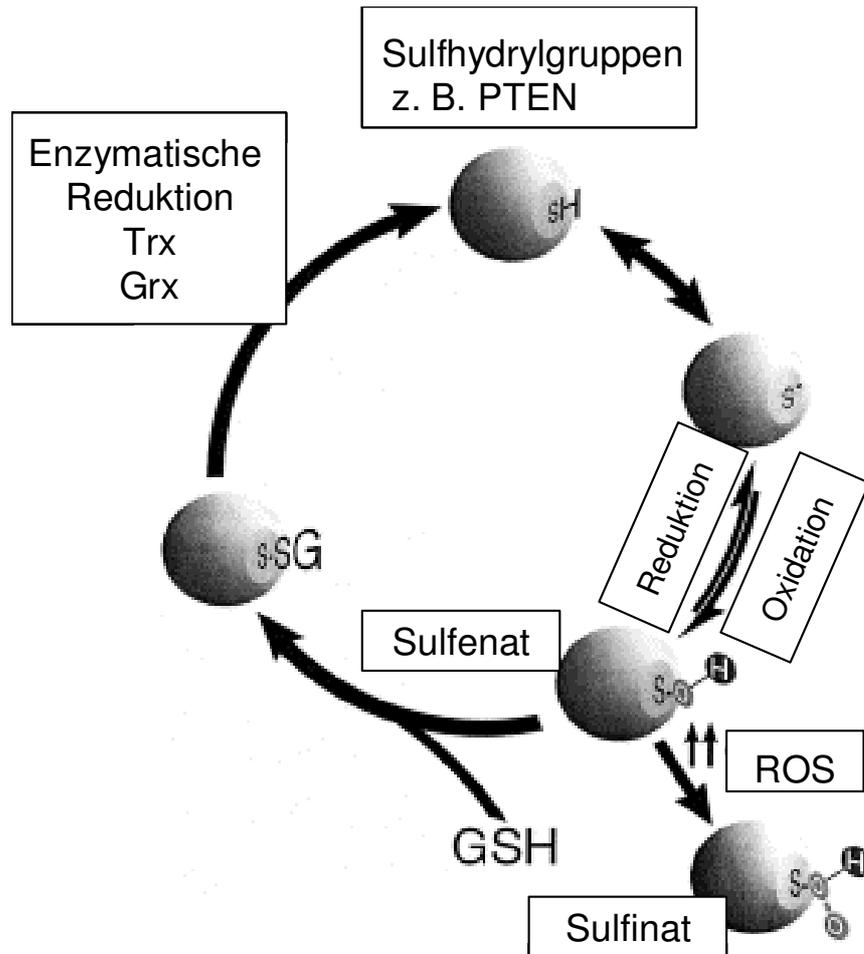
Es schließt sich die Frage an, welchen Mechanismus DJ-1 zur Protektion von Zellen ausübt: einen direkten in Form eines antioxidativen Enzyms oder eher einen indirekten in Form von Aktivierungen oder Inhibierungen von oxidativ induzierten Signaltransduktionswegen. Dies wird in den nächsten beiden Abschnitten beantwortet.

### **5.6.1.2 Einfluss von ROS in der antioxidativen Verteidigung und der Signaltransduktion**

Oxidativer Stress wird durch eine erhöhte Menge an ROS hervorgerufen, zu denen Superoxidanionen, Hydroxylradikale, Hydrogenperoxide oder Stickstoffoxide gehören. Diese reaktiven Spezies können entweder exogen, z. B. durch UV-Licht, Zytokine, Umweltgifte oder durch verschiedene Quellen, z. B. NADPH-Oxidase, Peroxisomen oder defekte Mitochondrien intrazellulär hervorgerufen werden (vgl. Abbildung 8). Die Folge von erhöhtem oxidativen Stress ist die Oxidation von Proteinen, DNA und Lipiden. Vor allen Dingen mitochondriale DNA wird häufig so stark modifiziert, dass es zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien kommt. Diese produzieren daraufhin wiederum eine erhöhte Menge ROS und es wird noch mehr DNA zerstört, so dass sich ein „Teufelskreis“ bildet, der meistens im Zelltod endet (Finkel et al., 2000).

## Diskussion

Aus diesem Grunde ist es wichtig, dass Zellen verschiedene Verteidigungsmechanismen haben. Ein wichtiges Verteidigungsnetzwerk bilden die antioxidativen Proteine, zu denen SOD, CAT, Grx, Trx und Prx zählen. Die SOD, zu denen die zytoplasmatische CuZnSOD (SOD1), die mitochondriale MnSOD (SOD2) sowie die extrazelluläre SOD (SOD3) gehören, katalysieren die Umsetzung von Superoxiden zu Sauerstoff und Hydrogenperoxid. Die Katalasen und Peroxidasen sorgen dann im weiteren für die Umwandlung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und Sauerstoff (Scandalios, 2005). Das nicht-enzymatische Verteidigungssystem GSH, ein Tripeptid bestehend aus einem Glutamat, Glycin und einem Cystein, ist einer der wichtigsten Thiol-Disulfid Redoxpuffer der Zelle. Es ist sowohl im Zytosol als auch im Kern und den Mitochondrien in erheblichen Mengen vorhanden. GSH ist in der Lage, den Redoxstatus von kritischen Protein-Sulfhydrylgruppen von z. B. Protein Tyrosinphosphatasen (PTP) aufrechtzuerhalten (Valko et al., 2006). Dabei wird die reduzierte Form des GSH zu einem gemischten Disulfid aus S-glutathionyliertem Protein, GSS-Protein, oxidiert und anschließend durch enzymatische Reduktion von Grx oder Trx zu GSH reduziert. So werden Sulfhydrylgruppen verschiedener Enzyme geschützt. Ist allerdings der oxidative Stress zu groß, können die oxidierten Proteine irreversibel zu Sulfinsäuren oder Sulfonsäuren oxidiert werden, und der Glutathionkreislauf kann nicht mehr stattfinden (vgl. Abbildung 65).



**Abbildung 65: Glutathionkreislauf**

Schematische Darstellung des zyklichen Kreislaufs von GSH, welches freie Sulphydrylgruppen nach ihrer Oxidation reduziert, indem es selbst eine Disulfidbrücke mit dem Sulfenanion eingeht und anschließend durch enzymatische Redoxsysteme z. B. Trx oder Grx wieder zu GSH für den nächsten Zyklus reduziert wird (Finkel, 2000).

GSH spielt in verschiedenen Bereichen eine protektive Rolle gegen oxidativen Stress: Es ist ein Co-Faktor verschiedener antioxidativer Enzyme wie z. B. Grx, es spielt eine Rolle im Aminosäuretransport durch die Plasmamembran, es ist in der Lage direkt  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Lipidperoxide zu reduzieren und es kann die wichtigen Vitamine E und C wieder in ihre aktive Form zurückversetzen.

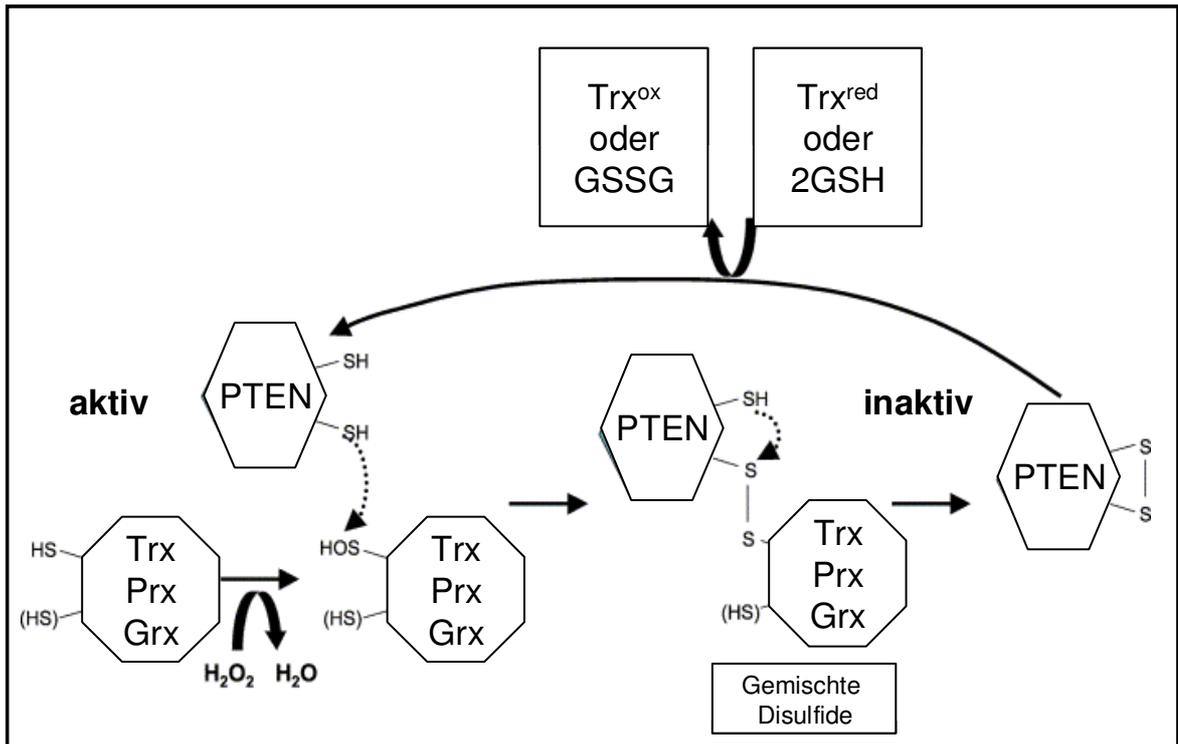
Die hier beschriebenen Antioxidantien sind direkte Verteidigungsmechanismen der Zelle gegen oxidativen Stress. Ist das Redoxgleichgewicht einer Zelle erheblich gestört, ist dieses Verteidigungsnetzwerk überlastet und die Zelle stirbt. Dabei werden meist Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die je nach Art und Dauer des oxidativen Stresses in der Repression oder (De)-Repression antioxidativer oder (anti-)apoptotischer Gene resultieren. Im Folgenden werden die verschiedenen Signaltransduktionen beschrieben, die durch ROS aktiviert werden können.

## Diskussion

Zu den wichtigsten Signaltransduktionswegen und den zentralen Mediatoren in der oxidativen Stressantwort gehören die MAP-Kinasen, der PI3K/Akt-Signalweg sowie das ASK-1 und NF- $\kappa$ B Signalsystem (Finkel et al., 2000) (vgl. Abbildung 9).

Relativ niedrige Konzentrationen von ROS induzieren Zellproliferation durch ERK- und Akt-Signaltransduktionswege, hauptsächlich durch Stimulation von Wachstumsrezeptoren. Viele dieser Rezeptoren werden verstärkt phosphoryliert in direkter Antwort auf Behandlung mit oxidativen Spezies oder Wachstumsfaktoren, die die Produktion von ROS stimulieren (Droge, 2002). Eine Erklärung für den Mechanismus liefert eine oxidationsabhängige Inaktivierung der Dephosphorylierung von Wachstumsrezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass  $H_2O_2$  reversibel Phosphotyrosinphosphatasen (PTP) inaktivieren kann (Lee et al., 1998; Lee et al., 2002). Dabei wird eines der beiden aktiven Cysteine der PTP, die alle ein CXXC-Motiv besitzen, reversibel zu Cystein-Sulfensäure (Cys-SOH) oxidiert. Bei höherem oxidativem Stress kann die Sulfhydrylgruppe sogar auch zu einer irreversiblen Form, der Cystein-Sulfinsäure (Cys-SO<sub>2</sub>H) oder Cystein-Sulfonsäure (Cys-SO<sub>3</sub>H), oxidiert werden wie in Abbildung 65 schon beschrieben (Woo et al., 2003).

Die Cys-SOH-Einheit der PTP wird im Normalfall direkt intramolekular von einem zweiten Cystein angegriffen, bildet ein Disulfid und ist in dieser Form inaktiv. Diese Disulfidbrücke kann dann wieder von antioxidativen Enzymen wie Trx oder Grx reduziert werden. Für den Transkriptionsfaktor Yap1 in Hefe konnte sogar ein gemischtes Disulfid aus Yap1 und Grx3 nachgewiesen werden (Delaunay et al., 2000), so dass eine solche gemischte Disulfidbindung für Substrate mit Sulfhydrylgruppen möglich zu sein scheint. Es ist allerdings nicht klar, ob diese Bildung gemischter Disulfide ein allgemeiner regulatorischer Mechanismus ist, da es sehr schwierig ist, diese instabilen Spezies nachzuweisen. Am Beispiel von PTEN, der Phosphatase, die PI-3,4,5-P3 in PI-4,5-P2 im Akt-Signalweg umwandelt, wird diese Oxidation veranschaulicht (vgl. Abbildung 66).

