

**Alternatives Spleißen von BAG6
verändert die Zytoskelett-Architektur
und die epithelial-mesenchymale-
Transition in humanen Zellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von:

Maximilian Thomas Schilling

aus

Neuwied

Bonn, 2018

Die vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung Immunbiologie am Institut für Genetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Prof. Dr. Norbert Koch angefertigt.

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert Koch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2018

Erscheinungsjahr: 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Die Bedeutung von alternativem Spleißen für die Biodiversität.....	3
1.2 Regulation des alternativen Spleißens	5
1.3 Genomische Organisation von <i>bag6</i>	6
1.4 BAG6 und alternatives Spleißen	7
1.5 Die BAG-Domäne und -Proteinfamilie	9
1.6 Funktionelle Domänen von BAG6	10
1.7 Funktion und Lokalisation von BAG6.....	12
1.8 Alternatives Spleißen als Ursache für Krankheiten.....	13
1.9 Auswirkungen von alternativem Spleißen auf die Zellmorphologie	14
1.10 Der potenzielle Einfluss von BAG6 auf die Zellmorphologie	14
1.11 Die Beziehung zwischen Zellmorphologie und Zytoskelett	15
1.12 Die Bedeutung von BAG-Proteinen in der Tumorbildung.....	16
2 Ergebnis.....	19
2.1 Steuerung der BAG6-Lokalisation	19
2.1.1 Lokalisation von BAG6-Spleißvarianten in HEK-Zellen.....	19
2.1.2 Lokalisation von BAG6-Spleißvarianten in IMR90S-Zellen	23
2.1.3 Einfluss des Spleißens von ex24 auf das Kernlokalisierungssignal von BAG6	27
2.1.4 Charakterisierung der Kernexportsequenz (NES) von BAG6.....	30
2.2 Die Bedeutung von BAG6 Exon 24 für die Zellmorphologie.....	33
2.2.1 Die zelllichteabhängige Expression von BAG6-Spleißvarianten beeinflusst die Zellmorphologie	33
2.2.2 Krankheitsassoziierte SNPs in BAG6 beeinflussen das Spleißen von ex24	36
2.2.3 Der Einfluss eines BAG6 KO und -Spleißvarianten auf Zellmorphologie und Aktin-Zytoskelett	40
2.2.4 Der Einfluss von BAG6-Spleißvarianten auf das Mikrotubuli-Zytoskelett	45
2.2.5 Die Bedeutung von BAG6-Spleißvarianten für die Morphologie von nicht-invasiven MCF-Zellen	48
2.2.6 Die Bedeutung von BAG6 für die Morphologie von invasiven MDA-Zellen	52
2.2.7 BAG6 beeinflusst das Koloniewachstum von Zellen im "Soft-agar-assay"	55
2.2.8 Morphologische Veränderungen durch Zytokinbehandlung von IMR90S-Zellen sind BAG6-abhängig.....	58
2.3 BAG6 beeinflusst die Zytoskelett-Dynamik.....	61
2.3.1 BAG6 beeinflusst die Aktin-Polymerisation	61
2.3.2 Ein BAG6 KO reduziert die zelllichteabhängige Veränderung der H3K27-Methylierung	66
2.3.3 Der Zusammenhang zwischen der Adhäsionsmolekül-Prozessierung und	

H3K27-Methylierung	69
2.3.4 BAG6 Δ ex24 erhöht die Bildung von zytoplasmatische Brücken und den Proteinaustausch zwischen Zellen mit unterschiedlichen BAG6-Spleißvarianten.....	74
2.4 Der Einfluss von BAG6 auf Migration und Zellzyklus	79
2.4.1 Die Zellmigration ist abhängig von der BAG6-Expression	79
2.4.2 Ein BAG6 KO in IMR90S-Zellen verhindert die korrekte Ausrichtung des Zellkerns in Migrationsrichtung	82
2.4.3 Ein BAG6 KO verringert die Abbau-Geschwindigkeit von primären Zilien.....	85
2.4.4 BAG6 zeigt eine zentrosomale Akkumulation während des Zellzyklus	88
2.4.5 Ein BAG6 KO führt zur fehlerhaften Orientierung des Spindelapparats während der Mitose.....	91
3 Diskussion	95
3.1 BAG6-Spleißvarianten in EMT, Tumorentwicklung und Diabetes.....	95
3.2 Die zellulären Funktionen von BAG6.....	103
3.3 Die Bedeutung von ex24 für die Lokalisation und die BAG-Domäne von BAG6 105	
3.4 Eine evolutionäre Betrachtung der BAG6 ex24-Spleißvarianten.....	109
4 Material und Methoden.....	113
4.1 Geräte, Materialien und Reagenzien	113
4.1.1 Allgemeine Geräte	113
4.1.2 Zentrifugen.....	114
4.1.3 Materialien	115
4.1.4 Reagenzien und Medien	116
4.1.5 Enzyme	118
4.1.6 Kommerzielle Kits	118
4.1.7 Antikörper.....	119
4.1.8 Plasmide	121
4.1.9 Bakterienstämme	122
4.1.10 Zelllinien.....	123
4.1.11 Datenbanken und Software.....	124
4.2 Molekularbiologische Methoden	125
4.2.1 Zelllinien.....	125
4.2.2 Zellwachstum bei verschiedenen Zelldichten	125
4.2.3 Genomische DNA Isolation.....	125
4.2.4 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	125
4.2.5 cDNA-Herstellung	125
4.2.6 PCR (Polymerase Ketten-Reaktion).....	126
4.2.7 qPCR	126
4.2.8 Bakterienkultur	127
4.2.9 Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien.....	127
4.2.10 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien	127

4.2.11	Restriktionsverdau	127
4.2.12	Agarosegel-Elektrophorese	128
4.2.13	Plasmid-Extraktion aus Agarosegelen	128
4.2.14	Ligation von DNA-Fragmenten	128
4.2.15	Erzeugung von fluoreszenzmarkierten <i>bag6</i> -Konstrukten	128
4.2.16	Mutations-PCR.....	129
4.2.17	NES-Mutation bzw. -Deletion von BAG6.....	129
4.2.18	Konstruktion von BAG6 NLS-Mutanten	129
4.2.19	Konstruktion von <i>bag6</i> ex24-Spleißsensor-Konstrukts	129
4.2.20	Transfektion von eukaryotischen Zellen	130
4.2.21	Erzeugung von stabilen Zelllinien	130
4.2.22	Erzeugung eines BAG6 " <i>knock outs</i> " (KO).....	131
4.2.23	Herstellung von Zelllysaten	131
4.2.24	Reduzierende SDS-PAGE.....	132
4.2.25	Westernblot und Antikörperfärbung	132
4.2.26	Immunfluoreszenzfärbung	132
4.2.27	Immunfluoreszenzfärbung für die Durchfluss-Zytometrie.....	133
4.2.28	Immunpräzipitation	133
4.2.29	" <i>Hanging drop assay</i> "	133
4.2.30	" <i>Soft agar assay</i> "	134
4.2.31	" <i>Scratch assay</i> "	134
4.2.32	Vergleich der Aktin-Polymerisations-Dynamik in IMR90S-Zellen	134
4.2.33	Bildanalyse.....	134
5	Tabellenverzeichnis.....	136
6	Abbildungsverzeichnis.....	137
7	Literaturverzeichnis.....	139

Abkürzungsverzeichnis

+ex24	BAG6 mit Exon 24
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphate
AS	Aminosäuren
BAG	Bcl-2 assoziiertes Athanogen (<i>Bcl-2 associated athanogene</i>)
bp	Basenpaare
CRISPR/Cas	gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)/Cas (<i>CRISPR-associated</i>)-Endonuklease
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
EMT	epithelial-mesenchymale-Transition
EpCAM	Epitheliales Zell Adhäsions Molekül (<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
ERM-Proteine	Ezrin, Radixin und Moesin
ESTs	expressed sequence tags
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>Forward scatter</i>)
G-Aktin	Globuläres Aktin
H3K27me3	Histon 3 an Lysin Position 27 Trimethylierung
H3K36me3	Histon 3 an Lysin Position 36 Trimethylierung
H3K9A	Histon 3 an Lysin Position 9
H3K9me2	Histon 3 an Lysin Position 9 Dimethylierung
HLA	Human leukocyte antigen
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
Hsp70	Hitzeschock-Protein 70
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
mCherry	Rot fluoreszierendes Protein (<i>Modified cherry fluorescent protein</i>)
MET	mesenchymal-epitheliale-Transition

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum (<i>Microtubule organizing center</i>)
NES	Kernexportsignal (<i>Nuclear export signal</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>Nuclear localization signal</i>)
nt	unbehandelt (<i>not treated</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PRR	prolinreiche Region
PXXP-Motiv	Polyprolin-reiches Motiv
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sgRNA	small guide RNA
SH3-Domäne	Src-homology 3-Domäne
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SR-Protein	Serine/Arginine-reiches Protein
SRSF	Serine und Arginin reicher Spleißfaktor
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Side scatter</i>)
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TPM	Transkripte pro Millionen kb Transkript
UBL	Ubiquitin-ähnliche Domäne (<i>Ubiquitin like domain</i>)
UPR	Ungefalteter Proteinstress (<i>Unfolded protein stress</i>)
UTR	untranslatierte Region
wt	Wildtyp
Δex24	BAG6 ohne Exon 24

Zusammenfassung

Das menschliche Genom gewinnt durch alternatives Spleißen an zellulärer Proteinkomplexität. Für mehrere Vertreter der BAG-Proteinfamilie sind bisher Spleißvarianten bekannt, die sich in ihrer Wirkung auf die zelluläre Homöostase deutlich voneinander unterscheiden. Im Fall von *bag6* findet alternatives Spleißen insbesondere innerhalb der funktionellen BAG-Domäne statt, es fehlen aber weitergehende Studien zu der Bedeutung der einzelnen Spleißvarianten.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einzelner BAG6-Spleißvarianten auf das Wachstum humaner Zellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden mittels CRIPR/Cas9 verschiedene *bag6* KO-Zelllinien hergestellt und mit fluoreszierenden BAG6-Spleißvarianten rekonstituiert. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Westernblot wurde die Auswirkung der BAG6-Varianten auf die Zellmorphologie und insbesondere auf das Zytoskelett sowie auf damit assoziierte Zellfunktionen untersucht.

Die durch Spleißen hervorgerufene Deletion innerhalb der BAG-Domäne von BAG6 führte zu einer Dysfunktion des Kernlokalisierungssignals. Aus der dadurch veränderten zellulären Lokalisation von BAG6 ergaben sich drastische morphologische Veränderungen. Die Expression der kernlokalisierten +ex24-Variante resultiert in einer epithelialen, die der Δ ex24-Variante in einer mesenchymalen Zellmorphologie und veränderter Zell-Zell-Adhäsion und Migration. Es zeigte sich, dass die ex24-Sequenz zelldichteabhängig gespleißt wird, wobei der Verlust der ex24-kodierten BAG-Sequenz mit einer Veränderung der Histonmodifikation einherging. Experimente mit BAG6-Spleißsensor-Konstrukten zeigten, dass beschriebene Polymorphismen in einem Intron von *bag6* die korrekte zelldichteabhängige Spleißregulation beeinflussen.

Als Ergebnis dieser Arbeit wurden molekulare Grundlagen dafür entdeckt, wie das Spleißen von *bag6* die Zellmorphologie und damit verbundene Funktionen humaner Zellen steuert, welche auch relevant für die Tumorbildung sind.

1 Einleitung

Die korrekte dreidimensionale Faltung von Proteinen ist von essentieller Bedeutung für ihre zelluläre Funktion. Chaperone (Englisch für "Anstandsdamen") sind Proteine, die die korrekte Proteinfaltung gewährleisten und so Zellen vor der schädlichen Wirkung falschgefalteter Proteine und funktionsuntüchtiger Proteinaggregate schützen. Beteiligt an diesem Prozess sind auch Vertreter der BAG-Proteinfamilie. Über die namensstiftende BAG-Domäne modulieren sie u.a. die Funktion von Chaperone, wie die Hitzeschock-Proteine (z.B. Hsp70).

Ein Vertreter der BAG-Proteinfamilie ist BAG6 (BCL2 assoziiertes Athanogen 6; VHLA-B assoziiertes Transkript 3; BAT3; Scythe). Bisherige Studien weisen eine Funktion von BAG6 in diverse zellulären Prozessen nach, wie z.B. Apoptose, Chromatin-Modifikation, Proteinabbau, Proteintranslokation, Rezeptoraktivierung und Zellzyklus-Regulation (Kawahara et al., 2013). Mäusen ohne *bag6* sind nicht lebensfähig (Desmots et al., 2005) und im Menschen ist eine Dysregulation von BAG6 mit diversen Erkrankungen und Tumorwachstum assoziiert (Calderon-Gonzalez et al., 2015). So weitgefächert und essentiell die Bedeutung von BAG6 ist, so wenig ist bisher darüber bekannt, wie dieses Funktionsspektrum reguliert wird.

1.1 Die Bedeutung von alternativem Spleißen für die Biodiversität

Dass ein einzelnes Gen wie *bag6* so unterschiedliche, biologische Funktionen besitzt, mag zuerst verwundern, Studien zeigen aber, dass dies, bezogen auf das menschliche Genom, eher die Regel ist. Erste Schätzungen gingen von 120 000 Genen im menschlichen Genom aus (Liang et al., 2000) und Wissenschaftler waren überrascht als schließlich nur 20 000 proteinkodierende Gene gefunden wurden. Auch im Vergleich mit primitiveren Tier- und Pflanzenarten war dies eine unerwartet geringe Anzahl an Genen, die letztendlich nur zwei Prozent des Genoms ausmachen. Mittlerweile wird die Diskrepanz zwischen Gen- und Proteininformation mit der regulatorischen Funktion der nicht-proteinkodierenden Bereiche erklärt. Ein wichtiger Teil dieser Regulation betrifft das alternative Spleißen. Alternatives Splei-

ßen erlaubt aus einem Gen unterschiedliche, funktionelle Genprodukte zu erzeugen. Dieses Prinzip entwickelte sich parallel mit der zunehmenden Komplexität der Eukaryonten (Nilsen und Graveley, 2010). In Menschen lässt sich alternatives Spleißen für 95 % aller Multi-Exon-Gene nachweisen (Pan et al., 2009), so auch bei *bag6* (Kämper et al., 2012 a). Somit könnte alternatives Spleißen eine mögliche Erklärung für die große Bandbreite der nachgewiesenen BAG6-Funktionen sein.

Alternatives Spleißen findet im Zuge der RNA-Prozessierung statt, nachdem die genetische Information im Kern von der DNA (*deoxyribonucleic acid*) in pre-mRNA (*pre messenger ribonucleic acid*) umgeschrieben wurde. Beim basalen Spleißen werden nicht-proteinkodierende Introns herausgeschnitten, dadurch entsteht die reife mRNA, die ausschließlich aus Exons besteht. Beim alternativen Spleißen wird darüber hinaus die Exon-Abfolge verändert (Abbildung 1). So können Exons ausgelassen, Exons oder Introns eingefügt oder alternative Spleißstellen verwendet werden. Als Konsequenz ergeben sich so Alternativen für Translationsstart und -stopp, Poly-Adenylierung, den UTRs (untranslatierte Region) und der Anwesenheit von funktionellen Domänen. Im Gegensatz zu Genpromotoren, die die Quantität von Proteinen steuern, steuert alternatives Spleißen die Eigenschaften des betreffenden Proteins, also die funktionelle Qualität.

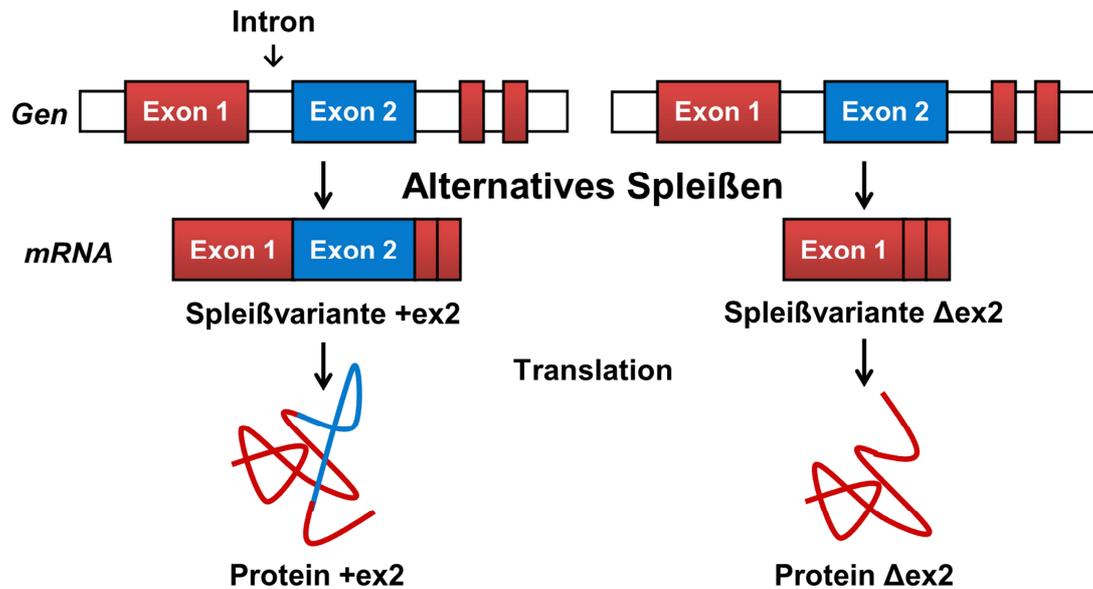


Abbildung 1: Zunahme der Proteinvierfalt durch alternatives Spleißen.

Durch alternatives Spleißen eines Genprodukts können einzelne, proteinkodierende Exons aus der pre-mRNA (*pre messenger ribonucleic acid*) entfernt werden. Die aus den unterschiedlich gespleißten mRNAs (Spleißvariante +ex2 bzw. Δex2) translatierten Proteine unterscheiden sich in ihrer Größe und Sequenz. Während ein Protein Exon2 enthält (blau hervorgehoben), fehlt dem alternativ gespleißten Protein Δex2 diese Sequenz.

1.2 Regulation des alternativen Spleißens

Alternatives Spleißen kann die Funktion einzelner Proteine stark verändern (Birzele et al., 2088). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer komplexen Regulation. Zum einen fungieren *cis*-wirkende Elemente in der Nukleotidsequenz von Exons oder Introns der pre-mRNA als Spleiß-Enhancer oder -Silencer, zum anderen fungieren *trans*-wirkende Proteine wie heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs), Serine/Arginine-reiche Proteine (SR-Proteine) und weitere RNA-bindende Proteine als Regulatoren. Dabei kann das *trans*-wirkende Protein durch seine Bindung entscheiden, ob das *cis*-wirkende Element die Spleiß-Wahrscheinlichkeit erhöht oder verringert. Als Spleiß-Silencer (= Spleißverminderer) fungieren meist hnRNPs, als Spleiß-Enhancer (= Spleißverstärker) SR-Proteine, die sich wiederum gegenseitig verdrängen können. Weitere Komplexität ergibt sich aus der Beobachtung, dass *trans*-wirkende Spleißregulatoren selbst alternativ gespleißt oder auf andere Art reguliert werden können. Die zelluläre Abundanz von unterschiedlichen *trans*-wirkenden Elementen

ist u.a. abhängig von Zelltyp, Zellzyklusstatus und der Zelldifferenzierung. Andere Faktoren, die sich auf das alternative Spleißen auswirken können, sind die posttranslationale Modifikation von Spleißfaktoren und die Chromatin-Organisation bzw. Histon-Modifikation am Transkriptionsort. Für *bag6* konnte alternatives Spleißen nachgewiesen werden (Kämper et al., 2012 a). Unter welchen Bedingungen dies *in vivo* geschieht und mit welcher Auswirkung auf die zelluläre Funktion von BAG6, ist bisher nicht tiefergehend untersucht.

1.3 Genomische Organisation von *bag6*

Erstmals beschrieben wurde *bag6* 1989 (Spies et al., 1989) und bereits ein Jahr später konnte eine vollständige Sequenz bestimmt werden (Banjeri et al., 1990). Das Gen *bag6* liegt in der MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex; *Major histocompatibility complex*) Klasse III Region (Genlokus 6p21.33) und besitzt eine ungefähre Größe von 22 kb (Kilobasen). Exprimiert wird BAG6 ubiquitär, also in allen Gewebstypen und Zellen. Dabei liegt die durchschnittliche mRNA-Abundanz im menschlichen Gewebe relativ hoch bei 20 Transkripten pro Millionen kb Transkript (TPM; *Genotype-Tissue Expression project*) und am höchsten im Testis mit 140 TPM (vgl. durchschnittliche β -Aktin mRNA-Abundanz 2000 TPM). Die mRNA von *bag6* besteht aus bis zu 26 Exons, wovon das gesamte erste Exon die 5'-UTR bildet, und einer relativ kurzen 3'-UTR (Abbildung 2). Die *bag6*-mRNA wird alternativ gespleißt insbesondere Exon 5, 11b und 24, was zur Bildung unterschiedlicher BAG6-Proteine führt (Kämper et al., 2012). Das Spleißmuster von BAG6 unterscheidet sich dabei zwischen unterschiedlichen Zelllinien (Kämper et al., 2012a) und Geweben (Luce et al., 2016).

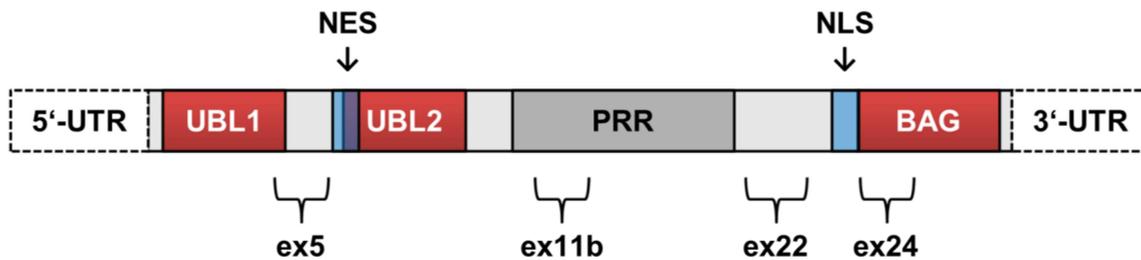


Abbildung 2: Schematische Darstellung der *bag6*-mRNA.

Die *bag6*-mRNA mit untranslatierten Bereichen (5'- und 3'-UTR) kodiert für mehrere, funktionelle Domänen: Ubiquitin-ähnliche Domänen (UBL1 und UBL2), Prolinreiche Region (PRR) und BCL2 assoziierte Athanogen-Domäne (BAG). Die beiden Lokalisierungssignale, das potenzielle Kernexportsignal (NES, siehe Desmots et al., 2007) und das Kernlokalisierungssignal (NLS, siehe Manchen und Hubberstey, 2001), sind blau gefärbt. Die Lage alternativ spleißbarer Exons (ex5, ex11b, ex22, ex24) ist durch Klammern indiziert.

1.4 BAG6 und alternatives Spleißen

Die Tatsache, dass sich Zelllinien und Gewebe mit unterschiedlichen Eigenschaften stark im Spleißmuster von *bag6* unterscheiden, weist bereits auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einzelnen BAG6-Spleißvarianten und einer spezifischen, zellulären Funktion hin. Was passiert, wenn dieses Muster gestört ist, zeigen Studien zu *bag6* auf genomischer Ebene. Hier existiert ein Zusammenhang zwischen sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in *bag6* und einer erhöhten Gefahr der Krebsentstehung (Chen et al., 2014; Zhao et al., 2014; Etokeben et al., 2015 b). Interessanterweise fallen nicht alle krankheitsassoziierten SNPs in den Promotor-Bereich von *bag6* (was eine Dysregulation der BAG6-Gesamt-Proteinmenge vermuten ließe) oder führen zu Veränderungen in der späteren Aminosäure-Sequenz (was einen Funktionsverlust vermuten ließe), sondern es sind stille Mutationen, die teilweise in nicht proteinkodierenden Introns liegen (Sirota et al., 2009). Hier könnten SNPs eine Auswirkung auf das alternative Spleißen haben (Ward und Cooper, 2010), was bereits eine hinreichende Ursache für die Tumorbildung sein kann (Shkreta et al., 2013). Erste Studien weisen neben krankheitsassoziierten SNPs in *bag6* auch auf einen direkten Zusammenhang zwischen alternativen Spleißprodukten von *bag6* bei Autismus (Stamova et al., 2013), Diabetes (Kaminska et al., 2016) bzw. der Tumorbildung hin (Loiselle et al., 2016). Ein SNP (*rs10484558*) in Exon 7 von BAG6 führt vermutlich zu verändertem

Bindeverhalten der Spleißfaktoren SRSF1 und SRSF5 (Serine und Arginin reiche Spleißfaktoren 1 und 5), was zu einer erhöhten Abstoßung nach Stammzelltransplantation führt (Piras et al., 2014). In Mäusen unterscheidet sich das Spleißmuster von BAG6 (und auch SRSF5) zwischen Mikroglia und Makrophagen nach Infektion mit einem abgeschwächten Bakterium (Gonzalez-Pena et al., 2016).

Trotz dieser ersten Hinweise, dass unterschiedliche BAG6-Spleißvarianten einen entscheidenden Einfluss auf Zellwachstum und -metabolismus haben, fehlen Studien inwiefern einzelne BAG-Spleißvarianten dafür verantwortlich sind. Dabei wäre dieses Wissen gerade in Hinsicht auf die Assoziation von BAG6 mit diversen Krankheiten wichtig für effektive Therapien.

1.5 Die BAG-Domäne und -Proteinfamilie

BAG6 gehört zur BAG-Proteinfamilie, wie BAG1 (L, M und S), BAG2, BAG3, BAG4 und BAG5, wobei alle Proteine eine C-terminale BAG-Domäne charakterisiert, BAG5 sogar vier (Abbildung 3). BAG6 zeichnet sich innerhalb der BAG-Proteinfamilie durch seine Proteingröße und Domänen-Architektur aus. So besitzt nur BAG6 eine prolinreiche Region (PRR).

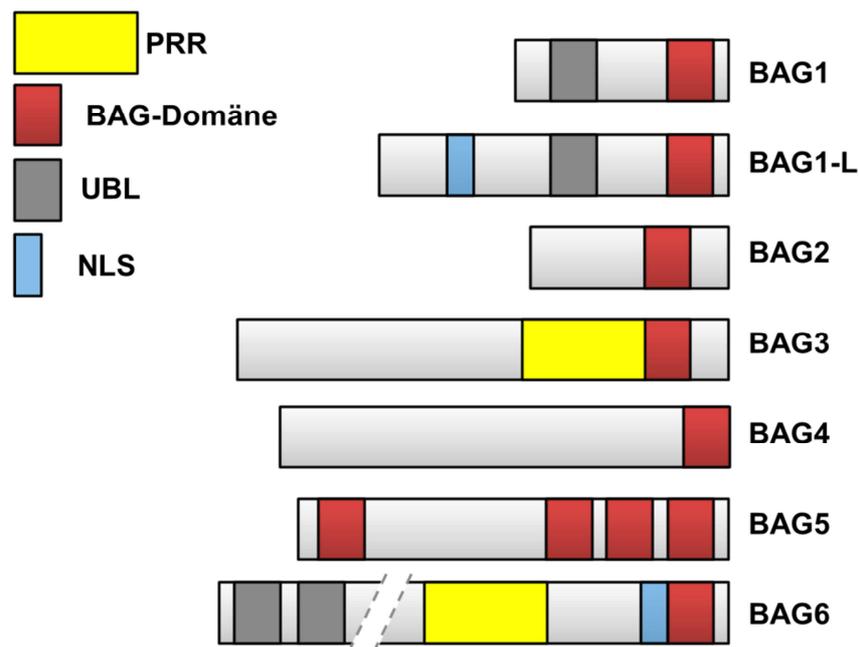


Abbildung 3: Domänen-Architektur der BAG-Proteinfamilie.

Dargestellt sind die humanen Vertreter der BAG-Proteinfamilie BAG1 bis BAG6. Indizierte Domänen sind: PRR (prolinreiche Region), BAG-Domäne, UBL (Ubiquitin-ähnliche Domäne) und NLS (Kernlokalisierungssignal). (adaptiert von Behl, 2016)

Die Bedeutung der für die BAG-Proteinfamilie namensgebende BAG-Domäne zeigt sich in ihrer evolutionären Konservierung bis hinunter zur Hefe (Doong et al., 2002). Sie besteht aus drei antiparallelen α -Helices aus jeweils 30-40 Aminosäuren (siehe BAG6 BAG-Domäne Abbildung 4). Dabei muss eine Protein-Protein-Interaktion mittels der BAG-Domäne nicht über alle drei α -Helices stattfinden. Für eine energieabhängige Interaktion mit der ATPase-Domäne von Hsp70 sind z. B. die beiden letzten Helices ausreichend (Doong et al., 2002). Alternative Spleißstellen überschneiden sich mit der Lage der einzelnen α -Helices in BAG6.

Inwiefern sich alternatives Spleißen auf die Funktion einzelner Vertreter der BAG-Proteinfamilie auswirkt wurde bisher nicht hinreichend untersucht.

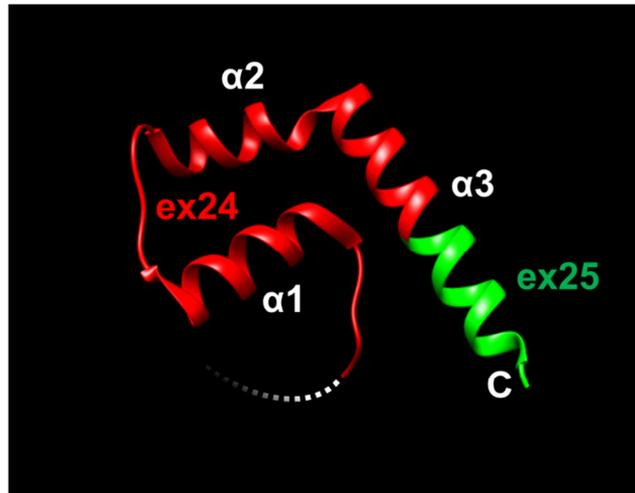


Abbildung 4: BAG-Domäne von BAG6.

Dreidimensionale Darstellung der BAG-Domäne von BAG6 nach Kuwabara et al., 2015. Exon 24 (ex24) ist rot gefärbt und Exon 25 (ex25) am C-Terminus (C) grün. Die drei α -Helices der BAG-Domäne sind gekennzeichnet (α 1-3).

1.6 Funktionelle Domänen von BAG6

Das BAG6-Protein hat eine Größe von ungefähr 120 kDA und ist in der Lage Homooligomere zu bilden (Xu et al., 2013). Die Bildung der Oligomere findet über eine prolinreiche Region (PRR) in der Mitte von BAG6 statt (Abbildung 3), was die funktionelle Komplexität erhöht. Des Weiteren fungiert die PRR als Holdase-Domäne und bindet an hydrophobe Regionen defekter, ribosomaler Proteine (Wang et al., 2011). Dort binden auch funktionelle Proteine wie das Insulator-Protein CTCFL (*CCCTC-binding factor like*) (Nguyen et al., 2008) und das Testis-spezifische Protein PXT1 (Peroxisomal testis enriched protein 1) (Kaczmarek et al., 2011). In der Mitte von BAG6, und dort insbesondere in der PRR, befinden sich mehrere potenzielle Polyprolin-reiche Motive (PXXP-Motive) zur Bindung an SH3 (*Src-homology 3*)-Domänen (Behl, 2016). Ein PXXP-Motiv in BAG6 konnte bereits experimentell bestätigt werden (Okada et al., 2011), existiert aber nicht in allen Spleißvarianten (nicht in Varianten mit Exon 11b). Für BAG3, einen anderen Vertreter der BAG-Proteinfamilien, konnte gezeigt

werden, dass über PXXP-Motive Proteine mit SH3-Domänen gebunden werden (Kassis et al., 2006; Leznicki et al., 2015), z.B. das Motorprotein Dynein (Gamerding et al., 2011). Am N-Terminus besitzt BAG6 zwei Ubiquitin-ähnliche Domänen (UBLs) (Kikukawa et al., 2005), die wichtig für den Abbau falsch lokalisierter oder defekter, proteasomaler Substrate sind (Minami et al., 2010). Über diesen N-Terminus kann BAG6 direkt an das Proteasom (Kikukawa et al., 2005; Leznicki et al., 2015) sowie über gp78 und UbxD8 an das endoplasmatische Retikulum (ER) binden (Xu et al., 2013). Aufgrund dieser Eigenschaften ist BAG6 innerhalb des Bag6-Ubl4A-Trc35 Komplexes wichtig für eine effiziente, ER-assoziierte Degradation (ERAD). BAG6 verhindert somit nicht nur Bildung von Aggregaten falschgefalteter Proteine durch seine Holdase- bzw. Chaperon-unterstützenden Funktionen (Wang et al., 2011), sondern fungiert darüber hinaus als Plattform für einen effizienten, proteasomalen Abbau.

In direkter Nähe der UBLs befindet sich ein potentielles Kernexportsignal (NES) (Desmots et al., 2007). Eine NES ist meist ein LxxxLxxLxL-Motiv, wobei "L" eine hydrophobe Aminosäure ist (meist Leucin) und kann an Exportine binden, die einen Transport durch die Kernporen ins Zytosol vermitteln. Bei einer Proteinbindung an die UBLs könnte die benachbarte NES maskiert werden, was sich auf die BAG6-Lokalisation auswirken würde.

Neben der BAG-Domäne liegt am C-Terminus ein klassisches, zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (NLS) genau am Ende von Exon 23 (Manchen und Hubberstey, 2001). Eine klassische NLS besteht aus einer ein- oder zweiteiligen Sequenz, hauptsächlich aus positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin, die für den Importin-vermittelten Kernimport nötig sind. Für andere Proteine konnte gezeigt werden, dass die angrenzende Aminosäure-Sequenz die Stärke einer NLS verändern kann (Efthymiadis et al., 1997; Hodel et al., 2001). Inwiefern dies auf die NLS von BAG6 zutrifft, die direkt vor dem alternativ gespleißten Exon 24 liegt, ist bisher nicht untersucht worden. Vor der NLS liegt außerdem eine Caspase3-

Schnittstelle (DEQD) (Wu et al., 2004). Kommt es zur Abtrennung des C-terminalen Fragments durch Caspase3, führt dies zur Translokation des NLS-beinhaltenen BAG6-Fragments in den Kern und schließlich zur Apoptoseinduktion (Wu et al., 2004). Schon die Expression des C-Terminus allein kann Apoptose-induzierend wirken (Thress et al., 1998). Eine Proteinbindung von Trc35 an die BAG-Domäne von BAG6 maskiert die NLS und beeinflusst so die Lokalisation des Proteinkomplexes sowie weitere Proteinbindung (Wang et al., 2011).

1.7 Funktion und Lokalisation von BAG6

Die Lokalisation von BAG6 innerhalb der Zelle ist nukleär und zytosolisch, abhängig von Zelltyp (Kämper et al., 2012 a), Zellzyklus (Yong und Wang, 2012) und unterschiedliche Stimuli wie Zytokine (Kämper et al., 2012 b) und DNA-Schäden (Krenciute et al., 2013). Unter gewissen Stressbedingungen kann BAG6 auch in Exosomen nachgewiesen werden und als Ligand für den Rezeptor NKp30 fungieren (Pogge von Strundmann et al., 2007). Die Ursache der so verschiedenen BAG6-Lokalisationen dürfte in dem weiten Spektrum der zellulären Funktionen von BAG6 zu suchen sein.

Neben der ausführlicher untersuchten Rolle von BAG6 im zytosolischen Proteinabbau sind die Funktionen von BAG6 innerhalb des Zellkerns weniger gut charakterisiert. Hier ist bisher nur der Proteintransport in den Kern (Sebti et al., 2014; Kämper et al., 2012 b) und eine Funktion als Plattform für die effiziente Interaktion anderer Kernproteine miteinander beschrieben (Nguyen et al., 2008).

Dass BAG6 an wichtigen Zellfunktionen beteiligt ist, ergibt sich auch aus einer hohen Konservierung von BAG-Proteinen von der Hefe (Sondermann et al., 2002) über das gesamte Tierreich bis hin zu Pflanzen (Doukhanina et al., 2006). *bag6* "knock-out" Mäusen sind nicht lebensfähig und zeigen Zelldifferenzierungs-Defekte (Desmots et al., 2005). Aus der essenti-

ellen Bedeutung von *bag6* resultiert auch eine starke Krankheitsassoziation, wie z.B. mit Arthritis (Etokebe et al., 2015 a), Diabetes (Kaminska et al., 2016), und Infektions- (Grover und Izzo, 2012) und Autoimmunerkrankungen (Hsieh et al., 2010). Einen Einfluss auf die Tumorbildung in unterschiedlichen Geweben wurde bereits mehrfach diskutiert (Calderon-Gonzalez et al., 2015; Wang et al., 2008; Etokebe et al., 2015 b). In Brusttumoren ist eine höhere BAG6-Expression mit einer verkürzten, metastasenfrenen Überlebenszeit assoziiert (Shipitsin et al., 2007). BAG6 ist dabei vermehrt in den Brustkrebszellen zu finden, die Stammzellmarker tragen und eine Metastasierung initiieren, weniger in den Zellen die später den größeren Anteil der Metastasenmasse ausmachen.

1.8 Alternatives Spleißen als Ursache für Krankheiten

Eine Dysregulation des alternativen Spleißens hat oft ernste Folgen für den Organismus und äußert sich in unterschiedlichen Krankheiten. Hierbei ist zwischen der fehlerhaften Funktion von Spleißstellen sowie *cis*- und *trans*-wirkenden Elementen zu unterscheiden. Mutationen, die das Spleißen einzelner Gene beeinträchtigen, sind vermutlich für 60 % der erblichen Erkrankungen verantwortlich (López-Bigas et al., 2005). Für *bag6* wird diese Hypothese für den SNP *rs10484558* diskutiert (Piras et al., 2014). Dieser SNP führt zur erhöhten Abstoßung nach Knochenmark-Transplantationen und zerstört einen Spleiß-Enhancer für SRSF3 in Exon 7 ohne Einfluss auf die Aminosäuresequenz von BAG6.

Sind Spleißfaktoren betroffen hat dies meist globale Auswirkungen aufgrund ihres weiten Spektrums an Zielgenen. Hier zu nennen sind insbesondere neurologische Störungen (Dredge et al., 2001; Arnold et al., 2013) und Tumorbildung (Anczuków et al., 2012; Zhang et al. 2013). Die Ursache für das veränderte Spleißmuster von Tumoren liegt darin, dass während der Tumorprogression grundlegende Entwicklungsprogramme der Zellen ausgenutzt werden (Shapiro et al., 2011). So steuert das alternative Spleißen die Zellpluripotenz bzw. -differenzierung sowie die epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) bzw. den dazu gegen-

läufigen Prozess (MET, mesenchymal-epitheliale-Transition). Beides sind wichtige Kennzeichen der Tumorentwicklung.

1.9 Auswirkungen von alternativem Spleißen auf die Zellmorphologie

Eine Veränderung der Zellmorphologie findet im gesunden Organismus vor allem während der Zelldifferenzierung und EMT bzw. MET statt. Eine Veränderung im Spleißfaktoren-Profil der Zelle sorgt dabei für die nötige, globale Veränderung diverser Genprodukte (Biamonti et al., 2012). Es konnte aber auch für einige Proteine ohne direkte Spleißfaktoren-Funktion gezeigt werden, dass die Expression alternativer Spleißvarianten eine morphologische Transition bedingen kann, wie z.B. für δ -Catenin (Zhang et al., 2014). Eine alternative Spleißvariante von CD44 ist essentiell für die EMT (Brown et al., 2011). Durch eine EMT ändert sich überdies die Chromatin-Organisation der Zelle durch eine Veränderung der Histonmodifikationen (Warns et al., 2015), was wiederum Einfluss auf die Aktivität von Spleißfaktoren hat (Zhou et al., 2014). Histone selbst sind hochkonservierte, basische Proteine, um die sich die DNA zwecks Verpackung legt. Werden Histone z.B. durch Methylierung modifiziert, ändert dies den Grad der DNA-Packung und dadurch den Aktivitätsstatus der betreffenden DNA-Sequenz. Während die Histonmodifikationen H3K9A (Histon 3 an Lysin Position 9 Acetylierung) und H3K36me3 (Histon 3 an Lysin Position 36 Trimethylierung) mit einem Auslassen von Exons assoziiert ist (Schor et al., 2009), führt H3K9me2 und H3K27me3 zu alternativen Spleißen und reduzierter Polymerase-II-Aktivität (Allo et al., 2009).

1.10 Der potenzielle Einfluss von BAG6 auf die Zellmorphologie

Über den Einfluss von BAG6 auf die Zellmorphologie bzw. EMT ist bisher wenig bekannt. Es gibt aber indirekte Hinweise, wie der Zusammenhang von Tumorentwicklung und alternativem Spleißen von BAG6. Direktere Hinweise stammen aus Untersuchungen am Mausmodell. Hier resultierte ein *bag6* "knock-out" (BAG6 KO) in einer veränderten Zellmorphologie *in*

vivo (Yong und Wang, 2012). Eine genauere Betrachtung von isolierten Zellen *in vitro* ergab einen Defekt in der korrekten Differenzierung von mesenchymalen Zellen (Desmots et al., 2005). In Zellkultur-Experimenten resultiert die transgene Expression des C-Terminus von BAG6 in morphologischen Veränderungen (Wu et al., 2004). Darüber hinaus hat BAG6 einen Einfluss auf die Histonmodifikation (Nguyen et al., 2008; Wakeman et al., 2012), wodurch das globale, alternative Spleißmuster beeinflusst werden könnte. Bei einer EMT-Induktion, hervorgerufen durch *Chlamydia trachomatis*-Infektion, zeigt sich ein Anstieg der BAG6-Expression (Igietsme et al., 2015). Die Bedeutung einzelner BAG6-Spleißvarianten während dieser morphologischen Veränderungen ist aber bisher nicht untersucht worden.

1.11 Die Beziehung zwischen Zellmorphologie und Zytoskelett

Im Verlauf der EMT verlieren epitheliale Zellen ihre Polarität und Zell-Zell-Kontakte, was zu einem größeren Migrations-, Invasions- und schließlich Metastasierungspotenzial führen kann (Yang et al., 2008; Yilmaz und Christofori, 2009). Bei der Ausbildung von Metastasen ist wiederum die MET für das Tumorstadium entscheidend (Polyak und Weinberg, 2009). Das Zytoskelett ist bei diesem Prozess von zentraler Bedeutung bei der Tumorentwicklung (Sun et al., 2015). Es besteht aus einem komplexen Netzwerk aus Mikrofilamenten (Aktin-Zytoskelett), Intermediärfilamenten (Vimentine, Keratine, Laminine, Desmine und Neurofilamente) und Mikrotubuli. Über Transmembranproteine bzw. -rezeptoren und assoziierten Adapterproteinen steht es im engen Kontakt mit der extrazellulären Matrix und benachbarten Zellen.

Ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts sind Mikrotubuli, die aus α - und β -Tubulin polymerisieren. γ -Tubulin ist wichtig für die Entstehung und Polarisierung der Mikrotubuli. Die Stabilität von Mikrotubuli wird u.a. durch posttranslationale Modifikationen gesteuert, wie z.B. durch eine Acetylierung mittelbar durch den BAG6-Interaktionspartner p300 (Han et al., 2009). BAG6 selbst wurde als Tubulin-assoziiertes Protein identifiziert (He et al., 2015) und ein

wichtiger BAG6-Interaktionspartner Hsp70 bindet selbst direkt an Tubulin (Sanchez et al., 1994).

Ein weiterer Hauptbestandteil des Zytoskeletts sind Aktinfilamente, die als Bündel oder Netzwerk vorliegen können. Dabei polymerisiert freies, globuläres Aktin (G-Aktin) zu filamentösen Aktinsträngen (F-Aktin) aus zwei miteinander verschränkten Helices. In Form eines kortikalen Aktinnetzes wird die Plasmamembran stabilisiert und über Ankerproteine mit transmembranären Zelladhäsionsmolekülen (wie z.B. Cadherine, Intergine, EpCAM) verbunden. So können Zellkontakte und schließlich komplexere Gewebe ausgebildet werden. Außerdem ist das Aktin-Zytoskelett essentiell für die Ausbildung von Zellfortsätzen wie Mikrovilli, Pseudopodien und Membrankanälen (*tunneling nanotubes*) (Austefjord et al., 2014). Auch findet über das Aktin-Zytoskelett ein Kurzstreckentransport durch Myosine statt.

Bisher haben sich keine Studien mit einem möglichen Einfluss von BAG6 auf das Aktin-Zytoskelett beschäftigt. Bekannt sind nur einige Bindungspartner von BAG6, die wiederum mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert sind, z.B. Hsp70 (Turturici et al., 2008) und Ubl4A (Zhao et al., 2017). Für einen anderen Vertreter aus der BAG-Proteinfamilie BAG3 sind Auswirkung auf Aktin-Zytoskelett (Fontanella et al., 2010), Zellkontakte (Kassis et al., 2006) und Migration (Iwasaki et al., 2007) bereits beschrieben. Betrachtet man diese Ergebnisse in einem Zusammenhang mit den morphologischen Veränderungen in BAG6-assoziierten Erkrankungen und dem BAG6 KO-Mausmodell, erscheint ein Einfluss von BAG6 auf das Zytoskelett als eine mögliche Erkrankungsursache. Unterstützt wird dies durch eine Vielzahl von Studien die BAG-Proteine als Tumormarker hervorheben (Calderon-Gonzalez et al., 2015).

1.12 Die Bedeutung von BAG-Proteinen in der Tumorbildung

Viele Vertreter aus der BAG-Proteinfamilie sind bisher als Tumormarker beschrieben und diskutiert worden. BAG1 gilt als Tumormarker, insbesondere in Brustkrebs (Townsend et al.,

2003; Sharp et al., 2004). Interessanterweise verändert sich dabei das Expressionsmuster der BAG1-Varianten in den Tumorzellen. In einigen Tumorzellen wird vermehrt die BAG1-Variante mit NLS (BAG1-L) exprimiert, welche im Kern akkumuliert (Takayama et al., 1998). Eine Meta-Studie stuft eine erhöhte, nukleäre BAG1-Expression als Marker für gute Therapierbarkeit von Brustkrebs ein (Papadakis et al., 2017). Bei Prostata-Krebs wird BAG1-L bereits als neues, therapeutisches Ziel untersucht (Cato et al., 2017). BAG2 unterstützt die Tumorbildung durch p53-Akkumulation im Kern (Yue et al., 2015). BAG3 reguliert die EMT (Xiao et al., 2013) sowie Migration und Invasion von Tumorzellen (Shi et al., 2015) und wird als Ansatzpunkt für die Tumorthherapie diskutiert (Zhu et al., 2012). Außerdem wird BAG3 von Tumorzellen vermehrt sekretiert, was zu einer reduzierten Immunantwort führt (De Marco et al., 2017), ein Mechanismus der auch für BAG6 beschrieben wurde (Reiner et al., 2013). Ein differenziertes Bild ergibt sich für BAG4. Eine erhöhte BAG4-Expression kann das Invasionspotenzial von Tumorzellen steigern (Yi et al., 2017), wobei aber eine zytoplasmatische Expression mit verringerter Aggressivität assoziiert ist (Annunziata et al., 2007). Ähnlich wie bei BAG1 scheint also die Lokalisation des BAG4-Proteins von entscheidender Bedeutung für seine Funktion und in der Tumorbildung. BAG5 interagiert wie BAG2 mit p53 im Kern (Yue et al., 2016) und wird vermehrt in Tumorzellen exprimiert (Bruchmann et al., 2013).

Eine Vielzahl von Studien verweisen also auf einen Zusammenhang zwischen Expression und Lokalisation von BAG-Proteinen und der Tumorbildung. Für BAG6 selbst fehlen bisher solche Studien, obwohl BAG6 als Tumormarker vorgeschlagen (Calderon-Gonzalez et al., 2015) und in kleinzelligem Lungenkrebs das Transkript mit am stärksten veränderten alternativen Spleißen im Vergleich zu gesundem Gewebe ist (Loiselle et al., 2016).

