

Aus der Abteilung Neurologie

(Prof. Dr. med. M. Bähr)

im Zentrum Neurologische Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

BAG1 stellt die Bildung funktionaler DJ-1-L166P-Dimere  
und deren Chaperon-Aktivität wieder her

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sebastian Deeg

aus

Konstanz

Göttingen 2010

**Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Kermer**

**II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Müller**

**III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Oppermann**

**Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 2011**

## **Inhalt**

<b>1. Einleitung</b>	<b>2-5</b>
<b>2. Zusammenfassende Darstellung der Methoden</b>	<b>6-13</b>
2.1 Zelllinien/ Plasmide/Medium	6
2.2 Zellzählungen	6
2.3 Ausplattierungen für Immunpräzipitations-Assay und Immunzytochemie	7
2.4 Transfektion	7-8
2.5 Lyse der Zellen	8
2.6 Western Blot	8-9
2.7 Co-Immunoprecipitations-Assay	10
2.8 Immunzytochemie	11
2.9 Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie	11
2.10 Fluoreszenzfaltungs-Assay	12
2.11 Zelltod-Assay	12-13
<b>3. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse</b>	<b>14-16</b>
3.1 BAG1 interagiert mit DJ-1 und verändert seine Dimerbildung	14-15
3.2 DJ-1 verfügt über Chaperon-Aktivität	15-16
3.3 BAG1 verhindert DJ-1-L166P-induzierten Zelltod	16
<b>4. Literaturangaben</b>	<b>17-20</b>
<b>5. Kopie der Publikation</b>	<b>21</b>
BAG1 restores formation of functional DJ-1 L166P dimers and DJ-1 chaperone activity	22-30

## 1. Einleitung

Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Menschen. Die Prävalenz beträgt etwa 1‰ und nimmt mit steigendem Alter kontinuierlich zu. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, ein Erkrankungsbeginn vor dem 30. Lebensjahr ist sehr selten. Auch die Inzidenz der Erkrankung steigt mit zunehmendem Alter deutlich an, wobei sie in der Bevölkerungsgruppe der 60-70-jährigen mit cirka 2,5% ihren Gipfel erreicht (Polymeropoulos et al. 1996, de Rijk et al. 2000).

Das Krankheitsbild wurde erstmals 1817 durch James Parkinson mit der Veröffentlichung von "An Essay on the Shaking Palsy" als eigenständiges Syndrom beschrieben. Klinisch ist das Parkinson-Syndrom durch die Kardinal-Symptome Akinese, muskuläre Rigidität und Ruhetremor, sowie häufigen Störungen der Körperhaltung und der Haltungsreflexe definiert. Zusätzlich können andere neurologische, psychische und vegetative Störungen mit unterschiedlicher Häufigkeit auftreten.

Die Mortalität der Patienten hat sich seit Einführung der L-DOPA-Therapie der Normalbevölkerung angenähert, natürliche Verläufe der Erkrankung werden unter Therapie nicht mehr beobachtet. Der Tod tritt bei den meisten Patienten durch interkurrente Infekte und kardiale oder respiratorische Insuffizienz ein.

Der Morbus Parkinson wird weiterhin klinisch diagnostiziert. Für die Diagnosestellung werden eine progressive Symptomatik und das Vorhandensein von mindestens zwei der drei Kardinal-Symptome, Akinese, Rigor und Tremor (Ruhetremor von 4-6 Hz) gefordert. Darüber hinaus wird die Diagnose durch mindestens 3 Nebenkriterien gestützt: einseitiger Beginn, Progredienz der Krankheit, depressive Verstimmung, vegetative Störungen, Asymmetrie der Symptome, gutes Ansprechen auf L-DOPA (70-100%), L-DOPA-induzierte Dyskinesien, Ansprechen der Symptome auf L-DOPA-Therapie für mindestens 5 Jahre sowie ein klinischer Verlauf über mindestens 10 Jahre (Hughes et al. 1992). Die einzelnen Symptome treten interindividuell in unterschiedlicher Ausprägung auf. Die Sicherheit der klinischen Diagnose beträgt hierbei maximal 80%. Deshalb wird die endgültige Diagnose post mortem auf neuropathologisch-histologischem Wege gestellt.

Die Krankheit ist morphologisch durch einen starken Zellverlust der pigmentierten, dopaminergen Neurone insbesondere in der Substantia nigra gekennzeichnet, der sich makroskopisch in einer erkennbaren Abblässung dieser Region widerspiegelt. Zusätzlich können weitere Teile des Zentralnervensystems, insbesondere kortikale Areale, der Nucleus basalis Meynert, die Raphe-Kerne und sympathische Ganglien vom Zelluntergang betroffen sein. Histopathologisch lässt sich die Neurodegeneration vor allem dem venterolateralen Anteil der Pars Compacta (Locus coeruleus) der Substantia nigra zuordnen (Fearnley and Lees 1991, Mori et al. 1998, Farrer et al. 2001). Hier zeigt sich darüber hinaus eine Gliazellvermehrung (Gliose) bei freiem extrazellulärem Neuromelanin. Pathognomonisch finden sich in den meisten Fällen intrazellulär gelegene, sogenannte Lewy-Körper in den verbliebenen Neuronen der Substantia nigra. Diese zytoplasmatischen Einschlusskörperchen bestehen hauptsächlich aus fibrilliertem  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin, gepaart mit einer Reihe von anderen Proteinen (Goedert 2001). Mit einer klinischen Manifestation der Krankheit ist ab einem nigralen Nervenzellverlust von etwa 50% (Fearnley and Lees 1991), bzw. einer Verringerung des Neurotransmitters Dopamin im striatalen Projektionsgebiet der Neurone um 60-80% zu rechnen (Leenders et al. 1990, Marsden 1990).