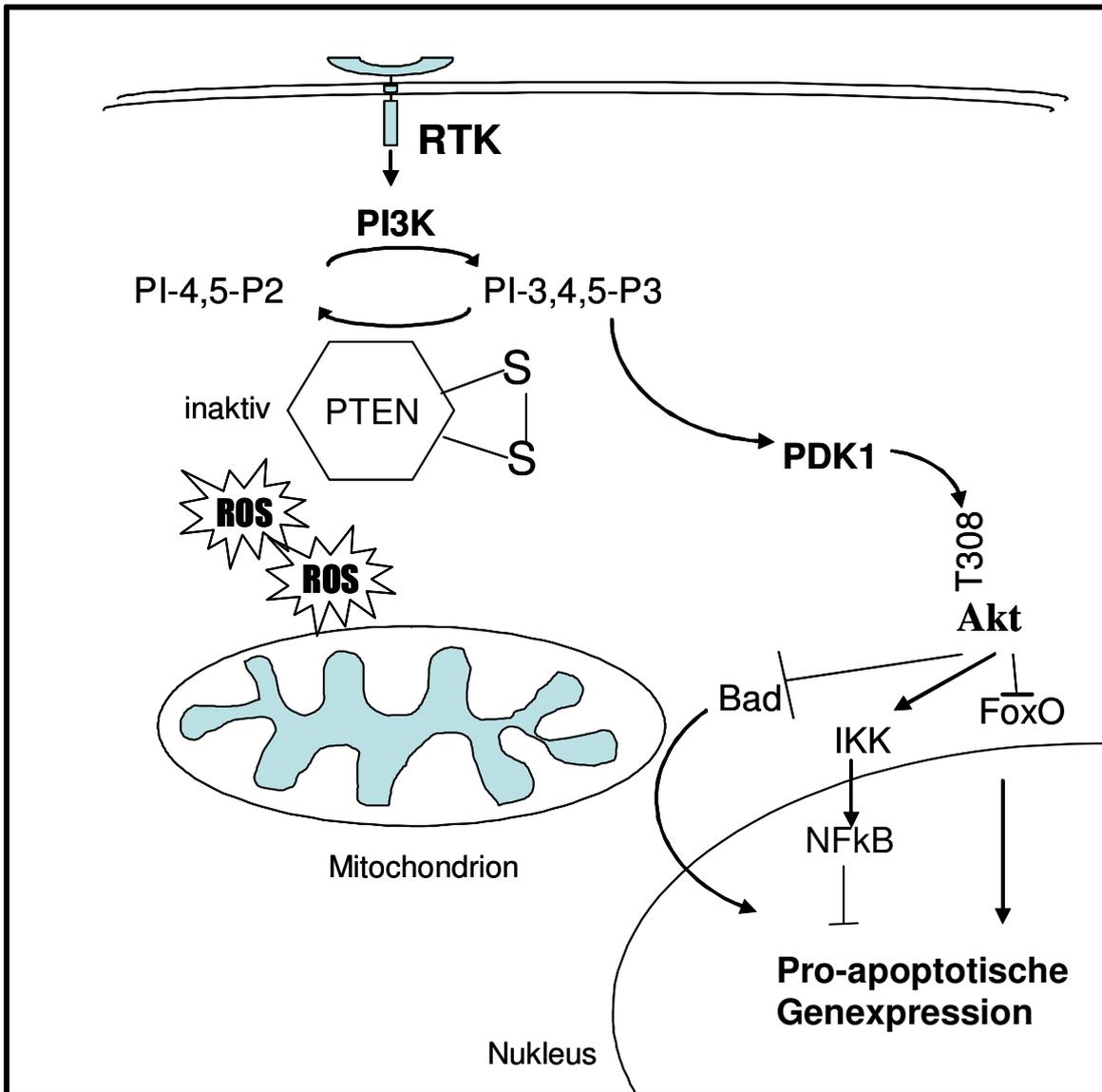


**Abbildung 66: Mechanismus der Aktivierung und Inaktivierung von PTEN**

Hypothetischer Mechanismus der Inaktivierung von PTEN: Der aktive Cysteinrest von PTEN wird von Trx oder Grx angegriffen und es entsteht ein instabiles gemischtes Disulfid. Ein anschließender intramolekularer Angriff des zweiten Cysteins von PTEN verdrängt Trx oder Grx und es entsteht ein inaktives PTEN, welches eine intramolekulare Disulfidbrücke trägt. Der Prozess ist reversibel und PTEN kann wieder durch die Enzyme Trx oder Grx reduziert werden.

Der beschriebene Mechanismus bedeutet nun, dass antioxidative Enzyme nicht nur direkt oxidativ wirken können, sondern dabei auch Signalwege beeinflussen können. Die Modulation von Disulfidbrücken ist ein sehr schneller und effektiver Redoxmechanismus, um zelluläre Signalwege an- und auszuschalten. Im Folgenden werden nun zwei Signalwege genauer beschrieben, die über ROS induziert werden.

Im Falle von leichtem oxidativem Stress wird der Akt-Signalweg eingeschaltet, indem PTEN durch Oxidation inaktiviert wird und die erhöhte Phosphorylierung von Akt zu einer Repression von pro-apoptotischen Genen wie z. B. FoxO-Proteinen führt, einer Untergruppe der Forkheadfamilie von Transkriptionsfaktoren, die Apoptose induzieren (Song et al., 2005) (vgl. Abbildung 67).

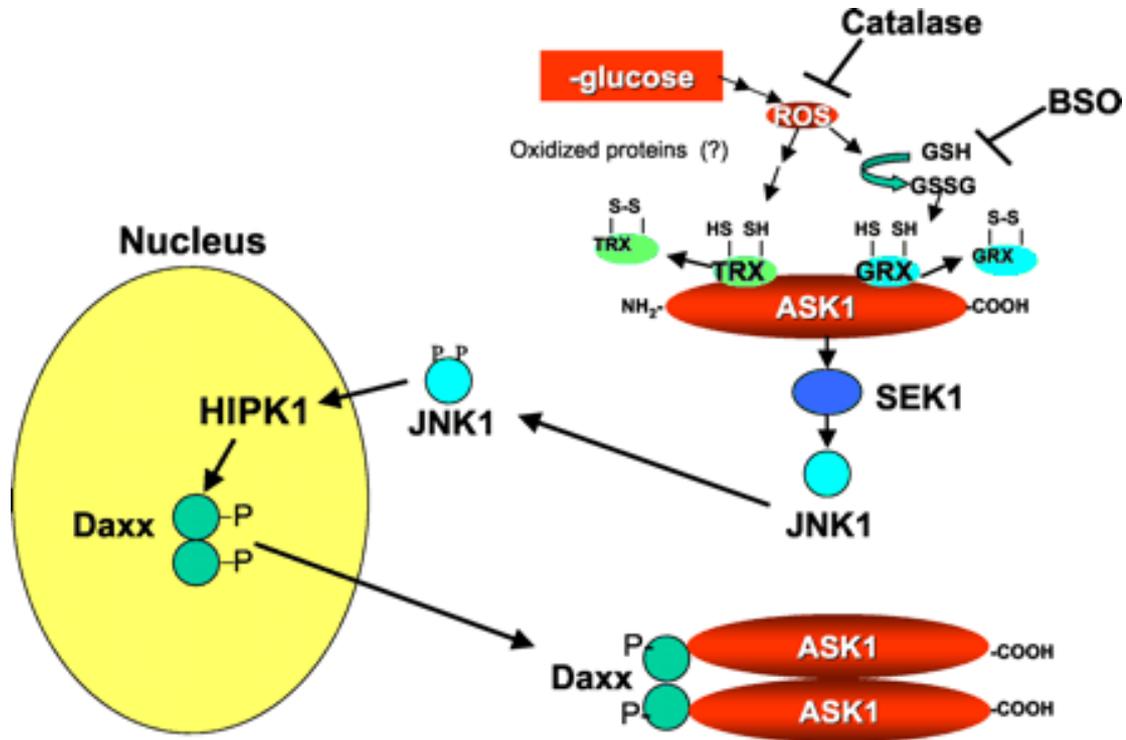


**Abbildung 67: Darstellung des Akt-Signalwegs bei geringem oxidativem Stress**

Schematische Darstellung des Akt-Signalwegs nach leichtem oxidativem Stress. PTEN wird durch Oxidation seiner Sulfhydrylgruppen inaktiviert, so dass PI-4,5-P2 zu PI-3,4,5-P3 phosphoryliert werden kann und PDK1 Akt am Threonin-308 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung aktiviert Akt, die wiederum dazu führt, dass FoxO inaktiviert und NF-κB aktiviert werden und pro-apoptische Genexpression nicht stattfinden kann.

Bei relativ hohem oxidativem Stress werden eher JNK- und p38<sup>MAPK</sup>-Signaltransduktionswege angeschaltet. Auch hier spielen die redoxaktiven Enzyme eine entscheidene Rolle in der Regulation der Kinasen. Es konnte gezeigt werden, dass Trx Ask-1 binden kann und unter normalen Bedingungen seine pro-apoptische Aktivität unterdrücken kann (Saitoh et al., 1998). Erhöhter oxidativer Stress jedoch verursacht eine Dissoziation dieses Komplexes und Ask-1 kann JNK, die Kinase, die in der Kaskade unterhalb von Ask-1 steht, aktivieren. JNK aktiviert HIPK1 im Kern, eine Kinase, die Daxx, das „death-associated protein“, phosphoryliert und so dessen Kernexport ermöglicht.

Daxx aktiviert dann Ask-1 und führt zum Anschalten eines pro-apoptotischen Signalwegs (vgl. Abbildung 68). Dies ist ebenfalls ein sehr sensibler Prozess, der erneut indirekt durch Eingreifen antioxidativer Systeme zu einem An- oder Abschalten von Signalwegen und zur (De)-repression von pro-apoptotischen Genen führt



**Abbildung 68: Schematische Darstellung des pro-apoptotischen Ask-1-Signalwegs**

Schematische Darstellung der Aktivierung des Ask-1-Transduktionswegs. Ask-1 bindet an Trx oder Grx und ist in diesem Komplex inaktiv. Nach der Oxidation von Trx bzw. Grx löst sich die Bindung zu Ask-1, welches dann den JNK-Weg aktiviert. JNK bewirkt über Phosphorylierungen von Daxx die Translokation von Daxx in das Zytoplasma. Daxx sorgt dann für eine Oligomerisierung von Ask-1 und phosphoryliert es, so dass es in dieser aktiven Form den apoptotischen Signalweg anschalten kann (Quelle: Song et al., 2003).

Es wird nun im Folgenden diskutiert, ob DJ-1 eher einen direkten antioxidativen Mechanismus ausübt und als Sensor für oxidativen Stress gilt oder einen indirekten als Intermediat in einem Signaltransduktionsweg.

### 5.6.1.3 DJ-1 als antioxidatives Protein oder Intermediat in Signaltransduktionskaskaden

Die ersten Hinweise darauf, dass DJ-1 möglicherweise in Signaltransduktionskaskaden eine Rolle spielt, kamen aus Drosophila-Studien. Kim und Kollegen konnten als erste zeigen, dass der Verlust von Photorezeptoren in PTEN Knock-out-Fliegen mit dem

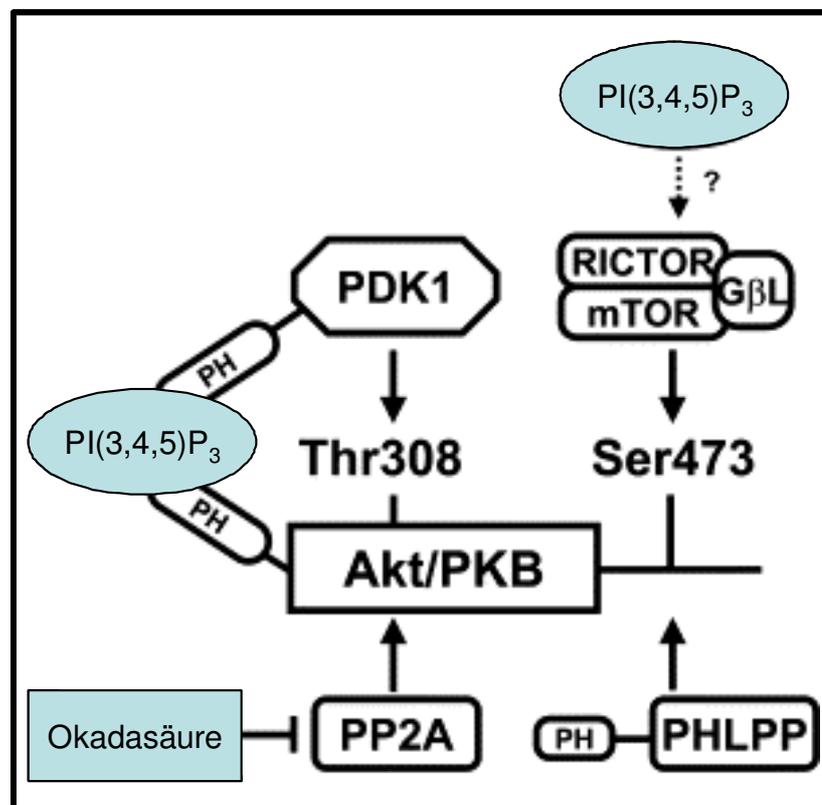
## Diskussion

*Drosophila*-Homologen von DJ-1 wieder geheilt werden konnte (Kim et al., 2005a). Die funktionelle Interaktion von DJ-1 mit PTEN konnte in Zellkulturexperimenten bestätigt werden. Insulin-stimulierte Zellen zeigten mit stabil transfiziertem DJ-1 eine erhöhte Phosphorylierung von Akt als Knock-out-Zellen. Yang und Kollegen konnten zusätzlich zeigen, dass körperweiter DJ-1 Knock-out für Fliegen letal war. Selektives Ausschalten des *DJ-1*-Gens nur im Fliegenauge konnte einen typischen Augenphänotyp hervorbringen. Dieser Phänotyp wurde dann mittels verschiedener Signaltransduktionskaskaden versucht zu heilen, wobei Stimulation des Akt-Signalwegs erfolgreich war (Yang et al., 2005) (vgl. Kapitel 1.5.6).

In dieser Arbeit konnte in DJ-1 Knock-out-MEF-Zellen nach Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine erhöhte Phosphorylierung an der Stelle T308 im Akt-Protein festgestellt werden, wenn die Zellen mit [wt]DJ-1 transfiziert wurden. Während die G-Helix-brechenden Mutanten keine oder nur wenig Phosphorylierung zeigten, wurde in Zellen, die mit [L166E]DJ-1 und [V169I]DJ-1 transfiziert waren, eine Akt-Phosphorylierung auf wt-Niveau detektiert (vgl. Abbildung 54B). Eine erhöhte Akt-Phosphorylierung in [wt]DJ-1 transfizierten Zellen und den nicht destabilisierenden Mutanten im Gegensatz zu den G-Helix-brechenden Mutanten konnte auch in Insulin-stimulierten Zellen gezeigt werden (vgl. Abbildung 53).