2 Ergebnis

2.1 Steuerung der BAG6-Lokalisation

Ein entscheidender Faktor für die Funktion eines Proteins innerhalb der Zelle ist seine Lokalisation. Bereits die Veränderung des Kern-Zytosol-Verhältnisses eines Proteins kann zu dramatische Veränderungen der Proteinfunktion führen (Birzele et al., 2008). Für BAG6 konnten bereits unterschiedliche Lokalisationen für bestimmte Spleißvarianten beobachtet werden (Kämper et al., 2012 a). Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die Unterschiede in der Lokalisation einzelner BAG6-Spleißvarianten, unter Berücksichtigung von potenziellen Lokalisierungssignalen, zu untersuchen. Ein tieferes Verständnis der Lokalisations-Regulation von BAG6 ist wichtig für das Verständnis der zellulären BAG6-Funktion.

2.1.1 Lokalisation von BAG6-Spleißvarianten in HEK-Zellen

Bisherige Studien weisen BAG6 je nach verwendeter Zelllinie oder Versuchsbedingungen einer unterschiedlichen, zellulären Lokalisation zu, teils mit erheblichen Konsequenzen für die zelluläre Homöostase. Um zu untersuchen, ob eine Veränderung des BAG6-Proteins durch alternatives Spleißen ursächlich für seine Lokalisationsunterschiede ist, wurden verschiedene BAG6 Spleißvarianten transient und stabil in verschiedenen Zelllinien (HEK, IMR90S, MCF und MDA) exprimiert und mittels Mikroskopie untersucht. Ein deutlicher Einfluss der ex24-Varianten auf die Geschwindigkeit der Zellzahl-Vervielfachung ließ sich dabei anhand der Durchlichtaufnahmen nicht ausmachen.

In stabilen HEK wt + mCherry-BAG6-Zelllinien, die mCherry-BAG6-Fusionsproteinen +ex24 bzw. Δ ex24 exprimieren, zeigte sich eine Fluoreszenz für +ex24 ausschließlich im Kern, zu einem frühen (d 1) und späten (d 6) Zeitpunkt nach der Zellaussaat (Abbildung 5 A). Im Gegensatz dazu zeigte sich BAG6 Δ ex24 anfangs im Kern und Zytosol und nach längerer Kultivierung schließlich größtenteils im Zytosol. Die Δ ex24-Translokation ins Zytosol war dabei abhängig von der Zelldichte während längerer Kultivierungszeit.

Um zu testen, ob die zytosolische Lokalisation von BAG6 Δ ex24 an einen Ausschluss aus dem Kern oder an einer veränderten Dynamik von Kernexport zu -import lag, wurden stabile HEK +BAG6 Δ ex24 Zellen mit Leptomycin B behandelt (Abbildung 5 B). Leptomycin B inhibiert gezielt den Kernexport und kernimportierte Proteine können sich dadurch im Nukleus ansammeln. Unter Leptomycin B-Behandlung ließ sich auch bei hoher Zelldichte Δ ex24 (welche sich normalerweise im Zytoplasma befand) verstärkt im Kern nachweisen, wenn auch in deutlich geringerem Maße als bei niedriger Zelldichte. Dies deutet darauf hin, dass ein Kernimport von Δ ex24 auch bei hoher Zelldichte stattfand, aber ohne Leptomycin B-Behandlung durch einen höheren Kernexport maskiert wurde.

Ein weiterer Faktor, über den BAG6 selbst seine Lokalisation beeinflussen könnte, ist die Bildung von Oligomeren über die PRR-Domäne (Xu et al., 2013). Um dies zu untersuchen, wurden stabile HEK BAG6-mCherry Δ ex24 Zellen bei niedriger und hoher Zelldichte mit EGFP-BAG6 +ex24 transfiziert (Abbildung 5 C). Bei niedriger Zelldichte führte die zusätzliche Expression der nukleären +ex24-Variante zur vermehrten Lokalisation von Δ ex24 im Kern, verglichen mit mock-transfizierten Zellen. Bei hoher Zelldichte hatte die zusätzliche Expression der +ex24-Variante keinen Einfluss auf die Lokalisation der Δ ex24-Variante, was auf einen verstärkten Kernexport von Δ ex24 unter dieser Bedingung hinweisen könnte. Aus der beobachteten Interaktion zwischen zwei unterschiedlichen, transgenen BAG6-Varianten hinsichtlich ihrer Lokalisation ergab sich eine wichtige Konsequenz für weitere Experimente. Um einzelne BAG6-Spleißvarianten genauer betrachten zu können, muss eine Lokalisations-Beeinflussung (und einer damit assoziierten Funktions-Beeinflussung) des Transgens durch endogenes BAG6 vermieden werden. Der endogene BAG6-Status der verwendeten Zelllinie ist also bei Experimenten mit transgenem BAG6 von Bedeutung.

Zusammenfassend ergaben verschiedenen Bag6-Expressions-Experimente einen deutlichen Unterschied in der Lokalisation von BAG6-ex24-Spleißvarianten in HEK wt-Zellen, insbesondere bei hoher Zelldichte. Dabei zeigte sich bei transienter sowie stabiler BAG6-Expression, dass die von ex24 kodierte Aminosäuresequenz innerhalb der BAG-Domäne

2.1 Steuerung der BAG6-Lokalisation

einen Einfluss auf die zelluläre BAG6-Lokalisation hat. Ursächlich dafür ist eine unterschiedliche Kernimport- bzw. -export-Geschwindigkeit. BAG6-Splicesvarianten können sich darüber hinaus gegenseitig in ihrer Lokalisation beeinflussen.

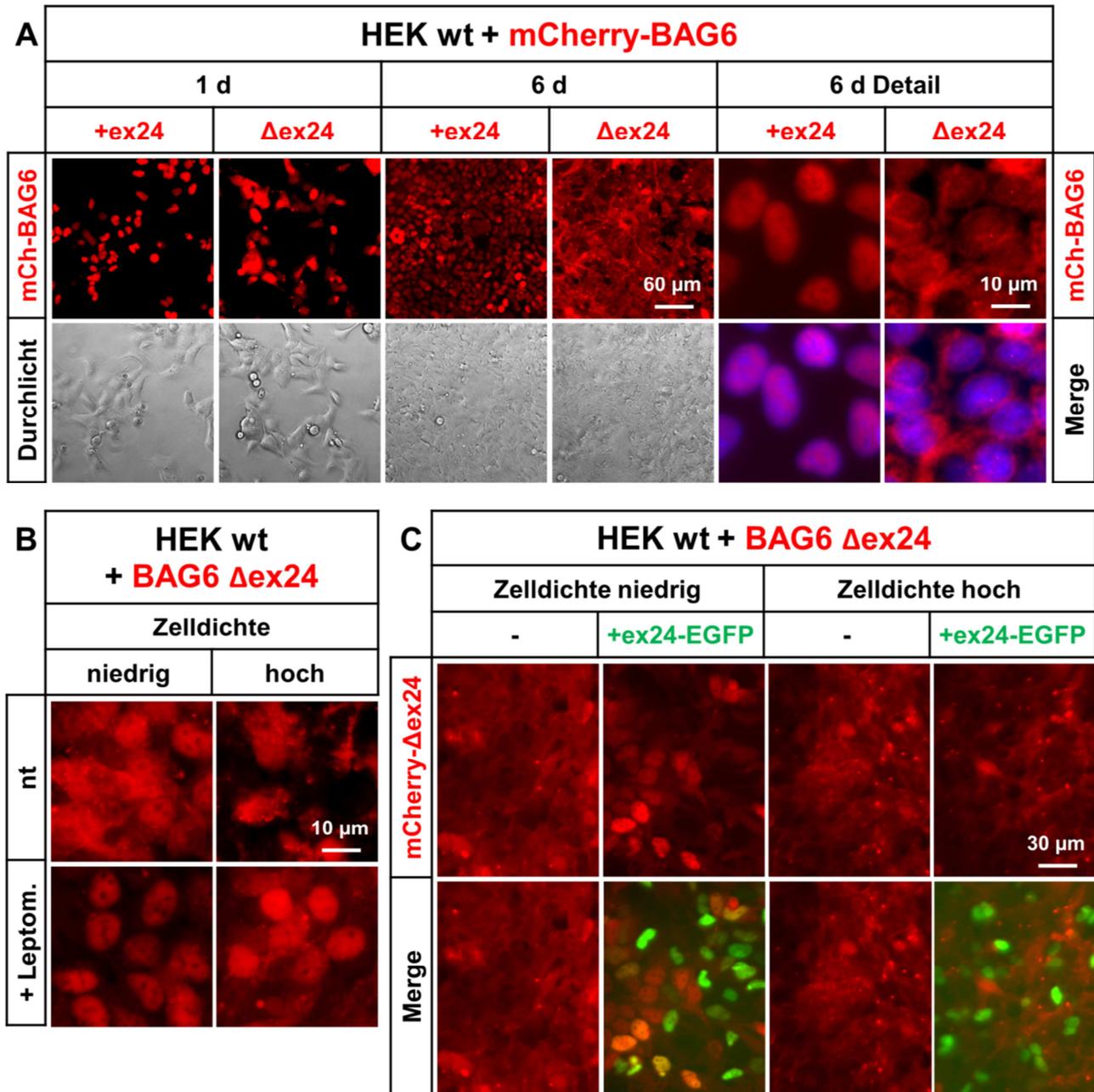


Abbildung 5: Alternatives Spleißen von ex24 verändert die BAG6-Lokalisation in HEK-Zellen.

A) Stabile HEK-Zelllinien auf Wildtyp-Basis (wt), die fluoreszenzmarkiertes (mCherry) BAG6 mit ex24 (+ex24) oder ohne ex24 (Δ ex24) exprimieren, wurden nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer (1 und 6 Tage) mikroskopiert. Die mCherry-Fluoreszenzaufnahmen (rot) sind mit passenden Durchlichtaufnahmen darunter dargestellt. Detail-Vergrößerungen zum späten Zeitpunkt (6 d) zeigen Unterschiede in der BAG6-Lokalisation. Zur besseren Darstellung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. **B)** Stabile Δ ex24 HEK-Zellen wurden bei niedriger und hoher Zelldichte ohne (nt) bzw. mit Leptomycin B (+ Leptom.) inkubiert. Die mCherry-BAG6-Fluoreszenzaufnahmen sind rot dargestellt. **C)** Stabile Δ ex24 HEK-Zellen wurden zusätzlich, bei verschiedenen Zelldichten, transient mock bzw. mit +ex24-EGFP transfiziert. Die obere Reihe zeigt die BAG6 Δ ex24-Lokalisation (mCherry-BAG6, rot). Die untere Reihe zeigt ein Merge-Bild von BAG6 Δ ex24 mit BAG6 +ex24-Lokalisation (EGFP; grün). Maßstabsbalken indizieren die Größen in μ m.

2.1.2 Lokalisation von BAG6-Spleißvarianten in IMR90S-Zellen

Wie zuvor gezeigt (Abbildung 5 C) können sich verschiedene BAG6-Spleißvarianten gegenseitig in ihrer Lokalisation beeinflussen, deshalb wurden für weitere Untersuchungen BAG6 "knock-out" (BAG6 KO) Zelllinien mittels des CRISPR/Cas-Systems hergestellt. In BAG6 KO-Zellen kann es zu keiner Oligomer-Bildung (und damit zu keiner Lokalisations-Beeinflussung) zwischen endogenem und transgenem BAG6 kommen. Einzelne Spleißvarianten lassen sich besser charakterisieren.

Als besonders geeignet für einen BAG6 KO zeigte sich die aus Lungengewebe isolierte IMR90S-Zelllinie (Nichols et al., 1977), da diese wenig degeneriert und aufgrund ihrer Größe gut zu mikroskopieren ist. Um den Einfluss der am häufigsten, alternativ gespleißten Exons von BAG6 (Kämper et al., 2012 a) auf die BAG6-Lokalisation zu untersuchen, wurden zunächst mCherry-markierte BAG6-Varianten mit verschiedenen Kombinationen von ex11b und ex24 transient in IMR90S wt-Zellen exprimiert (Abbildung 6 A). Dabei ergab sich eine nukleäre BAG6-Lokalisation für +ex24-Varianten und eine nukleär-zytosolische für Δ ex24-Varianten, unabhängig von ex11b. Um die Lokalisationsunterschiede der BAG6 ex24-Varianten mit der endogenen Verteilung von BAG6 in IMR90S-Zellen zu vergleichen wurde zunächst die BAG6-Gesamt-Proteinmenge mittels Antikörper gefärbt (Pan BAG6). Zur Beurteilung von möglichen Lokalisationsunterschieden der ex24-Varianten, wurde außerdem ein Antikörper spezifisch gerichtet gegen das alternativ gespleißte ex24 (Anti-ex24) verwendet. Während der Pan BAG6-Antikörper in der Immunfluoreszenz eine nukleär-zytosolische Immunfluoreszenzfärbung zeigte, ergab sich für den Anti-ex24-Antikörper eine ausschließlich nukleäre Färbung (Abbildung 6 B). Damit unterschieden sich die endogenen BAG6-ex24-Spleißvarianten in IMR90S-Zellen hinsichtlich ihrer Lokalisation.

Zur weiteren Verifizierung dieser Lokalisationsunterschiede wurden stabile IMR90S BAG6 KO-Zellen mit BAG6 +ex24 bzw. Δ ex24 hergestellt. Die erfolgreiche Rekonstitution des BAG6 KO wurde mittels Pan BAG6-Antikörperfärbung im Westernblot untersucht (Abbildung 6 C). Dabei zeigte sich die stabile Expression der BAG6-mCherry-Fusionsproteine als Bande

oberhalb der endogenen BAG6-Proteinbande wie in IMR90S Wildtyp-Zellen (wt), wobei die Größendifferenz der mCherry-Größe entsprach. Durch die fluoreszierende mCherry-Markierung ließen sich die BAG6-Spleißvarianten auch in lebenden, unfixierten Zellen beobachten, was mögliche Fixierungs- und Färbeartefakte ausschließt. Dabei ergab sich eine gleichmäßig strukturierte, zytosolische und eine nukleäre Lokalisation der Δ ex24-Variante (Abbildung 6 D). Hingegen zeigte die +ex24-Variante eine ausschließlich nukleäre Fluoreszenz. Damit stimmte die Lokalisation der endogenen ex24-Varianten in der Immunfluoreszenz (Abbildung 6 B) mit der Lokalisation der transgenen BAG6-mCherry-Fusionsproteine (Abbildung 6 D) überein: Δ ex24 lag hauptsächlich im Zytosol, +ex24 fast ausschließlich im Kern vor.

Wie bereits für HEK wt-Zellen gezeigt werden konnte (Abbildung 5 C), kann BAG6 Homooligomere über die PRR-Domäne (Abbildung 2) bilden (Xu et al., 2013), was einen Einfluss auf die Lokalisation der einzelnen BAG6-Variante haben kann. Um die BAG6-Oligomerbildung auch in IMR90S BAG6 KO-Zellen zu verifizieren, wurden stabile BAG6 +ex24-EGFP exprimierende Zellen zusätzlich transient mit BAG6 mCherry- Δ ex24 transfiziert (Abbildung 6 E). Anschließend wurde untersucht, wie sich die verschiedenen Lokalisationsmuster der Δ ex24-Variante (nur Nukleus, Nukleus und Zytosol, nur Zytosol) auf die +ex24-Variante auswirkte, die in IMR90S BAG6 KO-Zellen normalerweise nukleär vorlag. Lag Δ ex24 im Nukleus vor, war dies auch der Fall für +ex24. Befand sich die transient exprimierte Δ ex24-Variante zusätzlich im Zytosol, führte dies teilweise zu einer Translokalisierung der +ex24-Variante ins Zytosol. Lag Δ ex24 hingegen in granulärer Form im Zytosol vor (Abbildung 6 E, Spalte 3), hatte dies auch bei einem hohen Δ ex24/+ex24-Verhältnis keinen sichtbaren Einfluss auf die +ex24-Lokalisation. Damit ergab sich eine gegenseitige Beeinflussung der BAG6 ex24-Varianten hinsichtlich ihrer Lokalisation wie zuvor in HEK-Zellen.

Um die unterschiedliche Lokalisation von BAG6-Spleißvarianten auch in primären Zellen zu verifizieren, wurden unreife primäre Dendritische Zellen mit den Pan BAG6- und Anti-ex24-

Antikörpern gefärbt (Abbildung 6 F). Wie in IMR90S-Zellen lag BAG6 (gefärbt mit dem Pan BAG6-Antikörper) hauptsächlich zytosolisch vor, erkennbar an der roten Immunfluoreszenzfärbung um den DAPI-positiven Zellkern. Die +ex24-Variante befand sich hingegen ausschließlich im Zellkern, erkennbar an der Kolo­kalisierung der Anti-ex24- und DAPI-Färbung im Merge-Bild.

Aus den vorangegangenen Beobachtungen ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Spleißen von BAG6 ex24 und der BAG6-Lokalisation. Die Zelldichte und Oligomerbildung haben darüber hinaus einen Einfluss auf die Gesamt-BAG6-Lokalisation. Die robusten Lokalisationsunterschiede in unterschiedlichen Zelllinien sowie unter transienten und stabilen Expressionsbedingungen, sprechen für einen direkten Einfluss des ex24 auf die BAG6-Lokalisation. Ein solcher direkter Einfluss wäre denkbar, da die alternativ gespleißte Aminosäuresequenz in direkter Nähe zu einem Kernlokalisierungssignal liegt (Abbildung 2).

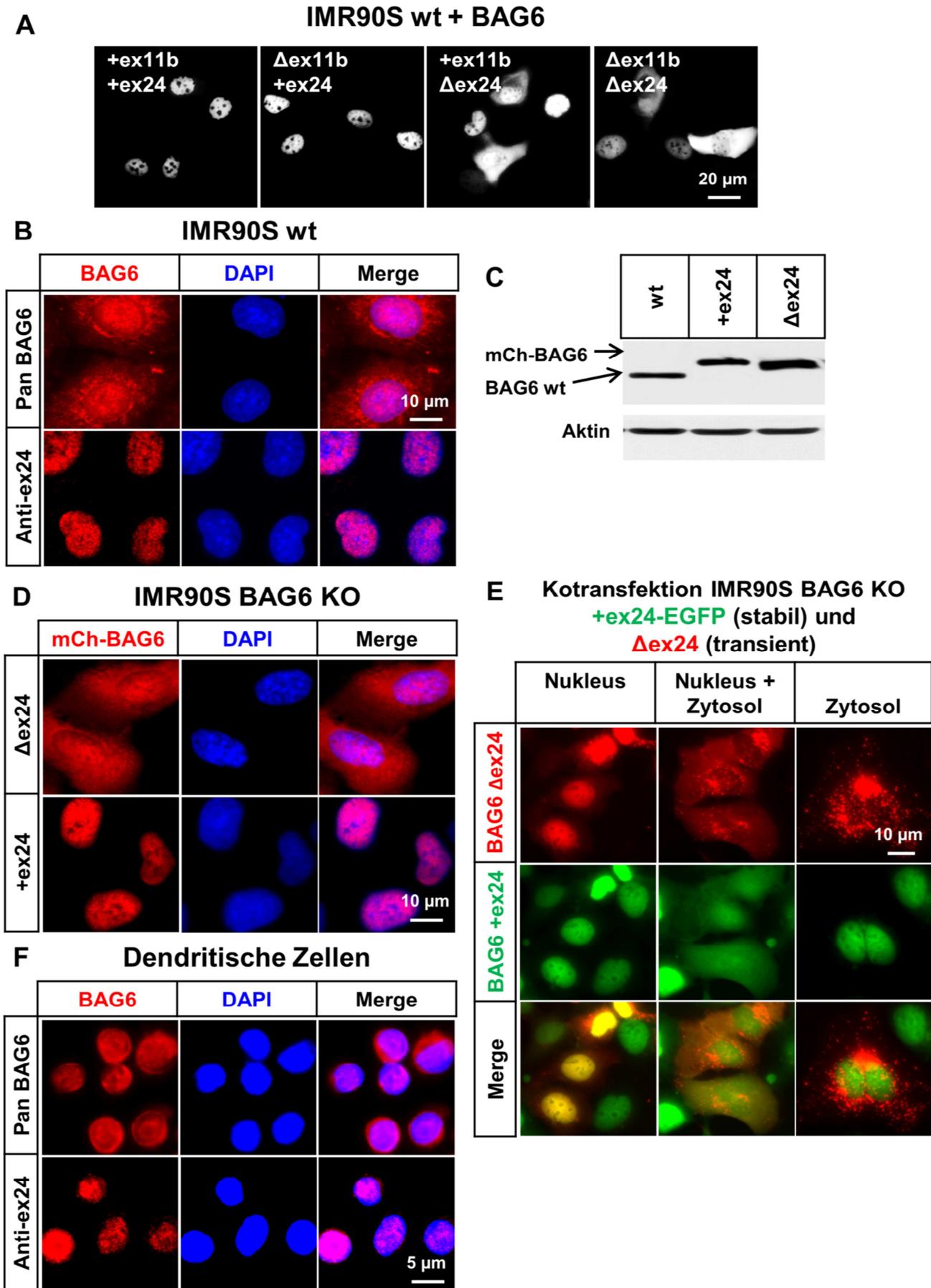


Abbildung 6: Spleißen von ex24 verändert die Lokalisation von endogenem und exogenem

BAG6 in wt- und BAG6 KO-Zellen.

A) IMR90S Wildtyp-Zellen (wt) wurden transient mit mCherry-BAG6-Konstrukten transfiziert. Angegeben ist die BAG6-Spleißvariante mit (+) bzw. ohne (Δ) Exon11b (ex11b) bzw. Exon 24 (ex24). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Lokalisation des fluoreszenzmarkierten BAG6 in unfixierten Zellen. **B)** IMR90S wt-Zellen wurden für die BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) bzw. nur die +ex24-Variante (Anti-ex24) immunfluoreszenzgefärbt (rot). Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. **C)** Westernblots für Gesamt-Zelllysate von IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen mit BAG6 +ex24 bzw. Δ ex24. Pfeile markieren Proteingröße für endogenes BAG6 (BAG6 wt) und stabil exprimiertes mCherry-BAG6 (mCh-BAG6). Aktin diente als Ladekontrolle. **D)** Auf Basis von IMR90S BAG6 KO-Zellen wurden stabile Δ ex24 und +ex24 mCherry-BAG6 exprimierende Zelllinien erzeugt (vgl. Westernblot in C). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die Lokalisation der mCherry-markierten BAG6-Spleißvarianten. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. **E)** Zur Betrachtung der BAG6-Oligomerbildung wurden stabile BAG6 +ex24-EGFP-IMR90S-Zellen auf BAG6 KO-Basis zusätzlich transient mit mCh-BAG6- Δ ex24 transfiziert. Die Lokalisation der unterschiedlich, fluoreszenzmarkierten BAG6-Spleißvarianten wurde in unfixierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die verschiedenen Spalten und passende Merge-Bilder zeigen den Einfluss unterschiedlicher BAG6 Δ ex24-Lokalisationen auf die +ex24-Lokalisation. **F)** Primäre, humane Dendritische Zellen wurden für die BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) bzw. die +ex24-Variante (Anti-ex24) immunfluoreszenzgefärbt (vgl. IMR90S-Zellen in B). Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μ m.

2.1.3 Einfluss des Spleißens von ex24 auf das Kernlokalisierungssignal von BAG6

Der deutliche Lokalisationsunterschied der BAG6-Spleißvarianten zeigte sich weitgehend unabhängig von dem getesteten Zelltyp (Zelllinie oder primäre Zelle) und dem Modus der Expression (endogen oder transgen stabil oder transient). Der Grund für einen solchen, unter verschiedenen Bedingungen reproduzierbaren Lokalisationsunterschied ist mit größerer Wahrscheinlichkeit in einem unmittelbar veränderten Bindungsverhalten an die Kernimport-Maschinerie zu suchen. Diese Vermutung wird durch die unmittelbare Lage des Kernlokalisierungssignals (NLS) in ex23 direkt vor der Grenze zu ex24 unterstützt (Abbildung 2). Es ist bekannt, dass an die NLS angrenzende Sequenzen deren Bindungsstärke an Importine beeinflussen können (Efthymiadis et al., 1997; Hodel et al., 2001).

Um zu testen, ob dieser molekulare Mechanismus eine mögliche Ursache für die Lokalisationsunterschiede der ex24-Varianten ist, wurde ein bioinformatisches NLS-Vorhersage-Programm verwendet (cNLS mapper; Kosugi et al., 2009). Durch das alternative Spleißen bei der Δ ex24-Variante folgt auf die NLS in ex23 die Aminosäuren LRS (Abbildung 7, Reihe 1). Ohne alternatives Spleißen würde auf die NLS hingegen die Aminosäuren TMQ folgen. Bezieht man diese Sequenzunterschiede in die Berechnung des NLS-Scores (0 =

ausschließlich zytosolisch; 10 = ausschließlich nukleär) ein, ergibt sich eine Reduktion von 7 auf 5,3, bedingt durch die spleißbedingte Veränderung der drei an die NLS angrenzender Aminosäuren. Um die bioinformatischen Vorhersagen zu validieren, wurden die drei der NLS angrenzende Aminosäuren in +ex24-Variante in die entsprechenden Aminosäuren der Δ ex24-Variante mutiert (TMQ→LRS) und umgekehrt auf Grundlage von Δ ex24 (LRS→TMQ). Alle vier BAG6 Varianten wurden stabil in IMR90S BAG6 KO-Zellen exprimiert. Hier zeigte sich, dass die ansonsten nur im Nukleus vorkommende +ex24-Variante durch den Austausch der drei Aminosäuren auch im Zytosol vorlag (Abbildung 7, Reihe 4), wie sonst nur die natürliche Δ ex24-Variante. Umgekehrt fand sich ein größerer Anteil BAG6 im Nukleus nach dem entsprechenden Aminosäure-Austausch in der Δ ex24-Variante (Abbildung 7, Reihe 3).

Daraus folgt, dass die Lokalisation von BAG6 in direktem Zusammenhang mit dem alternativen Spleißen von ex24 steht. Die Stärke der NLS von BAG6, die den Kernimport steuert, ist in der Δ ex24-Variante vermindert. Die Beobachtung, dass BAG6 Δ ex24 trotz der Existenz einer schwachen NLS vermehrt im Zytosol zu finden war, lässt sich mit einem zusätzlichen aktiven Transports aus dem Nukleus erklären. Dieser Kernexport wäre bei der +ex24-Variante von der stärkeren NLS maskiert, aber eben nicht bei der Δ ex24-Variante mit schwacher NLS. Eine mögliche Ursache für den gezielten BAG6-Export aus dem Kern ist die Existenz einer Kernexportsequenz (NES).

2.1.4 Charakterisierung der Kernexportsequenz (NES) von BAG6

Die Δ ex24-Variante ist trotz schwacher NLS vermehrt zytosollokalisiert. Erst durch Inhibition des aktiven Kernexports durch Leptomycin B liegt Δ ex24 auch hauptsächlich nukleär vor (Abbildung 5 B). Dies zeigt, dass neben einer NLS (die den Kernimport steuert) auch ein Kernexport-Mechanismus für BAG6 existieren könnte.

Um zu untersuchen, ob BAG6 eine potenzielle NES besitzt wurde eine bioinformatische Vorhersage mit NetNES 1.1 (La Cour et al., 2004) durchgeführt (Abbildung 8 A). Für BAG6 wird die Existenz einer NES am Anfang von UBL2 vorhergesagt (LeqLqrLesrLqpflQryyevL). Diese Stelle zeichnet sich außerdem durch eine hohe evolutionäre Konservierung auf Proteinebene relativ zur gesamten BAG6-Sequenz aus (Abbildung 8 B). Variationen auf Nukleotidebene sind zumeist stille Mutationen, was eine wichtige Funktion der Aminosäuresequenz wahrscheinlich macht. Um die Bedeutung der NES für die BAG6-Lokalisation zu untersuchen, wurden stabile HEK Zellen mit mutierter (NES mut) bzw. deletierter (NES del) der potenziellen NES auf Δ ex24-Basis als mCherry-Fusionsprotein hergestellt. Während die +ex24-Variante auch mit zunehmender Zelldichte im Kern verblieb, lagen die Δ ex24-NES-Varianten zunächst in Nukleus und Zytosol vor (Abbildung 8 C). Nach fünf Tagen und steigender Zelldichte, lag die Δ ex24-Variante mit funktioneller NES ausschließlich im Zytosol vor wie bereits zuvor beobachtet (Abbildung 5 A). Im Gegensatz dazu führte die Mutation bzw. Deletion der NES zu einer erhöhten BAG6-Kernlokalisierung. Interessanterweise zeigten die Zellen mit BAG6-Konstrukten ohne funktionelle NES in Durchlichtaufnahmen eine verstärkte Zell-Zell-Adhäsion im Vergleich zum wt-Konstrukt, erkennbar an einer verringerten Ausbreitung der Zellen und ausgeprägter Koloniebildung (Abbildung 8 D).

Damit konnte erstmals die Existenz einer funktionellen NES in BAG6 nachgewiesen werden. Eine Manipulation des Kernexports von BAG6 durch Expression von NES-Mutanten führte zu einer morphologischen Veränderung der Zellen. Eine verstärkte nukleäre BAG6-Lokalisation resultierte in einem epithelialerem Wachstumsbild der Zelllinie.

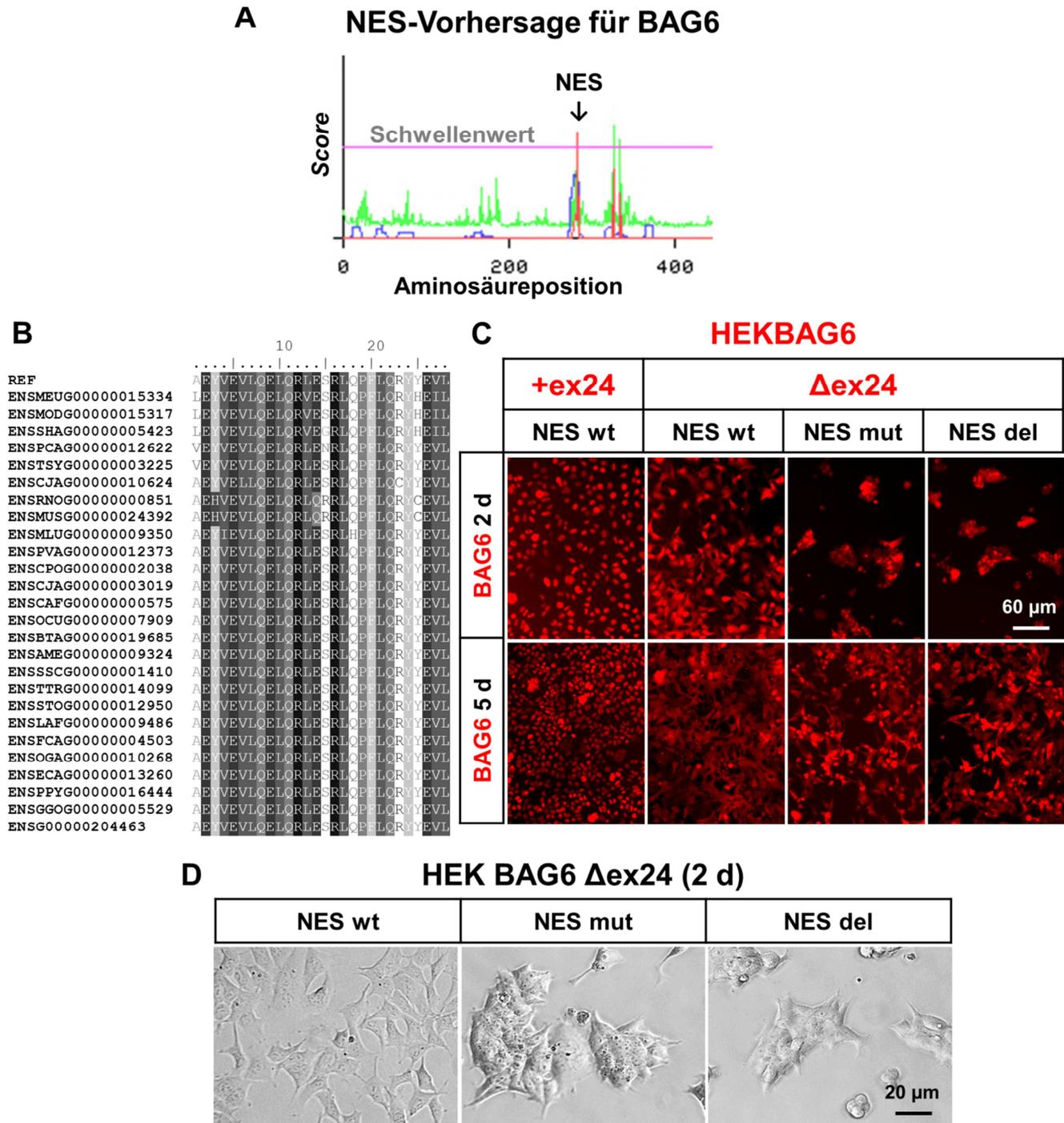


Abbildung 8: Nachweis einer funktionellen NES in BAG6 mit Auswirkungen auf BAG6-Lokalisation und Zellmorphologie.

A) Graphisches Ergebnis für die Vorhersage einer potenziellen NES (Kernexportsequenz) in BAG6 (NetNES 1.1; La Cour et al., 2004). Gezeigt wird der Gesamt-NES-Score für die entsprechende Aminosäureposition. Der Pfeil markiert die Lage der potenziellen NES mit einem Score oberhalb des Schwellenwerts. **B)** Vergleichendes Aminosäuresequenz-Alignment für die potenzielle BAG6 NES. Als Referenz (REF) dient die humane Sequenz, darunter die BAG6-Sequenzen verschiedener Spezies mit ihrem entsprechenden Ensembl-Kürzel. **C)** Zur funktionellen Untersuchung der NES wurden HEK wt-Zellen mit verschiedenen mCherry-BAG6-Konstrukten transfiziert und für 2 bzw. 5 Tage bei zu Beginn gleicher Zelldichte kultiviert. Gezeigt wird die BAG6-Lokalisation in unfixierten Zellen mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen. Neben der BAG6 +ex24 bzw. Δex24-Varinante mit wildtypischer (NES wt) wurden auf Basis der Δex24-Varinante Konstrukte mit mutierter (NES mut) bzw. deletierter (NES del) NES-Sequenz transfiziert. **D)** Durchlichtaufnahmen von HEK-Zellen mit BAG6 Δex24 mit NES wt, mut und del nach 2 Tagen Kultivierung zeigten morphologische Unterschiede.

Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

2.2 Die Bedeutung von BAG6 Exon 24 für die Zellmorphologie

Bereits bei der Untersuchung der BAG6-Lokalisation von ex24-Spleißvarianten in wt und BAG6 KO-Zellen ließen sich erste, morphologische Veränderungen der Zellen beobachten. Des Weiteren führte eine vermehrte nukleäre BAG6-Lokalisation durch Manipulation der NES zu einer veränderten Zellmorphologie (Abbildung 8 D). Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor für Zellen von BAG6 KO-Mausmodellen gemacht (Yong und Wang, 2012), aber ohne potenzielle Veränderungen des Zytoskeletts genauer zu analysieren. Im Folgenden soll der Einfluss von BAG6 ex24-Spleißvarianten auf die Zellmorphologie genauer untersucht werden.

2.2.1 Die zelldichteabhängige Expression von BAG6-Spleißvarianten beeinflusst die Zellmorphologie

Wurde die Lokalisation von BAG6 durch Mutation bzw. Deletion der NES beeinflusst, resultierte dies in einer veränderten Zellmorphologie (Abbildung 8 D). Um hier einen möglichen Zusammenhang genauer untersuchen zu können, war es nötig eine Bedingung zu finden, unter der sich das Spleißen von ex24 (und damit die BAG6-Lokalisation) robust veränderte. Versuche in transgenen HEK-Zellen, die noch endogenes BAG6 besitzen, zeigten eine mit steigender Zelldichte zunehmende Lokalisation von Δ ex24 ins Zytosol (Abbildung 5 A und Abbildung 8 C). Eine mögliche Erklärung für diese Translokalisierung könnte in der zuvor gezeigten Oligomerisierung von BAG6 liegen (Abbildung 5 C und Abbildung 6 E): Bei niedriger Zelldichte würde viel endogenes BAG6 mit starker NLS vorliegen (+ex24) und durch Oligomerbildung transgenes BAG6 verstärkt im Kern halten. Bei hoher Zelldichte würde hingegen viel endogenes BAG6 mit schwacher NLS vorliegen (Δ ex24), durch die NES (Abbildung 8) ins Zytosol transportiert und dort transgenes BAG6 halten.

Um zu testen ob veränderte Zelldichte einen Einfluss auf das Spleißen von BAG6 ex24 hat, wurden IMR90S-Zellen für fünf Tage bei unterschiedlichen Zelldichten kultiviert und für die

+ex24-Variante (anti-ex24) gefärbt (Abbildung 9 A, Reihe 1). Während die Gesamt-BAG6-Proteinfärbung (Pan BAG6) weitgehend konstant blieb (Abbildung 9 A, Reihe 2), verringerte sich die nukleäre +ex24-Variante mit zunehmender Zelldichte. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen alternativem Spleißen von ex24 und der Zellmorphologie zu untersuchen, wurden das Aktin- und Mikrotubuli-Skelett in Zellen bei zunehmender Zelldichte gefärbt. Hierbei zeigten sich eine deutliche Abnahme des kortikalen Aktins (Abbildung 9 A, Reihe 3) und eine Veränderung des Mikrotubuli-Skeletts (Abbildung 9 A, Reihe 4) von einer symmetrischen, gleichmäßig hin zu einer asymmetrischen Form mit perinukleärem Zentrum. Bestätigt werden konnte die Zelldichteabhängigkeit des alternativen Spleißens von ex24 mittels Westernblots (Abbildung 9 B). Während die Gesamt-BAG6-Proteinmenge (Pan BAG6) nicht variierte, wurde mit steigender Zelldichte vermehrt ex24 (anti-ex24) gespleißt. Graphisch zusammengefasst sind die zelldichteabhängigen Veränderungen von BAG6 und der Zytoskelett-Architektur in Abbildung 9 C.

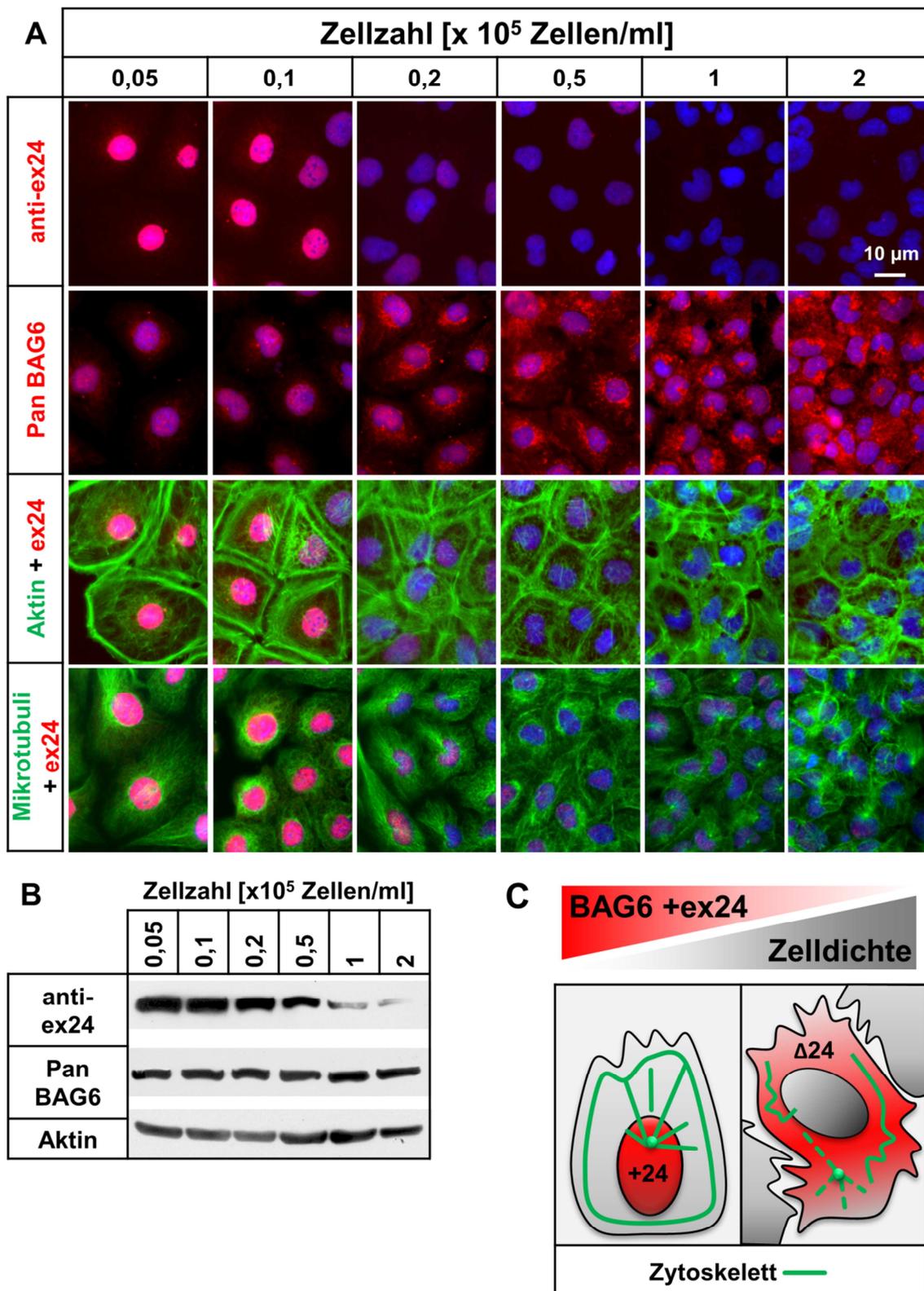


Abbildung 9: Spleißen von BAG6 ex24 ist zelldichteabhängig und beeinflusst das Zytoskelett.

A) IMR90S wt-Zellen wurden für fünf Tage bei unterschiedlichen Zelldichten kultiviert (siehe Ausgangszellzahl in $\times 10^5$ Zellen/ml Medium). Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen repräsentative Aufnahmen mit steigender Zelldichte von links nach rechts. Reihe eins zeigt die Färbung für BAG6 +ex24 (anti-ex24) in einem Merge-Bild mit dem DAPI-gefärbten Zellkern (blau). Reihe zwei zeigt entsprechend die Färbung für die BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6). Reihe drei zeigt die Veränderung des Aktin-Zytoskeletts in grün, gefärbt mittels Phalloidin, in Merge-Bildern mit BAG6

+ex24. Reihe vier zeigt entsprechend die Veränderung des Mikrotubuli-Skeletts. **B)** IMR90S wt-Zellen wurden wie in A) bei verschiedenen Zelldichten kultiviert. Westernblots für Gesamt-Zelllysate wurden für BAG6 +ex24 (anti-ex24) und BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) gefärbt. Aktin dient als Ladekontrolle. **C)** Die Grafik veranschaulicht die zell-dichteabhängige Veränderung des BAG6 ex24 Spleißens sowie die damit verbundenen Veränderungen der BAG6-Lokalisation und des Zytoskeletts. Der Maßstabsbalken indiziert die Größe in μm .

Zusammenfassend ergaben Experimente an IMR90S-Zellen unter verschiedenen Zelldichten, das BAG6 ex24 bei geringer Zelldichte kaum gespleißt wurde. BAG6 blieb im Kern und die Zellen wiesen ein strukturiertes Zytoskelett auf. Bei höheren Zelldichten wurde ex24 vermehrt gespleißt, BAG6 lag dadurch im Zytosol vor und die geordnete Struktur des Zytoskeletts ging verloren (Abbildung 9 C). Existiert also ein Zusammenhang zwischen Spleißen von ex24 und der allgemeinen Zellmorphologie wie auch schon in vorangegangenen Experimenten beobachtet wurde (Abbildung 8 D), könnte ein verändertes ex24-Spleißverhältnis zu krankhaften Veränderungen innerhalb eines Organismus führen. Bereits erwähnte krankheitsassoziierte Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in *bag6* legen diesen Schluss nahe (Chen et al., 2014; Zhao et al., 2014; Etokeben et al., 2015 b).

2.2.2 Krankheitsassoziierte SNPs in BAG6 beeinflussen das Spleißen von ex24

Eine Vielzahl von Studien hat eine Assoziation von Mutation in *bag6* mit Krankheiten nachgewiesen, ohne einen möglichen Mechanismus aufzuzeigen (Cagliani et al., 2011; Piras et al., 2014). Da die untersuchten Mutationen in *bag6* als SNPs zumeist in Introns liegen, können sie sich nur indirekt, wie durch einen Einfluss auf das alternative Spleißen, auf die spätere Aminosäure-Sequenz von BAG6 auswirken. Interessanterweise liegen zwei dieser SNPs im Intron zwischen ex24 und ex25 (*rs743400* und *rs750332*, SNP1 bzw. SNP2).

Um zu untersuchen, ob diese SNPs das Spleißen von BAG6 ex24 verändern, wurden ex24-Sensor-Konstrukte hergestellt. Dazu wurde die genomische *bag6*-Nukleotidsequenz von ex23 bis ex25 zwischen die Fluoreszenzproteine mCherry (N-terminal) und EGFP (C-terminal) kloniert und die SNPs 1 und 2 eingefügt (Abbildung 10 A). Des Weiteren wurde ein

zusätzliches Stopp-Kodon in ex24 eingefügt. Wenn nun ex24 aus dem Konstrukt gespleißt wird, entsteht ein gleichzeitig rot- und grün-fluoreszierendes Protein (Abbildung 10 A, Δ ex24). Wird ex24 nicht gespleißt, stoppt die Translation am Stopp-Kodon in ex24, und ein nur rot-fluoreszierendes Protein entsteht (Abbildung 10 A, +ex24).

Um die Auswirkung der beiden SNPs auf das Spleißen von ex24 zu untersuchen, wurden Sensor-Konstrukte mit den vier möglichen SNP 1 (T oder C) und SNP 2 (G oder A) - Kombinationen stabil in IMR90S-Zellen exprimiert. Der Vergleich der Fluoreszenzintensität von mCherry und EGFP bei gleicher Belichtung erlaubt das Spleißen von ex24 in lebenden Zellen zu untersuchen (Abbildung 10 B). Bei der SNP-Kombination T/G zeigten Zellkolonien teils eine koordinierte Gelb-Färbung (mCherry und EGFP; Δ ex24), teils eine Rot-Färbung (nur mCherry; +ex24). Für die SNP-Kombination T/A und C/G wurde ex24 im Sensor-Konstrukt vollständig gespleißt, ersichtlich in einer Gelbfärbung. Die Kombination C/A führte zu vollkommener Inhibition des Spleißens von ex24. Damit wirkten sich die untersuchten SNPs auf das alternative Spleißen von BAG6 ex24 aus.

Um zu untersuchen, ob sich das Spleißen des Sensor-Konstrukts auch von der Zelldichte abhängig ist, wie das ex24-Spleißen von endogenem BAG6 (Abbildung 5 A und Abbildung 9 Abbildung 8 C), wurden IMR90S-Zellen mit der wildtypischen SNP-Kombination näher untersucht (Abbildung 10 C). In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme zeigten Zellen in der Zellkolonie-Mitte (bei hoher Zelldichte) eine Gelb-Färbung (Δ ex24). Zellen an der Kolonie-Peripherie (bei niedriger Zelldichte) zeigten hingegen eine Rot-Färbung (+ex24). Daraus ergibt sich, dass das Sensor-Konstrukt wie endogenes BAG6 zelldichteabhängig gespleißt wurde.