Die Ätiologie des Morbus Parkinson bleibt weiterhin ungeklärt. Während die Pathophysiologie des Morbus Parkinson durch den Ausfall der dopaminergen Neurone und durch deren striatale Projektion erklärt wird, ist die Ursache der Neurodegeneration weiterhin unklar. Es wird eine Vielzahl von Hypothesen zur Entstehung der Erkrankung diskutiert. Am häufigsten werden hier Apoptose, endogene und exogene Neurotoxine, genetische Suszeptibilität, Immunprozesse, mitochondriale Fehlfunktionen, oxidativer Streß, Umweltfaktoren und die gestörte proteasomale Degradation zelleigener Proteine genannt. Als idiopathisches Parkinson-Syndrom werden alle sporadischen Krankheitsfälle bezeichnet, denen bis heute keine ursächliche Pathogenese zugeordnet werden kann. Hierunter fällt auch eine Reihe von hereditären Formen der Erkrankung, bei denen Genmutationen als krankheitsauslösender Pathomechanismus angenommen werden. Die einzelnen Hypothesen erscheinen für die verschiedenen Formen des Morbus Parkinson (sporadisch/hereditär) mehr oder weniger wahrscheinlich, bzw. könnten sich zukünftig zu einem ursächlichen Pathomechanismus ergänzen (multifaktorielle Genese).

Schon im 19. Jahrhundert wurde über eine familiäre Häufung von Patienten mit Morbus Parkinson berichtet, wobei erst in der heutigen Zeit eine kausale Verbindung zwischen vererbtem Gendefekt und Erkrankung gelungen ist.

Die rasante Entwicklung in den molekularbiologischen Arbeitstechniken und der daraus resultierende Wissenszuwachs führten in vielen Gebieten der Medizin zur Identifikation krankheitsassoziierter Gendefekte. Im Falle des Morbus Parkinson konnte erstmals 1996 ein Genlocus benannt werden, der in einer großen italienischen Familie eine autosomal-dominante Variante des Morbus Parkinson auslöste. 1997 konnte diesem Locus das Genprodukt  $\alpha$ -Synuclein mit der bekannten Punktmutation A53T zu geordnet werden. Auf der Suche nach weiteren Gendefekten wurden in den folgenden Jahren weltweit Assoziationsstudien an betroffenen Familien durchgeführt.

Zurzeit sind 14 Genloci identifiziert, die mit familiären Formen des Morbus Parkinson assoziiert sind. Etwa 10% aller Parkinsonerkrankungen können dieser Gruppe der hereditären Formen des Morbus Parkinson zugeordnet werden.

Eines dieser Gene, der PARK 7 Locus, kodiert für das DJ-1-Protein (Bonifati et al. 2003a). Es wurden verschiedene Deletions- und Punktmutationen durch Familienstudien beschrieben, die eine autosomal rezessiv vererbte Form der Parkinson-Erkrankung mit einem frühen Krankheitsbeginn auslösen (Bonifati et al. 2003b). Ursächlich wird in diesem Fall ein Funktionsverlust des cirka 20 kD großen Proteins angenommen. DJ-1 wird im Menschen ubiquitär exprimiert; es konnte in Gliazellen und Neuronen nachgewiesen werden (Bandopadhyay et al. 2004; Olzmann et al. 2007). Das DJ-1-Gen ist evolutionär hoch konserviert, das 189 Aminosäuren große Genprodukt weist eine signifikante Homologie mit intrazellulären Proteasen der PfpI Familie auf. Die Funktion des Proteins ist zurzeit noch nicht eindeutig belegt. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl möglicher Funktionen diskutiert; unter anderem soll es als Redox-Sensor (Kinumi et al. 2004; Taira et al. 2004; Andres-Mateos et al. 2007; Batelli et al. 2008), Transkriptionscofaktor (Bae et al. 2005) oder molekulares Chaperon dienen (Xia et al. 2003; Olzmann et al. 2004). Unterstützt wird die Hypothese der Funktion als molekulares Chaperon durch den Nachweis einer Assoziation von DJ-1 mit HSP70 und anderen Chaperonen (Li et al. 2005). Untersuchungen der kristallinen Struktur von DJ-1 legen ein Vorkommen des Proteins als Dimer nahe (Honbou et al. 2003, Wilson et al. 2003). Die am häufigsten untersuchte Mutante von DJ-1, die L166P-Mutante, scheint in der Bildung dieser Dimere stark eingeschränkt zu sein (Moore et al. 2003, Blackinton et al.

2005). Der Austausch von Leucin durch Prolin an Position 166 der Aminosäurekette bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins. Verschiedene Forschergruppen haben zudem eine Instabilität des mutierten Proteins beschrieben, welche durch eine schnellere Degradation über das Proteasom erklärt wird (Miller et al. 2003, Moore et al. 2003, Görner et al. 2004, Olzmann et al. 2004).

BAG1 wurde erstmals als Bcl-2 bindendes Protein beschrieben (Takayama et al. 1995). In dieser Arbeit konnte ein protektiver Effekt der Proteininteraktion auf induzierten Zelltod dargestellt werden. Inzwischen wurde BAG1 als multifunktionaler Bindungspartner einer Vielzahl von Proteinen charakterisiert. So konnten Einflüsse auf elementare, zelluläre Vorgänge wie die neuronale Differenzierung (Kermer et al. 2002, Liman et al. 2008), neuronale Regeneration (Planchamp et al. 2008) und Protektion vor programmiertem Zelltod (Takayama et al. 1995, Kermer et al. 2003, Townsend et al. 2003) in verschiedenen Modellen belegt werden.

