

# Lokalisation des mechanisch regulierten Cochaperons BAG3 und ausgewählter Bindepartner in Muskelzellen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Julia Friedrich**

aus

Ansbach

Bonn 2022

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

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Höfeld

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dieter Fürst

Tag der Promotion: 05.07.2023

Erscheinungsjahr: 2023

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	4
Zusammenfassung .....	5
1 Einleitung und Grundlagen.....	7
1.1 Stressfaktoren und zelluläre Schutzmechanismen.....	7
1.2 Mechanische Belastung und mechanischer Stress.....	8
1.3 Muskelzellen und Physiologie des Muskels.....	10
1.3.1 Physiologischer Aufbau und Unterschiede .....	10
1.3.2 Proteine des Zytoskeletts von Muskelzellen .....	15
1.4 Das dynamische Proteom .....	16
1.4.1 Faltungshelfer .....	17
1.4.1.1 Chaperone und Cochaperone .....	17
1.4.1.2 Kleine Hitzeschockproteine .....	17
1.4.2 Proteinfaltung als Problem .....	18
1.5 Abbau-Systeme - Relevante Abbauwege zur Erhaltung der Proteostase .....	19
1.5.1 Proteasomaler Abbau.....	19
1.5.2 Autophagie.....	20
1.5.3 Chaperone beim Proteinabbau - Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) .....	21
1.6 BAG3 - Mechanisch regulierte Proteostase-Systeme .....	22
1.6.1 BAG3 Bindedomänen und Bindepartner.....	22
1.6.2 BAG3 und seine mechanisch regulierten Phosphorylierungsstellen .....	23
1.6.3 BAG3 in der Transkription und Translation.....	24
1.6.4 BAG3 in der Autophagie.....	27
1.6.5 Klinisch relevante Mutationen und Defizite .....	28
1.6.6 Filamin als direkte Zielstruktur von BAG3.....	28
1.7 Zielsetzung .....	29
2 Methoden und Materialien.....	30

2.1	Methoden.....	30
2.1.1	Methoden im Umgang mit Escherichia coli-Bakterien.....	30
2.1.1.1	Kultivierung von E. coli-Bakterien .....	30
2.1.1.2	Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Bakterien .....	30
2.1.1.3	Transformation chemisch kompetenter E. coli-Bakterien .....	31
2.1.2	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.1.2.1	Plasmidpräparation aus E. coli-Bakterien .....	31
2.1.2.2	Polymerasekettenreaktion .....	31
2.1.2.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	33
2.1.2.4	Sequenzierung der Plasmide .....	33
2.1.3	Methoden im Umgang mit eukaryotischen Zellen .....	33
2.1.3.1	Kultivierung von A7r5-Zellen .....	34
2.1.3.2	Kultivierung von A7r5 auf Fibronectin .....	34
2.1.3.3	Kultivierung von C2-Zellen .....	35
2.1.3.4	Differenzierung von C2 Zellen.....	35
2.1.3.5	Transfektion von A7r5 mittels JetPRIME® .....	36
2.1.3.6	Behandlung von A7r5 Zellen mit Lysophosphatidinsäure .....	36
2.1.3.7	Elektropulsstimulation von differenzierten Myotuben .....	36
2.1.4	Biochemische Methoden .....	37
2.1.4.1	Fixieren von Zellen mit PFA oder Methanol/Aceton .....	37
2.1.4.2	Färben von fixierten Zellen.....	38
2.1.5	Statistische Analysen .....	38
2.2	Materialien .....	39
2.2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	39
2.2.2	Chemikalien und <i>ready to use</i> Anwendungen .....	40
2.2.3	Primer .....	41
2.2.4	Zelllinien und Bakterien .....	41
2.2.5	Plasmide .....	42
2.2.6	Antikörper und weitere Farbstoffe .....	42
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Mechanische Einflüsse auf Glattmuskelzellen.....	44
3.1.1	Änderung der mechanischen Belastung .....	44
3.1.2	Steigerung der mechanischen Belastung mittels Fibronectin .....	46
3.1.3	Einfluss der Phosphorylierung und Dephosphorylierung mechanisch regulierter Phosphorylierungsstellen auf die BAG3 Lokalisation .....	49

3.1.4	Einfluss der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 auf die Lokalisation von TSC1 .....	52
3.2	Quergestreifte Muskelzellen – Myotuben.....	55
3.2.1	Einfluss auf ausgewählte mechanisch regulierte Proteine durch variable mechanische Belastung in Myotuben .....	56
3.2.1.1	Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von BAG3 in Myotuben .....	56
3.2.1.2	Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von HspB8 in Myotuben.....	59
3.2.1.3	Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von HspB5 in Myotuben.....	62
3.2.1.4	Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von HspB1 in Myotuben.....	65
3.2.1.5	Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von XIN/XIRP2 in Myotuben .. .....	68
3.2.1.6	Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von FILIP in Myotuben .....	70
3.2.1.7	Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von FILIP1L in Myotuben ...	73
3.2.2	Einfluss der Mechanoadaptation auf das Läsionsausmaß.....	76
3.2.3	Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von nukleärem TDP-43 in Myotuben .....	79
4	Diskussion .....	82
4.1	Induktion von mechanischer Belastung in Glattmuskelzellen .....	82
4.2	Einfluss des Phosphorylierungsstatus von BAG3 in Glattmuskelzellen.....	83
4.2.1	Einfluss des Phosphorylierungsstatus von BAG3 auf die Kolo-kalisation an Aktinstressfasern .....	83
4.2.2	Ausbildung granulärer Strukturen aufgrund der Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von BAG3.....	84
4.2.3	BAG3 vermittelte Rekrutierung von TSC1 .....	85
4.3	Lokalisation verschiedener Proteine in Läsionen von elektropulsstimulierten Myotuben.....	86
4.4	Mechanoadaptation in Myotuben .....	90
4.5	Bildung von Myo-Granula in Myotuben unter Einfluss von mechanischer Belastung .....	91
4.6	Zusammenfassung und Ausblick .....	93
5	Literaturverzeichnis .....	95
Anhang	.....	108

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ADP	Adenosindiphosphat
A	Alanin
AMOTL1	<i>angiomin-like protein 1</i>
AMOTL2	<i>angiomin-like protein 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAG3	<i>BCL2 associated athanogene 3</i>
CASA	Chaperon-assistierte selektive Autophagie
CHIP	<i>C terminus of HSC70-Interacting Protein</i>
CMA	<i>chaperon-mediated autophagy</i> - chaperonvermittelte Autophagie
CRYAA	Crystallin Alpha A
CRYAB	Crystallin Alpha B
D	Asparaginsäure
EPS	Elektropulsstimulation
FCS	Fetales Kälber Serum
FILIP	<i>Filamin A Interacting Protein 1</i>
FILIP1L	<i>Filamin A Interacting Protein 1 Like</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HSF1	Hitzeschockfaktor 1
Hsp	Hitzeschockprotein
HspB	kleines Hitzeschockprotein
LATS1	<i>large tumor suppressor kinase 1</i>
LATS2	<i>large tumor suppressor kinase 2</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
mTORC1	mTOR Komplex 1
mTORC2	mTOR Komplex 2
MW	Mittelwert
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäuren
nGS	Ziegenserum
p62	SQSTM1 – Sequestome-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur

Lokalisation des mechanisch regulierten Cochaperons BAG3 und ausgewählter Bindepartner in Muskelzellen

---

S	Serin
SEM	Standardabweichung
SYNPO2	Synaptopodin 2
T	Threonin
TAZ	<i>WW-domain-containing transcription regulator 1</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TDP-43	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>
TSC	<i>Tuberous Sclerosis Komplex</i>
TSC1	Hamartin
TSC2	Tuberin
WT	Wildtyp
XIN/XIRP2	<i>Xin actin-binding repeat-containing protein 2</i>
YAP	<i>Yes-associated protein 1</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Physiologischer Aufbau des Muskels.....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Myofibrille.....	13
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Glattnuskelgewebes.....	14
Abbildung 4: Schematischer Darstellung der Aktinstressfasern einer Glattnuskelzelle. ....	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Abbaus durch CASA. ....	21
Abbildung 6: Darstellung der BAG3 Bindedomänen und ausgewählter Bindepartner. ....	23
Abbildung 7: Mechanische regulierte Phosphorylierungsstellen von BAG3.....	24
Abbildung 8: Interaktion von TSC1 mit BAG3. ....	25
Abbildung 9: BAG3-vermittelte Transkription von Filamin.....	26
Abbildung 10: BAG3 im CASA-Komplex vermittelt den Abbau von Filamin. ....	27
Abbildung 11: Einfluss von Serumentzug und LPA auf A7r5 Zellen. ....	46
Abbildung 12: Einfluss von Fibronektin auf die BAG3-Lokalisation in A7r5. ....	48
Abbildung 13: Lokalisation von BAG3 an Aktin in A7r5 Zellen. ....	52
Abbildung 14: Einfluss der BAG3 Mutanten auf die TSC1 Rekrutierung an Aktin in A7r5 Zellen.....	55
Abbildung 15: Einfluss auf die BAG3 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben. ....	59
Abbildung 16: Einfluss auf die HspB8 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben. ....	62
Abbildung 17: Einfluss auf die HspB5 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben. ....	65
Abbildung 18: Einfluss auf die HspB1 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben. ....	67
Abbildung 19: Einfluss auf die XIN/XIRP2 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben. ....	70
Abbildung 20: Einfluss auf die FILIP Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben. ....	73
Abbildung 21: Einfluss auf die FILIP1L Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben. ....	76
Abbildung 22: Einfluss mechanischer Adaption auf das Läsionsausmaß in Myotuben. ....	79
Abbildung 23: Lokalisation von TDP-43 in Myotuben und mechanoadaptierten Myotuben nach EPS. ....	80

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mechanisch regulierte Phosphorylierungsstellen von BAG3. ....	24
Tabelle 2 Zusammensetzung von LB-Medium und LB-Agar .....	30
Tabelle 3 Zusammensetzung der Reagenzien für die PCR.....	32
Tabelle 4 PCR-Protokoll.....	32
Tabelle 5 Zusammensetzung des verwendeten PBS .....	33
Tabelle 6 Zusammensetzung des Kulturmediums für A7r5 .....	34
Tabelle 7 Zusammensetzung des Proliferationsmediums für C2 .....	35
Tabelle 8 Zusammensetzung des Differenzierungsmediums für C2 .....	36
Tabelle 9 EPS Protokolle .....	37
Tabelle 10: Verwendete Geräte .....	39
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien .....	40
Tabelle 12: Chemikalien.....	40
Tabelle 13: Kits und fertige Anwendungen .....	41
Tabelle 14: Verwendete Primer für die Klonierung phosphomimetischer BAG3 Mutanten....	41
Tabelle 15: Zelllinien .....	41
Tabelle 16: Bakterien .....	41
Tabelle 17:Plasmide.....	42
Tabelle 18: primäre Antikörper.....	42
Tabelle 19: sekundäre Antikörper .....	43
Tabelle 20: weitere Fluoreszenz-markierte Antikörper .....	43

## Zusammenfassung

Zur Erhaltung der Proteostase und somit der Funktionsfähigkeit kontraktile Muskelzellen ist die zelluläre Maschinerie um das Protein BAG3 von besonderer Bedeutung. BAG3 stellt eine Kernkomponente der CASA, einer Form der Makroautophagie dar, welche durch mechanische Belastung gesteuert werden kann. Filamin ist eine Zielstruktur für den Abbau durch CASA in Muskelzellen, da es durch mechanische Belastung zur irreversiblen Entfaltung kommt. Funktionsfähiges Filamin lokalisiert in quergestreiften Muskelzellen an Aktinfilamenten und in glatten Muskelzellen an Aktinstressfasern und fungiert so als Quervernetzer des Aktins. Ein gestörter Abbau des Filamins führt zur Störung und Veränderung der Muskelarchitektur.

Mikroskopische Analysen aus Glattmuskelzellen konnten einen Zusammenhang der Kolo-kalisation von BAG3 und Aktin mit steigender mechanischer Belastung zeigen. Einen geänderten Einfluss auf die Lokalisation an Aktin von phosphomimetischen Mutanten verschiedener kraftregulierter Phosphorylierungsstellen des Proteins BAG3 konnte gegenüber dem Wildtyp nicht gezeigt werden. Die Rekrutierung von TSC1 wird durch die phosphomimetischen Mutanten des BAG3 Proteins nicht verhindert und es kommt zu keiner Einschränkung der durch mTORC1 aktivierten Translation von Filamin.

In der quergestreiften Muskulatur kommt es unter mechanischer Belastung zu Filamin-enthaltenen Läsionen, welche mit der Intensität der Belastung proportional zunehmen. Mittels Prästimulation zeigt sich eine Mechanoadaptation der Zellen und das Entstehen von Läsionen wird verringert. Durch diesen mechanoprotektiven Mechanismus kann intensiveren Belastungen standgehalten werden. Mikroskopische Analysen der Lokalisation von BAG3 zeigen, dass mit steigender mechanischer Belastung eine verstärkte Lokalisation innerhalb der Läsionen auftritt. Es kann somit ein dynamisches Verhalten von BAG3 beschrieben werden, ebenso zeigen HspB5, FILIP, FILIP1L und XIN/XIRP2 die gleiche Dynamik. Da der BAG3 Bindepartner HspB8 dieses Verhalten nicht zeigen konnte lässt dies auf eine Entkopplung schließen. Die Möglichkeit der Interaktion von BAG3 mit weiteren kleinen Hitzeschockproteinen legt nahe, dass HspB8 austauschbar ist und es unter Veränderung der Interaktionspartner zu einem autophagischen Abbau über BAG3 kommen kann.

Das Protein TDP-43 zeigt unter akuter mechanischer Belastung eine verstärkte zytoplasmatische Lokalisation. Eine Funktion ist die Unterstützung der Bildung von Sarkomeren, indem mRNA aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert wird. Ein starker Anstieg von TDP-43 im Zytoplasma kann auch auf unlösliche Aggregate hinweisen, welche in weiteren Analysen untersucht werden müssen. Aufgrund der Prästimulation der Myotuben konnte eine verringerte TDP-43 Lokalisation innerhalb des Zytoplasmas gezeigt werden.

Weitere Untersuchungen in Glattmuskelzellen bezüglich der verschiedenen BAG3 Interaktionspartner, sowie die Entkopplung von HspB8 und deren mögliche Alternativen

müssen in weiteren Experimenten bestätigt werden. Für die in quergestreiften Muskelzellen beschriebene Lokalisationsänderungen der Interaktionspartner müssen weitere Analysen zeigen, ob es zu Funktionsänderungen kommt. Auch der Einfluss der Mechanoprotektion muss spezifisch betrachtet werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit und weitere Experimente können das Wissen über die Filaminhomöostase und das Verständnis der damit verbundenen Funktion von CASA stärken.

## 1 Einleitung und Grundlagen

### 1.1 Stressfaktoren und zelluläre Schutzmechanismen

Jede Zelle eines Organismus ist permanent einer großen Zahl von äußeren und inneren Einflüssen ausgesetzt. Dabei sind Zellen positiven Stimuli und auch einer Vielzahl von Stressfaktoren ausgesetzt. Als Stressfaktoren sind zum Beispiel Hunger, ein spezifischer Mangel an relevanten Wachstumsfaktoren oder plötzliche Temperaturänderungen wie beispielsweise der sogenannter Hitzestress zu erwähnen (Richter et al. 2010). Auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können zu sogenanntem oxidativen Stress führen. ROS sind auch unter dem Begriff Sauerstoffradikale bekannt. Die positiven Effekte von ROS sind besonders bei der Immunantwort von Bedeutung. Dennoch entstehen ROS häufig als Nebenprodukt metabolischer Prozesse. Weiter können sie durch Strahlung, wie beispielsweise der Ultravioletten-Strahlung aber auch radioaktiver Strahlung, erzeugt werden. Besonders bei letzterem erfolgt eine unkontrollierte Akkumulation toxischer Produkte und es bedarf effektiver Gegenmaßnahmen der betroffenen Zellen oder Organe, sodass das Proteom nicht weiter gefährdet wird (Dahl et al. 2015).

Die zelluläre Antwort ist jedoch immer abhängig von der Intensität und dem Ausmaß der Beeinflussung. Liegt direkt eine Veränderung oder Beschädigung der DNA vor spricht man von genotoxischem Stress. Die generelle Beschädigung einer Zelle bezeichnet man als zytotoxischen Stress. Dabei kann der Schaden beispielsweise durch chemische Substanzen, Zellen des Immunsystems oder auch Viren ausgelöst werden. Genotoxischer Stress kann, ebenso wie zytotoxischer Stress, ein dauerhaftes und ungebremstes Wachstum verursachen oder die Zelle mittels Apoptose oder gar Nekrose in den Zelltod treiben (Biamonti und Caceres 2009). Um diese extremen Veränderungen zu verhindern gibt es eine Vielzahl von Gegenmaßnahmen. Beispielsweise triggert genotoxischer Stress häufig einen Signalweg über p53, welcher für die Kontrolle und Instandhaltung der korrekten DNA verantwortlich ist (Herr und Debatin 2001). Oxidativem Stress kann die Zelle mittels enzymatischen und nicht-enzymatischen Detoxifikationsmechanismen begegnen (Mager et al. 2000). Eine Vielzahl unterschiedlicher negativer Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Schwermetalle, können durch die Synthese von schützenden Molekülen weitestgehend unschädlich gemacht werden (Wimmer et al. 2005). Auch Infektionen, Entzündungen oder Fieber führen zu einer Stressreaktion (Biamonti und Caceres 2009). Des Weiteren können auch entfaltete Proteine zu einer stressinduzierten Antwort führen. Innerhalb stressvermittelter Reaktionen kommt es meist zu einem Anhalten von anabolen Prozessen und somit zu einer Inhibition anderer Signalwege wie beispielsweise mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*). Gerade der mTOR Signalweg ist für Proliferation bekannt und in diversen anabolen Prozessen zu finden (Dikic 2017; Kathage et al. 2017).

Durch entfaltete oder fehlgefaltete Proteine steigt das Risiko der Bildung von Proteinaggregaten innerhalb einer Zelle. Dies ist unter anderem bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und weiteren) zu beobachten. Die durch Stress ausgelösten zellulären Antwortmechanismen resultieren häufig in einer veränderten Regulation von Transkriptionsfaktoren. So wird schließlich die Genexpression beeinflusst und meist die Proteinsynthese verringert (Sala et al. 2017). Gleichzeitig wird die Transkription von sogenannten Chaperonen und Proteinen wie Cochaperonen, die Chaperone in ihrer Funktion unterstützen, induziert (Cotto und Morimoto 1999). Chaperone sind essenziell um Proteine zu falten und so dem Protein seine vorgesehene räumliche Struktur zu verleihen. Gleichzeitig sind sie zur partiellen und zielgerichteten Entfaltung nötig.

Unter Stress kann es zu irreversibel entfalteten Proteinen kommen. Der Abbau von fehlerhaften, entfalteten oder beschädigten Proteinen kann über das Ubiquitinsystem oder über eine Form der Autophagie erfolgen. Einige Proteine können durch Lysosomen selbst umschlossen und so direkt abgebaut werden (Mikroautophagie). Durch die chaperonvermittelte Autophagie (*chaperon-mediated autophagy* - CMA) werden spezifische Zielstrukturen mittels Chaperonen zum Lysosom überführt. Besonders große Strukturen oder Proteine können durch die Makroautophagie abgebaut werden. Chaperone sind auch häufig an autophagischen Abbauwegen beteiligt. So schützen sie vor Proteinaggregaten und zeigen meist unter Einfluss von Stress eine gesteigerte Expression (Arndt et al. 2010; Richter et al. 2010; Saibil 2013).

Auch durch mechanische Belastung oder mechanischen Stress kann es zur partiellen oder kompletten Entfaltung eines Proteins bis hin zur Schädigung der Zelle kommen. Dabei kommt es sowohl durch äußere Einflüsse wie auch durch selbstgenerierte Kraft zur mechanischen Belastung. In diesem Fall spielen die Mechanismen der Reparatur und der Autophagie eine besonders große Rolle, da eine mechanische Belastung dauerhaft für die Zelle besteht (Cohen-Kaplan et al. 2016; Höfeld et al. 2021; Ravikumar et al. 2010).

## **1.2 Mechanische Belastung und mechanischer Stress**

Die Zellen eines Organismus sind dauerhaft einem mechanischen Einfluss ausgesetzt. Zu den essenziellen Funktionen der Zelle gehört die Möglichkeit zur Proliferation, Migration und Adhäsion. Hierfür sind physikalische Kräfte nötig. Beispielsweise sind zur Bewegung oder Vervielfältigung der Zelle mechanische Kräfte essenziell. Auch bei der Synthese und Faltung von Proteinen, sowie bei der Bildung von Proteinkomplexen spielen mechanische Kräfte eine wichtige Rolle. Wie genau dabei diese Funktionen durch mechanische Kräfte beeinflusst werden, ist weiter Gegenstand der Forschung (Discher et al. 2009). Die Annahme, dass die

Konformation von Proteinen auch eine Änderung der Form der Zellen unterschiedlicher Gewebe mit unterschiedlichsten Funktionen bedingt, wird ebenfalls genauer untersucht (Johnson et al. 2007). Dies heißt, dass Zellen unterschiedlicher Gewebe und Funktion auch eine unterschiedliche Elastizität aufweisen müssen. Beispielsweise ist Knochengewebe durch eine deutlich festere Gewebestruktur ausgezeichnet als das Gehirn. Dies macht deutlich, dass durch mechanische Belastung auf unterschiedliches Gewebe, eine unterschiedlich starke Reaktion ausgelöst werden muss (Irianto et al. 2016). Weiter zeigt sich anhand der Entwicklung des Menschen, dass auch aufgrund des Entwicklungsstadiums unterschiedlich starke mechanische Belastungen auf ein Gewebe oder Organ wirken. Während der Entwicklung und dem Wachstum ändert sich die Festigkeit und Elastizität von Gewebe. Dies macht deutlich, dass der humane Körper, sowohl während der Embryonalentwicklung, wie auch im erwachsenen Zustand permanent einer variierenden mechanischen Belastung oder mechanischem Stress ausgeliefert ist (Hoffman et al. 2011; Moore et al. 2010; Wolfenson et al. 2019).

Da sich keine Zelle einer mechanischen Belastung entziehen kann, liegen eine Vielzahl von Mechanismen zum Schutz der Zelle vor Schäden vor. Denn selbstverständlich gibt es eine mechanische Belastung, die für die Zelle nicht nur ein gewisses Maß an Stress verursacht, sondern auch beschädigend oder gar zerstörend wirken kann. Dies ist vom Zelltyp und somit den entsprechenden Funktionen abhängig. Betrachtet man beispielsweise die für das Leben essenzielle Dehnung der Lunge zur Aufnahme von Sauerstoff, wird deutlich, welcher massiven mechanischen Belastung diese Zellen ausgeliefert sind. Weiter ist nicht zu vergessen, dass alle blutführenden Gefäße durch den Blutfluss dauerhaften Scherkräften ausgeliefert sind. Auch führt beispielsweise ein Anstieg des Blutdrucks zu einer Vergrößerung und somit zu einer Dehnung der Blutgefäße (Discher et al. 2009; Hoffman et al. 2011). Des Weiteren ist bei der Bewegung von Immunzellen mechanischer Stress relevant. Hier erfolgt ein Stimulus, sodass es zur Migration, also einer mechanischen Belastung kommt. Aufgrund dessen ist es der Immunzelle möglich, den Infektionsherd zu infiltrieren. Ähnlich verhält es sich bei metastasierenden Tumorzellen. Auch hier führt die Möglichkeit der Fortbewegung mittels mechanischer Energie zur Verbreitung und zur Invasivität. Eine besondere Rolle im Zusammenhang mit mechanischer Belastung und Stress spielen Muskelzellen. Es gehört zu den Hauptaufgaben eines Muskels die Fähigkeit zur Kontraktion zu besitzen. Dabei spielt die selbst generierte Kraft eine bedeutende Rolle. Dies liegt auch in Struktur und Aufbau der Muskelzellen (Ayad et al. 2019; Svitkina 2018).

Durch mechanische Reize werden verschiedene mechanosensitive Proteine angesprochen. Beispielsweise Ionen-Kanäle oder Transmembranproteine, welche für Fokal- oder Zell-Zell-Kontakt relevant sind, aber auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) welche

als Mechanosensoren und Transduktoren dienen. Je nach Intensität des mechanischen Reizes erfolgt eine unterschiedliche Reaktion der Zelle (Ingber 2006).

Es zeigen sich jedoch auch verschiedene Krankheitsbilder, welche in direktem Zusammenhang mit einer verminderten oder fehlerhaften Reaktion auf mechanische Belastung stehen. Diese Pathologien können genetisch bedingt, idiopathisch, aber genauso auch einem höheren Lebensalter geschuldet sein. Veränderungen der Komplexe und Strukturen, welche durch mechanische Belastung angesprochen werden, führen beispielsweise zu Hypertonie, Arteriosklerose, Osteoporose, muskuläre Myopathien und Dystrophien sowie zu kanzerogenen Erkrankungen (DuFort et al. 2011; Ehrlicher et al. 2011; Hoffman et al. 2011; Höhfeld et al. 2021; Höhfeld und Hoppe 2018).

### **1.3 Muskelzellen und Physiologie des Muskels**

Ohne unsere Muskulatur wäre ein Leben nicht möglich. Dabei besteht der menschliche Körper aus mehr als 650 Muskeln. Neben den bekannten Muskeln - wie dem Herzmuskel oder der Skelettmuskulatur - gibt es eine Vielzahl weiterer Muskeln, wovon jeder seine spezifische Funktion übernimmt. Diese Menge an, zur Kontraktion fähigen Geweben, unterliegt zwei grundlegend unterschiedlichen Steuerungsmechanismen. Zum einen gibt es Muskeln, welche durch das vegetative Nervensystem gesteuert werden. Hierzu gehört beispielsweise die Verengung oder Dehnung von Blutgefäßen. Diese kann von einem Individuum nicht eigenständig kontrolliert werden. Zum anderen gibt es Muskeln, die einer willkürlichen Steuerung unterliegen. Dies umfasst alle Muskeln, welche durch die bewusste Entscheidung bewegt, also zur Kontraktion gebracht werden, können. Auch physiologisch und anatomisch weisen Muskeln verschiedene Merkmale auf (Vaupel et al. 2015).

#### **1.3.1 Physiologischer Aufbau und Unterschiede**

Grundlegend kann man Muskelgewebe aufgrund des physiologischen Aufbaus in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen die sogenannte quergestreifte Muskulatur und zum anderen die glatte Muskulatur. Betrachtet man zuerst die Quergestreifte, fällt genau die spezifische Querstreifung optisch auf. Man unterscheidet hierbei nochmals die Skelettmuskulatur von der Herzmuskulatur. Die quergestreifte Muskulatur (Abbildung 1) besteht aus kontraktile Proteinstrukturen, den sogenannten Myofibrillen. Diese Myofibrillen bilden die Muskelfasern. Durch die Umhüllung mehrerer Muskelfasern mit Endomysium und die Zusammenlagerung bildet sich der sogenannte Faszikel. Mehrere Faszikel oder auch Muskelfaserbündel genannt, werden durch das Perimysium umschlossen. Im Perimysium befinden sich auch Nervenbahnen, Lymph- und Blutgefäße, welche für eine adäquate Versorgung des Muskels

verantwortlich sind. Weiter wird der Skelettmuskel durch das Epimysium ummantelt. Über Sehnen erfolgt eine Verbindung von Muskeln und Knochen (Vaupel et al. 2015).

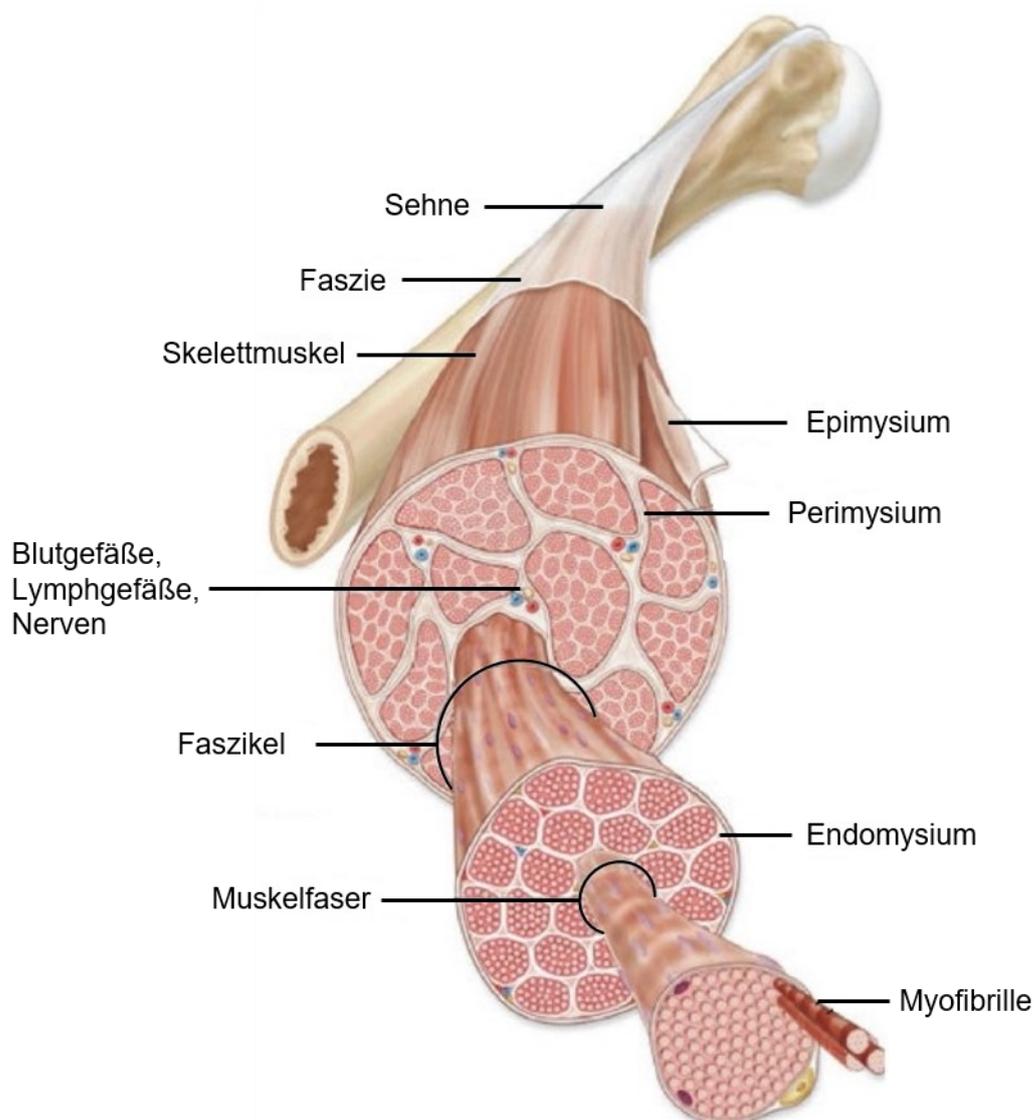


Abbildung 1: Physiologischer Aufbau des Muskels.

Meist wird der Skelettmuskel über Sehnen am Skelett verankert. Der Skelettmuskel wird durch das Epimysium ummantelt und besteht aus den einzelnen Faszikeln. Die Faszikel werden durch das Perimysium umfasst. In diesen Zwischenräumen finden sich auch Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven. Betrachtet man die Faszikel genauer, bestehen diese aus Muskelfasern. Muskelfasern werden durch das Endomysium umfasst und können auch nochmals in kleinere Strukturen unterteilt werden. Die Muskelfasern werden aus den Myofibrillen aufgebaut. Abbildung modifiziert nach McKinley und O'Loughlin (2009).

Betrachtet man Myofibrillen jedoch nochmals genauer, so lässt sich eine langgestreckte Struktur erkennen. Es zeigt sich, dass eine symmetrische Aneinanderreihung von Sarkomeren

die Struktur der Myofibrillen bestimmt. Ein Sarkomer ist also ein definierter Teil der Myofibrille welcher sich von einer Z-Scheibe zur nächsten Z-Scheibe erstreckt. Dies lässt sich auch schematisch darstellen und so zeigt sich nochmals der symmetrische Aufbau (Abbildung 2). Ein Sarkomer, welches den Bereich zwischen zwei Z-Scheiben beschreibt, kann in weitere Bereiche unterteilt werden. Es umfasst die A-Bande wobei der zentrale Teil der A-Bande mit der M-Linie als Mittellinie, als der Hauptteil bezeichnet wird. In der A-Bande findet man Myosinfilamente. Diese sind verhältnismäßig dicke Filamente und dienen als Motorproteine. Sie nutzen zur Kraftgenerierung die aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) generierte Energie, um Kraft und so eine Bewegung entlang des Zytoskeletts zu erzeugen. Diese Funktion des Myosins ermöglicht so beispielsweise den intrazellulären Verkehr, die Weiterleitung von Signale oder führt zur Kontraktion (Jockusch 2017). In der I-Bande, welche den Bereich zur linken und rechten Seite der Z-Scheibe beschreibt, liegen dünne Filamente vor. Diese bestehen aus Aktin. Die Z-Scheibe selbst enthält das Strukturprotein Titin, welches selbst einen Teil des Sarkomers darstellt. Aufgrund seiner Größe liegt Titin gewunden, quasi federartig vor und ist für die Elastizität der Sarkomerstruktur verantwortlich. Es ist also für die mechanische Regulation sowie Signaltransduktion unerlässlich (Frank et al. 2006; Linke und Hamdani 2014).

Durch die konstante, wiederholte Aneinanderreihung der Sarkomere und ihrem zylindrischen Aufbau gestaltet sich so die Myofibrille (Frank et al. 2006; Jockusch 2017; Linnemann et al. 2010). Der Aufbau der Muskulatur unterliegt immer dem gleichen Schema. Es ist möglich, durch Training eine Veränderung der Muskulatur hervorzurufen. Das heißt, es besteht die Option, die Muskelmasse gezielt zu steigern. Dies äußert sich zum einen in der Größe der Muskelfasern, zum anderen steigt die Anzahl der Sarkomere. Krankheiten oder Hunger und Mangelernährung führen dagegen zu Gegenteiligem, also zu einem Muskelverlust (Orfanos et al. 2016; Proske und Morgan 2001).

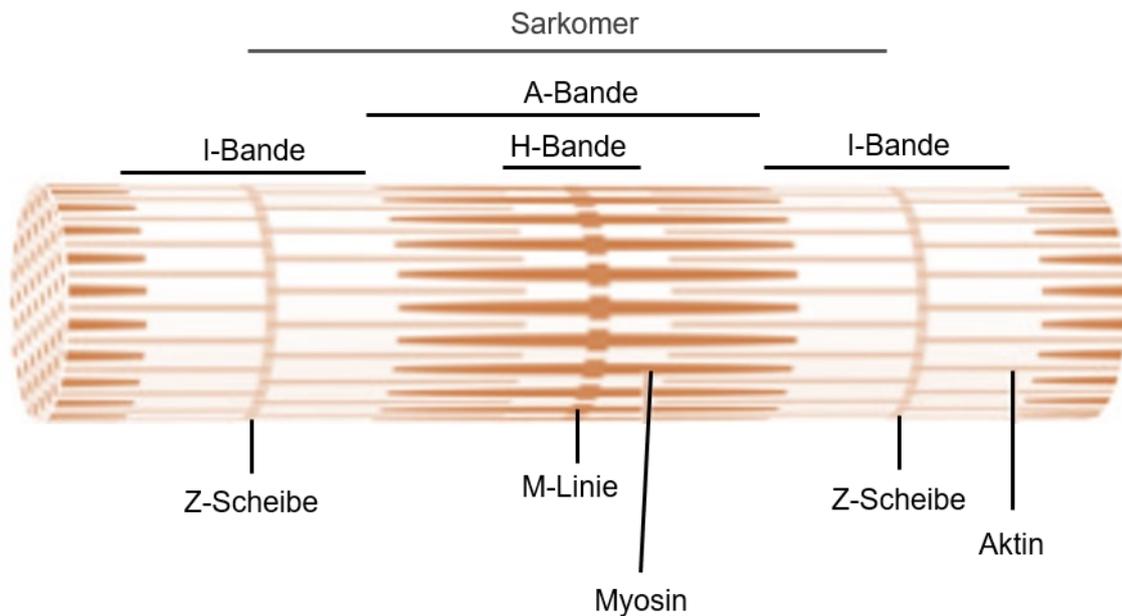


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Myofibrille.