Es gibt zwei entscheidende Phosphorylierungsstellen im Akt-Protein, T308 in der Kinasedomäne und S473 in der regulativen Domäne (Alessi et al., 1996). T308 wird von der PDK1 phosphoryliert (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1997). Die Phosphorylierung an T308 erfolgt in einer flexiblen T-Schleife der Kinasedomäne, nahe des katalytischen Zentrums. Die Phosphorylierung der T-Schleife ähnelt der Phosphorylierung in vielen AGC-Kinasen (Proteinkinase A (PKA), G (PKG) und C (PKC)). Wenn die T-Schleife phosphoryliert wird, schwingt sie vom aktiven Zentrum weg und macht den Weg frei für ATP und Substrat (Toker et al., 2000). Dabei ist ein entscheidender Schritt, dass Akt mit seiner N-terminalen Pleckstrin-homologen (PH)-Domäne an die Plasmamembran-gebundene phosphorylierte Phosphatidyle bindet, um somit zytoplasmatisches Akt an die Membran zu relokalisieren und den Zugang für PDK1 zu ermöglichen (Franke et al., 1997), welches ebenso eine PH-Domäne besitzt. Der Phosphorylierungsmechanismus des S473 im hydrophoben Motiv der C-terminalen Domäne ist dagegen nicht so gut untersucht. Es wurde vorgeschlagen, dass entweder eine Autophosphorylierung (Toker et al., 2000) oder diverse Kinasen wie z. B. die Serinkinase Integrin-linked Kinase 1 (ILK-1) (Persad et al., 2000) oder MAPK-aktivierendes Protein (MAPKAP)-Kinase (Clifton et al., 1996) für die zweite Phosphorylierung verantwortlich sind, um den Akt-Signalweg zu

stimulieren. Neuste Publikationen gehen davon aus, dass es über die „mammalian target of rapamycin“ (mTOR)-Proteinkinase phosphoryliert wird, welche einen Komplex mit Rapamycin-insensitivem Partner von mTOR (Rictor) und „G-Protein  $\beta$ -subunit-like protein“ (G $\beta$ L) bildet (Bayascas et al., 2005; Sarbassov et al., 2005) (vgl. Abbildung 69). Die jeweiligen Phosphatasen, die die Akt-Phosphorylierung wieder eliminieren können, sind die Proteinphosphatase 2A (PP2A), die Okadasäure-sensitiv ist und die Stelle T308 dephosphoryliert, während die PH-Domäne Leucin-reiche repeat Protein Phosphatase (PHPLPP) die Stelle S473 dephosphoryliert (Gao et al., 2005). PHPLPP agiert Okadasäure-unabhängig und ist die einzige Proteinphosphatase, die eine PH-Domäne besitzt.



**Abbildung 69: Regulierung von Akt durch Kinasen und Phosphatasen**

Schematische Darstellung der Kinasen und Phosphatasen, die den Akt-Signaltransduktionsweg regulieren. PDK1 ist die Kinase, welche T308 phosphoryliert, während PP2A die Phosphatase darstellt, die die Phosphorylierung eliminiert. Der Komplex aus mTOR, Rictor, G $\beta$ L phosphoryliert die Stelle S473, während PHPLPP diese Phosphorylierung rückgängig macht.

Es stellt sich nun die Frage, an welcher Stelle DJ-1 die Akt-Phosphorylierung positiv beeinflusst. Da aus den Drosophila-Experimenten hervorging, dass DJ-1 ein Antagonist von PTEN ist (Kim et al., 2005a), wurde der Einfluss von DJ-1 auf PTEN zunächst untersucht. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die PTEN-Aktivität

## Diskussion

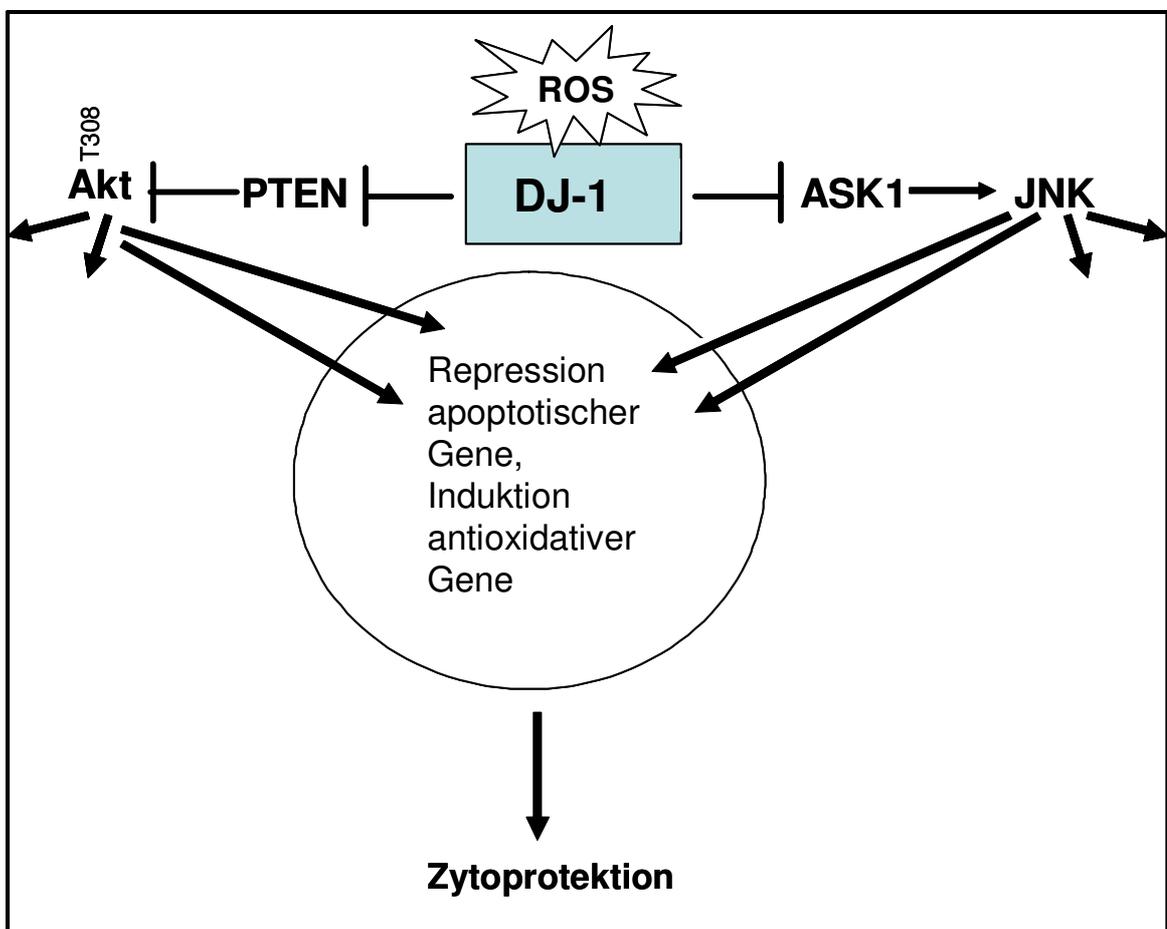
blockiert ist aufgrund der unter Kapitel 5.6.1.2, Abbildung 66 beschriebenen Disulfidbildung und durch eine erhöhte Phosphorylierung von Akt der „pro-survival“-Signaltransduktionsweg angeschaltet wird. Das Ganze geschieht aber nur in Anwesenheit von intaktem DJ-1. In Zellen, die mit den G-Helix-brechenden DJ-1-Mutanten transfiziert wurden, ist die Phosphorylierung unterdrückt. Damit stellt sich die Frage, ob es sich bei der Inaktivierung von PTEN um einen direkten Mechanismus von DJ-1 handelt, ähnlich einem gemischten Disulfid, oder ob dies eher indirekt passiert. Co-IP von endogenem PTEN oder einem Myc/PTEN-Konstrukt mit DJ-1/V5 waren erfolglos (Daten wurden nicht gezeigt). Ebenso konnte auch in Y2H-Studien keine eindeutige Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden (Daten wurden nicht gezeigt).

Durch den Shift-Assay, bei dem sowohl die oxidierte als auch reduzierte Form von PTEN in einem nicht-reduzierenden SDS-Gel aufgetrennt werden können (Lee et al., 2002; Leslie et al., 2003; Meng et al., 2002), sieht man in den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten DJ-1-Proben sowohl eine oxidierte untere als auch eine nicht oxidierte obere Bande (vgl. Abbildung 54A). Da beide Modifikationen von PTEN nachgewiesen wurden, lässt sich daraus schließen, dass DJ-1 wahrscheinlich kein direktes antioxidatives Enzym ist, da ansonsten die oxidierte PTEN-Bande von DJ-1 eliminiert sein müsste. Somit scheint DJ-1 einen indirekten Einfluss auf PTEN zu haben oder DJ-1 agiert weiter unterhalb der phosphorylierten Phosphoinositidlipiden und beeinflusst die Kinasen PDK1 und mTOR.

Der zweite Hinweis auf eine Beteiligung von DJ-1 in einem Signaltransduktionsweg kam von Junn und Kollegen (Junn et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass das Fehlen von DJ-1 nach oxidativer Behandlung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in neuronalen SH-SY5Y Zellen zu einer Aktivierung des pro-apoptischen Signaltransduktionswegs Ask-1 führte. Die in dieser Arbeit gezeigten *in vitro* Kinase-Experimente zeigten eine erhöhte Phosphorylierung von MBP, einem Substrat der Ask-1-Kinase, wenn die Zellen mit [L166P]DJ-1 transfiziert waren oder in DJ-1 Knock-out Zellen. Diese Phosphorylierung blieb in [wt]DJ-1 transfizierten Zellen aus. DJ-1 scheint Ask-1-Aktivierung zu verhindern, indem es an Daxx bindet und dieses an einer Translokation aus dem Kern hindert. In Y2H-Studien und Co-IP konnte eine Interaktion von DJ-1 und Daxx in der oben genannten Publikation gezeigt werden.

In dieser Arbeit wurde in den DJ-1 Knock-out-MEF-Zellen, die mit [wt]DJ-1, [V169I]DJ-1 oder [L166E]DJ-1 transfiziert wurden, in demselben *in vitro* Kinasesystem ebenfalls eine Reduktion an Ask-1-Aktivität im Gegensatz zu [L166P]DJ-1 und [V169P]DJ-1 transfizierten Zellen festgestellt (vgl. Abbildung 55). Anders als in den SH-SY5Y

transfizierten Zellen (Junn et al., 2005) wurde jedoch eine direkte Interaktion von DJ-1 mit Ask-1 detektiert (vgl. Abbildung 55). Außerdem war die Interaktion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Zellen in Anwesenheit von DJ-1 stärker als in nicht induzierten Zellen. Dabei scheint Ask-1, welches durch Trx oder Grx inaktiviert ist, nach der Oxidation dieser Redoxenzyme die JNK-Kinase zu aktivieren (vgl. Abbildung 68). Diese Ergebnisse deuten erneut darauf hin, dass DJ-1 eine indirekte Schutzfunktion einnimmt und die Aktivierung von proapoptischen Genen unterdrückt. Der Einfluss von DJ-1 sowohl im „pro-survival“-Akt-Signalweg unter leichten Stressbedingungen als auch im pro-apoptischen Ask-1-Transduktionsweg bei hohem oxidativem Stress wird in der folgenden Abbildung abschließend zusammengefasst (vgl. Abbildung 70).



**Abbildung 70: Schematische Darstellung des Einflusses von DJ-1 im Akt- und Ask-1-Signalweg**

Schematische Darstellung des anti-apoptischen Signalwegs Akt und der Inaktivierung von PTEN, der von DJ-1 bei leichtem oxidativem Stress beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu wird der Ask-1-Signalweg bei erhöhtem oxidativem Stress angeschaltet, wenn DJ-1 fehlt oder im Falle der instabilen Mutante L166P. Beide Signalwege induzieren antioxidative Gene und reprimieren apoptotische Gene, was am Ende zum Zellüberleben führt.

Die schützende Funktion von DJ-1 scheint also abhängig von der Stärke des oxidativen Stresses zu sein. Bei leichtem oxidativem Stress werden Cysteine und Methionine

reversibel zu Sulfensäuren (Cys-SOH oder Met-SOH) oxidiert (Choi et al., 2006), und DJ-1 kann als feiner Redoxsensor agieren. Dabei kann DJ-1 den Akt-Weg induzieren, antioxidative Gene anschalten und den Ask-1-Signaltransduktionsweg reprimieren. Bei hohem oxidativem Stress werden die Cysteine und Methionine von DJ-1 irreversibel zu Sulfin- oder Sulfonsäuren oxidiert (Cys-SO<sub>n</sub> und Met-SO<sub>n</sub>), und der Redoxsensor ist inaktiv. Somit können durch oxidativen Stress induzierte Prozesse wie mitochondriale Fehlfunktionen, Ausfall des UPS und Anreicherung fehlgefalteter und toxischer Proteine in Gang gesetzt werden, welche typischerweise mit der PK assoziiert sind. Der Oxidationszustand von DJ-1 könnte einen Marker für die PK oder andere durch überhöhten oxidativen Stress induzierte Krankheiten darstellen.