Im Menschen wurden bisher sechs Mitglieder der BAG-Familie identifiziert. Deren Gene sind in der Evolution hochkonserviert und finden sich als Homolog in vielen Organismen, von Hefen bis zum Säugetier wieder. Die Genprodukte besitzen alle eine einheitliche, cirka 50 Aminosäuren große BAG-Domäne am C-Terminus des Proteins. Dieser Proteinabschnitt weist eine hohe Bindungsaktivität für die ATPase-Domäne des bekannten Chaperons HSP70 auf. Durch diese Proteininteraktion moduliert BAG1 die ATPase- und Proteinfaltungsaktivität von HSP70 und nimmt dadurch direkten Einfluss auf die Refaltung beschädigter oder fehlgefalteter Proteine (Takayama et al. 1997, Sondermann et al. 2001, Liman et al. 2005). Zusätzlich besitzt BAG1 auch eine UBL-Domäne (ubiquitin like domain) am N-Terminus des Proteins, welche eine Bindung an das Proteasom ermöglicht. In diesem Zusammenhang wurde BAG1 als Transportprotein beschrieben, welches beschädigte, fehlgefaltete Proteine auch direkt der proteasomalen Degradation zuführen kann (Lüders et al. 2000, Demand et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine neue Proteininteraktion zwischen BAG1 und DJ-1 belegt. In den anschließenden Experimenten folgte die nähere Charakterisierung der Proteininteraktion. So konnte ein Effekt von BAG1 auf die subzelluläre Verteilung, die Dimerbildung und mögliche Funktion von DJ-1 als molekulares Chaperon dargestellt werden.

## **2. Zusammenfassende Darstellung der Methoden**

### **2.1 Zelllinien/ Plasmide/Medium**

In dieser Arbeit wurden 3 verschiedene Zelllinien verwendet.

CSM 14.1-Wildtypzellen wurden in DME-Nährmedium mit 10% Kälberserum und Penicillin/Streptomycin bei 32°C kultiviert.

SH-SY5Y- und HEK293T-Wildtypzellen wurden in DME-Nährmedium mit 10% Kälberserum und Penicillin/Streptomycin bei 37°C kultiviert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden cDNA Vollängen-Plasmide für DJ-1-Wildtyp und DJ-1-L166P-Mutante mit einem C-terminalem V5/HIS Tag oder C-terminalem Flag-Tag, Vollängen-Plasmide für DJ-1-Wildtyp und DJ-1-L166P-Mutante als C-terminales CFP- oder N-terminales YFP-Fusionsprotein, cDNA-Vollängen-Plasmide für BAG1 und BAG $\Delta$ C mit oder ohne C-terminalen Flag-Tag, sowie ein cdYFP-Plasmid mit einem N-terminalen HA-Tag benutzt. Zusätzlich wurden kommerzielle siGenome SMARTpool DJ-1 siRNA und siGenome nontargeting siRNA (Thermo Fisher Scientific) benutzt.

### **2.2 Zellzählungen**

Die Zellen wurden vor Durchführung der einzelnen Experimente jeweils in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu erzielen. Dazu wurden 10 $\mu$ l der Zellsuspension (mit circa  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Medium) mit 90 $\mu$ l Medium verdünnt und die Zählkammer mit 10 $\mu$ l dieser Suspension befüllt. Die Quantifizierung erfolgte durch Auszählen der vier Quadranten und Bildung des Mittelwertes der Zellzahl mit einer 10-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop. Die resultierende Zellkonzentration in Zellen /ml konnte dann durch Multiplikation des Mittelwertes der Zellzahl mit dem Faktor  $10^5$  berechnet werden.



### 2.3 Ausplattierungen für Immunpräzipitations-Assay und Immunzytochemie

Die Zellen wurden in ihrem Normalmedium (durchschnittlich 15ml) in Kulturflaschen gezüchtet. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers vorsichtig vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und in Medium mit einer Glaspipette in ein 15-ml-*Tube* überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000U/min zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 1ml frischem Medium gründlich resuspendiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für einen nachfolgenden Immunpräzipitationsassay wurden die Zellen in 6-*well*-Zellkulturplatten verteilt. Pro *well* bedeutete dies eine Zahl von 1 Million Zellen in 2ml Nährmedium, entsprechend einer Konfluenz von cirka 80%. Für die immunzytochemischen Versuche wurden die Zellen in 24-*well*-Zellkulturplatten verteilt, die zuvor mit runden Deckgläschen bestückt wurden. Pro *Well* bedeutete dies eine Zahl von 200000 Zellen in 0,5ml Nährmedium, entsprechend einer Konfluenz von cirka 60% des *well*-Bodens, bzw. des Deckgläschens.