Um die molekulare Auswirkung der untersuchten SNPs genauer zu verstehen, wurden bioinformatische Vorhersagen mit SpliceAid2 (Piva et al., 2012) gemacht, wie sich eine potenzielle Spleiß-Regulatoren-Bindung durch die SNPs verändern könnte. Die Vorhersagen ergaben einen Einfluss auf das Bindeverhalten von SRSF5 (Serine und Arginin reicher

Spleißfaktor 5). Um dies zu verifizieren, wurden Westernblots von IMR90S-Zellen bei zunehmender Zelldichte für SRSF5 gefärbt (Abbildung 10 D). Während die SRSF5-Proteinmenge mit zunehmender Zelldichte zunahm, blieb die Menge von SRSF2, einem anderen Spleiß-Regulator, konstant. Interessanterweise zeigte sich für BAG6 KO-Zellen keine zelldichteabhängige Veränderung der SRSF5-Proteinmenge. Dies stimmte mit einer fehlenden, zelldichteabhängigen Morphologie-Veränderung der BAG6 KO-Zellen überein.

Zusammenfassend ergaben Experimente mit Spleißsensor-Konstrukten, dass die untersuchten SNPs im Intron zwischen ex24 und ex25 einen Einfluss auf das Spleißen von ex24 hatten, indem sie das Bindevverhalten von Spleiß-Regulatoren wie SRSF5 verändern. Eine zelldichteabhängige Regulation von SRSF5 in IMR90S wt-Zellen kann sich durch eine Mutation der Bindestelle nicht mehr auf das Spleißen von BAG6 ex24 auswirken. Die fehlende zelldichteabhängige Regulation von SRSF5 in BAG6 KO-Zellen weist darüber hinaus auf die mögliche Existenz einer Rückkopplungs-Schleife zwischen BAG6 und SRSF5 hin. Damit ließe sich eine zuvor beobachtete Krankheits-Assoziation von SNP1 (McGinnis et al., 2009) mit den zellulären Veränderungen durch die Expression unterschiedlicher ex24-Varianten erklären.

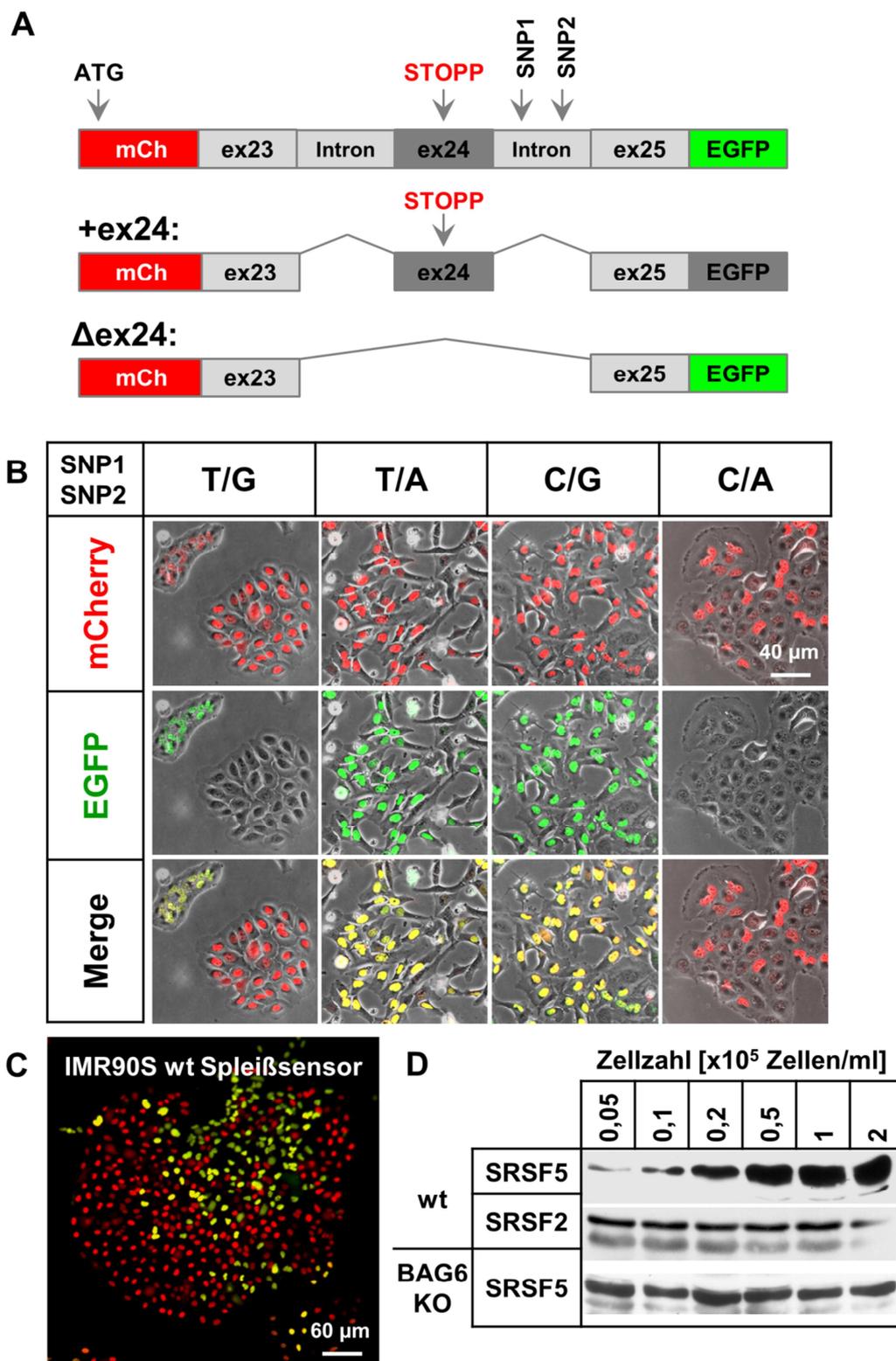


Abbildung 10: Krankheitsassoziierte SNPs im ex24-nachfolgendem Intron von BAG6 verändern das Spleißverhältnis von ex24.

A) Um den Einfluss von Krankheitsassoziierten SNPs auf das alternative Spleißen von ex24 zu untersuchen wurden Spleißsensor-Konstrukte hergestellt. Die Grafik veranschaulicht die zu diesem Zweck verwendeten Konstrukte. Die genomische BAG6-Sequenz ex23-ex25 wurde im Leseraster zwischen ein N-terminales mCherry und ein C-terminales EGFP kloniert. Ein zusätzlich eingefügtes Stopp-Kodon in ex24 führt zu einem Verlust der EGFP-Fluoreszenz, falls ex24 nicht gespleißt wird. Dadurch fluoreszieren diese Zellen nur rot (mCh). Hingegen führt das Spleißen von ex24 zu einer

roten (mCh) und grünen (EGFP) Fluoreszenz. Durch das Einfügen der SNPs 1 und 2 (siehe Pfeile) kann damit der Einfluss der SNPs auf das Spleißen von BAG6 ex24 untersucht werden. **B)** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von lebenden, stabilen IMR90S Wildtyp-Zellen mit Spleißsensor-Konstrukten für alle SNP1 und 2-Kombinationen. Die erste Spalte zeigt dabei die wildtypische SNP-Kombination (T/G). Gezeigt werden die einzelnen Fluoreszenzkanäle bei gleicher Belichtungsdauer sowie das daraus generierte Merge-Bild mit der jeweiligen Durchlichtaufnahme. **C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von IMR90S wt-Zellen mit dem Spleißsensor-Konstrukt mit wildtypischer SNP-Kombination (T/G). Das Bild zeigt das koordinierte, zelldichteabhängige Spleißen von ex24 in einer einzelnen Zellkolonie. Im Merge-Bild entsprechen gelbe Zellen BAG6 Δ ex24 und rote Zellen BAG6 +ex24. **D)** Westernblots für Gesamt-Zellysate von IMR90S wt bzw. BAG6 KO-Zellen, kultiviert bei zunehmender Zelldichten für SRSF-Proteine. Gezeigt wird die Zunahme von SRSF5 aber nicht SRSF2 in wt-Zellen. In BAG6 KO-Zellen ist SRSF5-Proteinmenge bei zunehmender Zelldichte hingegen unverändert. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

2.2.3 Der Einfluss eines BAG6 KO und -Spleißvarianten auf Zellmorphologie und Aktin-Zytoskelett

Wie vorangehend gezeigt, besteht ein Zusammenhang zwischen Zelldichte, alternativem Spleißen von BAG6 ex24 und der Zellmorphologie. Um genauer zu untersuchen wie sich der Verlust von BAG6 und die Rekonstitution mit BAG6 Δ ex24 bzw. +ex24 auf die Zellmorphologie auswirkt, wurden zunächst Zellkolonie mikroskopiert und für Komponenten des Aktin-Zytoskeletts gefärbt. Hierbei ermöglichte die Untersuchung von Zellkolonien (hervorgegangen aus Einzelzellen) den morphologischen Vergleich bei geringer Zelldichte. Außerdem lassen sich erste Rückschlüsse auf die Zell-Zell-Adhäsion ziehen.

Im Durchlicht zeigten zweidimensional wachsende IMR90S wt-Zellen einen epithelialen Phänotyp mit symmetrischem Zellkörper und ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 11 A, Reihe 1). BAG6 KO-Zellen zeigten hingegen einen eher mesenchymalen Phänotyp mit spindelförmigem Zellkörper, unregelmäßiger Zelloberfläche und geringer Zell-Zell-Adhäsion. Durch Expression der +ex24-Variante ließ sich der wt-Phänotyp wieder herstellen, nicht aber durch die Δ ex24-Variante. Ein ähnliches Bild ergab ich bei der dreidimensionalen Zellkultivierung im "hängenden Tropfen" (*Hanging drop*) (Abbildung 11 A, Reihe 2). Während wt und +ex24 eine starke Zell-Zell-Adhäsion zeigten, bildeten BAG6 KO und Δ ex24 hier nur lose Zellaggregate. Das Aktin-Zytoskelett (Abbildung 11, Reihe 3 und 4) von wt-Zellen war regelmäßig mit einem ausgeprägten kortikalen Netz. Dies wird im Aktin-Profil durch die zwei (von Zelle und Nachbarzelle) ausgeprägten Aktin-Intensitäts-Spitzen jeweils neben dem

Nukleus (N) deutlich (Abbildung 11 A, Reihe 5). Im BAG6 KO-Profil findet sich hingegen nur jeweils eine Spitze für jede Zell-Zell-Grenze und eine asymmetrische, perinukleäre Ansammlung von F-Aktin. Auch hier stellte nur die +ex24-Variante den wt mit ausgeprägtem, kortikalem Aktin-Zytoskelett wieder her.

Es ist bekannt, dass das kortikale Aktin-Zytoskelett direkten Einfluss auf die Integrität der Zellmembran hat (Köster und Mayor, 2016). Um zu untersuchen inwiefern das Fehlen des kortikalen F-Aktins in BAG6 KO-Zellen die Membranstabilität beeinflusst, wurden Einzelzellen in einer stärkeren Vergrößerung untersucht (Abbildung 11 A, Reihe 6). Hierbei zeigten BAG6 KO- und Δ ex24-Zellen vermehrte Bildung von Membranblasen (*blebbing*) als Zeichen von instabiler Zellmembran, wt und +ex24-Zellen nicht. BAG6 beeinflusste somit Zytoskelett und Membranintegrität und -motilität.

Als Adaptern zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Zellmembran fungieren Proteine wie Moesin. Ist das kortikale Aktinnetz beeinträchtigt, mit offensichtlichen Auswirkungen auf die Zellmembran, so könnten Adapter-Proteine wie Moesin eine veränderte Lokalisation zeigen (Fehon et al., 2010). Eine Moesin-Färbung im wt ergab eine punktartige Verteilung des Moesin, typisch für fokale Zellkontakte (Abbildung 11 A, Reihe 7). Im BAG6 KO war die Moesinfärbung hingegen ungeordnet, über den Zellkörper verteilt und sammelt sich asymmetrisch, perinukleär. Nur die +ex24-Variante konnte den wt-Phänotyp wiederherstellen.

Um einen Einfluss von BAG6 auf weitere Komponenten bzw. Interaktionspartner des Zytoskeletts zu betrachten, wurden FACS-Färbungen von wt und BAG6 KO-Zellen miteinander verglichen. Eine Zusammenstellung der Daten ist in einer normalisierten Form in Abbildung 11 B dargestellt. Es zeigte sich, dass epitheliale Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin (Epidermales Cadherin), EpCAM (Epitheliales Zell Adhäsions Molekül) und Integrin β 1 im BAG6 KO verringert exprimiert werden, das mesenchymale N-Cadherin hingegen vermehrt zu finden ist. Andere Zytoskelett-Proteine wie Mikrotubuli zeigten keinen

quantitativen Unterschied zwischen wt und BAG6 KO.

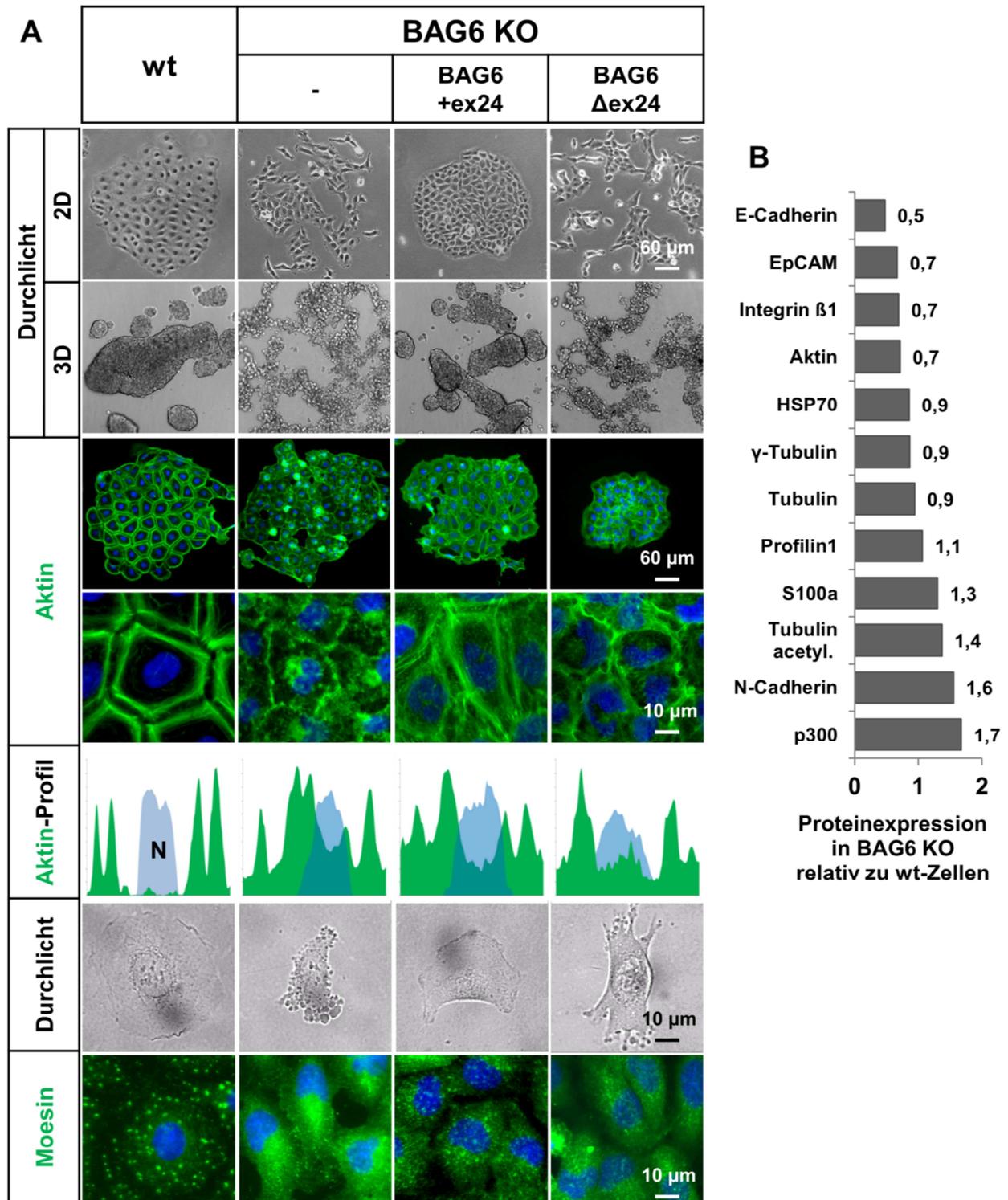


Abbildung 11: BAG6 +ex24 aber nicht Δ ex24 kompensiert die BAG6 KO-bedingten Veränderungen der Zellmorphologie, Zell-Zell-Adhäsion sowie Aktin-Architektur in IMR90S-Zellen.

A) Die Abbildung zeigt mikroskopische Aufnahmen von IMR90S wt, BAG6 KO und +ex24 bzw. Δ ex24-Zellen auf BAG6 KO-Basis. Die erste Reihe zeigt mikroskopische Durchlichtaufnahmen von einzelnen Zellkolonien bei konventionellen, adhärennten Wachstumsbedingungen (2D). Die zweite Reihe zeigt das Wachstumsverhalten der Zelllinien unter dreidimensionalen Wachstumsbedingungen (3D) im

"*Hanging drop assay*". Reihe drei und vier zeigen Immunfluoreszenzfärbungen für das Aktin-Zytoskelett mittels Phalloidin von Zellkolonien und in einer Detailansicht. Das Aktin-Profil veranschaulicht die Intensität der Aktin-Färbung relativ zum Nukleus (N). Die sechste Reihe zeigt Durchlichtaufnahmen von Einzelzellen wenige Stunden nach der Wiederaussaat. Die unterste Reihe zeigt Immunfluoreszenzfärbungen für den Zell-Adhäsionsmarker Moesin. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm . **B)** Das Diagramm zeigt die Veränderung der relativen Expressionsstärke von verschiedenen Zytoskelett-Proteinen und damit assoziierten Proteinen. Grundlage der Daten sind Durchfluss-Zytometrie-Messungen von mindestens 10 000 IMR90S-Zellen. Die dargestellten Werte zeigen die Proteinexpression des BAG6 KO relativ zum wt.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen BAG6 KO und wt-Zellen auf allgemeine Wachstumsdefekte der Zellen zurückzuführen waren, wurde das Wachstum von IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen über sechs Tage untersucht. BAG6 KO-Zellen zeigten dabei keinen Wachstumsdefekt (Abbildung 12 A). Auch hatte ein BAG6 KO bzw. die Rekonstitution mit BAG6 +ex24 bzw. Δex24 keine deutlichen Auswirkungen auf Zellgröße (FSC = *forward scatter*) oder -granularität (SSC = *side scatter*) gemessen mittels Durchfluss-Zytometrie (Abbildung 12 B).

Zusammenfassend ergaben morphologische Untersuchungen, dass ein BAG6 KO zu morphologischen Veränderung von einem eher epithelialen hin zu einem mesenchymaleren Phänotyp (epithelial-mesenchymale-Transition; EMT) führte. Diese Veränderung ging einher mit wenig ausgeprägtem, kortikalem F-Aktin und verringerter Membranintegrität, was in schwachen Zell-Zell-Kontakten resultierte. Ein Wachstumsdefekt der BAG6 KO-Zellen war dabei nicht ursächlich.

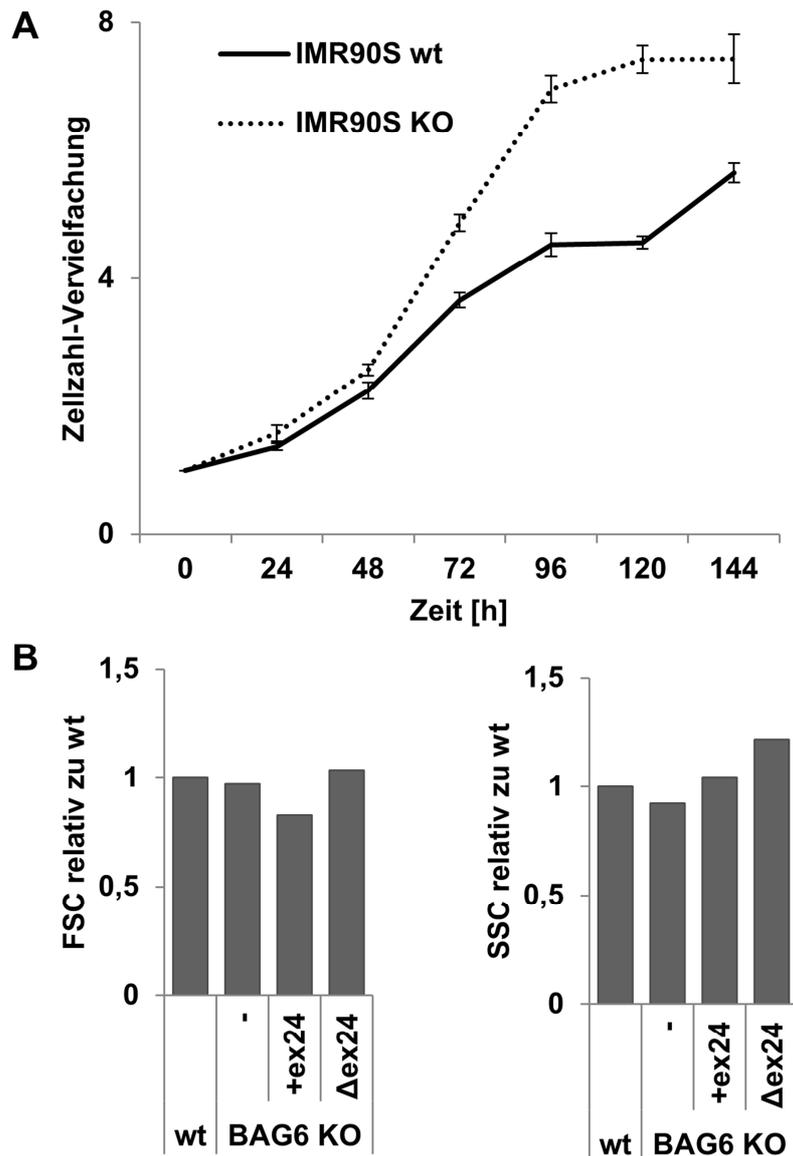


Abbildung 12: Ein BAG6 KO hat keinen deutlichen Einfluss auf Zellwachstum, -größe und -granularität von IMR90S-Zellen.

A) IMR90S Wildtyp (wt, durchgezogene Linie) bzw. BAG6 KO (KO, gestrichelte Linie) -Zellen wurden über einen Zeitraum von sechs Tagen kultiviert. Dabei wurde die Zellzahl zu unterschiedlichen Zeitpunkten (X-Achse) bestimmt und als Zellzahl-Vervielfachung (Y-Achse) relativ zum Startpunkt berechnet. Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente wieder. **B)** Zellgröße (FSC = *forward scatter*) bzw. -granularität (SSC = *side scatter*) von unfixierten IMR90S wt, BAG6 KO und +ex24 bzw. Δex24-Zellen wurde mittels Durchfluss-Zytometrie bestimmt. Dargestellt sind die relativen Messwerte von mindestens 10 000 Zellen relativ zum Wildtyp (wt).

2.2.4 Der Einfluss von BAG6-Spleißvarianten auf das Mikrotubuli-Zytoskelett

Die Abhängigkeit des Spleißens von BAG6 ex24 von der untersuchten Zelldichte (Abbildung 9 A und B) spiegelte sich in der Veränderung des Aktin-Zytoskeletts wieder (Abbildung 9 A, Reihe 3). Dabei ähnelte der wt-Phänotyp bei hoher bzw. niedriger Zelldichte der stabilen Zelllinie mit entsprechenden BAG6 ex24-Variante (Abbildung 11 A, Reihe 3 und 4). Um herauszufinden, ob diese morphologischen Übereinstimmungen auch für das Mikrotubuli-Skelett galt wurden wt, BAG6 KO-Zellen ohne bzw. mit einer der beiden ex24-Varianten mit einem Antikörper für Tubulin gefärbt (Abbildung 13 A). Dabei zeigte sich bei Zellkolonien des wt ein gleichmäßiges Mikrotubuli-Netz, wie zuvor bei Bedingungen geringer Zelldichte. Der BAG6 KO spiegelte hingegen bei vergleichbarer Zelldichte den wt bei hoher Zelldichte wieder, mit asymmetrischem, perinukleärem Mikrotubuli-Netz. Durch Rekonstitution der BAG6 KO-Zellen mit +ex24, ließ sich das gleichmäßige Mikrotubuli-Netz über den gesamten Zellkörper wieder herstellen. Die Δ ex24-Variante entsprach dem BAG6 KO-Phänotyp. Das Mikrotubuli-interagierende Protein PPP4C, das in Studien als BAG6-Interaktionspartner nachgewiesen wurde (Ewing et al., 2007; Kristensen et al., 2012), zeigte dementsprechend eine geordnete, punktartige Verteilung im wt, nicht aber im BAG6 KO (Abbildung 13 A, Reihe 3). Wie zuvor für das Aktin-Zytoskelett, ließ sich bei der PPP4C-Färbung der wt-Phänotyp nur mit der +ex24-Variante wiederherstellen.

In einem Massenspektrometrie-Experiment ist BAG6 bereits als Tubulin-assoziiertes Protein detektiert worden (Hein et al., 2015), außerdem besitzt es SH3-Bindestellen, über die in BAG3 eine Tubulin-Bindung vermittelt wird (Gamerding et al., 2011). Um eine Bindung von BAG6 an Tubulin zu bestätigen, wurde eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen BAG6 durchgeführt (Abbildung 13 B). Der Westernblot des BAG6-Präzipitats war positiv für β -Tubulin. Somit interagierte BAG6 mit Tubulin.

Zytosolisches BAG6 lag mit zunehmender Zelldichte in Form von Granula im Zytosol vor (Abbildung 5). Stabile HEK-Zellen mit der mCherry-markierten Δ ex24-Variante erlaubten eine Beobachtung dieser Granula in lebenden Zellen in Echtzeit. Eine Beobachtung unter dem

Fluoreszenzmikroskop ergab, dass diese sich mit einer Geschwindigkeit von ca. einem μm pro Minute in der Zelle bewegen konnten (Abbildung 13 C). Um zu untersuchen ob dieser in Echtzeit-verfolgbare BAG6-Transport ähnlich wie bei BAG3 (Gamerding et al., 2011) Mikrotubuli-vermittelt ist, wurden stabile HEK Δex24 Zellen mit Chemikalien behandelt, die den Mikrotubuli-abhängigen Transport inhibieren (Abbildung 13 D). Als Kontrolle wurde die Mikrotubuli-Polymerisation mit Colchicin inhibiert. Merge-Bilder mit einem Zeitunterschied von einer Minute zeigten eine eindeutige Bewegung der BAG6-Granula in der unbehandelten Kontrolle (grüne bzw. rote Granula). Eine Behandlung mit Vanadate (einem Inhibitor für den Dynein-abhängigen Vesikel-Transport), weniger mit AMP-PNP (Adenylyl-imidodiphosphate; einem Inhibitor für den Kinesin-abhängigen Vesikel-Transport), reduzierte die Bewegung und führte zu perinukleären Anreicherung von +ex24, erkennbar an der hauptsächlich gelben Signalüberlagerung von beiden Zeitpunkten. Wurde das Mikrotubuli-Skelett mit Colchicin gestört (wodurch der gesamte Tubulin-abhängige Transport zusammenbricht), bildeten sich deutlich vergrößerte, perinukleäre BAG6-Granula in einem ähnlichen Ausmaß wie nach Vanadate-Behandlung. Da Vanadate den Dynein-abhängigen Transport von der Zellperipherie zum Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) inhibiert, könnte dies auf eine Beteiligung von BAG6 Δex24 am retrograden Transport hinweisen.

Zusammenfassend ergaben Untersuchungen hinsichtlich des Mikrotubuli-Skeletts, dass BAG6 die Mikrotubuli-Skelett-Architektur beeinflusste, mit diesem assoziiert war und über selbiges innerhalb des Zytosols transportiert wurde.

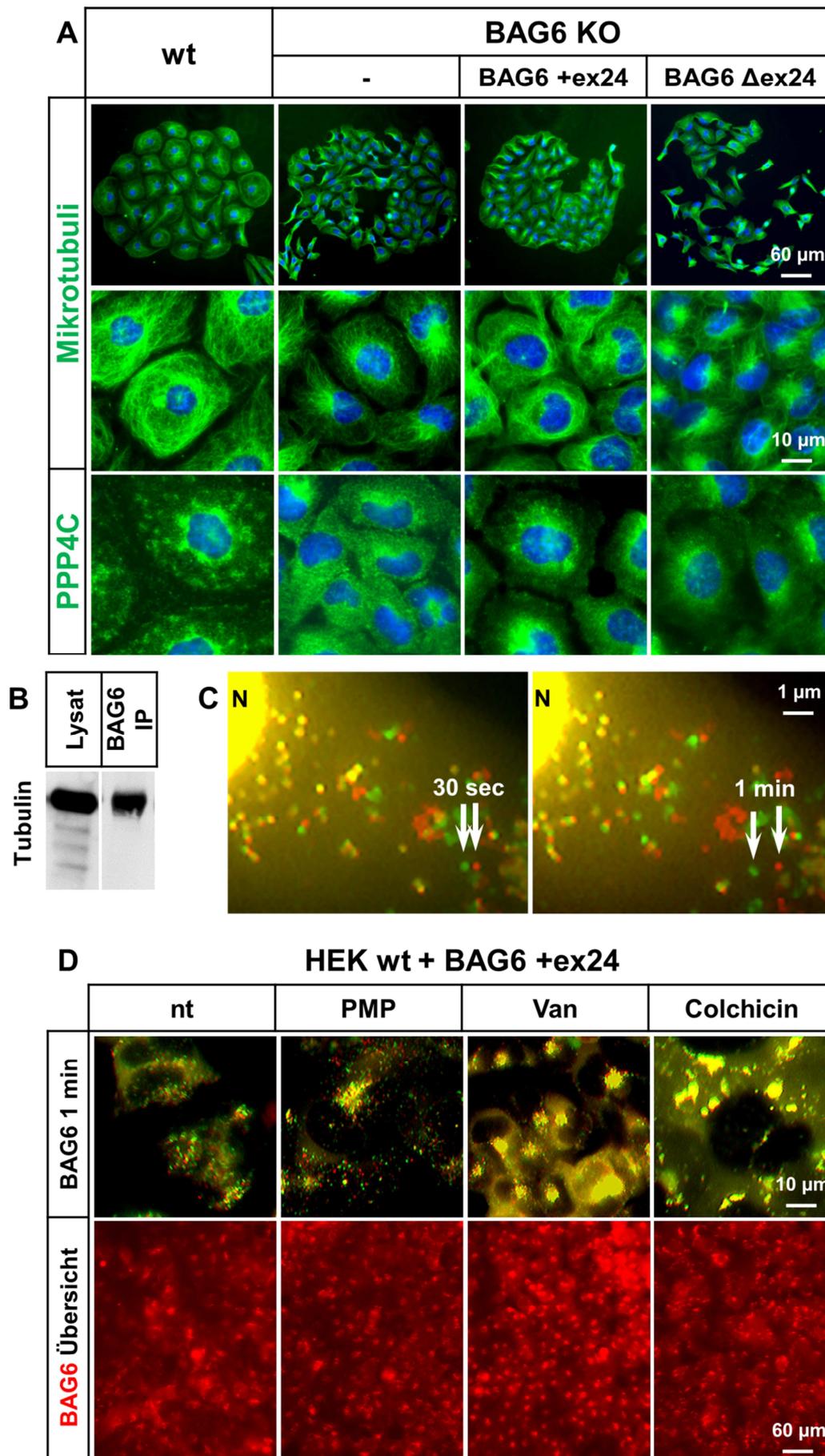


Abbildung 13: BAG6 beeinflusst das Mikrotubuli-Skelett und ist selbst Tubulin-assoziiert.

A) Die Abbildung zeigt mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahmen von IMR90S wt, BAG6 KO und +ex24 bzw. Δ ex24-Zellen auf BAG6 KO-Basis. Reihe eins und zwei zeigen Immunfluoreszenzfärbungen für das Mikrotubuli-Skelett von Zellkolonien bzw. in einer Detail-Ansicht. Reihe drei zeigt die Immunfluoreszenzfärbung für das Tubulin- und BAG6-assoziierte Protein PPP4C. **B)** Westernblots gefärbt für Tubulin vom Gesamt-Zelllysät und nach einer BAG6-Immunpräzipitation (BAG6 IP) mit Pan-BAG6-Antikörper von IMR90S wt-Zellen. Das Gesamt-Zelllysät entspricht 10 % der für die BAG6 IP eingesetzten Proteinmenge. **C)** Aufnahmen von HEK wt-Zellen mit mCherry-BAG6- Δ ex24 zeigten eine Bewegung von BAG6-positiven Granula innerhalb der Zelle. Gezeigt werden zwei Zeitpunkte (nach 30 sec und 1 min), wobei der Startpunkt rot und der spätere Zeitpunkt grün kodiert ist. Der Nukleus (N) ist indiziert. Pfeile markieren eine Granulabewegung. **D)** Stabile HEK wt-Zellen mit mCherry-BAG6- Δ ex24 wurden mit Motorprotein-Inhibitoren AMP-PNP und Vanadate inkubiert. Als Kontrolle diente eine Behandlung mit Colchicin zur Inhibition der Mikrotubuli-Polymerisation. Die erste Reihe zeigt Merge-Bilder mit einer Minute Zeitdifferenz von Fluoreszenzaufnahmen mit mCherry-BAG6- Δ ex24 positiven Granula. Die zweite Reihe zeigt die Verteilung der mCherry-BAG6- Δ ex24-Fluoreszenz in der Übersicht. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μ m.

2.2.5 Die Bedeutung von BAG6-Spleißvarianten für die Morphologie von nicht-invasiven MCF-Zellen

In IMR90S-Zellen zeigt sich ein deutlicher Einfluss von BAG6 auf das Zytoskelett und die Zellmorphologie (Abbildung 11 A und Abbildung 13 A). Mehrere Studien weisen einen Zusammenhang zwischen einer veränderten BAG6-Homöostase und erhöhter Metastasierungsgefahr bzw. Tumorwachstum nach, insbesondere bei Brustkrebs (Calderon-Gonzalez et al., 2015). Um die Bedeutung von BAG6-Spleißvarianten in Brustkrebs-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst ein BAG6 KO in wenig invasiven MCF-Zellen (welche aus luminalem Brustzellkarzinom isoliert wurden; Soule et al., 1973) hergestellt.

Im Gegensatz zu IMR90S- besaßen MCF-Zellen einen größeren Anteil an zytosolischem BAG6 und weniger kernlokalisiertes BAG6 (Abbildung 14 A, oben). Ein erfolgreicher BAG6 KO durch das CRISPR/Cas-System, konnte mittels Westernblot verifiziert werden (Abbildung 14 A, unten). Auf Basis des BAG6 KO wurden weiter stabile BAG6 +ex24 bzw. Δ ex24-Zelllinien hergestellt.

Endsprechend den morphologischen Untersuchungen an den IMR90S-Zelllinien (Abbildung 11 A) wurden verschiedene MCF-Zellkolonien im Durchlicht untersucht und für Komponenten des Zytoskeletts gefärbt (Abbildung 14 B). Als Zellen mit epithelialer Herkunft bildeten wt MCF-Zellen kompakte, "pflastersteinartige" Kolonien mit starker Zell-Zell-Adhäsion (Abbildung 14 B, Reihe 1). Wie in IMR90S-Zellen resultierte ein BAG6 KO in einer

verringerten Zell-Zell-Adhäsion, erkennbar in einer größeren Ausbreitung der Zellkolonien. Außerdem wechselten die MCF BAG6 KO-Zellen von ihrer typisch epithelialen zu einer mesenchymalen Morphologie. Die +ex24-Variante lokalisierte nukleär, die Δ ex24-Variante zytosolisch (Abbildung 14 B, Reihe 2). Die unterschiedliche Lokalisation der ex24-Spleißvarianten entsprach dabei den Beobachtungen bei anderen Zelllinien (Abbildung 6 B und F). Der wt-Phänotyp konnte weitgehend durch die +ex24-Variante, nicht aber durch die Δ ex24-Variante wiederhergestellt werden.

Unterschiede im Zytoskelett zeigten sich in MCF-Zellen mit ihrem schlecht ausgeprägten Aktin-Zytoskelett und geringer Größe weniger auffällig als bei IMR90S-Zellen (Abbildung 14 B, Reihe 4). Die stärkere F-Aktin-Färbung an den Zell-Zell-Kontakten der wt MCF-Zellen war im BAG6 KO deutlich reduziert. Auch die ringähnliche Aktin-Struktur um den Kern war weniger prominent, dafür bildeten sich im BAG6 KO asymmetrische, perinukleäre Aktin-Strukturen. In +ex24-Zellen war das Aktin-Zytoskelett entsprechend dem wt regelmäßiger ausgeprägt. Interessanterweise bildeten sich die ringähnlichen Aktin-Strukturen des wt eher in Δ ex24-Zellen wieder aus.

Um trotz der weniger deutlichen Unterschiede im Aktin-Zytoskelett der MCF-Zelllinien eine mögliche Ursache für die reduzierte Zell-Zell-Adhäsion der BAG6 KO-Zellen zu finden, wurden Zelladhäsionsmoleküle gefärbt. E-Cadherin ist neben seiner Funktion als Adhäsions-Molekül auch ein wichtiges Markerprotein für epitheliales Wachstum und sein Verlust führt zu höherem Metastasierungspotenzial (Beavon, 2000). Der MCF wt besaß eine starke, gleichmäßige E-Cadherin-Färbung entlang der Zell-Zell-Kontakte, während dort im BAG6 KO weniger E-Cadherin zu finden war (Abbildung 14 B, Reihe 5). Die +ex24-Zellen entsprachen dem wt-Phänotyp. In Δ ex24-Zellen war die E-Cadherin-Färbung noch weniger membranlokalisiert als beim BAG6 KO. Für ein weiteres Adhäsionsmolekül Integrin β 1 ergab sich ein ähnliches Bild. Die Membranlokalisation im BAG6 KO- und Δ ex24-Zellen war reduziert (Abbildung 14 B, Reihe 6). Syndecan als weiteres Adhäsionsprotein und Ko-Rezeptor (Mythreue und Blobel, 2009) war im wt gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt.

In BAG6 KO-Zellen bildeten sich hingegen Aggregate um den Nukleus (Abbildung 14 B, Reihe 7).

Um auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen BAG6 KO und wt-Zellen auf allgemeine Wachstumsdefekte der Zellen zurückzuführen waren, wurde das Wachstum von MCF wt und BAG6 KO-Zellen über sechs Tage untersucht (Abbildung 14 C). Dabei zeigte sich kein deutlicher Wachstumsdefekt der BAG6 KO-Zellen. Die größere Zellzahl-Vervielfachung nach 96 h erklärte sich mit einem dichteren, epithelialeren Wachstum von wt-Zellen im Vergleich zu BAG6 KO-Zellen.

Zusammenfassend ergaben die BAG6-abhängigen Veränderungen in MCF- und in IMR90S-Zellen ein übereinstimmendes Bild: Durch einen BAG6 KO wurde die Zellmorphologie mesenchymaler und Zell-Zell-Kontakte geschwächt.

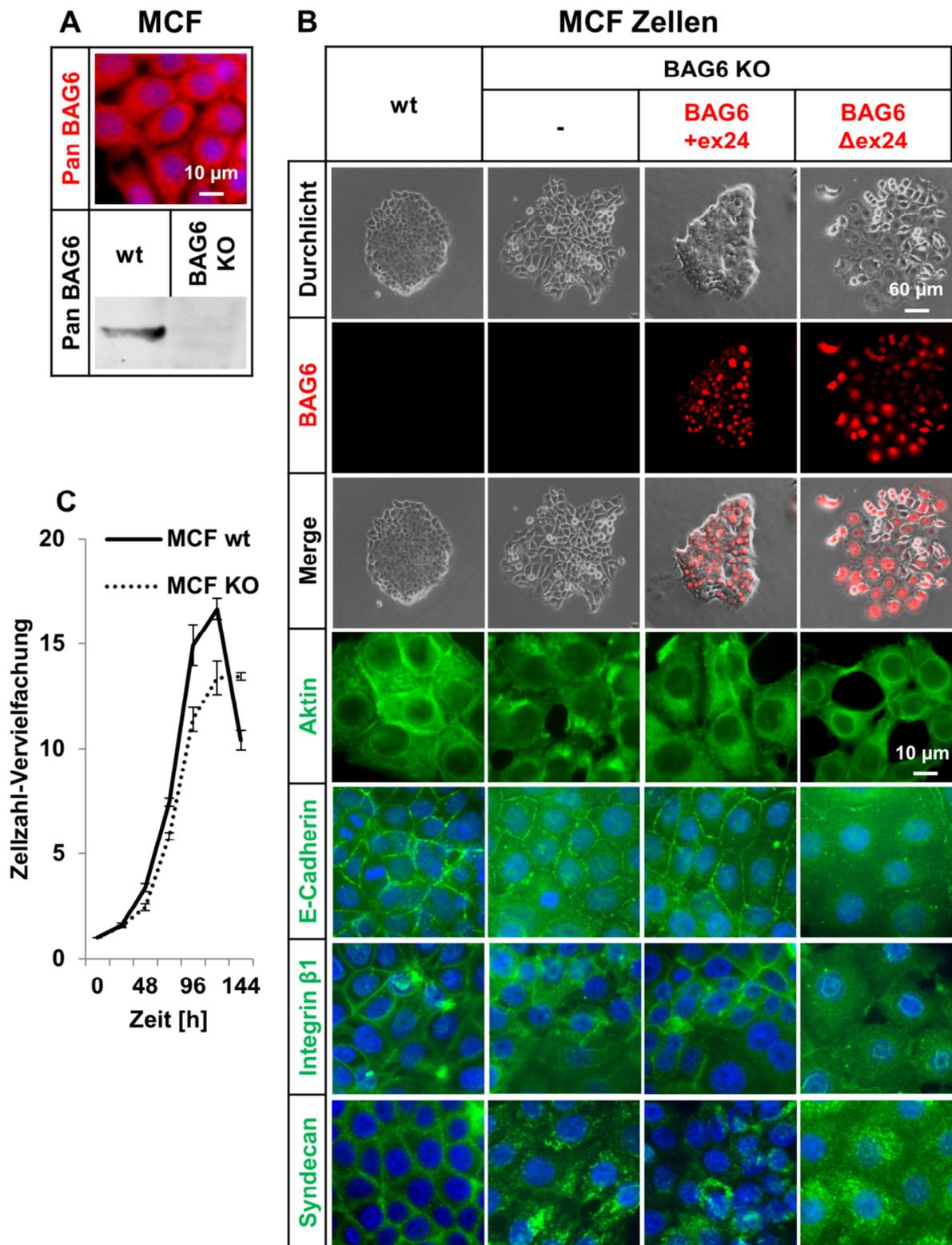


Abbildung 14: BAG6 +ex24 aber nicht Δex24 kompensiert die BAG6 KO-bedingten Veränderungen in Zellmorphologie, Zell-Zell-Adhäsion sowie Aktin-Architektur von nicht invasiven MCF-Zellen.

A) Mittels CRISPR/Cas-Technologie wurde ein BAG6 KO in MCF-Zellen hergestellt. Eine Immunfluoreszenzfärbung für die BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) zeigt die endogene BAG6-Lokalisation in MCF-Zellen. Der Westernblot für Gesamt-Zelllysate von MCF-Wildtyp (wt) und BAG6 KO-Zellen gefärbt mit dem Pan BAG6-Antikörper veranschaulicht den BAG6 KO. **B)** Die Abbildung zeigt Unterschiede zwischen MCF wt, BAG6 KO und +ex24 bzw. Δex24-Zellen auf BAG6

KO-Basis. Die erste Reihe zeigt mikroskopische Durchlichtaufnahmen von einzelnen Zellkolonien bei adhärennten Wachstumsbedingungen. Die zweite Reihe zeigt die entsprechende mCherry-BAG6-Fluoreszenz mit den dazugehörigen Merge-Bilder in Reihe drei. Die vierte Reihe zeigt Fluoreszenzfärbungen für das Aktin-Zytoskelett mittels Phalloidin. Die drei untersten Reihen zeigen Immunfluoreszenzfärbungen für E-Cadherin, Integrin $\beta 1$ und Syndecan bei jeweils gleicher Belichtungszeit. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm . **C**) MCF Wildtyp (wt, durchgezogene Linie) bzw. BAG6 KO (KO, gestrichelte Linie) -Zellen wurden über einen Zeitraum von sechs Tagen kultiviert. Dabei wurde die Zellzahl zu unterschiedlichen Zeitpunkten (X-Achse) bestimmt und als Zellzahl-Vervielfachung (Y-Achse) relativ zum Startpunkt berechnet. Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente wieder.

2.2.6 Die Bedeutung von BAG6 für die Morphologie von invasiven MDA-Zellen

Neben MCF- sind MDA-Zellen (isoliert aus Metastasen eines basalen Adenokarzinoms) eine der wichtigsten Zelllinien für die Brustkrebs-Forschung. Im Gegensatz zu MCF- sind MDA-Zellen hoch-invasiv, metastasenbildend und fibroblastoid, also mesenchymalen Typs. In Bezug auf BAG6 zeichneten sich MDA-Zellen durch einen deutlich höheren Anteil an BAG6 im Kern aus (Abbildung 15 A, oben) verglichen mit MCF-Zellen (Abbildung 14 A, oben).

Um die Auswirkung eines BAG6 KO in epithelialen, nicht invasiven Zellen (MCF) mit mesenchymalen, invasiven Zellen vergleichen zu können, wurde ein BAG6 KO in MDA-Zellen hergestellt und mittels Westernblot bestätigt (Abbildung 15 A). Stabile +BAG6-Zelllinien auf BAG6 KO-Basis konnten nicht hergestellt werden, da die Transfektionseffizienz zu gering war. Das Wachstumsbild von wt MDA-Zellkolonien bestätigte ihr hohes Migrationspotenzial in der Durchlichtübersicht (Abbildung 15 B, Reihe 1). BAG6 KO MDA-Zellen breiteten sich hingegen weniger stark aus. Bei höherer Zelldichte und stärkerer Vergrößerung zeigte sich eine mesenchymale Morphologie mit ausgeprägten Zellfortsätzen bei wt-Zellen, wohingegen BAG6 KO-Zellen eine regelmäßiger, epitheliale Wachstumsform annahmen (Abbildung 15 B, Reihe 2). Ein verändertes Zellaggregations-Verhalten ergab sich auch im dreidimensionalen "*Hanging drop assay*" (Abbildung 15 B, Reihe 3 und 4). Hier bildeten wt-Zellen ausgeprägte Zellfortsätze aus, BAG6 KO-Zellen nicht. Eine Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli zeigt, dass die in wt-Zellen vorhandenen Zellfortsätze Mikrotubuli-positiv waren.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen

BAG6 KO und wt-Zellen auf allgemeine Wachstumsdefekte der Zellen zurückzuführen waren, wurde das Wachstum von MDA wt und BAG6 KO-Zellen über sechs Tage untersucht (Abbildung 15 C). Dabei zeigte sich kein deutlicher Wachstumsdefekt der BAG6 KO-Zellen. Die größere Zellzahl-Vervielfachung nach 96 h erklärte sich mit einer stärkeren Tendenz der wt-Zellen übereinander zu wachsen (siehe Abbildung 15 B, Reihe 2).

Ein Vergleich von IMR90S-, MCF- und MDA-Zellen ergab, dass ein BAG6 KO die Zytoskelett-Komplexität reduzierte und dadurch die allgemeine Zell-Morphologie veränderte. IMR90S- und MCF- wt-Zellen hatten eine relativ hohe Zell-Zell-Adhäsion. Ein BAG6 KO verringerte diese und erhöhte so das Migrationspotenzial. Gleichzeitig veränderte sich die Morphologie von einem eher epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp. Ein anderes Bild ergab sich für die bereits hochinvasiven MDA-Zellen. Mit ihrer im Vorhinein geringen Zell-Zell-Adhäsion resultierte ein BAG6 KO in keiner weiteren Migrationssteigerung. Im Gegenteil, es kam zu einem kompakteren Wachstum. Bedacht werden muss bei dem Vergleich der unterschiedlich invasiven MCF- und MDA-Zellen, dass sich beide Zelllinien in ihrer endogenen BAG6-Lokalisation unterscheiden. Dies könnte die andersgeartete Auswirkung auf die Zell-Zell-Adhäsion durch Veränderung der BAG6-Homöostase erklären.