Ein Abschnitt der Myofibrille ist das Sarkomer. Dabei wiederholt sich der dargestellte Aufbau in gleichbleibender symmetrischer Abfolge. Von Z-Scheibe zu Z-Scheibe wird das Sarkomer definiert. Der spezifische Aufbau sieht wie folgt aus: Als I-Bande wird der Bereich links und rechts der Z-Scheiben bezeichnet. Dieser weist lediglich Aktin (dünne Filamente) auf. Die A-Bande bezeichnet den Teil, der von Myosin (dicke Filamente) und teilweise Aktin durchzogen ist. Hierbei differenziert man den Bereich, welcher keinerlei Aktin aufweist nochmals in die H-Bande. Die M-Linie stellt den Mittelpunkt des Sarkomers dar. Abbildung modifiziert nach Höfeld et al. (2021).

Die sogenannte glatte Muskulatur zeigt keine klassischen Querstreifen und unterliegt nicht der willkürlichen Kontrolle, sondern der des vegetativen Nervensystems. Die größte Aufgabe, die diese Muskulatur erfüllen muss, ist die Aufrechterhaltung einer definierten Dauerspannung. Vorkommende Änderungen dieser Spannung erfolgen recht langsam und sehr spezifisch. Die Anordnung der Zellen bezeichnet man auch als Scherengitter (Abbildung 3).

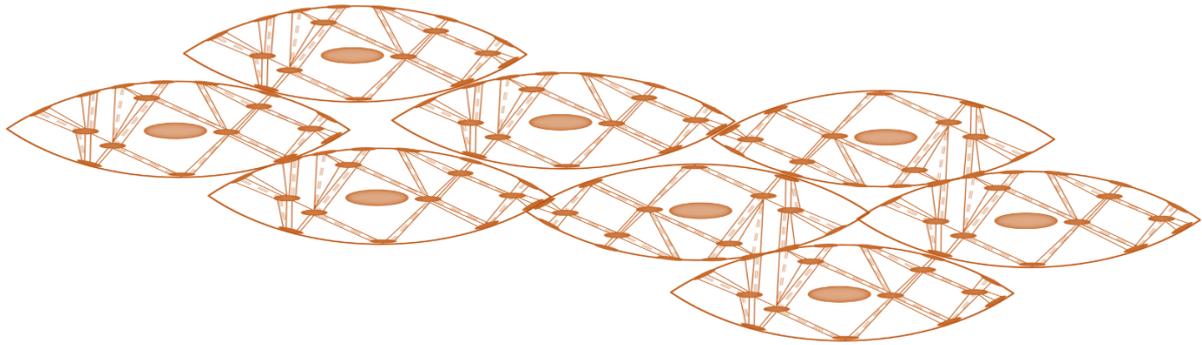


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Glattmuskelgewebes.

Die als Scherengitter dargestellte Anordnung der Zellen ermöglicht so die Kompensation von starker mechanischer Belastung. Abbildung modifiziert nach Vaupel et al. (2015).

Diese Anordnung ist für die Dehnbarkeit des Gewebes essenziell. Der Zellkern liegt bei diesen Zellen im Zentrum und auch die Filamente bündeln, jedoch ohne die zuvor erwähnte Regelmäßigkeit. Diese Bündel aus Aktin werden als Aktinstressfasern bezeichnet. Auch sind die Filamente (Aktin und Myosin) längs ausgerichtet, jedoch nicht parallel. In Glattmuskelzellen (Abbildung 4) kommt es so zu keiner Bildung von Myofibrillen oder Sarkomeren wie bei der quergestreiften Muskulatur. Es liegen auch keine Z-Scheiben vor, an welchen Aktin und Myosin verankert sein könnten. Diese Funktion übernehmen, sogenannte *dense bodies*. Sie können als Pendant zu Z-Scheiben betrachtet werden. Ähnliche Verankerungen von Aktin- und Myosin-Filamenten lassen sich an der Zellmembran finden. Dort werden diese Knotenpunkte als *dense band* bezeichnet. Anhand dieser spezifischen Strukturmerkmale spannt sich das Zytoskelett der Glattmuskelzelle auf. Dieses Zytoskelett ermöglicht es der Zelle großen Kräften standzuhalten, ebenso wie selbst Kräfte zu generieren (Geeves und Holmes 2005; Henderson et al. 2017; Linnemann et al. 2010).

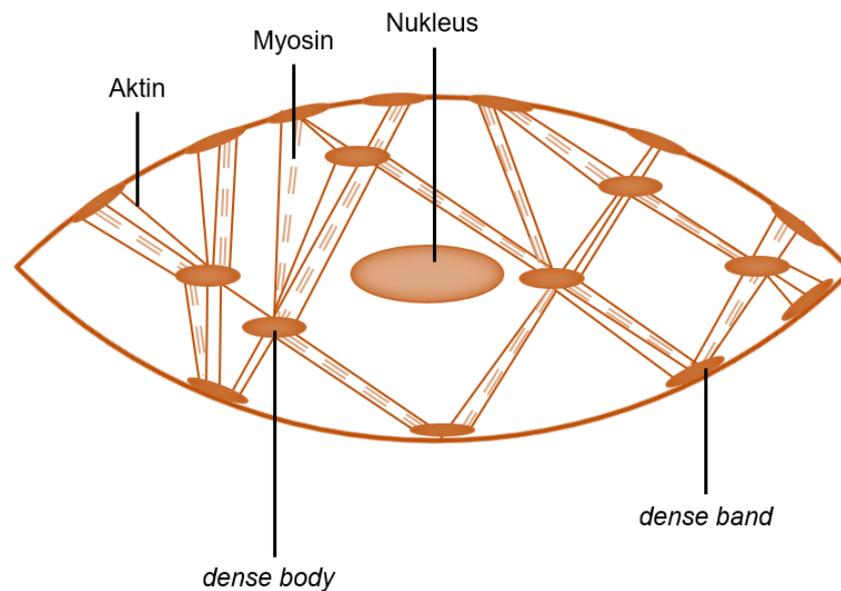


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktinstressfasern einer Glattmuskelzelle. Es zeigt sich kein symmetrischer Aufbau, somit liegen auch keine Sarkomere wie bei der quergestreiften Muskulatur vor. Dennoch wird durch die Vernetzung von Aktin und Myosin über die sogenannten *dense bodies* oder *dense bands* die Integrität der Zelle gewahrt. Abbildung modifiziert nach Vaupel et al. (2015).

### 1.3.2 Proteine des Zytoskeletts von Muskelzellen

Besonders Aktin trägt zur Fortbewegung und Beweglichkeit der Zelle maßgebend bei. Dabei unterscheidet man in der quergestreiften Muskulatur das Aktin der Skelettmuskulatur vom Aktin der Herzmuskulatur. Wie erwähnt formt Aktin die sogenannten dünnen Aktinfilamente. Diese Aktinfilamente sind an den Z-Scheiben verankert. Über das Protein Filamin wird das Aktin quervernetzt. Da Aktin maßgeblich daran beteiligt ist, das Aktinzytoskelett und somit auch die Form der Zelle zu erhalten und zu bestimmen, liegt je nach Zelltyp ein unterschiedlich geformtes Zytoskelett vor. Dies äußert sich auch in der Verformbarkeit der Zelle, ebenso wie es die Elastizität beeinflusst. Aufgrund der Struktur von Aktin und seinen Vernetzungen ist es so möglich, Signale oder mechanische Einflüsse über lange Strecken zu transportieren (Ehrlicher et al. 2011; Jockusch 2017). Um eine Verbindung zwischen dem intrazellulären Zytoskelett und der extrazellulären Matrix herzustellen, kommen sogenannte Integrine zum Einsatz. Integrine sind aufgrund ihrer Lokalisation einer mechanischen Regulation unterlegen und reagieren somit sensitiv auf mechanische Reize (Fu et al. 2012; Luo et al. 2007). Integrine tragen zum Aufrechterhalten der zellulären Spannung bei, indem sie über mechanosensitive Adhäsionskomplexe Signale der extrazellulären Matrix weiterleiten (Schiller und Fässler 2013; Sun et al. 2016).

Weiter spielt, wie bereits in Kapitel 1.3.1 erwähnt, Titin eine wichtige Rolle. Es reicht von der M-Linie bis durch die Z-Scheibe. Ohne Titin wäre es der Zelle unmöglich selbst Kraft zu generieren (Frank et al. 2006).

Besonders zu erwähnen ist weiter das Protein Filamin. Es sind drei Isoformen des Filamins bekannt und das Protein liegt als homodimerer Komplex vor. Filamin A und B kommt im Vergleich zu Filamin C nicht in Muskelzellen vor. Filamin C kommt an den Z-Scheiben und an Aktinstressfasern vor. Weiter kann Filamin Integrinrezeptoren aktivieren und so die Reorganisation des Aktinzytoskeletts beeinflussen (Kiema et al. 2006). Dennoch dienen alle drei Isoformen des Filamin, in jedem Zelltyp, der Migration und Adhäsion. Durch mechanische Belastung wird Filamin partiell entfaltet (Nakamura et al. 2011; Ulbricht et al. 2013a). Die erneute Assemblierung der Myofibrillen stellt besonders nach einer mechanischen Beschädigung eine Herausforderung dar. Bei der Beschädigung entstehen mikroskopisch sichtbare Läsionen. Um den Läsionen entgegenwirken zu können, agieren *Xin actin-binding repeat-containing protein 2* (XIN/XIRP2) mit Filamin. Die sogenannte Filaminhomöostase, also der Abbau von entfaltetem Filamin ebenso wie die Neusynthese, trägt maßgeblich zum Erhalt der Muskulatur bei. Das Aufrechterhalten eines definierten Gleichgewichts von Auf- und Abbau verschiedener Proteine ist eine der wichtigsten Funktionen einer Zelle (Eulitz et al. 2013; Orfanos et al. 2016; van der Ven et al. 2006).

#### **1.4 Das dynamische Proteom**

Proteine sind Grundbausteine der Zelle. Sie dienen als Strukturkomponenten, sind an zellulärer Kommunikation und an Transportvorgängen beteiligt. Auch vermitteln sie als Enzyme verschiedene Stoffwechselprozesse (Murrell et al. 2015). Die Proteostase beschreibt das dynamische Gleichgewicht von Transkription, Translation und Degradation im Zuge der Erhaltung und Anpassung der Proteinausstattung von Zellen und Geweben. Weiter ist die Qualitätskontrolle ein wichtiger Aspekt der Proteostase, da auch Faltung und Entfaltung zum Erhalt des Proteoms beitragen. Das dynamische Gleichgewicht kann durch beispielsweise die Proliferation, Migration oder Adhäsion der Zelle beeinflusst werden. Auch äußere Einflüsse, wie mechanischer Stress, sind von Bedeutung. Speziell bei Zellen, die zur Kontraktion fähig sind, wie Muskelzellen zeigt sich die große Relevanz (Balch et al. 2008; Clarkson und Hubal 2002; Klaipe et al. 2018).

Besonders wichtig für die Proteostase sind molekulare Chaperone, die sogenannten Hitzeschockproteine und Chaperon-regulierende Cochaperone.

### **1.4.1 Faltungshelfer**

Für die Neusynthese eines funktionsfähigen Proteins ist die dreidimensionale Struktur, also die räumliche Anordnung und Faltung, von großer Bedeutung. Dabei unterstützen molekulare Chaperone den Prozess der Proteinfaltung. Auch entfaltete, fehlgefaltete oder beschädigte Proteine können durch die erneute und korrekte Faltung mittels Chaperonen und Cochaperonen wieder ihre Funktionsfähigkeit erhalten (Quinlan und Ellis 2013; Richter et al. 2010).

#### **1.4.1.1 Chaperone und Cochaperone**

Als molekulare Chaperone werden die Hitzeschockproteine bezeichnet. Zu diesen zählen die Hsp60-, Hsp70-, Hsp90-, Hsp100-Familien. Ebenso gehören die aufgrund ihrer geringen Größe als kleine Hitzeschockproteine (siehe 1.4.1.2) bezeichneten HspBs zu den Chaperonen. Chaperone sind keine typischen Makromoleküle, da sie keinen definierten Klienten haben. Chaperone binden über eine Peptidbindedomäne ein zu faltendes Protein und verändern die Konformation des zu faltenden Proteins über ihre ATPase-Domäne. Für diese Funktionsfähigkeit ist Energie nötig, welche über den Verbrauch von ATP erzeugt wird (Buchberger et al. 2010; Saibil 2013). Häufig kooperieren und agieren sie zusammen mit Cochaperonen. Diese Cochaperone unterstützen die Chaperone bei der Faltung von Proteinen, indem sie die ATPase-Domäne des Chaperons aktivieren (Caplan 2003).

Aber nicht nur die Faltung zählt zu den Aufgaben der Chaperone, sondern dienen sie auch als Stabilisatoren ungefalteter Proteine und weisen weitere Funktionen, welche für den Abbau relevant sind auf (Arndt et al. 2010; Gamerdinger et al. 2011a; Hartl et al. 2011; Lanneau et al. 2010; Ulbricht et al. 2013a).

#### **1.4.1.2 Kleine Hitzeschockproteine**

Kleine Hitzeschockproteine können Oligomere formen und dabei, je nach Größe des gebildeten Oligomers, verschiedene Funktionen übernehmen. Dabei sind die kleinen Hitzeschockproteine häufig in Komplexen mit weiteren Chaperonen zu finden. Die kleinen Hitzeschockproteine sind nicht ATP-abhängig. Eine ihrer Hauptaufgaben besteht darin, Proteine, die noch nicht ihre korrekte dreidimensionale Struktur erhalten haben, in ihrer Form zu stabilisieren. Dies ermöglicht anderen Proteostasefaktoren, wie beispielsweise anderen Chaperonen, die korrekte Faltung der Proteine. Auch wird die Aggregation von Proteinen verhindert. Weiter zählt die Stabilisierung des Aktinzytoskeletts zu ihren Aufgabengebieten. Auch die Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts, aufgrund von beispielsweise Migration, wird durch kleine Hitzeschockproteine unterstützt. Weiter können sie die Zelle vor der

Apoptose schützen. Zu den kleinen Hitzeschockproteinen gehören HspB1, HspB2; HspB3, HspB4 (Crystallin Alpha A - CRYAA), HspB5 (Crystallin Alpha B - CRYAB), HspB6, HspB7, HspB8 und HspB9 (Crippa et al. 2010; Mainz et al. 2015; Quinlan und Ellis 2013; Ungelenk et al. 2016). Mutationen bei diesen kleinen Proteinen können zu schwerwiegenden Folgen führen. Besonders Mutationen in HspB1 und HspB5 stehen in Assoziation mit Muskelschwächen. Im Fall einer Mutation von HspB8 zeigen sich neben Myopathien auch Aggregate im Gewebe, sowie eine motorische Neuropathie. Es wird deutlich, welche essenzielle Rolle HspB8 in der Proteostase übernimmt (Adriaenssens et al. 2017; Carra et al. 2008; Haidar et al. 2019).

Ein weiteres konkretes Beispiel für die Aufgaben von HspB1 und HspB5 zeigt sich in den Z-Scheiben der quergestreiften Muskulatur durch die Bindung an Titin. Hier unterstützen HspB1 und HspB5 unter Einfluss von mechanischer Belastung Titin in seiner Funktion. Sie schützen also Titin vor Aggregation oder einer verringerten Elastizität, welche die Sarkomere zerstören würde (Finka et al. 2016; Haslbeck und Vierling 2015; Kötter et al. 2014; Tanguay und Hightower 2015).

#### 1.4.2 Proteinfaltung als Problem

Um voll funktionsfähig zu sein, bedarf es während der Synthese eines Proteins einiger Schritte. So wird zuerst das Protein über die spezifische Aminosäuresequenz bestimmt. Die volle Funktion ist weiter von der räumlichen Anordnung, also der Faltung, des Proteins abhängig. Die Konformation darf allerdings keinesfalls starr sein, sondern verlangt aufgrund potentiell verschiedener Bindepartner eine gewisse Flexibilität. Diese partiellen Änderungen, oder auch Entfaltungen, führen besonders unter negativem Stress, zu irreversibel entfaltenen Proteinen, fehlerhaft gefalteten Proteinen oder gar Aggregationen (Balchin et al. 2016; Hartl et al. 2011; Minoia et al. 2014). Speziell das Auftreten von Aggregaten kann der Zelle Schaden zufügen. Besonders kritisch sind Aggregate dann, wenn die Zelle nicht in der Lage ist die Aggregate fachgerecht abzubauen. Das Protein *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43) liegt typischerweise im Nukleus vor. Hier dient es als RNA-bindendes Protein. Es ist also in *splicing*, Transkription und Transport von RNA involviert. Auch ist TDP-43 essenziell für die Bildung von Myotuben beziehungsweise Sarkomeren, da die dafür nötige RNA von TDP-43 transportiert wird. Unter mechanischer Belastung kommt es im Muskel zu einer Veränderung der Lokalisation von TDP-43. Somit ist ein Anstieg von TDP-43 im Zytoplasma zu beobachten. Im Zytoplasma kann ein verstärktes Vorkommen von TDP-43 ein Indikator für einen Anstieg von Aggregaten sein. Meist ist gerade der Muskel während seiner Differenzierung in der Lage diese Aggregate abzubauen. Sollte es der Zelle jedoch nicht möglich sein, kommt es zu einem

kritischen Akkumulieren von aggregierten Proteinen (Cutler et al. 2019; Guerrero et al. 2016; Rambaran und Serpell 2008; Vogler et al. 2018).

Eine gestörte Proteostase kann zu einer Vielzahl an neurodegenerativen Erkrankungen führen. Beispielsweise liegt ein Ungleichgewicht und eine Akkumulation von Proteinaggregaten bei Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder auch Chorea Huntington vor. Pathologisch zeigt sich hier gehäuft eine Proteinopathie. Allerdings spielt eine gestörte Proteostase häufig auch eine Rolle bei Krankheitsbildern wie Diabetes Mellitus oder auch Krebserkrankungen. Die Fähigkeit der Proteostase nimmt zusätzlich mit dem Alter ab. Somit steigt im fortgeschrittenen Alter das Erkrankungsrisiko an zuvor genannten Krankheiten (Arndt et al. 2010; Bhat et al. 2014; Choe et al. 2016; Gamerdinger et al. 2009; Ulbricht et al. 2013a).

## **1.5 Abbau-Systeme - Relevante Abbauege zur Erhaltung der Proteostase**

Es ist keinem Organismus möglich ohne eine funktionsfähige Proteostase zu überleben, daher spielen neben der Synthese neuer Proteine besonders der Abbau von entfalteten und beschädigten Proteinen, sowie von Proteinaggregaten eine große Rolle. Für den Abbau von Proteinen gibt es unterschiedliche Optionen. Besonders die Autophagie mit ihren unterschiedlichen Formen hat neben dem proteasomalem Abbau eine große Bedeutung. Die Systeme zum Abbau, sowohl Autophagie wie auch der proteasomale Abbau, sollten jedoch nicht nur mit der alleinigen Funktion des Abbaus fehlerhafter Proteine in Verbindung gebracht werden. Der Abbau erfüllt weitere essenzielle Funktionen, wie beispielsweise die Gewinnung von Energie in Hungerperioden oder die Bereitstellung neuer Bausteine zur Neusynthese von Proteinen (Gatica et al. 2018; Mizushima et al. 2008).

### **1.5.1 Proteasomaler Abbau**

Ein potentieller Mechanismus um ein fehlerhaftes oder beschädigtes Protein abzubauen, ist der Abbau über das zytosolische Proteasom. Das Proteasom besteht aus einer 20S-Einheit mit katalytischer Proteaseaktivität und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten. Es kommt zuerst, vor dem endgültigen Abbau des Proteins, über mehrere enzymatische Reaktionen zum Markieren des Proteins mittels Ubiquitin. Dabei wird durch Ubiquitin-Ligasen eine Kette aus Ubiquitinen geknüpft. Die so entstandene Polyubiquitinkette wird von der 19S-Untereinheit erkannt. Durch die Interaktion mit der 20S-Untereinheit, welche proteolytisch aktiv ist, erfolgt der Abbau des markierten Proteins. Dabei wird, vor Einbringen des abzubauenen Proteins in die 20S-Untereinheit, die Ubiquitinkette abgebaut. Die Kette wird dabei in einzelne Ubiquitin Moleküle zerlegt. Diese Ubiquitine werden nicht mitabgebaut, sondern können erneut verwendet werden (Ji und Kwon 2017; Minoia et al. 2014; Tanaka 2009).

Weiter besteht für die 20S-Untereinheit auch die Option, unter vermehrtem Stress oder wenn es zu einer Vielzahl an geschädigten Proteinen kommt, teilweise direkt Zielstrukturen abzubauen (Ben-Nissan und Sharon 2014).

### **1.5.2 Autophagie**

Ein weiterer Weg des Abbaus fehlerhafter Proteine ist die Autophagie. Übersetzt aus dem altgriechischem bedeutet Autophagie sich selbst verzehrend. Sie ist also nicht limitiert im Abbau und kann, bis zum Zelltod, alle Strukturen, von beschädigten oder fehlerhaften Proteinen bis hin zu voll funktionsfähigen Organellen, abbauen.

Die Autophagie wird häufig in drei verschiedenen Formen unterteilen. Meist wird in die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die CMA unterschieden. Die Makroautophagie ist dabei die am besten erforschte der genannten Formen und bildet einen mehrstufigen Prozess ab. Dabei wird das abzubauen Protein mit einer Membran umschlossen. Dies wird als die Bildung des Phagophors bezeichnet. Das Phagophor bezeichnet eine wachsende Lipiddoppelmembran welche im Folgenden zu einem Autophagosom heranwächst. Die geschlossene Lipiddoppelmembran umschließt dabei alle Komponenten welche abgebaut werden sollen. Durch das Verschmelzen des Autophagosoms mit einem Lysosom erfolgt die Bildung des Autophagolysosoms. Das Autophagolysosom ist in der Lage, die umschlossenen Proteine in ihre einzelnen Bestandteile zu zerlegen. Dies erfolgt mittels saurer Hydrolasen aus dem Lysosom. Die Proteine können nach dem vollständigen Abbau erneut als Bausteine für die Synthese neuer Proteine dienen oder zur Energiegewinnung verwendet werden (Gatica et al. 2018; Ravikumar et al. 2010).

Die Makroautophagie zeichnet sich, wie der Name bereits vermuten lässt, dadurch aus, dass auch verhältnismäßig große Strukturen und Proteine über diese Form eliminiert werden können. Für kleinere Proteine kann beispielsweise die Mikroautophagie den Abbau übernehmen. Dabei kommt es zur direkten Aufnahme des Proteins in das Lysosom. Hierfür kann das Lysosom seine Membran einstülpen und die Aufnahme ermöglichen. Die CMA zeichnet sich durch die Zusammenarbeit mit sogenannten Chaperonen, wie dem Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), aus. Die abzubauen Proteine werden durch die Chaperone wahrgenommen und zum Lysosom überführt. Der Abbau erfolgt auch bei diesem Weg durch das Lysosom. Die Aufnahme ist rezeptorvermittelt und zur Entfaltung der räumlichen Anordnung der Proteine werden Chaperone eingesetzt. Es kommt also bei der CMA zu keiner Bildung von Autophagosomen (Behl 2011; Kaushik und Cuervo 2012; Kaur und Debnath 2015; Luthold et al. 2020; Ravikumar et al. 2010; Ulbricht et al. 2013a).

### 1.5.3 Chaperone beim Proteinabbau - Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA)

Eine spezielle Form der Makroautophagie stellt die Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) dar. Diese zeichnet sich besonders durch den Gebrauch von Chaperonen und Chochaperonen aus. Speziell in Muskel-, Immun- oder Nervenzellen trägt CASA einen essenziellen Beitrag zum Erhalt der Proteostase bei. Durch den Einfluss von mechanischer Belastung kann CASA aktiviert werden. Für den Abbau eines Proteins mittels CASA wird ein spezifischer Komplex gebildet. Dieser formiert sich aus dem Cochaperon *BCL2 associated athanogene 3* (BAG3), dem Chaperon Hsp70 aus der Hsp70-Familie und dem kleinen Hitzeschockprotein HspB8. Weiter bindet das Protein *C-terminus of Hsp70-Interacting Protein* (CHIP) an dem Komplex. CHIP stellt eine chaperonassoziierte Ubiquitinligase dar. Diese kann mittels Ubiquitin die abzubauenen Strukturen markieren. Der Komplex rekrutiert über p62 (SQSTM1 – Sequestome-1) und die BAG3 vermittelte Interaktion mit Synaptopodin 2 (SYNPO2) an der gebildeten Phagophorenmembran. Diese umschließt im folgenden Schritt, der Bildung des Autophagosoms, den Komplex mitsamt dem abzubauenen Protein. Weiter erfolgt, wie bei der Makroautophagie beschrieben, die Verschmelzung mit einem Lysosom, sodass der Abbau der Proteine, sowie des BAG3-Komplexes erfolgen kann (Arndt et al. 2010; Behl 2011; Minoia et al. 2014; Ulbricht et al. 2013a; Ulbricht et al. 2013b).

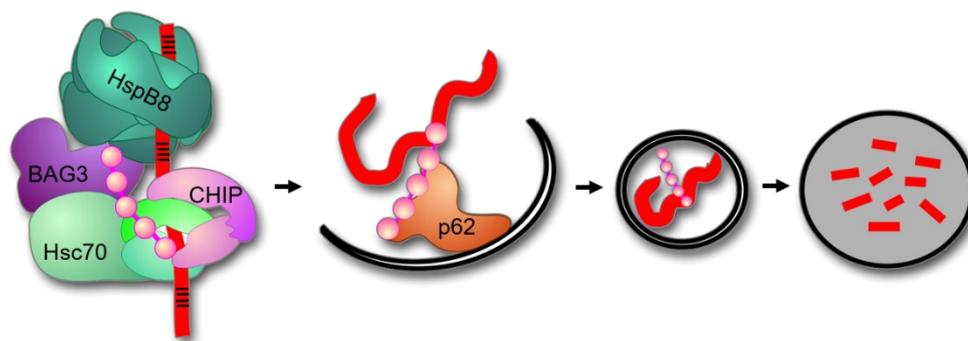


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Abbaus durch CASA.

Durch die Interaktion von BAG3 mit Hsp70 und CHIP formiert sich der CASA-Komplex. Das abzubauenen Protein wird durch HspB8 stabilisiert. Durch CHIP kommt es zur Ubiquitinierung des Proteins. Weiter erfolgt die Rekrutierung über p62 an der Phagophorenmembran. Diese bildet sich und umschließt dabei den Komplex. Durch die Fusion mit einem Lysosom kommt es zum Abbau der Bestandteile innerhalb des sogenannten Autolysosoms. Abbildung modifiziert nach Ulbricht et al. (2013a; 2015).

Speziell im Muskelgewebe ist CASA von großer Bedeutung. Dies wird deutlich durch die Funktion von CASA in der quergestreiften Muskulatur. Wie bereits unter 1.3.2 beschrieben, stellt Filamin eines der bekanntesten Proteine dar, welches durch CASA abgebaut wird. Filamin lokalisiert in der quergestreiften Muskulatur an Aktinfilamenten. Dort fungiert es als Quervernetzer des Aktins. Eine vergleichsweise ähnliche Lokalisation des CASA-Komplexes kann man in glatten Muskelzellen feststellen. Hier wird der Komplex an Aktin-Stressfasern rekrutiert. Sobald eine Spannung und somit mechanische Kraft durch die Zelle aufgebracht wird, kommt es zum CASA-vermittelten Abbau. Defizite des Abbaus von Filamin durch CASA äußern sich in der Störung und Veränderung der Muskelarchitektur (Arndt et al. 2010; Mizushima und Sadoshima 2017; Ulbricht et al. 2013b).

## **1.6 BAG3 - Mechanisch regulierte Proteostase-Systeme**

### **1.6.1 BAG3 Bindedomänen und Bindepartner**

Wie zuvor dargestellt, spielt BAG3 eine essenzielle Rolle in der Proteostase. BAG3 gehört zu den Cochaperonen und übernimmt, neben dem Abbau durch CASA, auch Aufgaben im Bereich der Translation und Transkription. Somit stellt BAG3 ein multifunktionales Protein dar, welches die Synthese von Proteinen beeinflussen kann und am Abbau dieser schlussendlich involviert ist (Höhfeld et al. 2021; Klimek et al. 2017; Rosati et al. 2011).

Für diese unterschiedlichsten Funktionen besitzt BAG3 verschiedene Domänen, welche mit spezifischen Funktionen und unterschiedlichen Bindepartnern in Verbindung gebracht werden können. Über die WW Domäne kommt es zur Interaktion mit Bindepartnern, die ein PxxP Motiv aufweisen. Als Beispiele seien hier *large tumor suppressor kinase 1* (LATS1) und *large tumor suppressor kinase 2* (LATS2), *angiomin-like protein 1* (AMOTL1) und *angiomin-like protein 2* (AMOTL2) oder Hamartin (TSC1) genannt (Kathage et al. 2017; Klimek et al. 2019; Sudol und Harvey 2010). Die WW-Domäne, an welcher prolinreiche Regionen binden können, ist für die Bildung von Autophagosomen wichtig. SYNPO2 besitzt solch eine Region und ist somit ein adäquater Bindepartner (Ulbricht et al. 2013a).

Weiter findet sich die namensgebende BAG-Domäne, diese ist für die Bildung des CASA-Komplexes unerlässlich. Über die BAG-Domäne kommt es zur Interaktion mit der ATPase Domäne von Hsp70 (Arndt et al. 2010; Klimek et al. 2017).

Auch ein PxxP Motiv lässt sich finden. Dieses kann mit Dynein und somit mit dem intrazellulären Transportsystem der Zelle in Verbindung gebracht werden (Mizushima und Sadoshima 2017). Mittels diesem Cargosystem lässt sich der Proteintransport oder auch das Bewegen von Aggregaten innerhalb der Zelle bewältigen.

Weitere vorliegende Bindemotive sind IPV-Motive, welche kleine Hitzeschockproteine binden können. Neben HspB8 können auch diverse andere kleine Hitzeschockproteine mit BAG3 interagieren (Arndt et al. 2010; Carra et al. 2008; Crippa et al. 2010).

Weiter liegen 14-3-3 Bindestellen mit RSQS-Motiven vor. Die 14-3-3 Proteinen spielen in einer Vielzahl von Prozessen eine Rolle und können zum Beispiel mit Proteinen interagieren, welche direkt mTOR regulieren (Xu et al. 2013).

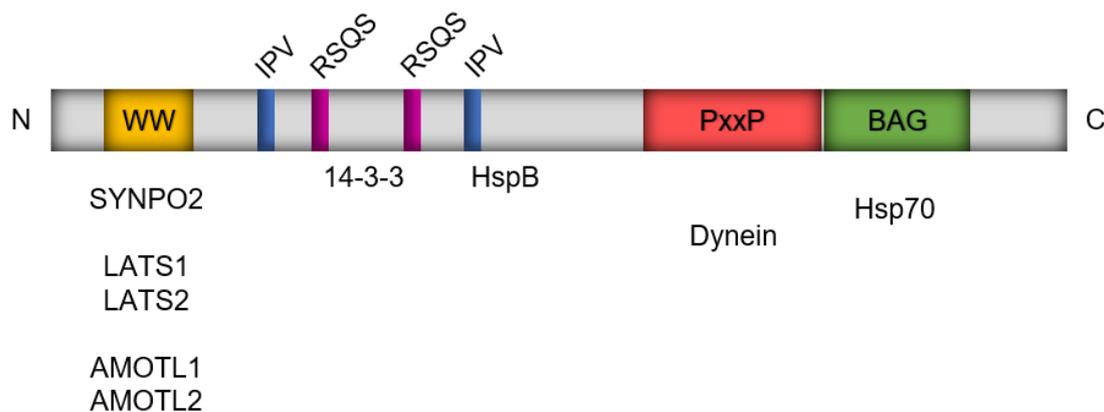


Abbildung 6: Darstellung der BAG3 Bindedomänen und ausgewählter Bindepartner.

Abbildung modifiziert nach Klimek et al. (2017).

### 1.6.2 BAG3 und seine mechanisch regulierten Phosphorylierungsstellen

Die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung betrifft eine Vielzahl an Proteinen und stellt eine bedeutende posttranslationale Modifikation dar. Häufig führt hier eine Änderung zu einer Aktivierung oder Deaktivierung von beispielsweise Enzymen, Rezeptoren, Signalkaskaden und weiteren Prozessen (Walsh et al. 2005). Fehlerhafte Phosphorylierungsreaktionen sind häufig mit schwerwiegenden Erkrankungen assoziiert (Ardito et al. 2017).

Unter dem Einfluss von mechanischer Belastung zeigt BAG3 eine veränderte Phosphorylierung unterschiedliche Positionen. Meist zeigt sich unter mechanischer Belastung eine Dephosphorylierung von BAG3. Durch verschiedene Arbeiten konnten so bereits einige kraftregulierte Phosphorylierungsstellen sowohl im humanen Muskel, als auch in Mausmyotuben spezifisch nachgewiesen werden. Die Arbeiten von Hoffman et al. (2015) konnten in humanen Muskelproben verschiedene, durch mechanische Belastung, beeinflusste Phosphorylierungsstellen zeigen. Durch Reimann et al. (2017) konnten weitere Analysen mechanisch regulierten Phosphorylierungsstellen in BAG3 in Mausmyotuben zeigen. Dabei konnte der Phosphorylierungsstatus mit dem Widerstand gegenüber mechanischem Stress in Verbindung und somit ein Schutzmechanismus gezeigt werden. (Hoffman et al. 2015; Reimann et al. 2017)

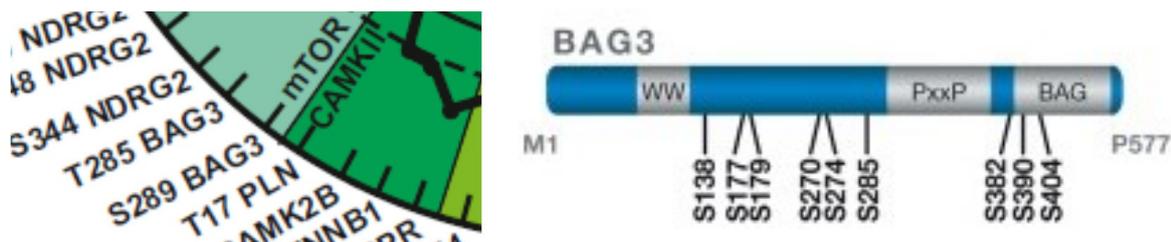


Abbildung 7: Mechanische regulierte Phosphorylierungsstellen von BAG3.

Abbildungen modifiziert nach Hoffman et al. (2015) und Reimann et al. (2017).

Tabelle 1: Mechanisch regulierte Phosphorylierungsstellen von BAG3.