### 2.4 Transfektion

Für die Transfektion von DNA in die Zellen wurde für die beschriebenen Experimente als Transfektions-Reagenz *Lipofectamine 2000* verwendet. In Vorversuchen wurde folgendes Protokoll etabliert, das bezogen auf die Parameter Menge an eingesetzter DNA und Reagenzien, Zelldichte bei Transfektion und Zeitablauf die beste Transfektionseffizienz und das höchste Expressionsniveau auf Proteinebene ergab. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der geplanten Transfektion wie beschrieben ausplattiert. Das Nährmedium wurde kurz vor der Transfektion für Zellen in 6-*well*-Platten durch 1 ml eines reduzierten Mediums, *Opti-MEM*, ersetzt. Entsprechend wurde das Nährmedium in 24-*well*-Platten durch 250 µl *Opti-MEM* ersetzt. Anschließend wurden in gläsernen Reaktionsgefäßen zum einen DNA mit *Opti-MEM*, zum anderen *Lipofectamine 2000* mit *Opti-MEM* gemischt und jeweils für 5 min inkubiert. Die beiden Ansätze wurden zusammengeführt und für weitere 20 min inkubiert, um eine DNA-*Lipofectamine*-Komplexbildung zu ermöglichen. Dann wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen verteilt. Pro *well* einer 6-*well*-Platte wurden 3 µg DNA, 9 µl *Lipofectamin* und *Opti-MEM* in einem Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Pro *well*

einer 24-well-Platte wurden 1 µg DNA, 3 µl *Lipofectamin* und *Opti-MEM* in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Für Doppeltransfektionen wurde die gleiche Menge an DNA eingesetzt, wobei die Vektoren zu gleichen Teilen zusammen gemischt wurden. Die benötigten Volumina und Mengen wurden in Abhängigkeit zur Anzahl der *wells* vorab kalkuliert und in einem Ansatz gemischt. Die Platten wurden vorsichtig geschwenkt, um das Transfektionsreagens gleichmäßig über den Zellen zu verteilen. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das reduzierte Medium wieder gegen normales Nährmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden 24-48 Stunden nach Transfektion geerntet.

## **2.5 Lyse der Zellen**

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers vom Boden der Kulturschale gelöst und in ihrem Medium mit einer Glaspipette in ein 15-ml-Tube überführt. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 800 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Mit einer 200-µl-Pipette wurde nun Lyse-Puffer (cirka 100µl Lyse-Puffer pro 1 Mio Zellen) zugegeben, durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde für weitere 30 min bei 4°C in einem Laufrad bewegt. Proben für die subzelluläre Fraktionierung wurden nach Protokoll mit den kommerziellen Lysepuffern des ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction kit (EMD) behandelt. Die Proben wurden mit Lämmli-puffer 1:5 gemischt und bei 95°C in einem Thermoblock für 5 min denaturiert. Das fertige Lysat wurde entweder bei -20°C gelagert oder sofort weiter verarbeitet.

## **2.6 Western Blot**

Der Western Blot ist ein Verfahren, bei dem Proteine auf ein Acrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch über ihr Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proteine werden durch ein elektrisches Feld vom Gel auf eine PVDF-Membran transferiert und können nun mit spezifischen Antikörpern markiert und detektiert werden. Das Protokoll wurde durch eine Vielzahl von Vorversuchen optimiert, um durch Testung verschiedener Puffer,

Antikörperkonzentrationen, Zeitabläufe, etc eine bestmögliche Darstellung der Proteine zu erreichen. Die Proben wurden auf Eis bearbeitet, um eine Proteolyse zu verhindern. Für die Gelelektrophorese stand ein komplettes System von Biorad mit Gelgieß-Vorrichtung, Platten, verschiedenen Kämmen und einem Minicell-Tank zur Elektrophorese zu Verfügung. Zuerst wurde das Trenngel angemischt und mit einer Glaspipette zwischen die Glasplatten eingefüllt. Das Gel wurde mit einer 0,1% SDS-Lösung bedeckt und für 20 min zur Polymerisation stehen gelassen. Entsprechend wurde mit dem Sammelgel verfahren, abschließend wurden hier die Kämmen eingesteckt. Es wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Taschenboden und Übergang zum Trenngel mindestens 5 mm Sammelgel befand, um eine Aufkonzentrierung und Vortrennung der Proteine und damit eine hohe Auflösung und Bandenschärfe zu erreichen. Die fertigen Gele wurden nun in den Elektrophorese-Tank eingespannt und der Tank wurde mit Laufpuffer befüllt. Die Proben wurden mit einer Pipette aufgetragen. Bei jedem Gellauf wurde eine Negativ- und Positiv-Kontrolle, sowie ein Größenmarker (Magic Mark™ Western Standard) mit aufgetragen. Anfangs wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bei Übertritt der Proteinbande in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde nach etwa 2 Stunden beendet. Es folgte der Proteintransfer von Gel auf die Membran bei 200 mA, 80 V und 30 W für circa 80 min. Zum Abschluss des Transfers wurden die Membranen mit 4% Milchpulver in TBST für 1 Stunde blockiert, um später unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Die Membranen wurden mit dem Primärantikörper, verdünnt in 4% Milchpulver in TBST, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membranen wurden auf einer Wippe kontinuierlich bewegt, um eine homogene Verteilung des Antikörpers zu gewährleisten. Dann wurde die Membran 5x10 min mit jeweils 50ml TBST gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde nochmals 5x10 min mit TBST gewaschen. Die Sekundärantikörper waren mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gelabelt, die Detektion der markierten Proteinbanden erfolgte also über Lichtemission durch enzymatischen Substratumsatz. Das Auflegen der Filme und deren Entwicklung fanden in einer Dunkelkammer mit automatischem Entwickler statt.