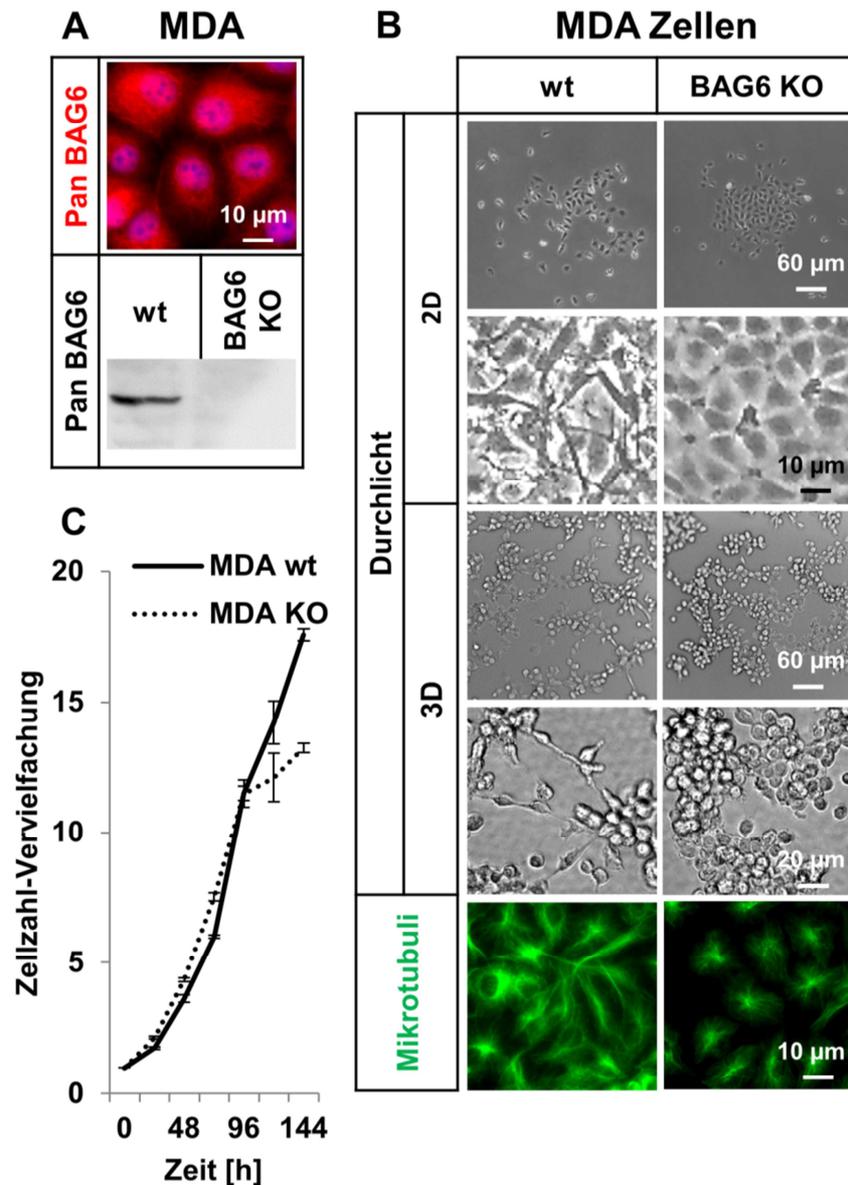


Abbildung 15: Ein BAG6 KO verändert die Morphologie von invasiven MDA-Zellen.

A) Mittels CRISPR/Cas-Technologie wurden ein BAG6 KO in MDA-Zellen hergestellt. Eine Immunfluoreszenzfärbung für die BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) zeigt die endogene BAG6-Lokalisation in MDA-Zellen. Der Western blot für Gesamt-Zelllysate von MDA-Wildtyp (wt) und BAG6 KO-Zellen gefärbt mit dem Pan BAG6-Antikörper veranschaulicht den BAG6 KO. **B)** Die Abbildung zeigt Unterschiede zwischen MDA wt und BAG6 KO-Zellen. Reihe eins und zwei zeigen mikroskopische Durchlichtaufnahmen von einzelnen Zellkolonien bei konventionellen, adhärenen Wachstumsbedingungen (2D) in Übersicht und Detail. Reihe drei und vier zeigen das Wachstumsverhalten der Zelllinien unter dreidimensionalen Wachstumsbedingungen (3D) im "Hanging drop assay" in Übersicht und Detail. Die unterste Reihe zeigt eine Immunfluoreszenzfärbungen für das Mikrotubuli-Skelett. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm . **C)** MDA Wildtyp (wt, durchgezogene Linie) bzw. BAG6 KO (KO, gestrichelte Linie) -Zellen wurden über einen Zeitraum von sechs Tagen kultiviert. Dabei wurde die Zellzahl zu unterschiedlichen Zeitpunkten (X-Achse) bestimmt und als Zellzahl-Vervielfachung (Y-Achse) relativ zum Startpunkt berechnet. Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente wieder.

2.2.7 BAG6 beeinflusst das Koloniewachstum von Zellen im "Soft-agar-assay"

Viele der durch einen BAG6 KO veränderten Eigenschaften der Zelle, wie z.B. Zytoskelett-Architektur und Zell-Zell-Adhäsion sind wichtig für die EMT und Tumorbildung. Ein weiteres Merkmal, das entscheidend für die Malignität von Tumorzellen ist, ist die Fähigkeit auch ohne Adhäsion an eine solide Oberfläche zu wachsen. Diese Eigenschaft erlaubt Tumorzellen sich unabhängig von einem Zellverband und der zellulären Umgebung zu teilen und schließlich Metastasen zu bilden. Der stringenteste Test für diese Zell-Eigenschaft ist der "Soft-agar-assay" (Borowicz et al., 2014), bei dem die Koloniebildung von in Agarose eingebettete Einzelzellen untersucht wird.

Um den Einfluss von BAG6 auf das Koloniewachstum im "Soft-agar-assay" zu untersuchen, wurden die MCF- bzw. MDA-Brustkrebszelllinien sowie IMR90S-Zellen verwendet. Hierbei zeigten beide wt und BAG6 KO-Brustkrebszelllinie eine deutliche Koloniebildung im Durchlicht nach 21 Tagen (Abbildung 16 A). Im Vergleich dazu war die Koloniebildung von IMR90S wt-Zellen vermindert, erhöhte sich aber durch einen BAG6 KO. Eine Auswertung der Kolonieanzahl ergab keine Auswirkung des BAG6 KO in den getesteten MCF bzw. MDA-Zellen (Abbildung 16 A, Diagramm). Hingegen verdreifacht sich die Kolonieanzahl in IMR90S-Zellen durch einen BAG6 KO.

Um zu testen, ob die Expression von BAG6 ex24-Spleißvarianten einen Einfluss auf das Koloniewachstum im "Soft-agar-assay" hat, wurde die Brustkrebszelllinie MCF verwendet, bei der ein BAG6 KO allein keinen eindeutigen Phänotyp zeigte. Außerdem ist BAG6 im Bereich der Brustkrebs-Forschung als potenzieller Biomarker von wachsendem Interesse (Calderon-Gonzalez et al., 2015). Während im "Soft-agar-assay" +ex24 nur halb so gut wie wt und BAG6 KO-Zellen wuchsen, erhöhte sich die Kolonieanzahl durch Δ ex24-Expression um das 1,5fache (Abbildung 16 B).

Neben der quantitativen Auswertung der Kolonieanzahl lässt sich das Koloniewachstum auch qualitativ anhand der Koloniegröße auswerten. Repräsentative, lichtmikroskopische

Aufnahmen von einzelnen Kolonien zeigten, dass sich die Koloniegröße (angegeben als Kolonie-Durchmesser relativ zum wt) in MCF-Zellen durch einen BAG6 KO nicht veränderte (Abbildung 16 C). In MDA- und IMR90S-Zellen, die im Gegensatz zu MCF-Zellen eher epithelial wachsen, verdoppelte sich die Koloniegröße hingegen.

Der "*Soft-agar-assay*" zeigte zusammenfassend, dass Zellen, die nur schlecht unter nicht-adhären Bedingungen wachsen (wie IMR90S-Zellen), durch einen BAG6 KO mehr und auch größere Zellkolonien bildeten. Bei Zellen, die bereits gut unter nicht-adhären Bedingungen wachsen (wie MCF-Zellen), erhöhte sich die Koloniezahl durch einen BAG6 KO nicht weiter. Durch Expression der +ex24-Variante ließ sich die Koloniezahl reduzieren. Ein BAG6 KO führte also nicht nur morphologisch zu einer EMT, sondern bestätigte sich auch in einem funktionellen Assay. Des Weiteren sollte ein veränderter BAG6-Status die Induzierbarkeit einer EMT beeinflussen.

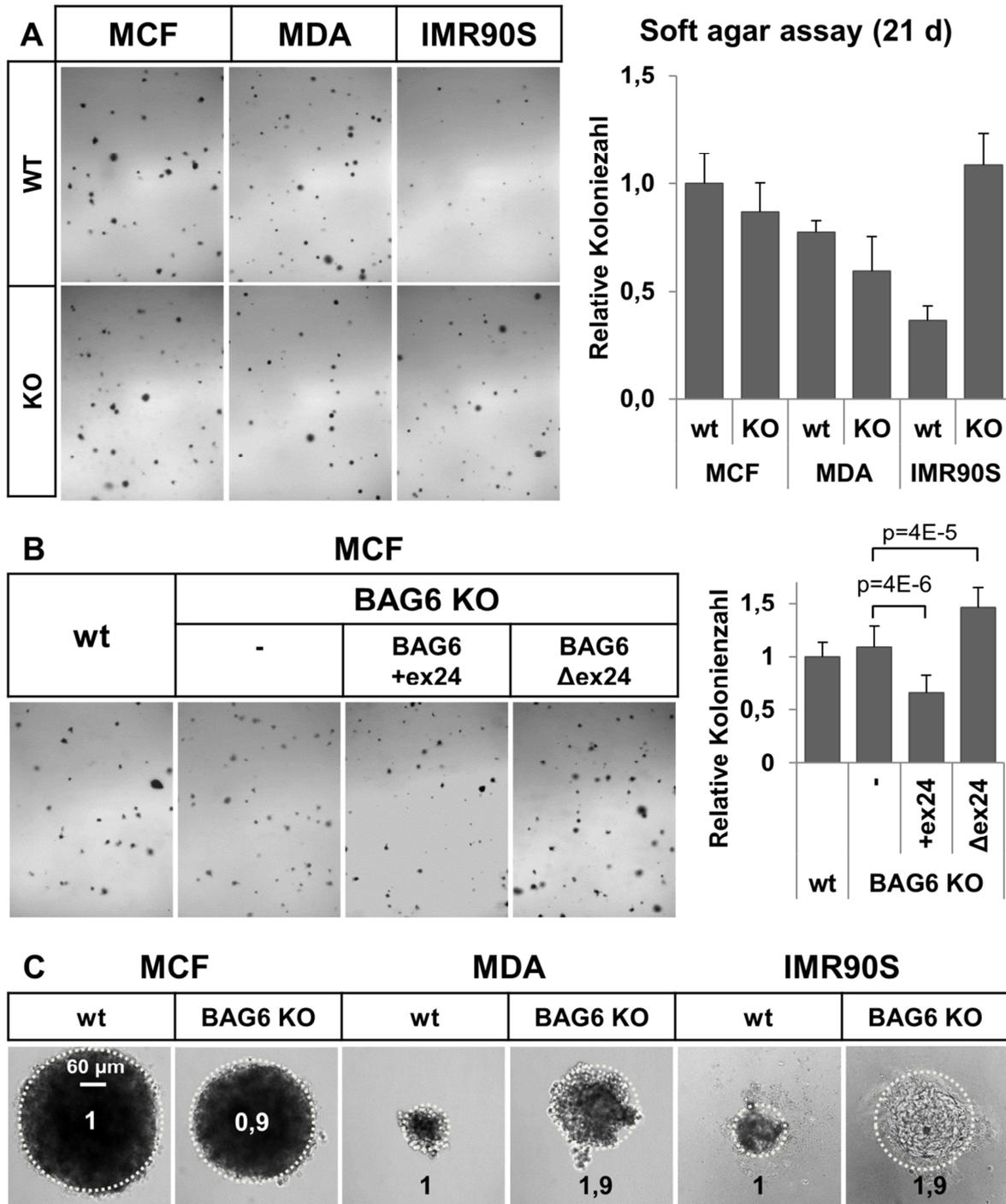


Abbildung 16: BAG6 beeinflusst das Koloniewachstum von Zellen im "Soft-agar-assay".

A) MCF, MDA und IMR90S wt bzw. BAG6 KO-Zellen wurden 21 Tage im "Soft-agar-assay" kultiviert. Die mikroskopischen Durchlichtaufnahmen zeigen die angewachsenen Zellkolonien nach 21 Tagen. Das dazugehörige Diagramm gibt die Koloniezahl relativ zu den MCF wt-Zellen wieder. **B)** MCF wt, BAG6 KO und +ex24 bzw. Δex24-Zellen auf BAG6 KO-Basis wurden 21 Tage im "Soft-agar-assay" kultiviert. Das dazugehörige Diagramm gibt die Koloniezahl relativ zu den MCF wt-Zellen wieder. **C)** Durchlichtaufnahmen von Zellkolonien aus dem im "Hanging drop assay" von MCF, MDA und IMR90S wt bzw. BAG6 KO-Zellen. Der Kolonie-Durchmesser ist als Zahl relativ zum jeweiligen wt angegeben. Alle Ergebnisse n=3.

2.2.8 Morphologische Veränderungen durch Zytokinbehandlung von IMR90S-Zellen sind BAG6-abhängig

IMR90S-Zellen zeigten eine epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) abhängig von der +ex24-Expression (Abbildung 11). Eine Rekonstitution des BAG6 KO mit einer +ex24-Variante führte zu einem epithelialen, mit einer Δ ex24-Variante zu einem mesenchymalen Phänotyp. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei MCF-Zellen (Abbildung 14 B). Es ist bekannt, dass sich eine EMT bzw. MET (mesenchymale-epitheliale-Transition) auch mittels Zytokinbehandlung induzieren lässt. EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) und TGF β (Transformierender Wachstumsfaktor beta) gehören zu den wichtigsten Vertretern dieser Zytokine (Uttamsingh et al., 2008). Für TGF β konnte bereits eine Korrelation mit der BAG6-Expression gezeigt werden (Dhaouadi et al., 2014). Außerdem bindet BAG6 selbst an den TGF β -Rezeptor (Kwak et al., 2008). Ist die morphologische Plastizität abhängig von BAG6, könnte eine Zytokin-induzierte EMT in BAG6 KO-Zellen reduziert und in +ex24 bzw. Δ ex24-Zellen verändert sein.

Um diese Hypothese zu testen wurden IMR90S wt, BAG6 KO und BAG6 KO-Zellen +BAG6 +ex24 bzw. Δ ex24 verwendet. Diese wurden mit EGF bzw. TGF β 14 Tage stimuliert (Abbildung 17). Während wt-Zellen durch eine EGF-Stimulation weiter epithelial wuchsen, rundeten sich die BAG6 KO-Zellen nach EGF-Behandlung ab (Abbildung 17, Spalte 2). Die +ex24-Zellen reagierten auf EGF ähnlich wie die BAG6 KO-Zellen. Dies war beachtlich, da +ex24 in vorherigen Versuchen eher dem wt ähnelte. Interessanterweise ging der Verlust der Zell-Zell-Kontakte bei der +ex24-Variante mit einer Verschiebung des sonst nukleären BAG6 ins Zytosol einher (Abbildung 17, siehe Detail BAG6). Die BAG6 Δ ex24-Zellen zeigten keine eindeutige, morphologische Reaktion auf die EGF-Behandlung, jedoch eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit. Eine TGF β -Stimulation führte zu einem mesenchymaleren Phänotyp im wt. Die BAG6 KO-Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen, ebenso wie die +ex24-Zellen ihren epithelialen bzw. die Δ ex24-Zellen ihren mesenchymalen Phänotyp beibehielten.

Zusammenfassend ergaben Experimente zu einer zytokininduzierten EMT, dass die Induzierbarkeit in IMR90S-Zellen durch einen BAG6 KO vermindert wurde. Die Rekonstitution des BAG6 KO mit der +ex24-Variante stabilisierte den epithelialen Phänotyp auch nach TGF β -Behandlung.

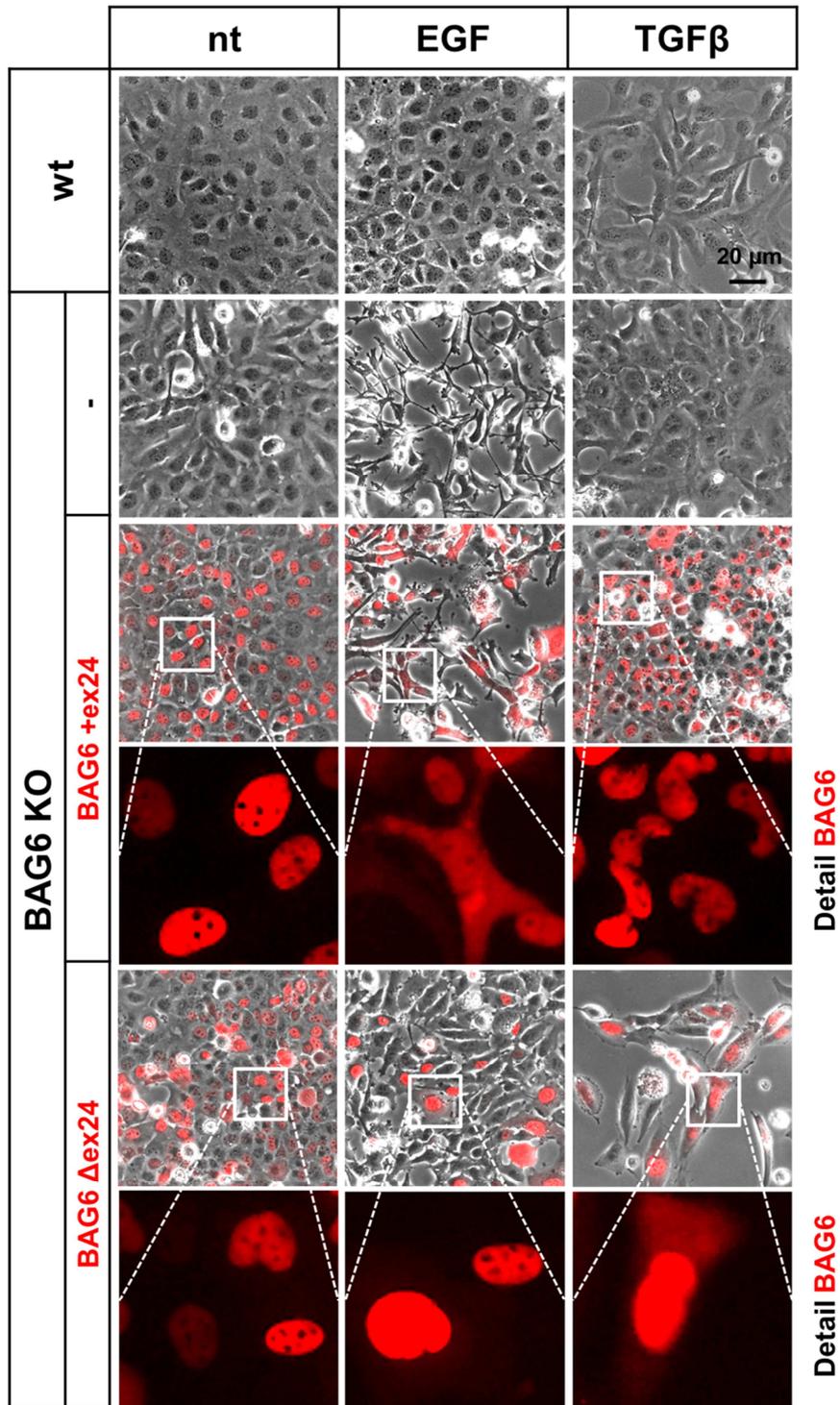


Abbildung 17: BAG6 beeinflusst die morphologische Reaktion von IMR90S-Zellen nach Zytokinstimulation.

IMR90S wt, BAG6 KO und +ex24 bzw. Δ ex24-Zellen auf BAG6 KO-Basis wurden 14 Tage mit EGF bzw. TGF β behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (nt). Durchlichtaufnahmen zeigen die morphologischen Veränderungen in den verschiedenen, stabilen Zelllinien. Im Fall von +ex24 bzw. Δ ex24 zeigen Fluoreszenzaufnahmen die mCherry-BAG6-Lokalisation in der Übersicht als Merge-Bild mit der Durchlichtaufnahme (Reihe drei bzw. fünf) oder alleine als Detailaufnahme (Reihe vier bzw. sechs). Maßstabsbalken indizieren die Größen in μ m.

2.3 BAG6 beeinflusst die Zytoskelett-Dynamik

Ein Eingriff in das BAG6 ex24-Spleißverhältnis äußerte sich am deutlichsten in einer Veränderung der Zytoskelett-Architektur (Abbildung 11, Reihe 3 und 4). Um die dafür zugrundeliegenden, molekularen Ursachen zu beschreiben, wurde im Folgenden die Assoziation von Zytoskelett und zytosolischem BAG6 genauer betrachtet. Außerdem wurde eine potenzielle, nukleäre Funktion von BAG6 mit möglichen Auswirkungen auf die Zellmorphologie untersucht.

2.3.1 BAG6 beeinflusst die Aktin-Polymerisation

Wie in Abbildung 11 gezeigt wurde, beeinflusst BAG6 die Form des Aktin-Zytoskeletts. Solch eine phänotypische Veränderung (insbesondere des kortikalen Aktin-Zytoskeletts) kann zu einem Teil an einer veränderten Dynamik der Aktin-Polymerisation bzw. Depolymerisation liegen (Chalut und Paluch, 2016). Hätte ein BAG6 einen Einfluss auf diesen Prozess könnte dies den Verlust an Zytoskelett-Komplexität im BAG6 KO erklären.

Um dieser Frage nachzugehen wurde zunächst das Aktin-Zytoskelett von MDA-Zellen untersucht, da diese Zelllinie ein komplexes Aktin-Zytoskelett besitzt. Dabei zeigten Phalloidin-Färbung der wt-Zellen prominente, vom Zellkern radial ausgehende Stressfasern die bis zur äußeren Zellmembran verliefen (Abbildung 18 A). BAG6 KO-Zellen besaßen kaum Stressfasern, die darüber hinaus weniger mit der Zellmembran assoziiert waren.

Das für die Aktin-Zytoskelett-Färbung verwendete Phalloidin färbt eingebautes, filamentöses Aktin (F-Aktin) aber nicht das freie, globuläre Aktin (G-Aktin). Ein Missverhältnis von F- zu G-Aktin kann ein erster Hinweis auf eine veränderte Aktin-Polymerisations-Dynamik sein. Um dies zu testen, wurden F- und G-Aktin durch Zentrifugation getrennt (McRobbie und Newell, 1983) und mittels Westerblots miteinander verglichen (Abbildung 18 B). Dabei ergab sich ein höherer Polymerisationsgrad des Aktins im wt verglichen mit dem BAG6 KO.

Es ist bekannt, dass die Stabilität von kortikalem F-Aktin Auswirkungen auf daran bindende

Membranproteine wie die ERM-Proteine (Ezrin, Radixin und Moesin) haben kann (Fehon et al., 2010). Eine Immunfluoreszenzfärbung für ERM-Proteine in wt und BAG6 KO-Zellen ergab eine strukturierte Verteilung im wt, nicht im BAG6 KO (Abbildung 18 C). Der Verlust an kortikaler F-Aktin-Stabilität wirkte sich also auch auf damit assoziierte Proteine aus.

Falls der Einfluss von BAG6 auf die Aktinstabilität relativ direkt ist, müsste BAG6 im wt auch an den Orten zu finden sein an denen die Aktinstabilität reguliert werden muss. Um dem nachzugehen wurde BAG6 und F-Aktin in IMR90S-Zellen kofärbt (Abbildung 18 D, Reihe 1). Es zeigte sich eine deutliche Kollokalisierung an der Zellmembran, insbesondere dort wo das Aktin-Zytoskelett direkt an die Membran stieß. Dies war insbesondere der Fall für U937-Zellen, die als Monozyten-artige Zelllinie (Sundström und Nilsson, 1976) besonders ausgeprägte Lamellipodien und Filopodien ausbildeten (Abbildung 18 D, Reihe 2 und 3).

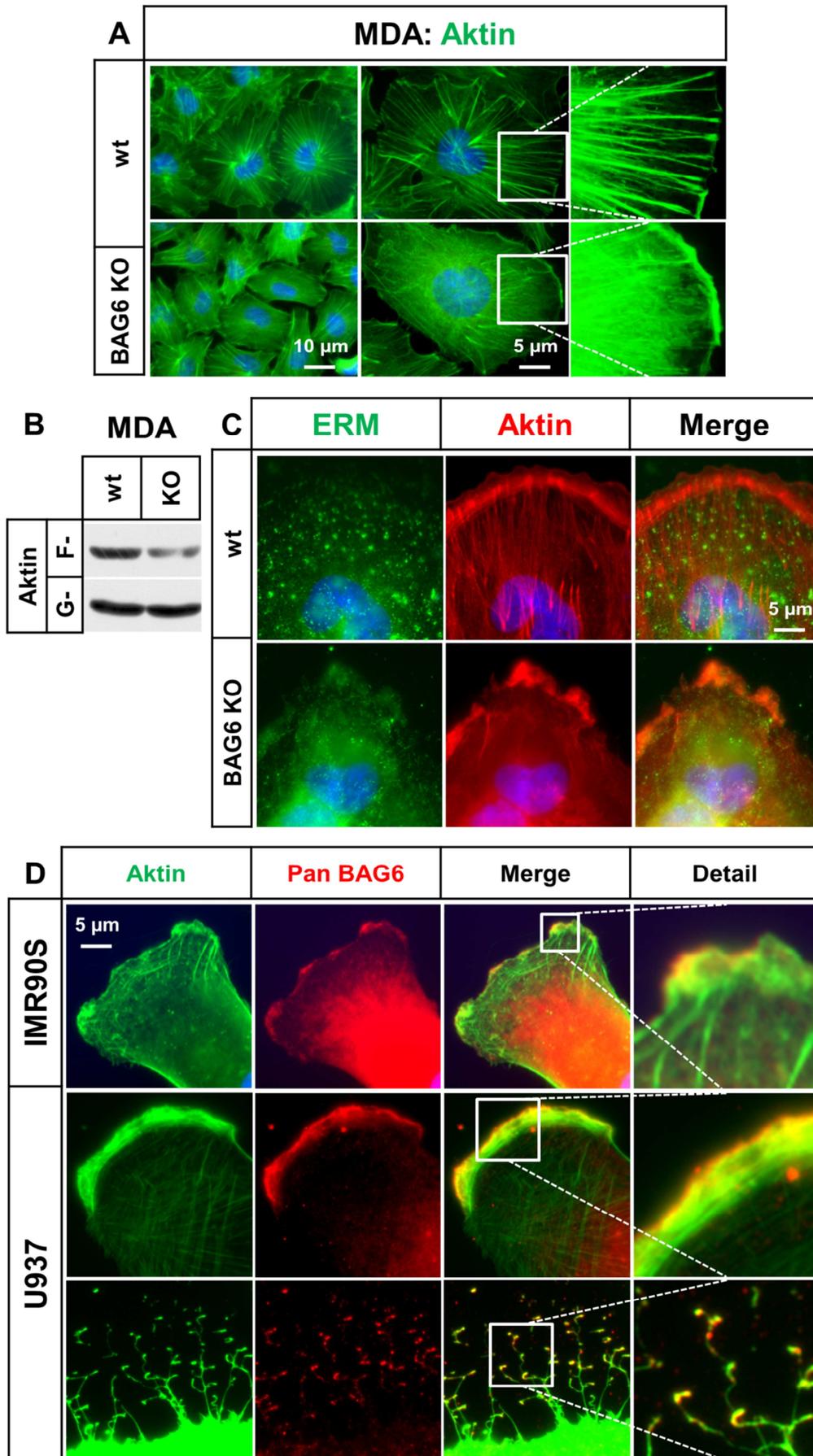


Abbildung 18: Ein BAG6 KO reduziert membranassoziiertes F-Aktin.

A) Fluoreszenzfärbungen von MDA wt und BAG6 KO-Zellen für das Aktin-Zytoskelett mittels Phalloidin zeigen eine Reduktion von membranassoziiertem F-Aktin und Aktin-Stressfasern. **B)** Filamentöses (F-) und globuläres (G-) Aktin von MDA wt-Zellen wurde durch Zentrifugation getrennt (McRobbie und Newell, 1983) und mittels Westerblots miteinander verglichen. **C)** Immunfluoreszenzfärbungen von IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen für ERM-Proteine (Ezrin, Radixin und Moesin) und Aktin-Zytoskelett mittels Phalloidin. **D)** Immunfluoreszenzfärbungen von IMR90S- (Reihe 1) und U937-Zellen (Reihe 2 und 3) für Aktin-Zytoskelett und BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) zeigen eine Kolokalisation innerhalb von Lamellipodien und Filopodien (siehe Detailaufnahmen). Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

Um eine veränderte Aktin-Polymerisations-Dynamik auch in Echtzeit verfolgen zu können, wurden IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen mit EGFP-gekoppeltem Aktin transfiziert. Merge-Bilder zweier Zeitpunkte mit 5 min Zeitdifferenz, zeigten keine Veränderung des Aktin-Zytosketts im wt, während im BAG6 KO innerhalb dieses Zeitraums deutlich Aktinstrukturen auf- und abgebaut wurden (Abbildung 19 A). Diese Strukturen bildeten sich in der gleichen Geschwindigkeit mit den "*Membran blebbs*" (siehe auch Abbildung 11 A, Reihe 6) und befanden sich größtenteils an der Zellmembran, also dort wo sonst eine stabile Verknüpfung von Aktin-Zytoskelett zur Zellmembran existieren sollte. Damit ergaben diese Versuche eine verringerte F-Aktinstabilität im BAG6 KO insbesondere an der Zellmembran.

Ein möglicher Mechanismus für den F-Aktin stabilisierenden Einfluss von BAG6 ist die Regulation seines Bindungspartners Hsp70. Für Hsp70 konnte gezeigt werden, dass es an F-Aktin bindet und seine Stabilität beeinflusst (Hishiya et al., 2010). Während im wt die Hsp70-Färbung eine filamentöse Organisation und eine Kolokalisation mit F-Aktin zeigte, war dies nicht der Fall im BAG6 KO (Abbildung 19 B, Hsp70-Detail). Damit ist Hsp70 ein möglicher Kandidat für eine BAG6-vermittelte F-Aktin-Stabilität.

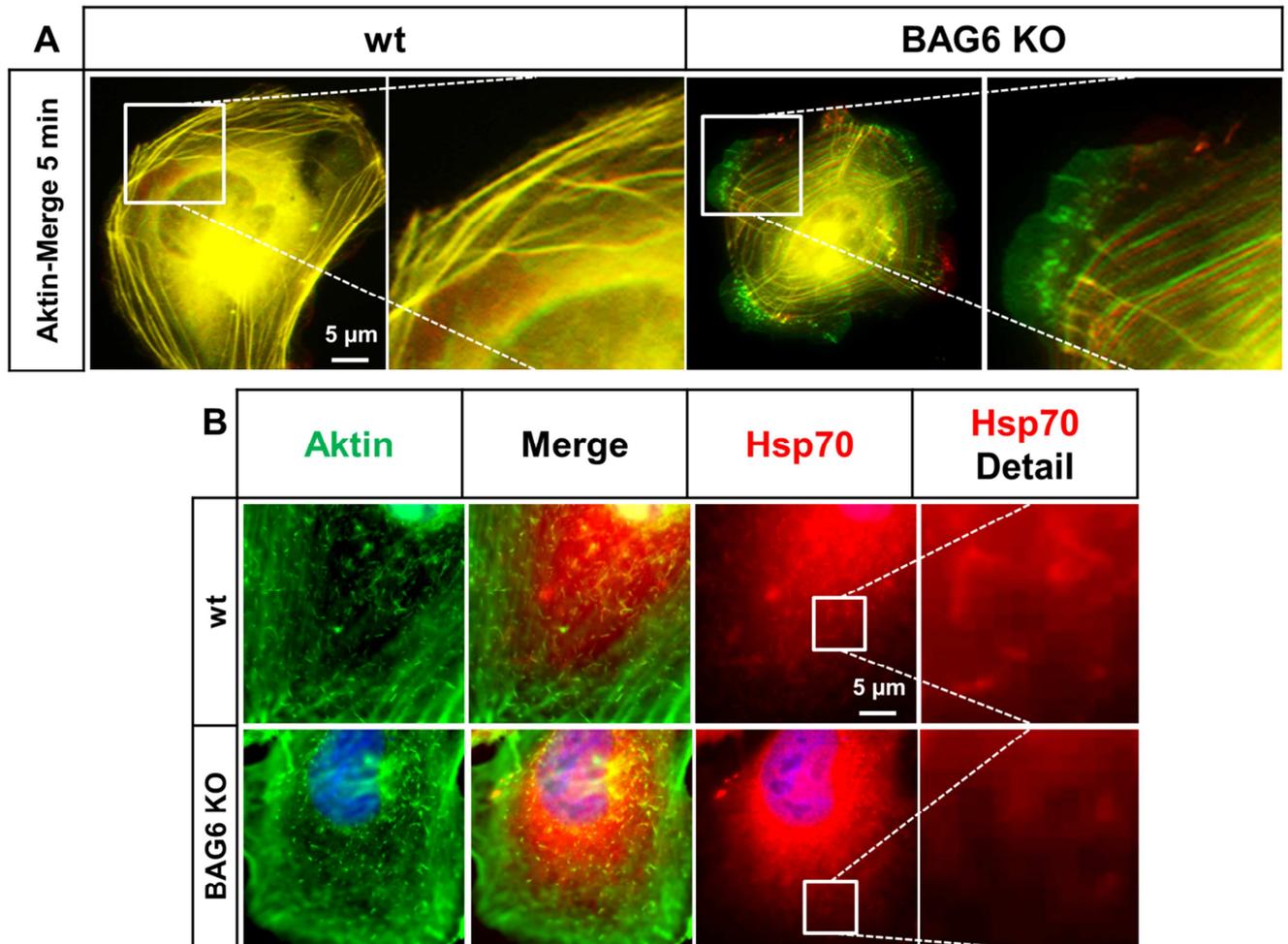


Abbildung 19: BAG6 beeinflusst die Aktin-Polymerisation und die Assoziation zwischen F-Aktin und Hsp70.

A) IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen wurden mit einem EGFP-Aktin-Konstrukt transfiziert. Dargestellt ist die dynamische Veränderung des Aktin-Zytoskeletts als Merge-Bild von zwei Fluoreszenzaufnahmen mit einer zeitlichen Differenz von 5 Minuten. Eine Zunahme von Aktin-Strukturen ist grün, eine -Abnahme rot kodiert. **B)** Immunfluoreszenzaufnahmen zur Kolo-kalisation von Hsp70 und Aktin in wt und BAG6 KO IMR90S-Zellen. In IMR90S-Zellen wurde das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin (Aktin) sowie Hsp70 immunfluoreszenzgefärbt. Gezeigt werden beide Färbungen einzeln und in Merge-Bildern mit Detail-Vergrößerungen. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

Zusammenfassend ergaben Versuche hinsichtlich der BAG6-abhängigen Aktin-Polymerisations-Dynamik, dass ein BAG6 KO die F-Aktin-Stabilität, insbesondere an der Zellmembran, herabsetzt. Ein möglicher Mechanismus könnte eine Interaktion von BAG6 mit Hsp70 an Stellen mit erhöhter Aktinstabilität sein.

2.3.2 Ein BAG6 KO reduziert die zelllichteabhängige Veränderung der H3K27-Methylierung

Die ausgeprägten, morphologischen Veränderungen durch einen BAG6 KO lassen sich nur teilweise mit der Auswirkung auf eine einzelne Zytoskelett-Komponente erklären. Vielmehr zeigte die Wiederherstellung des wt-Phänotyps durch die nukleäre +ex24-Variante, dass ein Teil der Veränderungen in einem BAG6-abhängigen Mechanismus im Zellkern zu suchen ist. Es ist bekannt, dass sich während einer EMT neben der Zellmorphologie auch die Histonmodifikationen verändern (Warns et al., 2015). Dementsprechend kann eine Veränderung des Histon-Kodes selbst erst zu einer globalen Veränderung des Expressionsmusters und schließlich zu einer EMT führen (Sun und Fang, 2016).

Um zu untersuchen ob BAG6 einen Einfluss auf die globale Histonmodifikation hat, wurden IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen in unterschiedlicher Zelldichte ausgesät und für eine H3K27me3 (Histon 3 Lysin 23 Trimethylierung) immunfluoreszenzgefärbt. Bei niedriger Zelldichte zeigte sich ein hoher Methylierungsgrad im wt, der mit steigender Zelldichte deutlich abnahm (Abbildung 20 A), parallel zur Abnahme der endogenen +ex24-Variante und der Veränderung des Zytoskeletts (Abbildung 9 A). Im Gegensatz dazu zeigte der BAG6 KO keine ausgeprägte, zelllichteabhängige Veränderung in der Histon-Methylierungsstärke.

Ist die H3K27me3 im wt abhängig von der Zelldichte, könnte auch ein Zusammenhang zwischen BAG6-Lokalisation und H3K27me3-Stärke bestehen. Tatsächlich besaßen Zellen mit einer zytosolischen BAG6-Lokalisation eine niedrige H3K27me3, Zellen unter geringer Dichte mit nukleärer BAG6-Lokalisation eine hohe H3K27me3 (Abbildung 20 B).

Für einen besseren Vergleich der H3K27me3-Dynamik wurde der äußere Rand einer Zellkolonie von wt und BAG6 KO miteinander verglichen (Abbildung 20 C). Dazu wurde die mittlere Stärke der H3K27me3-Immunfluoreszenz auf der Y-Achse gegen die zunehmende Zelldichte auf der X-Achse aufgetragen. Während der wt am Rand der Zellkolonie (also bei geringster Zelldichte) eine ungefähr 5-fach höher H3K27me3 im Vergleich zu weiter innen liegender Zellen zeigte, stagnierte die H3K27me im BAG6 KO auf relativ niedrigem Niveau.

Zusammenfassend ergaben H3K27me3-Immunfluoreszenzfärbungen, dass ein BAG6 KO zu einer geringeren morphologischen Plastizität bei einer gleichzeitig geringeren Variabilität der H3K27me3-Stärke führte. Im wt waren das Spleißen von BAG6 ex24 und die H3K27me3-Stärke im gleichen Ausmaß anhängig von der Zelldichte. Eine globale Veränderung der Histonmodifikationen durch BAG6 +ex24 stellt damit eine mögliche Ursache für die beobachteten, morphologischen Veränderungen während der BAG6-abhängigen EMT dar.

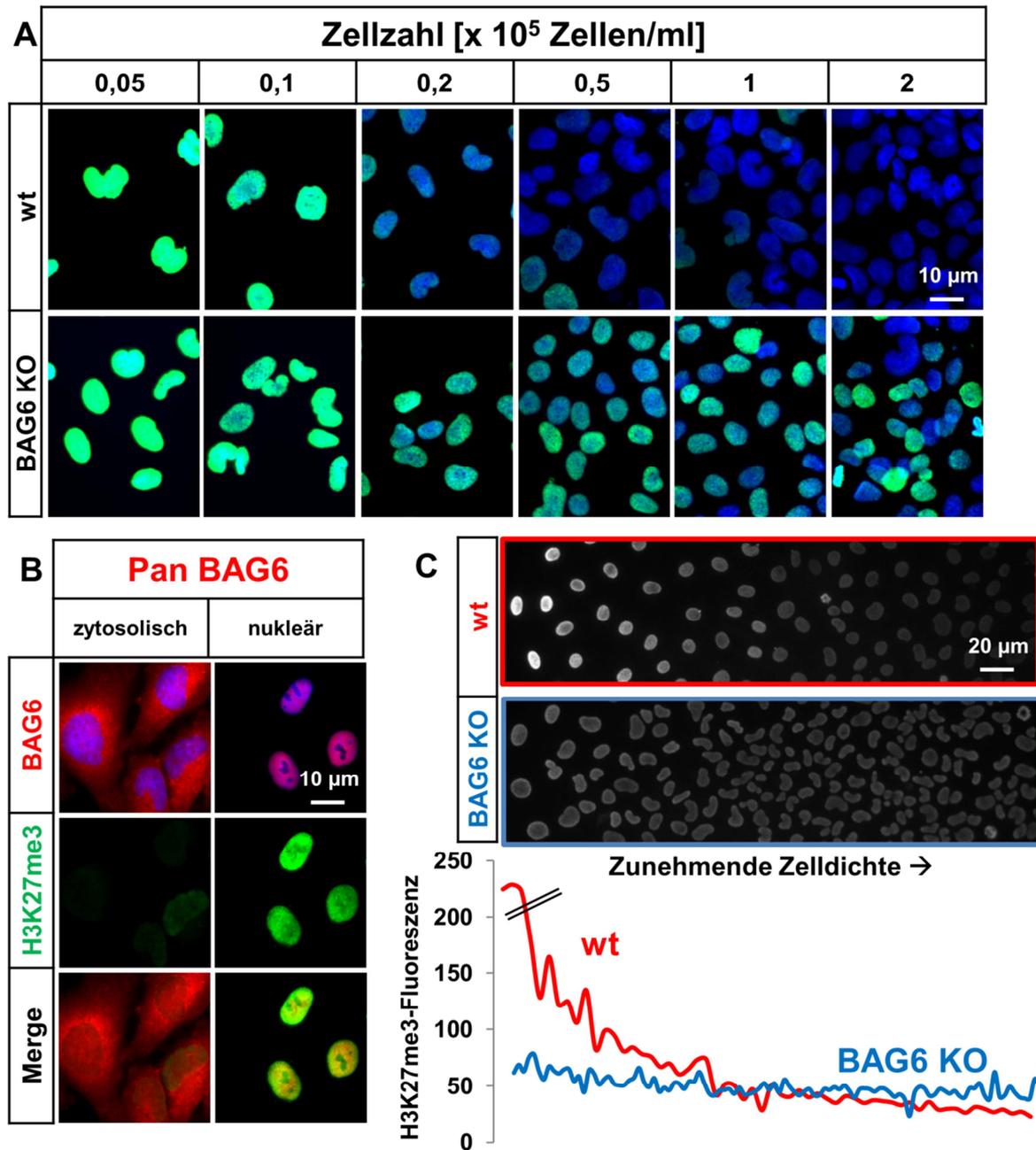


Abbildung 20: Ein BAG6 KO reduziert die zelldichteabhängige Regulation der H3K27-Methylierungs-Stärke.

A) IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen wurden für fünf Tage bei unterschiedlichen Zelldichten kultiviert (siehe Ausgangszellzahl in $\times 10^5$ Zellen/ml Medium). Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen die H3K27-Tri-Methylierung (H3K27me3) bei gleicher Belichtungszeit. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. **B)** Immunfluoreszenzaufnahmen zur Lokalisation der BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) und H3K27me3-Stärke. Gezeigt werden Bilder von IMR90S wt-Zellen mit zytosolischer und nukleärer BAG6-Lokalisation und ihrer H3K27me3-Stärke sowie entsprechende Merge-Bilder. **C)** Fluoreszenzaufnahmen zeigen den äußeren Rand einer wt (rot) bzw. BAG6 KO (blau) IMR90S-Zellkolonie (äußerer Rand mit niedriger Zelldichte links). Der passende Graph zeigt die mittlere H3K27me3-Fluoreszenzstärke auf der Y-Achse mit zunehmender Zelldichte in der Zellkolonie auf der X-Achse. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

2.3.3 Der Zusammenhang zwischen der Adhäsionsmolekül-Prozessierung und H3K27-Methylierung

BAG6 beeinflusste die Membrandynamik und die Funktion transmembranärer Proteine (Abbildung 11 A und B). Für andere Transmembranproteine wie den TGF β -Rezeptor konnte ein Einfluss von BAG6 auf dessen proteasomalen Abbau nachgewiesen werden (Kwak et al., 2008). Weiterhin kann bei dem Abbau von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. E-Cadherin, zytosolische Proteinfragmente entstehen, die nach Kernimport die Genexpression beeinflussen (Ferber et al., 2008). Dadurch werden Information über die zelluläre Umgebung (wie z.B. die Zelldichte) mittels der abgespaltenen Proteinfragmente in eine veränderte Genexpression, einschließlich der Histonmodifikation, übersetzt. Eine Veränderung im Abbau von Transmembran-Proteinen durch BAG6 wäre eine mögliche Ursache für die veränderte H3K27me3.

EpCAM (epitheliales Zelladhäsion-Molekül) stellt eines der am besten untersuchten Beispiele für ein Transmembran-Protein dar, dessen abgespaltener, zytosolischer Teil die Zelldifferenzierung beeinflusst (Huang et al., 2011). Um zu untersuchen, ob ein Kernimport des zytosolischen EpCAM-Fragments von BAG6 beeinflusst wird, wurden IMR90S wt-Zellen bei verschiedenen Zelldichten für EpCAM gefärbt (Abbildung 21 A). Eine nukleäre BAG6-Lokalisation bei geringer Zelldichte stimmte im wt mit einer nukleären Färbung für EpCAM überein. In Zellen mit ausschließlich zytosolischer BAG6-Lokalisation befand sich EpCAM hingegen nicht im Kern. Es traten vielmehr perinukleäre EpCAM-Akkumulationen auf, bei denen es sich um MTOC-assoziierte Protein-Akkumulationen für den proteasomalen Abbau handeln könnte. In BAG6 KO-Zellen befand sich im Gegensatz zum wt auch bei niedriger Zelldichte kein EpCAM im Kern oder an der Zellmembran.

Ein Grund für das Fehlen einer nukleären EpCAM-Färbung im BAG6 KO könnte eine zuvor fehlerhafte Membranintegration von EpCAM sein (Sivena und Pospelov, 2014). Ohne einen korrekten Einbau in die Zellmembran kann es später nicht zur Spaltung und Translokation von EpCAM in den Kern zusammen mit β -Catenin (einem wichtigen, transkriptionellem

Koaktivator) kommen. Ein bereits bekannter Hinweis für eine fehlerhafte Membranintegration von EpCAM ist das Fehlen von Actinin als Adaptorprotein zwischen EpCAM und dem Aktin-Zytoskelett an der Zellmembran (Balzar et al., 1998). In BAG6 KO-Zellen ließ sich weniger Actinin an der Zellmembran nachweisen als in wt-Zellen (Abbildung 21 B).

Um die mögliche Ursache für das Fehlen einer EpCAM-Färbung im Kern von BAG6 KO-Zellen weiter zu untersuchen, wurden IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen zunächst 12 h mit Leptomycin B behandelt (Abbildung 21 C, Spalte 2). Durch Inhibition des Kernexports durch Leptomycin B kann, selbst bei einer potenziell niedrigen Kernimport-Rate von EpCAM-Fragmenten, eine nukleäre Akkumulation des EpCAM-Fragments detektiert werden. Während sich in wt-Zellen BAG6 und EpCAM durch Inhibition des nukleären Exports im Kern ansammelten, zeigte sich in BAG6 KO-Zellen keine EpCAM-Kernfärbung. Dies deutete darauf hin, dass kein verstärkter Kernexport sondern ein fehlender Import von EpCAM ursächlich für die fehlende EpCAM-Kernfärbung im BAG6 KO war.

Des Weiteren wurden IMR90S-Zellen mit MG132 behandelt, um den Einfluss des proteasomalen Abbaus (an dem BAG6 u.a. beteiligt ist; Minami et al., 2010) auf die nukleäre Lokalisation des EpCAM-Fragments zu untersuchen. Durch die Behandlung nahm die EpCAM-Gesamtmenge in wt und BAG6 KO zu, nicht aber der nukleäre Anteil der EpCAM-Färbung (Abbildung 21 C, Spalte 3). Ein potentiell BAG6-abhängiger, proteasomaler Abbauprozess von EpCAM war also nicht ursächlich für eine positive EpCAM-Kernfärbung.