Maus Myotuben Position	Veränderung durch Elektropulsstimulation	humaner Muskel Position	Veränderung durch mechanische Belastung
S138	Dephosphorylierung	S136	
S179	Dephosphorylierung		
		S195	Phosphorylierung
S270	Dephosphorylierung	S264	Dephosphorylierung
S274	Dephosphorylierung		
		S275	Dephosphorylierung
S285	Dephosphorylierung	S279	Dephosphorylierung
T291	Dephosphorylierung	T285	Dephosphorylierung
		S289	Dephosphorylierung
S297	Dephosphorylierung		
S380	Dephosphorylierung		
S390	Dephosphorylierung		
S404	Dephosphorylierung		

Dephosphorylierung: Reguliert nach unten

Phosphorylierung: Reguliert nach oben

### 1.6.3 BAG3 in der Transkription und Translation

Über die WW-Domäne können Proteine mit prolinreichen Motiven an BAG3 binden. So ist es möglich, dass BAG3 TSC1 mit seinem PY-Motiv bindet. TSC1 liegt im sogenannten TSC Komplex, zusammen mit Tuberin (TSC2), vor. Dieser Komplex beeinflusst mTOR Komplex 1 (mTORC1) wie auch mTOR Komplex 2 (mTORC2). mTOR ist eine Kinase und Bestandteil der beiden mTORC Komplexe. Liegt mTORC1 aktiviert vor, so kommt es zu

verschieden anabolischen Prozessen. Beispielsweise wird die Translation stimuliert und gleichzeitig der Abbau durch die Autophagie inhibiert. Der TSC-Komplex ist in der Lage mTORC1 zu inhibieren. Dies würde, ebenfalls wie Hunger, zur Folge haben, dass die Translation inhibiert und zeitgleich die Autophagie gesteigert wird (Quy et al. 2013; You et al. 2015). BAG3 ist, wie erwähnt in der Lage TSC1 zu binden. Somit wird der TSC-Komplex aufgrund von BAG3 an Aktinfilamenten oder Aktinstressfasern rekrutiert. Hier kommt es aufgrund der Funktion des TSC-Komplexes zur lokalen Inhibition von mTORC1 und somit zur gesteigerten Autophagie. Durch die BAG3-vermittelte Lokalisation wird so der Abbau von mechanisch entfaltetem Filamin, welches als Aktinquervernetzer fungiert, induziert. Durch die autophagische Prozessierung mittels CASA wird neben Filamin und dem CASA-Komplex auch der TSC-Komplex abgebaut. Gleichzeitig, da die gesteigerte autophagische Funktion lokal begrenzt ist, kommt es nicht mehr zur Inhibition von mTORC1. Die mTORC1 Inhibitoren liegen verringert vor und mTORC1 kann so die Translation stimulieren (Dikic 2017; Goodman 2014; Jacobs et al. 2014; Kathage et al. 2017).

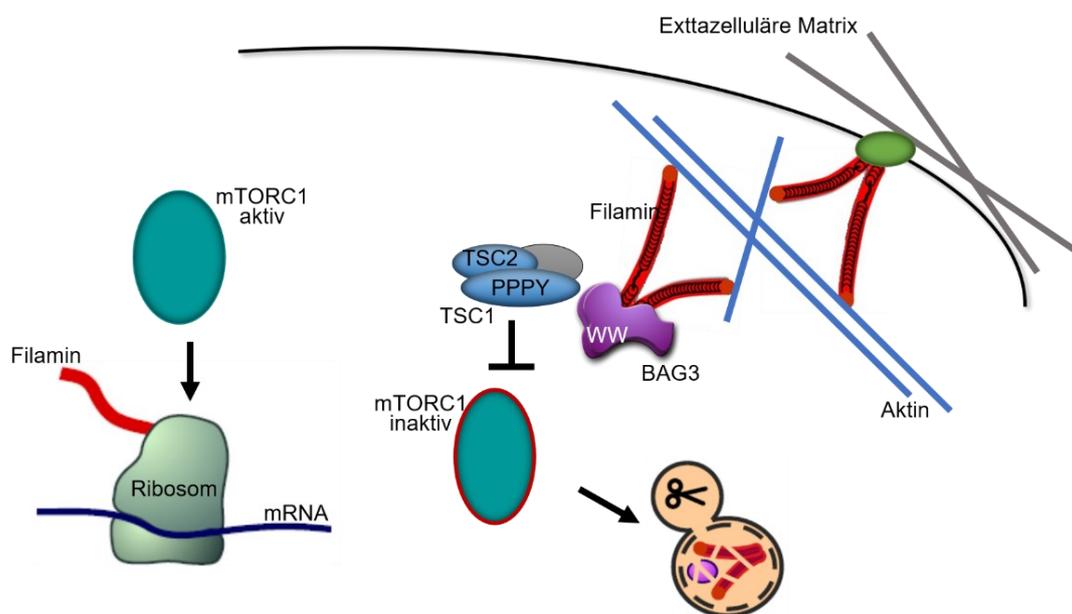


Abbildung 8: Interaktion von TSC1 mit BAG3.

Durch die Interaktion der WW Domäne von BAG3 mit dem PPPY Motiv von TSC1 kommt es zur Inhibition von mTORC1. Da BAG3 an Aktin lokalisiert ist, um dort mechanisch entfaltetes Filamin abzubauen, kommt es dort aufgrund der Hemmung von mTORC1 zur Autophagie. Gleichzeitig kommt es im Zytoplasma zur Translation von Filamin, da dort keine lokale Inaktivierung von mTORC1 stattfindet. Abbildung modifiziert nach Kathage et al. (2017).

Weiter kann BAG3 über seine WW-Domäne zur verstärkten Transkription von Filamin beitragen. Hierfür wird der Hippo-Signalweg, welcher für die Regulation von Proliferation und Wachstum bekannt ist, beeinflusst. Die Kinasen LATS1 und LATS2 weisen wie auch AMOTL1 und AMOTL2 ein PY-Motiv auf. Dieses kann mit WW-Domänen, wie sie BAG3 besitzt, interagieren. Im Zytoplasma findet man an LATS1 und LATS2 wie auch an AMOTL1 und AMOTL2 die Transkriptionsfaktoren *Yes-associated protein 1* (YAP) und *WW-domain-containing transcription regulator 1* (TAZ) gebunden vor. YAP und TAZ weisen ebenfalls eine WW Domäne auf und werden durch die Bindung an LATS1 und LATS2 bzw. AMOTL1 und AMOTL2 am Transport in den Nucleus gehindert. BAG3 ist in der Lage, LATS1 und LATS2 ebenso wie AMOTL1 und AMOTL2 zu binden. Somit kann YAP und TAZ in den Nucleus gelangen und die Transkription induzieren. Ein spezielles Zielgen, welches von YAP und TAZ transkriptionell reguliert wird, ist Filamin. Somit führt eine BAG3-vermittelte Aktivierung von YAP und TAZ zu einer verstärkten Transkription von Filamin (Dupont et al. 2011; Klimek et al. 2019; Kathage et al. 2017; Sudol und Harvey 2010; Yu und Guan 2013).

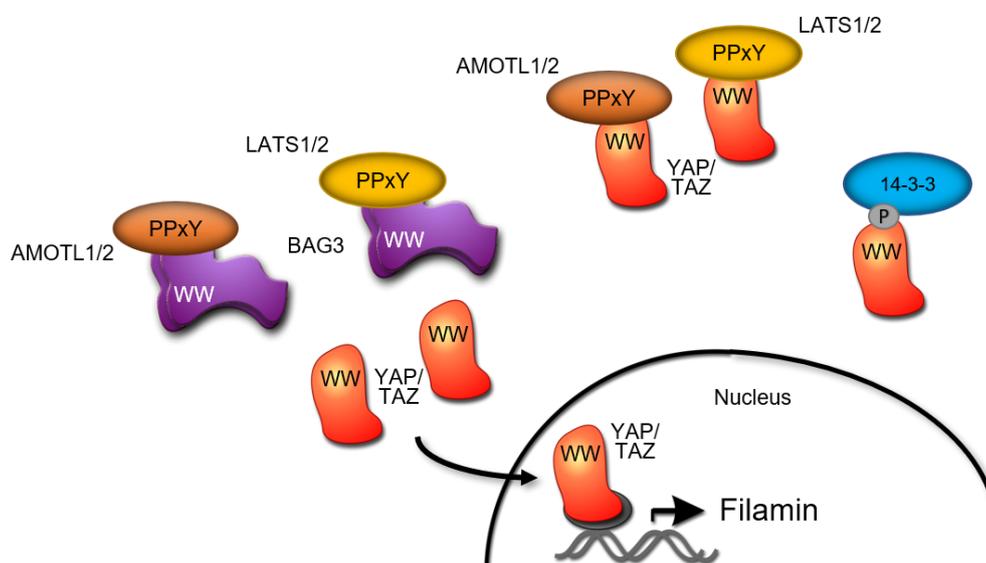


Abbildung 9: BAG3-vermittelte Transkription von Filamin.

BAG3 ist aufgrund der WW Domäne in der Lage die beiden Transkriptionsfaktoren YAP und TAZ zu aktivieren. Die beiden Transkriptionsfaktoren weisen beide eine WW Domäne auf. Im Zytoplasma liegen YAP und TAZ gebunden an LATS1 und LATS2 sowie an AMOTL1 und AMOTL2 vor. Aufgrund dessen ist es YAP und TAZ nicht möglich in den Nucleus zu migrieren. Aufgrund der WW Domäne kann BAG3 LATS1 und LATS2 wie auch AMOTL1 und AMOTL2 binden und dadurch YAP und TAZ freisetzen. Somit ist es YAP und TAZ möglich, die Lokalisation zu ändern und im Zellkern die Transkription zu Zielgenen zu aktivieren. Eines dieser Zielgene ist das Filamin. Abbildung modifiziert nach Kathage et al. (2017).

#### 1.6.4 BAG3 in der Autophagie

Unter mechanischer Belastung kommt es in Muskelzellen zur Entfaltung von Filamin. Ist es nicht möglich, die Entfaltung rückgängig zu machen, kommt es zum Abbau durch CASA. Hier zeigt sich eine weitere Funktion von BAG3. Der CASA-Komplex wird durch die Interaktion von BAG3 über seine BAG-Domäne mit Hsp70 und über IPV-Motive mit HspB8 Dimeren gebildet. Es kommt zur Anlagerung der Ubiquitinligase CHIP wodurch das abzubauen chaperonegebundene Filamin, mit Ubiquitin markiert wird. Folgend kann p62 binden und so den gesamten Komplex einschließlich des Filamins an der Phagophorenmembran rekrutieren. Zur gleichen Zeit kommt es zu einer Interaktion zwischen BAG3 und SYNPO2. Hierdurch wird die Phagophorenfusion vermittelt und anschließend das Verschmelzen des Autophagosoms mit einem Lysosom induziert, sodass die CASA-Maschinerie mitsamt des Filamins abgebaut werden kann. Dreh- und Angelpunkt des Abbaus von mechanisch entfaltetem Filamin ist somit BAG3. Aufgrund seiner vielen Bindestellen und Bindepartner ist der komplexe Ablauf der CASA von BAG3 abhängig (Arndt et al. 2010; Fuchs et al. 2015; Gamerding et al. 2011b; Ganassi et al. 2016; Judge et al. 2017; Mizushima und Sadoshima 2017; Rauch et al. 2017; Ulbricht et al. 2013a; Ulbricht et al. 2015).

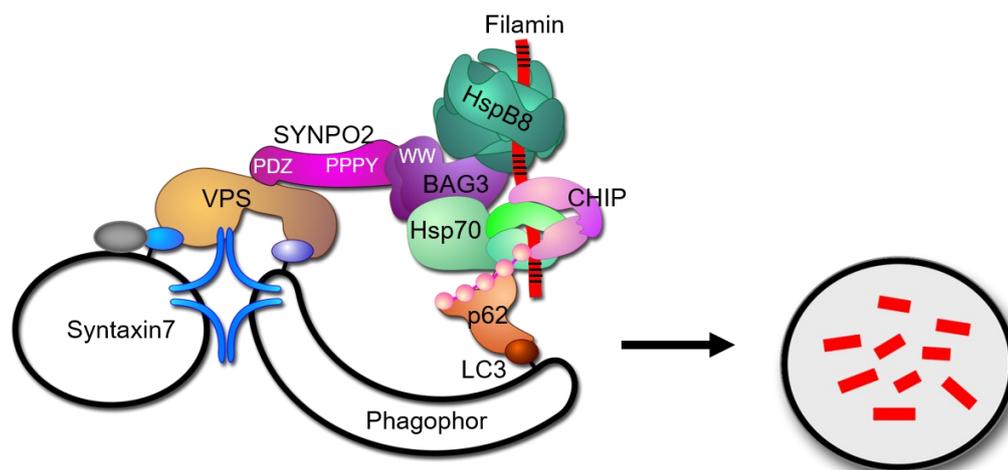


Abbildung 10: BAG3 im CASA-Komplex vermittelt den Abbau von Filamin.

BAG3 interagiert mit HspB8 und Hsp70. Zusätzlich wird der Komplex durch die E2 Ligase CHIP ergänzt und es kann zur Ubiquitinierung von Zielproteinen wie Filamin kommen. Über die WW Domäne interagiert BAG3 mit SYNPO2. Durch p62 kommt es zur Rekrutierung an der Phagophorenmembran. Über SYNPO2 wird die Phagophorenfusion vermittelt. Anschließend kommt es zu einem verschmelzen des gebildeten Autophagosoms mit einem Lysosom und es erfolgt der Abbau des Komplexes. Abbildung modifiziert nach Kathage et al. (2017).

### **1.6.5 Klinisch relevante Mutationen und Defizite**

Von einer klinisch relevanten Mutation im BAG3-Gen wurde erstmals 2009 berichtet. Bei dieser heterozygoten Mutation komme an Stelle 209 statt der eigentlichen Aminosäure Prolin die Aminosäure Leucin vor. Mit dieser Mutation ist eine Muskelschwäche, Kardiomyopathie sowie Ateminsuffizienz assoziiert. Diese Symptome treten bereits im Kindesalter auf und sind letzten Endes letal (Selcen et al. 2009). Auch weitere klinische relevante Mutationen zeigen ein spezifisches Bild. Meist wird von Myopathien und Dystrophien der gesamten Muskulatur berichtet. Besonders dramatisch äußert sich dies bei den lebensnotwendigen Muskeln wie dem Herzen. Aufgrund der Funktion von BAG3 zeigt sich, warum ein Fehler oder gar das Fehlen von BAG3 einen, für den Organismus; letalen Zustand beschreibt (Arimura et al. 2011; Arndt et al. 2010; Claeys und Fardeau 2013; Fang et al. 2017; Homma et al. 2006). Auch weitere Proteine werden beeinflusst. Vor allem Proteine, welche für die Bildung und Aufrechterhaltung der Sarkomere verantwortlich sind, werden hier in Mitleidenschaft gezogen (Homma et al. 2006; Kostera-Pruszczyk et al. 2015; Meister-Broekema et al. 2018).

### **1.6.6 Filamin als direkte Zielstruktur von BAG3**

Besonders in Muskelzellen ist Filamin, wie zuvor beschrieben, von großer Bedeutung. Im Speziellen in der quergestreiften Muskulatur ist Filamin als Aktin bindendes Protein bekannt. Mit seiner Größe von rund 250 kDa liegt Filamin als homodimerer Komplex vor. Lokalisiert ist es hier an den Z-Scheiben und dient der Quervernetzung des Aktins. Unter mechanischem Stress wird Filamin entfalten. Diese Entfaltung wird von BAG3 und der CASA Maschinerie erkannt und führt zum Abbau des Proteins. Dabei wird, aufgrund der mechanischen Entfaltung, die Ig Domäne 19-21 frei, woran der BAG3-Komplex binden kann. Gleichzeitig wird über die zuvor beschriebenen Signalwege die Transkription und Translation von Filamin induziert. Dies macht deutlich, dass die Filaminhomöostase direkt mit der Funktion von BAG3 verknüpft ist. So sind besonders unter Einfluss von mechanischem Stress beide Proteine für eine Aufrechterhaltung der Proteostase unerlässlich (Arndt et al. 2010; Klimek et al. 2017; Ulbricht et al. 2013a; Varlet et al. 2017).

Auch bei Mutationen oder gar dem Fehlen von Filamin zeigen sich schwerwiegende Einschnitte in die Funktionsfähigkeit der Zelle und letzten Endes des Organismus. Aggregate von Filamin in Herz- und Skelettmuskel weisen häufig auf eine fehlerhafte Autophagie hin. Auch kommt es zu pathologischen Veränderungen der Muskelstruktur und somit wie auch bei BAG3 Defiziten zu Muskeldystrophien oder Myopathien (Arimura et al. 2011; Ehrlicher et al. 2011; Kostera-Pruszczyk et al. 2015; Linnemann et al. 2010; Martin et al. 2021; Ruparelia et al. 2016; Ulbricht et al. 2015).

## 1.7 Zielsetzung

Aufgrund der verschiedenen Interaktionen, die BAG3 in Muskelzellen vermitteln kann, sollen weitere Erkenntnisse über den Einfluss des Phosphorylierungszustandes generiert werden. Dabei soll besonders die Lokalisation an Aktinstressfasern unter Phosphorylierung oder Dephosphorylierung in Glattmuskelzellen untersucht werden. Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten konnten bereits den Einfluss des Phosphorylierungszustands von BAG3 auf die CASA Aktivität oder die Interaktion mit HspB8 zeigen. Auch der Einfluss von BAG3 auf die Translation über mTORC1 soll weiter untersucht werden. Dabei soll geklärt werden, ob eine Abhängigkeit von der Kraft-regulierten Dephosphorylierung von BAG3 besteht.

Zudem soll in quergestreiften Muskelzellen mittels Elektropulsstimulation eine mechanische Belastung erzeugt werden und die Lokalisation von BAG3-Interaktionspartnern weiter analysiert werden. Von besonderer Relevanz ist hier die Entstehung von Läsionen, da hier mechanisch entfaltetes Filamin anfällt, welches mittels CASA abgebaut werden muss. Anhand der Untersuchungen der Proteine von Interesse innerhalb der Läsionen sollen Rückschlüsse auf die CASA Aktivität oder weitere Mechanismen zum Abbau und der Reparatur von Filamin möglich sein. Zusätzlich soll ein Zusammenhang der akuten mechanischen Belastung in Abhängigkeit der Intensität untersucht werden. Hierfür soll nach verschiedenen intensiven Behandlungen die Akkumulation eines Proteins innerhalb der Läsionen betrachtet werden.

Neben den Auswirkungen der akuten mechanischen Belastung soll der Einfluss der Prästimulation auf die Entstehung der Läsionen in Myotuben untersucht werden. Als Prästimulation soll ein gleichbleibender, sehr geringer mechanischer Reiz auf die Zellen einwirken, um eine mögliche Adaption der Zellen zu zeigen. Abschließend soll ein erster Eindruck gewonnen werden, ob es unter akutem mechanischem Stress verstärkt zur Bildung von Aggregaten kommt und ob eine Adaption aufgrund der Prästimulation der Myotuben einen Einfluss zeigen kann.

## 2 Methoden und Materialien

### 2.1 Methoden

#### 2.1.1 Methoden im Umgang mit *Escherichia coli*-Bakterien

##### 2.1.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Bakterien

In Tabelle 2 ist die Zusammensetzung des LB-Mediums sowie der LB-Agarplatten dargestellt. Die gebrauchsfertigen Lösungen wurden stets vor Verwendung autoklaviert. Die verwendeten *E. coli* Stämme TG-1 und XL-1 *Blue* wurden zur Amplifikation von Plasmiden herangezogen. Zum Animpfen von Flüssigkulturen wurden einzelne Klone einer zuvor auf Agarplatten ausplattierten Kultur, Glycerolstocks oder vorgeschalteten kleine Flüssigkulturen verwendet. Die Bakterien wurden in LB-Medium unter Zugabe eines Selektionsantibiotikums bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,3 bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

Tabelle 2 Zusammensetzung von LB-Medium und LB-Agar

<b>LB-Medium</b> (+/-Selektionsantibiotikum)	<b>LB-Agar</b> (+Selektionsantibiotikum)
1 % BactoTrypton	1 % BactoTrypton
0,5 % Bacto-Hefeextrakt	0,5 % Bacto-Hefeextrakt
0,5 % NaCl	0,5 % NaCl
	1,5 % Bacto-Agar
pH 7,5	pH 7,5
Antibiotikum 1:1000 (Kanamycin 50 mg/ml, Ampicillin 200 mg/ml)	Antibiotikum 1:1000 (Kanamycin 50 mg/ml, Ampicillin 200 mg/ml)

##### 2.1.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Um Plasmide einfach und effektiv in Bakterien zu transformieren, mussten diese eine Kompetenz erlangen. Hierfür wurden zweiwertige Kationen ( $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) verwendet. Zu Beginn wurde eine 2 ml Flüssigkultur des gewünschten *E. coli* Stammes über Nacht bei 37 °C und 200 rpm herangezogen. Von dieser Kultur wurden am darauffolgenden Tag 500 µl zu 100 ml LB-Medium gegeben. Diese wurden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase, was einer  $OD_{600}$  von 0,3 entspricht, kultiviert. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation auf Eis. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die

Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mittels 10 ml einer 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung konnte das Pellet resuspendiert werden. Im Folgenden wurde die Zentrifugation wiederholt und der Überstand erneut verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml einer 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugieren und dem Verwerfen des Überstandes wurden die Bakterien in einer 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung unter Zusatz von 15 % Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **2.1.1.3 Transformation chemisch kompetenter E. coli-Bakterien**

Die chemisch kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zu diesen wurde je nach Ausgangsmaterial 1 µg DNA der Plasmidpräparationen, oder 0,5 µg DNA des Ligationsansatzes gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock. Durch diesen soll die Aufnahme in das Bakterium erleichtert werden. Hierfür wurden die Ansätze für 1 min in einem 42 °C warmen Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Kultur für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Durch das folgende Zentrifugieren wurden die Bakterien sedimentiert und der Überstand konnte verworfen werden. Mit dem Rückfluss wurde das Pellet resuspendiert und anschließend mittels sterilem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Das Ausstreichen erfolgte auf Agarplatten, welche mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt waren. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## **2.1.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.1.2.1 Plasmidpräparation aus E. coli-Bakterien**

Um amplifizierte Plasmide aufzureinigen, wurde für kleine Kulturen (Volumina bis 5 ml) das NucleoSpin® Plasmid Kit und für größere Ansätze (Volumina bis 500 ml) das NucleoBond® Xtra Maxi Kit der Firma Macherey-Nagel eingesetzt. Alle Präparationen erfolgten nach den Angaben und Protokollen des Herstellers.

### **2.1.2.2 Polymerasekettenreaktion**

Die Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation klonierter Gensequenzen. Zu Beginn eines Zyklus erfolgt die Auftrennung der DNA-Stränge. Aufgrund dessen kommt es zur Anlagerung der spezifischen Primer an den entsprechenden Enden des zu amplifizierenden Abschnitts. Danach erfolgt die Amplifikation mittels KOD *Hot Start* Polymerase. So kommt es durch das Wiederholen der Zyklen zu einer exponentiellen Vervielfältigung einer definierten Gensequenz. Die KOD *Hot Start* Polymerase arbeitet

verhältnismäßig schnell mit 2000 Nukleotiden/min und besitzt weiter eine 3'-5' *Proofreading*-Funktion. Der jeweils zu amplifizierende Ansatz wurde nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema zusammengesetzt.

Tabelle 3 Zusammensetzung der Reagenzien für die PCR

Template DNA	1 µg
10 mM dNTPs	1 µl
10 pmol <i>sense</i> Primer	1 µl
10 pmol <i>antisense</i> Primer	1 µl
KOD-DNA Polymerase Puffer/	5 µl
KOD-DNA Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	x µl
Gesamtvolumen	50 µl

Anschließend wurde am Thermocycler das entsprechende PCR-Protokoll (Tabelle 4) gestartet.

Tabelle 4 PCR-Protokoll

	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	95	2
Denaturierung	95	0,3
Annealing	T <sub>m</sub> -5	0,16
Elongation	70	0,25/kb
Finale Elongation	70	10
Zyklen	40	

Abschließend wurde die PCR mittels NucleoSpin® Gel and PCR *Clean-up* Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und der Gehalt sowie die Reinheit am NanoDrop bestimmt.

### 2.1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für eine Auftrennung anhand der Größe von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei werden die negativ geladenen DNA-Fragmente durch elektroosmotische Auftrennung separiert. Kleine DNA-Fragmente können somit die Maschen des Gels schneller durchlaufen als große DNA-Fragmente. Hier wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und mit 1 µl SYBR® *Safe DNA gel stain* von Invitrogen™ versetzt. Dieser Farbstoff besitzt die Eigenschaft, in die DNA zu interkalieren und bei Anregung mit UV-Licht ein rot-oranges Signal zu emittieren. Die Auftrennung erfolgte bei 75 mA. Als Größenstandard diente der *GeneRuler™* DNA Ladder Mix von Thermo Scientific. So konnten die Plasmide vor einer Sequenzierung bereits einmal in ihrer Größe und auf Vollständigkeit geprüft werden. Dafür wurden die Plasmide an definierten Stellen mittels Restriktionsenzymen verdaut und anschließend auf das Gel aufgetragen.

### 2.1.2.4 Sequenzierung der Plasmide

Für eine Kontrolle der klonierten oder auch der amplifizierten Plasmide wurde eine Sequenzierung definierter und essenzieller Abschnitte durchgeführt. Diese erfolgte anhand des Sanger-Sequenzierungsprinzips durch einen externen Dienstleister. Hierfür wurden die Proben mit einem Gehalt von 50-100 µg/µl in einem Volumen von 20 µl dem Dienstleister zur Verfügung gestellt.

### 2.1.3 Methoden im Umgang mit eukaryotischen Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung und Transfektion von eukaryotischen Zellen erfolgten stets unter sterilen Bedingungen. Ebenfalls wurden alle Medien und Lösungen vor Verwendung auf 37 °C vorgewärmt. Die verwendete phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) sowie die Trypsin/EDTA-Lösung wurde für alle verwendeten Zelllinien in gleicher Zusammensetzung verwendet.

Tabelle 5 Zusammensetzung des verwendeten PBS

PBS
0,137 M NaCl
2,7 mM KCl
8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

---

### 2.1.3.1 Kultivierung von A7r5-Zellen

A7r5 (Glattmuskelzellen aus der Aorta der Ratte) wurden als adhärentes Monolayer bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-80 % erfolgte die Subkultivierung der Zellen. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für drei Minuten mit 1 ml 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. So wurden die Zell-Zell-Kontakte gelöst und extrazelluläre Proteine gespalten. Aufgrund der Reaktion lösten sich die Zellen von der Schale. Sobald die Zellen abgelöst und vereinzelt waren, wurde die Reaktion mit vorgewärmtem FCS-haltigem Medium gestoppt und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren bei 2000 rpm für 3 min wurde der Überstand, welcher die Trypsin/EDTA-Lösung enthält verworfen und das Pellet in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert. A7r5 Zellen wurden alle 3 Tage im Verhältnis 1:3 subkultiviert und auf 10 cm Schalen weiter kultiviert.

Tabelle 6 Zusammensetzung des Kulturmediums für A7r5

#### **Dulbecco's Modified Eagle Medium**

(+ 1g/L D-Glukose Pyruvat,  
- L-Glutamin, - Phenolrot)

10 % FCS
100 IU/ml Penicillin
100 IU/ml Streptomycin
4 mM L-Glutamin

### 2.1.3.2 Kultivierung von A7r5 auf Fibronectin

Zur Veränderung der Adhäsion und somit zur Induktion von selbstgenerierten mechanischen Kräften der Zellen kann Fibronectin eingesetzt werden. Hierfür wurden Deckgläser mit einer Lösung aus Fibronectin und PBS (50 µg/ml) für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Zellen darauf umgesetzt. Die Kultivierung (siehe 2.1.3.1) sowie anschließende Fixierung (siehe 2.1.4.1) und Färbung (siehe 2.1.4.2) erfolgten nach Standardbedingungen.

### 2.1.3.3 Kultivierung von C2-Zellen

Eine weitere etablierte Zelllinie stellen C2 Zellen dar. C2 Zellen sind Myoblasten aus der Maus, welche die Fähigkeit besitzen unter definierten Bedingungen zu Myotuben zu differenzieren. Kultiviert wurden die Zellen mit Proliferationsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80 %. Anschließend erfolgte eine Subkultivierung oder aber die Differenzierung der Zellen. Subkultiviert wurden C2 Zellen unter Standardbedingungen im Verhältnis 1:10-1:12. Auch hier liegen die Zellen als adhärenter Monolayer vor und wurden mittels PBS einmalig gewaschen. Anschließend wurden die C2 Zellen für 2 min mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde auch bei den C2 Zellen mit serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen folgend zentrifugiert (2000 rpm; 3 min) und mit frischem Proliferationsmedium weiter auf 10 cm Kulturschalen kultiviert.

Tabelle 7 Zusammensetzung des Proliferationsmediums für C2

#### **Dulbecco's Modified Eagle Medium**

(+4,5 g/L Glukose, -L-Glutamin,  
Pyruvat)

15 % FCS

100 IU/ml Penicillin

100 IU/ml Streptomycin

2 % Natrium-Pyruvat

1 % nicht essenzielle Aminosäuren  
(NEAA)

### 2.1.3.4 Differenzierung von C2 Zellen

Die Differenzierung wird zum einen durch den Zell-Zell-Kontakt der C2 Zellen selbst und zum anderen durch Zugabe des serumreduzierten Differenzierungsmedium induziert. Hierfür wurde an d<sub>0</sub> das Proliferationsmedium komplett von den Zellen abgenommen und durch Differenzierungsmedium ersetzt. Alle zwei Tage wurde ein Wechsel des Mediums durchgeführt und die Zellen bis d<sub>5</sub> kultiviert. Ab diesem Zeitpunkt war die Differenzierung soweit fortgeschritten, sodass spontane Kontraktionen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden konnten.

Tabelle 8 Zusammensetzung des Differenzierungsmediums für C2

**Dulbecco's Modified Eagle Medium**

(+4,5 g/L Glukose, -L-Glutamin,  
Pyruvat)

2 % Pferde-Serum

100 IU/ml Penicillin

100 IU/ml Streptomycin

2 % Natrium-Pyruvat

1 % nicht essenzielle Aminosäuren  
(NEAA)

### 2.1.3.5 Transfektion von A7r5 mittels JetPRIME®

Für die Überexpression der Proteine von Interesse wurden A7r5 Zellen mithilfe von JetPRIME® (Polyplus Transfection™) transient transfiziert. Hierfür wurde für A7r5 Zellen nach Herstellerprotokoll verfahren und bei einer Konfluenz von rund 60 % transfiziert. Da jedoch A7r5 Zellen eine verhältnismäßig große Fläche bei einer geringen Zellzahl zeigen, wurden die Angaben der Reagenzien, wie für 6 well Platten vorgesehen, auf 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass das Herstellerprotokoll für die Fläche einer 10 cm Schale eine höhere Zellzahl annimmt. Somit wurde in der Regel dem Medium der Zellen 2 µg DNA, 4 µl JetPRIME® und 200 µl JetPRIME® Puffer für 16 h zugesetzt. Anschließend erfolgte ein Medienwechsel. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion für die Experimente verwendet.

### 2.1.3.6 Behandlung von A7r5 Zellen mit Lysophosphatidsäure

Zur Induktion von Aktinstressfasern in A7r5 Zellen kann Lysophosphatidsäure (LPA) herangezogen werden. Hierfür wurden die konfluenten Zellen für 15 min mit LPA (10 µM) inkubiert. Da LPA in H<sub>2</sub>O gelöst war, konnte die Substanz zur Behandlung direkt ins Medium der Zellen gegeben werden. Anschließend erfolgte direkt die Fixierung (siehe 2.1.4.1) der Zellen.

### 2.1.3.7 Elektropulsstimulation von differenzierten Myotuben

Um Zellen mittels Elektropulsstimulation (EPS) behandeln zu können war es nötig, diese entweder in 6 well Platten oder 3,5 cm Zellkulturschalen zu kultivieren. Aufgrund der Form der Elektrode, welche exakt die Ausmaße einer 6 well Platte vorgibt, konnte nur in diesem Format

eine Stimulation der Zellen erfolgen. Die Stimulation erfolgte standardgemäß an d<sub>5</sub> der Differenzierung der C2 Zellen. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch mikroskopisch die erfolgte Differenzierung, also die Ausbildung von kontrahierenden Myotuben festgestellt werden. Zusätzlich wurde Medium in die Schalen gegeben, sodass die Kontakte der Elektrode sich in Flüssigkeit befanden und der Stromkreis stets geschlossen vorlag.

Es erfolgte die Stimulation nach etablierten Protokollen (siehe Tabelle 9). Hierfür wurden die C2 Zellen mit der Elektrode versetzt und für den gewünschten Zeitraum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> behandelt. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Stimulation wurde die Kontraktion der Myotuben unter dem Lichtmikroskop regelmäßig kontrolliert.

Tabelle 9 EPS Protokolle

	<b>Prästimulation</b>	<b><i>mild</i></b>	<b><i>twitch</i></b>	<b><i>damage</i></b>
Dauer	16 h	3 h	3 h	3 h 5 h
Sequenz	10 V; 4 ms 0,5 Hz	10 V; 4 ms 0,5 Hz	10 V; 10 ms 1 Hz	10 V; 10 ms 15 Hz für 5 s 5 s Pause 5 Hz für 5 s 5 s Pause

## 2.1.4 Biochemische Methoden

### 2.1.4.1 Fixieren von Zellen mit PFA oder Methanol/Aceton

Um die Zellen fixieren zu können, mussten diese vorerst einmalig mit *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) gewaschen werden, um alle Rückstände des Mediums und Serums komplett zu entfernen. Anschließend wurde mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) /PBS mit 0,25 % Ziegenserum (nGS) fixiert. Um diesen Vorgang bestmöglich zu unterstützen, erfolgte das Fixieren für 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation erfolgte das Färben der Zellen (siehe 2.1.4.2).

Eine weitere Möglichkeit Zellen zu fixieren stellt Methanol/Aceton dar. Für diese Methode wurde eine Lösung aus Methanol und Aceton (1:1) auf -20 °C vorgekühlt. Anschließend wurde auf die mit PBS gewaschenen Zellen 1 ml pro 6 well oder 3,5 cm Schale Methanol/Aceton Lösung gegeben und für 2 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen um alle Rückstände der Fixierlösung zu entfernen und es konnte mit dem Färben (siehe 2.1.4.2) fortgeföhren werden.

#### **2.1.4.2 Färben von fixierten Zellen**

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde, sofern mit PFA fixiert wurde, für 1 min mit *Tris-buffered saline with Tween20* (TBST) die Zellmembran permeabilisiert. Um die Eigenfluoreszenz des PFAs zu unterdrücken, erfolgte eine zehnmünütige Inkubation mit Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl). Dieser Schritt ist bei einer Fixierung mit Methanol/Aceton hinfällig. Um Rückstände wieder gänzlich zu entfernen, wurde dreimal mit TBST gewaschen, wobei im letzten Schritt das TBST für 10 min auf den Zellen verblieben war. Anschließend wurde über Nacht mit 10 % nGS/TBST blockiert. Folgend wurde die Blockierlösung abgenommen und durch den primären Antikörper ersetzt. Dieser wurde ebenfalls in 10 % nGS/TBST angesetzt. Unter Standardbedingungen wurde der Erstantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alternativ konnte eine Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt werden. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit TBST. Auch hier wurde beim letzten Waschschrift das TBST 10 min auf den Zellen gelassen. Der sekundäre Antikörper wurde folgend wieder in 10 % nGS/TBST angesetzt und für 2 h bei RT auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurde erneut mit TBST gewaschen, wobei im letzten der drei Waschschrift wieder 10 min inkubiert wurde. Anschließend wurde die Flüssigkeit komplett abgenommen. Bei den 3,5 cm Schälchen wurde der Rand der Schalen entfernt, sodass nur der mit Zellen bedeckte Boden verblieb. Dieser wurde mit 80 µl Fluoromount-G versetzt und anschließend ein 30 mm Deckglas aufgelegt. Die eingedeckelten Proben wurden über Nacht mit 2 ml H<sub>2</sub>O beschwert und anschließend mithilfe von Nagellack auf einem Objektträger fixiert. Bei Zellen, welche direkt auf Deckgläsern kultiviert wurden, konnte das Deckglas direkt auf einem Objektträger eingedeckelt werden. Hierfür wurde die Menge an Fluoromount-G entsprechend verringert. Die Proben konnten nun mittels Laser-Scanning-Mikroskop (LSM510) oder Zeiss *Cell Observer SD spinning disk* mikroskopiert werden.