## 2.7 Co-Immunopräzipitations-Assay

Das Verfahren diente der Darstellung der Proteininteraktion von DJ-1 und BAG1. Die Zellen wurden nach obigem Protokoll transient transfiziert, geerntet und mit dem bekannten Puffer lysiert. Aus dem Lysat wurden mit Hilfe des *Red Anti-FLAG M2 Affinity Gel* die interagierenden Proteine präzipitiert. Pro Probe wurden 30  $\mu$ l der Agarose-*bead*-Suspension verwendet. Die Beads wurden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis gestellt. Es wurde 500  $\mu$ l TBS zugefügt, die Suspension wurde kurz gevortext und für 30 sec bei 4°C mit 8000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dieser Waschschrift wurde 2-mal wiederholt. Pro Probe wurden cirka 3 Mio Zellen in 1 ml Lyse-Puffer lysiert. Das Lysat wurde vor Inkubation mit den *beads* durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C mit 8000g von verbliebenem Zelldebris befreit. Der Überstand wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit den *beads* zusammengeführt. Die Proben wurden in ein Laufrad gespannt, wodurch eine sanfte Bewegung während der Inkubation gegeben war. Die Inkubation erfolgte für 4 Stunden bei 4°C. Das Inkubat wurde anschließend für 30s mit 8000g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde mit einer 200- $\mu$ l-Pipette vorsichtig entfernt. Die verbliebenen, proteinbeladenen *beads* wurden mit 500  $\mu$ l TBS versetzt, 20s gevortext und damit von ungebundenem Protein befreit. Es folgte wiederum eine Zentrifugation für 30s mit 8000g bei 4°C und der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Der Waschschrift wurde 2malig wiederholt. Während der einzelnen Arbeitsschritte wurden die Proben auf Eis gelagert. Die *beads* wurden mit 20 $\mu$ l Elutions-Puffer (0,1M Glycin HCl, pH 3,5) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, hierfür wurden die Proben nochmals in das Laufrad gespannt. Das Eluat wurde für 20s bei 8000g abzentrifugiert und in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß übertragen. Um das saure Milieu zu neutralisieren wurde jetzt noch 2 $\mu$ l Neutralisationspuffer (0,5M Tris HCl, pH 7,4 1,5M NaCl) zugeführt. Das Eluat wurde mit 5 $\mu$ l Lämmli-puffer gemischt, für 5min bei 95°C in einem Thermoblock aufgeköcht und auf ein Elektrophorese-Gel geladen. Es schloss sich ein Western Blot nach obigem Protokoll an.

## 2.8 Immunzytochemie

Die Zellen für die immunzytochemischen Versuche wurden in 24-*well*-Platten auf Deckgläschen kultiviert und transfiziert. Zur Ernte der Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen einmalig mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 20 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert, es folgten 2 weitere Waschschrte mit kaltem PBS. Die Zellmembranen wurden für 15 min mit 0,1% Saponin in PBS permeabilisiert, nochmals mit PBS gewaschen und schließlich mit 3% bovinem Serum-Albumin(BSA) in PBS für 1 Stunde bei 4°C blockiert. Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Der ungebundene Anteil des Primärantikörpers wurde für 4x15 min mit PBS ausgewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut 4x15 min mit PBS gewaschen, die Zellkerne mit DAPI 1:2000 in PBS für 2 min angefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit einem Mikroskopier-Medium auf Objektträger montiert.

## 2.9 Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie

Zellen für dieses fluoreszenzmikroskopische Verfahren wurden ebenfalls auf Deckgläschen kultiviert und mit den Fluophorkonstrukten transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit Mikroskopier-Medium auf Objektträger montiert. Die Auswertung erfolgte an einem Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss, Inc.) mit einem 63x NA 1.4 Öl-Objektiv. Die Anregung der Probe erfolgte über monochromatische Lichtblitze eines Argon-Lasers (80MHz, 457 nm mit 250 mW), deren Intensität über einen akusto-optischen Modulator reguliert wurden. Die Bilder wurden bei Raumtemperatur angefertigt. Die Bildverarbeitung und Bildberechnung wurde mit Hilfe der Da Vis software (Lavisision GmbH) durchgeführt. Die Auswertung der Intensitäts- und Lebenszeitbilder erfolgte mit laboreigenen Protokollen über das MatLab (Math Works) Programm. Die resultierenden Histogramme repräsentieren die Messwerte von 15 Zellen pro Kondition.

### **2.10 Fluoreszenzfaltungs-Assay**

CSM 14.1- oder SH-SY5Y-Zellen wurden mit der Faltungsmutante (cdYFP mit einem HA Tag) und einem Effektor (BAG1, DJ-1, etc) transient transfiziert. Hierfür wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert und 24 Stunden nach Transfektion fixiert. Zur Durchführung dieser Experimente wurde ein konfokales Mikroskop (SP2, Leica) mit einem AOBS akustooptischem Strahlteiler und einem 63x NA 1.4 Öl-Objektiv benutzt. Die Bilder wurden bei Raumtemperatur angefertigt. Zur Messung der YFP-Fluoreszenz wurden die Zellen mit einem Argon-Laser (514 nm) angeregt, die Emission wurde in einem Wellenbereich zwischen 525 und 600 nm gemessen. Die Cy5-Fluoreszenz wurde über einen Helium-Laser (633 nm) angeregt und in einem Emissionsbereich von 640 bis 750 nm gemessen. Die Cy5-Fluoreszenzkonzentration diente als Referenz der absoluten Menge an exprimierter YFP Faltungsmutante. Die Berechnung der Refaltungseffizienz erfolgte durch einfache Division der YFP-Fluoreszenz durch die Referenzfluoreszenz mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ (National Institutes of Health). Histogramme wurden aus dem Datensatz von 10 Zellen der jeweiligen Kondition berechnet.