Um zu verifizieren ob die nukleäre EpCAM-Färbung im gleichen Maß wie die H3K27me3 zelldichteabhängig war, wurden IMR90S-Zellen bei hoher und niedriger Zelldichte kofärbt. Dabei zeigte sich, dass bei geringer Zelldichte (Bedingungen bei denen viel nukleäres BAG6 vorlag) die H3K27me3 stark war und viel wachstumsförderndes (Maetzel et al., 2009) EpCAM-Fragment im Kern lokalisierte (Abbildung 21 D).

Zusammenfassend ergaben die Versuche zur EpCAM-Lokalisation in IMR90S-Zellen, dass die nukleäre Lokalisation des EpCAM-Fragments im wt zelldichteabhängig und im BAG6 KO

nicht vorhanden war. Der BAG6-abhängige Effekt auf EpCAM war dabei unabhängig von einem proteasomalen Prozess und benötigt eine nukleäre BAG6-Lokalisation. Der Kernimport von Adhäsionsprotein-Fragmenten wie die von EpCAM und ihre Auswirkung auf die Transkription wären eine mögliche Verbindung zwischen veränderte Zell-Zell-Adhäsion und globaler globale H3K27me3-Stärke.

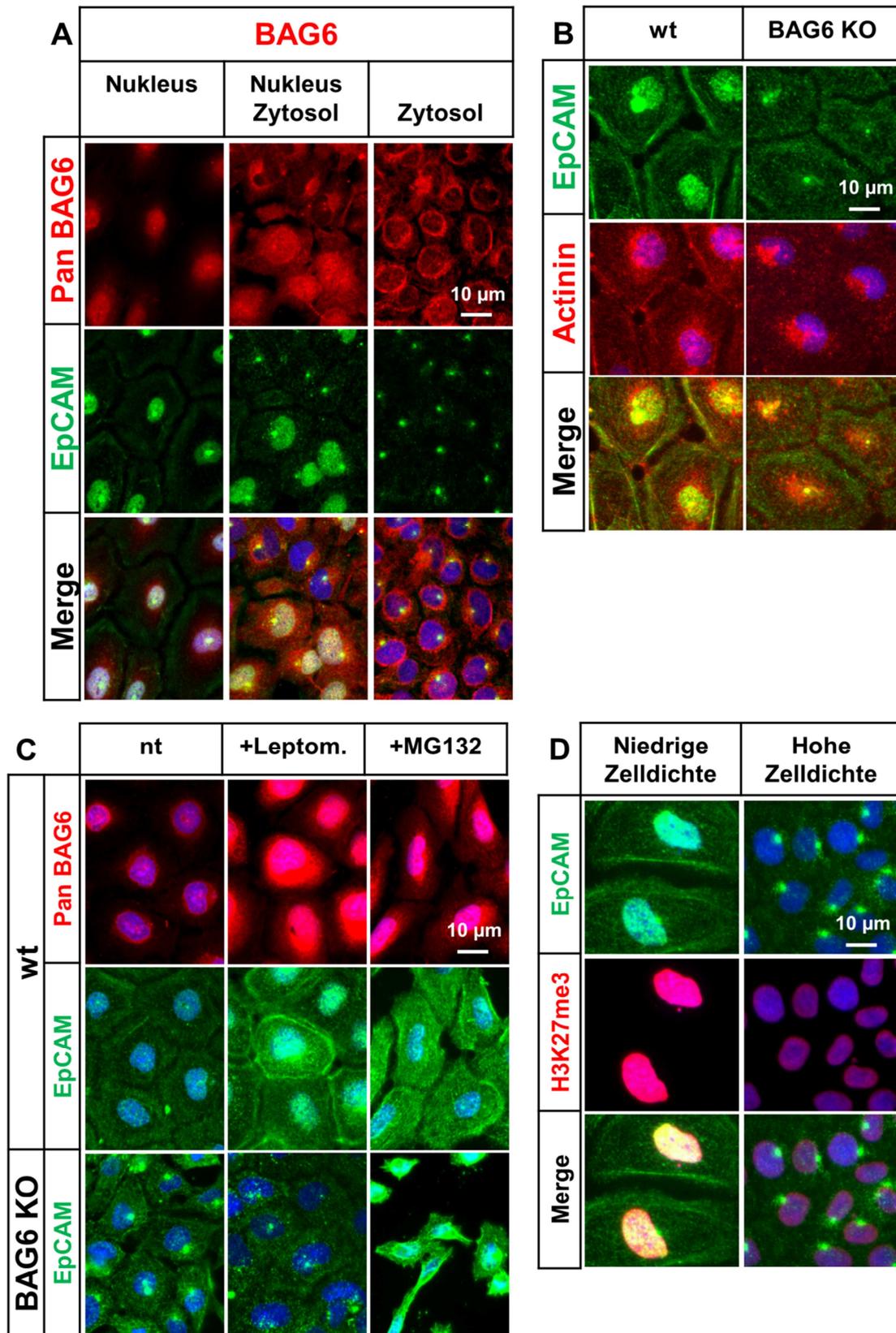


Abbildung 21: Eine Translokalisierung von BAG6 ist nötig für einen Kernimport des zytosolischen EpCAM-Fragments.

A) Immunfluoreszenzfärbung für die BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) und EpCAM in IMR90S-Zellen. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. Gezeigt werden Zellen mit BAG6-Lokalisation ausschließlich im Nukleus, im Nukleus und Zytosol und ausschließlich im Zytosol. **B)** Immunfluoreszenzaufnahmen von IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen für EpCAM und das

EpCAM-assoziierte Actinin. **C)** Immunfluoreszenzaufnahmen von IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen nach Behandlung mit Leptomycin B (+Leptom.) bzw. MG132 für 6 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen (nt). **D)** Immunfluoreszenzaufnahmen von IM90S-Zellen bei hoher und niedriger Zelldichte. Gezeigt werden Immunfluoreszenzfärbung für EpCAM und H3K27me3. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

Die Translokation von EpCAM in den Kern findet in einem Komplex mit β -Catenin statt (Sivena und Pospelov, 2014). β -Catenin selbst ist einer der wichtigsten EMT-Biomarker (Chaw et al., 2012), wobei als transkriptioneller Koaktivator insbesondere seine nukleäre Lokalisation von Interesse ist (Kim et al., 2013). Um den Einfluss von BAG6 auf die Lokalisation von β -Catenin zu untersuchen, wurden IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen für β -Catenin gefärbt (Abbildung 22). In wt-Zellen zeigte sich eine Akkumulation von β -Catenin an Zell-Zell-Kontakten und eine schwache nukleäre Färbung. Nach Inhibition des nukleären Exports durch Leptomycin B ergab sich eine verstärkte Kernfärbung. In BAG6 KO-Zellen mit schwach ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten, war die dortige β -Catenin-Akkumulation reduziert. Auch ließ sich nach Leptomycin B-Behandlung keine β -Catenin im Kern nachweisen. Damit fehlte BAG6 KO-Zellen ein wichtiger Mechanismus zur Ausbildung morphologischer Plastizität.

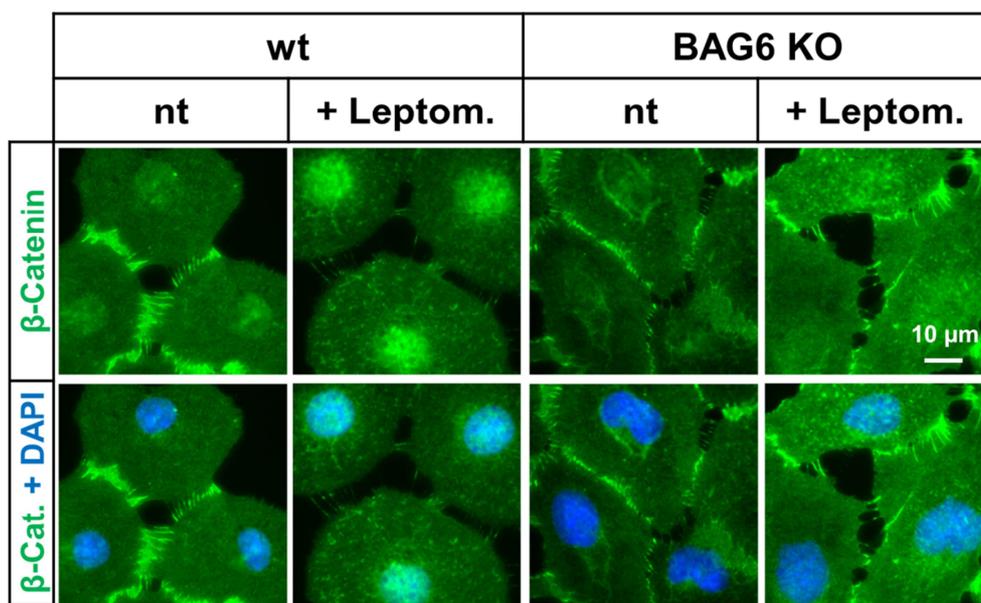


Abbildung 22: Ein BAG6 KO reduziert die β -Catenin-Translokation in den Kern.

Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin von IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen nach Leptomycin B (+Leptom.) -Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (nt). Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. Der Maßstabsbalken indiziert die Größe in μm .

2.3.4 BAG6 Δ ex24 erhöht die Bildung von zytoplasmatische Brücken und den Proteinaustausch zwischen Zellen mit unterschiedlichen BAG6-Spleißvarianten

BAG6 beeinflusste das Zytoskelett mit deutlichen Konsequenzen auf Einzelzell-Ebene. Darüber hinaus könnte sich ein BAG6-abhängiger Effekt auf das Zytoskelett auch auf Zell-Zell-Interaktionen auswirken. Tumorzellen interagieren miteinander, insbesondere unter zellulärem Stress, hervorgerufen durch wechselnde, zelluläre Umgebung während Metastasierung (durch eine EMT) und Metastasenwachstum (durch eine MET). Ein relativ neuentdeckter Mechanismus zum Stoffaustausch unter solchen Stressbedingungen ist die Ausbildung von Zytoplasmabrücken zwischen Tumorzellen (Sahoo et al., 2017). Diese Zytoskelett-abhängigen Zell-Zell-Verbindungen, sorgen für einen effizienten Stoffaustausch zumeist unter heterogenen Zellen. Dabei fungiert eine Zelle als Spender und die andere (meist eine geschädigte bzw. gestresste Zelle) als Empfänger. Die Ausbildung von Zytoplasmabrücken kann dadurch zum Wachstum von metastasierten Tumorzellen in einem anderen Gewebe beitragen.

Während langer Kultivierung ohne zwischenzeitliche Trypsinisierung von MCF BAG6 KO +BAG6 Δ ex24-Zellen konnten besonders viele Zytoplasmabrücken mittels Durchlichtmikroskopie beobachtet werden (Abbildung 23 A). Eine Konsequenz der vermehrten Zellbrücken-Bildung war die Entstehung ungewöhnlich großer, teilweise multinukleärer Zellen mit einem hohen Anteil zytosolischem BAG6. Die mit ihnen verbundenen Zellen waren von normaler Größe und besaßen meist eine andere Δ ex24-Lokalisation und -Fluoreszenzstärke. Diese Beobachtung ließ sich nur bei Δ ex24-Zelllinien machen, welche mesenchymaler und damit potenziell metastasierungsfähiger sind als Zelllinien mit einem anderen BAG6-Status.

Um festzustellen ob die Zytoplasmabrücken ein Überbleibsel unvollständiger Zytokinese sind, oder sie sich aktiv bilden, wurden zunächst mikroskopische Detailaufnahmen untersucht. Dabei zeigte sich, dass neubildenden Zytoplasmabrücken sich aus dünne

Zellfortsätze formten, an deren Ende eine Zelle einseitig Δ ex24-positive BAG6-Granula anreicherte (Abbildung 23 B, 1). Oft reichte die sich bildende Brücke von der Peripherie einer Zelle in die Nähe des Zellkerns der benachbarten Zelle (Abbildung 23 B, 2). Beobachtungen verschiedener Zeitpunkte zeigten, dass sich die Zytoplasmabrücken vergrößern konnten (Abbildung 23 C).

Insbesondere für die Tumorforschung von Interesse ist, ob diese Zytoplasmabrücken auch tatsächlich zum Stoffaustausch zwischen Zellen genutzt werden können. Zum Nachweis ob es tatsächlich zu einem Proteinaustausch kam, wurden IMR90S BAG6 KO +BAG6 Δ ex24 mit mCherry-markiert und MCF BAG6 KO +BAG6 +ex24 mit EGFP-markiert kokultiviert (Abbildung 23 D). Dies resultierte in einer unidirektionalen Übertragung von BAG6 +ex24 in Δ ex24-Zellen, also von den epithelialeren in die mesenchymaleren Zellen. Die Richtung des Austauschs war dabei unabhängig von den getesteten Zelllinien und fand nur bei Beteiligung von Δ ex24-Zellen statt (Abbildung 23 E). Waren beide Zellen +ex24-positiv, fand kein Austausch statt. Ein möglicher Grund für diesen asymmetrischen Proteinaustausch dürfte in dem stabileren Zytoskelett der +ex24 Zellen liegen, deren geringere Membrandynamik zu einem höheren Zellinnendruck führen könnte. Dadurch würde sich ein Druckgefälle zur Empfängerzelle ausbilden.

Zusammenfassend ergaben Kokultivierungs-Versuche mit unterschiedlichen Zelllinien, dass Zellen mit einem hohen zytosolischen BAG6 Δ ex24-Level zur erhöhten Bildung von Zytoplasmabrücken neigten. Dabei fungierten sie als Empfänger von Proteinen aus Zellen mit höherer BAG6-Kernlokalisation. Die Ausbildung von Zytoplasmabrücken wäre ein möglicher Mechanismus über den Δ ex24-Zellen mit hohem Metastasierungspotenzial am Ort der Metastasenbildung Proteine aus anderen Zellen aufnehmen können. So könnte die Übertragung von +ex24 BAG6 ein epitheliales Wachstum der zuvor metastasierten Zellen induzieren, was eine Zunahme der Metastasenmasse ermöglichen würde.

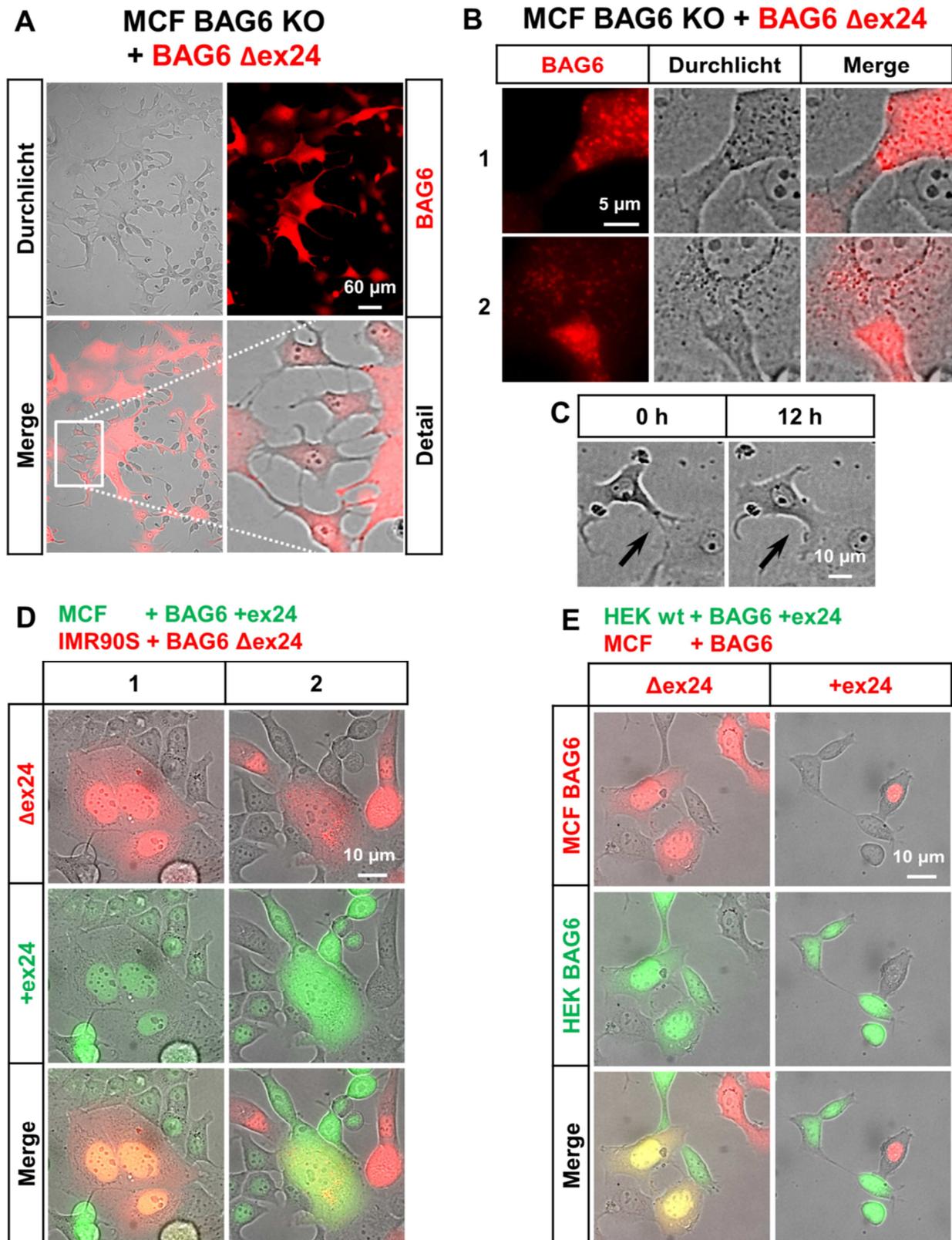


Abbildung 23: Expression von BAG6 Δ ex24 in Zellen auf BAG6 KO-Basis führt zur vermehrter Bildung von Zytoplasmabrücken.

A) Durchlicht bzw. Fluoreszenzaufnahmen von unfixierten, stabilen MCF BAG6 KO-Zellen mit mCherry-BAG6 Δ ex24. **B)** Detailaufnahmen von Zell-Zell-Kontakten zwischen stabilen MCF BAG6 KO-Zellen mit mCherry-BAG6 Δ ex24. **C)** Mikroskopische Durchlichtaufnahmen von MCF Δ ex24-Zellen mit 12 h Zeitdifferenz. Der Pfeil markiert die Ausbildung einer Zytoplasmabrücke. **D)** MCF-Zellen mit BAG6 +ex24-EGFP und IMR90S-Zellen mit mCherry-BAG6 Δ ex24 wurden für fünf Tage kokultiviert.

2.3 BAG6 beeinflusst die Zytoskelett-Dynamik

Die Fluoreszenzaufnahmen von unfixierten Zellen zeigen die Lokalisation beider BAG6-Spleißvarianten. Eine BAG6-Übertragung von einer zur anderen Zelllinie zeigt sich im Merge-Bild beider Beispiele (1 und 2). **E**) HEK-Zellen mit BAG6 +ex24-EGFP und MCF-Zellen mit mCherry-BAG6 Δ ex24 bzw. +ex24 wurden für fünf Tage kokultiviert. Die Fluoreszenzaufnahmen von unfixierten Zellen zeigen die Lokalisation beider BAG6-Spleißvarianten. Eine BAG6-Übertragung zeigt sich im Merge-Bild als Gelbfärbung. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

2.4 Der Einfluss von BAG6 auf Migration und Zellzyklus

Neben einer direkten Auswirkung von BAG6 auf die Zytoskelett-Architektur, stellt sich die Frage, ob durch einen BAG6 KO auch Zytoskelett-abhängige Prozesse innerhalb der Zellen beeinträchtigt werden. Im Folgenden sollen solche Prozesse (wie Migration und Zellzyklus) genauer untersucht werden. Mögliche Auswirkungen von BAG6-Spleißvarianten könnte erklären, wieso BAG6 in vielen medizinischen Studien mit der Tumorentwicklung assoziiert wird (Calderon-Gonzalez et al., 2015; Wang et al., 2008; Etokebe et al., 2015 b).

2.4.1 Die Zellmigration ist abhängig von der BAG6-Expression

Von entscheidender Wichtigkeit für die Metastasierung einer Zelle ist das Invasionspotenzial. Dies ist die Fähigkeit sich erstens aus einem Zellverband zu lösen und zweitens sich durch einen gezielten Umbau des Zytoskeletts in die passende Richtung zu migrieren. Da BAG6 die Lokalisation von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen veränderte und wichtig für die Ausbildung eines stabilen Zytoskeletts war, konnten sich BAG6 KO bzw. Δ ex24-Zellen gut aus dem Zellverband lösen (Abbildung 11 A und Abbildung 14 B). Damit ist die erste Voraussetzung für eine gerichtete Zellmigration erfüllt. Um den BAG6-Einfluss auf die Migration von Zellen mit unterschiedlichem, natürlichem Migrationspotential zu untersuchen, wurden im Folgenden verschiedene Zelllinien verwendet.

Zunächst wurde die Migrationsgeschwindigkeit von stabilen +ex24 und Δ ex24 HEK Zellen auf wt-Basis im "*Scratch assay*" (Wundheil-Assay) verglichen (Abbildung 24 A). Bei diesem Test ergibt sich die Migrationsfähigkeit aus der Geschwindigkeit, in der Zellen in eine vorher beigefügte, definierte Schramme migrieren. Dabei zeigten nach 24 h die +ex24-Zellen eine erhöhte, die Δ ex24-Zellen eine verringerte Migration im Vergleich zu wt-Zellen. Somit beeinflusste bereits die BAG6-Transfektion auf wt-Basis die Zellmigration messbar.

Um im gleichen Assay die Auswirkungen eines BAG6 KO zu untersuchen, wurde MCF- und MDA wt und BAG6 KO-Zellen miteinander verglichen (Abbildung 24 B). Während weder

MCF wt noch BAG6 KO-Zellen eine deutliche Migration nach 24 h zeigten, migrierten MDA wt und BAG6 KO-Zellen beide relativ schnell, der BAG6 KO etwas langsamer.

Um den Einfluss der einzelnen ex24-Spleißvarianten auf die Zellmigration zu untersuchen wurden IMR90S-Zelllinien verwendet, da sie im Koloniewachstum eine gleichmäßige Ausbreitung zeigten (Abbildung 11 A, Reihe 1). Im "Scratch assay" zeigten IMR90S wt und +ex24-Zellen eine schnellere Migration nach 24 h als BAG6 KO- und Δ ex24-Zellen (Abbildung 24 C). Nach 48 h war die Schramme bei wt und +ex24-Zellen zugewachsen, nicht aber bei BAG6 KO- und Δ ex24-Zellen. Dabei besaßen die eingewanderten Zellen morphologische Unterschiede (Abbildung 24 C, Reihe 4). Während wt und +ex24-Zellen eine epitheliale Zellform mit Lamellipodien besaßen, waren BAG6 KO und Δ ex24-Zellen mesenchymal spindelförmig und besaßen ausgeprägte Filopodien. Im Gegensatz zu IMR90S-Zellen migrierte bei MCF-Zellen allein die Δ ex24-Zelllinie schneller (Abbildung 24 C, Reihe 5).

Zusammenfassend ergaben "Scratch-assay"-Experimente, dass BAG6 die Zellmigration beeinflussen kann. Dabei ließ sich das Migrationsverhalten von HEK-Zellen bereits durch die Expression einzelner ex24-Spleißvarianten auf wt-Basis verändern, wobei die Oligomerisierung zwischen trans- und endogenem BAG6 (Abbildung 14 C und Abbildung 6 E) den Effekt beeinflussen könnte. In Zellen mit niedrigem (MCF-Zellen) bzw. hohem Migrationspotenzial (MDA-Zellen) reduzierte sich die Migrationsgeschwindigkeit durch einen BAG6 KO. In MCF-Zellen zeigte die Δ ex24-Zelllinie eine verstärkte Migration, was sich durch eine verringerte Zell-Zell-Adhäsion erklären lässt (Abbildung 14 B). Im Gegensatz dazu verringerte sich in IMR90S-Zellen die Migrationsfähigkeit von BAG6 KO und Δ ex24 im Vergleich zu wt und +ex24-Zellen. Dieser Unterschied lässt sich nur erklären, wenn sich ein BAG6 KO nicht allein durch Schwächung der Zell-Zell-Kontakte auf das Migrationsverhalten auswirkt. Ein weiterer, hier zu testender Faktor für eine gerichtete Migration ist die korrekte Ausrichtung des Zellkerns zur Migrationsrichtung (Nabi, 1999).

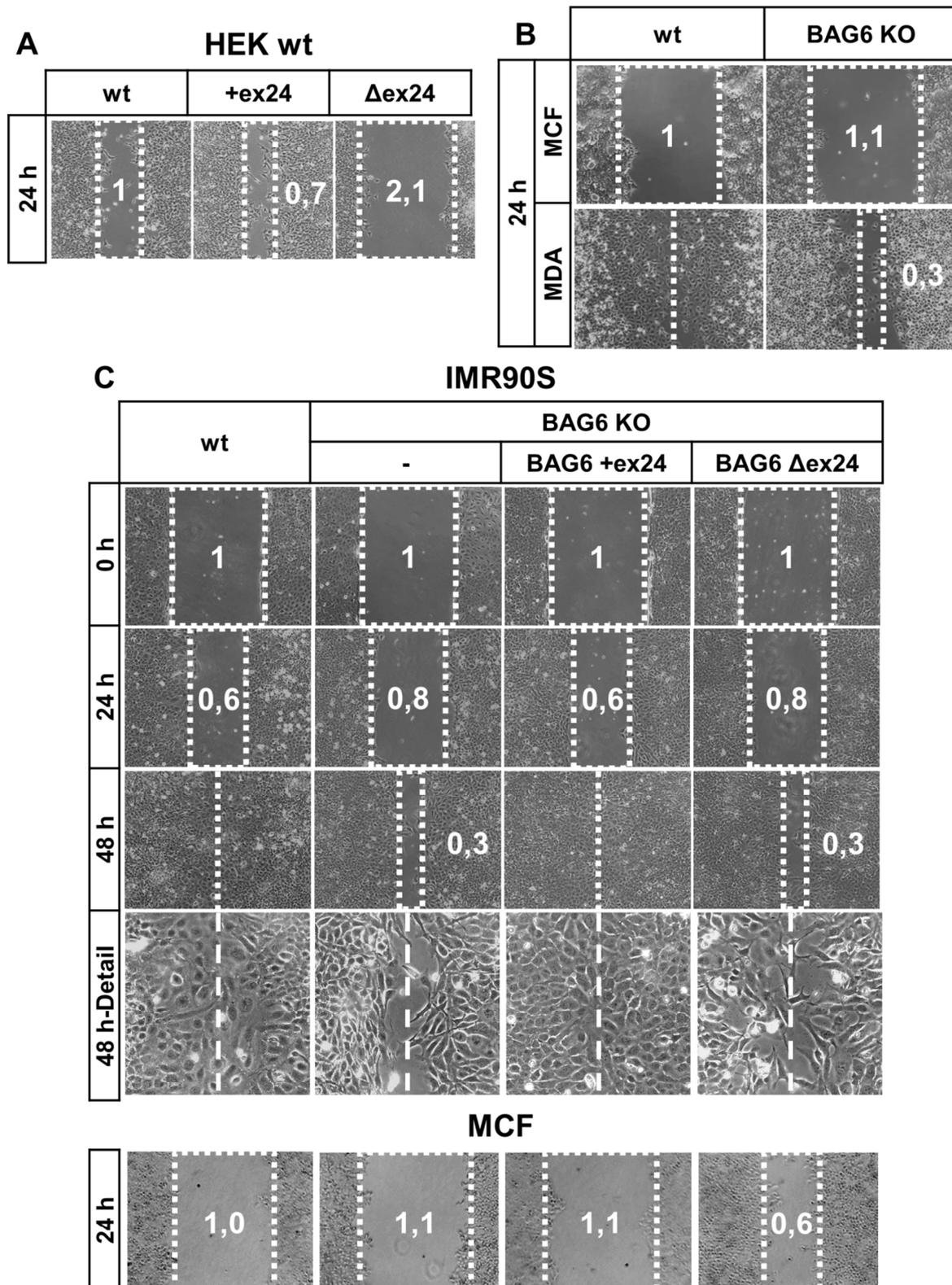


Abbildung 24: Die Zellmigration im "Scratch assay" ist abhängig von der BAG6-Expression.

A) Die Zellmigration von HEK wt-Zellen bzw. mit BAG6 +ex24 oder Δ ex24 wurde im "Scratch assay" untersucht. Durchlichtaufnahmen zeigen das Ausmaß der gerichtet migrierenden Zellen nach 24 h. Das gestrichelte Rechteck markiert die noch zellfreie Fläche. Die Zahl gibt die Breite der nicht geschlossenen Schramme relativ zum wt an. **B)** Wie in A) wurde die Zellmigration von MCF bzw. MDA wt und BAG6 KO-Zellen untersucht. **C)** Wie in A) wurde die Zellmigration von IMR90S wt, BAG6 KO und +ex24 bzw. Δ ex24-Zellen auf BAG6 KO-Basis zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die

Detailaufnahmen zeigen die unterschiedliche Zellmorphologie der migrierenden Zellen. Die unterste Reihe zeigt den 24 h-Zeitpunkt für die Migration verschiedener MCF-Zelllinien (entsprechenden den IMR90S-Zellen). Alle Ergebnisse n=3.

2.4.2 Ein BAG6 KO in IMR90S-Zellen verhindert die korrekte Ausrichtung des Zellkerns in Migrationsrichtung

Ein BAG6 KO in IMR90S-Zellen reduzierte die gezielte Zellmigration im "*Scratch assay*" (Abbildung 24 C), obwohl die reduzierte Zell-Zell-Adhäsion durch ein BAG6 KO eigentlich zu einer verstärkten Migration führen müsste. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte im schwach ausgeprägten Zytoskelett des BAG6 KO liegen (Abbildung 11 A und Abbildung 13 A). Für die Aufrechterhaltung einer gezielten Migrationsrichtung ist eine Zytoskelett-abhängige Ausrichtung des Zellkerns essentiell. Es konnte gezeigt werden, dass dafür das Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) in Migrationsrichtung vor den Zellkern gebracht werden muss (Nabi, 1999).

Um zu testen, ob eine MTOC-Fehlausrichtung zu einer verringerten Migrationsfähigkeit von BAG6 KO-Zellen führte, wurden Immunfluoreszenzfärbung von IMR90S-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im "*Scratch assay*" gemacht. Zur Darstellung des MTOC wurde γ -Tubulin gefärbt und die Lokalisation relativ zum DAPI-gefärbten Zellkern bestimmt (Abbildung 25 A). Eine korrekte Ausrichtung zum "*Scratch*" (gestrichelte Linie) wurde mit einem grünen, eine neutrale mit einem gelben und eine falsche Ausrichtung mit einem roten Pfeil markiert. Eine Auswertung der MTOC-Orientierung nach 24 h ergab eine bessere Ausrichtung der wt-Zellen zum "*Scratch*" im Vergleich zu BAG6 KO-Zellen. Dieser Unterschied egalisierte sich nach 48 h, als der "*Scratch*" im wt bereits geschlossen war. Die Abbildung 25 B veranschaulicht, wie sich die Zytoskelett-Veränderungen durch einen BAG6 KO auf die Migrationsrichtung auswirken könnten: Für eine korrekte Zellkern-Ausrichtung muss das MTOC vor den Zellkern gebracht werden. Dies war in BAG6 KO-Zellen mit einem schwach ausgeprägten Zytoskelett nicht gegeben.

Um festzustellen, ob die Ursache für eine fehlerhafte Zellkern-Ausrichtung im BAG6 KO eine

verringerte Verknüpfung zwischen Kern und Zytoskelett war, wurden kernassoziierte Zytoskelett-Fasern in wt und BAG6 KO-Zellen immunfluoreszenzgefärbt. Dabei zeigte sich eine Reduktion an F-Aktin um bzw. über dem Kern in BAG6 KO-Zellen (Abbildung 25 C, Spalte 2 und 3). Ein weiteres Zytoskelett-Protein, das mit einer epithelialen Migration verknüpft ist, sind Septine (Short, 2014). In der Immunfluoreszenzfärbung für Septin ließen sich ausgeprägte, transnukleäre Fasern in wt-Zellen erkennen (Abbildung 25 C, Spalte 4 und 5). In BAG6 KO-Zellen waren diese deutlich weniger ausgeprägt. Es bestand keine Verknüpfung zwischen Zytoskelett und Kernmembran.

Damit ließ sich die verringerte gezielte Migration von BAG6 KO-Zellen mit einer verringerten Verknüpfung zwischen Zellkern und Zytoskelett erklären. Daraus ergab sich die Unfähigkeit der BAG6 KO-Zellen ihren Zellkern effizient in Migrationsrichtung auszurichten (Abbildung 25 B).

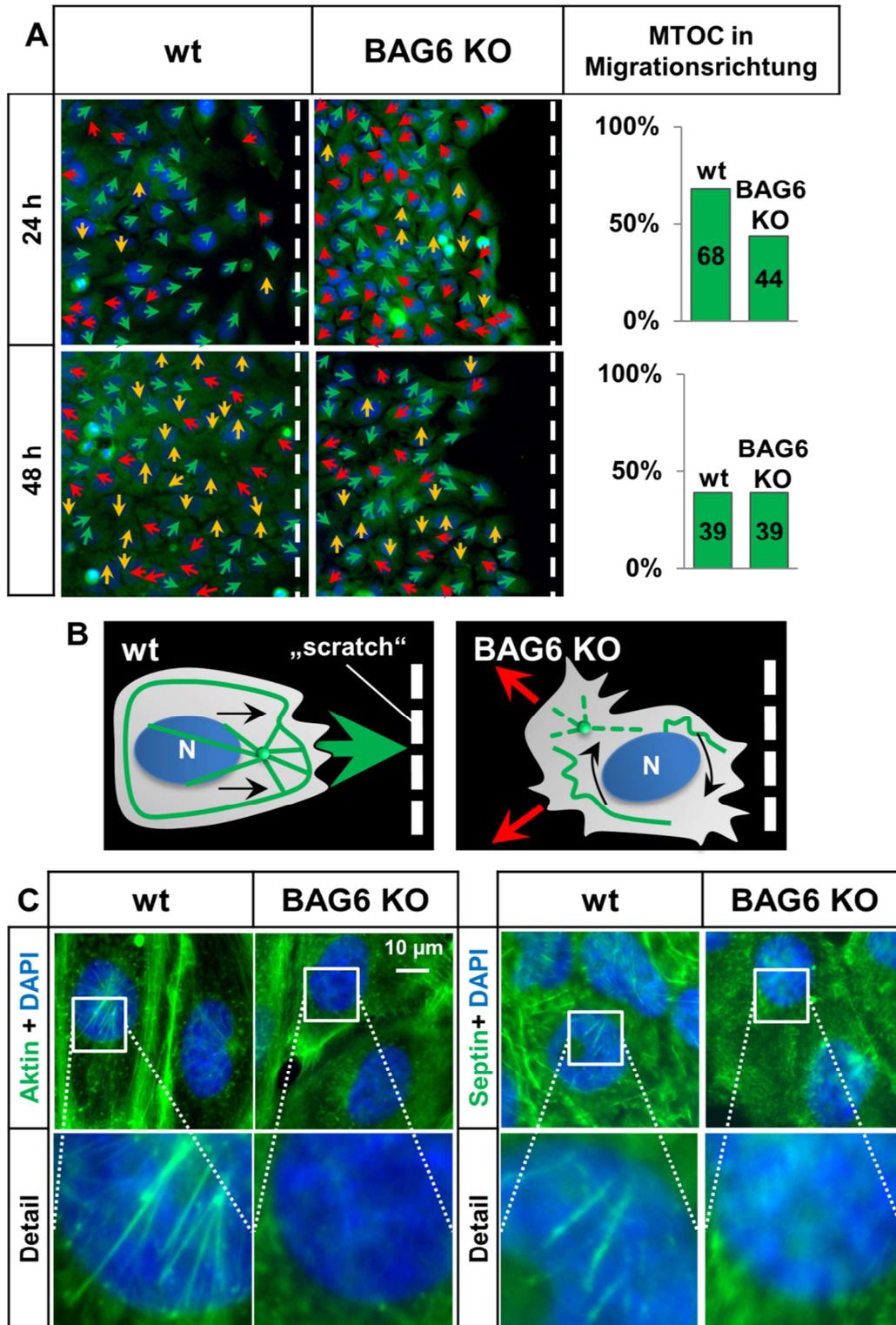


Abbildung 25: Ein BAG6 KO in IMR90S-Zellen verhindert die korrekte Ausrichtung des Zellkerns in Migrationsrichtung.

A) Die Migrationsrichtung von IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen wurde im "Scratch assay" untersucht. Spalte eins und zwei zeigt Immunfluoreszenzfärbungen für Tubulin. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. Die farb-kodierten Pfeile geben die Migrationsrichtung in Richtung "Scratch" (weißgestrichelte Linie) wieder. Es wurde unterschieden in: eine korrekte Ausrichtung des MTOC relativ zum Zellkern (grüner Pfeil), eine neutrale Ausrichtung (gelber Pfeil) und eine inkorrekte Ausrichtung (roter Pfeil). Die dazugehörigen Diagramme geben den relativen Anteil an Zellen mit korrekt in Migrationsrichtung ausgerichteten Zentrosomen wieder nach 24 bzw. 48 h (n >300). **B)** Die Graphik veranschaulicht den Zusammenhang zwischen gerichteter Migration und der Ausrichtung des

Zellkerns durch das Zytoskelett in wt und BAG6 KO-Zellen. **C)** Immunfluoreszenzfärbung für das Aktin-Zytoskelett mittels Phalloidin bzw. für Septin in IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. Die Detailaufnahmen zeigen die Ausprägung tran- und perinukleärer Zytoskelett-Strukturen. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

2.4.3 Ein BAG6 KO verringert die Abbau-Geschwindigkeit von primären Zilien

BAG6 beeinflusste die Architektur des Mikrotubuli-Skeletts (Abbildung 13 A). Für das Zytoskelett-Protein Aktin ergab sich darüber hinaus eine Veränderung in der Aktin-Polymerisations-Dynamik (Abbildung 19 A). Im Fall von Tubulin ist die Polymerisation insbesondere während der Bildung von primären Zilien entscheidend. Die Funktion von primären Zilien ist die Weiterleitung von extrazellulären Signalen und die Zellwachstums-Kontrolle (Basten und Giles, 2013). Je eine primäre Zilie bildet sich bei seneszenten Zellen neben dem Kern aus Tubulin mit den Zentriolen als Basalkörper (Basten und Giles, 2013). Über den Basalkörper wird der Auf- und Abbau der Zilien gesteuert sowie die extrazellulären Signale weitergeleitet. Tumorzellen mit primären Zilien zeigen ein höheres Metastasierungspotenzial (Emoto et al., 2014).

Um zu testen, ob BAG6 am Ort der primären Zilienbildung akkumuliert, wurden Immunfluoreszenzfärbung für γ -Tubulin als Basalkörper-Marker und Pan BAG6 durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Assoziation von BAG6 mit γ -Tubulin in IMR90S-Zellen (Abbildung 26 A). Somit lag BAG6 am Ort der primären Zilienbildung gehäuft vor.

Als nächstes wurde ein möglicher Einfluss von BAG6 auf die Zilienbildung untersucht. Dazu wurden wt und BAG6 KO-Zellen für die Zilienmarker-Proteine Arl13b (ADP-ribosylation factor-like protein 13b) und acetyliertes Tubulin immunfluoreszenzgefärbt. Die Arl13b-Färbung wies primäre Zilien in wt und BAG6 KO-Zellen als eine röhrenförmige Struktur in der Nähe des Zellkerns nach (Abbildung 26 B). Im wt waren diese Zilien außerdem deutlich positiv für acetyliertes Tubulin, weniger im BAG6 KO (Abbildung 25Abbildung 26 B, Detail). Es ist bekannt, dass sich durch die Acetylierung von Tubulin Bindeeigenschaft zu anderen Proteinen verändert, was wiederum die Tubulin-Stabilität (und damit die Stabilität der primären Zilien) beeinflusst (Howes et al., 2013).

Um die Auswirkung eines BAG6 KO auf die Zilienbildung genauer zu untersuchen, wurden IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen zunächst für 72 h in Serum-freiem Medium kultiviert, womit die Ausbildung von primären Zilien stimuliert wird. Die Zilien-Rückbildung wurde durch erneute Zugabe von Serum stimuliert und Immunfluoreszenzfärbungen zu verschiedenen Zeitpunkten gemacht. Um zu testen, ob die reduzierte Tubulin-Acetylierung in BAG6 KO-Zellen einen Einfluss auf die primäre Zilien-Stabilität hatte, wurde die Zilienrückbildung nach Wiederezugabe von Serum zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Arl18b-Färbung untersucht (Abbildung 26 C). Dabei zeigte sich nach 6 bzw. 24 h erneuter Serumzugabe nur eine geringe Zilienrückbildung im wt und BAG6 KO. Nach 48 h hingegen hatten sich die Zilien im wt weitgehend zurückgebildet, nicht aber im BAG6 KO (Abbildung 26 C, Spalte 4 und 5).

Zusammenfassend ließ sich durch Kofärbungen eine Assoziation von BAG6 mit Zentriolen, (dem Basalkörper von primären Zilien) nachweisen. Dort veränderte ein BAG6 KO die Acetylierung von Tubulin in primären Zilien und darüber hinaus deren Abbaugeschwindigkeit. Ein Einfluss von BAG6 auf das Tubulin-Skelett resultiert also nicht nur in einer veränderten Zellmorphologie (Abbildung 13 A), sondern auch in Tubulin-abhängigen Prozessen wie der Migration (Abbildung 24 und Abbildung 25) und Zilienbildung (Abbildung 26).

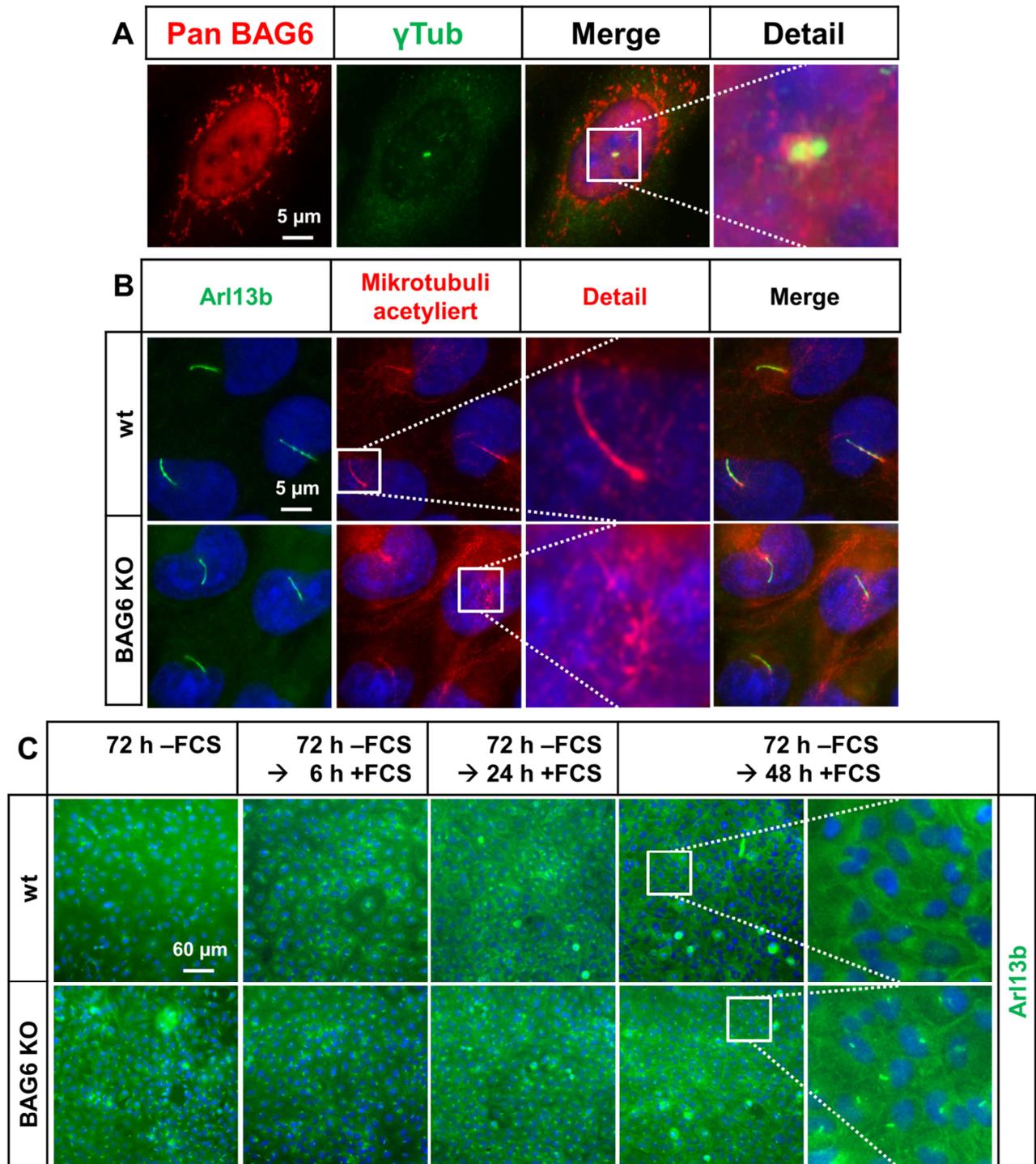


Abbildung 26: Ein BAG6 KO verringert die Abbau-Geschwindigkeit von primären Zilien.

A) Immunfluoreszenzfärbung von IMR90S wt-Zellen für die BAG6-Gesamt-Proteinmenge und γ -Tubulin (γ Tub) als zentrosomaler Marker. Die Detail-Vergrößerung zeigt die lokale Anreicherung von BAG6 (rot) am Zentrosom (grün). Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. **B)** Immunfluoreszenzaufnahmen von IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen 72 h ohne FCS gefärbt für den primären Zilienmarker Arl13b und acetylierte Mikrotubuli. Die Detailaufnahme bei gleicher Belichtungszeit zeigt Unterschiede in Acetylierungs-Stärke der Mikrotubuli. **C)** Zur Bestimmung der Auf- bzw. Abbaugeschwindigkeit von primären Zilien wurden IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen für Arl13b immunfluoreszenzgefärbt. Gezeigt wird der Auf- bzw. Abbau von primären Zilien nach FCS-Entzug für 72 h (-FCS) und Wiedergabe (+FCS) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Detail-Vergrößerung zeigt Unterschiede im primären Zilienabbau nach 48 h FCS-Wiedergabe. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μ m.

2.4.4 BAG6 zeigt eine zentrosomale Akkumulation während des Zellzyklus

BAG6 zeigte eine Akkumulation am Zentrosom (Abbildung 26 A) und beeinflusste hier die Zilienbildung (Abbildung 26 B und C). Über die Zilienbildung hinaus besitzen Zentrosomen eine wichtige Funktion in der Mitose (Basten und Giles, 2013). Vor der Mitose bilden sich zunächst zwei reife Zentrosomen aus, die während der eigentlichen Mitose als Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) zur Ausbildung des Teilungsapparats dienen. Für BAG3 (Fuchs et al., 2015) und BAG6 (Winnefeld et al., 2006) gibt es bereits erste Hinweise, dass ein Einfluss der BAG-Proteine auf die Zellteilung besteht.

Um zu untersuchen, ob BAG6 gezielt am MTOC akkumuliert, wurden zunächst Methanol-fixierte IMR90S-Zellen für BAG6 und Mikrotubuli kogefärbt (Abbildung 27 A). Im Zentrum des besonders Tubulin-positiven MTOC zeigte sich dabei eine BAG6-Akkumulation (Abbildung 27 A, Detail). BAG6 als Protein mit Funktion im Proteinabbau (Ast und Schuldiner, 2011) akkumulierte am MTOC, das während der Interphase auch Zentrum des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus ist (Vora und Phillips, 2016).