#### **2.1.5 Statistische Analysen**

Für die statistische Analyse der Mikroskopiedaten wurden alle Experimente n≥5 durchgeführt. Anschließend wurden konfokale Aufnahmen an den Mikroskopen (LSM510, Zeiss *Cell Observer SD spinning disk*) generiert. Anhand dieser Aufnahmen wurden zufällig zwischen 30 und 50 Zellen/Myotubenabschnitte pro Bedingung für jeden einzelnen Versuch ausgewählt. Anhand dieser Zellen wurde mittels Fiji die Signalintensität sowie Flächen der zu analysierenden Strukturen ermittelt. Diese Daten konnten mittels Excel gegenübergestellt werden und so die voneinander unabhängigen Experimente analysiert werden. Zur Analyse des Signifikanzniveaus wurde der *Student's* T-Test durchgeführt. Ebenfalls wurde der Mittelwert (MW) sowie der Standardfehler (SEM) ermittelt.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verwendete Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugsystem	HLC Biotech/KNFlab Laboport
Autoklav	Tuttnauer Syntec
AxioObserver SD	Zeiss
Eismaschine	Scotsman
Elektropulsstimulationssystem	Ion Optix
Feinwaage SI-234	Denver Instruments
Gefrierschrank (-20 °C)	Siemens
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific
Heizblock	Eppendorf
Inkubator	Binder/ Thermo Scientific
Kühlschrank	Bauknecht
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf
Lichtmikroskop ID03	Zeiss
LSM510	Zeiss
Magnetrührer	Heildoph
Milli-Q-Plus Reinstwasseranlage	Merck
pH-Meter	Mettler Toledo
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe Accu-Jet R	Brand
Schüttelinkubator	Thermo Scientific
Sterilbank Microflow Biological safety cabinet	Nalge Nunc Industries
Thermocycler T3000	Eppendorf
Vortex	Scientific Industries
Waage	KernKB
Wasserbad	Lauda/Grant
Zeiss Cell Observer SD spinning disk	Zeiss

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
10 cm Zellkulturschalen	Sarstedt
24 well Platten	TPP
3 cm Zellkulturschalen	Greiner
6 well Platten	TPP/Sarstedt
Deckgläser	Roth
Objektträger	Roth
Parafilm	Bemis
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml / 50 ml	Falcon/Sarstedt
serologische Pipetten 5 ml / 10 ml	VWR

## 2.2.2 Chemikalien und *ready to use* Anwendungen

Tabelle 12: Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Roth
Ammoniumchlorid	Roth
Ampicillin	Roth
Bacto Trypton	Roth
Bacto-Agar	Roth
Bacto-Hefeextrakt	Roth
Calciumchlorid	Roth
DAPI	Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Ethanol	Roth
FCS (Fetales Kälber Serum)	PanBiotech
Fluoromount-G	Invitrogen
Glutamin	Life Technology
Glycerin	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kanamycin	Roth
LPA	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Roth
Natrium Pyruvat	Gibco
Natriumchlorid	Roth
nicht essenzielle Aminosäuren	Roth
Paraformaldehyd	Roth
Penicillin/Streptomycin	Life Technology
Pferde Serum	PanBiotech
Salzsäure (HCl)	Roth

Tris	Roth
Triton X100	Roth
Trypsin-EDTA 0.05 %	Gibco
Tween-20	Sigma-Aldrich
Ziegenserum	PanBiotech

Tabelle 13: Kits und fertige Anwendungen

Bezeichnung	Hersteller
JetPrime	PolyPlus
KOD DNA Polymerase	Merck
NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel
NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpinR Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel

### 2.2.3 Primer

Tabelle 14: Verwendete Primer für die Klonierung phosphomimetischer BAG3 Mutanten

Bezeichnung	Sequenz
S136A for	5'-cct cag agg tcc cag gca cct ctg cgg ggc a-3'
S136A rev	5'- tcg ccc gca gag gtg cct ggg acc tct gag g-3'
S136D for	5'-ctc aga ggt ccc agg acc ctc tgc ggg gca tg-3'
S136D rev	5'-cat gcc ccg cag agg gtc ctg gga cct ctg ag-3'

### 2.2.4 Zelllinien und Bakterien

Tabelle 15: Zelllinien

A7r5	Glattmuskelzelle aus der Aorta, Ratte
C2	quergestreifte Muskelzellen, Maus

Tabelle 16: Bakterien

E. coli TG1	Stratagen
E. coli XL1 Blue	Invitrogen

## 2.2.5 Plasmide

Tabelle 17: Plasmide

<b>Bezeichnung</b>		<b>Definition</b>
pCMV-Tag2b-Leervektor		Leervektor zur Kontrolle
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 WT	Einbringen von BAG3 über die Schnittstellen BamHI und EcoRI
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 WAWA	Mutation der WW Domäne
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 S136A	Punktmutation von Serin136 zu Alanin136
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 S136D	Punktmutation von Serin136 zu Asparaginsäure136
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 T285A	Punktmutation von Threonin285 zu Alanin285
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 T285D	Punktmutation von Threonin285 zu Asparaginsäure285
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 S289A	Punktmutation von Serin289 zu Alanin289
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 S289D	Punktmutation von Serin289 zu Asparaginsäure289
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 T285A S289A	Punktmutation von Threonin285 und Serin289 zu Alanin285 und Alanin289
pCMV-Tag2b-FLAG	BAG3 T285D S289D	Punktmutation von Threonin285 und Serin289 zu Asparagin285 und Asparagin290

## 2.2.6 Antikörper und weitere Farbstoffe

Tabelle 18: primäre Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Subtyp</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
BAG3		Kaninchen	AG Höfeld
BAG3	IgG	Kaninchen	Proteintech
Filamin C	IgA	Maus	AG Fürst
FILIP	IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich
FILIP1L		Kaninchen	AG Fürst
FLAG	IgG1	Maus	Sigma-Aldrich
HSPB1	IgG1	Maus	Proteintech
HspB5	IgG	Kaninchen	Cloud-Clone Corp.
HspB8	IgG	Kaninchen	St John's Laboratory
HspB8	IgG2a	Maus	OriGene
Titin	IgA	Maus	AG Fürst
TSC1	IgG	Kaninchen	Cell Signaling
XIN/XIRP2		Kaninchen	AG Fürst

Tabelle 19: sekundäre Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Subtyp</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen	IgG	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor 488 Anti-Maus	IgA	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor 555 Anti-Maus	IgG	Ziege	Thermo Fisher
Alexa Fluor 555 Anti-Kaninchen	IgG <sub>1</sub>	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor 594 Anti-Kaninchen	IgG	Ziege	Invitrogen
CY5 Anti-Maus	IgG <sub>1</sub>	Ziege	Jackson

Tabelle 20: weitere Fluoreszenz-markierte Antikörper

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Phalloidin Atto 488	Atto-Tec
Phalloidin Atto 550	Atto-Tec
Phalloidin Atto 633	Atto-Tech

### **3 Ergebnisse**

Mittels verschiedener mikroskopischer Analysen soll die Lokalisation von BAG3 und potenziell weiterer Bindepartner innerhalb von Muskelzellen analysiert werden. Dabei sollen sowohl Glattmuskelzellen wie auch quergestreifte Muskelzellen betrachtet werden.

#### **3.1 Mechanische Einflüsse auf Glattmuskelzellen**

Die hier verwendeten Glattmuskelzellen stammen aus der Aorta einer Ratte und werden folgend als A7r5 Zellen bezeichnet. Diese Zelllinie ist als Model für Glattmuskelzellen etabliert. Um mechanische Einflüsse in Glattmuskelzellen zu zeigen, müssen Kräfte generiert werden. Dies erfolgt meist durch Veränderung der Adhäsionskräfte. Auch weitere Behandlungsmöglichkeiten mit synthetischen oder endogenen Substanzen sind möglich. Ein weiterer Vorteil dieser Zelllinie liegt in der Option, die Zellen transient zu transfizieren. Durch Transfektion ist es möglich, BAG3-Mutanten zu exprimieren und mutations-abhängige Veränderungen festzustellen. Mittels Punktmutation, also einem Aminosäuretausch, verschiedener mechanisch regulierter Phosphorylierungsstellen konnten die unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen in den Experimenten untersucht werden. Für die unter 3.1.2, 3.1.3 und 3.1.4 verwendeten mechanisch regulierten Phosphorylierungsstellen wurde BAG3 an den Stellen Serin136 (S136), Threonin285 (T285), Serin289 (S289) und als Kombination an T285 S289 modifiziert. Es erfolgte an diesen Stellen eine Punktmutation der Aminosäure in Alanin (A) oder Asparagin (D). Die Veränderung zu A verhält sich dabei wie eine dauerhafte Dephosphorylierung der Position, die Mutation zu D imitiert dabei den phosphorylierten Zustand. Die als BAG3 WAWA bezeichnete Mutante weist eine mutierte WW Domäne auf. Zur Kontrolle wurde stets der BAG3 Wildtyp (WT) mitgeführt.

##### **3.1.1 Änderung der mechanischen Belastung**

Um einen ersten Eindruck für die mechanische Belastung in Glattmuskelzellen zu erhalten, wurden diese unter verschiedenen Konditionen kultiviert. Da, wie unter 1.2 erwähnt, jede Zelle und somit auch die Glattmuskelzellen permanenten mechanischen Kräften ausgeliefert sind, ist es selbsterklärend, dass es keinen Zustand ohne mechanische Belastung gibt. Somit ist es essenziell den Stress spezifisch steuern zu können. Unter Zellkulturbedingungen erfolgt dies bei Glattmuskelzellen beispielsweise durch die Veränderung des Substrates oder der Nährstoffe. So obliegt es der Zelle, sich den Umständen anzupassen.

In folgendem Experiment wurden A7r5 Zellen auf Glas kultiviert. Glas ist als sehr hartes Substrat bekannt und induziert somit eine höhere mechanische Belastung. Das Adhären der Zellen auf harten Substraten wie Glas führt zu einer gesteigerten Stressantwort (Ulbricht

et al. 2013b). Zusätzlich wurde den Zellen für 16 h das Serum entzogen. Der Entzug führt zu einem Hungerzustand, der eine gesteigerte Autophagie zur Folge hat. Ebenso sollte durch die Behandlung mit LPA ein weiterer Effekt zu sehen sein. LPA wird mit Proliferation, Adhäsion und mit der Bildung von Aktinstressfasern in Verbindung gebracht. (Gogarten et al. 2001; Hernández-Araiza et al. 2018; Moolenaar et al. 1997) Besonders die Bildung der Stressfasern und anschließendes Assemblieren von BAG3 an diesen Fasern sollte gezeigt werden.

Hierfür wurden A7r5 Zellen unter Standardbedingungen (+FCS, -LPA) unter Serumentzug (-FCS, -LPA) wie auch unter Einfluss von LPA (+FCS; +LPA) und der Kombination aus dem Zusatz von LPA und Serumentzug (-FCS, +LPA) kultiviert. Anschließend konnten die A7r5 Zellen mittels PFA fixiert werden. In Abbildung 11 ist die Färbung dieser A7r5 Zellen zu sehen, dabei wurde mittels Antikörperfärbung BAG3 und Aktin mittels Phalloidinfärbung dargestellt. Die übereinander gelagerten Signale sind unter *merge* zu sehen. Unter Standardbedingungen (+FCS, -LPA) ist eine diffuse Anordnung von BAG3 in den Zellen zu erkennen. Das Aktinnetzwerk lässt sich klar erkennen. Versetzt man die Zellen in einen Hungerzustand durch Serumentzug (-FCS, -LPA) ändert sich an der Verteilung von BAG3 nichts. Auch die Zugabe von LPA (+FCS, +LPA) kann die Lokalisation von BAG3 nicht beeinflussen. Weiter konnte unter Entzug des Serums (-FCS, +LPA) keine Veränderung des BAG3 Signals beobachtet werden. Es konnte nicht gezeigt werden, dass die Zugabe von LPA oder die Induktion der Autophagie durch Serumentzug die zytoplasmatische Lokalisation des BAG3 Proteins verändert.

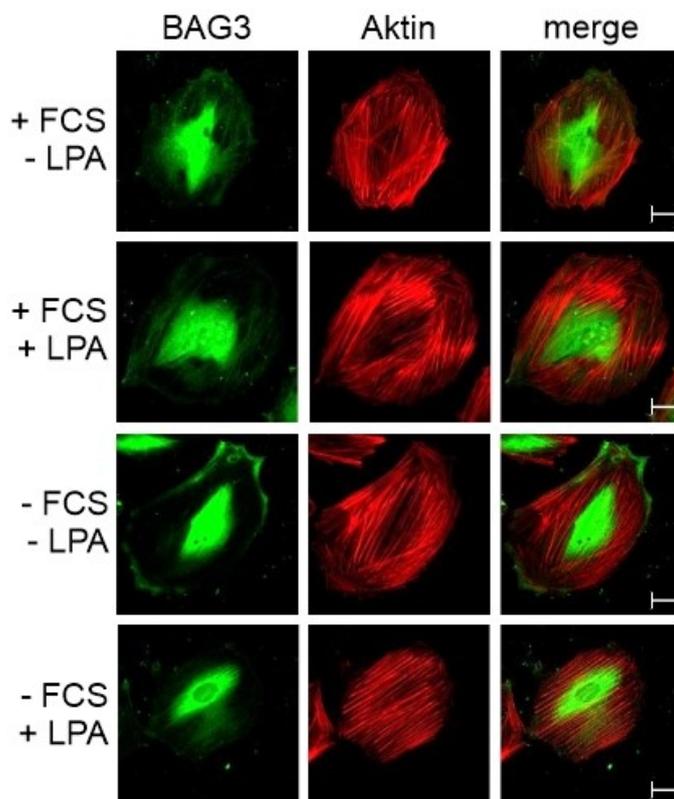


Abbildung 11: Einfluss von Serumentzug und LPA auf A7r5 Zellen.

Die auf Glas kultivierten A7r5 Zellen wurden je nach Bedingung  $\pm$  Serum (+FCS, -FCS) und  $\pm$  LPA (+LPA, -LPA) behandelt. Anschließend erfolgte eine Fixierung der A7r5 Zellen mit PFA sowie die Färbung von BAG3 mittels BAG3 Antikörper (grün) und Aktin mittels Phalloidin (rot). Größenbalken = 20  $\mu$ m; n=3

### 3.1.2 Steigerung der mechanischen Belastung mittels Fibronektin

Eine weitere Möglichkeit, die mechanische Belastung in Glattmuskelzellen zu steigern, bietet Fibronektin. Da Fibronektin ein extrazelluläres Matrixprotein ist, kann es durch Interaktion mit Integrinen das Aktinzytoskelett beeinflussen. Fibronektin wird in Säugern von Fibroblasten sezerniert und wurde lange Zeit als „Kleber“ bezeichnet und auf diese Funktion reduziert. Fibronektin hat allerdings auf verschiedenste Prozesse Einfluss. Zu diesen Prozessen gehören beispielsweise Adhäsion der Zellen, Migration oder auch Organisation des Zytoskeletts. Diese Vorgänge können durch mechanische Belastung beeinflusst werden. Aufgrund der Interaktion von Fibronektin mit Integrinen kommt es somit zu einer Antwort auf die mechanische Belastung (Parisi et al. 2020; Raghov 2013). Fibronektin ist in der Lage die Lokalisation von BAG3 in A7r5 Zellen zu beeinflussen. Da BAG3 kraftregulierte Phosphorylierungsstellen aufweist, soll untersucht werden, ob Fibronektin die Lokalisation des BAG3 Proteins beeinflussen kann. Ferner sollen die phosphomimetischen Mutanten der kraftregulierten Phosphorylierungsstellen genauso betrachtet werden. Das heißt, die mögliche

Änderung des Phosphorylierungszustandes der phosphomimetischen Mutanten S136, T285, S289 und T285 S289 sowie die BAG3 WAWA Mutante wurden hierfür untersucht. Das mittels FLAG-Epitop markierte BAG3 konnte anhand einer transienten Transfektion in A7r5 Zellen eingebracht werden. Nach der Kultivierung der A7r5 Zellen auf Glas erfolgte die Fixierung mit PFA und die anschließende Färbung. Aufgrund des anti-FLAG Antikörpers kann gezeigt werden, ob sich die Lokalisation der phosphomimetischen BAG3-Varianten durch die Verwendung des unterschiedlichen Substrates (-Fibronectin, +Fibronectin) verändert. Durch die Verwendung des anti-FLAG Antikörpers wird ausschließlich das transfizierte BAG3 und somit die mutierten Formen analysiert. Abbildung 12 zeigt in der ersten Spalte (-Fibronectin), dass das Signal des BAG3 WT wie auch das Signal der phosphomimetischen Mutanten und der Mutierten WW Domäne (BAG3 WAWA) diffus vorliegt. Es folgt keiner spezifisch erkennbaren Richtung oder ordnet sich in einer klaren Struktur an. Sobald die A7r5 Zellen auf beschichteten Deckgläsern (+Fibronectin) kultiviert wurden, ist die Rekrutierung von Bag3 WT an Aktin-Stressfasern klar zu erkennen. Auch die BAG3 WAWA Mutante, sowie die phosphomimetischen Mutanten zeigen diese gleiche Anordnung. Das BAG3 Signal (WT und mutiertes BAG3) der Zellen, welche auf Fibronectin gewachsen sind, zeigt sich sehr geordnet. Dies weist auf eine Ausrichtung entlang der Stressfasern unter Einfluss von mechanischer Belastung hin. Die exakte Lokalisation der unterschiedlichen BAG3 Varianten an Aktinstressfasern wurde somit Gegenstand weiterer Analysen (siehe 3.1.3.).

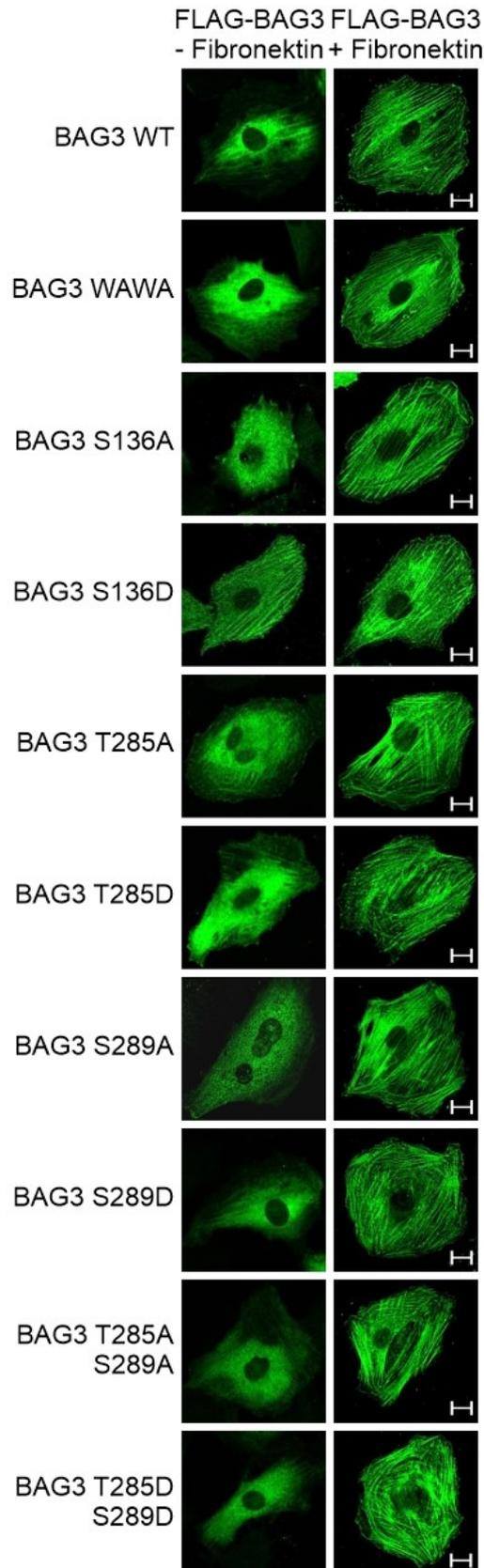


Abbildung 12: Einfluss von Fibronektin auf die BAG3-Lokalisation in A7r5.

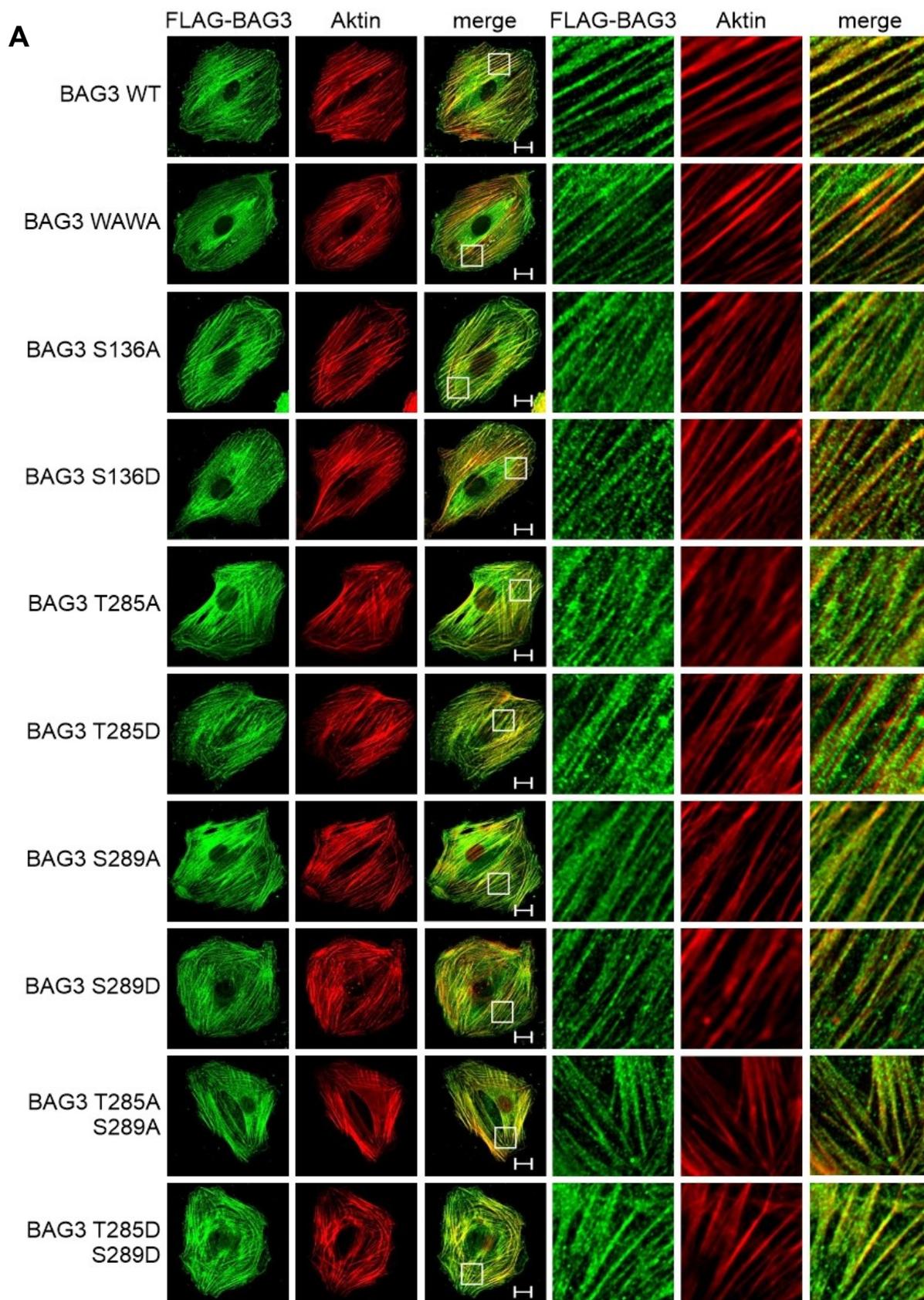
A7r5 Zellen wurden auf Glas (-Fibronektin) und beschichtetem Glas (+Fibronektin) kultiviert. Mittels transienter Transfektion wurde BAG3 sowie BAG3 WAWA und die

phosphomimetischen Mutanten S136, T285, S289 und T285 S289 eingebracht. BAG3 wurde in allen Bedingungen mit einem FLAG-Tag versehen. Die Kontrolle stellt der WT des BAG3 Proteins dar. Es erfolgte eine Fixierung der Zellen mit PFA sowie die Färbung mittels anti-FLAG Antikörper. Größenbalken = 20 µm; n=5

### **3.1.3 Einfluss der Phosphorylierung und Dephosphorylierung mechanisch regulierter Phosphorylierungsstellen auf die BAG3 Lokalisation**

Wie unter 3.1.2 gezeigt werden konnte, ist Fibronectin in der Lage, BAG3 und die verwendeten Mutanten in Ihrer Lokalisation zu beeinflussen. Dabei wird ein Muster deutlich, dass ähnlich dem der Aktinstressfasern ist. Um eine Aussage über das Ausmaß und potentielle Unterschiede zwischen BAG3 WAWA, den phosphomimetischen Mutanten und dem BAG3 WT treffen zu können, erfolgte eine Antikörperfärbung gegen das FLAG-Epitop zum Nachweis der BAG3 Varianten und gleichzeitig eine Färbung von Aktin mittels Phalloidin. Diese Doppelfärbung ermöglicht eine quantitative Analyse der Kolo-kalisation von Aktin und BAG3. Der ermittelte Wert für die Kolo-kalisation des BAG3 WT und Aktin wurde dabei auf 1 definiert und anschließend die relative Veränderung der BAG3-Varianten ermittelt. Bereits durch Kathage et al. (2017) konnte gezeigt werden, dass die Kolo-kalisation von BAG3 WAWA und Aktin im Vergleich zu BAG3 WT und Aktin signifikant verringert vorliegt. Es wurden auch in diesem Versuch A7r5 Zellen auf beschichtetem Glas (+Fibronectin) kultiviert. Durch eine transiente Transfektion wurden die FLAG-Epitop markierten Konstrukte (BAG3 WT, BAG3 WAWA sowie den bekannten phosphomimetischen Mutanten) in die A7r5 Zellen eingebracht. Nach Fixieren der Zellen mit PFA erfolgte die Färbung mittels anti-FLAG Antikörper der FLAG-BAG3 Varianten (grün) sowie Aktin (Phalloidin, rot). Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt. Ein dem Aktin sehr ähnliches Muster zeigt BAG3 WT. Die Kolo-kalisation von Aktin und BAG3 WT wird als Referenz betrachtet. Relativ zur Kolo-kalisation des WT ( $1,00 \pm 0$ ) mit Aktin zeigt sich eine sehr signifikante Reduktion bei BAG3 WAWA ( $0,67 \pm 0,07$ ). Auch bei insgesamt drei der phosphomimetischen Mutanten konnte eine Reduktion beobachtet werden. Dabei zeigt sich für die Mutante T285A ( $0,85 \pm 0,06$ ) eine signifikante Reduktion. Für die beiden Mutanten S289 zeigt sich für A ( $0,81 \pm 0,06$ ) eine signifikante Reduktion und eine sehr signifikante Reduktion für D ( $0,76 \pm 0,05$ ). Diese Effekte lassen sich anhand der überlagernden Signale im *merge* Bild gut erkennen. Hier kommt es aufgrund der Farben rot und grün bei einer exakten Kolo-kalisation zur Gelbfärbung des Signals. Zusätzlich wurde zur Verdeutlichung eine zehnfache Vergrößerung dargestellt. Die jeweiligen Ausschnitte sind durch weiße Rechtecke gekennzeichnet. Für die weiteren phosphomimetischen Mutanten konnte keine signifikante Veränderung der Kolo-kalisation mit Aktin festgestellt werden. Hier zeigt sich ein dem BAG3 WT entsprechendes Verhalten. Die beschriebenen Veränderungen sind dem Säulendiagramm

(Abbildung 13 **B**) zu entnehmen. Zusammenfassend zeigt das Experiment, dass es zu einer veränderten Kolo­kalisierung von BAG3 und Aktin aufgrund von spezifischen phosphomimetischen Mutationen (T285A, S289A und S289D) kommt. Ein ähnliches Verhalten zeigt die BAG3 WAWA Mutante.



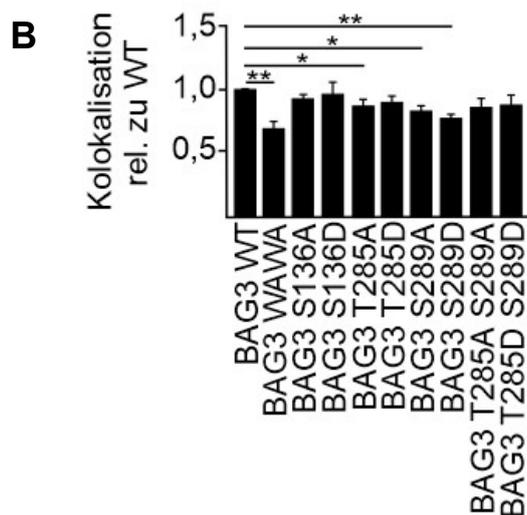


Abbildung 13: Lokalisation von BAG3 an Aktin in A7r5 Zellen.

**A** In A7r5 Zellen wurde durch transiente Transfektion BAG3 sowie BAG3 WAWA und die phosphomimetischen Mutanten der kraftregulierten Phosphorylierungsstellen S136, T285, S289 und T285 S289 eingebracht. Kultiviert wurden die Zellen auf Glas (+Fibronektin). Es erfolgte eine Antikörperfärbung von FLAG (grün) sowie Aktin anhand von Phalloidin (rot). Die durch weiße Rechtecke markierten Flächen wurden nebenstehend zehnfach vergrößert abgebildet. Größenbalken = 20  $\mu\text{m}$

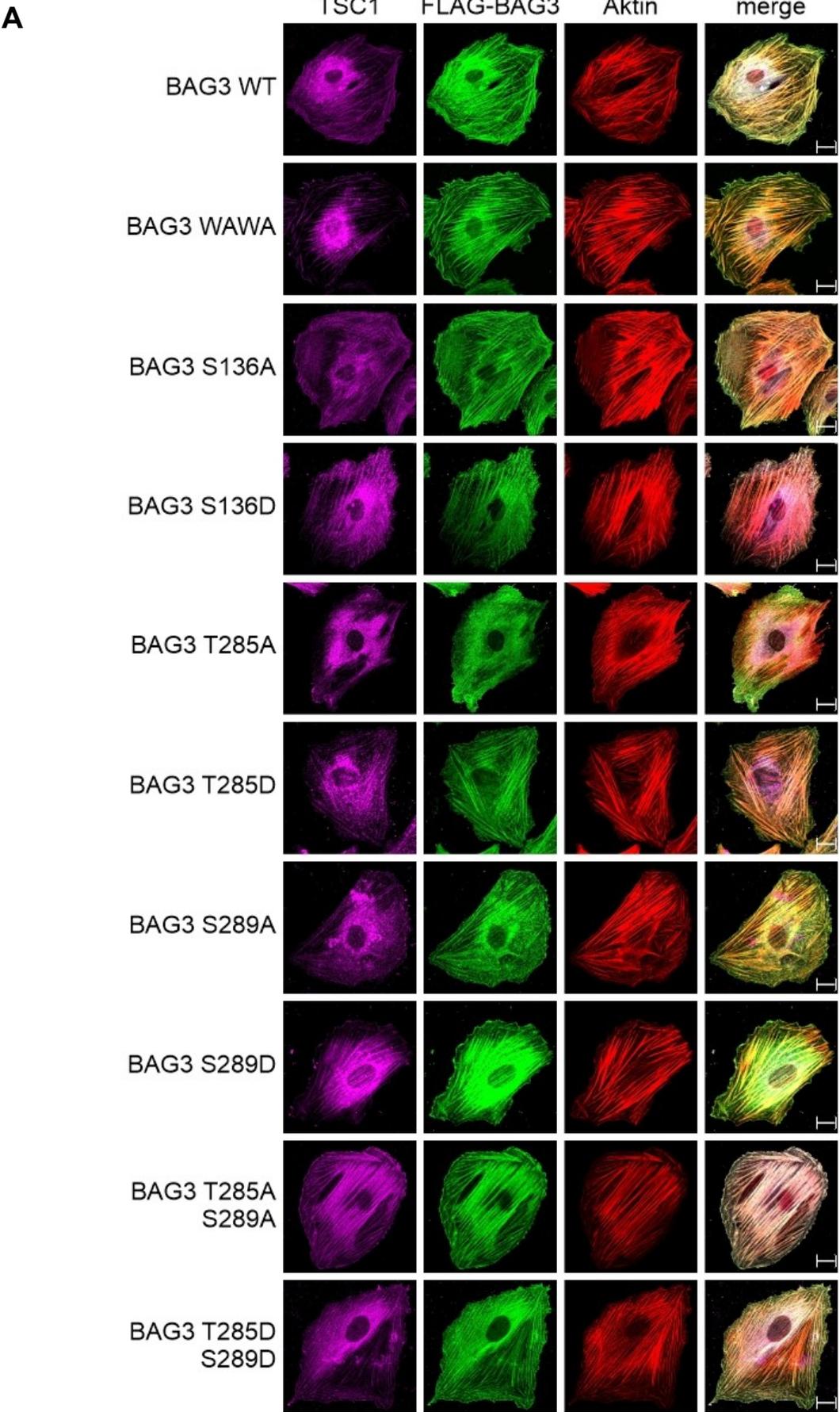
**B** Dargestellt ist anhand des Säulendiagramms die Kokalisation von BAG3 und Aktin. Dabei ist die relative Veränderung der Kokalisation der phosphomimetischen Mutanten und BAG3 WAWA im Vergleich zu BAG3 WT dargestellt. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### 3.1.4 Einfluss der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 auf die Lokalisation von TSC1

Der Zusammenhang von BAG3 und mTOR wurde bereits unter 1.6.1 und 1.6.3 dargestellt. Über seine WW Domäne ist BAG3 in der Lage TSC1 zu binden. Aufgrund dieser Bindung kommt es zur Inhibition von mTORC1. Resultat dieser Signalkaskade ist die lokale Induktion der Autophagie (CASA). Somit kann spezifisch an Aktinfilamenten CASA zum Einsatz kommen. Durch die Lokalisation von TSC1 entlang der Aktinstressfasern kommt es im verbleibenden Zytoplasma zu einer Aktivierung von mTORC1 und somit zu einer gesteigerten Proteintranslation (Goodman 2014; Jacobs et al. 2014; Kathage et al. 2017).

Um die Rekrutierung von TSC1 an Aktinstressfasern analysieren zu können, wurden A7r5 Zellen mit FLAG-Epitop markierten BAG3 Konstrukten transfiziert. Es wurde wiederhol der BAG3 WT als Referenz verwendet und weiter BAG3 WAWA sowie die phosphomimetischen

Mutanten untersucht. Durch das fixieren der Zellen mit PFA konnte anschließend anhand einer Antikörperfärbung gegen FLAG sowie TSC1 die Lokalisation der Proteine dargestellt werden. Aktin wurde anhand von Phalloidin gefärbt. Anhand dieser Färbung konnte die im Folgenden die Kolokalisation von TSC1 und Aktin bestimmt werden und in Relation zu BAG3 WT analysiert werden. Durch die Arbeiten von Kathage et al. (2017) wurde bereits gezeigt, dass es durch die Mutation der WW Domäne zu einer verringerten Lokalisation von TSC1 an Aktin kommt. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, konnte hier ebenfalls eine signifikante Reduktion von TSC1 an Aktin für die BAG3 WAWA Mutante ( $0,76 \pm 0,09$ ) festgestellt werden. Weiter wurde für die phosphomimetische Mutante S289A ( $0,86 \pm 0,06$ ) ebenfalls eine signifikante Reduktion der Kolokalisation von TSC1 und Aktin beobachtet. Für die weiteren phosphomimetischen Mutanten (S136, T285, S289D und T285 S289) konnte keine signifikante Veränderung gezeigt werden. Die Kolokalisation dieser phosphomimetischen Mutanten sind mit dem BAG3 WT vergleichbar und zeigen keinen Unterschied. Diese Aussage wird durch das in Abbildung 14 **B** dargestellt Säulendiagramm grafisch dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass es aufgrund der phosphomimetische Mutation BAG3 S289A zu einer verringerten Kolokalisation von TSC1 und Aktin kommt. Eine ähnliche Veränderung der Kolokalisation konnte bereits für BAG3 WAWA gezeigt werden (Kathage et al. 2017).