### **2.11 Zelltod-Assay**

Zelltod wurde in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Methoden quantifiziert. Zum einen wurde ein kommerzieller Assay (ToxiLight BioAssay, Lonza) benutzt, wo die Freisetzung des Enzyms Adenylat-Kinase aus toten Zellen gemessen wird. Hierzu wurde Medium der jeweiligen Kondition 36 Stunden nach Transfektion der Zellen zur Analyse in eine Mikrotitrier-Platte überführt. Durch Zugabe einer Substratlösung konnte die Konzentration von Adenylat-Kinase als Messgröße für stattgehabten Zelltod mit Hilfe eines Luminometers (Trilux Microbeta 1450, Wallac) quantifiziert werden.

Zum anderen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie an einem Axioplan2 Mikroskop Zelltod ausgezählt. Hierzu wurden Zellen auf Deckgläschen kultiviert und entsprechend den verschiedenen Konditionen transient transfiziert. 36 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und nach Protokoll immunzytochemisch präpariert. Gezählt wurden Zellen

anhand der DAPI Färbung, deren Nucleus fragmentiert, bzw pyknotisch verändert war.  
Hierfür wurden pro Kondition 2000 Zellen gezählt.

### **3. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse**

#### **3.1 BAG1 interagiert mit DJ-1 und verändert seine Dimerbildung**

In einer Reihe von Experimenten wurde mittels Co-Immunopräzipitation die Proteininteraktion zwischen BAG1 und DJ-1 dargestellt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass überexprimiertes und endogenes Wildtyp-DJ-1, sowie die L166P-Mutante mit BAG1 interagieren. Hierzu wurde aus dem Zellysat zunächst überexprimiertes BAG1-Protein über einen Flag-Tag präzipitiert. Anschließend folgte die Detektion des interagierenden DJ-1 mittels Western Blots. In dieser Darstellung fand sich keine Präferenz im Bindungsverhalten zwischen rekombinantem und endogenem Protein. Nach Reduktion des Expressionslevels von endogenem DJ-1 durch spezifische siRNA war diese Proteininteraktion nicht mehr nachweisbar. Zusätzlich konnte im gleichen Ansatz eine zweite Proteininteraktion zwischen BAG1 und endogenem HSP70 dargestellt werden. Die BAG1-Deletionsmutante BAG $\Delta$ C wurde zur genaueren Lokalisation und Spezifität der Interaktion mit untersucht. Aufgrund der fehlenden BAG-Domäne konnte die Deletionsmutante jedoch weder an DJ-1 noch an HSP70 binden.

In einem zweiten Ansatz wurde die Proteininteraktion durch Präzipitation von BAG1 über DJ-1 geprüft. Hierdurch konnte die starke Proteininteraktion wiederum bestätigt werden. Auch in diesem Ansatz war eine Proteinbindung mit der BAG1-Deletionsmutante aufgehoben. Zusätzlich konnte eine Interaktion zwischen mutiertem DJ-1-Protein und endogenem HSP70 dargestellt werden.

Als nächstes wurde die subzelluläre Verteilung von DJ-1 in den verschiedenen Zellkompartimenten mittels Western Blot dargestellt. Durch fraktionierte Lyse der Zellen mit vier unterschiedlichen Puffern wurde zunächst die Aufteilung der Proteine in die Fraktionen Zytosol, Membranen und Organellen, Zellkern, sowie Zytoskelett ermöglicht. Die erfolgreiche Fraktionierung wurde durch Detektion spezifischer Proteine der einzelnen Kompartimente belegt. Für DJ-1 fand sich eine gleichmäßige Verteilung von Wildtyp und mutiertem Protein in den Fraktionen Zytosol, Membranen und Organellen, sowie Zytoskelett. In der nukleären Fraktion war nur die DJ-1-L166P-Mutante nachweisbar, durch Koexpression von BAG1 konnte diese nukleäre Anreicherung deutlich reduziert werden. Dieses Ergebnis



konnte auch in einer immunzytochemischen Darstellung bestätigt werden. Eine weitere Auffälligkeit fand sich in der Membran- und Organellen-assoziierten Fraktion. Zusätzlich zu den 25 kD großen Proteinbanden des DJ-1-Monomers detektierten wir eine cirka 50 kD große Bande. Aufgrund der Größe und der Antikörperspezifität gehen wir von der dimerisierten Form des DJ-1-Proteins aus. Die Koexpression von BAG1 führte zu einer stärkeren Intensität dieser zusätzlichen Proteinbande auf dem Western Blot, also zu einer signifikanten Zunahme des Dimer-Anteils von mutiertem und Wildtyp-DJ-1-Protein.

Der Einfluss von BAG1 auf die Dimerisierung von DJ-1 wurde in der Folge durch FRET/FLIM-Experimente mit DJ-1-Fluorophorproteinen (CFP und YFP als Donor- und Akzeptor-Molekül) näher beschrieben. Gemessen wurde die Abnahme der Fluoreszenzlebenszeit des Donorproteins CFP-DJ-1 als Ausdruck des zusätzlichen Energietransfers (FRET, Förster-Resonanz-Energie-Transfer) auf den Akzeptor YFP-DJ-1. Die FRET-Effizienz steht also als quantitativer Messwert für die Interaktion zwischen CFP- und YFP-gebundenem DJ-1 und beschreibt damit die Menge an dimerisiertem DJ-1. Die FRET-Effizienz war für das DJ-1-Wildtyp-Protein mit 25% deutlich höher als die der DJ-1-L166P-Mutante mit 10%. Die Koexpression von BAG1 führte zu einer starken Zunahme der FRET Effizienz des mutierten Proteins auf vergleichbare Werte des Wildtyp Proteins. Allerdings beeinflusste BAG1 auch die Dimerisierung des DJ-1 Wildtyp-Proteins, was in einer leichten Zunahme der FRET-Effizienz dieser Kondition resultierte. Grundsätzlich konnte durch diese Experimente eine Dimerbildung von DJ-1 in vivo dargestellt werden und ein Effekt von BAG1 auf den Dimerisierungsgrad von DJ-1 eindeutig belegt werden.