Um zu testen, ob auch während anderer Zellzyklus-Phasen BAG6 mit dem Zentrosom bzw. dem MTOC assoziiert war, wurde eine KO-Färbung für Pan BAG6 und acetyliertes Tubulin zu verschiedenen Zellzyklus-Phasen in IMR90S-Zellen durchgeführt (Abbildung 27 B). Acetyliertes Tubulin diente dabei als Marker für Zentrosomen bzw. das MTOC (Poole et al., 2001). In der Pro- und Metaphase akkumulierte BAG6 an den für acetyliertes Tubulin-positiven Zentrosomen (Abbildung 27 B, Spalte 1 und 2). Während der Telophase und anschließender Zytokinese verschwand die zentrosomale BAG6-Immunfluoreszenzfärbung und BAG6 akkumulierte am Mittelkörper (Abbildung 27 B, Spalte 3 und 4), dem Ort, an dem beide Tochterzellen voneinander getrennt werden. Dabei reicherte sich BAG6 insbesondere an der Stelle an, an der sich der kontraktile Ring bildete, welcher die Teilungsfurchung vollzieht. In der Interphase zeigte BAG6 wieder eine Kolo-kalisation mit den Zentrosomen (Abbildung 27 B, Spalte 5).

Es ist bekannt, dass der kontraktile Ring stark ubiquitinyliert ist und nach erfolgreicher

Zytokinese mittels Autophagie abgebaut wird (Pohl und Jentsch, 2009), beides Prozesse bei denen BAG6 eine Rolle spielt (Rodrigo-Brenni und Gutierrez, 2014; Sebti et al., 2014). Um die BAG6-Lokalisation im Mittelkörper genauer zu bestimmen, wurden mikroskopische Detailaufnahmen gemacht (Abbildung 27 C). Hierbei zeigte sich eine BAG6-positive Ringstruktur im Zentrum des Mittelkörpers (Abbildung 27 C, Detail), außerdem eine BAG6-Akkumulation im Bereich der Tubulin-positiven, sogenannten Mittelkörper-Armen, an denen endosomales Recycling stattfindet (Schiel et al., 2013).

Zusammenfassend ergaben Immunfluoreszenzfärbungen zu unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen, dass BAG6 Zellzyklus-abhängig an Zentrosomen akkumulierte. Während der Zytokinese ließ sich BAG6 im Mittelkörper nachweisen, wo BAG6 an dem dort stattfindenden Proteinabbau beteiligt sein könnte. Dadurch könnte sich ein BAG6 KO auf die Zellteilung auswirken.

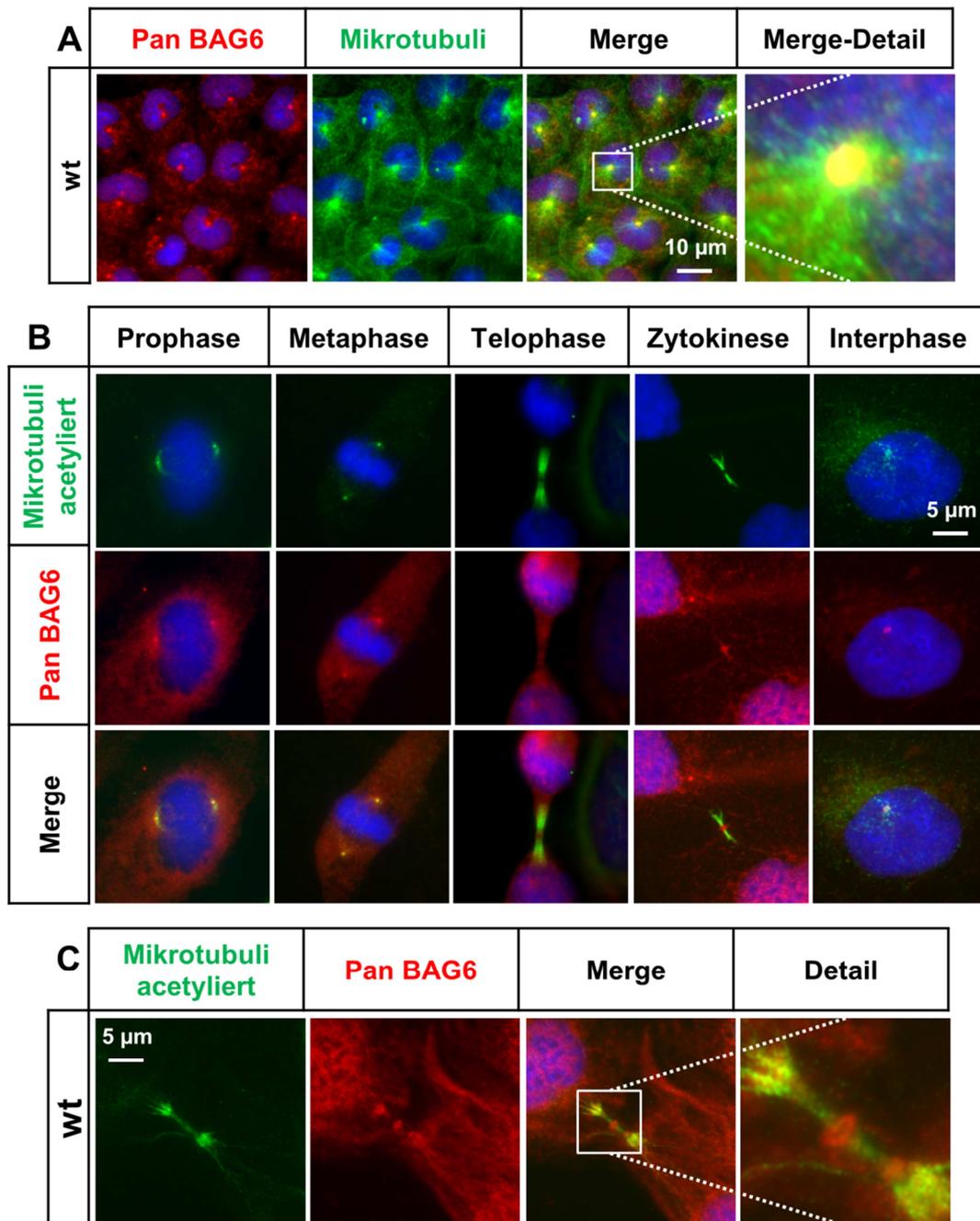


Abbildung 27: BAG6 zeigt eine zentrosomale Akkumulation während des Zellzyklus.

A) IMR90S wt-Zellen wurden für die BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) und β -Tubulin immunfluoreszenzgefärbt. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. Das Merge-Bild und entsprechende Detail-Vergrößerung zeigen eine BAG6-Akkumulation am MTOC. **B)** Immunfluoreszenzaufnahmen von BAG6 in IMR90S wt-Zellen zu verschiedenen Zellzyklus-Phasen. Als Marker für Zentrosome und den Mittelkörper während der Zytokinese dient die Immunfluoreszenzfärbung von acetyliertem Tubulin. **C)** Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen im Detail die spezifische BAG6-Lokalisation im Mittelkörper von IMR90S-Zellen während der Zytokinese. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

2.4.5 Ein BAG6 KO führt zur fehlerhaften Orientierung des Spindelapparats während der Mitose

BAG6 zeigt eine zentrosomale Lokalisation während unterschiedlicher Zellzyklus-Phasen (Abbildung 27 B) und beeinflusst das Mikrotubuli-Skelett (Abbildung 13 A). Ein zellulärer Mechanismus, bei dem sich die Manipulation an einem Protein mit diesen Eigenschaften auswirken könnte, ist die Mitose. Während der Mitose bilden sich polare Mikrotubuli zwischen den Zentrosomen und den kondensierten Chromosomen sowie astrale Mikrotubuli zur Positionierung des Zentrosoms am Zellkortex. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein reduziertes BAG6-Proteinlevel zu mitotischen Defekten führen kann (Winnefeld et al., 2006), wie auch im Fall von BAG3 (Fuchs et al., 2015).

Um den Einfluss eines BAG6 KO auf die Architektur der Teilungsspindel zu untersuchen, wurden die Mikrotubuli von mitotischen IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen immunfluoreszenzgefärbt (Abbildung 28 A). Bereits in der Übersicht (Abbildung 28 A, Reihe 1) fiel eine stärkere Tubulin-Färbung für mitotische BAG6 KO-Zellen im Vergleich zu wt-Zellen auf. Um zwischen polaren und astralen Mikrotubuli zu unterscheiden, wurden die Zentrosomen mit einem anti- γ -Tubulin-Antikörper angefärbt. In der Detailaufnahme des BAG6 KO (Abbildung 28 A, Reihe 3) zeigte sich eine ungewöhnlich starke Ausprägung der astralen Mikrotubuli.

Um zu untersuchen, ob sich diese Veränderung in der Spindel-Architektur auf den Ablauf der Mitose auswirkt, wurden IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen mittels Durchlichtmikroskopie während der Mitose beobachtet. Dabei zeigte sich eine stabile Positionierung der kondensierten Chromosomen während des beobachteten Zeitraums in wt-Zellen (Abbildung 28 B, Reihe 1). In BAG6 KO-Zellen hingegen bewegten sich die alignierten, Metaphasen-Chromosomen in allen drei Ebenen (Abbildung 28 B, Reihe 2). Es ist bekannt, dass eine zu starke astrale Mikrotubuli-Bildung während der Mitose zu einer fehlerhaften Spindelbewegung führen kann (Rankin und Wordeman, 2010).

Eine mögliche Ursache für die veränderte Astral-Mikrotubuli-Bildung an den Zentrosomen

von BAG6 KO-Zellen wäre der BAG6-assoziierte Verlust von Proteinen, die an dieser Stelle die Mikrotubuli-Polymerisation kontrollieren. Ein Protein, welches diese Kriterien erfüllt, ist Hsp70. Wie zuvor gezeigt beeinflusste BAG6 die Assoziation von Hsp70 mit dem Zytoskelett (Abbildung 19 B), beide Proteine interagieren miteinander (Corduan et al., 2009), und es konnte gezeigt werden, dass Hsp70 für eine normale Mikrotubuli-Polymerisation am mitotischen Zentrosom nötig ist (Fang et al., 2016). Um zu untersuchen, ob BAG6 die zentrosomale Lokalisation von Hsp70 in mitotischen Zellen beeinflusst, wurden mitotische wt und BAG6 KO-Zellen für Hsp70 immunfluoreszenzgefärbt. Dabei zeigte sich, dass durch einen BAG6 KO die zentrosomale Akkumulation von Hsp70 verloren ging (Abbildung 28 C).

Zusammenfassend ergaben Experimente an mitotischen Zellen, dass ein BAG6 KO zu einer gesteigerten Astral-Mikrotubuli-Bildung in mitotischen Zellen führte, vermutlich durch einen Verlust von Hsp70 am Zentrosom. Dadurch könnte es im BAG6 KO zur fehlerhaften Positionierung des Spindelapparats kommen, aber ohne das Zellwachstum *in vitro* nachhaltig zu stören (Abbildung 12 A). *In vivo* könnte solch eine Defekt aber ernsthafte Konsequenzen haben.

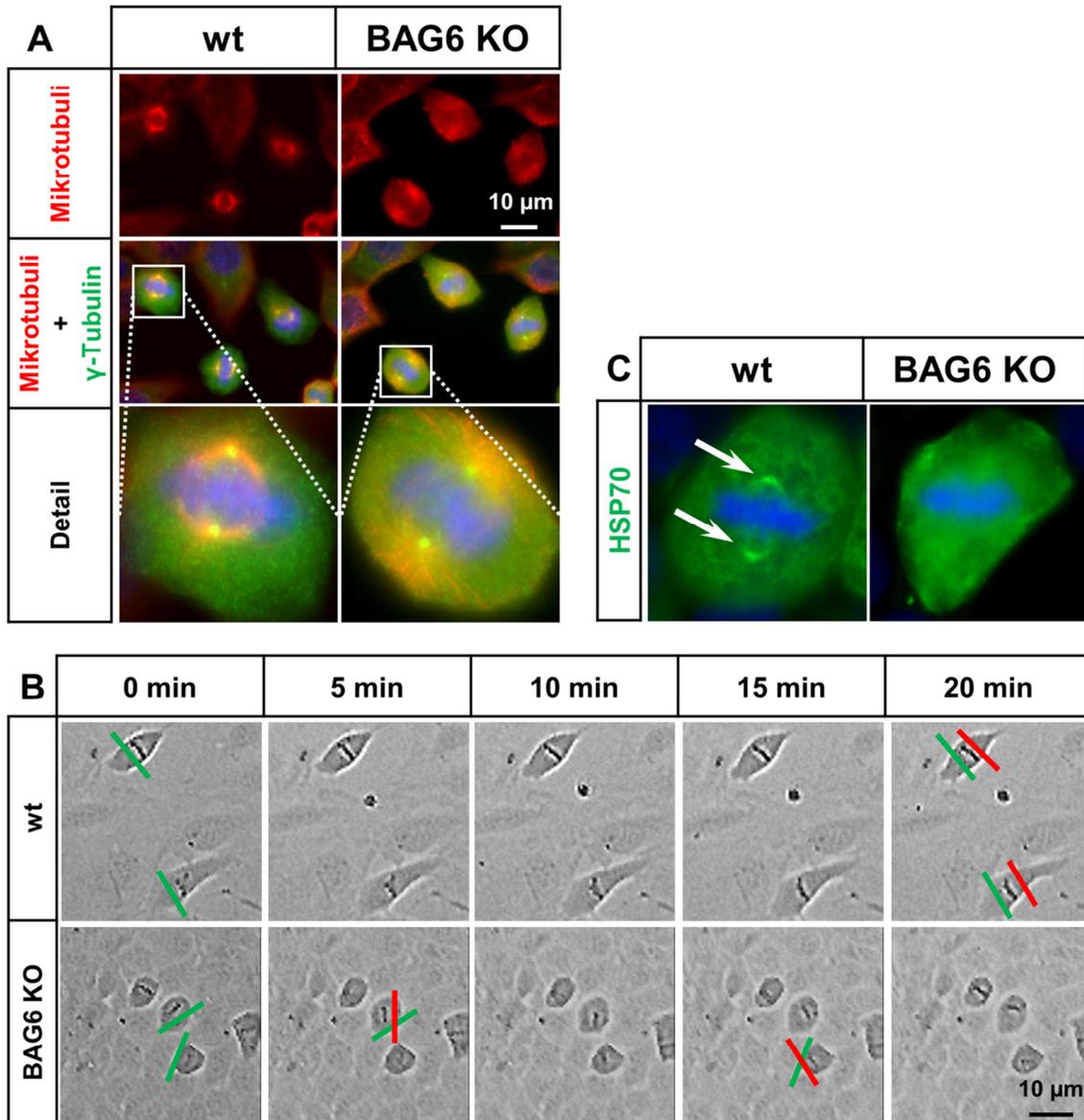


Abbildung 28: Ein BAG6 KO führt zur fehlerhaften Orientierung des Spindelapparats während der Mitose.

A) MCF wt und BAG6 KO-Zellen wurden für β -Tubulin (Mikrotubuli) und γ -Tubulin (als zentrosomaler Marker) immunfluoreszenzgefärbt. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau) und Merge-Bilder erzeugt. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm . Detailaufnahmen zeigen die Ausprägung von polaren und astralen Mikrotubuli. **B)** Mikroskopische Durchlichtaufnahmen von mitotischen MCF wt und BAG6 KO-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Zum Startzeitpunkt sind für wt und BAG6 KO-Zellen jeweils zwei Orientierungen der Äquatorialebene angegeben (grüne Linien). Nach 20 min zeigte sich keine Veränderung in der Orientierung für den wt (rote Linien). Beim BAG6 KO kam es hingegen zu einer Rotation der Äquatorialebene (ersichtlich an den sich kreuzenden roten und grünen Linien). **C)** Immunfluoreszenzaufnahmen zur Hsp70-Lokalisation in MCF wt und BAG6 KO-Zellen in mitotischen Zellen. Pfeile indizieren Hsp70-Akkumulationen im wt. Maßstabsbalken indizieren die Größen in μm .

3 Diskussion

3.1 BAG6-Spleißvarianten in EMT, Tumorentwicklung und Diabetes

In vielen wissenschaftlichen Studien konnte eine Bedeutung von BAG-Proteinen für die zelluläre Homöostase nachgewiesen werden. Selbst in Pflanzen ist ein BAG6-Homolog konserviert und entscheidend für Apoptose, Autophagie und Pathogen-Abwehr (Li und Dickman, 2016 und Li et al., 2016). In Mäusen resultiert ein *"knock-out"* von verschiedenen Vertretern der BAG-Proteinfamilie, wie BAG3 (Homma et al., 2006) oder BAG6 (Desmots et al., 2005), in einer Apoptoseinduktion, dramatischen Entwicklungsdefekten und vorzeitigem Tod. In einem BAG6 KO-Mausmodell unter anderem genetischen Hintergrund äußert sich das Fehlen von BAG6 in einer männlichen Unfruchtbarkeit (Sasaki et al., 2008 und Kaczmarek et al., 2011), was neue Studien am Menschen bestätigen (Intasqui et al., 2017).

Um die Konsequenz eines BAG6 KO unabhängig von einem Mausmodell zu untersuchen, wurden für diese Arbeit erstmals humane BAG6 KO-Zelllinien mittels CRISPR/Cas-Technologie hergestellt und mit verschiedenen BAG6-Spleißvarianten rekonstituiert. Dabei resultierte ein BAG6 KO in einem ähnlichen morphologischen Phänotyp in allen untersuchten Zelllinien. Es entstand eine mesenchymalere Zytoskelett-Architektur mit schwach ausgeprägtem, kortikalem Aktin-Zytoskelett (Abbildung 11 A) und eine veränderte F-Aktin-Stabilität (Abbildung 19 A). Ein bekanntes Resultat solch einer reduzierten F-Aktin-Stabilität sind die sogenannten *"Membran blebbs"* (Charras, 2008), welche tatsächlich bei BAG6 KO-Zellen beobachtet werden konnten (Abbildung 11 A, Reihe 6). Außerdem veränderte sich die Lokalisation von Transmembran-Proteinen zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 14 B und Abbildung 18) und zur Signal-Transduktion, wie z.B. für EpCAM (Abbildung 21). Dadurch waren BAG6 KO-Zellen nicht mehr in der Lage die über Zell-Zell-Kontakte vermittelte Information, wie z.B. über die Zelldichte, in ein nukleäres Proliferations-Signal zu übersetzen (Denzel et al., 2009). Die BAG6 KO-Morphologie zeigte daher keine

zellichteabhängige Veränderung wie der wt (Abbildung 9 A). Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass BAG6 an Signalwegen beteiligt ist, über die Veränderungen der zellulären Umgebung wahrgenommen und in eine morphologische Zellreaktion übersetzt werden.

Weitere Konsequenzen aus den beobachteten Zytoskelett-Veränderungen nach einem BAG6 KO waren ein verändertes Migrationspotenzial (Abbildung 24) sowie ein verändertes Wachstum im "*Soft-agar-assay*" (Abbildung 16). Beides sind Eigenschaften einer Zelle, die sich maßgeblich auf die Tumorentwicklung auswirken können. Wie stark sich der BAG6 KO-Phänotyp ausprägte war dabei abhängig von der Morphologie der verwendeten Wildtyp-Zelllinie. Eine invasive Brustkrebszelllinie (MDA) verlor nach einem BAG6 KO einen Teil ihrer epithelialen Ausprägung und migrierte schlechter (Abbildung 15 B und Abbildung 24 B), zeigte aber ein besseres Potenzial zum Metastasenwachstum (Abbildung 16 C). Eine wenig invasive Brustkrebszelllinie (MCF) mit schwach ausgeprägter Zytoskelett-Architektur zeigte hingegen kein verstärktes Wachstum im "*Soft-agar-assay*" (Abbildung 16 C). Immunfluoreszenzfärbungen unterschiedlicher Zelllinien stimmten aber dahingehend überein, dass die Expression der BAG6 +ex24-Variante einen epithelialeren Phänotyp erzeugte, die der Δ ex24-Variante einen mesenchymaleren Phänotyp. Deutlich wurde die BAG6 KO-bedingte EMT auch anhand einer veränderten Expression bzw. Lokalisation von EMT-Markern. So reduzierte sich durch einen BAG6 KO die Expression von epithelialen Markern wie E-Cadherin (auf 50 % des wt) und EpCAM (auf 70 %) und die Expression von mesenchymalen Markern wie S100a (auf 130 % des wt) und N-Cadherin nahmen zu (Abbildung 11 B). Darüber hinaus akkumulierten in BAG6 KO-Zellen epitheliale Marker für die Zell-Zell-Adhäsion (E-Cadherin, Integrin β 1 und Syndecan) weniger stark an der Zellmembran (Abbildung 14 B und Abbildung 21 B).

Ein Vorgang, bei dem solche zellmorphologischen Veränderungen von entscheidender Bedeutung sind, ist die Tumorbildung (Jolly et al., 2017). Und tatsächlich, BAG6 wird als Tumormarker für Brustkrebs vorgeschlagen (Calderon-Gonzalez et al., 2015) und ein SNP

im Promotor-Bereich von *bag6* (rs3117582) zeigt eine starke Assoziation mit Lungenkrebs (Wang et al., 2008; Etokebe et al., 2015 b). Eine genomweite Meta-Studie für lungenkrebsassoziierte SNPs führt nur zwölf eindeutig betroffene Gene auf, darunter auch der in *bag6* (Liu et al., 2017). Die Lage des SNPs im Promotobereich lässt hier eine Auswirkung auf die BAG6-Expressionstärke am wahrscheinlichsten erscheinen.

Histologische BAG6-Färbungen von gesunden und entarteten Zellen von Brust bzw. Lungengewebe (proteinatlas.org) weisen eine veränderte BAG6-Expression auf (Abbildung 29). Während in gesundem Brustgewebe die Stärke der Färbung mit Pan BAG6- und anti-ex24-Antikörper ungefähr gleich stark ist, ist die anti-ex24-Färbung im Tumorgewebe reduziert. Gleiches gilt für gesundes und entartetes Lungengewebe, was auf einen relativen Verlust von BAG6 +ex24 in Tumoren spricht.

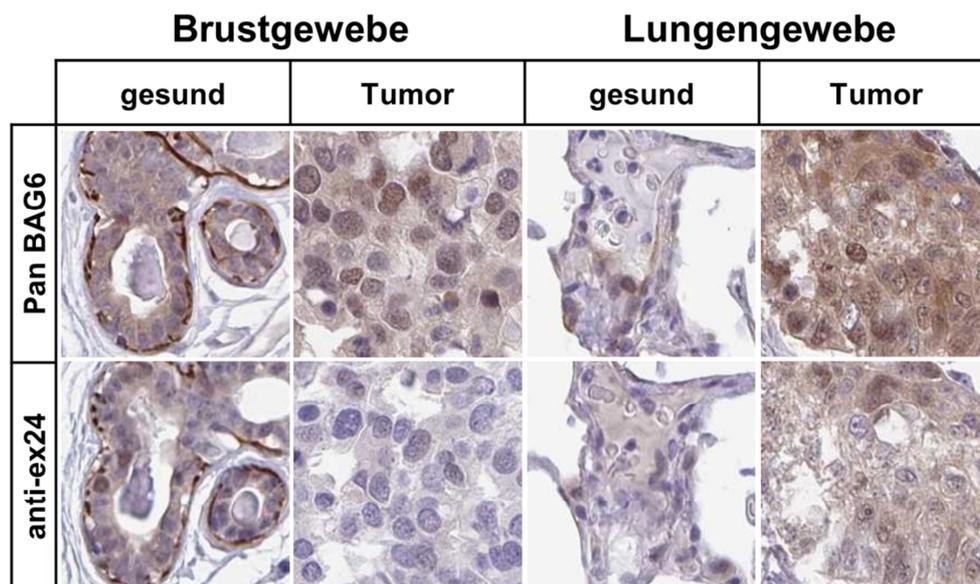


Abbildung 29: BAG6 ex24 wird in Tumoren vermehrt gespleißt.

Die histologischen Färbungen (Quelle: proteinatlas.org/ENSG00000204463-BAG6, Uhlen et al., 2015) zeigen die BAG6-Expressionsstärke in gesundem und entartetem Brust- bzw. Lungengewebe. Gefärbt wurde die BAG6-Gesamt-Proteinmenge (Pan BAG6) bzw. nur die +ex24-Variante (Anti-ex24). Die relative anti-ex24-Färbung im Tumorgewebe ist reduziert.

Dass neben einer veränderten Expressionsstärke vor allem das alternative Spleißen von BAG6 relevant für die Tumorbildung ist, zeigen bereits erste Studien. So finden sich im Zellkultur-Modell für kleinzelligen Lungenkrebs nur zehn signifikant unterschiedlich exprimierte Spleißvarianten, darunter BAG6 (Loiselle et al., 2016). Dass das alternative Spleißen von BAG6 die Tumorbildung auch in anderen Krebsarten beeinflussen kann, zeigt eine Meta-Analyse zum alternativen Spleißen in Krebszellen (Climente-Gonzalez et al., 2017). Hier wurde BAG6 als alternativ gespleißtes Genprodukt bestätigt.

Das gängige Modell für die Tumorentwicklung geht davon aus, dass zwei morphologische Veränderungen der Tumorzellen nötig sind, von Entstehung des primären Tumors bis hin zum Wachstum entfernter Metastasen (Thiery, 2002). Zuerst muss eine epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) erfolgen, wodurch Tumorzellen ihr Metastasierungspotenzial entwickeln und schließlich eine Intravasation in den Blutstrom stattfinden kann. Nach einer anschließenden Extravasation kommt es wiederum zu einer mesenchymal-epithelialen-Transition (MET), die entscheidend für das Größenwachstum der Metastasen ist (Thiery, 2002). Ein Genprodukt wie BAG6, das alleine durch alternatives Spleißen beide Transitionen (EMT und MET) induzieren könnte, wäre deshalb von besonderem Interesse.

Der Grund warum alternatives Spleißen von gesteigertem Interesse für die Tumorforschung ist, erschließt sich, wenn man das gängige Modell zur Krebsentstehung betrachtet. Das "*Multiple hit*"-Modell zur Krebsentstehung (Knudsonhypothese; Knudson, 1971) geht von einer Onkogen-Aktivierung und einer Tumorsuppressoren-Deaktivierung durch aufeinanderfolgende Mutationen aus. Die der Aktivierung bzw. Deaktivierung zugrundeliegende Mutationen haben dabei meist irreversible Auswirkungen auf die normale Proteinfunktion (wie z.B. ein vorzeitiges Stopp-Kodon). So kann der Verlust eines epithelialen Markers durch eine Nonsense-Mutation eine EMT begünstigen, für eine spätere MET während der Tumorentwicklung kann dieser Verlust aber hinderlich sein. Induziert bereits alternatives Spleißen eine EMT, wie im Fall von BAG6, ist dieser Prozess weniger endgültig. Das

Verhältnis von BAG6 +ex24 zu Δ ex24 könnte sich während der Tumorentwicklung mehrfach verschieben, da Mutationen unterschiedlicher *cis*- bzw. *trans*-wirkende Elemente aufeinander folgen können. Durch solch ein Umschalten zwischen der Expression von Spleißvarianten mit unterschiedlichen Funktionen, ist alternatives Spleißen ein wesentlicher Faktor für Tumorplastizität (die Fähigkeit von Zellen, dynamisch zwischen unterschiedlichen Phänotypen zu wechseln; Pradella et al., 2017).

Wie könnte sich das Spleißen von BAG6 ex24 nun konkret auf die Tumorplastizität *in vivo* auswirken? Während der Tumorentwicklung würde eine Mutation (z.B. in einem ex24-assoziierten Intron) zu einer krankhaften Zunahme der Δ ex24-Variante führen (Abbildung 30). Dies begünstigt eine EMT, die Tumorzellen verlieren ihre Zell-Zell-Kontakte und können metastasieren. Am Ort der Metastasenbildung wachsen nun vermehrt Tumorzellen, die eine MET durchmachen können. Eine weitere Mutation verschiebt das ex24-Spleißverhältnis wieder in Richtung +ex24.

Noch komplexer wird die potenzielle Bedeutung von BAG6 in der Tumorbildung betrachtet man den Prozess der Zytoplasmabrücken-Bildung zwischen Zellen mit unterschiedlichem BAG6 ex24-Status (Abbildung 23). Ein Transport von Proteinen und anderen zytosolischen Bestandteilen aus gesunden Zellen in extravasierte Tumorzellen mit hohem BAG6 Δ ex24-Anteil, könnte die Wahrscheinlichkeit der Metastasenbildung erhöhen. Tatsächlich sind Zytoplasmabrücken auch in der Tumorthherapie von steigendem Interesse (Sahoo et al., 2017), aber bisher fehlt ein tiefgehendes Wissen über beteiligte Proteine (Ariazi et al., 2017). BAG6 wäre bisher das erste Genprodukt dessen alternatives Spleißen diesen Prozess beeinflusst.

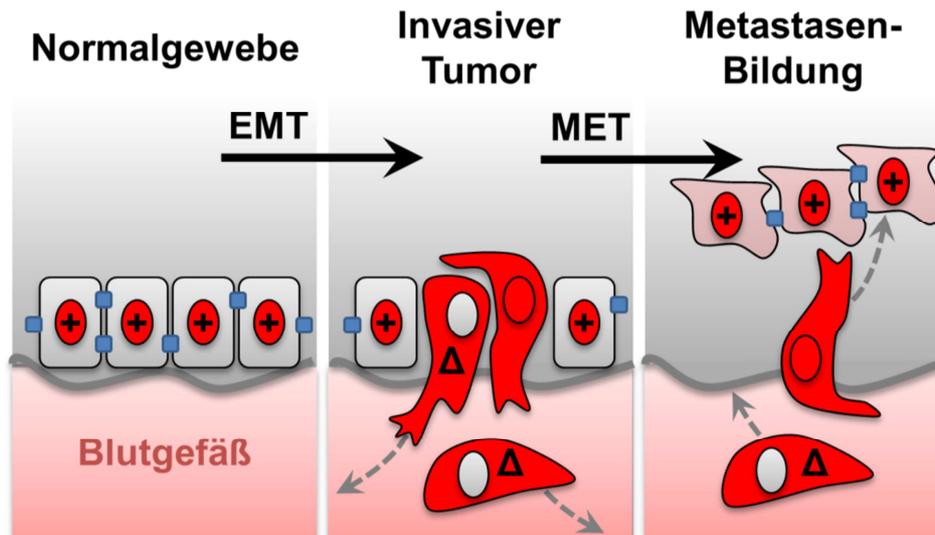


Abbildung 30: Modell zur Bedeutung von BAG6 in der Tumorbildung.

Das Modell veranschaulicht die mögliche Bedeutung von BAG6 ex24 in der Tumorbildung. In Rot ist die Veränderung des Spleißens von BAG6 ex24 (+ bzw. Δ) mit Auswirkungen auf die BAG6-Lokalisation dargestellt. Epitheliales "Normalgewebe" besitzt eine starke Zell-Zell-Adhäsion sowie nukleäres BAG6 (+ex24). Durch verstärktes Spleißen von ex24 (Δ ex24) kommt es zu einer BAG6-Translokation ins Zytosol und einer epithelial-mesenchymale-Transition (EMT). Nach einer Intravasation und anschließender Extravasation kann es am Ort der Metastasenbildung wieder zu verringertem ex24-Spleißen kommen. Dadurch wird eine mesenchymal-epitheliale-Transition (MET) unterstützt, wodurch die Metastasen-Masse stärker wachsen kann.

Wie ließe sich der beobachtete Einfluss von BAG6 auf die Zellmorphologie als therapeutischen Ansatz für die Tumorthherapie nutzen? Eine Technik, die gezielt das BAG6-ex24-Spleißmuster in Tumoren verändert könnte, wäre von besonderem Interesse. Eine eher indirekte Methode ist die Manipulation von Spleißfaktoren. SRSF5 als Kandidat für das Spleißen von BAG6 ex24 (Abbildung 10 D) wird bereits allgemein als Ansatzpunkt für die Tumorthherapie diskutiert (da Silva et al., 2015). Tatsächlich existiert auch eine direkte Methode zum gezielten Eingriff in das alternative Spleißen von einzelnen Genprodukten (Havens und Hastings, 2016). Dabei werden mittels sequenzspezifischer, komplementärer RNA-Moleküle gezielt Spleiß-Enhancer bzw. -Silencer in mRNA-Molekülen maskiert und so das alternative Spleißen manipuliert. Experimente mit BAG6-Spleißsensor-Konstrukten (Abbildung 10 B) veranschaulichen wie deutlich sich eine veränderte Spleißfaktoren-Bindung auf das ex24-Spleißen auswirken kann. Darüber hinaus lassen sich diese RNA-Moleküle durch eine Verknüpfung an Liganden gezielt in entartete Zellen liefern, die den passenden Oberflächen-Rezeptor tragen (Juliano, 2016). So könnte BAG6 ein vielversprechendes Ziel

für eine Tumorthherapie durch Eingriff in das Tumorzell-Spleißmuster sein. Für das Mitglied der BAG-Proteinfamilie BAG1 wurde solch eine Idee bereits diskutiert (Cato et al., 2017).

Neben der Tumorentwicklung zeigt sich die zentrale Bedeutung von BAG6 auch in einer Assoziation mit anderen Erkrankungen. Tatsächlich bestätigen Analysen von genetischen Variationen im humanen Genom (*Residual Variation Intolerance Score*; Petrovski et al., 2013), dass *bag6* zu den 1,6 % am wenigsten mutationstoleranten Genen gehört. Als weiteres Beispiel für eine BAG6-assoziierte Erkrankung ist hier besonders Diabetes zu nennen. Für den in dieser Arbeit untersuchten SNP1 ist eine Assoziation mit Diabetes bekannt (McGinnis et al., 2009). Tatsächlich zeigte sich, dass dieser SNP (und ein weiterer, getesteter SNP in dem ex24-nachfolgenden Intron) einen Einfluss auf das alternative Spleißen von ex24 hatte, vermutlich durch eine veränderte Bindestelle für SRSF5 (Abbildung 10). Darüber hinaus besaß SRSF5 eine zelllichteabhängige Expressionsstärke in IMR90S wt, nicht aber in BAG6 KO-Zellen (Abbildung 10 D).

In einer neuen Studie (Kaminska et al., 2016) konnte gezeigt werden, dass BAG6 ex24 im Fettgewebe von Menschen mit Typ 2 Diabetes weniger gespleißt wird und dies abhängig vom BMI (*Body mass index*). Interessanterweise ist SRSF5 der Spleißfaktor, der entscheidend für die Differenzierung von Adipozyten ist (Cooper et al., 2014 und Li et al., 2013) und dessen vorhergesagte Bindestelle von dem untersuchten SNP1 betroffen war. In genetischen Studien an eineiigen Zwillingen mit diskordantem BMI wurde außerdem eine unterschiedlich CpG-Methylierung im *bag6*-Promotor gefunden (Pietiläinen et al., 2016). Über seine Bedeutung in der Adipozyten-Differenzierung hinaus ist SRSF5 ein überexprimierter Marker für metastasierenden Lungenkrebs (Kim et al., 2016), der Tumorart bei der alternatives Spleißen von BAG6 nachgewiesen werden konnte (Loiselle et al., 2016).

Ein möglicher molekularer Mechanismus, der BAG6 mit der Adipozyten-Differenzierung verbindet, ist die β -Catenin-Translokation in den Zellkern. IMR90S wt-Zellen zeigten eine β -Catenin-Färbung im Kern bevor und nach Kernexport-Inhibition mittels Leptomycin B

(Abbildung 22). In BAG6 KO-Zellen ließ sich hingegen kein nukleäres β -Catenin-Signal detektieren. Studien zeigen, dass solch ein Verlust von nukleärem β -Catenin zu einer erhöhten Adipogenese führen kann (Li et al., 2008). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen der ER-assoziierten Degradation (ERAD), an der BAG6 beteiligt ist (Xu et al., 2013), und dem zellulären Lipid-Metabolismus (Stevenson et al., 2016). Konkret konnte gezeigt werden, dass BAG6 an UbxD8 bindet (Schrul und Kopito, 2016), einen wichtigen Lipid-Sensor der Zelle (Lee et al., 2010). Möglicherweise ist ein exaktes BAG6 ex24-Spleißverhältnis entscheidend für die richtige Funktion des Lipid-Sensors UbxD8. Eine genauere Betrachtung des alternativen Spleißens von BAG6 in Fettgewebs-Zellen von Patienten mit Typ 2 Diabetes könnte tiefere Einblicke in die möglichen genetischen Ursachen der Erkrankung liefern.

3.2 Die zellulären Funktionen von BAG6

Studien zu BAG6 befassen sich zumeist mit einer zytosolischen BAG6-Funktion, meist im Zusammenhang mit einer Chaperon-Funktion bzw. dem gezielten Proteinabbau über das Proteasom (Wang et al., 2011; Akahane et al., 2013). In den hier durchgeführten Experimenten ließ sich der wt-Phänotyp in BAG6 KO-Zellen aber durch die Expression der nukleären +ex24-Variante wieder herstellen. Dies spricht für eine entscheidende, nukleäre Funktion von BAG6. So zeigte sich, dass BAG6 im Kern nötig für eine zelldichteabhängige H3K27me3 ist (Abbildung 20). Es ist bekannt, dass eine Veränderung des Histon-Kodes mit EMT, Tumorprogression und Metastasierung einhergehen kann (Sun und Fang, 2016), also eine mögliche Ursache für die ausgeprägten, BAG6-abhängigen, zellulären Veränderungen ist. Ein mögliches Bindeglied zwischen BAG6 und der Histon-Methylierung stellen dabei Methyltransferasen wie DOTL1 dar (Wakeman et al., 2012).

Die Tatsache, dass BAG6 besonders als zytosolisches Protein in Zusammenhang mit ERAD beschrieben wird, darf nicht zu der Vermutung führen, nukleäres BAG6 hätte keinerlei Funktion in der Protein-Qualitätskontrolle. Im Gegenteil, insbesondere Studien an Hefe zeigen, dass nicht nur Proteinabbau im Kern stattfindet, sondern fehlgefaltete, zytosolische Proteine dafür gezielt dorthin transportiert werden (Nielsen et al., 2014). ER-assoziiertes Zellstress durch Störung der ERAD-Funktion kann allein schon zu einer EMT führen (Shah und Beverly, 2015). Für BAG1 und BAG6-Interaktionspartner wie gp78 ist ein Zusammenhang zwischen "Ungefaltetem-Protein-Stress" (*unfolded protein stress*, UPR) und EMT bereits beschrieben (Johno und Kitamura, 2013).

Auch wenn bei den Experimenten in dieser Arbeit die BAG6 +ex24-Varianten zumeist den wt wiederherstellen konnte, bedeutet dies nicht, dass ausschließlich die +ex24-Variante eine Auswirkung auf die Zellmorphologie hat. Einige Zusammenhänge sprechen für eine zusätzliche Funktion der Δ ex24-Variante (z.B. indirekt über erwähnte BAG6-Oligomerbildung mit +ex24-Varianten; Abbildung 5 C und Abbildung 6 E) und nicht nur eine potentiell

dominant-negative Funktion. In MCF BAG6 KO-Zellen hatte die zusätzliche Expression von BAG6 Δ ex24 einen Effekt auf die Zellmigration (Abbildung 24, Reihe 5) und Koloniebildung im "Soft-agar-assay" (Abbildung 16 B). Außerdem akkumulierte zytosolisches BAG6 gezielt an Zentrosomen (Abbildung 26 A) und Stellen mit verstärkter Aktin-Polymerisation (Abbildung 18 D) und war dort wichtig für eine Lokalisation des direkten BAG6-Interaktions-Partners Hsp70 (Abbildung 19 D und Abbildung 28 C). Zur Erinnerung, eine direkte Bindung zwischen der BAG-Domäne von BAG6 Δ ex24 und Hsp70 ist dabei immer noch möglich (Doong et al., 2002). Außerdem zeigte mCherry-BAG6 Δ ex24 einen gerichteten, Tubulin-abhängigen Transport im Zytosol (Abbildung 13 C). Es ist verlockend zu spekulieren, dass gerade die Oligomer-Bildung unterschiedlicher BAG6 ex24-Varianten es der Zelle ermöglicht, die verschiedenen BAG6-Funktionen genauestens zu modulieren. In diesem Modell könnte bereits eine moderate Veränderung des Gleichgewichts der BAG6 ex24-Varianten eine Verschiebung der BAG6-Funktionen hervorrufen.

Auf einen direkten Zusammenhang zwischen BAG6 und dem Aktin-Zytoskelett weisen Studien zu Ubl4A (eine Untereinheit aus dem BAG6-Komplex neben BAG6 und GET4/TRC35; Mariappan et al., 2010) und dem zellmembranassoziierten Zytoskelett hin (Zhao et al., 2015). GET4 bindet direkt an den Arp2/3-Komplex, der wichtig für die Ausbildung komplexer F-Aktin-Strukturen ist. Ein GET4 KO im Mausmodell führt zu reduziertem, kortikalem F-Aktin-Zytoskelett (Zhao et al., 2015), zeigt also einen ähnlichen Phänotyp wie ein BAG6 KO (Abbildung 11). Interessanterweise wurde ARPC3, eine Untereinheit des Arp2/3-Komplexes bereits als BAG6-Interaktionspartner in einer Interaktionsstudie (*Yeast two-hybrid assay*) gefunden (Stelzl et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass nukleäres BAG6 entscheidend für eine epitheliale Wachstumsform ist und sich indirekt auf das Zytoskelett durch Veränderung der Histon-Methylierung (Abbildung 20) auswirken kann. Darüber hinaus gibt es aber auch Hinweise auf eine Funktion von zytosolischem BAG6, mit direktem Einfluss auf das Zytoskelett.

3.3 Die Bedeutung von ex24 für die Lokalisation und die BAG-Domäne von BAG6

Alternatives Spleißen von BAG6 ex24 hatte einen entscheidend Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von BAG6. Das alternative Spleißen von ex24 führte zu einer vornehmlich zytosolischen Lokalisation von endogenem (Abbildung 6 B und F) wie transgenem BAG6 (Abbildung 6 A und D). BAG6 mit ex24 besaß hingegen eine rein nukleäre Lokalisation.

Diese Lokalisationsunterschiede der BAG6 ex24-Varianten unterstreichen, wie wichtig eine genaue Angabe der verwendeten BAG-Spleißvarianten für zukünftige Experimente ist. Eine zuvor beobachtete, unterschiedliche Lokalisation von BAG6-Spleißvarianten in verschiedenen Zelllinien (Kämper et al., 2012 a) ist wahrscheinlich auf die Bildung von BAG6-Homooligomeren zurückzuführen, die auch *in vivo* vorkommen (Minami et al., 2010). Die gegenseitige Beeinflussung der ex24-Varianten hinsichtlich ihrer Lokalisation konnte auch in den verwendeten BAG6 KO-Zelllinien durch gleichzeitige Expression der +ex24 und Δ ex24-Variante nachvollzogen werden (Abbildung 5 C und Abbildung 6 E). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass funktionelle Studien einzelner BAG6-Spleißvarianten nur unter Vermeidung einer Hetero-Oligomerbildung in BAG6 KO-Zellen möglich sind. Gleichzeitig dürfte die Oligomerbildung unterschiedlicher BAG6-Spleißvarianten eine Zunahme der funktionellen Komplexität *in vivo* bedeuten (Xu et al., 2013). Bei der Betrachtung von endogenem BAG6 ist außerdem die untersuchte Zelldichte von entscheidender Bedeutung. IMR90S-Zellen bei niedriger Zelldichte besaßen einen großen Anteil +ex24 im Kern, bei hoher Zelldichte hingegen viel Δ ex24 im Zytosol (Abbildung 9 A).

Was ist nun ursächlich für die unterschiedlichen, beobachteten Phänotypen hervorgerufen durch BAG6 ex24-Varianten? Betrachtet man die Auswirkungen des alternativen Spleißens von BAG6 ex24 auf die Aminosäuresequenz von BAG6, so ergibt sich daraus eine gleichzeitige Veränderung zweier funktioneller Domänen, der NLS und der BAG-Domäne. Wird ex24, welches direkt auf die NLS von BAG6 (Manchem et al., 2001) folgt, alternativ gespleißt, führt dies zu einer veränderten NLS-Stärke in der Theorie (Efthymiadis et al.,

1997; Hodel et al., 2001) und in Mutations-Experimenten (Abbildung 7). Das alternative Spleißen von ex24 hat somit einen direkten Einfluss auf die BAG6-Lokalisation.

Dass bereits die BAG6-Lokalisation einen starken Einfluss auf die Zellmorphologie hat, ergaben erste Experimente zu dem anderen Lokalisierungssignal in BAG6, der NES (Kernexportsequenz). Eine Mutation bzw. Deletion der BAG6 NES resultierte in verstärkter nukleärer BAG6-Lokalisation mit deutlichen Auswirkungen auf das Zellwachstum in HEK wt-Zellen (Abbildung 8 D). Über die Existenz dieser NES in BAG6 wurde bisher spekuliert (Sebti et al., 2014), aber experimentell validiert wurde sie zuvor nicht. Interessanter Weise befindet sich die NES von BAG6 in der Nähe der beiden funktionellen UBLs (Abbildung 2). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass eine veränderte Aminosäuresequenz an der NES-Position sich auf das Bindevverhalten an den UBLs auswirkt (z.B. durch Veränderung der dreidimensionalen Proteinstruktur). Genauso könnte eine Proteinbindung an die UBLs auch zu einer Maskierung der NES führen, was den nukleären BAG6-Export verringern würde.

Des Weiteren wirkt sich das Spleißen von BAG6 ex24 auf die über die BAG-Domäne vermittelte Funktion von BAG6 aus. In der BAG6 ex24-Sequenz sind zwei der drei α -Helices der für Protein-Protein-Interaktionen benötigten BAG-Domäne kodiert (Abbildung 4). Trotzdem muss das Spleißen von ex24 nicht zum Verlust aller α -Helices führen. Ein Alignment der C-terminalen Aminosäuresequenz von Δ ex24 mit anderen humanen BAG-Proteinen bzw. den von anderen Spezies zeigt (Abbildung 31 A), dass nach Spleißen von ex24 die aufrückenden Aminosäure-Sequenzen in ex23 bzw. ex22 zur Bildung einer alternativen BAG-Domäne führen könnte. Laut vorhergesagter Sekundärstruktur (POLYVIEW-2D; Porollo et al., 2004) besitzt Δ ex24 eine intakte α 2- und α 3-Helix (Abbildung 31 B). Bei gleichzeitigem Spleißen von ex22 und ex24 (was möglich erscheint, da das Spleißen von ex22 zu keiner Leserasterverschiebung führt) können sogar alle drei BAG-Domänen-typischen Helices alternativ entstehen.

3.3 Die Bedeutung von ex24 für die Lokalisation und die BAG-Domäne von BAG6

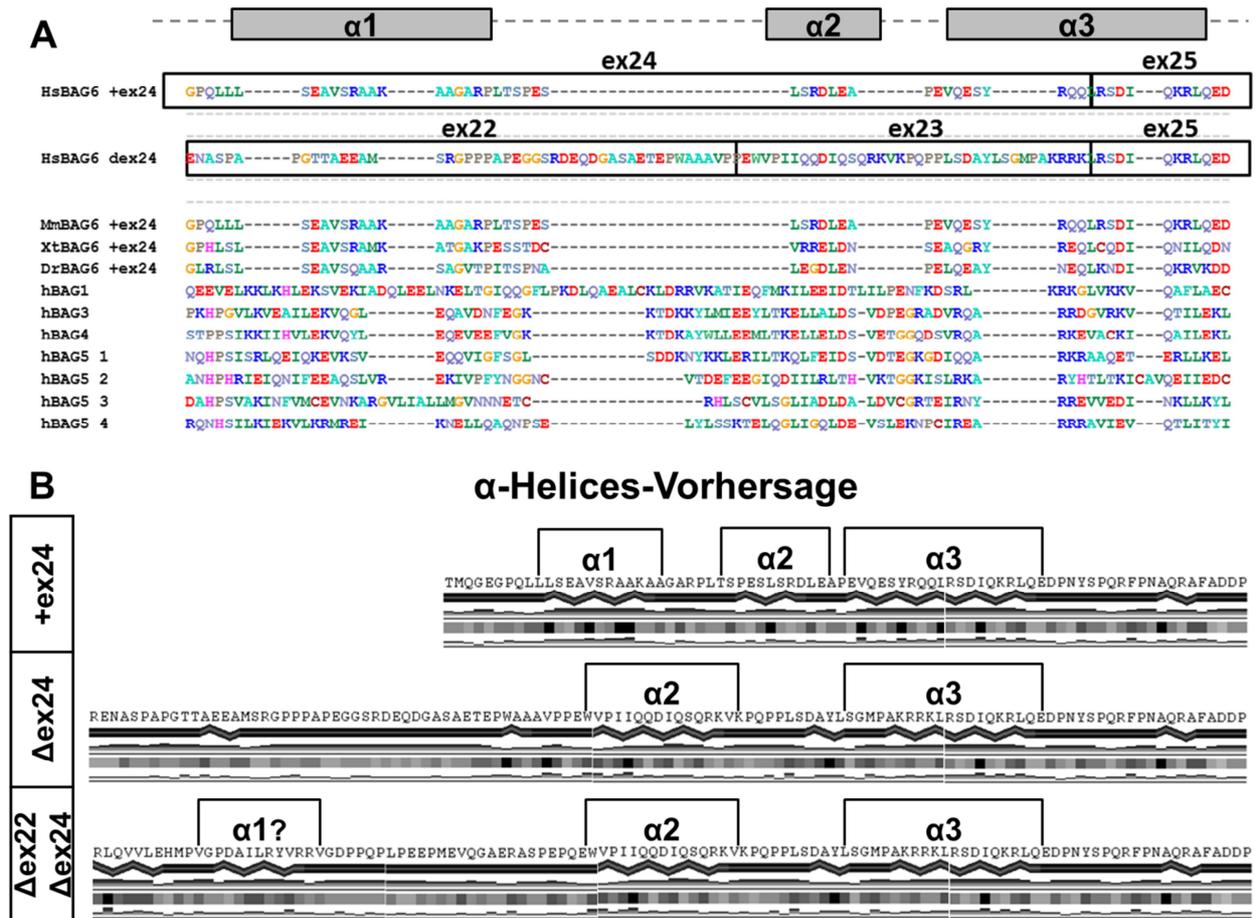


Abbildung 31: Spleißen von BAG6 ex24 für zur Entstehung einer alternativen BAG-Domäne.