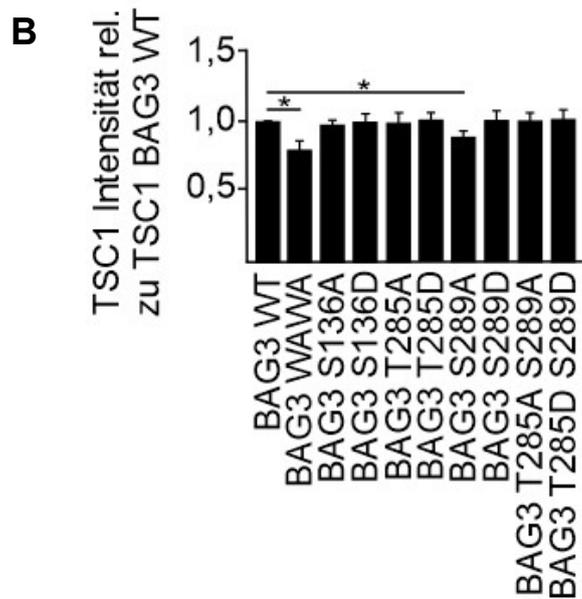


Abbildung 14: Einfluss der BAG3 Mutanten auf die TSC1 Rekrutierung an Aktin in A7r5 Zellen. **A** A7r5 Zellen wurden transient mit FLAG-Epitop markierten BAG3 Konstrukten transfiziert. Als Kontrolle wurde BAG3 WT verwendet und im Vergleich zu BAG3 WAWA sowie den phosphomimetischen Mutanten untersucht. Kultiviert wurden die A7r5 Zellen auf Glas (+Fibronectin) und mit PFA anschließend fixiert. Die Antikörperfärbung erfolgte gegen FLAG (grün) und TSC1 (violett) anhand von Phalloidin wurde Aktin (rot) gefärbt. Größenbalken = 20  $\mu$ m

**B** Bei der quantitativen Analyse wurde die Kolokalisation von TSC1 und Aktin untersucht. Dabei wurde BAG3 WT als Referenz betrachtet und BAG3 WAWA wie auch die phosphomimetischen Mutanten relativ dazu analysiert und mittels Säulendiagramm dargestellt. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.2 Quergestreifte Muskelzellen – Myotuben

Die quergestreifte Muskulatur zeigt einen anderen Aufbau als die glatte Muskulatur. Somit ist die Handhabung und die Kultivierung dieser Zellen auch in einigen Punkten zu unterscheiden. Die hier verwendeten C2 Zellen stammen aus der Maus. Die Differenzierung der Myoblasten in Myotuben ist durch eine Veränderung der Zusätze des Zellkulturmediums möglich. So kommt es in vitro zur Bildung von Myotuben, die zur spontanen Kontraktion fähig sind. Die Möglichkeit der Kontraktion lässt es zu, dass mittels EPS die Zellen eine definierte, gesteigerte mechanische Belastung erfahren.

### **3.2.1 Einfluss auf ausgewählte mechanisch regulierte Proteine durch variable mechanische Belastung in Myotuben**

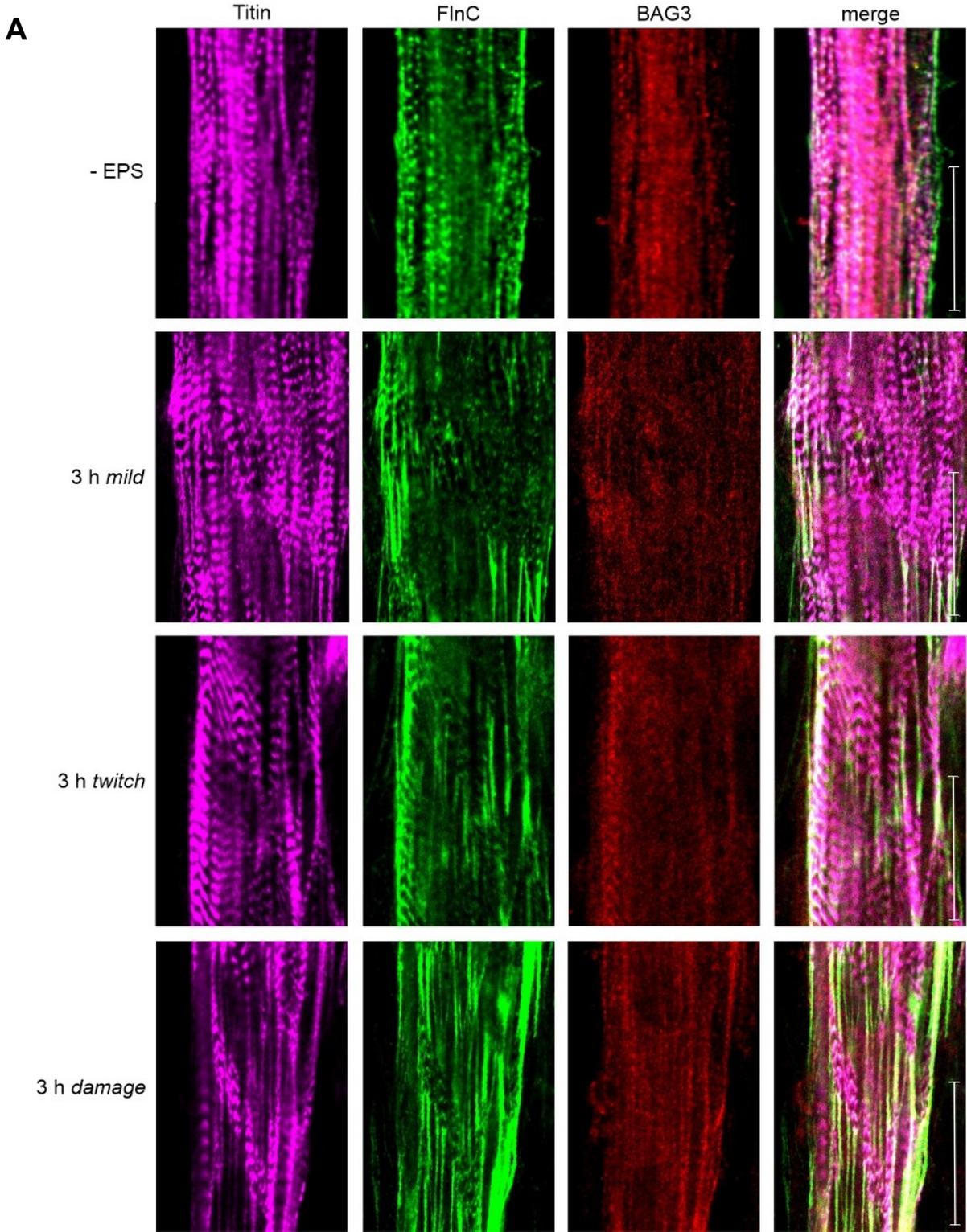
Durch die mechanische Belastung mittels EPS eröffnet sich die Möglichkeit, weitere relevante und mechanische beeinflussbare Proteine zu analysieren. Von großem Interesse sind vorwiegend die Komponenten des CASA-Komplexes, da wie zuvor erwähnt, der Abbau von mechanisch entfaltetem Filamin mittels CASA, gerade in der quergestreiften Muskulatur, eine bedeutende Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurde für die Experimente 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.2.1.3, 3.2.1.4, 3.2.1.5, 3.2.1.6 und 3.2.1.7 die Differenzierung von C2 Myoblasten zu Myotuben innerhalb von fünf Tagen durchgeführt. Nach erfolgreicher Differenzierung zu Myotuben erfolgte die EPS Behandlung. Als Kontrolle und somit als Referenz wurden stets unstimulierte Myotuben herangezogen. In den folgenden Analysen wurden die Ergebnisse jedoch nicht relativ zur Kontrolle dargestellt, sondern als absoluter Wert der Veränderung der Verteilung des Signals. Es wurden die EPS Protokolle *mild*, *twitch* sowie *damage* zur Induktion von mechanischer Belastung verwendet. Durch die verschiedenen EPS Bedingungen werden, aufgrund der mechanischen Belastung, sogenannte Läsionen in unterschiedlichem Ausmaß verursacht. In diesen zeigt sich eine Akkumulation von mechanisch entfaltetem Filamin. Diese Läsionen lassen sich durch die Färbung von Filamin und zusätzlich dem Z-Scheiben Marker Titin gut darstellen. Um zu prüfen, ob auch Komponenten der CASA-Maschinerie in Läsionen rekrutiert werden, sollte deren Lokalisation analysiert werden.

Um spezifisch den prozentualen Anteil eines Proteins innerhalb der Filamin-enthaltenen Läsionen im Vergleich zu dem gesamten Anteil des zu untersuchenden Proteins berechnen zu können, ist die zusätzliche Färbung von Filamin sowie dem Z-Scheiben Marker Titin unerlässlich. Aufgrund der Färbung der Z-Scheiben mittels Titin konnte eine Maske erstellt werden. Mittels dieser Maske lässt sich das Filaminsignal, welches nicht mit den Z-Scheiben kolokalisiert, ermitteln. Somit kann die exakte Lokalisation und auch die Größe der durch die mechanische Belastung ausgelösten Läsionen bestimmt werden. Anhand dieser Angaben lässt sich von jedem Protein von Interesse der Anteil des Signals innerhalb der Läsionen gegenüber dem Gesamtsignal als Prozentwert ermitteln.

#### **3.2.1.1 Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von BAG3 in Myotuben**

BAG3 spielt eine der zentralen Rollen in der Muskelhomöostase (siehe 1.6). Dabei kommt es unter anderem zum Abbau von mechanisch entfaltetem Filamin mittels CASA. Für diesen Vorgang ist die Rekrutierung von BAG3 mitsamt des CASA-Komplexes an den Z-Scheiben in Myotuben nötig. Wie in Abbildung 15 **A** zu sehen ist lokalisiert BAG3 an den Z-Scheiben, welche durch Titin gut zu erkennen sind. Auch zeigt Filamin die erwartete Lokalisation an den Z-Scheiben. Betrachtet man die Bildreihe der Filamin-Färbung mit zunehmender

mechanischer Belastung, fällt auf, dass das Ausmaß der Läsionen deutlich steigt. Unterstützt wird diese Aussage durch das Säulendiagramm (Abbildung 15 **C**). Dieses zeigt die signifiante Steigerung der Filamin-enthaltenden Läsionen in Abhängigkeit von der Intensität der mechanischen Belastung in Prozent. Auch für BAG3 ist ein vergleichbares Verhalten zu beobachten. Bei ansteigender mechanischer Belastung ist BAG3 zunehmend in Läsionen nachweisbar. Während in unstimulierten Myotuben 2,45 % ( $\pm 0,18$  %) des BAG3-Proteins in Läsionen vorliegt, steigt dieser Wert auf 3,32 % ( $\pm 0,32$  %) unter *mild* und auf 5,53 % ( $\pm 0,18$  %) und 8,36 % ( $\pm 0,15$  %) unter *twitch* beziehungsweise *damage* Bedingungen (Abbildung 15 **B**). Das Experiment belegt die zunehmende Rekrutierung von BAG3 in Filamin-enthaltende Läsionsbereiche unter mechanischer Belastung in Skelettmuskelzellen.



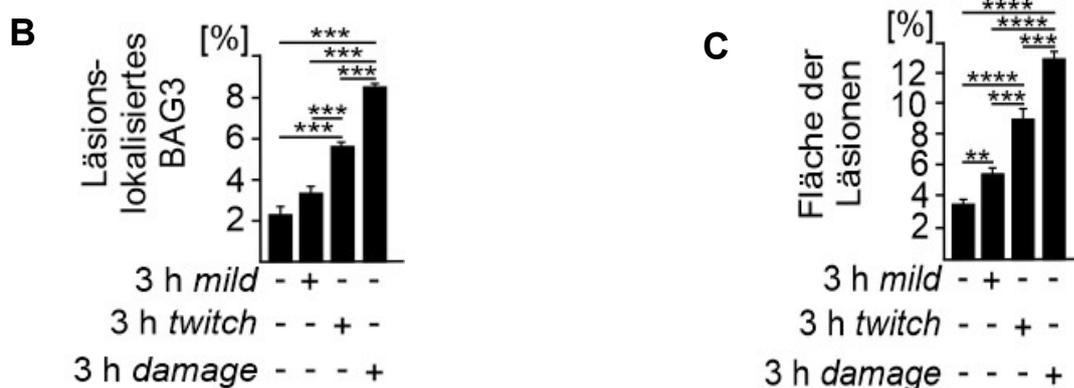


Abbildung 15: Einfluss auf die BAG3 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben.

**A** C2 Myoblasten wurden über fünf Tage zu Myotuben differenziert. Anschließend erfolgte anhand der Protokolle *mild*, *twitch* und *damage* eine dreistündige EPS. Die als Referenz verwendeten Myotuben wurden nicht mittels EPS stimuliert. Im Anschluss wurden die Myotuben mit Methanol/Aceton fixiert und mittels Antikörperfärbung Titin (violett) Filamin C (grün) und BAG3 (rot) dargestellt. Größenbalken = 20  $\mu$ m

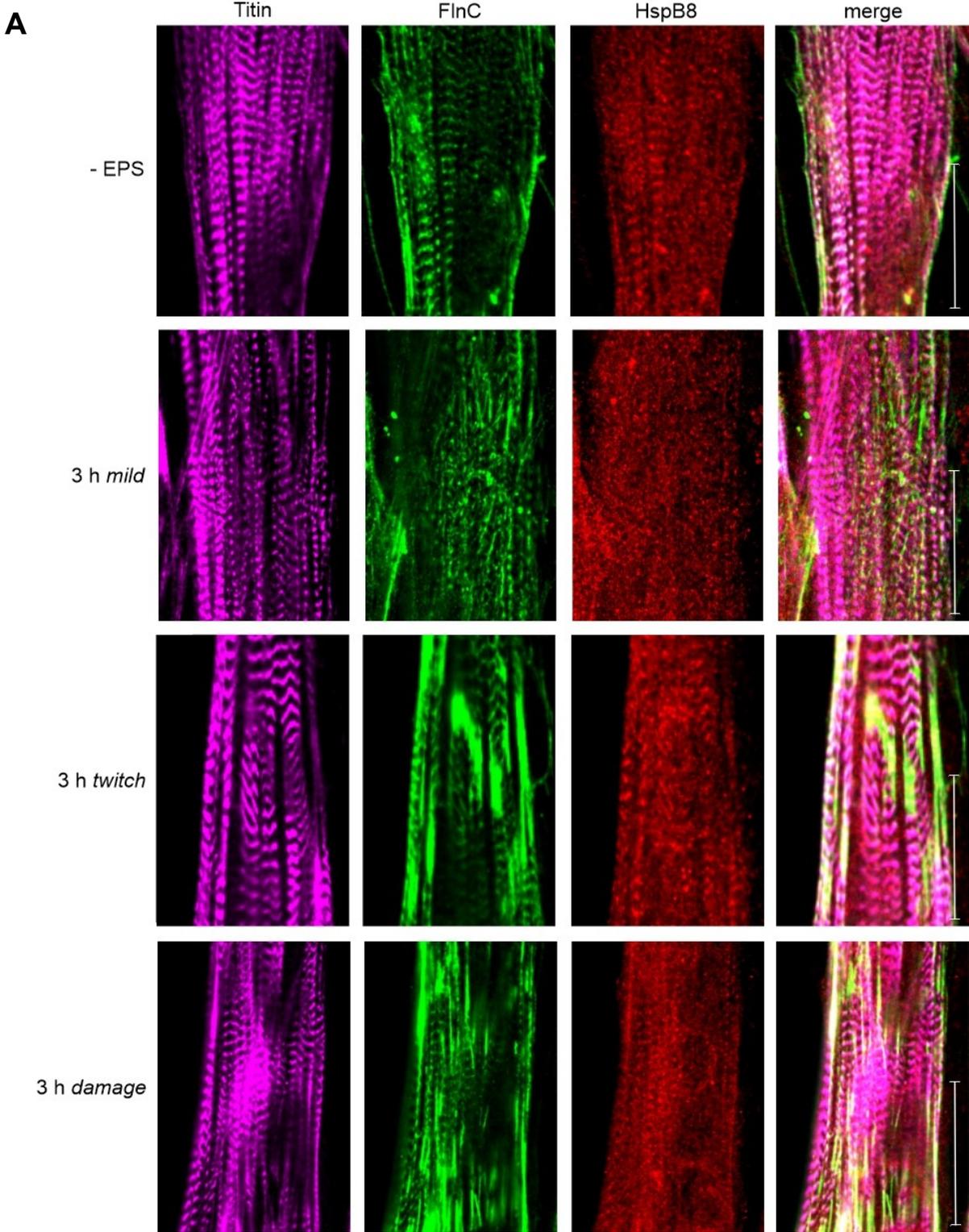
**B** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse des prozentualen Anteils von BAG3 in den Läsionen für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW $\pm$ SEM; n $\geq$ 5; \*\*\*p<0,001.

**C** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Fläche der Filamin-enhaltenen Läsionen in Prozent für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW $\pm$ SEM; n $\geq$ 5; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

### 3.2.1.2 Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von HspB8 in Myotuben

Neben BAG3 erfolgt der Abbau durch CASA unter Zusammenarbeit mit HspB8. Aufgrund der Interaktion von HspB8 kann Filamin stabilisiert und so schließlich durch CASA abgebaut werden. Aufgrund dessen soll die Lokalisation von HspB8 genauer betrachtet und so geklärt werden, ob die Funktion und die damit verbundene Lokalisation von HspB8 essenziell für den Filaminabbau ist. Es ist in Abbildung 16A deutlich zu sehen, dass aufgrund der Stimulation ein Anstieg der Läsionen zu vermerken ist. Die quantitative Auswertung ist in Abbildung 16 C dargestellt. Die Läsionen zeigen sich in der Bildreihe der Filaminfärbung. Weiter zeigt sich Filamin lokalisiert an den Z-Scheiben, welche mittels des Z-Scheiben Markers Titin markiert wurden. Um den spezifischen Einfluss der mechanischen Belastung untersuchen zu können, wurden stimulierte Myotuben mit unstimulierten Myotuben verglichen und das HspB8 Signal innerhalb der Filamin-enhaltenen Läsionen analysiert (Abbildung 16). Ohne zusätzliche

mechanische Belastung mittels EPS liegen 3,42 % ( $\pm 0,46$  %) des HspB8-Proteins in Läsionen vor. Durch die Stimulation mit *mild* kommt es zu einer geringfügigen, nicht signifikanten, Erhöhung auf 3,85 % ( $\pm 0,64$  %) HspB8 innerhalb den Läsionen. Nach Stimulaiton der Myotuben mittels *twitch* oder *damage* kann lediglich eine Tendenz auf 4,95 % ( $\pm 0,77$  %) beziehungsweise auf 5,02 % ( $\pm 0,99$  %) HspB8 Protein in den Läsionen gezeigt werden. Das Experiment zeigt keine signifikante Veränderung der Lokalisatin des HspB8 Protein innerhalb der Filamin-enthaltenen Läsionen unter Einfluss von mechanischer Belastung, sondern zeigt lediglich eine mögliche Tendenz. Es ist, wie vergleichsweise bei BAG3, ein zunehmende Rekrutierung von HspB8 in Filamin-enthatenden Läsionsberichen möglich ist aber nicht belegt.



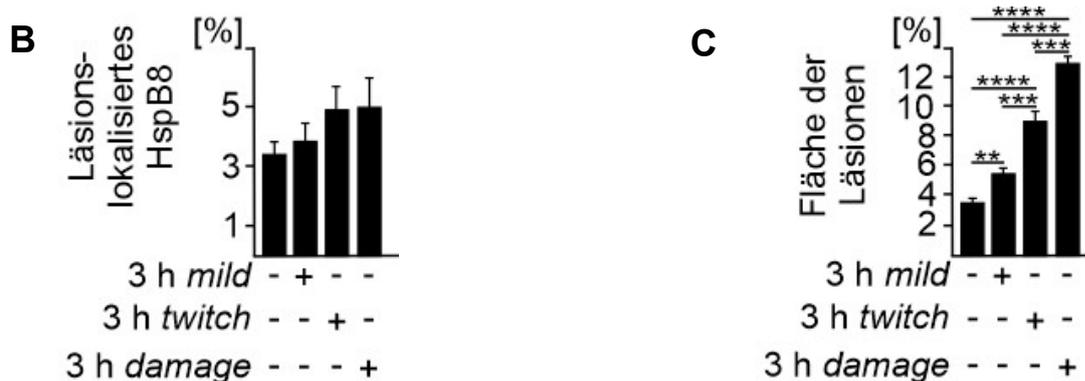


Abbildung 16: Einfluss auf die HspB8 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben.

**A** C2 Myoblasten wurden über fünf Tage zu Myotuben differenziert. Anschließend erfolgte anhand der Protokolle *mild*, *twitch* und *damage* eine dreistündige EPS. Die als Referenz verwendeten Myotuben wurden nicht mittels EPS stimuliert. Im Anschluss wurden die Myotuben mit Methanol/Aceton fixiert und mittels Antikörperfärbung Titin (violett) Filamin C (grün) und HspB8 (rot) dargestellt. Größenbalken = 20  $\mu$ m

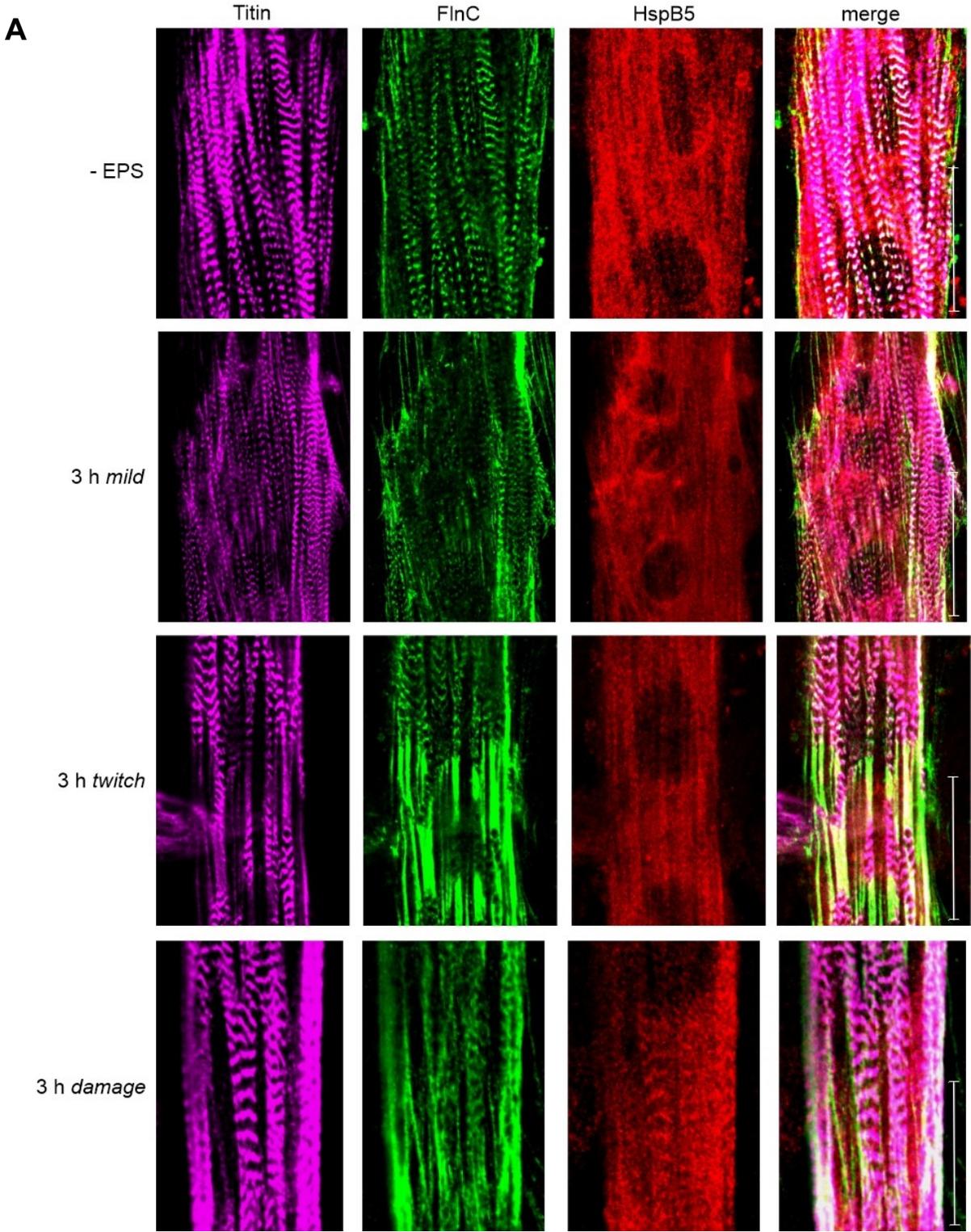
**B** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse des prozentualen Anteils von HspB8 in den Läsionen für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ .

**C** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Fläche der Filamin-enhaltenen Läsionen in Prozent für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.2.1.3 Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von HspB5 in Myotuben

Aufgrund der Ergebnisse der nicht signifikanten Veränderung von HspB8 (Abbildung 16) soll folgendes Experiment zeigen, ob es potenzielle weitere Kandidaten gibt, welche wie HspB8 eine Option darstellen, mit dem CASA-Komplex zu agieren. Es konnte bereits von Rauch et al. (2017) gezeigt werden, dass auch HspB5 ein weiterer Interaktionspartner von BAG3 ist. Es soll folgend die Rekrutierung von HspB5 in den, durch mechanische Belastung induzierten, Läsionen untersucht werden. Die Analysen zu BAG3 hatten gezeigt, dass es zu einem Anstieg des in den Läsionen vorliegenden BAG3 kommt, sobald die mechanische Belastung erhöht wird (Abbildung 15). Ein ähnliches Verhalten konnten für den BAG3 Bindepartner HspB8 nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse zu HspB5 sind in Abbildung 17 dargestellt. In Abbildung 17 **A** ist zu sehen, dass Filamin sowie Titin an den Z-Scheiben lokalisieren. Die Bildfolge des Filamins zeigt, unter steigender mechanischer Belastung, den zu erwartenden Anstieg des

läsionslokalisierten Filamins. Eine quantitative Aussage kann anhand des Säulendiagramms (Abbildung 17 C) erfolgen. Ohne EPS zeigt sich eine recht diffuse Verteilung von HspB5. Es liegen 2,44 % ( $\pm 0,43$  %) HspB5 Protein innerhalb der Läsionen vor. Unter Einfluss von *mild* EPS folgt ein sehr signifikanter Anstieg des HspB5 Signals innerhalb der Filamin-enhaltenen Läsionen auf 5,59 % ( $\pm 0,37$  %). Nach Behandlung mittels *twitch* Protokoll zeigt sich ein höchst signifikanter Anstieg auf 8,22 % ( $\pm 0,41$  %) läsionslokalisiertes HspB5 Protein gegenüber der unbehandelten Myotuben. Hierbei liegt auch ein sehr signifikanter Unterschied zwischen *mild* und *twitch* mit 5,59 % ( $\pm 0,37$  %) und 8,22 % ( $\pm 0,41$  %) vor. Die Lokalisation von HspB5 innerhalb der Läsionen nach *twitch* liegt mit *damage* auf gleicher Höhe bei 8,22 % ( $\pm 0,41$  %) und 7,97 % ( $\pm 0,73$  %). Gegenüber mildem EPS mit 5,59 %  $\pm 0,37$  % ist die verstärkte Lokalisation in den Läsionen nach *damage* mit 7,97 % ( $\pm 0,73$  %) signifikant erhöht. Gegenüber unstimulierten Myotuben ist die Steigerung höchst signifikant. Dieses Ergebnis zeigt, dass unter gesteigerter mechanischer Belastung ein signifikanter Anstieg des läsionslokalisiertem HspB5 zeigt. Ein ähnlicher Anstieg konnte bereits für BAG3 gezeigt werden, jedoch nicht für HspB8. Somit unterstützt dieses Ergebnis die zuvor genannte Interaktion von BAG3 und HspB5 anstelle des HspB8.





17: Einfluss auf die HspB5 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben.

**A** C2 Myoblasten wurden über fünf Tage zu Myotuben differenziert. Anschließend erfolgte anhand der Protokolle *mild*, *twitch* und *damage* eine dreistündige EPS. Die als Referenz verwendeten Myotuben wurden nicht mittels EPS stimuliert. Im Anschluss wurden die Myotuben mit Methanol/Aceton fixiert und mittels Antikörperfärbung Titin (violett) Filamin C (grün) und HspB5 (rot) dargestellt. Größenbalken = 20  $\mu$ m

**B** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse des prozentualen Anteils von HspB5 in den Läsionen für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM; n $\geq$ 5; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

**C** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Fläche der Filamin-enthaltenen Läsionen in Prozent für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM; n $\geq$ 5; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

### 3.2.1.4 Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von HspB1 in Myotuben

Ein weiteres potenzielles kleines Hitzeschockprotein, welches mit BAG3 interagiert und so möglicherweise die Funktion von HspB8 übernehmen kann, ist HspB1. Da für eine Quantifizierung und Bestimmung der Lokalisation innerhalb der Läsionen eine Färbung von Filamin und Titin in derselben Probe nötig sind, konnte keine statistische Analyse zu HspB1 durchgeführt werden. Aufgrund der verschiedenen Antikörpersubtypen war in diesem Fall eine dreifache Färbung aus technischen Gründen nicht durchführbar. Dennoch sollte mittels Filamin und HspB1 vorerst ein erster Überblick gewonnen werden, welcher über die Lokalisation von HspB1 und die Veränderung der Lokalisation Aufschluss gibt. Abbildung 18 zeigt deutlich, dass HspB1 eine diffuse Verteilung ohne den Einfluss von zusätzlicher mechanischer Belastung aufweist. Diese Verteilung kann auch durch die Überlagerung der Signale von HspB1 und Filamin (*merge*) nicht einem Muster oder eine Z-Scheibenlokalisation zugeordnet werden. Auch unter Einfluss von mechanischer Belastung zeigt sich keine

Veränderung der Struktur. Selbst mit der stärksten mechanischen Belastung (nach Behandlung mittels *damage* Protokoll) konnte keine spezifische Rekrutierung von HspB1 an Filamin oder in den Läsionen ausgemacht werden. Es zeigt sich somit unter allen Konditionen ein ähnliches Bild und damit keiner veränderten Lokalisation für HspB1. Die dargestellte Lokalisation lässt keine ersten Rückschlüsse auf ein verstärktes auftreten innerhalb der Filamin-enhaltenen Läsionen zu. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde eine andere Möglichkeit zur Quantifizierung des in den Läsionen lokalisierten Signals vorerst nicht weiterverfolgt.

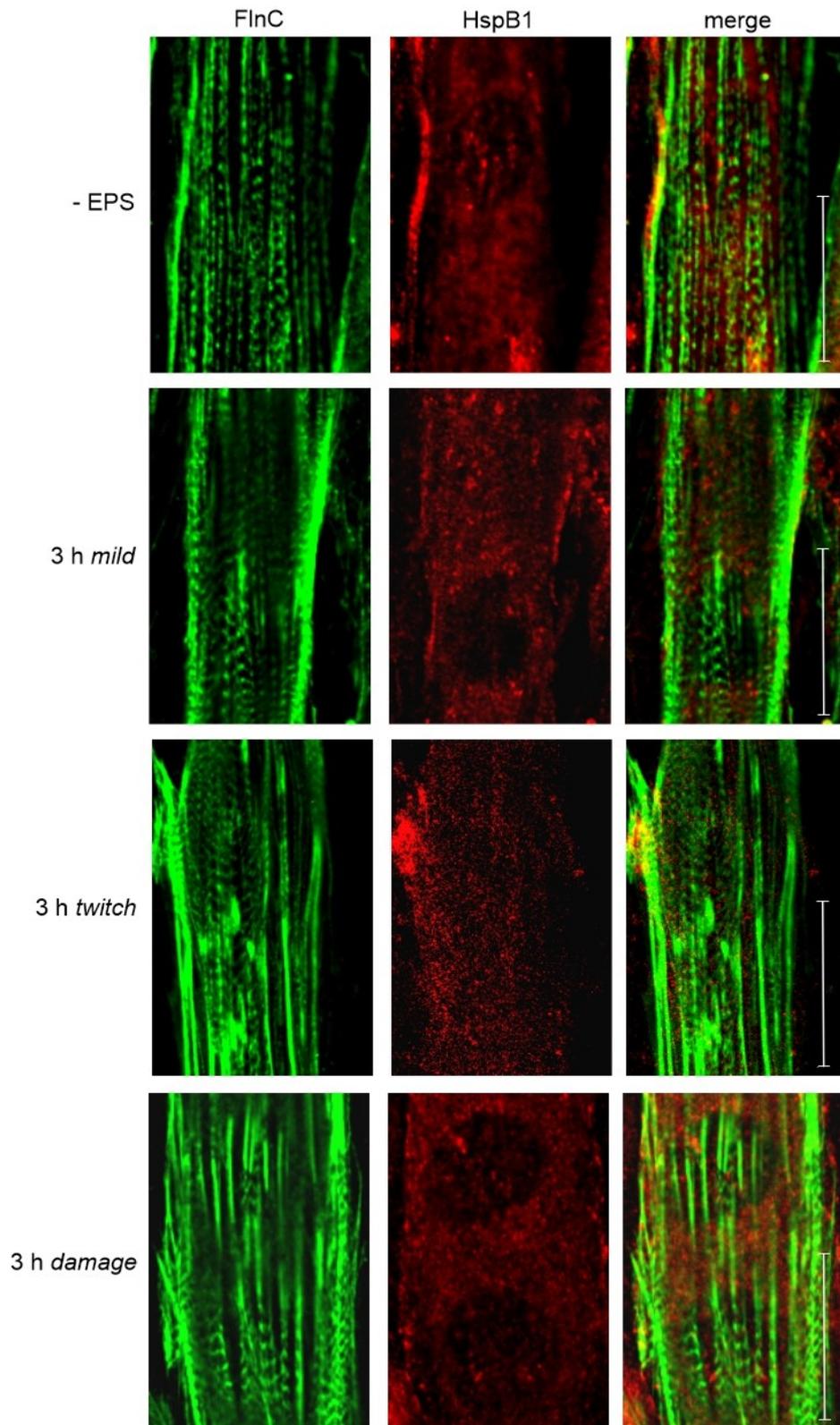


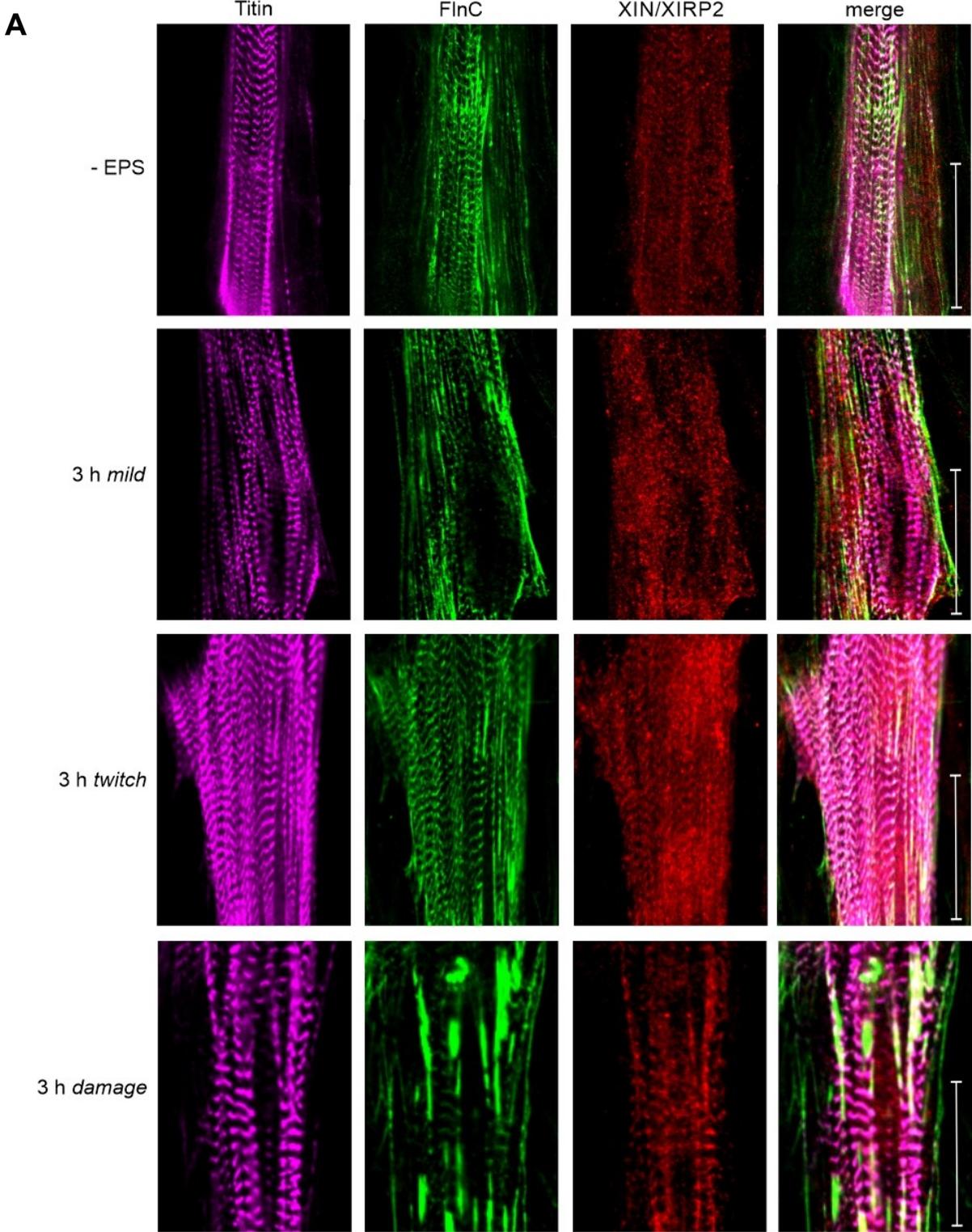
Abbildung 18: Einfluss auf die HspB1 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben.