### 5.6.2 Funktion von DJ-1 im Zellkern

Niki und Takahashi und Kollegen konnten zeigen, dass DJ-1 die Aktivität des Androgenrezeptors (AR) positiv reguliert (Niki et al., 2003a; Takahashi et al., 2001b). Dabei wurde ein DJ-1-Bindungsprotein (DJBP) mit Hilfe von Y2H-Studien gefunden, welches an den AR bindet und dessen Aktivität reduziert. DJ-1 kann jedoch diese Repression aufheben und die AR-Aktivität zum Teil wieder herstellen, was mit Hilfe von Luciferase-Assays und Co-IP von Niki und Kollegen gezeigt werden konnte. DJBP rekrutiert dabei den Co-Repressorkomplex aus Histon-Deacetylase (HDAC) und mSin3. HDAC ist ein Enzym, welches Acylgruppen von Histonen entfernt, damit diese an DNA binden können und deren Gentranskription inhibieren. mSin3 induziert die Aktivität von HDAC. Dieselbe Gruppe konnte weiterhin in ihrem Y2H-Screen PIASx- $\alpha$ , einen Modulator des AR und eine E3-Ligase bei der Sumoylierung (vgl. Kapitel 1.5.5), als ein weiteres DJ-1-Bindungsprotein identifizieren (Takahashi et al., 2001b). Dabei wurde in Co-IP-Studien eine direkte Interaktion von DJ-1 mit PIASx- $\alpha$  an der AR-Bindungsseite von PIASx- $\alpha$  detektiert. PIASx- $\alpha$  ist an sumoylierungsabhängigen Prozessen beteiligt, indem es ähnlich wie bei ubiquitinierungsabhängigen Prozessen im UPS kleine SUMO-Proteine auf Lysine transferiert. Da DJ-1 durch Bindung an PIASx- $\alpha$  den AR positiv beeinflusst, lag die Vermutung nahe, dass dieser Prozess sumoylierungsabhängig stattfindet. Es wurde aus dieser Überlegung heraus eine DJ-1-Mutante K130R angefertigt, welche an der vermuteten Sumoylierungsstelle Lysin-130 ein Arginin trägt. Dieses Konstrukt konnte die Bindung zwischen AR und PIASx- $\alpha$  nicht trennen, während [wt]DJ-1 konzentrationsabhängig eine komplette Dissoziation des AR-Komplexes bewirkte. In den

## Diskussion

Luciferase-Assays war die AR-Aktivität in cotransfizierten [K130R]DJ-1-Zellen im Vergleich zu [wt]DJ-1 transfizierten Zellen erheblich reduziert.

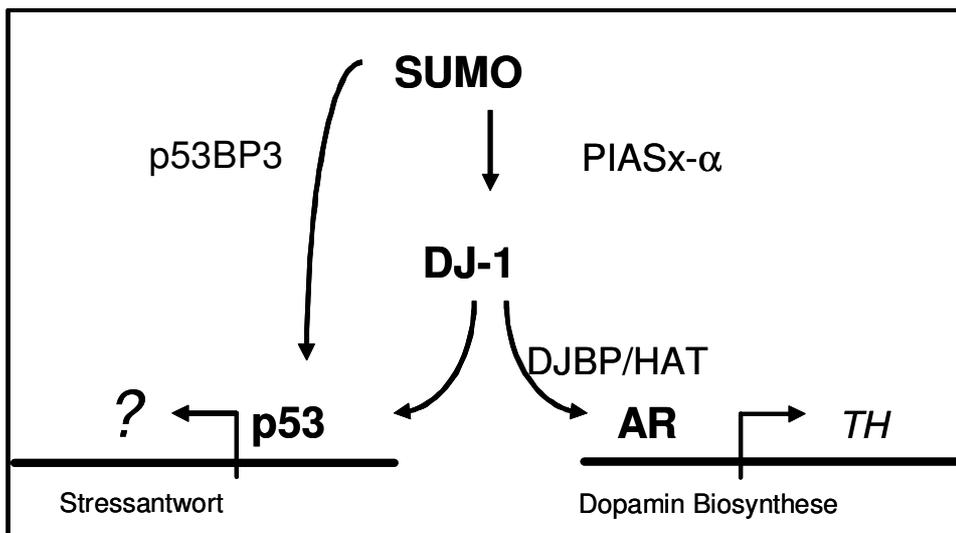
DJ-1 scheint also auch eine Funktion im Zellkern zu haben, da es den AR durch transkriptionelle Regulation aktivieren kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HEK 293T-Zellen DJ-1 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Durch eine Co-Transfektion von DJ-1 mit PIAS $\alpha$  wurde eine erhöhte Lokalisation von DJ-1 im Zellkern festgestellt (vgl. Abbildung 59). Damit scheint PIAS $\alpha$  in seiner Funktion als E3-Ligase DJ-1 zu sumoylieren, so dass modifiziertes DJ-1 in den Zellkern gelangen kann. Es ist aus der Literatur bekannt, dass Sumoylierungen verschiedener Proteine zu einer Translokation in andere subzelluläre Bereiche bzw. zu einer Regulation transkriptioneller Prozesse führen können (Seeler et al., 2003). Allerdings war auch eine Colokalisation von [K130R]DJ-1 und PIAS $\alpha$  zu beobachten, so dass es möglicherweise noch eine andere Sumoylierungsstelle im DJ-1-Protein gibt, die für diese Translokation verantwortlich ist oder eine sumoylierungsunabhängige Translokation stattfindet. Zusätzlich konnte eine sehr schwache Sumoylierung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Allerdings war diese im Vergleich zu einer Positivkontrolle p53 sehr schwach ausgeprägt (vgl. Abbildung 57, Abbildung 58). Auch hier war eine Sumoylierung ebenso für die Mutante K130R zu detektieren. Diese Befunde stehen im direkten Widerspruch zu den Daten von Niki und Kollegen. Dieselbe Gruppe konnte zusätzlich noch zeigen, dass von allen 16 Lysinen des DJ-1-Proteins, die zu Argininen mutiert wurden, nur K130R nicht sumoyliert wurde (Shinbo et al., 2006). Allerdings ist weiterhin die Spezifität dieser Sumoylierung sehr fragwürdig, da sie sehr schwach ausgeprägt war und außerdem sehr schlecht in unserem Assay zu reproduzieren war. Möglicherweise waren die Bedingungen und das Zellsystem nicht ideal gewählt.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine sumoylierungsabhängige Translokation von DJ-1 in den Zellkern und eine Bindung an PIAS $\alpha$  zu einer Aktivierung der AR führt. Diese Aktivität führt zu einer erhöhten Transkription des TH-Gens (Jeong et al., 2005). TH ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Dopaminbiosynthese. Die Dopaminsynthese ist bei Parkinsonpatienten erheblich gestört, was schließlich zu Bewegungsstörungen und den typischen Kardinalsymptomen führt. Dabei ist eine intakte TH-Funktion von entscheidender Wichtigkeit und scheint bei einer Fehlfunktion von DJ-1 stark beeinträchtigt zu sein.

DJ-1 scheint nicht nur den AR positiv zu regulieren (Takahashi et al., 2001b), sondern auch die Transkription des Tumorsuppressors p53. In dem oben erwähnten Y2H-Screen wurde TOPORS gefunden, ein Protein, welches auch unter dem Namen p53-Bindungsprotein (p53BP) bekannt ist und sowohl p53 als auch Topoisomerase I bindet. Nach UV-Bestrahlung wurde eine erhöhte Co-Lokalisation von DJ-1 und p53 festgestellt, die mit einer erhöhten Sumoylierung einherging. P53 bindet an TOPORS, wird sumoyliert und ist inaktiv. Durch Bindung von DJ-1 an p53 wird p53 aus dem TOPORS-Komplex befreit und seine transkriptionelle Aktivität angeschaltet (Shinbo et al., 2005).

Damit gibt es zwei verschiedene sumoylierungsabhängige Prozesse, bei denen DJ-1 die transkriptionelle Aktivität von zwei verschiedenen Genen aktiviert. DJ-1 wird dabei sumoylierungsabhängig in den Kern transportiert und aktiviert entweder p53 als Folge einer oxidativen Stressantwort oder den AR, was TH-Expression hervorruft und zur Biosynthese von Dopamin wichtig ist. Diese Fähigkeiten von DJ-1 in der transkriptionellen Modulation werden in der folgenden Abbildung noch einmal zusammenfassend dargestellt (vgl. Abbildung 71).



**Abbildung 71: DJ-1 als Modulator in SUMO-abhängigen transkriptionellen Prozessen**

Schematische Darstellung von DJ-1, welches über SUMO-Modifikationen in den Kern gelangt und dort durch Bindung an p53 oder PIASx- $\alpha$  die transkriptionellen Prozesse reguliert. Dabei werden entweder Gene der Stressantwort transkribiert durch Aktivierung von p53 oder TH durch Aktivierung des AR.

### 5.6.3 Mitochondriale Funktion von DJ-1

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass eine kleine Fraktion von DJ-1 in Mitochondrien lokalisiert ist. Allerdings gilt dies sowohl für [wt]DJ-1 als auch für die pathogenen Mutanten und Polymorphismen [L166P]DJ-1, [M26I]DJ-1, [R98Q]DJ-1, [D149A]DJ-1 und [A104T]DJ-1 (Blackinton et al., 2005; Zhang et al., 2005). Sowohl in

## Diskussion

IF-Studien als auch in subzellulären Fraktionierungen wurde DJ-1 zu einem geringen Anteil (ca. 10%) in Mitochondrien detektiert (Miller et al., 2003). Li und Kollegen konnten sogar zeigen, dass DJ-1 mit dem mitochondrialen Chaperon Hsp70 comigriert und nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung eine erhöhte Lokalisation von [wt]DJ-1 in den Mitochondrien zu finden ist (Li et al., 2005). Bonifati und Kollegen konnten jedoch nur für L166P eine mitochondriale Lokalisierung in den Mitochondrien finden (Bonifati et al., 2003b). In dieser Arbeit konnte keine ausgeprägte Lokalisierung von DJ-1 in Mitochondrien beobachtet werden (vgl. Abbildung 20). Dies kann zum einen daran liegen, dass der Anteil von mitochondrial gebundenem DJ-1 unter der Detektionsgrenze lag, zum anderen könnte es in verschiedenen Zelltypen auch Unterschiede in der subzellulären Verteilung geben.

Bei erhöhtem oxidativen Stress erhöhte sich die subzelluläre Verteilung von DJ-1 und seinen Mutanten in den Mitochondrien um das Drei- bis Vierfache (Blackinton et al., 2005). Es wurde beschrieben, dass vor allen Dingen die Oxidationsstufen der drei Cysteine des DJ-1-Proteins von besonderer Bedeutung waren. Die beiden Cysteine-53 und -46, die zu Alaninen mutiert wurden, zeigten dabei eine ähnlich erhöhte Translokation in Mitochondrien bei erhöhtem oxidativen Stress, während C106A weder unter nicht-oxidierenden noch unter oxidierenden Bedingungen in den Mitochondrien lokalisiert war (Canet-Aviles et al., 2004). Auch die antioxidative Wirkung der C106A-Mutante war im Vergleich zu [wt]DJ-1 deutlich gesenkt und ebenso gering wie die der pathogenen Mutante L166P (Takahashi-Niki et al., 2004). Somit ist wahrscheinlich das Cystein-106, welches Teil des möglichen katalytischen Zentrums von DJ-1 ist, das Cystein, welches ROS eliminieren und die Zelle vor zu großem oxidativen Stress schützen kann. Eine erhöhte Oxidation an der Stelle C106 im Vergleich zu C46 und C53 konnte auch durch Massenspektrometriedaten von Kinumi und Kollegen (Kinumi et al., 2004) belegt werden. Ein weiterer Hinweis darauf, dass DJ-1 eine wichtige Rolle in der Fehlfunktion von Mitochondrien spielt, ergibt sich aus den DJ-1 Knock-out-Mäusen. Diese zeigen erst nach MPTP-Behandlung eine höhere Sensitivität auf dessen toxische Wirkung im Vergleich zu Kontrollmäusen (Kim et al., 2005b). Ebenso konnte in der mit Mitochondrien angereicherten Fraktion der SN von MPTP behandelten Mäusen eine erhöhte Lokalisation von DJ-1 in den Mitochondrien festgestellt werden (Jin et al., 2005).

Diese Befunde sprechen dafür, dass DJ-1 eine physiologische Rolle in den Mitochondrien als Radikalfänger einnimmt, um das Gleichgewicht der ROS aufrecht zu erhalten. Wenn der protektive Effekt von DJ-1 aber fehlt, dann findet eine Akkumulation der ROS in den Mitochondrien statt, so dass diese verletzbar sind bzw. so stark in ihrer Funktion gestört

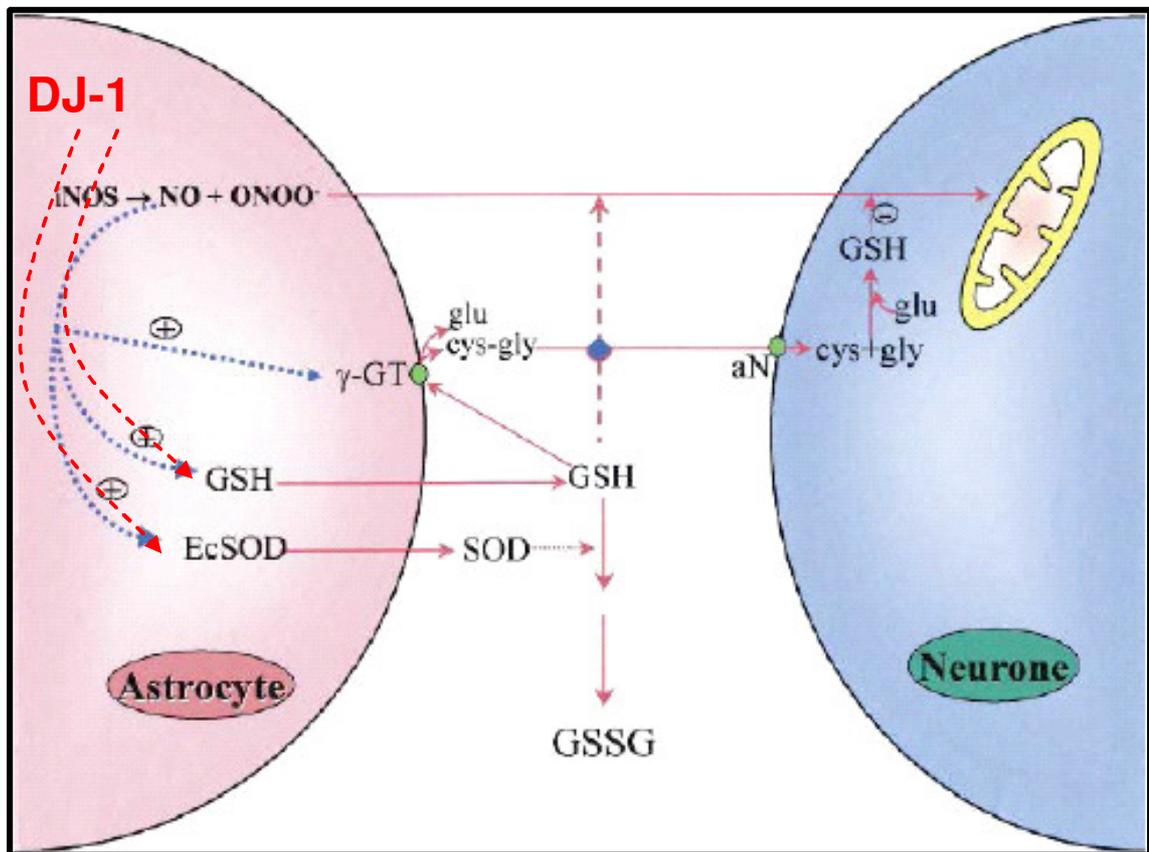
werden, dass ein irreversibler Prozess in Gang gesetzt wird, der zum Zelltod führt und im Parkinsonpatienten ein vermehrtes Sterben dopaminerger Neuronen verursacht.