A) Alignment von BAG6-Aminosäuresequenzen von humanen (HsBAG6) BAG6-Spleißvarianten mit (+ex24) und ohne (Δ ex24) Exon 24 sowie BAG6 von anderen Spezies: MmBAG6 *Mus musculus*; XtBAG6 *Xenopus tropicalis*; DrBAG6 *Danio rerio*; und anderen humanen Vertretern der BAG-Proteinfamilie (hBAG1 bis hBAG5). Die Farbkodierung indiziert konservierte Aminosäuren. Die Lage der einzelnen α -Helices (α 1-3) der BAG-Domänen ist oberhalb des Alignments angegeben. Exongrenzen der humanen BAG6-Varianten sind hervorgehoben. **B)** Vorhergesagte Sekundärstrukturen der humanen +ex24 bzw. Δ ex24 BAG6-Varianten sowie einer möglichen Δ ex22 Δ ex24-Variante durch POLYVIEW-2D (Porollo et al., 2004). Potenzielle α -Helices sind gezackt dargestellt. Hervorgehoben sind die Positionen der einzelnen, vorhergesagten α -Helices (α 1-3), insbesondere die potenzielle α 1-Helix (α 1?) durch gleichzeitiges Spleißen von ex22 und ex24 (Δ ex22 Δ ex24).

Aufgrund dieser Vorhersagen durchgeführte RT-PCR-Experimente an einer Zelllinie und primären Zellen ergaben tatsächlich, dass BAG6 ex22 alternativ gespleißt werden kann (Abbildung 32 A). Um einen Eindruck von der Häufigkeit möglicher BAG6 ex22/ex24-Spleißvarianten zu bekommen, wurden eine Quantifizierung aller humanen *bag6* ESTs (Stand 2016; NCBI) durchgeführt. Die Analyse ergab zwar nur insgesamt 14 % BAG6 Δ ex22, davon waren aber rund 80 % gleichzeitig Δ ex22 und Δ ex24 (Abbildung 32 B). Dieser hohe Anteil an Δ ex22 Δ ex24 lässt koordiniertes Spleißen möglich erscheinen. Dass ex22 von

weiterem Interesse sein sollte, zeigt eine neue Studie, in der ex22 das am stärksten hochregulierte Phosphopeptid in einem Model für axonale Regeneration nach Verletzung ist (Yu et al., 2013), und in einem Mausmodell mit erhöhter Insulin-Sensitivität verstärkt phosphoryliert wird (Feng et al., 2014). Eine Veränderung der α -Helice-Architektur durch alternatives Spleißen erscheint auch funktionell sinnvoll, bedenkt man, dass je nach Protein-Protein-Interaktion nur zwei der drei α -Helices nötig sind. So erfolgt die Interaktion mit Hsp70 nur über die α 2- und α 3- Helix (Doong et al., 2002), die mit Raf1 über die α 1- und α 2-Helix (Wang et al., 1996).

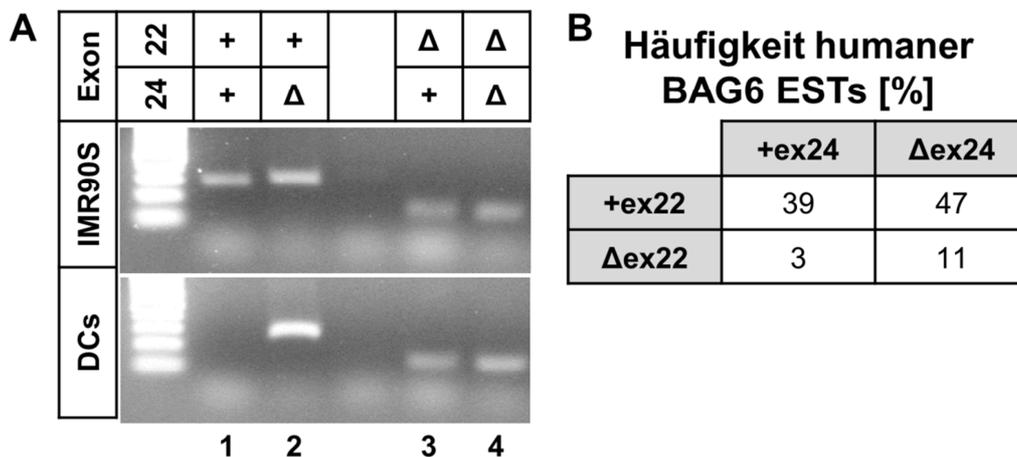


Abbildung 32: Alternativ gespleißten Exons im C-Terminus von BAG6.

A) Zum Nachweis von BAG6 ex22 bzw. ex24-Spleißvarianten wurde cDNA von IMR90S- und primären Dendritischen Zellen (DCs) mittels RT-PCR und sequenzspezifischen Primern analysiert. Dabei konnten alle ex22/ex24-Kombinationen nachgewiesen werden (Spur 1-4), bis auf +ex22+ex24 in DCs (Spur 1). **B)** Kreuztabelle zur relativen Häufigkeit der BAG6 ex22/ex24-Spleißvarianten in humanen ESTs (*expressed sequence tags*).

Zusammenfassend ergibt sich ein Modell, in dem das alternative Spleißen von BAG6 ex24 (und möglicherweise ex22) gleichzeitig die Lokalisation und das Bindevverhalten von BAG6 verändern kann. Die Assoziation von Protein-Bindestellen mit beiden Lokalisierungssignalen in BAG6 (N-terminal: UBLs und NES; C-terminal: BAG-Domäne und NLS) kann zu einer Maskierung des jeweiligen Lokalisierungssignals nach Proteinbindung führen. Neueste Studien bestätigen dieses Modell für eine Maskierung der NLS durch Bindung von TRC35 an die BAG-Domäne (Mock et al., 2017).

Damit könnte das alternative Spleißen von ex24 die BAG6-Lokalisation auf zwei Weisen regulieren. Zum einen direkt, über eine Veränderung der NLS-Stärke, zum anderen indirekt über eine veränderte Maskierungs-Wahrscheinlichkeit der NLS durch die Entstehung einer alternativen BAG-Domäne. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist die Lage des gleichfalls alternativ gespleißten ex5 von BAG6 (Kämper et al., 2012 a) in direkter Nähe zu NES und UBLs (Abbildung 2). Auch hier könnte sich das alternative Spleißen direkt auf Proteinbindung und indirekt auf die BAG6-Lokalisation auswirken. Zusätzlich könnte auch das alternativ gespleißte ex11b von BAG6 zu einer veränderten Proteinbindung über ein PXXP-Motiv führen (Okada et al., 2011).

All diese Beobachtungen verdeutlichen, wie komplex der Zusammenhang ist, zwischen alternativ gespleißten Exons, veränderten Bindeeigenschaften und lokalisationsrelevanten Domänen in BAG6. Diese BAG6-Architektur zeugt von einem hohen Evolutionsdruck für eine ausgefeilte Regulation der BAG6-Lokalisation und -Funktion.

3.4 Eine evolutionäre Betrachtung der BAG6 ex24-Spleißvarianten

Betrachtet man die Exon-Struktur der BAG6 BAG-Domäne von einem evolutionären Standpunkt, fällt auf, dass (außer bei einzelligen Vertretern wie *Capsaspora owczarzaki*) in der Nähe bzw. innerhalb der BAG-Domäne von BAG6 gespleißt wird (Abbildung 33 A). Bei Vertretern der Urmundtiere zeigt eine Auswertung von ESTs und einer Vorhersage der Protein-Sekundärstruktur (POLYVIEW-2D; Porollo et al., 2004), dass alternatives Spleißen die C-terminale α -Helices-Architektur der erweiterten BAG-Domäne verändern kann. Möglicherweise stellt dies eine alternative, evolutionäre Strategie zur Modulation der BAG6 BAG-Domäne dar. Eine potenzielle NLS, wie z.B. beim Menschen, wird aber nicht zugleich beeinflusst.

Bei Vertretern der Neumundtiere, bis hinunter zum Lanzett-Fischchen ist das alternative Spleißen der BAG-Domäne hingegen mit einer Veränderung des NLS-Kontextes verknüpft.

Wird das BAG6 ex24-Äquivalent vom Lanzettfischchen (*Branchiostoma floridae*) gespleißt entsteht erst dadurch eine potenzielle NLS. Beim Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*) lässt sich bereits die gleiche C-terminale BAG6-Exon-Architektur wie beim Menschen finden. Damit scheint eine Verbindung von BAG6 ex24-Spleißen und der BAG6 NLS-Funktion evolutionär konserviert.

Bei den meisten Fischen stellt sich das alternative Spleißen der BAG-Domäne noch komplexer dar, besitzen sie doch noch zusätzlich ein *bag6*-Homolog (*bag6l*, *BAG6-like*). Eine potenzielle Veränderung der NLS-Stärke durch alternatives Spleißen ist bei ihnen teils für BAG6, teils für BAG6L vorhergesagt (Abbildung 33 B, z.B. Stichling) oder besteht zwischen beiden BAG6-Homologen (Abbildung 33 B, z.B. Zebrafisch). Möglicherweise stellt diese genomische *bag6*-Organisation einen weiteren, alternativen Weg hin zu einer größeren Komplexität an BAG6-Proteinen mit unterschiedlicher Lokalisation dar.

3.4 Eine evolutionäre Betrachtung der BAG6 ex24-Spleißvarianten

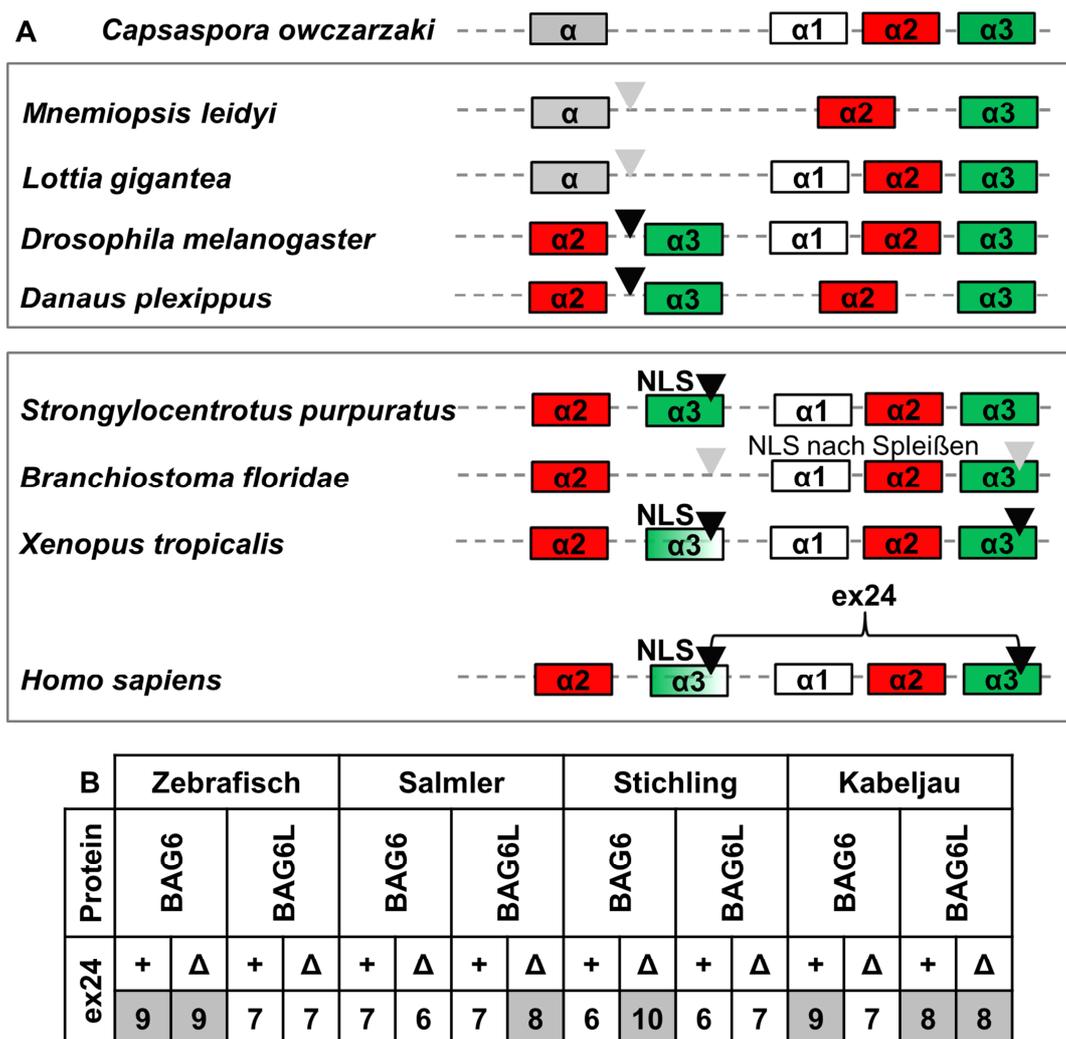


Abbildung 33: Evolutionäre Betrachtung der Exonstruktur der BAG-Domäne von BAG6.

A) Graphische Darstellung der α -Helices-Architektur innerhalb der BAG6 BAG-Domäne einiger Vertreter der Urmundtiere (oberer Kasten) und Neumundtiere (unterer Kasten). Die vorhergesagte (POLYVIEW-2D) α -Helices-Architektur ist vereinfacht dargestellt. Pfeile geben alternative Spleißstellen an (gestrichelt = potenziell; durchgezogen = EST-bestätigt). Die Existenz einer potenziellen NLS ist indiziert. **B)** Fische besitzen neben *bag6* auch *bag6l* (ensembl.org), wobei beide alternativ gespleißt werden können (siehe ensembl.org). Aufgeführt sind die vorhergesagten NLS-Stärken (cNLS mapper; Kosugi et al., 2009) von BAG6 und BAG6L mit (+ex24) bzw. ohne (Δ ex24). Hervorgehoben sind NLS-Stärken, die zu einer deutlichen Kernakkumulation führen könnten.

Aus der evolutionären Betrachtung der BAG-Domänen-Architektur von BAG6 ergibt sich, wie konserviert und damit essentiell die Modulierbarkeit der BAG6 BAG-Domänen-Architektur durch alternatives Spleißen ist. Betrachtet man die Exon-Struktur und ESTs weiterer Vertreter der humanen BAG-Proteinfamilie, fällt auf, dass neben BAG6 auch alternatives Spleißen bei BAG1 und BAG5, eventuell bei BAG4, stattfinden könnte (ensembl.org). Genauere Charakterisierungen, wie sich einzelne Spleißvarianten in ihrer Funktion

unterscheiden, gibt es aber bisher nur für BAG1 (Yang et al., 1998 und Nollen et al., 2000). Damit eröffnet sich ein weites Feld von Forschungsansätzen, die insbesondere den Zusammenhang zwischen diversen Erkrankungen und Vertretern der BAG-Proteinfamilien aufdecken könnten.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte, Materialien und Reagenzien

4.1.1 Allgemeine Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer	Renner, Darmstadt
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoradiographiekassetten	Faust GmbH, Köln
BD Acurri C6 Durchflusszytometer	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop AE31, Objektive: Los PH 20x, H PH 60x	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Axiophot, Objektive: Plan-APOCHROMAT (63x, Öl), Ph3 Plan-Neoflurat (100x, Öl)	Zeiss, USA
Geldokumentations-Apparatur	Cybertech, Berlin
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf GmbH, Hamburg
Kompaktschüttler KS 15 & Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Kühlschrank	Liebherr, Bieberrach a.d. Riss
Laborwippe Rocking Platform	Biometra, Göttingen
Mikroliterpipetten	Labsystems, Finnland
Mikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
Mikrowellenherd Micromat	AEG Hausgeräte, Berlin
Netzgeräte	Renner, Darmstadt
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
pH-Meter inoLab pH730	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Proteinelektrophoresekammer Semidry Blotting Apparatur	cti, Idstein
Sicherheitswerkbank	Steag, Pfullingen
Testtube Rotator	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Thermocycler MyCyclerTM	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
Tiefkühltruhe (-80 °C)	Forma 900 Series Thermo Scientific, USA
UV-Transluminator	Bachofer, Reudingen
Vortex Genie 2	Bender & Holbein, Zürich, Schweiz
Wasserbad Julabo 12B	Julabo Labortechnik GmbH, Houston, USA

4.1.2 Zentrifugen

Zentrifuge Biofuge 22R	Heraeus, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Centrifuge Z 200 M/H	HERMLE Labortechnik, Wehingen
Zentrifuge J-20HS	Beckmann, Hamburg
Zentrifuge L8M	Beckmann, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Zürich, Schweiz
Zentrifuge OptimaTM TL 100 Ultracentrifuge	Beckmann, Hamburg
Zentrifuge Qualitron DW-41 Micro-Centrifuge	Artisan Scientific Corporation, Champaign, USA
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus, Zürich, Schweiz

4.1.3 Materialien

Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalspritzen und -kanülen	VWR, Darmstadt
Einweghandschuhe Nitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einweghandschuhe Rotiprotect	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme	Agfa-Gaevert, Leverkusen
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gel-Blotting Filterpapier	GE Healthcare, Freiburg
Glasflaschen und -gefäße	Schott AG, Mainz
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
MicroAmpR	Applied Biosystems, USA
Multiwellgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Freiburg
Objektträger SuperFrost	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Papiertücher "Tissue Box"	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Parafilm,	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 13 ml, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2 ml	Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA
Röntgenfilme	Cronex 5
Zellkulturflaschen und -schalen	Sarstedt, Nümbrecht

4.1.4 Reagenzien und Medien

30 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar-Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Lonza, Basel, Schweiz
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg
Ammoniumpersulfat	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitoren	Roche, Basel, Schweiz
DAPI	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (4,5 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
dNTPs	Gene Craft, Ares Biosciences GmbH, Köln
Dulbecco's PBS (1x)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FCS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Fluoromount G	Affymetrix, Santa Clara, USA
G418, Geneticin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
LB broth	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Leptomycin B	Axxora, Lörrach
Leptomycin B	Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA
MEM Minimum Essential Medium (mit EBSS, ohne L-Glutamin, 2.2 g/L NaHCO ₃)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MG132	Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Polyethylenimin "Max" (Pei Max)	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim
Protein A-Sepharose™ CL-4B	GE Healthcare, Freiburg
Protein-Marker III (Prestained)	VWR International GmbH, Darmstadt
Protein-Marker IV (Prestained)	VWR International GmbH, Darmstadt
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Roti-Block (10x)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti-Immunoblock (10x)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti-Load DNA 6x	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS-PAGE Probenpuffer (Roti-Load 1, 4x)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

4.1.5 Enzyme

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzyme (diverse)	Thermo Scientific, USA
RevertAid Reverse Transcriptase	Thermo Scientific, USA
RNase A	New England BioLabs, Ipswich, USA
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Darmstadt
Taq DNA Polymerase	Genecraft, Ares Biosciences GmbH, Köln

4.1.6 Kommerzielle Kits

GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
GeneJET Genomic DNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Basel, Schweiz
NucleoBond _R Plasmid-Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren
pcDNA TM 3.1/V5-His-TOPO _R TA Expression Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA

4.1.7 Antikörper

Tabelle 1: Primär-Antikörper

Antikörper	Quelle/Referenz
Actinin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Aktin	AC-40, Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA
Anti-ex24 (BAG6)	Polyklonaler anti-BAG6 Antikörper; Antigensequenz: SDAYLSGMPAKRRKTMQGEQPQLLLSEAVSRAAKAAGARPLTSPELSRD LEAPEVQESYRQQLRSDIQKRLQEDPNYS; Atlas Antibodies, Bromma, Schweden
Arl13b	AG Gruß, Institut für Genetik, Bonn
E-Cadherin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
EpCAM	HEA125, G. Moldenhauer (DKFZ, Heidelberg)
ERM	Cusabio, Huston, USA
H3K27me3	Novus Biologicals, Abingdon, UK
Hsp70	W27, Biolegend, San Diego, USA
Intergrin β 1	TS2/16, Biolegend, San Diego, USA
Moesin	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
N-Cadherin	8C11, Biolegend, San Diego, USA
p300	AbD Serotec, Puchheim
Pan BAG6	Polyklonaler anti-BAG6 Antikörper; Antigensequenz: RKVKPQPPLSDAYLSGMPAK (Desmots et al.2005)
PPP4C	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Profilin1	AG Witke, Institut für Genetik, Bonn
S100a	Biolegend, San Diego, USA
Septin	Biolegend, San Diego, USA
SRSF2	Novus Biologicals, Abingdon, UK
SRSF5	AAT Bioquest, Sunnyvale, USA
Syndecan	MI15, Biolegend, San Diego, USA
Tubulin acetyliert	15G10, Biolegend, San Diego, USA
β -Catenin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
β -Tubulin	YOL 1/34, G. Moldenhauer (DKFZ, Heidelberg)
γ -Tubulin	14C11, Biolegend, San Diego, USA

Tabelle 2: Sekundär-Antikörper

Antikörper	Quelle
anti-Kaninchen IgG Ziege Alexa Fluor488	Invitrogen, Darmstadt
anti-Kaninchen IgG Ziege Alexa Fluor594	Invitrogen, Darmstadt
anti-Kaninchen IgG Ziege POD-gekoppelt	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG Ziege Alexa Fluor488	Invitrogen, Darmstadt
anti-Maus IgG Ziege Alexa Fluor594	Invitrogen, Darmstadt
anti-Maus IgG Ziege POD-gekoppelt	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG Ziege Alexa Fluor488	Invitrogen, Darmstadt
anti-Ratte IgG Ziege POD-gekoppelt	Dianova, Hamburg

4.1.8 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete bzw. hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pcDNA 3.1/V5-His-TOPO TA	linearisierter Vektor für TOPO TA-Klonierung	Invitrogen, Darmstadt
pEGFP-actin	Expressionsvektor mit EGFP-Aktin	AG Witke
pEGFP-BAG6 Δ 11b	cDNA BAG6 (Δ ex11b und +ex24) in pEGFP-N1	AG Koch
pEGFP-C1	Expressionsvektor mit EGFP-Tag	Clontech (now Takara Bio USA, Inc.)
pEGFP-N1	Expressionsvektor mit EGFP-Tag	Clontech (now Takara Bio USA, Inc.)
pL-EF1a Cas9-IRES-BAG6 KO	CRISPR/Cas-Plasmid für BAG6 KO (tgactctcaaactcgtacc (agg))	AG Koch
pL-EF1a Cas9-IRES-Blasticidin U6-gRNA empty N19-Swal	Expression von Cas9-NLS unter EF1 α -Promotor und sgRNA unter U6-Promotor	Dr. Thomas Zillinger, Universität Bonn, Institut für Klinische Chemie und klinische Pharmakologie
pmCherry-BAG6 Δ 11b,24-TMQ	Mutation der ersten Aminosäuren in ex25 (LRS \rightarrow TMQ)	AG Koch
pmCherry-BAG6 Δ 11b-LRS	Mutation der ersten Aminosäuren in ex24 (TMQ \rightarrow LRS)	AG Koch
pmCherry-BAG6fl	vollängen cDNA BAG6 (+ex11b und +ex24) in pmCherry-C1	AG Koch
pmCherry-BAG6 Δ 11b	cDNA BAG6 (Δ ex11b und +ex24) in pmCherry-C1	AG Koch
pmCherry-BAG6 Δ 11b,24	cDNA BAG6 (Δ ex11b und Δ ex24) in pmCherry-C1	AG Koch
pmCherry-BAG6 Δ 24	cDNA BAG6 (+ex11b und Δ ex24) in pmCherry-C1	AG Koch

pmCherry-BAG6 Δ 24NESdel	cDNA BAG6 (+ex11b und Δ ex24) in pmCherry-C1 mit deletierter NES	AG Koch
pmCherry-BAG6 Δ 24NESmut	cDNA BAG6 (+ex11b und Δ ex24) in pmCherry-C1 mit mutierter NES	AG Koch
pmCherry-C1	Expressionsvektor mit mCherry-Tag	Clemens Rottner
pmCherry-ex24sensorSTOPP-EGFP-SNPsC/A	BAG6 ex24 Spleißsensor mit SNPs C/A	AG Koch
pmCherry-ex24sensorSTOPP-EGFP-SNPsC/G	BAG6 ex24 Spleißsensor mit SNPs C/G	AG Koch
pmCherry-ex24sensorSTOPP-EGFP-SNPsT/A	BAG6 ex24 Spleißsensor mit SNPs T/A	AG Koch
pmCherry-ex24sensorSTOPP-EGFP-SNPsT/G	BAG6 ex24 Spleißsensor mit SNPs T/G	AG Koch

4.1.9 Bakterienstämme

Tabelle 4: *E. coli*-Stämme für Klonierungen

DH5 α	F-endA1 glnV44 thi-1 recA1 RelA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80lacZDM15 D(lacZYA-argF)U163, hsdR17 (r k-m k+), λ -
One Shot TOP10 (Invitrogen)	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC] Φ 80dlacZDM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

4.1.10 Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete bzw. hergestellte Zelllinien

Zelllinie	Quelle/Referenz
DCs (humane, primäre Dendritische Zellen)	Dermatologie, Bonn
HEK (menschliche, embryonale Nierenzellen-Zelllinien; <i>Human embryonic kidney</i>)	Shein und Enders, 1962
HEK wt + mCherry-BAG6 Δ 24	AG Koch
HEK wt + mCherry-BAG6+24	AG Koch
HEK wt + mCherry-BAG6 Δ 24NESdel	AG Koch
HEK wt + mCherry-BAG6 Δ 24NESmutl	AG Koch
IMR90S (Fibroblasten-artige Zelllinie)	Coriell Institute, NY, USA
IMR90S BAG6 KO	AG Koch
IMR90S BAG6 KO + BAG6+24-EGFP	AG Koch
IMR90S BAG6 KO + ex24sensorSTOPP-EGFP-SNPsC/A	AG Koch
IMR90S BAG6 KO + ex24sensorSTOPP-EGFP-SNPsC/G	AG Koch
IMR90S BAG6 KO + ex24sensorSTOPP-EGFP-SNPsT/A	AG Koch
IMR90S BAG6 KO + ex24sensorSTOPP-EGFP-SNPsT/G	AG Koch
IMR90S BAG6 KO + mCherry-BAG6+24	AG Koch
IMR90S BAG6 KO + mCherry-BAG6 Δ 24	AG Koch
IMR90S wt + BAG6 Δ 11b-EGFP	AG Koch
IMR90S wt + mCherry-BAG6fl	AG Koch
IMR90S wt + mCherry-BAG6 Δ 11b	AG Koch
IMR90S wt + mCherry-BAG6 Δ 11b, Δ 24	AG Koch
IMR90S wt + mCherry-BAG6 Δ 24	AG Koch
MCF (Brustkrebs-Zelllinie)	Soule et al., 1973
MCF BAG6 KO	AG Koch
MCF BAG6 KO + BAG6+24-EGFP	AG Koch
MCF BAG6 KO + mCherry-BAG6+24	AG Koch
MCF BAG6 KO + mCherry-BAG6 Δ 24	AG Koch
MDA (Brustkrebs-Zelllinie)	Cailleau et al., 1974
MDA BAG6 KO	AG Koch
U937 (Monozyten-artige Zelllinie)	Sundström und Nilsson, 1976

4.1.11 Datenbanken und Software

Tabelle 6: Verwendete Datenbanken und Software

Beschreibung	Name
Basic Local Alignment Search (BLAST)	BLAST blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
Bildbearbeitung	ImageJ imagej.nih.gov/ij
Datenbank	Malacards malacards.org
Datenbank	GeneCards genecards.org
Datenbank (SNPs, ESTs)	NCBI .ncbi.nlm.nih.gov
FACS-Daten Analyse	CFlow Plus (BD)
Genome Browser	Ensembl ensembl.org
Mutations-Primerdesign	SDM-Assist (Karnik et al., 2013)
NES Vorhersage	NetNES cbs.dtu.dk/services/NetNES
NLS Vorhersage	cNLS mapper nls-mapper.iab.keio.ac.jp
Primerdesign	Tm Calculator tmcalculator.neb.com
Restriktionsverdau-Planung	NEBcutter V2.0 nc2.neb.com/NEBcutter2
Restriktionsverdau-Planung	DoubleDigest Calculator (Thermo Scientific)
Sequenzalignment	MUSCLE ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle
Sequenzalignment	BioEdit mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit
sgRNA-Design	MIT CRISPR (crispr.mit.edu; Hsu et al., 2013)
Spleiß-Motiv Vorhersage	SpliceAid2 193.206.120.249/splicing_tissue

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Zelllinien

HEK-, IMR90S-, MCF- und MDA-Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Zellkulturmedium diente DMEM-Medium (HEK-, MCF- und MDA-Zellen) bzw. MEM (IMR90S-Zellen) mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin.

4.2.2 Zellwachstum bei verschiedenen Zelldichten

Zur Untersuchung von zell-dichteabhängigen Veränderungen wurden Zellen in sechs verschiedenen Verdünnungen (2 bzw. 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05 x 10⁶ Zellen/10ml Medium) in 10cm-Kulturschalen für fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden Glasdeckgläschen zur Immunfluoreszenzfärbung bzw. die Zellen für SDS-PAGE und Westernblot entnommen.

4.2.3 Genomische DNA Isolation

Genomische DNA zur Herstellung der Spleißsensor-Konstrukte wurde mit Genomic DNA Purification Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.2.4 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Zur RNA-Isolation wurden der High Pure RNA Isolation Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. In Kürze wurde jeweils das Lysat von 1 x 10⁶ Zellen und mittels Zentrifugation an ein Filter-Röhrchen gebunden, ungewollte DNA durch eine DNase I-Inkubation abgebaut und die verbleibende RNA durch mehrere Waschschrirte aufgereinigt. Die von den Filter-Röhrchen eluierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

4.2.5 cDNA-Herstellung

Zur Analyse von zellulärer mRNA mittels PCR muss diese zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mittels reverser Transkription. Bei der Erststrang-Synthese wird die RNA durch Hitzedenaturierung geöffnet, damit sich DNA-Primer anlagern können. Die Reverse-Transkriptase verlängert die Primer des so entstandenen RNA-DNA-Hybriden zu einem für die PCR-geeigneten DNA-Template.

Zur Herstellung von cDNA wurde die RevertAid Reverse Transcriptase nach Angaben des Herstellers verwendet. In Kürze wurden 1 µg zuvor isolierte Gesamt-RNA mit anchored Oligo(dT)18 Primer bei 65 °C für 5 min inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit Reaktions-Puffer,

RiboLock RNase Inhibitor, dNTP-Mix und RevertAid Reverse Transcriptase versetzt. Die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für 1 h im Thermo-Cycler. Die erzeugte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.2.6 PCR (Polymerase Ketten-Reaktion)

Die PCR wird genutzt um DNA-Sequenzen mittels hitzestabiler DNA-Polymerasen zu vervielfältigen. Dabei dienen sequenzspezifische, revers-komplementäre Oligonukleotide (Primer) als Ausgangspunkt der DNA-replizierenden Kettenreaktion entlang der Zielsequenz (Template).

Zur PCR wurde die Q5 High-Fidelity DNA Polymerase bzw. die Taq DNA Polymerase nach Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet. In Kürze wurde die PCR-Reaktion mit Reaktions-Puffer, dNTP-Mix, dem sequenzspezifische Primer-Paar, dem DNA-Template und der DNA Polymerase angesetzt. Der PCR-Prozess erfolgte im Thermo-Cycler: initiale Denaturierung (98 °C, 30 s), 35 Zyklen mit Denaturierung (98 °C, 10 s), Primer-Hybridisierung (Primer-spezifische Temperatur, 30 s) und Elongation (72 °C, 30 s/kb für die Q5 DNA Polymerase und 60 s/kb für die Taq DNA Polymerase), abschließende Elongation (72 °C, 2 min). Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung wurde mit dem Tm Calculator (tmcalculator.neb.com) bestimmt.

4.2.7 qPCR

Die qPCR (quantitative PCR) dient der Quantifizierung von DNA. In dieser Arbeit wurde mit dieser Methode die relative Menge von BAG6-Spleißvarianten in cDNA-Proben bestimmt. Die PCR-Reaktion entsprach dem Standard-Protokoll.

Zum der Nachweis der jeweiligen BAG6-Spleißvariante wurden folgende Primer verwendet: +ex22/+ex24 5' – ctg agc ctc agc ggg aga atg – 3' (*forward primer*) und 5' – cctg ca tcg tct tgc gtc tct tg – 3' (*reverse primer*); +ex22/Δex24 5' – ctg agc ctc agc ggg aga atg – 3' (*forward primer*) und 5' – gac cgg agc ttg cgt ctc ttg – 3' (*reverse primer*); Δex22/+ex24 5' – ctga gcc tca gga atg ggt cc – 3' (*forward primer*) und 5' – cctg ca tcg tct tgc gtc tct tg – 3' (*reverse primer*); Δex22/Δex24 5' – ctg agc ctc agg aat ggg tcc – 3' (*forward primer*) und 5' – gac cgg agc ttg cgt ctc ttg – 3' (*reverse primer*).

4.2.8 Bakterienkultur

Zur Klonierung und Propagierung von Plasmiden dienten *E. coli* DH5 α bzw. TOP10-Bakterien. Die Bakterien wurden in LB-Medium bei 37 °C im Schüttler bei >200 rpm bzw. im Brutschrank kultiviert. Bakterien mit Antibiotika-resistenten Plasmiden wurden mit 100 μ g/ml Ampicillin bzw. 50 μ g/ml Kanamycin kultiviert.

4.2.9 Transformation von *E. coli*-Bakterien

Chemisch kompetente DH5 α -Bakterien zur Aufnahme von Plasmiden wurden mittels der Calciumchlorid-Methode (Dagert und Ehrlich, 1979) hergestellt und bei -80 °C gelagert. Für die eigentliche Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf Eis für 30 min mit dem zu transfizierendem Plasmid inkubiert (maximal 1/10 des Bakterienvolumens). Die Plasmid-Aufnahme erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Nach Zugabe von LB-Medium ohne Antibiotika für 1 h bei 37 °C im Schüttler wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Nach Inkubation im Brutschrank über Nacht wurden von den selektionierten Bakterienklonen Flüssigkulturen angeimpft.

4.2.10 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Bakterien

Die Isolation von in *E. coli* propagierten Plasmiden im kleinen Maßstab wurde mittels alkalischer Lyse und Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurden 2 ml Übernachtskultur abzentrifugiert, in 200 μ l Resuspendierungs-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4) aufgenommen, mit 300 μ l Lyse-Puffer (0.2 M NaOH / 1 % SDS) aufgeschlossen und diese Reaktion mit 400 μ l Neutralisierungs-Puffer (7,5 M NH₄Ac) gestoppt. Zelldedritus und genomische DNA wurden anschließend abzentrifugiert (16 000 g, 15 min) und die Plasmid-DNA im Überstand mit 500 μ l Isopropanol gefällt und erneut abzentrifugiert. Das erhaltene Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O eluiert.

Die Isolation von in *E. coli* propagierten Plasmiden im großen Maßstab wurde das Nucleo-Bond PC 100 Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Plasmid-Aufreinigung erfolgt hier über einen Anionen-Austauscher.

4.2.11 Restriktionsverdau

Zum Restriktionsverdau wurden Restriktions-Enzyme der Firma Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei Erfolgte der Verdau zuweist bei 37 °C über Nacht. Im Fall eines Doppelverdau wurden die Reaktions-Bedingungen mittels DoubleDigest Calculator bestimmt.

4.2.12 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Analyse und Präparation von PCR-Produkten bzw. Plasmiden wurden Agarose-TAE-Gele (0,8 – 2 % Agarose) mit 20 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Nach Größenauftrennung der DNA bei 10 V/cm wurden Ethidium-gefärbte DNA-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und bei Bedarf ausgeschnitten.

4.2.13 Plasmid-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Plasmid-Extraktion wurde das gewünschte PCR-Produkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem GeneJET Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers eluiert. In Kürze wurde das Gelstück in Binde-Puffer bei 60 °C gelöst und auf ein Aufreinigungs-Röhrchen gegeben. Nach mehreren Waschschritten wurde die gebundene DNA mit 65 °C warmen H₂O von den Röhrchen durch Zentrifugation eluiert.

4.2.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die Ligation werden kompatible DNA-Enden durch eine enzymkatalytische Reaktion miteinander verbunden. Die Ligase bildet dabei eine Phosphodiester-Bindung zwischen dem 3'-Hydroxy-Ende der einen und dem 5'-Phosphat-Ende der anderen DNA.

Die Ligation wurde mit einer T4 DNA Ligase nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In Kürze wurden 100 ng linearisierter Vektor und Insert, im molaren Verhältnis 1:5, mit T4 DNA Ligase-Puffer und 1 U T4 DNA Ligase bei 21 °C für 1 h inkubiert und anschließend direkt in kompetente Bakterien transformiert.

4.2.15 Erzeugung von fluoreszenzmarkierten *bag6*-Konstrukten

Zur Erzeugung von fluoreszenzmarkierten *bag6*-Konstrukten wurde zunächst die jeweilige BAG6-Spleißvariante mittels PCR aus Plasmid-Templates amplifiziert. Für fluoreszenzmarkierte Spleißvarianten wurden folgende Primer benutzt: 5' – aat tag atc tat gga gcc taa tga tag tac cag tac – 3' (*forward primer*) und 5' – aat agt cga caa ctt agg atc atc agc aaa ggc – 3' (*reverse primer*). Mittels der eingefügten Restriktionsschnittstellen wurde das BAG6-Insert nach BglII- und Sall-Verdau N-terminal in den pmCherry- bzw. C-terminal pEGFP-Vektor ligiert. Das verwendete BAG6 Vollängen-Konstrukt besitzt dabei 1162 aa. Der Δex24-Spleißvarinate fehlt davon aa 1083 – 1131.

4.2.16 Mutations-PCR

Die gezielte Mutation von DNA-Sequenzen in Plasmiden wird mittels PCR und Primern, welche die gewünschte Mutation enthalten, durchgeführt. Anschließend wird das Template-Plasmid ohne gewünschte Mutation durch einen DpnI-Verdau zerstört. DpnI verdaut nur methylierte DNA direkt aus Bakterien, nicht aber durch PCR-amplifizierte DNA.

Das Mutation-Primerdesign erfolgte mit dem Programm SDM-Assist (Karnik et al., 2013). Das verwendete PCR-Protokoll entspricht im Grunde dem Q5-PCR-Protokoll mit ein paar Modifikationen. Zunächst wurden zwei getrennte PCR-Reaktionen mit der doppelten Menge nur eines der beiden Mutations-Primer für 20 Zyklen bei niedriger Primer-Hybridisierungstemperatur durchgeführt. Die Elongationszeit entspricht dabei der Plasmidgröße. Anschließend wurden beide PCR-Reaktionen gemischt und eine Zweistufen-PCR (ohne Hybridisierungsschritt) mit 30 Zyklen durchgeführt. Danach wurden in 50 µl PCR-Reaktion 10 U DpnI gegeben (ohne weiteren Puffer) und bei 37 °C über Nacht verdaut. Nach Transformation der mutierten Plasmide in kompetente Bakterien wurde die Mutation mittels Sequenzierung verifiziert.

4.2.17 NES-Mutation bzw. -Deletion von BAG6

Mutation bzw. Deletion der NES (Nukleare Exportsignal) in BAG6 wurde auf Basis des zytosolischen mCherry-BAG6- Δ ex24-Konstrukts durch Mutations-PCR mit Q5 DNA Polymerase durchgeführt. Für die Mutation wurden folgende Primer für zusätzliche Einfügung einer stummen XbaI-Schnittstelle verwendet: 5' – tcc agg agg tac agc ggg tgg agt cta gag tccagc cct tct tg – 3' (*forward primer*); 5' – ggg ctg gac tct aga ctc cac ccg ctg tac ctc ctg gag cac ctc – 3' (*reverse primer*). Dadurch wurde die potenzielle NES mit LeqLqrLesrLqpfLqryyevL mutiert in LeqVqrVesrVqpfLqryyevL. Für die Deletion wurde die komplette NES mittels PCR deletiert.

4.2.18 Konstruktion von BAG6 NLS-Mutanten

BAG6 NLS-Mutanten wurden durch Mutations-PCR hergestellt. Wobei der Nukleotidaustausch für die benötigte Mutation auf Aminosäure-Ebene (LRS→TMQ für BAG6 Δ ex24 bzw. TMQ→LRS für BAG6 +ex24) der jeweiligen wildtypischen Sequenz entsprach.

4.2.19 Konstruktion von *bag6* ex24-Spleißsensor-Konstrukts

Das *bag6* ex24 Spleißsensor-Konstrukt besteht aus der genomischen Sequenz des humanen *bag6* von Beginn von Exon 23 bis Ende von Exon 25 mit den dazwischen liegenden Introns, einem N-terminalem mCherry-, einem C-terminalem EGFP-Tag sowie einem künstlich

eingefügtem Stopp-Kodon in ex24. Das entsprechende Fragment wurde aus IMR90S DNA mittels eines *forward primers* mit zusätzlicher Sall-Schnittstelle (5' – ata gtc gac gaa tgg gtc cct att atc cag cag – 3') und eines *reverse primers* mit zusätzlicher Agel-Schnittstelle (5' – taa acc ggt gga gga tca tca gca aag gcc c – 3') durch PCR amplifiziert und in den pmCherry-C1-Vektor kloniert. Durch einen Restriktionsverdau mit VspI und BamHI wurde das mCherry-ex23-ex25-Fragment ausgeschnitten und anschließend in den pEGFP-N1-Vektor kloniert. Das Stopp-Kodon wurde durch Mutation-PCR eingefügt (5' – agc ccc taa agc ctg agc cgg g – 3' (*forward primer*) und 5' – ggc tca ggc tta ggg gct cgt ca – 3' (*reverse primer*)). Aus der IMR90S-Zelllinie wurde ein Konstrukt mit SNP *rs750332* hergestellt, aus der MCF-Zelllinie ohne. Der natürlich vorkommende SNP *rs743400* wurde zusätzlich durch Mutation-PCR eingefügt (5' – att tga cag cgt gct tgg ggg g – 3' (*forward primer*) und 5' – ccc caa gca cgc tgt caa ata gcc – 3' (*reverse primer*)). Stabile Zelllinien auf IMR90S wt-Basis wurden für alle Spleißsensor-Varianten durch G418-Selektion erzeugt.

4.2.20 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde Polyethylenimine Max (PEIMax) verwendet. PEIMax ist eine vollständig hydrolysierte, hydrochloride Salzform von Polyethylenimine und bildet nach Bindung an die zu transfizierende DNA positiv-geladene Partikel, die von Zellen aufgenommen werden können.

Für die Transfektion im 6-well-Format wurden zunächst 1 µg Plasmid-DNA und 3 µl PEIMax in jeweils 50 µl 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Für die Transfektion einer 10cm-Zellkultur-Schale wurden zunächst 3 µg Plasmid-DNA und 12 µl PEIMax in jeweils 150 µl 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Nach Zugabe der PEIMax-Lösung zur Plasmid-DNA-Lösung wurde gevortext, die Lösung für 20 min inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft.

Die zu transfizierenden Zellen wurden zuvor mit Trypsin-EDTA gelöst und die benötigte Zellzahl in frischem Medium ausgesät. Nach einer Transfektion über Nacht wurde das Zellmedium gewechselt.

4.2.21 Erzeugung von stabilen Zelllinien

Zur Erzeugung stabiler Zelllinien wurden Zellen zunächst über Nacht mit PEIMax transfiziert und anschließend das Medium gewechselt. Nach zwei Tagen wurden die transfizierten Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst und in verschiedenen Verdünnungsstufen unter benötigtem Selektionsdruck neu ausgesät. Im Falle eines Plasmids mit Neomycin-Resistenz wurden 500 µg/ml G-418 zugegeben. Einzelzellklone wurden durch "begrenzende Verdünnung" (*limiting*

dilution) in eine 96-well-Platte hergestellt und schließlich mittels Westernblot bzw. Immunfluoreszenzfärbung verifiziert.

4.2.22 Erzeugung eines BAG6 "knock outs" (KO)

Ein somatischer BAG6 KO wurde mittels des von dem adaptiven, antiviralen Abwehrmechanismus von Bakterien entlehntem CRISPR/Cas-System hergestellt. Dabei wird ein Plasmid das für die Cas9-Endonuklease und eine sgRNA (*small guide RNA*) kodiert in den Zielzellen exprimiert. Die sgRNA bringt die Endonuklease zu einem spezifischen DNA-Abschnitt, dort wird die DNA geschnitten, es kommt möglicherweise zu einer *non-homologous end joining* (NHEJ) DNA-Reparatur und einem Verschieben des Leserasters, wodurch kein funktionelles Vollängen-Protein mehr entstehen kann.

Die sgRNA-Sequenz für *bag6* (tgg act ctc aaa ctc gta cc (agg)) liegt in BAG6 Exon 2 und wurde mit dem sgRNA-Zielsequenz-Programm MIT CRISPR (crispr.mit.edu; Hsu et al., 2013) designt. Die passende DNA-Sequenz wurde als Oligonukleotid bestellt, in den pL-EF1a Cas9-IRES-Blasticidin U6-gRNA empty N19-Swal-Vektor nach restriktionsenzymatischen Verdau mit Swal ligiert und in Bakterien transformiert. Der verwendete pL-EF1a Cas9-IRES-Blasti, U6-gRNA empty N19-Swal-Vektor sowie die Materialien zur Klonierung wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Zillinger (Universität Bonn, Institut für Klinische Chemie und klinische Pharmakologie, AG Barchet) bereit gestellt. Die Plasmid-Propagation erfolgte unter Ampicillin-Selektion. Nach Transfektion des BAG6 KO-Plasmids in die Zielzellen, begann die Selektion mit 10 µg/ml Blasticidin an Tag zwei für fünf Tage. Einzelzellklone wurde durch "begrenzende Verdünnung" (*limiting dilution*) in eine 96-well-Platte hergestellt und schließlich mittels Westernblot bzw. Immunfluoreszenzfärbung verifiziert. Die Herstellung der BAG6 KO-Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Carmen Giesen (AG Koch), wobei unterschiedliche Zielsetzungen zur Verwendung der Zellen bestanden.