C2 Myoblasten wurden über fünf Tage zu Myotuben differenziert. Anschließend erfolgte anhand der Protokolle *mild*, *twitch* und *damage* eine dreistündige EPS. Die als Referenz verwendeten Myotuben wurden nicht mittels EPS stimuliert. Im Anschluss wurden die

Myotuben mit Methanol/Aceton fixiert und mittels Antikörperfärbung Filamin C (grün) und HspB1 (rot) dargestellt. Größenbalken = 20 µm; n≥5.

### **3.2.1.5 Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von XIN/XIRP2 in Myotuben**

Xin/Xirp2 ist für seine Interaktion mit Filamin bekannt. Es verhindert weiter die Depolymerisation von Aktin. Somit ist XIN/XIRP2 als ein essenzielles Protein, welches für den Erhalt des Zytoskeletts mit all seinen Funktionen verantwortlich ist zu nennen (Eulitz et al. 2013; van der Ven et al. 2006). Aufgrund der Interaktion mit Filamin ist eine gewisse Kolo­kalisierung anzunehmen, welche anhand der Färbung gezeigt werden konnte. Die Lokalisation an Z-Scheiben wird durch den Z-Scheiben Marker Titin deutlich. Anhand der Bildreihe des Filamins zeigt sich der Anstieg des läsionslokalisiertem Filamins mit steigender mechanischer Belastung (Abbildung 19). Die quantitative Analyse des Filaminsignals ist in Abbildung 19 C dargestellt. Ohne den Einfluss von EPS liegen 2,95 % ( $\pm 0,40$  %) des XIN/XIRP2 Proteins in Läsionen lokalisiert. Erfahren die Myotuben eine Behandlung mit *mild* EPS, steigt der Anteil XIN/XIRP2 Protein nicht signifikant auf 3,70 % ( $\pm 0,62$  %) innerhalb der Läsionen. Unter *twitch* zeigt sich eine signifikante Erhöhung auf 5,81 % ( $\pm 0,65$  %) XIN/XIRP2 Protein innerhalb der Läsionen, welche auch signifikant gegenüber *mild* mit 3,70 % ( $\pm 0,62$  %) ist. Höchst signifikant ist der Unterschied zwischen unstimulierten Myotuben mit 2,95 % ( $\pm 0,40$ ) und *damage* mit 8,48 % ( $\pm 0,802$  %) läsionslokalisierten XIN/XIRP2. Auch gegenüber *mild* ist der Effekt von *damage* sehr signifikant und zusätzlich im Vergleich zu *twitch* ebenfalls signifikant erhöht. Das Experiment zeigt also, dass es besonders unter starker mechanischer Belastung (*damage*), zu einer deutlich vermehrten Rekrutierung von XIN/XIRP2 in den Filamin enthaltenden Läsionen kommt.



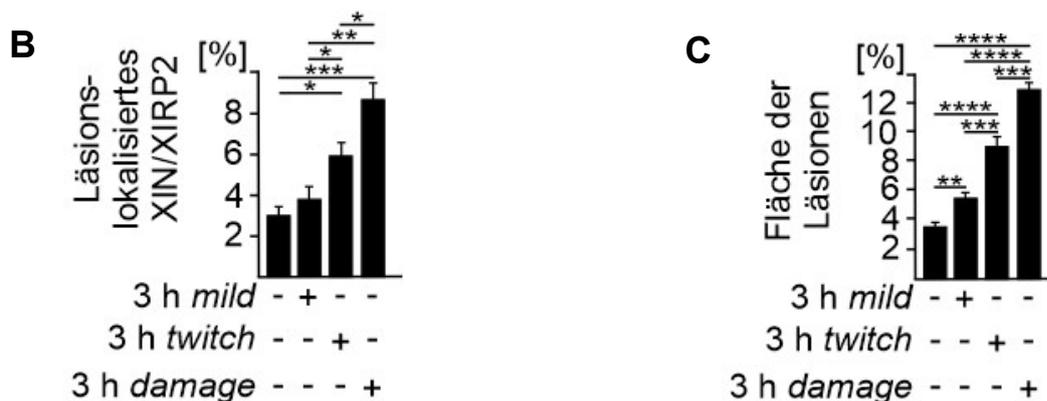


Abbildung 19: Einfluss auf die XIN/XIRP2 Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben.

**A** C2 Myoblasten wurden über fünf Tage zu Myotuben differenziert. Anschließend erfolgte anhand der Protokolle *mild*, *twitch* und *damage* eine dreistündige EPS. Die als Referenz verwendeten Myotuben wurden nicht mittels EPS stimuliert. Im Anschluss wurden die Myotuben mit Methanol/Aceton fixiert und mittels Antikörperfärbung Titin (violett) Filamin C (grün) und XIN/XIRP2 (rot) dargestellt. Größenbalken = 20  $\mu$ m

**B** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse des prozentualen Anteils von XIN/XIRP2 in den Läsionen für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**C** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Fläche der Filamin-enthaltenen Läsionen in Prozent für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

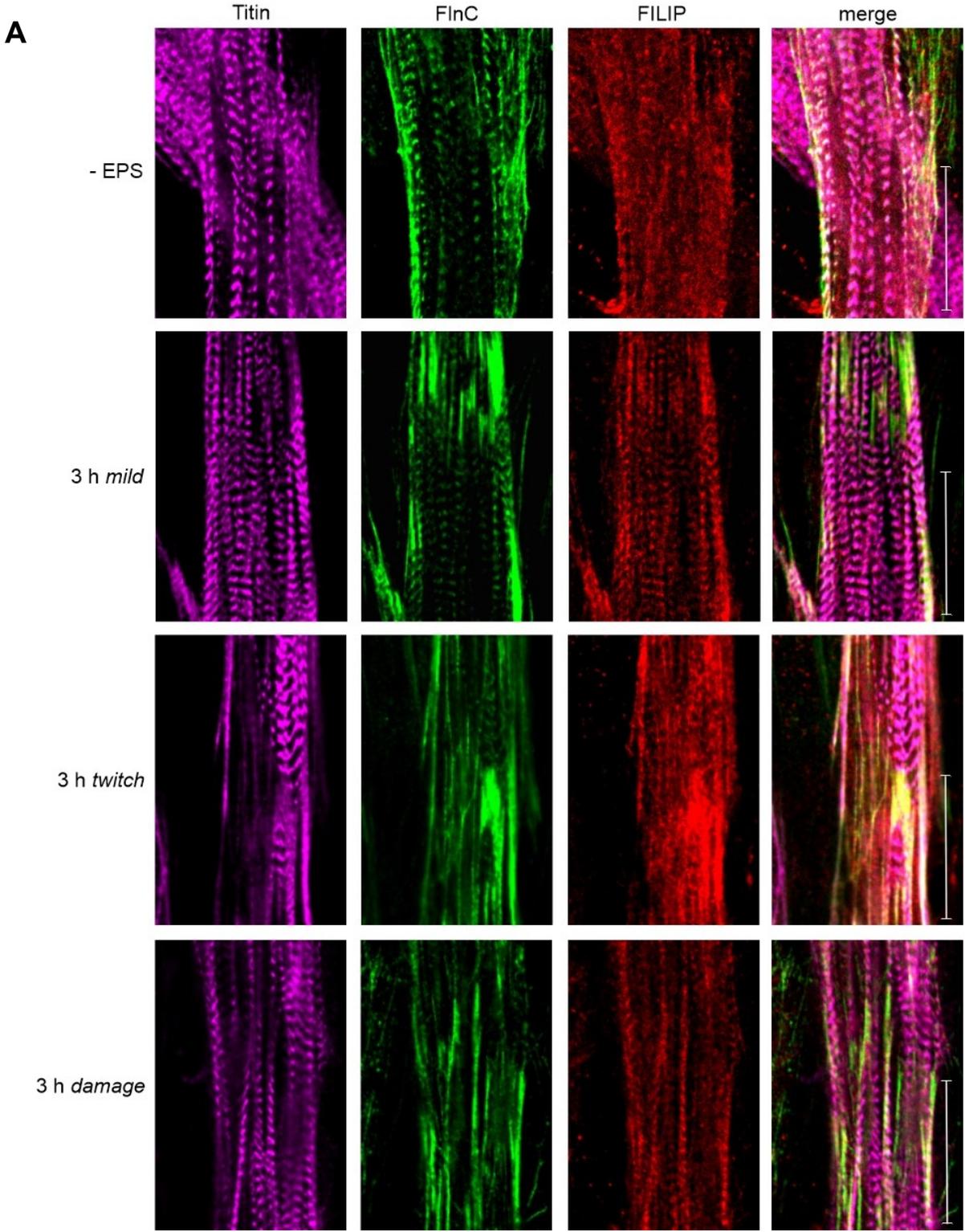
### 3.2.1.6 Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von FILIP in Myotuben

*Filamin A Interacting Protein 1* (FILIP) wird meist in Verbindung mit Filamin A genannt. Es ist bekannt, dass FILIP für den Abbau von Filamin A relevant ist. Es konnte nun auch von Reimann et al. (2020) gezeigt werden, dass ebenfalls eine Interaktion zwischen FILIP und Filamin C zustande kommt und der Abbau von Filamin C durch FILIP stimuliert wird. Folglich unterstützt FILIP die CASA-Maschinerie und somit den Abbau von Filamin C in Myotuben. Auf Basis dieser Erkenntnis sollte die Rekrutierung von FILIP in den Läsionen genauer betrachtet werden. Die Kolo-kalisation von Filamin an Z-Scheiben, welche mittels Titin dargestellt sind, zeigt mit steigender mechanischer Belastung einen Anstieg der Filamin-enthaltenen Läsionsbereiche (Abbildung 20 **A, C**).

Abbildung 20 zeigt für Myotuben ohne zusätzliche mechanische Belastung teilweise eine Lokalisation von FILIP an Z-Scheiben und in geringem Maße auch in den Läsionen mit 2,10 % ( $\pm 0,36$  %). Erfolgt eine Stimulation mittels *mild* zeigt sich lediglich eine geringe

Tendenz auf 2,72 % ( $\pm 0,12$  %) und somit kein signifikanter Anstieg von FILIP in den Läsionen. Erfahren die Myotuben jedoch eine stärkere mechanische Belastung, zeigt sich im Vergleich zur unstimulierten Referenz und ebenfalls den mit *mild* behandelten Myotuben ein signifikanter Anstieg für *twitch* auf 3,66 % ( $\pm 0,20$  %) und für *damage* auf 3,52 % ( $\pm 0,11$  %) des läsionslokalisierten FILIP.

Das Ergebnis zeigt einen Anstieg von FILIP innerhalb der Läsionen unter mechanischer Belastung (*twitch* und *damage*). Durch die gesteigerte Rekrutierung von FILIP in Filamin-enhaltenen Läsionen kann FILIP den Abbau von Filamin unterstützen.



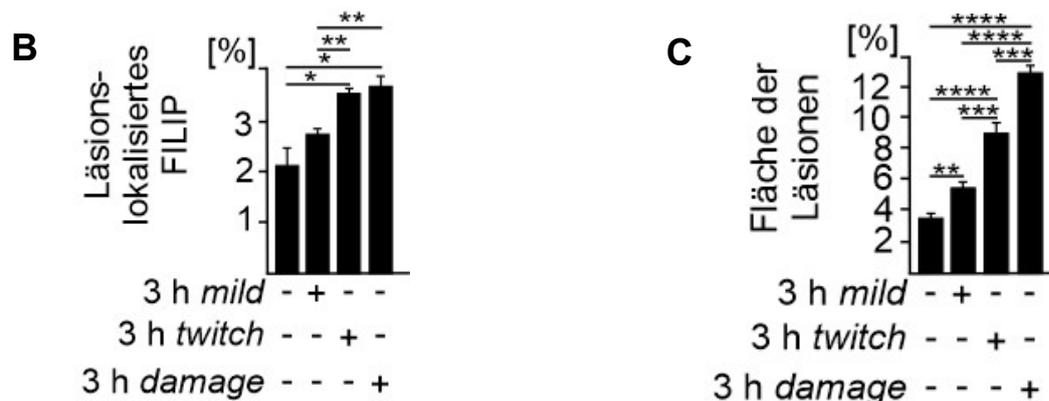


Abbildung 20: Einfluss auf die FILIP Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben.

**A** C2 Myoblasten wurden über fünf Tage zu Myotuben differenziert. Anschließend erfolgte anhand der Protokolle *mild*, *twitch* und *damage* eine dreistündige EPS. Die als Referenz verwendeten Myotuben wurden nicht mittels EPS stimuliert. Im Anschluss wurden die Myotuben mit Methanol/Aceton fixiert und mittels Antikörperfärbung Titin (violett) Filamin C (grün) und FILIP (rot) dargestellt. Größenbalken = 20  $\mu$ m

**B** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse des prozentualen Anteils von FILIP in den Läsionen für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ .

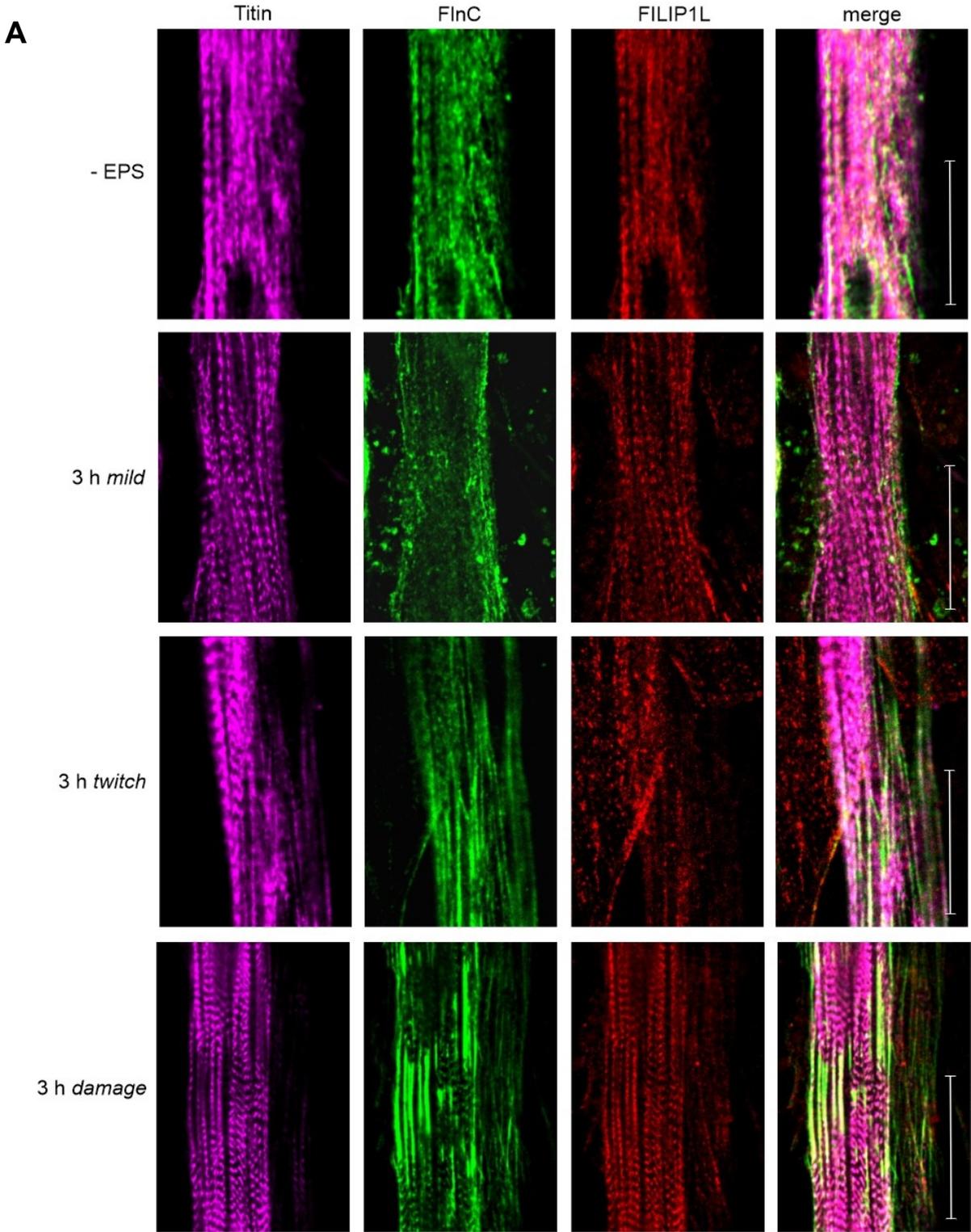
**C** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Fläche der Filamin-enthaltenen Läsionen in Prozent für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.2.1.7 Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von FILIP1L in Myotuben

Für eine Stressantwort ist die Synthese von Hitzeschockfaktoren unerlässlich. Diese Synthese wird über den Transkriptionsfaktor Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) vermittelt. *Filamin A Interacting Protein 1 Like* (FILIP1L) limitiert dabei die Funktion von HSF1, da aufgrund von FILIP1L der Abbau über das Proteasom von HSF1 induziert wird (Hu und Mivechi 2011). Die Funktion, in Bezug auf die CASA oder die Interaktion mit BAG3, ist dabei jedoch noch nicht abschließend geklärt. Um die Lokalisation von FILIP1 in Filamin-enthaltenen Läsionsbereichen genauer zu untersuchen, erfolgte die Färbung von Filamin sowie der Z-Scheiben mittels Titin. Anhand der Filaminbildreihe, sowie der quantitativen Analyse des Filaminsignals, lässt sich die Veränderung des Ausmaßes der Läsionen aufgrund von mechanischer Belastung zeigen (Abbildung 21). Die Lokalisation von FILIP1L ist in Abbildung 21 **A** dargestellt. Dabei fällt auf, dass FILIP1L eine dem Filamin ähnliche Lokalisation aufweist. Ohne zusätzliche mechanische

Belastung zeigt sich mit 2,96 % ( $\pm 0,27$  %) des FILIP1L Proteins kaum eine Lokalisation innerhalb der Läsionen. Erhöht man die mechanische Belastung (*mild*) kann ein höchst signifikanter Anstieg auf 6,59 % ( $\pm 0,45$  %) beobachtet werden. Ebenfalls ist ein sehr signifikanter Anstieg von FILIP1L in den Läsionen auf 5,31 % ( $\pm 0,35$  %) unter Einfluss von *twitch* zu sehen. Unter *damage* zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg auf 4,90 % ( $\pm 0,55$  %) gegenüber unbehandelten Myotuben.

Das Experiment zeigt, dass FILIP1L unter Einfluss von mechanischer Belastung in den Filamin-enhaltenen Läsionen unter *mild*, *twitch* und *damage* erhöht vorliegt. Weiter zeigt sich, dass der Anteil von FILIP1L innerhalb der Läsionen (*twitch* und *damage*) wieder leicht rückläufig ist.



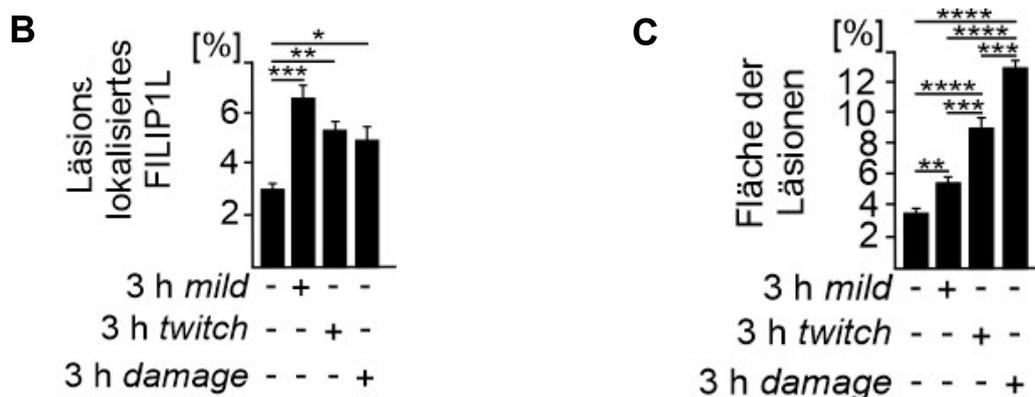


Abbildung 21: Einfluss auf die FILIP1L Lokalisation in Läsionen nach EPS in ausdifferenzierten Myotuben.

**A** C2 Myoblasten wurden über fünf Tage zu Myotuben differenziert. Anschließend erfolgte anhand der Protokolle *mild*, *twitch* und *damage* eine dreistündige EPS. Die als Referenz verwendeten Myotuben wurden nicht mittels EPS stimuliert. Im Anschluss wurden die Myotuben mit Methanol/Aceton fixiert und mittels Antikörperfärbung Titin (violett) Filamin C (grün) und FILIP1L (rot) dargestellt. Größenbalken = 20  $\mu$ m

**B** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse des prozentualen Anteils von FILIP1L in den Läsionen für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**C** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Fläche der Filamin-enhaltenen Läsionen in Prozent für unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.2.2 Einfluss der Mechanoadaptation auf das Läsionsausmaß

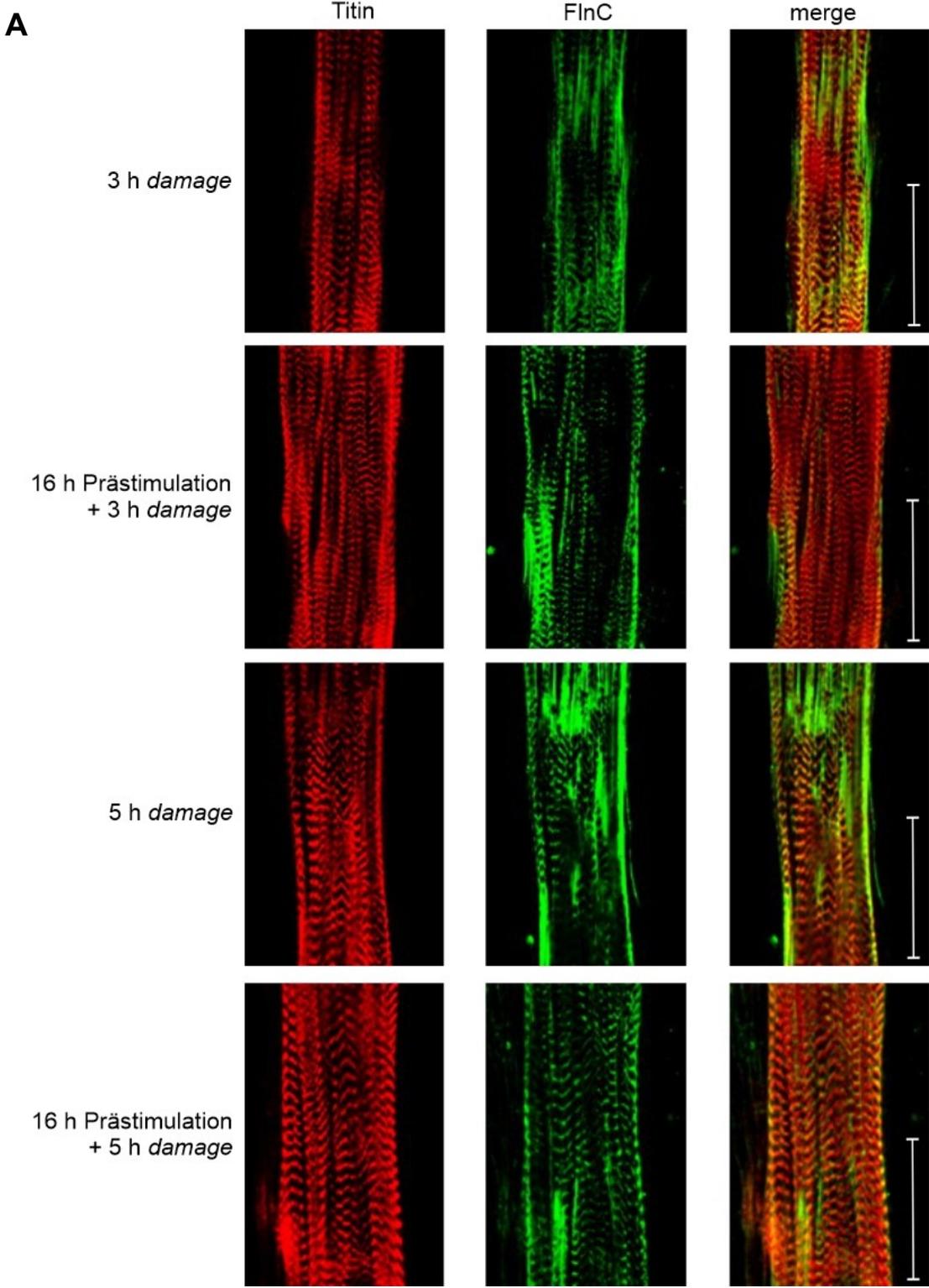
Wie in den vorangegangenen Experimenten eindrücklich dargestellt werden konnte, kommt es immer durch eine gesteigerte mechanische Belastung zu einem massiven Anstieg des Ausmaßes der Filamin-enhaltenen Läsionen (siehe 3.2.1). Eine Vielzahl, wie auch ein größeres Ausmaß, an Läsionen bedingt auch immer eine Erhöhung des Abbaus durch CASA, da die Menge an mechanisch entfaltetem Filamin dementsprechend proportional zu den Läsionen steigt. Diese Kompensation sowie die gleichzeitig nötige Neusynthese von Filamin benötigt Energie und Ressourcen. Um zu prüfen, ob Myotuben über Mechanismen verfügen, welche dabei nützlich sind, sich einer definierten und intensiven mechanischen Belastung (3 h *damage* oder 5 h *damage*) anzupassen, wurden differenzierte Myotuben für 16 Stunden prästimuliert. Die Prästimulation soll den Myotuben die Möglichkeit liefern, eine Mechanoadaptation, also eine Anpassung der Signalwege und Mechanismen an die

mechanische Belastung durchzuführen. Analysiert wurde die Fläche der Läsionen im Vergleich zur Gesamtfläche des Ausschnittes der Myotube in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung (Abbildung 22).

Vergleicht man die Läsionen der Myotuben welche mit 3 h *damage* und nach 5 h *damage* behandelt wurden, fällt auf, dass durch die Erhöhung der Dauer der mechanischen Belastung keine Adaption, sondern eine sehr signifikante Zunahme des Ausmaßes der Läsionen beobachtet werden kann. Dies äußert sich in einem Anstieg des Anteils der Filamin-enthaltenen Läsionen von 12,25 % ( $\pm 1,03$  %) für 3 h *damage* im Vergleich zu 20,41 % ( $\pm 1,4$  %) für 5 h *damage*. Werden die Myotuben 16 h prästimuliert und anschließend für 3 h nach *damage* Protokoll behandelt weisen diese einen Läsionsanteil von 4,38 % ( $\pm 0,33$  %) auf. Gegenüber Myotuben welche ohne Prästimulation einen Anteil von 12,25 % ( $\pm 1,03$  %) zeigen, liegt eine höchst signifikante Reduktion des Ausmaßes der Läsionen durch die Prästimulation vor.

Bei einer Behandlung mit 5 h *damage* liegt der Anteil der Läsionen bei 20,41 % ( $\pm 1,40$  %). Es zeigt sich also im Vergleich zu Myotuben, welche für 16 h prästimuliert wurden eine sehr signifikante Reduktion des Ausmaßes der Läsionen auf 9,85 % ( $\pm 1,68$  %).

Dieses Experiment macht den Einfluss mechanischer Belastung auf das Ausmaß der Filamin-enthaltenen Läsionen deutlich. Dabei eröffnet sich durch Prästimulation der Myotuben eine Möglichkeit zur Reduktion des Ausmaßes der Läsionen. Das heißt, Myotuben weisen die Fähigkeit auf, sich mechanischer Belastung spezifisch anzupassen und so das Ausmaß der Läsionen gering zu halten und vermindern zu können.



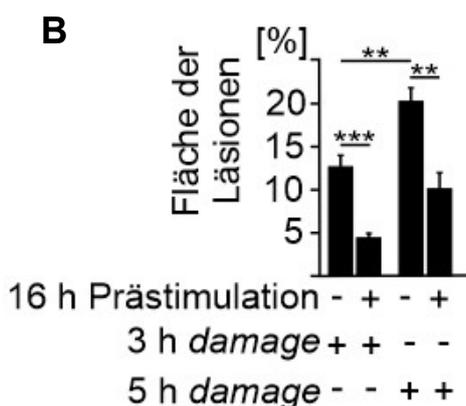


Abbildung 22: Einfluss mechanischer Adaption auf das Läsionsausmaß in Myotuben.

**A** C2 Myoblasten wurden über fünf Tage zu Myotuben differenziert. Anschließend erfolgte für 3 h oder 5 h eine Stimulation mittels *damage* Protokoll. Zusätzlich wurden 16 h prästimulierte Myotuben ebenfalls für 3 h oder 5 h mittels *damage* Protokoll behandelt. Anschließend konnten die Myotuben mit Methanol/Aceton fixiert und mittels Antikörperfärbung Titin (rot) und Filamin C (grün) dargestellt werden. Größenbalken = 20  $\mu$ m

**B** Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse des prozentualen Anteils der Läsionen unterschiedliche mechanische Belastungen. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM; n $\geq$ 5; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 3.2.3 Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von nukleärem TDP-43 in Myotuben

Um mögliche Erkenntnisse zur Bildung von Aggregaten oder granulären Strukturen in Myotuben gewinnen zu können, wurde TDP-43 mittels Antikörperfärbung dargestellt. TDP-43 liegt unter Standardbedingungen im Nukleus vor. Hier dient es der Bewegung von RNA und DNA. Es ist bekannt, dass während der Differenzierung TDP-43 in das Zytosol übergehen kann, jedoch ist dies kein Dauerzustand. So zeigen ausdifferenzierte Myotuben TDP-43 wieder kernlokalisiert (Guerrero et al. 2016; Vogler et al. 2018). Die Lokalisation innerhalb des Nukleus kann mittels DAPI-Färbung dargestellt werden. In Abbildung 23 zeigt sich ohne jeglichen mechanischen Einfluss (-Prästimulation, -*damage*), dass in differenzierten C2 Myotuben TDP-43 stark kernlokalisiert ist. Folgend wird diese Lokalisation von TDP-43 als Referenz betrachtet. Relativ zu unstimulierten Myotuben erfolgte eine fünfständige EPS nach *damage* Protokoll. Dabei zeigt sich ein sehr signifikanter Anstieg des zytoplasmatischen TDP-43 auf 1,26 ( $\pm$ 0,05) in den stimulierten Myotuben im direkten Vergleich zu unstimulierten Myotuben (1 $\pm$ 0). Aufgrund der mechanischen Belastung erfolgt somit eine Akkumulation von TDP-43 im Zytoplasma. Die Lokalisation außerhalb des Nukleus lässt sich anhand der Bilderreihe der *merge*-Darstellungen erkennen. Weiter wurde untersucht, ob eine

Prästimulation von 16 h der Myotuben mit *mild* (+Prästimulation) die Lokalisation von TDP-43 beeinflusst. Es kann eine Tendenz festgestellt werden, dass es zu einem deutlich geringeren Anstieg des zytoplasmatischen TDP-43 nach Prästimulation der Myotuben auf 1,02 ( $\pm 0,10$ ) kommt. Erweitert man die 16 h Prästimulation um 5 h *damage* (+Prästimulation + 5 h *damage*) zeigt sich ein signifikanter Anstieg des zytoplasmatischen TDP-43 auf 1,05 ( $\pm 0,02$ ) gegenüber unstimulierten Myotuben. Dieser geringe Anstieg zeigt sich beim direkten Vergleich von 16 h Prästimulation mit 1,02 ( $\pm 0,10$ ) zu 16 h Prästimulation plus 5 h *damage* als nicht signifikant. Weiter kann ein signifikanter Unterschied zwischen 5 h *damage* mit 1,26 ( $\pm 0,05$ ) und 16 h Prästimulation kombiniert mit 5 h *damage* mit 1,05 ( $\pm 0,02$ ) gezeigt werden. Hierbei kommt es zu einer signifikanten Reduktion des zytoplasmatischen TDP-43 nach Prästimulation der Myotuben.

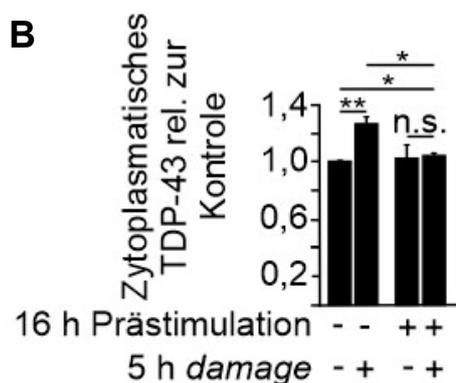
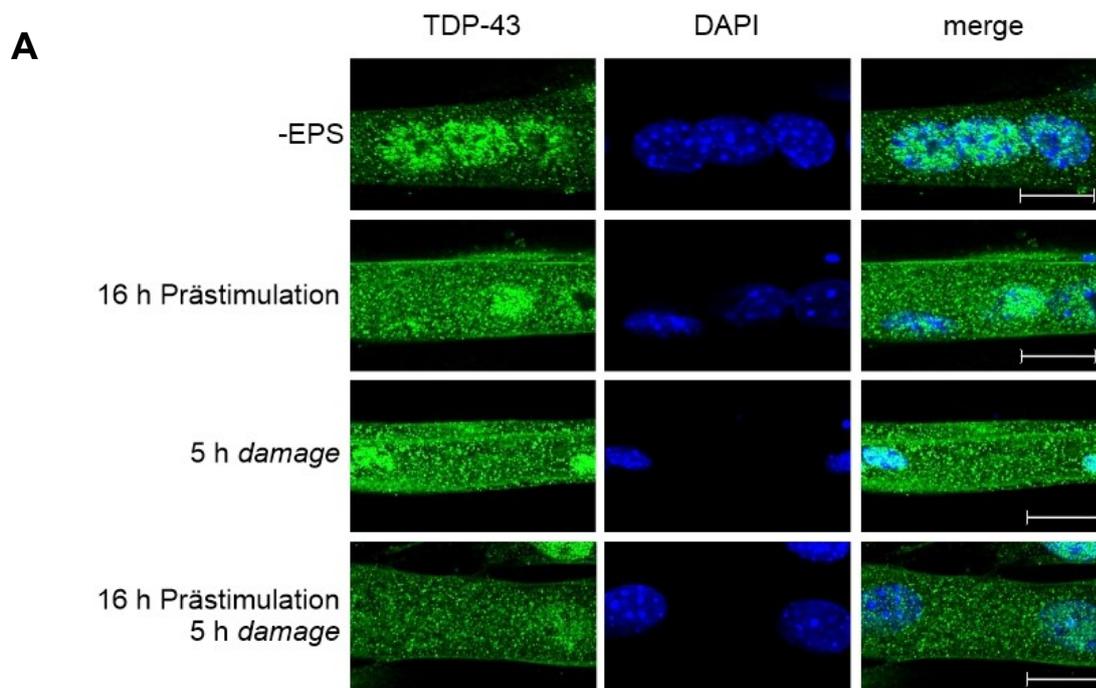


Abbildung 23: Lokalisation von TDP-43 in Myotuben und mechanoadaptierten Myotuben nach EPS.