### ***5.7 Relevanz der Charakterisierung von DJ-1 für die PK und andere Erkrankungen***

Da erhöhter oxidativer Stress nicht nur in der PK von Bedeutung ist, sondern auch für Krankheiten wie Krebs, Arteriosklerose, Diabetes, Ischämie und neurodegenerative Erkrankungen im allgemeinen eine Rolle spielt, ist die zytoprotektive Eigenschaft von DJ-1 auch dort wichtig. Ganz allgemein scheint das Alter einen erhöhten Risikofaktor für viele der oben genannten Krankheiten zu spielen, da gerade bei älteren Menschen sich mehr ROS ansammeln, so dass die Abwehrsysteme aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Redoxsystemen stark belastet oder überfordert sind und das sensible Gleichgewicht aus ROS-Produktion und -Vernichtung erheblich gestört ist (Finkel et al., 2000; Martindale et al., 2002). Gerade in diesem Zusammenhang ist es besonders wichtig, möglichst intakte und gut funktionierende Abwehrsysteme zu haben, die eine Oxidation von DNA, RNA und Lipiden verhindern können. Dabei könnte DJ-1 eine ganz entscheidende Rolle einnehmen. Aus immunohistologischen Untersuchungen an Hirnen von Parkinson- und Hirn Schlagpatienten konnte eine erhöhte DJ-1-Lokalisation in Astrozyten festgestellt werden, die wegen ihrer ausgeprägten sternförmigen Morphologie reaktive Astrozyten genannt werden (Bandopadhyay et al., 2004; Neumann et al., 2004). Reaktive Astrozyten üben im Gegensatz zu den stützenden Astrozyten eine Schutzfunktion gegenüber den benachbarten Neuronen aus und verteidigen diese gegen erhöhten oxidativen Stress. DJ-1 ist zwar nicht in LK, dem typischen pathologischen Merkmal der PK, nachweisbar, aber in neuronalen Tau-Einschlüssen von post-mortem-Hirnen von Patienten mit Pick'scher Krankheit und der Alzheimer'schen Krankheit sowie in glialen Einschlüssen von Hirnen von Patienten mit MSA und der Pick'schen Krankheit. Im Gegensatz zu DJ-1 ist  $\alpha$ -Synuclein hauptsächlich in LK angereichert. Die Tatsache, dass DJ-1 hauptsächlich in Astrozyten anzutreffen ist und nicht nur in der PK, sondern auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen sowie der Ischämie, lässt den Schluss zu, dass der Schutzmechanismus von DJ-1 überall dort ausgeführt werden kann, wo es zu einer übermäßigen Produktion oder Ansammlung von ROS kommt.

Es ist bekannt, dass Astrozyten neuroprotektive Funktionen ausüben, um die benachbarten Neuronen vor erhöhtem oxidativen Stress zu schützen. Dabei spielt das nicht-enzymatische Tripeptid GSH eine entscheidende Rolle, indem es bei erhöhter Stickoxidproduktion die

Glutathionproduktion erhöht. Dieses gelangt verstärkt in dem intrazellulären Raum, wird von den Neuronen aufgenommen und zur Verteidigung gegen verstärkte Angriffe von ROS eingesetzt. Gleichzeitig wird auch die Produktion an SOD3 erhöht, die die Oxidation von GSH zu oxidiertem Glutathion (GSSG) verhindern soll, welches nicht von den Neuronen aufgenommen werden kann (Heales et al., 2004) (vgl. Abbildung 72).



**Abbildung 72: Schematische Darstellung der Funktion von reaktiven Astrozyten**

Eine erhöhte Menge an Stickstoffoxid bei erhöhtem oxidativem Stress führt zu einer Steigerung der GSH-, SOD3- und  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT)-Expression, einem Enzym zum Transport von GSH in den extrazellulären Raum. SOD3 verhindert eine erhöhte Oxidation von GSH zu GSSG, so dass möglichst viel GSH in Neurone durch die Aminopeptidase (aN) transportiert werden kann, wo es zur Eliminierung der erhöhten ROS als Verteidigungsmechanismus benutzt wird. DJ-1 ist in reaktiven Astrozyten in erhöhten Mengen zu finden und scheint dort eine wichtige Rolle im GSH-Transport zu spielen (Heales et al., 2004).

Hier spielen erneut wieder sensible Redoxsysteme eine große Rolle. Auch DJ-1 scheint beteiligt an diesem Verteidigungsmechanismus und ist vermutlich in der Lage, diese Verteidigungsmaschinerie entscheidend zu beeinflussen und ebenfalls die SOD3- und GSH-Produktion zu erhöhen.

Einen direkten Einfluss von DJ-1 auf die GSH-Produktion in neuronalen Zellen und primären dopaminergen Neuronen konnten Zhou und Kollegen erstmals feststellen (Zhou et al., 2005). Sie transduzierten dopaminerge Zellen mit adenoviralem [wt]DJ-1,

## Diskussion

[L166P]DJ-1 und einem Knock-out-Konstrukt und konnten nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine erhöhte Menge an Glutamat-Cystein-Ligase (GCL), einem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der GSH-Synthese, in der RT-PCR detektieren.

In Vorversuchen wurde RNA aus Hirnen von DJ-1 Knock-out-Mäusen, die mittels des GeneTrap-Verfahrens hergestellt worden waren (vgl. Abbildung 46), isoliert und ebenfalls auf Unterschiede in der Expression von verschiedenen Redoxsystemen untersucht. Dabei wurden 2 Monate alte DJ-1 Knock-out-Mäuse mit 12 Monate alten und junge gleichaltrige Kontrollmäuse mit älteren Mäusen verglichen. Es zeigte sich dort, dass die Expression von mitochondrialem SOD2-Enzym in den älteren Kontrollmäusen deutlich höher exprimiert war als in entsprechenden jüngeren und den Knock-out-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Generell war die Expression von Prx4, Trx2 und Gprx2 in den älteren Mäusen höher als in den jeweils jüngeren Tieren. Dort spiegelt sich erneut wider, dass es im Alter zu erhöhtem oxidativen Stress kommt und damit die Redoxsysteme besonders intensiv arbeiten müssen. Abschließend kann man festhalten, dass DJ-1 nicht nur in der PK von Bedeutung ist, sondern einen ganz allgemeinen Verteidigungsmechanismus ausübt, der in beschädigtem Hirngewebe zum Tragen kommt und sowohl beim Hirnschlag als auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie auch im Alter immer wichtiger wird. Ein Fehlen von DJ-1 kann zu einem Ungleichgewicht des sehr sensiblen Redoxsystems führen, was zur Folge hat, dass erhöhter oxidativer Stress auftritt und sowohl der mitochondriale Weg als auch das UPS gestört ist, was letztlich zum erhöhten Zelltod führen kann.

## 6. Ausblick

DJ-1 ist ubiquitär exprimiert und scheint je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen auszuüben. Dabei ist die Integrität der DJ-1-Struktur Voraussetzung für eine vollständige Funktionsausübung. Bei einem Fehlen von DJ-1 im Falle von L166P, dessen Expression erheblich reduziert ist, können vermutlich sumoylierungsabhängige Prozesse wie die Kerntranslokation und Aktivierung von AR und p53 und oxidationsabhängige Prozesse wie die Zytoprotektion und die Aktivierung oder Inhibierung von Signaltransduktionskaskaden nicht stattfinden. Daher ist eine detailliertere Untersuchung sowohl der Struktur als auch der Funktion von DJ-1 von enormer Bedeutung.

In dem C-terminalen Helix-Knick-Helix Motiv kommt es offensichtlich durch die Helix-brechende AS Prolin nur in der G-Helix zu einer solchen konformationellen Veränderung, dass keine Dimerisierung mehr stattfinden kann. Das gleiche trifft auch für das Fehlen des Knicks mit den AS Asparagin-173 und Glycin-174 zu. Leider konnte bisher nur für wt bzw. E64D gezeigt werden, dass sich der Anteil an  $\alpha$ -Helix verringert und die Knäuel-Formation bei einer schrittweisen Temperaturerhöhung bei 55°C ansteigt. Es ist jedoch nicht klar, wie sich die tertiäre und quartäre Struktur der C-terminalen DJ-1-Mutanten verändert, da L166P auch in Bakterien nicht stabil exprimiert werden kann. Damit war eine vollständige Strukturaufklärung dieser Mutante nicht durchführbar. Daher wurde versucht, dieses Problem mittels dreifach-isotopenmarkiertem rekombinatem [wt]DJ-1 anzugehen, und die dynamische Struktur von DJ-1 insbesondere des C-Terminus mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Methoden, durchgeführt von Jochen Klages (Arbeitskreis Prof. Kessler, TU München), aufzuklären. Dabei besteht die Vermutung darin, dass man bei einer entsprechenden Temperaturerhöhung eine dynamische Strukturänderung von flexibleren und weniger flexiblen Teilen der Struktur unterscheiden könnte. Eine dynamische Untersuchung könnte weiter Aufschluss darüber geben, ob dabei das mögliche aktive Zentrum frei zugänglich ist oder ob hydrophobe Seitenketten frei gelegt werden, so dass das Protein verstärkt mit Chaperonen wechselwirken kann und dem UPS zugeführt wird. DJ-1 hat jedoch insgesamt einen hohen Anteil an hydrophoben Seitenketten, was die Zuordnung der einzelnen AS bei der Auswertung der NMR-Spektren erheblich erschwerte und die Studien deshalb noch andauern lässt.

Ein besseres Verständnis der strukturellen Zusammenhänge könnte weiter Aufschluss über die genaue Funktion von DJ-1 geben. Es scheint durch oxidative Prozesse aktiviert zu werden und dort Schutzfunktionen auszuüben. Allerdings ist es wohl kein direktes

antioxidatives Agens, da zum einen seine Cysteine zum Teil irreversibel oxidiert werden (Wilson et al., 2003a), zum anderen scheint es andere antioxidative Verteidigungssysteme in dopaminergen Zellen zu aktivieren wie z. B. GSH (Zhou et al., 2005). Diese Untersuchungen sollten nicht nur in der Zellkultur, sondern auch in post-mortem-Hirnen von Parkinsonpatienten durchgeführt werden. Da DJ-1 in reaktiven Astrozyten von Parkinsonpatienten in erhöhten Mengen zu finden ist (Neumann et al., 2004), wäre es interessant, den Schutzmechanismus von DJ-1 detaillierter zu charakterisieren. Mit Hilfe von Genarrays könnte man verschiedene Gene, die in der oxidativen Stressantwort involviert sind, auf deren Aktivierung untersuchen. Eine unterschiedliche Expression von antioxidativen Genen in kranken und gesunden Patienten könnte weiter Aufschluss geben, wie der molekulare Mechanismus von DJ-1 in reaktiven Astrozyten aussieht. In ersten preliminären semiquantitativen RT-PCR-Studien von RNA aus DJ-1 Knock-out-Mäusen konnte festgestellt werden, dass das mitochondriale antioxidative Genprodukt SOD2 in 12 Monate alten Kontrollmäusen höher exprimiert ist als in gleichaltrigen DJ-1 Knock-out-Maushirnen. Dieser Befund deutet daraufhin, dass die Verteidigungssysteme durch ein Fehlen von DJ-1 gestört sind und somit ein erhöhtes Sterben von Neuronen stattfinden kann. Der Redoxstatus von DJ-1 und seiner drei Cysteine sowie auch einiger Methionine (Choi et al., 2006) könnten dabei sehr wichtig für die Aktivität von DJ-1 sein. DJ-1 scheint als zytoprotektives Protein vor allen Dingen in den (pro)-apoptotischen Signaltransduktionskaskaden erst nach oxidativer Stressinduktion aktiviert zu werden. Je nach Stärke und Dauer des Stresses hat DJ-1 Einfluss auf die „pro-survival“-Akt-Signalkaskade bei schwachem oxidativen Stress oder den apoptotischen Ask-1-Signalweg bei hohem oxidativen Stress. Die Oxidationsstufen von DJ-1 müssten weiter untersucht werden und der Einfluss von DJ-1 in der Apoptose aufgeklärt werden, um dies als möglichen allgemeinen Marker für oxidativen Stress in der Zelle heranziehen zu können. Ein detaillierter Einblick in die Funktion von DJ-1 in der Apoptose und oxidativen Stressantwort könnte sehr hilfreich nicht nur in der PK, sondern auch bei Schlaganfall, Diabetes, Arteriosklerose und Krebs sein; Krankheiten, die mit erhöhtem oxidativen Stress und Zellsterben einhergehen. In der Krebsforschung ist DJ-1 als Protoonkogen schon länger bekannt. Ursprünglich wurde DJ-1 als Protoonkogen gefunden (Nagakubo et al., 1997), wobei es NIH3T3 Zellen in Kooperation mit H-Ras transformiert. Es wurde weiterhin als negativer Regulator von PTEN, einem Tumorsuppressor und Phosphatase im Akt-Signalweg, als möglicher diagnostischer Marker für Lungenkrebs identifiziert (Kim et al., 2005a).