4.2.23 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst, und die Trypsinisierung mit FCS-haltigem Zellkultur-Medium gestoppt. Die Zellzahl wurde fall nötig mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer angeglichen und das Zellpellet nach Zentrifugation (250 g, 5 min) mit eiskaltem PBS gewaschen. Bis zur eigentlichen Lyse wurden die Zellpellets bei -20 °C gelagert. 1×10^6 Zellen wurden in 100 µl Lyse-Puffer (0,5 % Triton X-100 in PBS mit Complete Protease Inhibitor Cocktail) auf Eis für 1 h lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (16 000 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit reduzierendem Roti-Load DNA Puffer versetzt und bei 98 °C für 5 min gekocht.

4.2.24 Reduzierende SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Laemmli wird genutzt um Proteine aus einem Gemisch allein nach ihrer Größe aufzutrennen. Durch denaturierende Bedingungen und eine Maskierung der Protein-Eigenladung durch SDS bewegen sich die Proteine allein abhängig von ihrer Größe im elektrischen Feld.

Die Auftrennung der Proteinproben in Roti-Load DNA erfolgte in Polyacrylamid-Gelen (Sammelgel: 0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 4 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,05 % APS, 0,1 % TEMED; Trenngel: 0,38 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 7,5 bzw. 12 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,05 % APS, 0,1 % TEMED) mit einem Tris-Glycin-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) in einem Mini-Gel-System. Die Proben wurden bei konstanter Spannung von 60 V in das Trenngel laufen gelassen und dann weiter bei 90 V.

4.2.25 Westernblot und Antikörperfärbung

Nach der Proteinauftrennung durch SDS-PAGE wurde das Acrylamidgel in Transfer-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin) 5 min äquilibriert und durch einen Semidry-Elektroblot bei 1,2 mA/cm² für 75 min auf Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde in Roti-Block bei 4 °C über Nacht blockiert. Die Primärantikörperfärbung erfolgte bei RT für 1 h gefolgt von drei 10 min Waschschritten (TBS-T-Puffer; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20). Die Färbung mit dem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper erfolgte bei RT für 1 h gefolgt von drei 10 min Waschschritten. Die Nachweisreaktion erfolgte mit dem Chemilumineszenzsubstrat ECL. Das Signal wurde auf Röntgenfilmen aufgenommen.

4.2.26 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient, neben dem Nachweis, auch der Lokalisationsbestimmung von Proteinen innerhalb von Zellen. Zu diesem Zweck wurden Zellen unter den benötigten Bedingungen auf sterilen Glasdeckgläschen kultiviert und am Ende des Experiments fixiert. Zur Fixierung wurde 4 % Paraformaldehyd in PBS pH 7,4 bei RT für 15 min verwendet, mit Ausnahme von Mikrotubuli-abhängigen Färbungen, für die eine Lösung aus 50 % Methanol und 50 % Aceton bei -20 °C für 5 min verwendet wurde. Im Fall der PFA-Fixierung folgte eine Permeabilisierung mit 0,5 % Triton X-100 in PBS bei RT für 10 min. Die Blockierung erfolgte in Roti-Immunoblock bei 4 °C über Nacht. Die Primärantikörperfärbung erfolgte bei RT für 1 h gefolgt von drei 10 min Waschschritten in PBS. Die Färbung mit den Alexa-fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper erfolgte bei RT für 1 h gefolgt von drei 10 min Waschschritten, wobei beim letzten DAPI zugegeben wurde.

Anschließend wurden die gefärbten Präparate mit Fluoromount G auf Objektträgern eingedeckelt.

4.2.27 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchfluss-Zytometrie

Die Durchfluss-Zytometrie erlaubt die Fluoreszenz- sowie Größen- und Granularitäts-Messung von einzelnen Zellen. Zur Bestimmung der relativen Zellgröße und -granularität wurden lebende Zellen eingemessen. Ansonsten wurden zur Immunfluoreszenzfärbung mit Trypsin-EDTA-gelöst, mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA in PBS pH 7,4 bei RT 15 min in FACS-Röhrchen fixiert. Es folgte eine Zentrifugation (250g, 5 min) und eine Permeabilisierung mit 0,5 % Triton X-100 in PBS bei RT für 10 min. Die Blockierung erfolgte in Roti-Immunoblock für bei RT für 30 min. Die Primärantikörperfärbung erfolgte bei RT für 1 h gefolgt von drei 10 min Waschschritten in PBS. Die Färbung mit den Alexa-fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper erfolgte bei RT für 1 h gefolgt von drei 10 min Waschschritten. Ausgewertet wurden die Daten mit Flowing Software 2. Für eine Messung wurden mindestens 10.000 Zellen ausgewertet.

4.2.28 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation werden durch Antikörper gegen das Protein von Interesse Protein-Komplexe aus Zelllysaten aufgereinigt, die dieses Protein enthalten.

Dazu wurde zunächst 1 µg des Antikörpers an 10 µl Protein-A-Sepharose gebunden und mit mindestens 200 µl Zelllysate bei 4 °C unter ständiger Bewegung über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Antikörper-Antigenkomplexe abzentrifugiert (300 g, 3 min) und dreimal mit eiskaltem Wasch-Puffer (0,1 % Triton X-100 in PBS) gewaschen. Die Protein-Eluation erfolgte in 2x reduzierendem Roti-Load DNA bei 98 °C für 10 min.

4.2.29 "Hanging drop assay"

Für den "Hanging drop assay" wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst und gezählt. Jeweils 10.000 Zellen wurden in 10 µl des entsprechenden Zellkultur-Mediums auf die innere Seite eines sterilen Zellkulturschalen-Deckel getropft, kopfüber auf eine mit PBS gefüllte Schale gesteckt und für den angegebenen Zeitraum kultiviert. Durchgeführt wurde der Versuch in mindestens sechs technischen und drei biologischen Replikaten.

4.2.30 "Soft agar assay"

Der "Soft agar assay" wurde in Triplikaten im 6-well-Platten durchgeführt. Je 6-well wurden 1,5 ml einer 1 % Agarose-Lösung in entsprechendem Zellkulturmedium durch aufkochen hergestellt. 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin wurden erst in die erkaltende Lösung kurz vor dem Gießen in das 6-well zugefügt. Nach Erkalten der unteren Agarose-Lösung, wurden je 6-well 1,5 ml einer 0,6 % Agarose-Lösung in entsprechendem Zellkulturmedium hergestellt und nach Zugabe von 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin bei $\leq 40^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad aufbewahrt. In gleichem Volumen Medium wurden 6 700 Zellen/ml angesetzt und mit der Lösung aus dem Wasserbad gemischt. Je 1,5 ml der Agarose-Zell-Lösung wurden je 6-well auf die erkaltete, untere Agarose-Lösung gegeben. Nachdem auch diese im Zellkultur-Schrank erhärtet war wurden 500 μl Medium dazugegeben. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Nach der angegebenen Kultivierungszeit wurden die entstandenen Zellkolonien mit Kristall-Violett-Lösung (0,005 % Kristall-Violett in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure) bei RT für 1 h gefärbt und mit PBS gewaschen. Die Anzahl an Zellkolonien wurde mittels Durchlichtmikroskopie bestimmt.

4.2.31 "Scratch assay"

Am Tag vor dem "Scratch assay" wurden Zellen bei gleicher Zelldichte im 6-well für eine 50 % Konfluenz ausgesät. Der "Scratch" in der konfluenten Zellschicht wurde mit einer sterilen 200 μl -Pipettenspitze herbeigeführt, und abgelöste Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt. Die Gleichmäßigkeit des "Scratches" sowie die Migration der Zellen in den "Scratch" wurden mittels Durchlichtmikroskopie untersucht. Zur Bestimmung der Migrationsrichtung durch MTOC-Färbung wurden die Zellen mit einer Lösung aus 50 % Methanol und 50 % Aceton bei -20°C für 5 min fixiert und immunfluoreszenzgefärbt. Die Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen aus Triplikaten.

4.2.32 Vergleich der Aktin-Polymerisations-Dynamik in IMR90S-Zellen

IMR90S wt und BAG6 KO-Zellen wurden mit einem EGFP-Aktin-Plasmid (pEGFP-actin) mit PEI_{Max} transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von lebenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten wurden gemacht.

4.2.33 Bildanalyse

Mikroskopische Bilder wurden mit ImageJ bearbeitet. Dabei wurden Fluoreszenzaufnahmen bei gleicher Belichtungszeit auf gleiche Weise bearbeitet.

5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primär-Antikörper	119
Tabelle 2: Sekundär-Antikörper	120
Tabelle 3: Verwendete bzw. hergestellte Plasmide	121
Tabelle 4: <i>E. coli</i> -Stämme für Klonierungen	122
Tabelle 5: Verwendete bzw. hergestellte Zelllinien	123
Tabelle 6: Verwendete Datenbanken und Software	124

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zunahme der Proteinviefalt durch alternatives Spleißen.	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der <i>bag6</i> -mRNA.	7
Abbildung 3: Domänen-Architektur der BAG-Proteinfamilie.	9
Abbildung 4: BAG-Domäne von BAG6.	10
Abbildung 5: Alternatives Spleißen von ex24 verändert die BAG6-Lokalisation in HEK-Zellen.	22
Abbildung 6: Spleißen von ex24 verändert die Lokalisation von endogenem und exogenem BAG6 in wt- und BAG6 KO-Zellen.	26
Abbildung 7: Spleißen von ex24 verändert die NLS-Stärke und Lokalisation von BAG6.	29
Abbildung 8: Nachweis einer funktionellen NES in BAG6 mit Auswirkungen auf BAG6- Lokalisation und Zellmorphologie.	31
Abbildung 9: Spleißen von BAG6 ex24 ist zelllichteabhängig und beeinflusst das Zytoskelett.	35
Abbildung 10: Krankheitsassoziierte SNPs im ex24-nachfolgendem Intron von BAG6 verändern das Spleißverhältnis von ex24.	39
Abbildung 11: BAG6 +ex24 aber nicht Δ ex24 kompensiert die BAG6 KO-bedingten Veränderungen der Zellmorphologie, Zell-Zell-Adhäsion sowie Aktin- Architektur in IMR90S-Zellen.	42
Abbildung 12: Ein BAG6 KO hat keinen deutlichen Einfluss auf Zellwachstum, -größe und - granularität von IMR90S-Zellen.	44
Abbildung 13: BAG6 beeinflusst das Mikrotubuli-Skelett und ist selbst Tubulin-assoziiert.	48
Abbildung 14: BAG6 +ex24 aber nicht Δ ex24 kompensiert die BAG6 KO-bedingten Veränderungen in Zellmorphologie, Zell-Zell-Adhäsion sowie Aktin-Architektur von nicht invasiven MCF-Zellen.	51
Abbildung 15: Ein BAG6 KO verändert die Morphologie von invasiven MDA-Zellen.	54
Abbildung 16: BAG6 beeinflusst das Koloniewachstum von Zellen im " <i>Soft-agar-assay</i> ".	57
Abbildung 17: BAG6 beeinflusst die morphologische Reaktion von IMR90S-Zellen nach Zytokinstimulation.	60
Abbildung 18: Ein BAG6 KO reduziert membranassoziiertes F-Aktin.	64
Abbildung 19: BAG6 beeinflusst die Aktin-Polymerisation und die Assoziation zwischen F- Aktin und Hsp70.	65
Abbildung 20: Ein BAG6 KO reduziert die zelllichteabhängige Regulation der H3K27- Methylierungs-Stärke.	68
Abbildung 21: Eine Translokation von BAG6 ist nötig für einen Kernimport des zytosolischen EpCAM-Fragments.	72
Abbildung 22: Ein BAG6 KO reduziert die β -Catenin-Translokation in den Kern.	73
Abbildung 23: Expression von BAG6 Δ ex24 in Zellen auf BAG6 KO-Basis führt zur	

vermehrter Bildung von Zytoplasmabrücken.....	76
Abbildung 24: Die Zellmigration im "Scratch assay" ist abhängig von der BAG6-Expression.....	81
Abbildung 25: Ein BAG6 KO in IMR90S-Zellen verhindert die korrekte Ausrichtung des Zellkerns in Migrationsrichtung.	84
Abbildung 26: Ein BAG6 KO verringert die Abbau-Geschwindigkeit von primären Zilien.	87
Abbildung 27: BAG6 zeigt eine zentrosomale Akkumulation während des Zellzyklus.	90
Abbildung 28: Ein BAG6 KO führt zur fehlerhaften Orientierung des Spindelapparats während der Mitose.	93
Abbildung 29: BAG6 ex24 wird in Tumoren vermehrt gespleißt.	97
Abbildung 30: Modell zur Bedeutung von BAG6 in der Tumorbildung.....	100
Abbildung 31: Spleißen von BAG6 ex24 für zur Entstehung einer alternativen BAG-Domäne.	107
Abbildung 32: Alternativ gespleißten Exons im C-Terminus von BAG6.	108
Abbildung 33: Evolutionäre Betrachtung der Exonstruktur der BAG-Domäne von BAG6.....	111

7 Literaturverzeichnis

- Akahane T, Sahara K, Yashiroda H, Tanaka K, Murata S. Involvement of Bag6 and the TRC pathway in proteasome assembly. *Nat Commun.* 2013;4:2234.
- Alló M, Buggiano V, Fededa JP, Petrillo E, Schor I, de la Mata M, Agirre E, Plass M, Eyraas E, Elela SA, Klinck R, Chabot B, Kornblihtt AR. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Jul;16(7):717-24.
- Anczuków O, Rosenberg AZ, Akerman M, Das S, Zhan L, Karni R, Muthuswamy SK, Krainer AR. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jan 15;19(2):220-8.
- Annunziata CM, Kleinberg L, Davidson B, Berner A, Gius D, Tchabo N, Steinberg SM, Kohn EC. BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Nov 15;13(22 Pt 1):6585-92.
- Ariazi J, Benowitz A, De Biasi V, Den Boer ML, Cherqui S, Cui H, Douillet N, Eugenin EA, Favre D, Goodman S, Gousset K, Hanein D, Israel DI, Kimura S, Kirkpatrick RB, Kuhn N, Jeong C, Lou E, Mailliard R, Maio S, Okafo G, Osswald M, Pasquier J, Polak R, Pradel G, de Rooij B, Schaeffer P, Skeberdis VA, Smith IF, Tanveer A, Volkmann N, Wu Z, Zurzolo C. Tunneling Nanotubes and Gap Junctions-Their Role in Long-Range Intercellular Communication during Development, Health, and Disease Conditions. *Front Mol Neurosci.* 2017 Oct 17;10:333.
- Arnold ES, Ling SC, Huelga SC, Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Ditsworth D, Kordasiewicz HB, McAlonis-Downes M, Platoshyn O, Parone PA, Da Cruz S, Clutario KM, Swing D, Tessarollo L, Marsala M, Shaw CE, Yeo GW, Cleveland DW. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 19;110(8):E736-45.
- Ast T, Schuldiner M. Protein degradation: BAGging up the trash. *Curr Biol.* 2011 Sep 27;21(18):R692-5.
- Austefjord MW, Gerdes H-H, Wang X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. *Communicative & Integrative Biology.* 2014;7:e27934.
- Autoimmune Disease Classification by Inverse Association with SNP Alleles Marina Sirota, Marc A. Schaub, Serafim Batzoglou, William H. Robinson, Atul J. Butte *PLoS Genet.* 2009 Dec; 5(12): e1000792. Published online 2009 Dec 24.
- Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol.* 1998 Aug;18(8):4833-43.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973 Nov;51(5):1409-16.
- Banerji J, Sands J, Strominger JL, Spies T. A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(6):2374-8.
- Basten SG, Giles RH. Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis.

- Cilia. 2013 Apr 29;2(1):6.
- Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer*. 2000 Aug;36(13 Spec No):1607-20. Review.
- Behl C. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2016 Aug;37(8):672-88.
- Biamonti G, Bonomi S, Gallo S, Ghigna C. Making alternative splicing decisions during epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Cell Mol Life Sci*. 2012 Aug;69(15):2515-26.
- Birzele F, Csaba G, Zimmer R. Alternative splicing and protein structure evolution. *Nucleic Acids Res*. 2008 Feb;36(2):550-8. Epub 2007 Nov 30.
- Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, Winn RA. The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp*. 2014 Oct 27;(92):e51998.
- Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D, Chodosh LA, Yang J, Cheng C. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2011 Mar;121(3):1064-74.
- Bruchmann A, Roller C, Walther TV, Schäfer G, Lehmusvaara S, Visakorpi T, Klocker H, Cato AC, Maddalo D. Bcl-2 associated athanogene 5 (Bag5) is overexpressed in prostate cancer and inhibits ER-stress induced apoptosis. *BMC Cancer*. 2013 Mar 1;13:96.
- Cagliani R, Riva S, Pozzoli U, Fumagalli M, Comi GP, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. Balancing selection is common in the extended MHC region but most alleles with opposite risk profile for autoimmune diseases are neutrally evolving. *BMC Evol Biol*. 2011 Jun 17;11:171.
- Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974 Sep;53(3):661-74.
- Calderón-González KG, Valero Rustarazo ML, Labra-Barrios ML, Bazán-Méndez CI, Tavera-Tapia A, Herrera-Aguirre ME, Sánchez del Pino MM, Gallegos-Pérez JL, González-Márquez H, Hernández-Hernández JM, León-Ávila G, Rodríguez-Cuevas S, Guisa-Hohenstein F, Luna-Arias JP. Determination of the protein expression profiles of breast cancer cell lines by quantitative proteomics using iTRAQ labelling and tandem mass spectrometry. *J Proteomics*. 2015 Jun 21;124:50-78.
- Cato L, Neeb A, Sharp A, Buzón V, Ficarro SB, Yang L, Muhle-Goll C, Kuznik NC, Riisnaes R, Nava Rodrigues D, Armant O, Gourain V, Adelmant G, Ntim EA, Westerling T, Dolling D, Rescigno P, Figueiredo I, Fauser F, Wu J, Rottenberg JT, Shatkina L, Ester C, Luy B, Puchta H, Troppmair J, Jung N, Bräse S, Strähle U, Marto JA, Nienhaus GU, Al-Lazikani B, Salvatella X, de Bono JS, Cato AC, Brown M. Development of Bag-1L as a therapeutic target in androgen receptor-dependent prostate cancer. *Elife*. 2017 Aug 10;6. pii: e27159.
- Chalut KJ, Paluch EK. The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function. *Dev Cell*. 2016 Sep 26;38(6):571-3.
- Charras GT. A short history of blebbing. *J Microsc*. 2008 Sep;231(3):466-78.
- Chaw SY, Abdul Majeed A, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol*. 2012 Oct;48(10):997-1006.

- Chen J, Zang YS, Xiu Q. BAT3 rs1052486 and rs3117582 polymorphisms are associated with lung cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014 Oct;35(10):9855-8.
- Climente-González H, Porta-Pardo E, Godzik A, Eyraes E. The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer. *Cell Rep.* 2017 Aug 29;20(9):2215-2226.
- Cooper D.R., Carter G., Li P., Patel R., Watson J.E., Patel N.A. Long Non-Coding RNA NEAT1 Associates with SRp40 to Temporally Regulate PPAR γ 2 Splicing during Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *Genes.* 2014;5:1050–1063.
- Corduan A, Lecomte S, Martin C, Michel D, Desmots F. Sequential interplay between BAG6 and HSP70 upon heat shock. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jun;66(11-12):1998-2004.
- da Silva MR, Moreira GA, Gonçalves da Silva RA, de Almeida Alves Barbosa É, Pais Siqueira R, Teixeira RR, Almeida MR, Silva Júnior A, Fietto JL, Bressan GC. Splicing Regulators and Their Roles in Cancer Biology and Therapy. *Biomed Res Int.* 2015;2015:150514.
- Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* 1979 May;6(1):23-8.
- De Marco M, Basile A, Iorio V, Festa M, Falco A, Ranieri B, Pascale M, Sala G, Remondelli P, Capunzo M, Firpo MA, Pezzilli R, Marzullo L, Cavallo P, De Laurenzi V, Turco MC, Rosati A. Role of BAG3 in cancer progression: A therapeutic opportunity. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Aug 31. pii: S1084-9521(17)30363-4.
- Denzel S, Maetzel D, Mack B, Eggert C, Bär G, Gires O. Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer.* 2009 Nov 19;9:402.
- Desmots F, Russell HR, Lee Y, Boyd K, McKinnon PJ. The reaper-binding protein scythe modulates apoptosis and proliferation during mammalian development. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec;25(23):10329-37.
- Desmots F, Russell HR, Michel D, McKinnon PJ. Scythe regulates apoptosis-inducing factor stability during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2008 Feb 8;283(6):3264-71.
- Dhaouadi N, Li JY, Feugier P, Gustin MP, Dab H, Kacem K, Bricca G, Cerutti C. Computational identification of potential transcriptional regulators of TGF- β 1 in human atherosclerotic arteries. *Genomics.* 2014 May-Jun;103(5-6):357-70.
- Doong H, Vrailas A, Kohn EC. What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett.* 2002 Dec 15;188(1-2):25-32. Review.
- Doukhanina EV, Chen S, van der Zalm E, Godzik A, Reed J, Dickman MB. Identification and functional characterization of the BAG protein family in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2006 Jul 7;281(27):18793-801.
- Dredge BK, Polydorides AD, Darnell RB. The splice of life: alternative splicing and neurological disease. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Jan;2(1):43-50. Review.
- Efthymiadis A, Shao H, Hübner S, Jans DA. Kinetic characterization of the human retinoblastoma protein bipartite nuclear localization sequence (NLS) in vivo and in vitro. A comparison with the SV40 large T-antigen NLS. *J Biol Chem.* 1997 Aug 29;272(35):22134-9.
- Emoto K, Masugi Y, Yamazaki K, Effendi K, Tsujikawa H, Tanabe M, Kitagawa Y, Sakamoto M.

- Presence of primary cilia in cancer cells correlates with prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2014 Apr;45(4):817-25.
- Etokebe GE, Jotanovic Z, Mihelic R, Mulac-Jericevic B, Nikolic T, Balen S, Sestan B, Dembic Z. Susceptibility to large-joint osteoarthritis (hip and knee) is associated with BAG6 rs3117582 SNP and the VNTR polymorphism in the second exon of the FAM46A gene on chromosome 6. *J Orthop Res.* 2015 Jan;33(1):56-62.
- Etokebe GE, Zienolddiny S, Kupanovac Z, Enersen M, Balen S, Flego V, Bulat-Kardum L, Radojčić-Badovinac A, Skaug V, Bakke P, Haugen A, Dembic Z. Association of the FAM46A gene VNTRs and BAG6 rs3117582 SNP with non small cell lung cancer (NSCLC) in Croatian and Norwegian populations. *PLoS One.* 2015 Apr 17;10(4):e0122651.
- Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duetzel HS, Stewart II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol.* 2007;3:89. Epub 2007 Mar 13.
- Fang CT, Kuo HH, Pan TS, Yu FC, Yih LH. HSP70 regulates the function of mitotic centrosomes. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Oct;73(20):3949-60.
- Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Apr;11(4):276-87.
- Feng B, Jiao P, Helou Y, Li Y, He Q, Walters MS, Salomon A, Xu H. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 (MKP-3)-deficient mice are resistant to diet-induced obesity. *Diabetes.* 2014 Sep;63(9):2924-34.
- Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, Tobiansky L, Niessen C, Ariga H, Daniel J, Fujita Y. A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem.* 2008 May 9;283(19):12691-700.
- Fontanella B, Birolo L, Infusini G, Cirulli C, Marzullo L, Pucci P, Turco MC, Tosco A. The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: new hints for actin folding. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 May;42(5):641-50.
- Fuchs M, Luthold C, Guilbert SM, Varlet AA, Lambert H, Jetté A, Elowe S, Landry J, Lavoie JN. A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis. *PLoS Genet.* 2015 Oct 23;11(10):e1005582.
- Gamerding M, Kaya AM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep.* 2011 Feb;12(2):149-56.
- Grover A, Izzo AA. BAT3 regulates Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6-mediated apoptosis of macrophages. *PLoS One.* 2012;7(7):e40836.
- Han Y, Jeong HM, Jin YH, Kim YJ, Jeong HG, Yeo CY, Lee KY. Acetylation of histone deacetylase 6 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May 22;383(1):88-92.
- Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic*

- Acids Res. 2016 Aug 19;44(14):6549-63.
- He X, Liu Z, He Q, Qin J, Liu N, Zhang L, Li D, Zhou J, Shui W, Liu M. Identification of novel microtubule-binding proteins by taxol-mediated microtubule stabilization and mass spectrometry analysis. *Thorac Cancer*. 2015 Sep;6(5):649-54.
- Hein MY, Hubner NC, Poser I, Cox J, Nagaraj N, Toyoda Y, Gak IA, Weisswange I, Mansfeld J, Buchholz F, Hyman AA, Mann M. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell*. 2015 Oct 22;163(3):712-23.
- Hishiya A, Kitazawa T, Takayama S. BAG3 and Hsc70 interact with actin capping protein CapZ to maintain myofibrillar integrity under mechanical stress. *Circ Res*. 2010 Nov 12;107(10):1220-31.
- Hodel MR, Corbett AH, Hodel AE. Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1317-25.
- Homma S, Iwasaki M, Shelton GD, Engvall E, Reed JC, Takayama S. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol*. 2006 Sep;169(3):761-73.
- Howes SC, Alushin GM, Shida T, Nachury MV, Nogales E. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol Biol Cell*. 2014 Jan;25(2):257-66.
- Hsieh YY, Lin YJ, Chang CC, Chen DY, Hsu CM, Wang YK, Hsu KH, Tsai FJ. Human lymphocyte antigen B-associated transcript 2, 3, and 5 polymorphisms and haplotypes are associated with susceptibility of Kawasaki disease and coronary artery aneurysm. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(4):262-8.
- Igietseme JU, Omosun Y, Stuchlik O, et al. Role of Epithelial-Mesenchyme Transition in *Chlamydia* Pathogenesis. Seshu J, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0145198.
- Intasqui P, Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Bertolla RP. Towards the identification of reliable sperm biomarkers for male infertility: A sperm proteomic approach. *Andrologia*. 2017 Dec 4.
- Iwasaki M, Homma S, Hishiya A, Dolezal SJ, Reed JC, Takayama S. BAG3 regulates motility and adhesion of epithelial cancer cells. *Cancer Res*. 2007 Nov 1;67(21):10252-9.
- Johno H, Kitamura M. Pathological in situ reprogramming of somatic cells by the unfolded protein response. *Am J Pathol*. 2013 Sep;183(3):644-54.
- Jolly MK, Ware KE, Gilja S, Somarelli JA, Levine H. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Mol Oncol*. 2017 Jul;11(7):755-769.
- Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2016 Aug 19;44(14):6518-48.
- Kaczmarek K, Studencka M, Meinhardt A, Wiczerzak K, Thoms S, Engel W, Grzmil P. Overexpression of peroxisomal testis-specific 1 protein induces germ cell apoptosis and leads to infertility in male mice. *Mol Biol Cell*. 2011 May 15;22(10):1766-79.
- Kaminska D, Käkelä P, Nikkola E, Venesmaa S, Ilves I, Herzig KH, Kolehmainen M, Karhunen L, Kuusisto J, Gylling H, Pajukanta P, Laakso M, Pihlajamäki J. Regulation of alternative splicing in human obesity loci. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Oct;24(10):2033-7.
- Kämper N, Franken S, Temme S, Koch S, Bieber T, Koch N. γ -Interferon-regulated chaperone governs

- human lymphocyte antigen class II expression. *FASEB J.* 2012 Jan;26(1):104-16.
- Kämper N, Kessler J, Temme S, Wegscheid C, Winkler J, Koch N. A novel BAT3 sequence generated by alternative RNA splicing of exon 11B displays cell type-specific expression and impacts on subcellular localization. *PLoS One.* 2012;7(4):e35972.
- Kassis JN, Guancial EA, Doong H, Virador V, Kohn EC. CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Exp Cell Res.* 2006 Sep 10;312(15):2962-71.
- Kawahara H, Minami R, Yokota N. BAG6/BAT3: emerging roles in quality control for nascent polypeptides. *J Biochem.* 2013 Feb;153(2).
- Kikukawa Y, Minami R, Shimada M, Kobayashi M, Tanaka K, Yokosawa H, Kawahara H. Unique proteasome subunit Xrpn10c is a specific receptor for the antiapoptotic ubiquitin-like protein Scythe. *FEBS J.* 2005 Dec;272(24):6373-86.
- Kim HR, Lee GO, Choi KH, Kim DK, Ryu JS, Hwang KE, Na KJ, Choi C, Kuh JH, Chung MJ, Lee MK, So HS, Yoon KH, Park MC, Na KS, Kim YS, Park DS. SRSF5: a novel marker for small-cell lung cancer and pleural metastatic cancer. *Lung Cancer.* 2016 Sep;99:57-65.
- Kim W, Kim M, Jho EH. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J.* 2013 Feb 15;450(1):9-21.
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Apr;68(4):820-3.
- Köster DV, Mayor S. Cortical actin and the plasma membrane: inextricably intertwined. *Curr Opin Cell Biol.* 2016 Feb;38:81-9.
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 23;106(25):10171-6.
- Krenciute G, Liu S, Yucer N, Shi Y, Ortiz P, Liu Q, Kim BJ, Odejimi AO, Leng M, Qin J, Wang Y. Nuclear BAG6-UBL4A-GET4 complex mediates DNA damage signaling and cell death. *J Biol Chem.* 2013 Jul 12;288(28):20547-57.
- Kristensen AR, Gsponer J, Foster LJ. A high-throughput approach for measuring temporal changes in the interactome. *Nat Methods.* 2012 Sep;9(9):907-9.
- Kuwabara N, Minami R, Yokota N, Matsumoto H, Senda T, Kawahara H, Kato R. Structure of a BAG6 (Bcl-2-associated athanogene 6)-Ubl4a (ubiquitin-like protein 4a) complex reveals a novel binding interface that functions in tail-anchored protein biogenesis. *J Biol Chem.* 2015 Apr 10;290(15):9387-98.
- Kwak JH, Kim SI, Kim JK, Choi ME. BAT3 interacts with transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors and enhances TGF-beta1-induced type I collagen expression in mesangial cells. *J Biol Chem.* 2008 Jul 11;283(28):19816-25.
- la Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel.* 2004 Jun;17(6):527-36.
- Lee JN, Kim H, Yao H, Chen Y, Weng K, Ye J. Identification of Ubx8 protein as a sensor for unsaturated fatty acids and regulator of triglyceride synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec

- 14;107(50):21424-9.
- Leznicki P, Korac-Prlic J, Kliza K, Husnjak K, Nyathi Y, Dikic I, High S. Binding of SGTA to Rpn13 selectively modulates protein quality control. *J Cell Sci.* 2015 Sep 1;128(17):3187-96.
- Li HX, Luo X, Liu RX, Yang YJ, Yang GS. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Sep 10;291(1-2):116-24.
- Li P., Carter G., Romero J., Gower K.M., Watson J., Patel N.A., Cooper D.R. Clk/STY (cdc2-like kinase 1) and Akt regulate alternative splicing and adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes. *PLoS ONE.* 2013;8:e53268.
- Li Y, Dickman M. Processing of AtBAG6 triggers autophagy and fungal resistance. *Plant Signal Behav.* 2016 Jun 2;11(6):e1175699.
- Li Y, Kabbage M, Liu W, Dickman MB. Aspartyl Protease-Mediated Cleavage of BAG6 Is Necessary for Autophagy and Fungal Resistance in Plants. *Plant Cell.* 2016 Jan;28(1):233-47.
- Liang F, Holt I, Pertea G, Karamycheva S, Salzberg SL, Quackenbush J. Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):239-40.
- Liu C, Cui H, Gu D, Zhang M, Fang Y, Chen S, Tang M, Zhang B, Chen H. Genetic polymorphisms and lung cancer risk: Evidence from meta-analyses and genome-wide association studies. *Lung Cancer.* 2017 Nov;113:18-29.
- Loiselle Julie J., Justin G. Roy, Leslie C. Sutherland Heliyon. RBM5 reduces small cell lung cancer growth, increases cisplatin sensitivity and regulates key transformation-associated pathways 2016 Nov; 2(11): e00204. Published online 2016 Nov 29.
- López-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigó R. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett.* 2005 Mar 28;579(9):1900-3.
- Luce MJ, Akpawu AA, Tucunduva DC, Mason S, Scott MS. Extent of pre-translational regulation for the control of nucleocytoplasmic protein localization. *BMC Genomics.* 2016 Jun 24;17:472.
- Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol.* 2009 Feb;11(2):162-71.
- Manchen ST, Hubberstey AV. Human Scythe contains a functional nuclear localization sequence and remains in the nucleus during staurosporine-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Oct 12;287(5):1075-82.
- Manchen ST, Hubberstey AV. Human Scythe contains a functional nuclear localization sequence and remains in the nucleus during staurosporine-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Oct 12;287(5):1075-82.
- Mariappan M, Li X, Stefanovic S, Sharma A, Mateja A, Keenan RJ, Hegde RS. A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature.* 2010 Aug 26;466(7310):1120-4.
- McGinnis R, McLaren W, Ranganath V, Whittaker P, Hunt S, Deloukas P; Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Haplotype-based search for SNPs associated with differential type 1 diabetes risk among chromosomes carrying a specific HLA DRB1-DQA1-DQB1 haplotype. *Diabetes Obes*

Metab. 2009 Feb;11 Suppl 1:8-16.

McRobbie SJ, Newell PC. Changes in actin associated with the cytoskeleton following chemotactic stimulation of dictyostelium discoideum. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983 Aug 30;115(1):351-9.

Minami R, Hayakawa A, Kagawa H, Yanagi Y, Yokosawa H, Kawahara H. BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *J Cell Biol.* 2010 Aug 23;190(4):637-50.

Mock JY, Xu Y, Ye Y, Clemons WM Jr. Structural basis for regulation of the nucleo-cytoplasmic distribution of Bag6 by TRC35. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Oct 31;114(44):11679-11684.

Mythreye K, Blobel GC. Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion. *Cell Signal.* 2009 Nov;21(11):1548-58.

Nabi IR. The polarization of the motile cell. *J Cell Sci.* 1999 Jun;112 (Pt 12):1803-11. Review.

Nguyen P, Bar-Sela G, Sun L, Bisht KS, Cui H, Kohn E, Feinberg AP, Gius D. BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. *Mol Cell Biol.* 2008 Nov;28(21):6720-9.

Nichols WW, Murphy DG, Cristofalo VJ, Toji LH, Greene AE, Dwight SA. Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science.* 1977 Apr 1;196(4285):60-3.

Nielsen SV, Poulsen EG, Rebula CA, Hartmann-Petersen R. Protein quality control in the nucleus. *Biomolecules.* 2014 Jul 9;4(3):646-61.

Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature.* 2010 Jan 28;463(7280):457-63.

Nollen EA, Brunsting JF, Song J, Kampinga HH, Morimoto RI. Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity. *Mol Cell Biol.* 2000 Feb;20(3):1083-8.

Okada H, Uezu A, Mason FM, Soderblom EJ, Moseley MA 3rd, Soderling SH. SH3 domain-based phototrapping in living cells reveals Rho family GAP signaling complexes. *Sci Signal.* 2011 Nov 29;4(201):rs13.

P. Intasqui, A. Agarwal, R. Sharma, L. Samanta, E.S. Sabanegh, R. Bertolla, Proteomic analysis reveals BAG6 and HIST1H2BA are potential sperm biomarker candidates in infertile men with primary and secondary infertility, In *Fertility and Sterility*, Volume 108, Issue 3, Supplement, 2017, Page e140, ISSN 0015-0282.

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1413-5.

Papadakis ES, Reeves T, Robson NH, Maishman T, Packham G, Cutress RI. BAG-1 as a biomarker in early breast cancer prognosis: a systematic review with meta-analyses. *Br J Cancer.* 2017 Jun 6;116(12):1585-1594.

Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL, Allen AS, Goldstein DB. Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003709.

Pietiläinen KH, Ismail K, Järvinen E, Heinonen S, Tummars M, Bollepalli S, Lyle R, Muniandy M, Moilanen E, Hakkarainen A, Lundbom J, Lundbom N, Rissanen A, Kaprio J, Ollikainen M. DNA

- methylation and gene expression patterns in adipose tissue differ significantly within young adult monozygotic BMI-discordant twin pairs. *Int J Obes (Lond)*. 2016 Apr;40(4):654-61.
- Piras IS, Angius A, Andreani M, Testi M, Lucarelli G, Floris M, Markt S, Ciceri F, La Nasa G, Fleischhauer K, Roncarolo MG, Bulfone A, Gregori S, Bacchetta R. BAT2 and BAT3 polymorphisms as novel genetic risk factors for rejection after HLA-related SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Nov;49(11):1400-4.
- Piva F, Giulietti M, Burini AB, Principato G. SpliceAid 2: a database of human splicing factors expression data and RNA target motifs. *Hum Mutat*. 2012 Jan;33(1):81-5.
- Pogge von Strandmann E, Simhadri VR, von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, Rothe A, Böll B, Simhadri VL, Borchmann P, McKinnon PJ, Hallek M, Engert A. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 2007 Dec;27(6):965-74.
- Pohl C, Jentsch S. Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 2009 Jan;11(1):65-70.
- Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):265-73.
- Poole CA, Zhang ZJ, Ross JM. The differential distribution of acetylated and detyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J Anat*. 2001 Oct;199(Pt 4):393-405.
- Porollo AA, Adamczak R, Meller J. POLYVIEW: a flexible visualization tool for structural and functional annotations of proteins. *Bioinformatics*. 2004 Oct 12;20(15):2460-2. Epub 2004 Apr 8. PubMed PMID: 15073023.
- Pradella D, Naro C, Sette C, Ghigna C. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression. *Mol Cancer*. 2017 Jan 30;16(1):8.
- Rankin KE, Wordeman L. Long astral microtubules uncouple mitotic spindles from the cytokinetic furrow. *J Cell Biol*. 2010 Jul 12;190(1):35-43.
- Reiners KS, Topolar D, Henke A, Simhadri VR, Kessler J, Sauer M, Bessler M, Hansen HP, Tawadros S, Herling M, Krönke M, Hallek M, Pogge von Strandmann E. Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood*. 2013 May 2;121(18):3658-65.
- Rodrigo-Brenni MC, Gutierrez E, Hegde RS. Cytosolic quality control of mislocalized proteins requires RNF126 recruitment to Bag6. *Mol Cell*. 2014 Jul 17;55(2):227-37.
- Sahoo P, Jena SR, Samanta L. Tunneling nanotubes: A versatile target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2017 Nov 29.
- Sánchez C, Padilla R, Paciucci R, Zabala JC, Avila J. Binding of heat-shock protein 70 (Hsp70) to tubulin. *Arch Biochem Biophys*. 1994 May 1;310(2):428-32.
- Sasaki T, Marcon E, McQuire T, Arai Y, Moens PB, Okada H. Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis. *J Cell Biol*. 2008 Aug 11;182(3):449-58.
- Schiel JA, Childs C, Prekeris R. Endocytic transport and cytokinesis: from regulation of the cytoskele-

- ton to midbody inheritance. *Trends Cell Biol.* 2013 Jul;23(7):319-27.
- Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Alló M, Kornblihtt AR. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 17;106(11):4325-30.
- Schrul B, Kopito RR. Peroxin-dependent targeting of a lipid-droplet-destined membrane protein to ER subdomains. *Nat Cell Biol.* 2016 Jul;18(7):740-51..
- Sebti S, Prébois C, Pérez-Gracia E, Bauvy C, Desmots F, Pirot N, Gongora C, Bach AS, Hubberstey AV, Palissot V, Berchem G, Codogno P, Linares LK, Liaudet-Coopman E, Pattingre S. BAG6/BAT3 modulates autophagy by affecting EP300/p300 intracellular localization. *Autophagy.* 2014 Jul;10(7):1341-2.
- Shah PP, Beverly LJ. Regulation of VCP/p97 demonstrates the critical balance between cell death and epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. *Oncotarget.* 2015 Jul 10;6(19):17725-37.
- Shapiro IM, Cheng AW, Flytzanis NC, Balsamo M, Condeelis JS, Oktay MH, Burge CB, Gertler FB. An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genet.* 2011 Aug;7(8):e1002218.
- Sharp A, Crabb SJ, Townsend PA, Cutress RI, Brimmell M, Wang XH, Packham G. BAG-1 in carcinogenesis. *Expert Rev Mol Med.* 2004 Mar 22;6(7):1-15. Review.
- Shein HM, Enders JF. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962 Jul 15;48:1164-72.
- Shi H, Xu H, Li Z, Zhen Y, Wang B, Huo S, Xiao R, Xu Z. BAG3 regulates cell proliferation, migration, and invasion in human colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2016 Apr;37(4):5591-7.
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell.* 2007 Mar;11(3):259-73.
- Shkreta L, Bell B, Revil T, Venables JP, Prinos P, Elela SA, Chabot B. Cancer-Associated Perturbations in Alternative Pre-messenger RNA Splicing. *Cancer Treat Res.* 2013;158:41-94.
- Short, B. (2014). Septins provide a link to epithelial migration. *The Journal of Cell Biology*, 207(2), 162.
- Sineva GS, Pospelov VA. β -Catenin in pluripotency: adhering to self-renewal or Wanting to differentiate? *Int Rev Cell Mol Biol.* 2014;312:53-78.
- Sondermann H, Ho AK, Listenberger LL, Siegers K, Moarefi I, Wente SR, Hartl FU, Young JC. Prediction of novel Bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33220-7.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973 Nov;51(5):1409-16.
- Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science.* 1989 Jan 13;243(4888):214-7.
- Stamova BS, Tian Y, Nordahl CW, Shen MD, Rogers S, Amaral DG, Sharp FR. Evidence for differential

- alternative splicing in blood of young boys with autism spectrum disorders. *Mol Autism*. 2013 Sep 4;4(1):30.
- Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlauff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksöz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker EE. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*. 2005 Sep 23;122(6):957-68.
- Stevenson J, Huang EY, Olzmann JA. Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Lipid Homeostasis. *Annu Rev Nutr*. 2016 Jul 17;36:511-42.
- Sun BO, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed Rep*. 2015 Sep;3(5):603-610.
- Sun L, Fang J. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Dec;73(23):4493-4515. Epub 2016 Jul 8. Review.
- Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976 May 15;17(5):565-77.
- Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, Miyashita T, Yamada M, Reed JC. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res*. 1998 Jul 15;58(14):3116-31.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54. Review.
- Thress K, Henzel W, Shillinglaw W, Kornbluth S. Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator. *EMBO J*. 1998 Nov 2;17(21):6135-43.
- Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, Brimmell M, Packham G. BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Mar 17;1603(2):83-98.
- Turturici G, Geraci F, Candela ME, Giudice G, Gonzalez F, Sconzo G. Hsp70 localizes differently from chaperone Hsc70 in mouse mesoangioblasts under physiological growth conditions. *J Mol Histol*. 2008 Dec;39(6):571-8.
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015 Jan 23;347(6220):1260419.
- Uttamsingh S, Bao X, Nguyen KT, Bhanot M, Gong J, Chan JL, Liu F, Chu TT, Wang LH. Synergistic effect between EGF and TGF-beta1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. *Oncogene*. 2008 Apr 17;27(18):2626-34.
- Vora SM, Phillips BT. The benefits of local depletion: The centrosome as a scaffold for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Cell Cycle*. 2016 Aug 17;15(16):2124-2134.
- Wakeman TP, Wang Q, Feng J, Wang XF. Bat3 facilitates H3K79 dimethylation by DOT1L and

- promotes DNA damage-induced 53BP1 foci at G1/G2 cell-cycle phases. *EMBO J.* 2012 May 2;31(9):2169-81.
- Wang HG, Takayama S, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 9;93(14):7063-8.
- Wang Q, Liu Y, Soetandyo N, Baek K, Hegde R, Ye Y. A ubiquitin ligase-associated chaperone holdase maintains polypeptides in soluble states for proteasome degradation. *Mol Cell.* 2011 Jun 24;42(6):758-70.
- Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijayakrishnan J, Matakidou A, Qureshi M, Dong Q, Gu X, Chen WV, Spitz MR, Eisen T, Amos CI, Houlston RS. Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1407-9.
- Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *J Pathol.* 2010 Jan;220(2):152-63.
- Warns JA, Davie JR, Dhasarathy A. Connecting the dots: chromatin and alternative splicing in EMT. *Biochem Cell Biol.* 2016 Feb;94(1):12-25.
- Winnefeld M, Grewenig A, Schnölzer M, Spring H, Knoch TA, Gan EC, Rommelaere J, Cziepluch C. Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned chromosomes and mitotic arrest. *Exp Cell Res.* 2006 Aug 1;312(13):2500-14.
- Wu YH, Shih SF, Lin JY. Ricin triggers apoptotic morphological changes through caspase-3 cleavage of BAT3. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):19264-75.
- Wu YH, Shih SF, Lin JY. Ricin triggers apoptotic morphological changes through caspase-3 cleavage of BAT3. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):19264-75.
- Xiao H, Cheng S, Tong R, Lv Z, Ding C, Du C, Xie H, Zhou L, Wu J, Zheng S. BAG3 regulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* 2014 Mar;94(3):252-61.
- Xu Y, Liu Y, Lee JG, Ye Y. A ubiquitin-like domain recruits an oligomeric chaperone to a retrotranslocation complex in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem.* 2013 Jun 21;288(25):18068-76.
- Xu Y, Liu Y, Lee JG, Ye Y. A ubiquitin-like domain recruits an oligomeric chaperone to a retrotranslocation complex in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem.* 2013 Jun 21;288(25):18068-76.
- Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008 Jun;14(6):818-29.
- Yang X, Chernenko G, Hao Y, Ding Z, Pater MM, Pater A, Tang SC. Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene.* 1998 Aug 27;17(8):981-9.
- Yi L, Lv Z, Wang J, Zhong X. Bcl-2 associated athanogene 4 promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. *Mol Med Rep.* 2017 Oct;16(4):3753-3760.
- Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):15-33.

- Yong ST, Wang XF. A novel, non-apoptotic role for Scythe/BAT3: a functional switch between the pro- and anti-proliferative roles of p21 during the cell cycle. *PLoS One*. 2012;7(6):e38085.
- Yu P, Pisitkun T, Wang G, Wang R, Katagiri Y, Gucek M, Knepper MA, Geller HM. Global analysis of neuronal phosphoproteome regulation by chondroitin sulfate proteoglycans. *PLoS One*. 2013;8(3):e59285.
- Yu T, Ma Y, Wang H. EpCAM Intracellular Domain Promotes Porcine Cell Reprogramming by Upregulation of Pluripotent Gene Expression via Beta-catenin Signaling. *Sci Rep*. 2017 Apr 10;7:46315.
- Yue X, Zhao Y, Huang G, Li J, Zhu J, Feng Z, Hu W. A novel mutant p53 binding partner BAG5 stabilizes mutant p53 and promotes mutant p53 GOFs in tumorigenesis. *Cell Discov*. 2016 Nov 1;2:16039.
- Yue X, Zhao Y, Liu J, Zhang C, Yu H, Wang J, Zheng T, Liu L, Li J, Feng Z, Hu W. BAG2 promotes tumorigenesis through enhancing mutant p53 protein levels and function. *Elife*. 2015 Aug 13;4.
- Zhang J, Manley JL. Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discov*. 2013 Nov;3(11):1228-37.
- Zhang Y, Zhao Y, Jiang G, Zhang X, Zhao H, Wu J, Xu K, Wang E. Impact of p120-catenin isoforms 1A and 3A on epithelial mesenchymal transition of lung cancer cells expressing E-cadherin in different subcellular locations. *PLoS One*. 2014 Feb 4;9(2):e88064.
- Zhao J, Wang H, Hu W, Jin Y. Effect of HLA-B-associated transcript 3 polymorphisms on lung cancer risk: a meta-analysis. *Med Sci Monit*. 2014 Nov 28;20:2461-5.
- Zhao Y, Lin Y, Zhang H, Mañas A, Tang W, Zhang Y, Wu D, Lin A, Xiang J. Ubl4A is required for insulin-induced Akt plasma membrane translocation through promotion of Arp2/3-dependent actin branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Aug 4;112(31):9644-9.
- Zhao Y, Zhang H, Affonso C, Bonomo R, Mañas A, Xiang J. Deficiency in ubiquitin-like protein Ubl4A impairs migration of fibroblasts and macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 29;483(1):617-623.
- Zhou HL, Luo G, Wise JA, Lou H. Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(2):701-13.
- Zhu H, Liu P, Li J. BAG3: a new therapeutic target of human cancers? *Histol Histopathol*. 2012 Mar;27(3):257-61.