### **3.2 DJ-1 verfügt über Chaperon-Aktivität**

In einem Refaltungs-Assay wurde die mögliche Funktion von DJ-1 als molekulares Chaperon untersucht. Hierzu benutzten wir einen Fluoreszenz-Biosensor, mit dem die Aktivität zellulärer Chaperone gemessen werden kann (Liman et al. 2005). Der Biosensor besteht aus einem punktmutierten YFP-Fluorophor, dessen Faltung und damit Fluoreszenzeigenschaften durch die Punktmutation verhindert wird. Nach Chaperon-vermittelter Refaltung des Biosensors entsteht eine messbare Zunahme der Fluoreszenzintensität, welche als

Faltungsaktivität berechnet wird. Der Biosensor eignet sich dazu, die Induktion von Refaltung eines beliebigen koexprimierten Proteins zu prüfen. In den Experimenten wurde der YFP Biosensor mit BAG1, DJ-1 oder einem Leervektor koexprimiert. In der Kontrollgruppe mit Koexpression des Leervektors war eine sehr schwache YFP-Fluoreszenz nachweisbar. Ebenso verhielt sich Gruppe mit Koexpression des mutierten DJ-1 Proteins, was auf einen vollständigen Verlust der Faltungsaktivität des Proteins durch die Punktmutation deutet. Demgegenüber zeigte das DJ-1-Wildtyp-Protein einen signifikanten Anstieg der Faltungsaktivität. Auch die Koexpression von BAG1 erhöhte die Faltungsaktivität in der Zelle mit vergleichbaren Werten zu früheren Studien (Liman et al. 2005). Durch die Koexpression von BAG1 mit der DJ-1-L166P-Mutante und dem DJ-1-Wildtyp konnte eine sehr hohe Faltungsaktivität gemessen werden, welche die Faltungsaktivität nach alleiniger BAG1 Koexpression noch überstieg. Hierdurch konnte zum einen ein eigener Effekt von DJ-1 auf die Faltungsaktivität der Zelle im Sinne einer Chaperonfunktion belegt werden, zum anderen konnte der Funktionsverlust des mutierten DJ-1-Proteins durch die Koexpression von BAG1 wiederhergestellt werden.

### **3.3 BAG1 verhindert DJ-1-L166P-induzierten Zelltod**

Zuletzt wurde durch die Quantifizierung des Zelltods die funktionelle Relevanz der einzelnen Konditionen überprüft. Die Expression von DJ-1-Wildtyp-Protein zeigte einen durchschnittlichen Zelltod von 5% der transfizierten Zellen, vergleichbar zu den Werten der mit Leervektor transfizierten Kontrollgruppe. Die L166P-Mutante wies eine deutlich höhere Zelltodrate von 20% auf. Die Koexpression von BAG1 minderte den zytotoxischen Effekt der Mutante in dieser Kondition auf 8%.

#### 4. Literaturangaben

Andres-Mateos, E, C Perier, L Zhang, B Blanchard-Fillion, TM Greco, B Thomas, HS Ko, M Sasaki, H Ischiropoulos, S Przedborski, TM Dawson and VL Dawson (2007): DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 37, 14807-12

Bae, BI, H Xu, S Igarashi, M Fujimuro, N Agrawal, Y Taya, SD Hayward, TH Moran, C Montell, CA Ross, SH Snyder and A Sawa (2005): p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47, 1, 29-41

Bandopadhyay, R, AE Kingsbury, MR Cookson, AR Reid, IM Evans, AD Hope, AM Pittman, T Lashley, R Canet-Aviles, DW Miller, C McLendon, C Strand, AJ Leonard, PM Abou-Sleiman, DG Healy, H Ariga, NW Wood, R de Silva, T Revesz, JA Hardy and AJ Lees (2004): The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 127, 2, 420-30

Batelli, S, D Albani, R Rametta, L Polito, F Prato, M Pesaresi, A Negro and G Forloni (2008): DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS ONE* 3, 4, e1884

Blackinton, J, R Ahmad, DW Miller, MP van der Brug, RM Canet-Aviles, SM Hague, M Kaleem and MR Cookson (2005): Effects of DJ-1 mutations and polymorphisms on protein stability and subcellular localization. *Brain Res Mol Brain Res* 134, 1, 76-83

Bonifati, V, P Rizzu, F Squitieri, E Krieger, N Vanacore, JC van Swieten, A Brice, CM van Duijn, B Oostra, G Meco and P Heutink (2003a): DJ-1( PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 24, 3, 159-60

Bonifati, V, P Rizzu, MJ van Baren, O Schaap, GJ Breedveld, E Krieger, MC Dekker, F Squitieri, P Ibanez, M Joosse, JW van Dongen, N Vanacore, JC van Swieten, A Brice, G Meco, CM van Duijn, BA Oostra and P Heutink (2003b): Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 5604, 256-9

de Rijk, MC, LJ Launer, K Berger, MM Breteler, JF Dartigues, M Baldereschi, L Fratiglioni, A Lobo, J Martinez-Lage, C Trenkwalder and A Hofman (2000): Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54, 5, 21-33

Demand, J, S Alberti, C Patterson and J Hohfeld (2001): Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* 11, 20, 1569-77

Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, Forno L, Gwinn-Hardy K, Petrucelli L, Hussey J, Singleton A, Tanner C, Hardy J, Langston JW (2001): Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 50, 3, 293-300

Fearnley JM, Lees AJ (1991): Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114, 5, 2283-301

Goedert M (2001): Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies. *Clin Chem Lab Med* 39, 4, 308-12

Görner, K, E Holtorf, S Odoj, B Nuscher, A Yamamoto, JT Regula, K Beyer, C Haass, PJ Kahle (2004): Differential effects of Parkinson's disease associated mutations on stability and folding of DJ-1, *J Biol Chem* 279, 6943– 6951

Honbou, K, NN 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, 33, 31380-4

Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992): Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55, 3, 181-4

Kermer, P, M Krajewska, JM Zapata, S Takayama, J Mai, S Krajewski and JC Reed (2002): Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation. *Cell Death Differ* 9, 4, 405-13

Kermer, P, MH Digicaylioglu, M Kaul, JM Zapata, M Krajewska, F Stenner-Liewen, S Takayama, S Krajewski, SA Lipton and JC Reed (2003): BAG1 over-expression in brain protects against stroke. *Brain Pathol* 13, 4, 495-506

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, 3, 722-8

Leenders KL, Salmon EP, Tyrrell P, Perani D, Brooks DJ, Sager H, Jones T, Marsden CD, Frackowiak RS (1990): The nigrostriatal dopaminergic system assessed in vivo by positron emission tomography in healthy volunteer subjects and patients with Parkinson's disease. *Arch Neurol* 47, 12, 1290-8

Li, HM, Niki T, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H (2005): Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radic Res* 39, 10, 1091-9

Liman, J, S Ganesan, CP Dohm, S Krajewski, JC Reed, M Bahr, FS Wouters and P Kermer (2005): Interaction of BAG1 and Hsp70 mediates neuroprotectivity and increases chaperone activity. *Mol Cell Biol* 25, 9, 3715-25

Liman, J, L Faida, CP. Dohm, JC. Reed, M Bähr, P Kermer (2008): Subcellular distribution affects BAG1 function. *Brainres* 119, 8 -2 1

- Lüders, J, J Demand and J Hohfeld (2000): The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem* 275, 7, 4613-7
- Marsden CD (1990): Parkinson's disease. *Lancet* 335, 8695, 948-52
- Miller, DW, R Ahmad, S Hague, MJ Baptista, R Canet-Aviles, C McLendon, DM Carter, PP Zhu, J Stadler, J Chandran, GR Klinefelter, C Blackstone, MR Cookson (2003): L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system, *J Biol Chem* 278, 36588– 36595
- Moore, DJ, L Zhang, TM Dawson and VL 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, 6, 1558-67
- Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, Suda K, Mizuno Y (1998): Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 51, 3, 890-2
- Olzmann, JA, K Brown, KD Wilkinson, HD Rees, Q Huai, H Ke, AI Levey, L Li and LS Chin (2004): Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem* 279, 9, 8506-15
- Olzmann, JA, JR Bordelon, EC Muly, HD Rees, AI Levey, L Li and LS Chin (2007): Selective enrichment of DJ-1 protein in primate striatal neuronal processes: implications for Parkinson's disease. *J Comp Neurol* 500, 3, 585-99
- Planchamp, V, C Bermel, L Toenges, T Ostendorf, S Kuegler, JC Reed, P Kermer, M Baehr and P Lingor (2008): BAG1 promotes axonal outgrowth and regeneration in vivo via Raf-1 and reduction of ROCK activity. *Brain* 131, 2606-2619
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC (1996): Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274, 1197-9
- Sondermann, H, C Scheufler, C Schneider, J Hohfeld, FU Hartl and I Moarefi (2001): Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* 291, 5508, 1553-7
- Taira, T, Y Saito, T Niki, SM Iguchi-Ariga, K Takahashi and H Ariga (2004): DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5, 2, 213-8
- Takayama, S, T Sato, S Krajewski, K Kochel, S Irie, JA Millan and JC Reed (1995): Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 2, 279-84

Takayama, S, DN Bimston, S Matsuzawa, BC Freeman, C Aime-Sempe, Z Xie, RI Morimoto and JC Reed (1997): BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J* 16, 16, 4887-96

Townsend, PA, RI Cutress, A Sharp, M Brimmell and G Packham (2003): BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Biochim Biophys Acta* 1603, 2, 83-98

Wilson, MA, JL Collins, Y Hod, D Ringe and GA Petsko (2003): The 1.1-A resolution crystal structure of DJ-1, the protein mutated in autosomal recessive early onset Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 16, 9256-61

Xia, J, DH Lee, J Taylor, M Vandelft and R Truant (2003): Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet* 12, 12, 1393-403

## **5. Kopie der Publikation**

**J Cell Biol. 2010 Feb 22; 188(4):505-13  
innerhalb der Dissertation Seite 22-30**

**BAG1 restores formation of functional DJ-1 L166P dimers and DJ-1 chaperone activity**

**S. Deeg<sup>1</sup>, M. Gralle<sup>2</sup>, K. Sroka<sup>1</sup>, M. Bähr<sup>1,3</sup>, F.S. Wouters<sup>2,3\*</sup>, P. Kermer<sup>1,3\*</sup>**

1 Department for Neurology, Georg-August University Goettingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen, Germany

2 Laboratory for Molecular and Cellular Systems, Dept. of Neuro- and Sensory Physiology, Georg-August University Goettingen, Humboldtallee 23, 37073 Göttingen, Germany

3 DFG Research Center for Molecular Physiology of the Brain (CMPB), Göttingen, Germany

\*contributed equally