## Ausblick

Aufgrund dieser vielseitigen funktionellen Eigenschaften von DJ-1 in den unterschiedlichsten zellulären Bereichen und seines Einflusses in verschiedenen Krankheiten ist es von großer Wichtigkeit, sowohl die exakten funktionellen Zusammenhänge aufzuklären als auch seine Einsetzbarkeit als Marker in der Krebsdiagnostik genauer zu untersuchen bzw. einen möglichen therapeutischen Ansatz in der oxidativen Stressantwort zu finden.

## 7. Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde DJ-1 erstmals mit der PK in Zusammenhang gebracht. Die ersten Studien zeigten, dass L166P, eine Punktmutation im C-Terminus des DJ-1-Proteins, und eine Deletion von Exon 1-5 zu den Mutationen gehören, die zu den motorischen Fehlfunktionen, den Kardinalsymptomen, im Parkinsonpatienten führen.

Diese Arbeit konnte dazu beitragen die Funktion von DJ-1 besser zu verstehen bzw. die Auswirkungen des Fehlens von DJ-1 aufzudecken. Es stellte sich heraus, dass die Expression von L166P im Vergleich zu [wt]DJ-1 sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten stark reduziert war. Die stark verminderte Proteinexpression kann entweder durch eine erhöhte Instabilität der RNA, durch eine Störung in der Proteinsynthese oder einen beschleunigten Abbau hervorgerufen werden. Durch semiquantitative RT-PCR- und quantitative RT-PCR-Experimente konnten Instabilitäten der RNA ausgeschlossen werden. Eine ineffektive Translation konnte durch „Pulse-Chase“-Experimente und CHX-Inhibitorstudien ebenso entkräftet werden. Allerdings scheint ein gesteigerter Abbau von [L166P]DJ-1 verantwortlich für dessen reduzierte Expression zu sein. Die Art des beschleunigten Abbaus konnte zwar nicht zweifelsfrei geklärt werden, aber es zeigte sich, dass ein Zusammenhang zwischen der Stabilität und der Struktur von DJ-1 besteht. Dabei spielt die C-terminale Domäne eine große Rolle, die nur im DJ-1-Protein als signifikante Helix-Knick-Helix Struktur vorhanden ist, nicht aber unter seinen Strukturhomologen. In einer Mutagenesestudie konnte gezeigt werden, dass im Helix-Knick-Helix Motiv nicht nur die PK-assoziierte Mutante L166P, sondern auch die Helix-brechende Mutante V169P in derselben Helix (G-Helix) und eine Deletion am Knick des Motivs ( $\Delta$ N173/G174) eine Destabilisierung von DJ-1 bewirken konnte. Helix-brechende Mutationen in der H-Helix zeigten keine verminderte Proteinexpression im Vergleich zu [wt]DJ-1. Die G-Helix-brechenden Mutanten scheinen das Protein konformationell so zu verändern, dass keine Dimerisierung mehr möglich ist, was aus Co-IP Studien hervorging. Das Helix-Knick-Helix Motiv, welches einen Großteil der Dimerberührungsfläche ausmacht, scheint bei der Dimerisierung eine entscheidende Rolle einzunehmen. Weiterhin konnte ein direkter Zusammenhang der Stabilität und Integrität von DJ-1 und seiner Funktion herausgearbeitet werden. Dabei sind die G-Helix-brechenden Mutanten unter oxidativem Stress weniger zytoprotektiv und können in (anti)-apoptotischen Signalwegen eine Expression von apoptotischen Genen nicht verhindern. Diese Prozesse sind abhängig vom oxidativen

## Zusammenfassung

Stress und von der Fähigkeit von redox-sensitivem DJ-1 als Intermediator in apoptotischen Signalwegen antioxidative Gene zu aktivieren.

Diese Erkenntnis ist vor allen Dingen in reaktiven Astrozyten von Wichtigkeit, die Neurone, in Parkinsonpatienten besonders die dopaminergen Neurone, vor oxidativem Stress schützen können. In reaktiven Astrozyten ist DJ-1 in großen Mengen lokalisiert und scheint die Aktivierung von Verteidigungssystemen wie GSH zu beeinflussen. Somit ist DJ-1 ein wichtiger Marker für erhöhten oxidativen Stress, nicht nur in der PK, sondern auch bei Schlaganfallpatienten. Eine erhöhte Produktion von DJ-1 würde einen größeren Schutz vor neuronalem Sterben bewirken, so dass dies auch therapeutische Möglichkeiten eröffnen könnte.

## 8. Literatur

- Abeliovich, A., Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W.H. Ho, P.E. Castillo, N. Shinsky, J.M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, und A. Rosenthal. 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 25:239-52.
- Abou-Sleiman, P.M., D.G. Healy, N. Quinn, A.J. Lees, und N.W. Wood. 2003. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 54:283-6.
- Abou-Sleiman, P.M., D.G. Healy, und N.W. Wood. 2004. Causes of Parkinson's disease: genetics of DJ-1. *Cell Tissue Res*. 318:185-8.
- Alessi, D.R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, und B.A. Hemmings. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J*. 15:6541-51.
- Alessi, D.R., S.R. James, C.P. Downes, A.B. Holmes, P.R. Gaffney, C.B. Reese, und P. Cohen. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. 7:261-9.
- Bandmann, O. 2004. DJ-1: the second gene for early onset Parkinson disease. *Neurology*. 62:357-8.
- Bandopadhyay, R., A.E. Kingsbury, M.R. Cookson, A.R. Reid, I.M. Evans, A.D. Hope, A.M. Pittman, T. Lashley, R. Canet-Aviles, D.W. Miller, C. McLendon, C. Strand, A.J. Leonard, P.M. Abou-Sleiman, D.G. Healy, H. Ariga, N.W. Wood, R. de Silva, T. Revesz, J.A. Hardy, und A.J. Lees. 2004. The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain*. 127:420-30.
- Baulac, S., M.J. LaVoie, J. Strahle, M.G. Schlossmacher, und W. Xia. 2004. Dimerization of Parkinson's disease-causing DJ-1 and formation of high molecular weight complexes in human brain. *Mol Cell Neurosci*. 27:236-46.
- Bayascas, J.R., und D.R. Alessi. 2005. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell*. 18:143-5.
- Beilina, A., M. Van Der Brug, R. Ahmad, S. Kesavapany, D.W. Miller, G.A. Petsko, und M.R. Cookson. 2005. Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:5703-8.
- Betarbet, R., T.B. Sherer, und J.T. Greenamyre. 2002. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 24:308-18.
- Betarbet, R., T.B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A.V. Panov, und J.T. Greenamyre. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 3:1301-6.
- Blackinton, J., R. Ahmad, D.W. Miller, M.P. van der Brug, R.M. Canet-Aviles, S.M. Hague, M. Kaleem, und M.R. Cookson. 2005. Effects of DJ-1 mutations and polymorphisms on protein stability and subcellular localization. *Brain Res Mol Brain Res*. 134:76-83.
- Bloem, B.R., I. Irwin, O.J. Buruma, J. Haan, R.A. Roos, J.W. Tetrud, und J.W. Langston. 1990. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 97:273-93.
- Bodles, A.M., und G.B. Irvine. 2004. Alpha-synuclein aggregation. *Protein Pept Lett*. 11:271-9.
- Bonifati, V., P. Rizzu, F. Squitieri, E. Krieger, N. Vanacore, J.C. van Swieten, A. Brice, C.M. van Duijn, B. Oostra, G. Meco, und P. Heutink. 2003a. DJ-1 (PARK7), a

- novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci.* 24:159-60.
- Bonifati, V., P. Rizzu, M.J. van Baren, O. Schaap, G.J. Breedveld, E. Krieger, M.C. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joesse, J.W. van Dongen, N. Vanacore, J.C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C.M. van Duijn, B.A. Oostra, und P. Heutink. 2003b. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 299:256-9.
- Brummelkamp, T.R., R. Bernards, und R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296:550-3.
- Canet-Aviles, R.M., M.A. Wilson, D.W. Miller, R. Ahmad, C. McLendon, S. Bandyopadhyay, M.J. Baptista, D. Ringe, G.A. Petsko, und M.R. Cookson. 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.* 101:9103-8.
- Choi, J., M.C. Sullards, J.A. Olzmann, H.D. Rees, S.T. Weintraub, D.E. Bostwick, M. Gearing, A.I. Levey, L.S. Chin, und L. Li. 2006. Oxidative Damage of DJ-1 Is Linked to Sporadic Parkinson and Alzheimer Diseases. *J Biol Chem.* 281:10816-24.
- Choi, J.C., D. Park, und L.C. Griffith. 2004. Electrophysiological and morphological characterization of identified motor neurons in the *Drosophila* third instar larva central nervous system. *J Neurophysiol.* 91:2353-65.
- Clark, I.E., M.W. Dodson, C. Jiang, J.H. Cao, J.R. Huh, J.H. Seol, S.J. Yoo, B.A. Hay, und M. Guo. 2006. *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature.* 441:1162-6.
- Clifton, A.D., P.R. Young, und P. Cohen. 1996. A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett.* 392:209-14.
- Cookson, M.R. 2003a. Crystallizing ideas about Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:9111-9113.
- Cookson, M.R. 2003b. Pathways to Parkinsonism. *Neuron.* 37:7-10.
- Cookson, M.R. 2005. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem.* 74:29-52.
- Crowther, R.A., S.E. Daniel, und M. Goedert. 2000. Characterisation of isolated alpha-synuclein filaments from substantia nigra of Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett.* 292:128-30.
- Dauer, W., und S. Przedborski. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39:889-909.
- Dawson, T.M., und V.L. Dawson. 2003. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science.* 302:819-22.
- Day, B.J., M. Patel, L. Calavetta, L.Y. Chang, und J.S. Stamler. 1999. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12760-5.
- Deglon, N., und P. Aebischer. 2002. Lentiviruses as vectors for CNS diseases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 261:191-209.
- Dekker, M., V. Bonifati, J. Van Swieten, N. Leenders, R.J. Galjaard, P. Snijders, M. Horstink, P. Heutink, B. Oostra, und C. Van Duijn. 2003a. Clinical features and neuroimaging of PARK7-linked parkinsonism. *Mov Disord.* 18:751-7.
- Dekker, M.C., V. Bonifati, und C.M. van Duijn. 2003b. Parkinson's disease: piecing together a genetic jigsaw. *Brain.* 126:1722-33.

## Literatur

- Dekker, M.C., S.A. Eshuis, R.P. Maguire, L. Veenma-van der Duijn, J. Pruijm, P.J. Snijders, B.A. Oostra, C.M. van Duijn, und K.L. Leenders. 2004. PET neuroimaging and mutations in the DJ-1 gene. *J Neural Transm.* 111:1575-81.
- Dekker, M.C., J.C. van Swieten, J.J. Houwing-Duistermaat, P.J. Snijders, E. Boeren, A. Hofman, M.M. Breteler, P. Heutink, B.A. Oostra, und C.M. van Duijn. 2003c. A clinical-genetic study of Parkinson's disease in a genetically isolated community. *J Neurol.* 250:1056-62.
- Delaunay, A., A.D. Isnard, und M.B. Toledano. 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J.* 19:5157-66.
- Djaldetti, R., und E. Melamed. 2002. New drugs in the future treatment of Parkinson's disease. *J Neurol.* 249 Suppl 2:II30-5.
- Dong, Z., B. Ferger, J.C. Paterna, D. Vogel, S. Furler, M. Osinde, J. Feldon, und H. Bueler. 2003. Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:12438-43.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95.
- Du, X., I.G. Choi, R. Kim, W. Wang, J. Jancarik, H. Yokota, und S.H. Kim. 2000. Crystal structure of an intracellular protease from *Pyrococcus horikoshii* at 2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:14079-84.
- Eriksen, J.L., T.M. Dawson, D.W. Dickson, und L. Petrucelli. 2003. Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron.* 40:453-6.
- Feany, M.B., und W.W. Bender. 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature.* 404:394-398.
- Finkel, T. 2000. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476:52-4.
- Finkel, T., und N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408:239-47.
- Forman, M.S., V.M. Lee, und J.Q. Trojanowski. 2005. Nosology of Parkinson's disease: looking for the way out of a quagmire. *Neuron.* 47:479-82.
- Forno, L.S., J.W. Langston, L.E. DeLanney, I. Irwin, und G.A. Ricaurte. 1986. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol.* 20:449-55.
- Franke, T.F., D.R. Kaplan, L.C. Cantley, und A. Toker. 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science.* 275:665-8.
- Fujiwara, H., M. Hasegawa, N. Dohmae, A. Kawashima, E. Masliah, M.S. Goldberg, J. Shen, K. Takio, und T. Iwatsubo. 2002. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 4:160-4.
- Funayama, M., K. Hasegawa, H. Kowa, M. Saito, S. Tsuji, und F. Obata. 2002. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol.* 51:296-301.
- Gao, T., F. Furnari, und A.C. Newton. 2005. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.* 18:13-24.
- Gasser, T., B. Muller-Myhsok, Z.K. Wszolek, R. Oehlmann, D.B. Calne, V. Bonifati, B. Bereznoi, E. Fabrizio, P. Viegge, und R.D. Horstmann. 1998. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet.* 18:262-5.
- Gibb, W.R., und A.J. Lees. 1988. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 51:745-52.