**A** Die ausdifferenzierten Myotuben wurden nach unterschiedlichen EPS Protokollen behandelt, zusätzlich wurde eine unstimulierte Kontrolle als Referenz verwendet. Direkt anschließend an die Stimulation erfolgte die Fixierung mit PFA sowie eine Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und die Antikörperfärbung gegen TDP-43 (grün).  
Größenbalken = 20  $\mu$ m

**B** Für das dargestellt Säulendiagramm wurde zuvor eine quantitative Analyse des zytoplasmatischen TDP-43 durchgeführt und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Daten zeigen den MW  $\pm$ SEM;  $n \geq 5$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n. s. = nicht signifikant.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Induktion von mechanischer Belastung in Glattmuskelzellen**

Für die Proteinhomöostase ist das Protein BAG3 unter mechanischer Belastung essenziell. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, welche in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte der Einfluss mechanischer Belastung auf die Lokalisation von BAG3 in Glattmuskelzellen und Skelettmuskelzellen untersucht werden.

Den Kern der CASA-Maschinerie stellt BAG3 dar. Ist CASA aktiv, so zeigt sich in Glattmuskelzellen eine Rekrutierung von BAG3 an Aktinstressfasern (Höhfeld et al. 2021; Ulbricht et al. 2013a). Um den Einfluss von CASA und die Interaktionen mit möglichen Bindepartnern zu untersuchen, wurde geprüft, ob es Möglichkeiten gibt, CASA in A7r5 Zellen spezifisch aktivieren zu können (3.1.1; 3.1.2). Hierfür wurde die Kolo­kalisierung von BAG3 und Aktin, sofern diese zustande kommt, analysiert. Aufgrund eines Mangels an Serum (3.1.1), also durch Erzeugen eines Hungerzustandes der Zellen, konnte keine Veränderung gezeigt werden. Es liegt keine verstärkte Kolo­kalisierung von BAG3 und Aktin vor. Es konnte somit in dieser Arbeit keine spezifische oder verstärkte Lokalisation von BAG3 an Aktinstressfasern belegt werden. Es ist bekannt, dass der Mangel von Nährstoffen zur Induktion der Makroautophagie führt. Auf CASA konnte anhand dieses Experimentes kein Einfluss durch Serumentzug gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Lokalisation von BAG3 an Aktinstressfasern unabhängig von einem induzierten Nährstoffmangel ist.

Wie bereits unter 3.1.1 beschrieben, kann mittels LPA die Bildung von Aktinstressfasern induziert werden. Dies hat zur Folge, dass es zu einer gesteigerten Spannung der Zelle kommt. Die Untersuchungen der Glattmuskelzellen A7r5 konnten nach Behandlung mit LPA weder eine Induktion der Aktinstressfaserbildung noch eine Rekrutierung von BAG3 an Aktinstressfasern zeigen (3.1.1). Somit konnte auch durch die Behandlung von A7r5 Zellen mit LPA keine gesteigerte CASA-Aktivität, aufgrund der Kolo­kalisierung von BAG3 an Aktin, belegt werden.

Als weitere Option, mechanische Belastung in A7r5 Zellen zu induzieren, wurde Fibronectin eingesetzt. Das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin kann durch die Interaktion mit Integrinen Einfluss auf das Aktinzytoskelett haben. So kann die Spannung und die Adhäsion der Zelle verstärkt werden. 3.1.2 zeigt, dass Fibronectin in der Lage ist, die Lokalisation von BAG3 zu beeinflussen. Die Untersuchungen zeigen eine gleichmäßige und geordnete Verteilung von BAG3. Durch Ulbricht et al. (2013a) konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Festigkeit des Untergrundes Glattmuskelzellen (A7r5) in der Lage sind, intrazellulär mechanische Kräfte aufzubauen. Diese gesteigerte mechanische Belastung führt zu einer Induktion von CASA.

Es kann also zusammenfassend gefolgert werden, dass die CASA-Kernkomponente BAG3 weder durch Hunger noch durch Behandlung der A7r5 Glattmuskelzellen mit LPA an Aktinstressfasern rekrutiert. Somit kann kein Einfluss anhand dieser Ergebnisse gesehen werden. Lediglich Fibronectin führt zur Veränderung der Lokalisation von BAG3 und somit zu einer Rekrutierung von BAG3 an Aktinstressfasern unter Einfluss von mechanischer Belastung.

## **4.2 Einfluss des Phosphorylierungsstatus von BAG3 in Glattmuskelzellen**

### **4.2.1 Einfluss des Phosphorylierungsstatus von BAG3 auf die Kolokalisation an Aktinstressfasern**

Die Lokalisation von BAG3 an Aktinstressfasern wird durch die mechanische Belastung reguliert. Anhand der Untersuchungen zur Kolokalisation von BAG3 an Aktinstressfasern konnte der Einfluss von Fibronectin gezeigt werden (3.1.2). Durch die Interaktion von Fibronectin mit Integrinen auf der Oberfläche der Zellmembran kommt es zur verstärkten Adhäsion der Zelle. Über die Verbindung der extrazellulären Integrine über Adapterproteine mit dem Aktinzytoskelett kommt es zu einer Weiterleitung der gesteigerten mechanischen Belastung und so schließlich zur Rekrutierung von BAG3. Die Quantifizierung der direkten Kolokalisation von BAG3 mit Aktin ist unter 3.1.3 dargestellt.

Weiter kann die veränderte mechanische Belastung auch an mechanosensitiven Phosphorylierungsstellen gezeigt werden (3.1.3). Die ausgewählten phosphomimetischen BAG3 Varianten der kraftregulierten Phosphorylierungsstellen S136, T285, S289 und T285 S289 werden unter mechanischer Belastung ebenso entlang der Aktinstressfasern rekrutiert, wie der BAG3 WT. Dennoch liegen folgende Veränderungen vor: Die analysierten phosphomimetischen Mutanten zeigen zwar die beschriebene Lokalisation an Aktinstressfasern, jedoch kann nicht für alle phosphomimetischen Mutanten der kraftregulierten Phosphorylierungsstellen der gleiche Effekt, wie für den BAG3 WT, beschrieben werden. Die reduzierte Rekrutierung von BAG3 WAWA an Aktinstressfasern konnte bereits von Kathage et al. (2017) gezeigt werden. Die Lokalisation des Serins136 der phosphomimetische Mutante S136 ist in einem den beiden RSQS-Motiven zu finden. Es erfolgt aufgrund der Phosphorylierung eine Interaktion mit 14-3-3 Proteinen (Xu et al. 2013). Dies deutet darauf hin, da die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen in Verbindung zu weiteren Abbauwegen steht. Für die phosphomimetischen Mutante T285A zeigt sich eine verringerte Rekrutierung an Aktinstressfasern. Da die Reduktion der Rekrutierung an Aktin jedoch lediglich 15 % beträgt, scheint dies in dieser Arbeit keinen weiteren Einfluss zu haben. Anders zeigt sich die phosphorylierte Form der phosphomimetischen Mutante BAG3 T285. Hier konnte keine Veränderung Rekrutierung an Aktin gezeigt werden. Offensichtlich kommt es

aufgrund der Phosphorylierung an T285 zu anderweitigen Reaktionen, die noch nicht abschließend geklärt sind. Die Lokalisation der phosphomimetischen Mutanten BAG3 S289 zeigt sowohl für die phosphorylierte als auch die dephosphorylierte Mutante einen negativen Einfluss auf die Kolo-kalisation mit Aktin. Ob die reduzierte Kolo-kalisation einen maßgeblichen Effekt auf CASA oder auch andere Funktionen der Zelle aufweist, kann aus diesen Daten nicht abschließend geschlussfolgert werden. Die Lokalisation der phosphomimetischen Mutanten BAG3 T285 S289 an Aktin erfolgt unverändert und weist keinen Unterschied zum BAG3 WT auf.

Zusammenfassend konnte eindrücklich gezeigt werden, dass die Rekrutierung von BAG3 in A7r5 Glattmuskelzellen durch Fibronektin beeinflusst wird. Es wird der Zusammenhang der gesteigerten mechanischen Belastung mit der Kolo-kalisation von BAG3 und Aktin deutlich. Es konnte für die phosphomimetischen Mutanten der kraftregulierten Phosphorylierungsstellen nur geringe Abweichungen vom BAG3 WT festgestellt werden. Inwiefern diese geringen Veränderungen der Lokalisation an Aktin einen Effekt auf Abbauege wie CASA haben, kann anhand dieser Daten alleine nicht abschließend geklärt werden. Ob in diesen speziellen Fällen CASA oder aber ein CASA ähnlicher Signalweg erfolgt, welcher BAG3 vermittelt ist, muss somit weiter untersucht werden.

#### **4.2.2 Ausbildung granulärer Strukturen aufgrund der Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von BAG3**

Die Analyse und Darstellung der Kolo-kalisation von BAG3 an Aktinstressfasern 3.1.3 legt nahe, dass es zu einer veränderten Struktur des BAG3 Signals kommt. Betrachtet man den BAG3 WT zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung entlang der Aktinstressfasern. Blickt man dagegen auf die BAG3 WAWA Mutante oder die phosphomimetischen BAG3 Mutanten, fällt eine Veränderung der Struktur, hin zu einer granuläre Struktur auf. Dies könnte ein Hinweis auf sogenannte Stress Granula sein. Stress Granula bezeichnet Aggregate aus RNA und Proteinen, welche durch Stress wie mechanische Belastung oder Hunger verursacht werden können. Diese Aggregate müssen, um die Proteostase aufrechterhalten zu können, schlussendlich, auch mittels Autophagie, abgebaut werden (Protter und Parker 2016; van Treeck und Parker 2019). Die Veränderung der Struktur der BAG3 WAWA Mutante lässt sich vermutlich auf die Inhibition der Interaktion mit verschiedenen Bindepartnern zurückführen. Es kommt zu verschiedenen Einschränkungen der CASA. An die eigentliche WW Domäne des BAG3 kann beispielsweise SYNPO2, TSC1, AMOTL1 und AMOTL2 sowie LATS1 und LATS2 binden. Steht die WW Domäne nicht mehr in voller Funktion zur Verfügung, äußert sich dies in Transkription, Translation und Autophagie, da in allen Bereichen BAG3 mit verschiedenen Interaktionspartnern interagiert.

Die phosphomimetischen Mutanten der kraftregulierten Phosphorylierungsstellen weisen ebenfalls dieses veränderte Bild auf. Hier müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob es sich in diesen Fällen um Stress Granula handelt oder ob es hier zu einer Bildung von Aggregaten kommt. Dies wäre beispielsweise denkbar für den Fall, dass die verschiedenen Varianten von BAG3 zu einer Komplexbildung führen. Es zeigt sich also, dass es essenziell zum Verständnis der einzelnen Phosphorylierungsstellen beitragen kann, zu klären, ob es sich bei den auftretenden Strukturen um Stress Granula, Komplexierung von BAG3 oder anderen Strukturen handelt. Ebenso müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob und inwiefern diese Strukturen Abbauege wie beispielsweise CASA beeinflussen.

#### **4.2.3 BAG3 vermittelte Rekrutierung von TSC1**

Die Interaktion von BAG3 und TSC1 erfolgt über die WW Domäne des BAG3. Aufgrund der Bindung von TSC1 an BAG3 kommt es lokal zu einer Inhibition von mTORC1 und folgend zur Induktion der Autophagie. Durch Mutationen innerhalb der WW Domäne (BAG3 WAWA) kommt es zur verringerten Lokalisation von TSC1 an Aktinstressfasern. Dieser Sachverhalt ist damit assoziiert, dass es aufgrund der veränderten WW Domäne nicht weiter zur korrekten Interaktion von BAG3 und TSC1 kommen kann. Folglich kann aufgrund der fehlerhaften Bindung von TSC1 an BAG3 nur eine deutlich geringere Menge TSC1 an den Aktinstressfasern lokalisiert detektiert werden (Kathage et al. 2017).

Die phosphomimetischen Mutanten der kraftregulierten Phosphorylierungsstellen S136, T285, S289 und T285 S289 liegen alle nicht innerhalb der WW Domäne. Somit ist bei den phosphorylierten wie auch dephosphorylierten Mutanten von BAG3 die eigentliche Bindestelle von TSC1 vorerst nicht blockiert. Die unter 3.1.4 dargestellten Ergebnisse spiegeln wider, dass es zu keiner signifikanten Veränderung der TSC1 Lokalisation an Aktin kommt. Die einzige Ausnahme kann bei BAG3 S289A gesehen werden. Im Fall von S289A konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass allgemein die Rekrutierung von BAG3 an Aktin ebenfalls verringert ist. Die verringerte Kolo-kalisation von BAG3 und Aktinstressfasern könnte ein Hinweis darauf sein, dass es auch dementsprechend zu einer verringerten TSC1 Lokalisation an Aktinstressfasern kommen kann.

Insgesamt zeigt sich jedoch für die anderen phosphomimetischen Mutanten ein, vom Phosphorylierungszustand, unabhängiges Bild. Es konnte keine weitere signifikante Veränderung aufgrund der Phosphorylierung oder Dephosphorylierung gezeigt werden. Somit kommt es wie für den BAG3 WT beschrieben zur Interaktion von BAG3 mit TSC1, gefolgt von der lokalen Induktion der Autophagie. Neben der an den Aktinstressfasern lokalisierten gesteigerten Autophagie kommt es durch Aktivierung von mTORC1 zur Translation. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es aufgrund der Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von

BAG3 zu keiner Änderung der Interaktion mit TSC1 kommt. Der mTORC1 Signalweg bleibt somit unbeeinflusst durch die phosphomimetischen Mutanten des BAG3 Proteins.

#### **4.3 Lokalisation verschiedener Proteine in Läsionen von elektropulsstimulierten Myotuben**

Aufgrund der Möglichkeit, differenzierte Myotuben mittels EPS zu stimulieren, eröffnen sich verschiedenste Untersuchungen der Zellen nach akuter mechanischer Belastung. Dabei ist die Art der Belastung von milden Impulsen bis hin zu exzessiven Einheiten, welche zu Zellschäden führen, variable. Es konnte bereits durch Orfanos et al. (2016) gezeigt werden, dass in Myotuben durch Variation der Intensität der Stimulation, das Ausmaß der sogenannten Läsionen beeinflusst werden kann. Läsionen (Mikroverletzungen) treten bereits durch Kontraktion auf und beschreiben kleine Schäden einzelner Myofibrillen oder Sarkomere. Innerhalb der Läsionen liegt mechanisch irreversibel entfaltetes Filamin vor. Dieses Filamin ist eine der Zielstrukturen, die mittels CASA abgebaut werden. Die Funktion von CASA sowie der CASA Kernkomponenten sind in der quergestreiften Muskulatur für die Homöostase von Filamin unerlässlich. Filamin lokalisiert in der quergestreiften Muskulatur an den Z-Scheiben. Kommt es zu einer mechanischen Belastung äußert sich diese in der Entfaltung von Filamin. Ist die Entfaltung von Filamin irreversibel, so kann das anhand der Lokalisation von Filamin dargestellt werden, da funktionsloses Filamin nicht mehr an den Z-Scheiben rekrutiert vorliegt. Um weitere Erkenntnisse zur Lokalisation der CASA Kernkomponenten BAG3 und HspB8 zu erlangen, sollte die Lokalisation der Proteine in den Läsionen ermittelt werden. Es konnte wie unter 3.2.1.1 beschrieben ein signifikanter Anstieg von BAG3 in den Läsionen mit steigender mechanischer Belastung gezeigt werden. Dieser Anstieg ist vergleichbar mit dem Ausmaß der Filamin-enthaltenen Läsionen (Abb. Abbildung 15 C). Es zeigt sich deutlich, dass durch ein verstärktes Auftreten von irreversibel entfaltetem Filamin, welches abgebaut werden muss, es zu einem Anstieg an BAG3 kommt. Dabei wird aufgrund der Lokalisation innerhalb der Läsionen deutlich, dass es zu CASA oder einem anderen BAG3 vermittelten Abbau kommt. Durch die Arbeiten von Lohanadan et al. (2021) konnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit der Isoform des SYNPO2 Proteins zu verschiedenen Funktionen des SYNPO2 Proteins kommt. Das Resultat dieser Untersuchungen ist, dass SYNPO2b ohne Einfluss mechanischer Belastung in den Z-Scheiben lokalisiert ist. Da SYNPO2b auch eine Komponente des CASA-Komplexes darstellt und mit BAG3 interagiert, kommt es somit vermutlich zum autophagischen Abbau der CASA-Zielstrukturen. Erfährt die Zelle eine mechanische Belastung, konnte durch Lohanadan et al. (2021) gezeigt werden, dass innerhalb der Läsionen vermehrt die Isoform SYNPO2e vorliegt. Hierbei wird für diese Isoform besonders die Stabilisierung sowie eine schützende Funktion der Myofibrillen betont.

Zusammenfassend kann SYNPO2e eine deutlich dynamischere Rolle, unter Einfluss von mechanischer Belastung, zugesprochen werden. SYNPO2b verbleibt dagegen auch unter Einfluss von mechanischer Belastung an den Z-Scheiben und kann dort beispielsweise mit BAG3 interagieren. Betrachtet man nun die Untersuchungen dieser Arbeit zu BAG3 (3.2.1.1), zeigt sich auch hier unter steigender mechanischer Belastung eine klare Dynamik. Die Lokalisation des BAG3 Protein nimmt innerhalb der Läsionen zu. Es liegt nahe, dass es in den Läsionen zu einer Interaktion von BAG3 mit SYNPO2e kommt. Dies kann zur Aufrechterhaltung der Homöostase innerhalb der Läsionen beitragen und so eine protektive Wirkung auf die Zelle haben. Weiter kann das an den Z-Scheiben verbliebene BAG3 mit SYNPO2b interagieren und so den autophagischen Abbau durch CASA erhalten.

Eine weitere Kernkomponente von CASA stellt das Protein HspB8 dar. Für HspB8, welches direkt mit BAG3 interagieren kann, konnte nicht gezeigt werden, dass es unter Einfluss von mechanischer Belastung zu einer Steigerung der Lokalisation des HspB8 Proteins innerhalb der Läsionen kommt. (3.2.1.2). Anhand der Ergebnisse lässt sich auf eine Entkopplung von HspB8 schließen. Die durch Lohanadan et al. (2021) erläuterte Interaktion von BAG3 mit SYNPO2b in den Z-Scheiben wird durch mechanische Belastung nicht weiter beeinflusst. Für HspB8 zeigt sich ein ähnliches Verhalten und verhält sich somit nicht mit gleicher Dynamik wie SYNPO2e oder BAG3. Dies würde die Annahme unterstützen, dass es innerhalb der Läsionen zu einem Austausch von HspB8 durch einen anderen BAG3 Bindepartner kommt. Ob es aufgrund dessen zu einer Reduktion des Abbaus durch CASA innerhalb und außerhalb der Filamin-enthaltenen Läsionen kommt, muss weiter untersucht werden.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es zu Veränderungen der Zusammensetzung des CASA-Komplexes, aufgrund von mechanischer Belastung, kommt. Ob dieser veränderte Abbauweg aufgrund von mechanischer Belastung komplett von CASA abweicht und somit einen weiteren, unabhängigen Abbauweg darstellt, oder ob CASA in veränderter Form vorliegt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Für einen veränderten Abbau durch CASA spricht weiter, dass neben HspB8 auch HspB5 mit BAG3 direkt interagieren kann (Rauch et al. 2017). Unter 3.2.1.3 zeigt sich mit steigender mechanischer Belastung eine signifikante Steigerung des Signals innerhalb der Läsionen. Somit kann eine dynamische Lokalisation des HspB5 Proteins gezeigt werden. Es ist ferner bekannt, dass kleinen Hitzeschockproteine zwar alle eigene Funktionen besitzen, dennoch sind teilweise Überlappungen der Funktionen zu beobachten. Für HspB5 ist ebenfalls eine Interaktion mit Hsp70 beschrieben und zusätzlich wird HspB5 mit der Faltung von Proteinen assoziiert (Tanguay und Hightower 2015). Aufgrund der gesteigerten Lokalisation innerhalb der Filamin-enthaltenen Läsionen unter mechanischer Belastung kann hier HspB5 zur Stabilisation der Sarkomere beitragen. Weiter legt dies die Vermutung nahe, dass HspB5 einen alternativen Bindepartner zu HspB8 darstellt. Weitere Analysen müssen zeigen, ob es

zwischen BAG3, HspB5 sowie SYNPO2e zu einer Interaktion kommt und so der Abbau des Filamins innerhalb der Läsionen mittels CASA ermöglicht wird. Alternativ ist es möglich, dass durch die Zusammenarbeit verschiedener Chaperone auch der Abbau von Filamin über weitere Wege erfolgen kann. Das entfaltete Protein kann so über HspB5 oder andere Chaperone lediglich stabilisiert werden, sodass es nicht zur Bildung unlöslicher Aggregate der Proteine kommt.

Wie HspB5 kann auch HspB1 mit BAG3 interagieren. Für HspB1 sind ebenfalls protektive Funktionen wie für HspB5 beschrieben (Collier et al. 2019). So ist es naheliegt, dass auch dieses kleine Hitzeschockprotein anstelle von HspB8 oder HspB5 mit BAG3 interagieren kann und so zum Abbau oder zur Stabilisation von entfaltetem Filamin nach mechanischer Belastung führen kann. Aufgrund eines ersten Eindrucks der Lokalisation von HspB1 konnte keine spezifische Akkumulation unter akuter mechanischer Belastung innerhalb der Läsionen erkannt werden (siehe 3.2.1.4). Es zeigt sich bei den kleinen Hitzeschockproteine ein ähnliches Verhalten wie bei den SYNPO2 Isoformen (Lohanadan et al. 2021). So wäre ein denkbare Modell, dass unter mechanischer Belastung innerhalb der Läsionen besonders HspB5, welches sich äußerst dynamisch zeigt, zur Stabilisierung beiträgt, hingegen HspB1 eher undynamisch und Z-Scheiben lokalisiert ist. Dies würde für eine Beteiligung von HspB1 am autophagischen Abbau (CASA) sprechen. Diese These muss besonders für das Protein HspB1 durch weitere quantitative Analysen abschließend geklärt werden. Weiter muss untersucht werden, ob es zu keiner spezifischen Steigerung von HspB1 innerhalb der Läsionen unter steigender mechanischer Belastung kommt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch den Einfluss von akuter mechanischer Belastung ein Abbau durch CASA verstärkt an den Z-Scheiben erfolgt, innerhalb der Läsionen jedoch primär ein protektiver Mechanismus, zum Schutz der Struktur, zum Einsatz kommt. Da der Abbau nicht gänzlich zum Erliegen kommt, müssen alternative Signalwege, in welche BAG3 wie auch die unterschiedlichen kleinen Hitzeschockproteine involviert sind, genauer analysiert werden.

Auch das Protein XIN/XIRP2 interagiert mit Filamin. Dabei ist XIN/XIRP2 besonders für den Erhalt des Zytoskeletts verantwortlich und lokalisiert mit Filamin in den Z-Scheiben. Kommt es zu einer Beschädigung (Läsion) oder einer Veränderung der Struktur der Sarkomere, kommt XIN/XIRP2 besonders innerhalb dieser Strukturen vor (Eulitz et al. 2013; van der Ven et al. 2006). Wie unter 3.2.1.5 dargestellt ist, erfolgt mit steigender mechanischer Belastung auch eine verstärkte Lokalisation von XIN/XIRP2 innerhalb der Läsionen. Ähnlich wie das dynamische Verhalten, welches für SYNPO2e beschrieben ist (Lohanadan et al. 2021), liegt hier die Vermutung nahe, dass somit die Struktur und Stabilität der Sarkomere aufrechterhalten wird. Da XIN/XIRP2 maßgeblich am Umbau der durch mechanische Belastung ausgelösten Läsionen beteiligt ist, ist es naheliegend, dass XIN/XIRP2 eine Filamin-stabilisierende Funktion übernimmt, welche ähnlich den Funktionen der kleinen

Hitzeschockproteine ist. Somit besteht die Möglichkeit, dass anschließend der Abbau durch CASA erfolgen kann. Die so entstehende Kooperation von XIN/XIRP2 mit BAG3 muss in weiteren Analysen genauer betrachtet werden.

Durch die Arbeit von Reimann et al. (2020) konnte gezeigt werden, dass auch ein FILIP-vermittelter Abbau von Filamin C in Muskelzellen erfolgen kann. Dabei kommt es zur Interaktion von FILIP mit einer mechanisch regulierten Ig-Domäne des Filamin C. Meist wurde lediglich der Abbau von Filamin A in nicht Muskelzellen durch FILIP beschrieben und untersucht. Die Erkenntnis, dass es auch in der quergestreiften Muskulatur zu einem FILIP vermittelten Filamin C Abbau kommen kann, führte dazu, dass weitere Analysen zu FILIP nötig waren. In dieser Arbeit war speziell die Lokalisation innerhalb der Läsionen von besonderem Interesse. Die Lokalisation innerhalb der Filamin-enthaltenen Läsionen würde hier für eine Interaktion von FILIP mit dem Abbau von Filamin sprechen, da ein signifikanter Anstieg von FILIP, unter mechanischer Belastung, innerhalb der Läsionen gezeigt werden konnte (3.2.1.6). Auch hier zeigt sich also eine gewisse Dynamik der Lokalisation von FILIP nach mechanischer Belastung. Dies deutet darauf hin, dass auch FILIP einen relevanten Beitrag zum Erhalt der Filaminhomöostase innerhalb der Läsionen leisten.

Zusammenfassend zeigt sich ein signifikanter Anstieg von HspB5, FILIP und BAG3 innerhalb der Läsionen unter Steigerung der mechanischen Belastung. Ob eine direkte Interaktion der Proteine erfolgt, ist aktuell noch nicht eindeutig geklärt und muss weiter analysiert werden. Es kommt jedoch zum Abbau von mechanisch irreversibel entfaltetem Filamin. In diesen Abbau sind die genannten Proteine involviert, auch wenn nicht abschließend geklärt ist, inwiefern die Proteine in unterschiedliche oder gleiche Abbauewege involviert sind und miteinander interagieren.

Neben FILIP wurde auch FILIP1L genauer analysiert (siehe 3.2.1.7). Die Bildung von Hitzeschockproteinen erfolgt aufgrund des Transkriptionsfaktors HSF1. FILIP1L ist für den Abbau über das Proteasom des HSF1 verantwortlich (Hu und Mivechi 2011). Für FILIP1L konnte, unter sehr mildem EPS, ein massiver Anstieg innerhalb der Läsionen gezeigt werden. Erfolgt eine stärkere Stimulation geht der Anteil von FILIP1L innerhalb der Läsionen wieder leicht zurück. Inwiefern sich FILIP1L auf den Abbau von HSF1 in mechanisch belasteten Myotuben auswirkt muss weiter untersucht werden. Auch ob dieser Signalweg mit BAG3 in direkter Verbindung steht kann aus dieser Arbeit nicht geschlossen werden und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Insgesamt zeigt sich also, dass es aufgrund der mechanischen Belastung zur Steigerung der Lokalisation von BAG3, HspB5, XIN/XIRP2, FILIP1 und FILIP1L innerhalb der Läsionen kommt. Die in der Literatur aufgeführten Möglichkeiten der Interaktion von BAG3 mit weiteren kleinen Hitzeschockproteinen legt nahe, dass HspB8 austauschbar ist und es dennoch zu einem autophagischen Abbau über BAG3 kommt. Auch die Interaktion von FILIP mit Filamin

kann auf den Abbau von mechanisch entfaltetem Filamin hinweisen. Zusätzlich konnte durch Lohanadan et al. (2021) gezeigt werden, dass es unter mechanischer Belastung zu einem differenziellen Verhalten mit unterschiedlichen Funktionen von SYNPO2 Isoformen kommt. Diese Model kann möglicherweise auch auf die hier analysieren Proteine übertragen werden. Dies würde zur Folge haben, dass unter mechanischer Belastung, besonders dynamische Proteine wie BAG3, HspB5, FILIP und XIN/XIRP2 verstärkt in den Filamin-enthaltenen Läsionen vorliegen und hier Funktionen zur Stabilität und dem Erhalt der Struktur beitragen. Hingegen zeigen Z-Scheiben lokalisierte CASA-Komplex Komponenten verstärkt Funktionen des autophagischen Abbaus. Dieses weniger dynamische Verhalten dieser Proteine wie HspB8, SYNPO2b, möglicherweise auch HspB1 würde zum Aufrechterhalten der Proteostase beitragen. Abschließend ist jedoch noch nicht gänzlich klar, ob es zwischen FILIP und BAG3 zu einer direkten Interaktion kommt. Innerhalb der Läsionen akkumuliert XIN/XIRP2. Inwiefern die Aufgaben von XIN/XIRP2 zur Umbildung und Wiederherstellung der korrekten Struktur der Sarkomere in Assoziation mit BAG3 oder der Autophagie steht, muss weiter untersucht werden.

#### **4.4 Mechanoadaptation in Myotuben**

Ausdifferenzierte Myotuben besitzen die Fähigkeit zur Kontraktion. Durch den Einsatz von mildem EPS kann die Bildung der Sarkomere positiv beeinflusst und unterstützt werden. Es zeigt sich beispielsweise für BAG3 nach EPS eine Veränderung im Phosphorylierungsstatus mechanisch regulierter Phosphorylierungsstellen. Auch konnte anhand von Phosphoproteomik gezeigt werden, dass durch die Anwendung von EPS Veränderungen im Proteom der Myotuben erfolgen (Reimann et al. 2017). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Reaktion der Myotuben nach mechanischer Belastung, durch die Intensität der Belastung bestimmt wird. Die Veränderung und das Ausmaß der Schädigungen (Läsionen) in Myotuben, welche durch akute mechanischer Belastung entstehen, konnte von Orfanos et al. (2016) belegt werden. Weiter wurde durch Orfanos et al. (2016) gezeigt, dass nicht nur die Intensität, sondern ebenso die Dauer der Belastung zu einem signifikanten Anstieg des Ausmaßes der Läsionen führt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Prästimulation der Myotuben genauer analysiert. Es zeigt sich, wie unter 3.2.1 zu sehen, eine unterschiedliche intensive Ausprägung der Läsionen aufgrund der Art der mechanischen Belastung. Die Anwendung von mildem EPS über eine lange Dauer (16-24 h) fördert die Ausbildung der Sarkomerstruktur. Dies lässt vermuten, dass es bereits hier zu einem Anstieg der CASA Komponenten kommen könne. Die vorangegangenen Analysen konnten bereits die Anwesenheit verschiedener CASA-Komponenten innerhalb der Läsionen, aufgrund von stärkerer mechanischer Belastung (*twicht* und *damage*) sowie eine Dynamik der Proteine feststellen. Ebenfalls konnte unter

3.2.1.2 gezeigt werden, dass es unter akuter mechanischer Belastung (*damage* EPS) zu einer Entkopplung der CASA Komponente HspB8 und somit zu einer Änderung von CASA kommt. Anhand der Prästimulation sollte nun geprüft werden, ob mittels mildem EPS ein Einfluss auf das Ausmaß der Beschädigungen durch mechanische Belastung erfolgt. 3.2.2 zeigt, dass es aufgrund der Prästimulation von 16 h zu einer signifikanten Reduktion des Ausmaßes der Läsionen der Myotuben kommt. Kommt es nach erfolgter Prästimulation zu einer akuten mechanischen Belastung (*damage* EPS) können die Myotuben diese Belastung signifikant besser bewältigen. Dies zeigt sich im signifikant verringertem Ausmaß der Läsionen im direkten Vergleich zu Myotuben, welche keine Prästimulation erfahren haben. Dieser Schutzmechanismus gibt einen Hinweis auf die Aktivität von CASA oder weitere protektive Mechanismen. Das heißt abschließend, es besteht die Möglichkeit im Akutfall von starker mechanischer Belastung verstärkt mechanisch entfaltetes Filamin abzubauen und so die Filaminhomöostase aufrechtzuerhalten. Es ist somit nach erfolgter Prästimulation und damit einer mechanoadaptation der Myotuben möglich einer intensiveren mechanischen Belastung standzuhalten. Auch konnte gezeigt werden, dass dieser mechanoprotektive Mechanismus begrenzt ist. Durch die Steigerung der Dauer der akuten mechanischen Belastung zeigen sich verstärkt Läsionen und das Ausmaß des Schadens an der Myotube steigt. Somit obliegt der Myotube nur eine limitierte Möglichkeit zum Schutz gegenüber akuter mechanischer Belastung. Inwiefern sich die Prästimulation auf die zuvor beschriebene Entkopplung von HspB8 und damit verbundenen alternativen Bindepartner für BAG3 im Zuge von CASA ergibt müssen weitere Untersuchungen abschließend klären. Ebenso muss die zuvor untersuchte Dynamik der unterschiedlichen Proteine unter Einfluss der Prästimulation beschrieben werden.

#### **4.5 Bildung von Myo-Granula in Myotuben unter Einfluss von mechanischer Belastung**

Ein weiterer Mechanismus, welcher zur Reaktion auf akuten mechanischen Stress erfolgt, ist die Bildung sogenannter Myo-Granula. Dabei kommt es zur Bildung von Aggregaten um das Protein TDP-43. Normalerweise liegt das Protein TDP-43 im Zellkern vor. Zu seinen Aufgaben gehört der Transport von RNA. Bereits während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben kommt es zur Veränderung der Lokalisation. Dabei unterstützt TDP-43 die Bildung der Sarkomere, indem es mRNA zur korrekten Ausbildung von verschiedenen Sarkomerstrukturen aus dem Kern in das Zytoplasma lokalisiert. Die Ausbildung dieser Strukturen ist jedoch nicht nur während der Differenzierung nötig, sondern auch nach Beschädigung. Somit ist TDP-43 auch für Reparaturen in differenzierten Myotuben nötig. Allerdings kann ein massiver Anstieg von TDP-43 auch negative Folgen haben. Dabei kommt

es zu einem Anstieg von unlöslichen Aggregaten aus TDP-43 und RNA. Die Bildung solcher unlöslichen Aggregate kann mit einer steigenden Beschädigung der Myotuben aufgrund von mechanischer Belastung assoziiert werden (Vogler et al. 2018). Um zu analysieren, ob es unter mechanischer Belastung zu einer Veränderung der Lokalisation und dem Ausmaß der Veränderung kommt, wurde TDP-43 genauer untersucht (3.2.3). Es konnte in ausdifferenzierten Myotuben eine starke Lokalisation im Nukleus beobachtet werden. Dies zeigt an, dass es in diesem Zustand weniger zu Reparaturen der Struktur kommt und die Differenzierung abgeschlossen ist. Aufgrund von akutem mechanischem Stress kann eine Veränderung der Lokalisation ins Zytoplasma deutlich gesehen werden. Aufgrund der gesteigerten mechanischen Belastung liegt die Vermutung nahe, dass sich unter diesen Bedingungen zusätzlich unlösliche Aggregate bilden und die entstandenen Myo-Granula nicht abgebaut werden kann. Hierfür müssen allerdings weiter Analysen der Myo-Granula erfolgen. Durch die Mechanoadaptation also eine Prästimulation der Myotuben kann auch hier ein Schutz vor dem massiven Anstieg der Myo-Granula beobachtet werden. Um abschließende Aussagen zur Löslichkeit der Aggregate machen zu können, müssen weitere Untersuchungen angestellt werden. TDP-43 muss hier von unlöslichen Aggregaten separat betrachtet werden, da unter Standardbedingungen auch TDP-43 nötig ist, um weitere Reparaturen durchführen zu können und nicht nur innerhalb der aggregierten Strukturen vorliegt. Auch muss hier analysiert werden, ob weitere Proteine in den Aggregaten detektierbar sind. Es kann gerade bei unlöslichen Aggregaten vorkommen, dass nicht nur mRNA innerhalb der Aggregate zu finden ist, sondern zusätzlich weitere Proteine vorliegen. Möglicherweise kann hier auch eine Verbindung zu weiteren Komponenten der CASA-Maschinerie oder zu BAG3 Interaktionspartnern hergestellt werden.

#### 4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Es war für Glattmuskelzellen bekannt, dass es unter mechanischer Belastung zu einer Lokalisation von BAG3 an Aktinstressfasern kommt (Kathage et al. 2017). Auch die in dieser Arbeit untersuchten phosphomimetischen Mutanten kraftregulierter Phosphorylierungsstellen zeigen die Lokalisation an Aktinstressfasern. Die Lokalisation alleine gibt jedoch keinen weiterführenden Aufschluss auf potenziell veränderte Mechanismen. Aufgrund der Untersuchungen zur Lokalisation von TSC1 konnte gezeigt werden, dass es zu keiner veränderten Rekrutierung der phosphomimetischen BAG3 Mutanten kommt. Dies legt die Annahme nahe, dass sowohl die Aktivierung von mTORC1 erfolgt, wie auch folgend die Translation nicht unterbunden wird. Offen bleibt die Frage nach weiteren Bindepartnern von BAG3. Aufgrund der phosphomimetischen Mutation müssen weiterführende Analysen zeigen, ob es zu Einschränkungen der jeweiligen Interaktionen kommt.

Für quergestreifte Muskelzellen wurde bereits gezeigt, dass es unter mechanischer Belastung zur Entstehung Filamin-enhaltener Läsionen kommt (Orfanos et al. 2016). Dabei spielen nicht nur Intensität, sondern auch die Dauer der mechanischen Belastung eine essenzielle Rolle. Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass es unter verschiedenen intensiven mechanischen Belastungen zur Bildung der Filamin-enhaltenen Läsionen kommt und verschiedene, potenzielle BAG3 Interaktionspartner in ihrer Lokalisation beeinflusst werden.

BAG3 zeigt ein sehr dynamisches Verhalten und wird, nach mechanischer Belastung, verstärkt in Läsionen lokalisiert. HspB8 dagegen zeigt nicht dieses Verhalten und es kommt zu keiner Änderung der Lokalisation durch mechanische Belastung. Dies deutet auf die Entkopplung von HspB8 hin. Für HspB5 dagegen zeigt sich, wie auch für BAG3, die gesteigerte Lokalisation innerhalb der Läsionen. Dies weist darauf hin, dass BAG3 die Möglichkeit besitzt, mit weiteren kleinen Hitzeschockproteinen, wie HspB5, zu interagieren. Hier müssen weitere Experimente klären, wie genau diese Interaktion erfolgt. Ebenso muss dies für HspB1 weiter untersucht und quantifiziert werden. Ferner muss auch die Funktion von CASA aufgrund der möglichen geänderten Interaktion von BAG3 mit weiteren kleinen Hitzeschockproteinen genauer betrachtet werden.

Für FILIP und XIN/XIRP2 kann die gleiche Dynamik und somit eine gesteigerte Lokalisation innerhalb der Läsionen nach mechanischer Belastung beschrieben werden. Es ist durchaus möglich, dass diese Proteine besonders zur Stabilisierung der Myotuben beitragen. Eine Stabilisierung der beschädigten Strukturen ist deshalb so bedeutsam, da es aufgrund der Beschädigung auch zu beispielsweise unlöslichen Aggregaten kommen kann. Für FILIP ist bekannt, dass es den Abbau von mechanisch beschädigtem Filamin unterstützt. XIN/XIRP2 ist an der Stabilisierung sowie dem Umbau der beschädigten Sarkomere beteiligt. Hier müssen

weiter Experimente klären, ob es zu einer direkten Interaktion mit BAG3 kommt und inwiefern hier CASA oder eine andere Form des Abbaus des beschädigten Filamins beteiligt ist.

Da auch die Intensität der mechanischen Belastung eine essenzielle Rolle für das Ausmaß der Läsionen spielt, wurde der Einfluss der Prästimulation genauer untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass es aufgrund der Prästimulation der Myotuben zur Protektion vor Läsionen kommt. Diese Arbeit konnte zeigen, dass das Ausmaß der Läsionen aufgrund der Prästimulation mit anschließender starker mechanischer Belastung signifikant reduziert wurde. Diese mechanoprotektive Funktion muss nun folgend genauer betrachtet werden. Dabei kann die Lokalisation der zuvor untersuchten Proteine Aufschluss über weitere Veränderungen und das dynamische Verhalten der Proteine geben. Die Untersuchungen dieser Arbeit und weiterführender Experimente können dazu beitragen, weiteres Wissen zu generieren und so ein höheres Verständnis zur Filaminhomöostase sowie der Funktionen von CASA zu entwickeln.

## 5 Literaturverzeichnis

Adriaenssens, Elias; Geuens, Thomas; Baets, Jonathan; Echaniz-Laguna, Andoni; Timmerman, Vincent (2017): Novel insights in the disease biology of mutant small heat shock proteins in neuromuscular diseases. In: *Brain* 140 (10), S. 2541–2549. DOI: 10.1093/brain/awx187.

Ardito, Fatima; Giuliani, Michele; Perrone, Donatella; Troiano, Giuseppe; Lo Muzio, Lorenzo (2017): The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). In: *International journal of molecular medicine* 40 (2), S. 271–280. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3036.

Arimura, Takuro; Ishikawa, Taisuke; Nunoda, Shinichi; Kawai, Sachio; Kimura, Akinori (2011): Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. In: *Human Mutation* 32 (12), S. 1481–1491. DOI: 10.1002/humu.21603.

Arndt, Verena; Dick, Nikolaus; Tawo, Riga; Dreiseidler, Michael; Wenzel, Daniela; Hesse, Michael et al. (2010): Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. In: *Current biology : CB* 20 (2), S. 143–148. DOI: 10.1016/j.cub.2009.11.022.

Ayad, Nadia M. E.; Kaushik, Shelly; Weaver, Valerie M. (2019): Tissue mechanics, an important regulator of development and disease. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374 (1779), S. 20180215. DOI: 10.1098/rstb.2018.0215.

Balch, William E.; Morimoto, Richard I.; Dillin, Andrew; Kelly, Jeffery W. (2008): Adapting Proteostasis for Disease Intervention. In: *Science* 319 (5865), S. 916–919. DOI: 10.1126/science.1141448.

Balchin, David; Hayer-Hartl, Manajit; Hartl, F. Ulrich (2016): In vivo aspects of protein folding and quality control. In: *Science* 353 (6294), aac4354. DOI: 10.1126/science.aac4354.

Behl, Christian (2011): BAG3 and friends: co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. In: *Autophagy* 7 (7), S. 795–798. DOI: 10.4161/auto.7.7.15844.

Ben-Nissan, Gili; Sharon, Michal (2014): Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. In: *Biomolecules* 4 (3), S. 862–884. DOI: 10.3390/biom4030862.

Bhat, Kavita P.; Yan, Sen; Wang, Chuan-En; Li, Shihua; Li, Xiao-Jiang (2014): Differential ubiquitination and degradation of huntingtin fragments modulated by ubiquitin-protein ligase E3A. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (15), S. 5706–5711. DOI: 10.1073/pnas.1402215111.

Biamonti, Giuseppe; Caceres, Javier F. (2009): Cellular stress and RNA splicing. In: *Trends in Biochemical Sciences* 34 (3), S. 146–153. DOI: 10.1016/j.tibs.2008.11.004.

Buchberger, Alexander; Bukau, Bernd; Sommer, Thomas (2010): Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. In: *Molecular Cell* 40 (2), S. 238–252. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.10.001.

Caplan, Avrom J. (2003): What is a co-chaperone? In: *Cell Stress and Chaperones* 8 (2), S. 105. DOI: 10.1379/1466-1268(2003)008<0105:wiac>2.0.co;2.

Carra, Serena; Seguin, Samuel J.; Lambert, Herman; Landry, Jacques (2008): HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (3), S. 1437–1444. DOI: 10.1074/jbc.M706304200.

Choe, Young-Jun; Park, Sae-Hun; Hassemer, Timm; Körner, Roman; Vincenz-Donnelly, Lisa; Hayer-Hartl, Manajit; Hartl, F. Ulrich (2016): Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress. In: *Nature* 531 (7593), S. 191–195. DOI: 10.1038/nature16973.

Claeys, Kristl G.; Fardeau, Michel (2013): Myofibrillar myopathies: Elsevier (Handbook of Clinical Neurology, 113). In: *Handbook of clinical neurology*, S. 1337–1342.

Clarkson, Priscilla M.; Hubal, Monica J. (2002): Exercise-induced muscle damage in humans. In: *American journal of physical medicine & rehabilitation* 81 (11 Suppl), S52-69. DOI: 10.1097/00002060-200211001-00007.

Cohen-Kaplan, Victoria; Livneh, Ido; Avni, Noa; Cohen-Rosenzweig, Chen; Ciechanover, Aaron (2016): The ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 79, S. 403–418. DOI: 10.1016/j.biocel.2016.07.019.

Collier, Miranda P.; Alderson, T. Reid; Villiers, Carin P. de; Nicholls, Daisy; Gastall, Heidi Y.; Allison, Timothy M. et al. (2019): HspB1 phosphorylation regulates its intramolecular dynamics and mechanosensitive molecular chaperone interaction with filamin C. In: *Science Advances* 5 (5), eaav8421. DOI: 10.1126/sciadv.aav8421.

Cotto, J. J.; Morimoto, R. I. (1999): Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. In: *Biochemical Society symposium* 64, S. 105–118.

Crippa, Valeria; Sau, Daniela; Rusmini, Paola; Boncoraglio, Alessandra; Onesto, Elisa; Bolzoni, Elena et al. (2010): The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic

removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In: *Human Molecular Genetics* 19 (17), S. 3440–3456. DOI: 10.1093/hmg/ddq257.

Cutler, Alicia A.; Ewachiw, Theodore Eugene; Corbet, Giulia A.; Parker, Roy; Olwin, Brad B. (2019): Myo-granules Connect Physiology and Pathophysiology. In: *Journal of Experimental Neuroscience* 13, 1179069519842157. DOI: 10.1177/1179069519842157.

Dahl, Jan-Ulrik; Gray, Michael J.; Jakob, Ursula (2015): Protein quality control under oxidative stress conditions. In: *Journal of Molecular Biology* 427 (7), S. 1549–1563. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.02.014.

Dikic, Ivan (2017): Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. In: *Annual Review of Biochemistry* 86 (1), S. 193–224. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908.

Discher, Dennis; Dong, Cheng; Fredberg, Jeffrey J.; Guilak, Farshid; Ingber, Donald; Janmey, Paul et al. (2009): Biomechanics: cell research and applications for the next decade. In: *Annals of Biomedical Engineering* 37 (5), S. 847–859. DOI: 10.1007/s10439-009-9661-x.

DuFort, Christopher C.; Paszek, Matthew J.; Weaver, Valerie M. (2011): Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (5), S. 308–319. DOI: 10.1038/nrm3112.

Dupont, Sirio; Morsut, Leonardo; Aragona, Mariaceleste; Enzo, Elena; Giulitti, Stefano; Cordenonsi, Michelangelo et al. (2011): Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. In: *Nature* 474 (7350), S. 179–183. DOI: 10.1038/nature10137.

Ehrlicher, A. J.; Nakamura, F.; Hartwig, J. H.; Weitz, D. A.; Stossel, T. P. (2011): Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. In: *Nature* 478 (7368), S. 260–263. DOI: 10.1038/nature10430.

Eulitz, Stefan; Sauer, Florian; Pelissier, Marie-Cecile; Boisguerin, Prisca; Molt, Sibylle; Schuld, Julia et al. (2013): Identification of Xin-repeat proteins as novel ligands of the SH3 domains of nebulin and nebulin and analysis of their interaction during myofibril formation and remodeling. In: *Molecular Biology of the Cell* 24 (20), S. 3215–3226. DOI: 10.1091/mbc.E13-04-0202.

Fang, Xi; Bogomolovas, Julius; Wu, Tongbin; Zhang, Wei; Liu, Canzhao; Veevers, Jennifer et al. (2017): Loss-of-function mutations in co-chaperone BAG3 destabilize small HSPs and cause cardiomyopathy. In: *Journal of Clinical Investigation* 127 (8), S. 3189–3200. DOI: 10.1172/JCI94310.

Finka, Andrija; Mattoo, Rayees U. H.; Goloubinoff, Pierre (2016): Experimental Milestones in the Discovery of Molecular Chaperones as Polypeptide Unfolding Enzymes. In: *Annual Review of Biochemistry* 85, S. 715–742. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014124.

---

Frank, Derk; Kuhn, Christian; Katus, Hugo A.; Frey, Norbert (2006): The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 84 (6), S. 446–468. DOI: 10.1007/s00109-005-0033-1.

Fu, Guanyuan; Wang, Wei; Luo, Bing-Hao (2012): Overview: structural biology of integrins. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 757, S. 81–99. DOI: 10.1007/978-1-61779-166-6\_7.

Fuchs, Margit; Luthold, Carole; Guilbert, Solenn M.; Varlet, Alice Anaïs; Lambert, Herman; Jetté, Alexandra et al. (2015): A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis. In: *PLOS Genetics* 11 (10), e1005582. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005582.

Gamerding, Martin; Carra, Serena; Behl, Christian (2011a): Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: focus on BAG proteins. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 89 (12), S. 1175–1182. DOI: 10.1007/s00109-011-0795-6.

Gamerding, Martin; Hajieva, Parvana; Kaya, A. Murat; Wolfrum, Uwe; Hartl, F. Ulrich; Behl, Christian (2009): Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. In: *The EMBO Journal* 28 (7), S. 889–901. DOI: 10.1038/emboj.2009.29.

Gamerding, Martin; Kaya, A. Murat; Wolfrum, Uwe; Clement, Albrecht M.; Behl, Christian (2011b): BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. In: *EMBO reports* 12 (2), S. 149–156. DOI: 10.1038/embor.2010.203.

Ganassi, Massimo; Mateju, Daniel; Bigi, Ilaria; Mediani, Laura; Poser, Ina; Lee, Hyun O. et al. (2016): A Surveillance Function of the HSPB8-BAG3-HSP70 Chaperone Complex Ensures Stress Granule Integrity and Dynamism. In: *Molecular Cell* 63 (5), S. 796–810. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.07.021.

Gatica, Damián; Lahiri, Vikramjit; Klionsky, Daniel J. (2018): Cargo recognition and degradation by selective autophagy. In: *Nature Cell Biology* 20 (3), S. 233–242. DOI: 10.1038/s41556-018-0037-z.

Geeves, Michael A.; Holmes, Kenneth C. (2005): *The Molecular Mechanism of Muscle Contraction*: Elsevier (Advances in Protein Chemistry, 71), S. 161–193.

Gogarten, W.; Emala, C. W.; Lindeman, K. S.; Hirshman, C. A. (2001): Oxytocin and lysophosphatidic acid induce stress fiber formation in human myometrial cells via a pathway involving Rho-kinase. In: *Biology of reproduction* 65 (2), S. 401–406. DOI: 10.1095/biolreprod65.2.401.

Goodman, Craig A. (2014): The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli: Springer International Publishing (Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology 166, 166). In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, S. 43–95.

Guerrero, Erika N.; Wang, Haibo; Mitra, Joy; Hegde, Pavana M.; Stowell, Sara E.; Liachko, Nicole F. et al. (2016): TDP-43/FUS in motor neuron disease: Complexity and challenges. In: *Progress in neurobiology* 145-146, S. 78–97. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.09.004.

Haidar, Mansour; Asselbergh, Bob; Adriaenssens, Elias; Winter, Vicky de; Timmermans, Jean-Pierre; Auer-Grumbach, Michaela et al. (2019): Neuropathy-causing mutations in HSPB1 impair autophagy by disturbing the formation of SQSTM1/p62 bodies. In: *Autophagy* 15 (6), S. 1051–1068. DOI: 10.1080/15548627.2019.1569930.

Hartl, F. Ulrich; Bracher, Andreas; Hayer-Hartl, Manajit (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. In: *Nature* 475 (7356), S. 324–332. DOI: 10.1038/nature10317.

Haslbeck, Martin; Vierling, Elizabeth (2015): A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. In: *Journal of Molecular Biology* 427 (7), S. 1537–1548. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.02.002.

Henderson, Christine A.; Gomez, Christopher G.; Novak, Stefanie M.; Mi-Mi, Lei; Gregorio, Carol C. (2017): Overview of the Muscle Cytoskeleton: Wiley (Comprehensive Physiology, 7). In: *Comprehensive Physiology* (3), S. 891–944.

Hernández-Araiza, Ileana; Morales-Lázaro, Sara L.; Canul-Sánchez, Jesús Aldair; Islas, León D.; Rosenbaum, Tamara (2018): Role of lysophosphatidic acid in ion channel function and disease. In: *Journal of neurophysiology* 120 (3), S. 1198–1211. DOI: 10.1152/jn.00226.2018.

Herr, I.; Debatin, K. M. (2001): Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. In: *Blood* 98 (9), S. 2603–2614. DOI: 10.1182/blood.v98.9.2603.

Hoffman, Brenton D.; Grashoff, Carsten; Schwartz, Martin A. (2011): Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. In: *Nature* 475 (7356), S. 316–323. DOI: 10.1038/nature10316.

Hoffman, Nolan J.; Parker, Benjamin L.; Chaudhuri, Rima; Fisher-Wellman, Kelsey H.; Kleinert, Maximilian; Humphrey, Sean J. et al. (2015): Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. In: *Cell Metabolism* 22 (5), S. 922–935. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.09.001.

Höhfeld, Jörg; Benzing, Thomas; Bloch, Wilhelm; Fürst, Dieter O.; Gehlert, Sebastian; Hesse, Michael et al. (2021): Maintaining proteostasis under mechanical stress. In: *EMBO reports* 22 (8), e52507. DOI: 10.15252/embr.202152507.

Höhfeld, Jörg; Hoppe, Thorsten (2018): Ub and Down: Ubiquitin Exercise for the Elderly. In: *Trends in Cell Biology* 28 (7), S. 512–522. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.03.002.

Homma, Sachiko; Iwasaki, Masahiro; Shelton, G. Diane; Engvall, Eva; Reed, John C.; Takayama, Shinichi (2006): BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. In: *The American Journal of Pathology* 169 (3), S. 761–773. DOI: 10.2353/ajpath.2006.060250.

Hu, Yanzhong; Mivechi, Nahid F. (2011): Promotion of Heat Shock Factor Hsf1 Degradation via Adaptor Protein Filamin A-interacting Protein 1-Like (FILIP-1L)\*. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (36), S. 31397–31408. DOI: 10.1074/jbc.M111.255851.

Ingber, Donald E. (2006): Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. In: *The FASEB Journal* 20 (7), S. 811–827. DOI: 10.1096/fj.05-5424rev.

Irianto, Jerome; Pfeifer, Charlotte R.; Xia, Yuntao; Discher, Dennis E. (2016): SnapShot: Mechanosensing Matrix. In: *Cell* 165 (7), 1820-1820.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.002.

Jacobs, Brittany L.; Goodman, Craig A.; Hornberger, Troy A. (2014): The mechanical activation of mTOR signaling: an emerging role for late endosome/lysosomal targeting. In: *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 35 (1), S. 11–21. DOI: 10.1007/s10974-013-9367-4.

Ji, Chang Hoon; Kwon, Yong Tae (2017): Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. In: *Molecules and cells* 40 (7), S. 441–449. DOI: 10.14348/molcells.2017.0115.

Jockusch, Brigitte M. (2017): *The Actin Cytoskeleton*. Cham: Springer International Publishing (235).

Johnson, Colin P.; Tang, Hsin-Yao; Carag, Christine; Speicher, David W.; Discher, Dennis E. (2007): Forced unfolding of proteins within cells. In: *Science* 317 (5838), S. 663–666. DOI: 10.1126/science.1139857.

Judge, Luke M.; Perez-Bermejo, Juan A.; Truong, Annie; Ribeiro, Alexandre Js; Yoo, Jennie C.; Jensen, Christina L. et al. (2017): A BAG3 chaperone complex maintains cardiomyocyte function during proteotoxic stress. In: *JCI Insight* 2 (14). DOI: 10.1172/jci.insight.94623.

Kathage, Barbara; Gehlert, Sebastian; Ulbricht, Anna; Lüdecke, Laura; Tapia, Victor E.; Orfanos, Zacharias et al. (2017): The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. In: *Biochimica et*

*biophysica acta. Molecular cell research* 1864 (1), S. 62–75. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.10.007.

Kaur, Jasvinder; Debnath, Jayanta (2015): Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (8), S. 461–472. DOI: 10.1038/nrm4024.

Kaushik, Susmita; Cuervo, Ana Maria (2012): Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. In: *Trends in Cell Biology* 22 (8), S. 407–417. DOI: 10.1016/j.tcb.2012.05.006.

Kiema, Tiila; Lad, Yatish; Jiang, Pengju; Oxley, Camilla L.; Baldassarre, Massimiliano; Wegener, Kate L. et al. (2006): The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. In: *Molecular Cell* 21 (3), S. 337–347. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.01.011.

Klaips, Courtney L.; Jayaraj, Gopal Gunanathan; Hartl, F. Ulrich (2018): Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. In: *The Journal of cell biology* 217 (1), S. 51–63. DOI: 10.1083/jcb.201709072.

Klimek, Christina; Jahnke, Ricarda; Wördehoff, Judith; Kathage, Barbara; Stadel, Daniela; Behrends, Christian et al. (2019): The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1866 (10), S. 1556–1566. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.07.007.

Klimek, Christina; Kathage, Barbara; Wördehoff, Judith; Höhfeld, Jörg (2017): BAG3-mediated proteostasis at a glance. In: *Journal of cell science* 130 (17), S. 2781–2788. DOI: 10.1242/jcs.203679.

Kostera-Pruszczyk, Anna; Suszek, Małgorzata; Płoski, Rafał; Franaszczyk, Maria; Potulska-Chromik, Anna; Pruszczyk, Piotr et al. (2015): BAG3-related myopathy, polyneuropathy and cardiomyopathy with long QT syndrome. In: *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 36 (6), S. 423–432. DOI: 10.1007/s10974-015-9431-3.

Kötter, Sebastian; Unger, Andreas; Hamdani, Nazha; Lang, Patrick; Vorgerd, Matthias; Nagel-Steger, Luitgard; Linke, Wolfgang A. (2014): Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. In: *Journal of Cell Biology* 204 (2), S. 187–202. DOI: 10.1083/jcb.201306077.

Lanneau, David; Wettstein, Guillaume; Bonniaud, Philippe; Garrido, Carmen (2010): Heat shock proteins: cell protection through protein triage. In: *TheScientificWorldJournal* 10, S. 1543–1552. DOI: 10.1100/tsw.2010.152.

Linke, Wolfgang A.; Hamdani, Nazha (2014): Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. In: *Circulation Research* 114 (6), S. 1052–1068. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301286.

Linnemann, Anja; van der Ven, Peter F. M.; Vakeel, Padmanabhan; Albinus, Britta; Simonis, Dirk; Bendas, Gerd et al. (2010): The sarcomeric Z-disc component myopodin is a multiadapter protein that interacts with filamin and alpha-actinin. In: *European Journal of Cell Biology* 89 (9), S. 681–692. DOI: 10.1016/j.ejcb.2010.04.004.

Lohanadan, Keerthika; Molt, Sibylle; Dierck, Franziska; van der Ven, Peter F. M.; Frey, Norbert; Höhfeld, Jörg; Fürst, Dieter O. (2021): Isoform-specific functions of synaptopodin-2 variants in cytoskeleton stabilization and autophagy regulation in muscle under mechanical stress. In: *Experimental Cell Research* 408 (2), S. 112865. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112865.

Luo, Bing-Hao; Carman, Christopher V.; Springer, Timothy A. (2007): Structural basis of integrin regulation and signaling. In: *Annual review of immunology* 25, S. 619–647. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618.

Luthold, Carole; Varlet, Alice-Anaïs; Lambert, Herman; Bordeleau, François; Lavoie, Josée N. (2020): Chaperone-Assisted Mitotic Actin Remodeling by BAG3 and HSPB8 Involves the Deacetylase HDAC6 and Its Substrate Cortactin. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (1), S. 142. DOI: 10.3390/ijms22010142.

Mager, Willem H.; Boer, Albertus H. de; Siderius, Marco H.; Voss, Hans-Peter (2000): Cellular responses to oxidative and osmotic stress. In: *Cell Stress and Chaperones* 5 (2), S. 73. DOI: 10.1379/1466-1268(2000)005<0073:CRTOAO>2.0.CO;2.

Mainz, Andi; Peschek, Jirka; Stavropoulou, Maria; Back, Katrin C.; Bardiaux, Benjamin; Asami, Sam et al. (2015): The chaperone  $\alpha$ B-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (11), S. 898–905. DOI: 10.1038/nsmb.3108.

Martin, Thomas G.; Myers, Valerie D.; Dubey, Praveen; Dubey, Shubham; Perez, Edith; Moravec, Christine S. et al. (2021): Cardiomyocyte contractile impairment in heart failure results from reduced BAG3-mediated sarcomeric protein turnover. In: *Nature Communications* 12 (1), S. 2942. DOI: 10.1038/s41467-021-23272-z.

McKinley, M.; O'Loughlin, V. (2009): Human Anatomy: McGraw-Hill Companies, Incorporated. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=AAQPRAAACAAJ>.

Meister-Broekema, Melanie; Freilich, Rebecca; Jagadeesan, Chandhuru; Rauch, Jennifer N.; Bengoechea, Rocio; Motley, William W. et al. (2018): Myopathy associated BAG3 mutations

lead to protein aggregation by stalling Hsp70 networks. In: *Nature Communications* 9 (1), S. 5342. DOI: 10.1038/s41467-018-07718-5.

Minoia, Melania; Boncoraglio, Alessandra; Vinet, Jonathan; Morelli, Federica F.; Brunsting, Jeanette F.; Poletti, Angelo et al. (2014): BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. In: *Autophagy* 10 (9), S. 1603–1621. DOI: 10.4161/auto.29409.

Mizushima, Noboru; Levine, Beth; Cuervo, Ana Maria; Klionsky, Daniel J. (2008): Autophagy fights disease through cellular self-digestion. In: *Nature* 451 (7182), S. 1069–1075. DOI: 10.1038/nature06639.

Mizushima, Wataru; Sadoshima, Junichi (2017): BAG3 plays a central role in proteostasis in the heart. In: *Journal of Clinical Investigation* 127 (8), S. 2900–2903. DOI: 10.1172/JCI95839.

Moolenaar, Wouter H.; Kranenburg, Onno; Postma, Friso R.; Zondag, Gerben C. M. (1997): Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. In: *Current Opinion in Cell Biology* 9 (2), S. 168–173. DOI: 10.1016/S0955-0674(97)80059-2.

Murrell, Michael; Oakes, Patrick W.; Lenz, Martin; Gardel, Margaret L. (2015): Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (8), S. 486–498. DOI: 10.1038/nrm4012.

Nakamura, Fumihiko; Stossel, Thomas P.; Hartwig, John H. (2011): The filamins: organizers of cell structure and function. In: *Cell Adhesion & Migration* 5 (2), S. 160–169. DOI: 10.4161/cam.5.2.14401.

Orfanos, Zacharias; Gödderz, Markus P. O.; Soroka, Ekaterina; Gödderz, Tobias; Rumyantseva, Anastasia; van der Ven, Peter F. M. et al. (2016): Breaking sarcomeres by in vitro exercise. In: *Scientific Reports* 6, S. 19614. DOI: 10.1038/srep19614.

Parisi, Ludovica; Toffoli, Andrea; Ghezzi, Benedetta; Mozzoni, Beatrice; Lumetti, Simone; Macaluso, Guido M. (2020): A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. In: *The Japanese dental science review* 56 (1), S. 50–55. DOI: 10.1016/j.jdsr.2019.11.002.

Proske, U.; Morgan, D. L. (2001): Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. In: *The Journal of Physiology* 537 (Pt 2), S. 333–345. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.00333.x.

Protter, David S. W.; Parker, Roy (2016): Principles and Properties of Stress Granules. In: *Trends in Cell Biology* 26 (9), S. 668–679. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.05.004.

Quinlan, Roy A.; Ellis, R. John (2013): Chaperones: needed for both the good times and the bad times. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1617), S. 20130091. DOI: 10.1098/rstb.2013.0091.

Quy, Pham Nguyen; Kuma, Akiko; Pierre, Philippe; Mizushima, Noboru (2013): Proteasome-dependent activation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is essential for autophagy suppression and muscle remodeling following denervation. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (2), S. 1125–1134. DOI: 10.1074/jbc.M112.399949.

Raghow, Rajendra (2013): Connective Tissues of the Subendothelium. In: *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease*: Elsevier, S. 43–69.

Rambaran, Roma N.; Serpell, Louise C. (2008): Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. In: *Prion* 2 (3), S. 112–117. DOI: 10.4161/pri.2.3.7488.

Rauch, Jennifer N.; Tse, Eric; Freilich, Rebecca; Mok, Sue-Ann; Makley, Leah N.; Southworth, Daniel R.; Gestwicki, Jason E. (2017): BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins. In: *Journal of Molecular Biology* 429 (1), S. 128–141. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.11.013.

Ravikumar, Brinda; Sarkar, Sovan; Davies, Janet E.; Futter, Marie; Garcia-Arencibia, Moises; Green-Thompson, Zeyn W. et al. (2010): Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. In: *Physiological reviews* 90 (4), S. 1383–1435. DOI: 10.1152/physrev.00030.2009.

Reimann, Lena; Schwäble, Anja N.; Fricke, Anna L.; Mühlhäuser, Wignand W. D.; Leber, Yvonne; Lohanadan, Keerthika et al. (2020): Phosphoproteomics identifies dual-site phosphorylation in an extended basophilic motif regulating FILIP1-mediated degradation of filamin-C. In: *Communications Biology* 3 (1), S. 253. DOI: 10.1038/s42003-020-0982-5.

Reimann, Lena; Wiese, Heike; Leber, Yvonne; Schwäble, Anja N.; Fricke, Anna L.; Rohland, Anne et al. (2017): Myofibrillar Z-discs Are a Protein Phosphorylation Hot Spot with Protein Kinase C (PKC $\alpha$ ) Modulating Protein Dynamics. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 16 (3), S. 346–367. DOI: 10.1074/mcp.M116.065425.

Richter, Klaus; Haslbeck, Martin; Buchner, Johannes (2010): The heat shock response: life on the verge of death. In: *Molecular Cell* 40 (2), S. 253–266. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.10.006.

Rosati, A.; Graziano, V.; Laurenzi, V. de; Pascale, M.; Turco, M. C. (2011): BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. In: *Cell death & disease* 2, e141. DOI: 10.1038/cddis.2011.24.

Ruparelia, Avnika A.; Oorschot, Viola; Ramm, Georg; Bryson-Richardson, Robert J. (2016): FLNC myofibrillar myopathy results from impaired autophagy and protein insufficiency. In: *Human Molecular Genetics* 25 (11), S. 2131–2142. DOI: 10.1093/hmg/ddw080.

Saibil, Helen (2013): Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (10), S. 630–642. DOI: 10.1038/nrm3658.

Sala, Ambre J.; Bott, Laura C.; Morimoto, Richard I. (2017): Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. In: *Journal of Cell Biology* 216 (5), S. 1231–1241. DOI: 10.1083/jcb.201612111.

Schiller, Herbert B.; Fässler, Reinhard (2013): Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. In: *EMBO reports* 14 (6), S. 509–519. DOI: 10.1038/embor.2013.49.

Selcen, Duygu; Muntoni, Francesco; Burton, Barbara K.; Pegoraro, Elena; Sewry, Caroline; Bite, Anna V.; Engel, Andrew G. (2009): Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. In: *Annals of Neurology* 65 (1), S. 83–89. DOI: 10.1002/ana.21553.

Sudol, Marius; Harvey, Kieran F. (2010): Modularity in the Hippo signaling pathway. In: *Trends in Biochemical Sciences* 35 (11), S. 627–633. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.05.010.

Sun, Zhiqi; Guo, Shengzhen S.; Fässler, Reinhard (2016): Integrin-mediated mechanotransduction. In: *Journal of Cell Biology* 215 (4), S. 445–456. DOI: 10.1083/jcb.201609037.

Svitkina, Tatyana (2018): The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10 (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a018267.

Tanaka, Keiji (2009): The proteasome: overview of structure and functions. In: *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 85 (1), S. 12–36. DOI: 10.2183/pjab.85.12.

Tanguay, Robert M.; Hightower, Lawrence E. (Hg.) (2015): The Big Book on Small Heat Shock Proteins. Cham, s.l.: Springer International Publishing (Heat Shock Proteins, 8).

Ulbricht, Anna; Arndt, Verena; Höfeld, Jörg (2013a): Chaperone-assisted proteostasis is essential for mechanotransduction in mammalian cells. In: *Communicative & integrative biology* 6 (4), e24925. DOI: 10.4161/cib.24925.

Ulbricht, Anna; Eppler, Felix J.; Tapia, Victor E.; van der Ven, Peter F. M.; Hampe, Nico; Hersch, Nils et al. (2013b): Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. In: *Current biology : CB* 23 (5), S. 430–435. DOI: 10.1016/j.cub.2013.01.064.

Ulbricht, Anna; Gehlert, Sebastian; Leciejewski, Barbara; Schiffer, Thorsten; Bloch, Wilhelm; Höhfeld, Jörg (2015): Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. In: *Autophagy* 11 (3), S. 538–546. DOI: 10.1080/15548627.2015.1017186.

Ungelenk, Sophia; Moayed, Fatemeh; Ho, Chi-Ting; Grousl, Tomas; Scharf, Annette; Mashaghi, Alireza et al. (2016): Small heat shock proteins sequester misfolding proteins in near-native conformation for cellular protection and efficient refolding. In: *Nature Communications* 7 (1), S. 13673. DOI: 10.1038/ncomms13673.

van der Ven, Peter F. M.; Ehler, Elisabeth; Vakeel, Padmanabhan; Eulitz, Stefan; Schenk, Jörg A.; Milting, Hendrik et al. (2006): Unusual splicing events result in distinct Xin isoforms that associate differentially with filamin c and Mena/VASP. In: *Experimental Cell Research* 312 (11), S. 2154–2167. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.03.015.

van Treeck, Briana; Parker, Roy (2019): Principles of Stress Granules Revealed by Imaging Approaches. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 11 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a033068.

Varlet, Alice Anaïs; Fuchs, Margit; Luthold, Carole; Lambert, Herman; Landry, Jacques; Lavoie, Josée N. (2017): Fine-tuning of actin dynamics by the HSPB8-BAG3 chaperone complex facilitates cytokinesis and contributes to its impact on cell division. In: *Cell Stress and Chaperones* 22 (4), S. 553–567. DOI: 10.1007/s12192-017-0780-2.

Vaupel, Peter; Schaible, Hans-Georg; Mutschler, Ernst (2015): Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 158 Tabellen. 7. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. Online verfügbar unter <https://elibrary.hirzel.de/textbook/99.105015/9783804737242>.

Vogler, Thomas O.; Wheeler, Joshua R.; Nguyen, Eric D.; Hughes, Michael P.; Britson, Kyla A.; Lester, Evan et al. (2018): TDP-43 and RNA form amyloid-like myo-granules in regenerating muscle. In: *Nature* 563 (7732), S. 508–513. DOI: 10.1038/s41586-018-0665-2.

Walsh, Christopher T.; Garneau-Tsodikova, Sylvie; Gatto, Gregory J. (2005): Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44 (45), S. 7342–7372. DOI: 10.1002/anie.200501023.

Wimmer, Ursula; Wang, Ying; Georgiev, Oleg; Schaffner, Walter (2005): Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. In: *Nucleic acids research* 33 (18), S. 5715–5727. DOI: 10.1093/nar/gki881.

Xu, Zhe; Graham, Kourtney; Foote, Molly; Liang, Fengshan; Rizkallah, Raed; Hurt, Myra et al. (2013): 14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggresomes. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 18), S. 4173–4186. DOI: 10.1242/jcs.126102.

You, Jae-Sung; Anderson, Garrett B.; Dooley, Matthew S.; Hornberger, Troy A. (2015): The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice. In: *Disease models & mechanisms* 8 (9), S. 1059–1069. DOI: 10.1242/dmm.019414.

Yu, Fa-Xing; Guan, Kun-Liang (2013): The Hippo pathway: regulators and regulations. In: *Genes & Development* 27 (4), S. 355–371. DOI: 10.1101/gad.210773.112.

### Anhang

Vektorkarte pCMV-TAG2B-BAG3