- Gloeckner, C.J., N. Kinkl, A. Schumacher, R.J. Braun, E. O'Neill, T. Meitinger, W. Kolch, H. Prokisch, und M. Ueffing. 2006. The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet.* 15:223-32.
- Goldberg, M.S., A. Pisani, M. Haburcak, T.A. Vortherms, T. Kitada, C. Costa, Y. Tong, G. Martella, A. Tscherter, A. Martins, G. Bernardi, B.L. Roth, E.N. Pothos, P. Calabresi, und J. Shen. 2005. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron.* 45:489-96.
- Görner, K., E. Holtorf, S. Odoy, B. Nuscher, A. Yamamoto, J.T. Regula, K. Beyer, C. Haass, und P.J. Kahle. 2004. Differential effects of Parkinson's disease-associated mutations on stability and folding of DJ-1. *J. Biol. Chem.* 279:6943-6951.
- Greenamyre, J.T., T.B. Sherer, R. Betarbet, und A.V. Panov. 2001. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life.* 52:135-41.
- Greene, J.C., A.J. Whitworth, I. Kuo, L.A. Andrews, M.B. Feany, und L.J. Pallanck. 2003. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4078-83.
- Hague, S., E. Rogaeva, D. Hernandez, C. Gulick, A. Singleton, M. Hanson, J. Johnson, R. Weiser, M. Gallardo, B. Ravina, K. Gwinn-Hardy, A. Crawley, P.H. St George-Hyslop, A.E. Lang, P. Heutink, V. Bonifati, und J. Hardy. 2003. Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol.* 54:271-4.
- Hastings, T.G., D.A. Lewis, und M.J. Zigmond. 1996. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:1956-61.
- Hatano, Y., Y. Li, K. Sato, S. Asakawa, Y. Yamamura, H. Tomiyama, H. Yoshino, M. Asahina, S. Kobayashi, S. Hassin-Baer, C.S. Lu, A.R. Ng, R.L. Rosales, N. Shimizu, T. Toda, Y. Mizuno, und N. Hattori. 2004. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol.* 56:424-7.
- Hay, R.T. 2005. SUMO: a history of modification. *Mol Cell.* 18:1-12.
- Heales, S.J., A.A. Lam, A.J. Duncan, und J.M. Land. 2004. Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res.* 29:513-9.
- Healy, D.G., P.M. Abou-Sleiman, und N.W. Wood. 2004. Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res.* 318:189-94.
- Hedrich, K., A. Djarmati, N. Schafer, R. Hering, C. Wellenbrock, P.H. Weiss, R. Hilker, P. Vieregge, L.J. Ozelius, P. Heutink, V. Bonifati, E. Schwinger, A.E. Lang, J. Noth, S.B. Bressman, P.P. Pramstaller, O. Riess, und C. Klein. 2004. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology.* 62:389-94.
- Hering, R., C. Strauss, X. Tao, A. Bauer, E.-M. Mietz, S. Petrovic, P. Bauer, W. Schaible, D. Woitalla, T. Müller, L. Schöls, C. Klein, D. Berg, P.T. Meyer, J.B. Schulz, B. Wollnik, L. Tong, R. Krüger, und O. Riess. 2004. Novel E64D mutation in DJ-1 is causative of early-onset Parkinson's disease.
- Hershko, A., und A. Ciechanover. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem.* 61:761-807.
- Hicks, A.A., H. Petursson, T. Jonsson, H. Stefansson, H.S. Johannsdottir, J. Sainz, M.L. Frigge, A. Kong, J.R. Gulcher, K. Stefansson, und S. Sveinbjornsdottir. 2002. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 52:549-55.
- Hochstrasser, M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet.* 30:405-39.

- Hod, Y., S.N. Pentylala, T.C. Whyard, and M.R. El-Maghrabi. 1999. Identification and characterization of a novel protein that regulates RNA-protein interaction. *J Cell Biochem.* 72:435-44.
- Honbou, K., N.N. Suzuki, M. Horiuchi, T. Niki, T. Taira, H. Ariga, and F. Inagaki. 2003. The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 278:31380-4.
- Huynh, D.P., D.R. Scoles, D. Nguyen, and S.M. Pulst. 2003. The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet.* 12:2587-97.
- Imai, Y., M. Soda, S. Hatakeyama, T. Akagi, T. Hashikawa, K.I. Nakayama, and R. Takahashi. 2002. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell.* 10:55-67.
- Ito, G., H. Ariga, Y. Nakagawa, and T. Iwatsubo. 2006. Roles of distinct cysteine residues in S-nitrosylation and dimerization of DJ-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:667-72.
- Jenner, P. 2003a. Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 16 Suppl 1:S3-7.
- Jenner, P. 2003b. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.
- Jenner, P., and C.W. Olanow. 1998. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44:S72-84.
- Jeong, H., M.S. Kim, J. Kwon, K.S. Kim, and W. Seol. 2005. Regulation of the transcriptional activity of the tyrosine hydroxylase gene by androgen receptor. *Neurosci Lett.*
- Jin, J., G.E. Meredith, L. Chen, Y. Zhou, J. Xu, F.S. Shie, P. Lockhart, and J. Zhang. 2005. Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins: relevance to Lewy body formation and Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 134:119-38.
- Jonsson, G., and C. Sachs. 1975. Actions of 6-hydroxydopamine quinones on catecholamine neurons. *J Neurochem.* 25:509-16.
- Junn, E., H. Taniguchi, B.S. Jeong, X. Zhao, H. Ichijo, and M.M. Mouradian. 2005. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9691-6.
- Kahle, P.J., and C. Haass. 2004. How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease? *EMBO Rep.* 5:681-5.
- Kahle, P.J., C. Haass, H.A. Kretschmar, and M. Neumann. 2002. Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J Neurochem.* 82:449-57.
- Kim, R.H., M. Peters, Y. Jang, W. Shi, M. Pintilie, G.C. Fletcher, C. DeLuca, J. Liepa, L. Zhou, B. Snow, R.C. Binari, A.S. Manoukian, M.R. Bray, F.F. Liu, M.S. Tsao, and T.W. Mak. 2005a. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell.* 7:263-73.
- Kim, R.H., P.D. Smith, H. Aleyasin, S. Hayley, M.P. Mount, S. Pownall, A. Wakeham, A.J. You-Ten, S.K. Kalia, P. Horne, D. Westaway, A.M. Lozano, H. Anisman, D.S. Park, and T.W. Mak. 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.* 102:5215-20.
- Kinumi, T., J. Kimata, T. Taira, H. Ariga, and E. Niki. 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.* 317:722-8.

- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, and N. Shimizu. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 392:605-608.
- Klinefelter, G.R., and J.D. Suarez. 1997. Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. *Reprod Toxicol*. 11:511-9.
- Lang, A.E., and A.M. Lozano. 1998a. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*. 339:1044-53.
- Lang, A.E., and A.M. Lozano. 1998b. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*. 339:1130-43.
- Langston, J.W., L.S. Forno, J. Tetrud, A.G. Reeves, J.A. Kaplan, and D. Karluk. 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*. 46:598-605.
- Lee, S.-J., S.J. Kim, I.-K. Kim, J. Ko, C.-S. Jeong, G.-H. Kim, C. Park, S.-O. Kang, P.-G. Suh, H.-S. Lee, and S.-S. Cha. 2003b. Crystal structures of human DJ-1 and *Escherichia coli* Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain. *J. Biol. Chem*. 278:44552-44559.
- Lee, S.R., K.S. Kwon, S.R. Kim, and S.G. Rhee. 1998. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 273:15366-72.
- Lee, S.R., K.S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong, and S.G. Rhee. 2002. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 277:20336-42.
- Leroy, E., R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M.J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P.J. Steinbach, K.D. Wilkinson, and M.H. Polymeropoulos. 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*. 395:451-2.
- Leslie, N.R., D. Bennett, Y.E. Lindsay, H. Stewart, A. Gray, and C.P. Downes. 2003. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *Embo J*. 22:5501-10.
- Li, H.M., T. Niki, T. Taira, S.M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 2005. Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radic Res*. 39:1091-9.
- Liou, H.H., M.C. Tsai, C.J. Chen, J.S. Jeng, Y.C. Chang, S.Y. Chen, and R.C. Chen. 1997. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology*. 48:1583-8.
- Liu, B., J. Liao, X. Rao, S.A. Kushner, C.D. Chung, D.D. Chang, and K. Shuai. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:10626-31.
- Liu, Y., L. Fallon, H.A. Lashuel, Z. Liu, and P.T. Lansbury, Jr. 2002. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 111:209-18.
- Lücking, C.B., A. Dürr, V. Bonifati, J. Vaughan, G. De Michele, T. Gasser, B.S. Harhangi, G. Meco, P. Denèfle, N.W. Wood, Y. Agid, A. Brice, and F.P.s.D.G.S. Group. 2000. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N. Engl. J. Med*. 342:1560-1567.
- Macedo, M.G., B. Anar, I.F. Bronner, M. Cannella, F. Squitieri, V. Bonifati, A. Hoogeveen, P. Heutink, and P. Rizzu. 2003. The DJ-1L166P mutant protein associated with early onset Parkinson's disease is unstable and forms higher-order protein complexes. *Hum Mol Genet*. 12:2807-16.

## Literatur

- MacKeigan, J.P., L.O. Murphy, and J. Blenis. 2005. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol.* 7:591-600.
- Marder, K., G. Levy, E.D. Louis, H. Mejia-Santana, L. Cote, H. Andrews, J. Harris, C. Waters, B. Ford, S. Frucht, S. Fahn, and R. Ottman. 2003. Accuracy of family history data on Parkinson's disease. *Neurology.* 61:18-23.
- Marsden, C.D. 1983. Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 19:121-41.
- Martinat, C., S. Shendelman, A. Jonason, T. Leete, M.F. Beal, L. Yang, T. Floss, and A. Abeliovich. 2004. Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES- derived cell model of primary Parkinsonism. *PLoS Biol.* 2:e327.
- Martindale, J.L., and N.J. Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 192:1-15.
- McCormack, A.L., M. Thiruchelvam, A.B. Manning-Bog, C. Thiffault, J.W. Langston, D.A. Cory-Slechta, and D.A. Di Monte. 2002. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* 10:119-27.
- McNaught, K.S.P., and C.W. Olanow. 2003. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53:S73-84.
- Meng, T.C., T. Fukada, and N.K. Tonks. 2002. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell.* 9:387-99.
- Miller, D.W., R. Ahmad, S. Hague, M.J. Baptista, R. Canet-Aviles, C. McLendon, D.M. Carter, P.P. Zhu, J. Stadler, J. Chandran, G.R. Klinefelter, C. Blackstone, and M.R. Cookson. 2003. L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem.* 278:36588-95.
- Miller, D.W., C.R. Wilson, M.A. Kaleem, J. Blackinton, and M.R. Cookson. 2005. Identification of the epitope of a monoclonal antibody to DJ-1. *Neurosci Lett.* 374:203-6.
- Mitsumoto, A., and Y. Nakagawa. 2001. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res.* 35:885-93.
- Moore, D.J., L. Zhang, T.M. Dawson, and V.L. Dawson. 2003. A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization. *J Neurochem.* 87:1558-67.
- Moore, D.J., L. Zhang, J. Troncoso, M.K. Lee, N. Hattori, Y. Mizuno, T.M. Dawson, and V.L. Dawson. 2005. Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet.* 14:71-84.
- Nagakubo, D., T. Taira, H. Kitaura, M. Ikeda, K. Tamai, S.M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 1997. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun.* 231:509-13.
- Neumann, M., V. Muller, K. Gerner, H.A. Kretschmar, C. Haass, and P.J. Kahle. 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 (Berl).* 107:489-96.
- Niki, T., K. Takahashi-Niki, T. Taira, S.M.M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 2003b. 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.* 1:247-61.
- Nishinaga, H., K. Takahashi-Niki, T. Taira, A. Andreadis, S.M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 2005. Expression profiles of genes in DJ-1-knockdown and L 166 P DJ-1 mutant cells. *Neurosci Lett.* 390:54-9.

- Nuscher, B., F. Kamp, T. Mehnert, S. Odoj, C. Haass, P.J. Kahle, and K. Beyrer. 2004. Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study. *J Biol Chem.* 279:21966-75.
- Nussbaum, R.L., and C.E. Ellis. 2003. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 348:1356-64.
- Olzmann, J.A., K. Brown, K.D. Wilkinson, H.D. Rees, Q. Huai, H. Ke, A.I. Levey, L. Li, and L.-S. Chin. 2004. Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J. Biol. Chem.* 279:8506-8515.
- Outeiro, T.F., and S. Lindquist. 2003. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science.* 302:1772-5.
- Paisan-Ruiz, C., A.E. Lang, T. Kawarai, C. Sato, S. Salehi-Rad, G.K. Fisman, T. Al-Khairallah, P. St George-Hyslop, A. Singleton, and E. Rogaeva. 2005. LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology.* 65:696-700.
- Palacino, J.J., D. Sagi, M.S. Goldberg, S. Krauss, C. Motz, M. Wacker, J. Klose, and J. Shen. 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem.* 279:18614-22.
- Pankratz, N., and T. Foroud. 2004. Genetics of Parkinson disease. *NeuroRx.* 1:235-42.
- Pankratz, N., W.C. Nichols, S.K. Uniacke, C. Halter, A. Rudolph, C. Shults, P.M. Conneally, and T. Foroud. 2003. Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet.* 72:1053-7.
- Park, J., S.B. Lee, S. Lee, Y. Kim, S. Song, S. Kim, E. Bae, J. Kim, M. Shong, J.M. Kim, and J. Chung. 2006. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature.* 441:1157-61.
- Pearce, R.K., A. Owen, S. Daniel, P. Jenner, and C.D. Marsden. 1997. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 104:661-77.
- Persad, S., S. Attwell, V. Gray, M. Delcommenne, A. Troussard, J. Sanghera, and S. Dedhar. 2000. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3207-12.
- Petit, A., T. Kawarai, E. Paitel, N. Sanjo, M. Maj, M. Scheid, F. Chen, Y. Gu, H. Hasegawa, S. Salehi-Rad, L. Wang, E. Rogaeva, P. Fraser, B. Robinson, P. St George-Hyslop, and A. Tandon. 2005. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem.* 280:34025-32.
- Pichler, A., and F. Melchior. 2002. Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic.* 3:381-7.
- Polymeropoulos, M.H., C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, and R.L. Nussbaum. 1997. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276:2045-2047.
- Przedborski, D.W.a. 2003. Parkinson's Disease: Mechanism and Models. *Neuron.* 39:889-909.
- Quigley, P.M., K. Korotkov, F. Baneyx, and W.G. Hol. 2003. The 1.6-Å crystal structure of the class of chaperones represented by Escherichia coli Hsp31 reveals a putative catalytic triad. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3137-42.
- Rizzu, P., D.A. Hinkle, V. Zhukareva, V. Bonifati, L.A. Severijnen, D. Martinez, R. Ravid, W. Kamphorst, J.H. Eberwine, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, and P. Heutink. 2004.

## Literatur

- DJ-1 colocalizes with tau inclusions: a link between parkinsonism and dementia. *Ann Neurol.* 55:113-8.
- Sachs, C., und G. Jonsson. 1975. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol.* 24:1-8.
- Saitoh, M., H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono, und H. Ichijo. 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J.* 17:2596-606.
- Sampathu, D.M., B.I. Giasson, A.C. Pawlyk, J.Q. Trojanowski, und V.M. Lee. 2003. Ubiquitination of alpha-synuclein is not required for formation of pathological inclusions in alpha-synucleinopathies. *Am J Pathol.* 163:91-100.
- Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, und D.M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307:1098-101.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 38:995-1014.
- Seeler, J.S., und A. Dejean. 2003. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:690-9.
- Sekito, A., S. Koide-Yoshida, T. Niki, T. Taira, S.M. Iguchi-Arigo, und H. Ariga. 2006. DJ-1 interacts with HIPK1 and affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Free Radic Res.* 40:155-65.
- Seo, J.H., Y. Ahn, S.R. Lee, C. Yeol Yeo, und K. Chung Hur. 2005. The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway. *Mol Biol Cell.* 16:348-57.
- Shendelman, S., A. Jonason, C. Martinat, T. Leete, und A. Abeliovich. 2004. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol.* 2:e362.
- Shimura, H., N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka, und T. Suzuki. 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25:302-305.
- Shimura, H., M.G. Schlossmacher, N. Hattori, M.P. Frosch, A. Trockenbacher, R. Schneider, Y. Mizuno, K.S. Kosik, und D.J. Selkoe. 2001. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science.* 293:263-9.
- Shinbo, Y., T. Niki, T. Taira, H. Ooe, K. Takahashi-Niki, C. Maita, C. Seino, S.M. Iguchi-Arigo, und H. Ariga. 2006. Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ.* 13:96-108.
- Shinbo, Y., T. Taira, T. Niki, S.M. Iguchi-Arigo, und H. Ariga. 2005. DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3. *Int J Oncol.* 26:641-8.
- Singleton, A.B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M.R. Cookson, M. Muentner, M. Baptista, D. Miller, J. Blacato, J. Hardy, und K. Gwinn-Hardy. 2003.  $\alpha$ -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* 302:841.
- Song, G., G. Ouyang, und S. Bao. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 9:59-71.
- Song, J.J., und Y.J. Lee. 2003. Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 signal in Daxx trafficking and ASK1 oligomerization. *J Biol Chem.* 278:47245-52.
- Stadtman, E.R. 1992. Protein oxidation and aging. *Science.* 257:1220-4.
- Starr, R., und D.J. Hilton. 1999. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays.* 21:47-52.

- Stokoe, D., L.R. Stephens, T. Copeland, P.R. Gaffney, C.B. Reese, G.F. Painter, A.B. Holmes, F. McCormick, and P.T. Hawkins. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 277:567-70.
- Taira, T., Y. Saito, T. Niki, S.M. Iguchi-Ariga, K. Takahashi, and H. Ariga. 2004. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*. 5:213-8.
- Takahashi, K., T. Taira, T. Niki, C. Seino, S.M.M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 2001b. DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIAS $\alpha$  to the receptor. *J. Biol. Chem*. 276:37556-37563.
- Takahashi-Niki, K., T. Niki, T. Taira, S.M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 2004. Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 320:389-97.
- Tao, X., and L. Tong. 2003. Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 278:31372-9.
- Taylor, J.P., I.F. Mata, and M.J. Farrer. 2006. LRRK2: a common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention? *Trends Mol Med*. 12:76-82.
- Toker, A., and A.C. Newton. 2000. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem*. 275:8271-4.
- Uhl, G.R., J.C. Hedreen, and D.L. Price. 1985. Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology*. 35:1215-8.
- Valente, E.M., P.M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M.M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A.R. Bentivoglio, D.G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W.P. Gilks, D.S. Latchman, R.J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger, and N.W. Wood. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 304:1158-60.
- Valko, M., C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 160:1-40.
- Ved, R., S. Saha, B. Westlund, C. Perier, L. Burnam, A. Sluder, M. Hoener, C.M. Rodrigues, A. Alfonso, C. Steer, L. Liu, S. Przedborski, and B. Wolozin. 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*. 280:42655-68.
- Volkman, J. 2004. Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Neurophysiol*. 21:6-17.
- Volles, M.J., and P.T. Lansbury, Jr. 2003. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry*. 42:7871-8.
- Wagenfeld, A., J. Gromoll, and T.G. Cooper. 1998. Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1 (CAP1), a protein putatively involved in fertilization. *Biochem Biophys Res Commun*. 251:545-9.
- Wang, Z., M. Wang, J.S. Lazo, and B.I. Carr. 2002. Identification of epidermal growth factor receptor as a target of Cdc25A protein phosphatase. *J Biol Chem*. 277:19470-5.
- West, A.B., D.J. Moore, S. Biskup, A. Bugayenko, W.W. Smith, C.A. Ross, V.L. Dawson, and T.M. Dawson. 2005. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:16842-7.

## Literatur

- Wilson, M.A., J.L. Collins, Y. Hod, D. Ringe, und G.A. Petsko. 2003b. 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. USA*. 100:9256-9261.
- Wilson, M.A., D. Ringe, und G.A. Petsko. 2005. The atomic resolution crystal structure of the YajL (ThiJ) protein from *Escherichia coli*: a close prokaryotic homologue of the Parkinsonism-associated protein DJ-1. *J Mol Biol*. 353:678-91.
- Wilson, M.A., C.V. St Amour, J.L. Collins, D. Ringe, und G.A. Petsko. 2004. The 1.8-Å resolution crystal structure of YDR533Cp from *Saccharomyces cerevisiae*: a member of the DJ-1/ThiJ/PfpI superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:1531-6.
- Woo, H.A., H.Z. Chae, S.C. Hwang, K.S. Yang, S.W. Kang, K. Kim, und S.G. Rhee. 2003. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science*. 300:653-6.
- Wszolek, Z.K., R.F. Pfeiffer, Y. Tsuboi, R.J. Uitti, R.D. McComb, A.J. Stoessl, A.J. Strongosky, A. Zimprich, B. Muller-Myhsok, M.J. Farrer, T. Gasser, D.B. Calne, und D.W. Dickson. 2004. Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology*. 62:1619-22.
- Xu, J., N. Zhong, H. Wang, J.E. Elias, C.Y. Kim, I. Woldman, C. Piffl, S.P. Gygi, C. Geula, und B.A. Yankner. 2005. The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Hum Mol Genet*. 14:1231-41.
- Yang, Y., S. Gehrke, M.E. Haque, Y. Imai, J. Kosek, L. Yang, M.F. Beal, I. Nishimura, K. Wakamatsu, S. Ito, R. Takahashi, und B. Lu. 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*. 102:13670-5.
- Yokota, T., K. Sugawara, K. Ito, R. Takahashi, H. Ariga, und H. Mizusawa. 2003. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 312:1342-8.
- Yoon, S.O., C.H. Yun, und A.S. Chung. 2002. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev*. 123:1597-604.
- Zhang, L., M. Shimoji, B. Thomas, D.J. Moore, S.W. Yu, N.I. Marupudi, R. Torp, I.A. Torgner, O.P. Ottersen, T.M. Dawson, und V.L. Dawson. 2005. Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet*. 14:2063-73.
- Zhang, Y., J. Gao, K.K. Chung, H. Huang, V.L. Dawson, und T.M. Dawson. 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*. 97:13354-9.
- Zhou, W., und C.R. Freed. 2005. DJ-1 upregulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T  $\alpha$ -synuclein toxicity. *J. Biol. Chem.*:in press.
- Zimprich, A., S. Biskup, P. Leitner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, J. Kachergus, M. Hulihan, R.J. Uitti, D.B. Calne, A.J. Stoessl, R.F. Pfeiffer, N. Patenge, I.C. Carbajal, P. Vieregge, F. Asmus, B. Muller-Myhsok, D.W. Dickson, T. Meitinger, T.M. Strom, Z.K. Wszolek, und T. Gasser. 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 44:601-7.

## Danksagung

Ich bedanke mich vor allen Dingen bei Herrn Prof. Christian Haass, der mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gegeben hat und mich bei der Publikation meiner Daten gut unterstützt hat.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Philipp Kahle bedanken, der mich immer voll und ganz sowohl wissenschaftlich als auch moralisch unterstützt hat. Die sehr hilfreichen und zielgerichteten Vorschläge und äußerst fruchtbaren Diskussionen der Daten haben mir stets geholfen zügig und effektiv arbeit zu können.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Patrick Cramer, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat meine Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Eve Holtorf, die drei einhalb Jahre lange sehr gute Arbeit geleistet hat und zu meiner vollsten Zufriedenheit einen Großteil für das Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für eine äußerst angenehme und gute Kooperation bedanke ich mich bei Herrn Prof. Wolfgang Wurst, Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn und Thu-Trang Pham, die uns mit der Bereitstellung von DJ-1 Knock-out-Mausembryos und -Hirnmateriale entscheidend geholfen haben.

Bei meinen Kollaborationspartnern Jochen Klages, der die NMR Studien durchgeführt hat, Andreas Ledl, der die *in vitro* und *in vivo* Sumoylierungsstudien von DJ-1 gemacht hat, Hubert Kettenberger, der mir bei strukturellen Fragestellungen des DJ-1 Proteins und der Bedienung des Strukturprogramms PyMol enorm geholfen hat und Jens Waak, der das DJ-1-Projekt sehr voran gebracht hat, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Besonders möchte ich mich auch bei Anne-Katrin Ludwig, Katrin Fellerer, Sonja Zilow, Susanne Schöbel, Sylvia Fischer, Sven Lammich, Ayako Yamamoto, Veronika Müller, Sabine Odoy und allen anderen Mitarbeitern im Labor bedanken, die mich tatkräftig unterstützt haben und mit denen ich viele gute Gespräche führen durfte.

Für das aufmerksame Lesen, Korrigieren und Diskutieren dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Anja Capell, Regina Fluhrer, Melanie Meißner, Alice Sülzen, Ulf Dettmer und Nicole Exner.

Zum Schluß möchte ich Michael und meinen Eltern sowie Schwestern für ihre große Unterstützung und Geduld während der gesamten Doktorarbeit danken, die mir die Zeit erheblich versüßt haben.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Adresse: Karin Görner  
Leipartstr. 24  
81369 München  
e-mail: kgoerner@med.uni-muenchen.de

Geburtsdatum: 09.02.1977  
Geburtsort: Essen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Ausbildung:

#### *Dissertation*

2003 – 2006 Ludwig-Maximilians-Universität München, Adolf-Butenandt Institut, Prof. Dr. C. Haass

#### *Praktikum als wissenschaftliche Hilfskraft*

Juni 2002 – Dezember 2002 Ludwig-Maximilians-Universität München, Genzentrum, Dr. Stefan Weiss

#### *Diplom in Chemie*

März 2002 Westfälische Wilhelms Universität Münster, Biochemie, Prof Dr. H-J. Galla

#### *Vordiplom in Chemie*

Oktober 1999 Westfälische Wilhelms Universität Münster, Chemie

#### *Chemiestudium*

April 1997: Start des Diplom-Chemiestudiums an der Westfälischen Wilhelmsuniversität in Münster

#### *Abitur*

Juni 1996: Gymnasium Broich, Mülheim an der Ruhr

### Praktika

#### *UCSB, Santa Barbara, USA*

Januar 2001 - Mai 2001: Biochemischer Kurs, Abteilung Chemisches Ingenieurwesen, UCSB, Santa Barbara, Kalifornien, Prof. Dr. J A. Zasadzinski

#### *Bayer Leverkusen, Leverkusen*

Juli/August 1998 und 1999: Werkstudentin in der Krebsforschungsabteilung bei Bayer Leverkusen, Leverkusen, Dr. Lercher

### Präsentationen/Konferenzen

September 2004: (N)EUROPARK Europäisches Konsortium der Entwicklung der Genterapie in der Parkinsonschen Krankheit, Löwen, Belgien

November 2005: Präsentation bei der Konferenz der Gesellschaft für Neurowissenschaften, Washington, DC, USA

März 2005/2006: Präsentation für den SFB 596 Molekulare Mechanismen in der Neurodegeneration

März 2006: Einladung zum „Symposium for leading bioscientists of the next decade“ von Roche in Basel, Schweiz

## **Anhang: Publikationen**