

Regulation des Cochaperons BAG3 durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Judith Friederike Wördehoff

aus Witten

Bonn, 2019

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

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Höhfeld

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dieter Fürst

Tag der Promotion: 09.12.19

Erscheinungsjahr: 2020

Publikationen

Klimek, C., Kathage, B., **Wördehoff, J.** and Höfeld, J. (2017). **BAG3-mediated proteostasis at a glance.** J. Cell Sci. 130, 2781–2788.

Klimek C, Jahnke R, **Wördehoff J**, Kathage B, Stadel D, Behrends C, Hergovich A, Höfeld J. (2019). **The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy.** Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2019 Oct; 1866(10):1556-1566.

Konferenzbeiträge

Judith Wördehoff, Christina Klimek, Jörg Höfeld. **Mechanical stress protection** (2018). Poster, International Meeting of the DGZ 2018 in Leipzig.

Judith Wördehoff, Julia Walther, Ricarda Jahnke, Jörg Höfeld. **Mechanical stress protection: Role of BAG3 dephosphorylation** (2019). Poster, Jahrestagung Bonner Forum Biomedizin 2019.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Proteostase	2
2.1.1	Chaperone und Cochaperone sind essentiell für die Proteostase	2
2.1.2	Proteasomaler und lysosomaler Abbau zum Erhalt der Proteostase	3
2.2	Autophagie	4
2.3	Das Cochaperon BAG3	5
2.3.1	Chaperon-assistierte selektive Autophagie - CASA	6
2.3.2	BAG3 reguliert Proteintranskription und -translation	7
2.3.3	Mechanisch regulierte Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3	9
2.4	Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation von Proteinen	11
2.5	Dephosphorylierung von Proteinen durch Phosphatasen	12
2.6	Zielsetzung	13
3	Material	15
3.1	Geräteliste	15
3.2	Chemikalienliste	16
3.3	Reagenziensysteme	19
3.4	Enzyme	19
3.5	Bakterien- und Säuger-Stämme	19
3.6	Antikörper	20
3.7	Plasmide	21
3.8	Oligonukleotide	22
4	Methoden	23

4.1	Methoden im Umgang mit <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	23
4.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Bakterien	23
4.1.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	24
4.1.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	24
4.2	Methoden im Umgang mit eukaryontischen Zellen	25
4.2.1	Kultivierung von A7r5-Zellen.....	25
4.2.2	Kultivierung von HeLa-Zellen.....	26
4.2.3	Transfektion mittels JetPRIME®	26
4.2.4	Transfektion mittels Calcium-Phosphat	26
4.2.5	Behandlung eukaryontischer Zellen mit Inhibitoren	27
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	27
4.3.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> -Bakterien	27
4.3.2	PCR	28
4.3.3	Restriktionsverdau für die Klonierung der Phosphorylierungsmutanten	29
4.3.4	Sequenzierung.....	30
4.4	Proteinbiochemische Methoden	31
4.4.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	31
4.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	31
4.4.3	Proteinfällung durch TCA.....	32
4.4.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE	32
4.4.5	Western Blot	34
4.4.6	Immundetektion	34
4.4.7	Coomassie-Färbung	35
4.4.8	Immunpräzipitation	36
4.4.9	Immunopräzipitation mit Phosphatase-Behandlung.....	37

4.5	Statistik.....	38
5	Ergebnisse	39
5.1	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3	39
5.2	Einfluss der konservierten Phosphorylierungsstellen von BAG3 auf die Formierung des CASA-Komplexes.....	43
5.3	Funtionelle Charakterisierung der konservierten Phosphorylierungsstellen von BAG3 anhand des SYNPO2-Abbaus	50
6	Diskussion.....	55
6.1	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3	55
6.2	Regulierung des Phosphorylierungsstatus von BAG3 bei mechanischer Belastung	59
6.3	Dephosphorylierung von BAG3-S289A führt zum Verlust der HSPB8-Bindung	61
6.4	Bei Phosphorylierung von BAG3-T285D/S289D wird SYNPO2 nicht abgebaut	62
6.5	Phosphorylierung von BAG3-T285 hemmt den Abbau von SYNPO2	63
6.6	Ausblick.....	64
7	Verzeichnisse.....	65
7.1	Literaturverzeichnis	65
7.2	Abkürzungsverzeichnis	71
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	73
7.4	Tabellenverzeichnis.....	74
8	Anhang	75
8.1	Plasmidkarte pCMV-BAG3.....	75

1 Zusammenfassung

Die Zelle ist die kleinste Organisationseinheit, aus der alle Organismen aufgebaut sind. Sie ist auf ein Gleichgewicht der Proteinausstattung, die Proteostase, angewiesen. Auch das Cytoskelett ist essentiell für die Zelle, es stellt ihre Stabilität sicher. Bei mechanischem Stress entfaltet sich Filamin, ein Aktin-Quervernetzer, und kann seine stabilisierende Funktion nicht mehr wahrnehmen. Das Cochaperon BAG3 vermittelt dann den Abbau von Filamin über die Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA), während es gleichzeitig die Neusynthese von Filamin initiiert. CASA basiert auf der Kooperation von BAG3 mit dem kleinen Hitzeschutzprotein HSPB8, der chaperon-assoziierten Ubiquitinligase CHIP und zytoskelettassoziierten Protein SYNPO2. Unter mechanischer Belastung kommt es zu Veränderungen des Phosphorylierungszustands von BAG3. Die funktionellen Konsequenzen sind bis jetzt nicht verstanden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von BAG3 entscheidend für die Bildung des CASA-Komplexes ist. Bei Einsatz von Phosphataseinhibitoren bindet BAG3 nicht mehr an HSPB8 und CHIP, wichtige Kooperationspartner in der Autophagie. Dieser Befund lässt sich nur dadurch erklären, dass BAG3 einer ständigen Phosphorylierung und Dephosphorylierung unterliegt. Der CASA-Komplex bildet sich bei Phosphorylierung somit nur unvollständig aus. Des Weiteren führen auch Punktmutationen an mechanisch regulierten Phosphorylierungsstellen von BAG3 zur Störung der Bildung des CASA-Komplexes. Bei der Phosphorylierung von Threonin285 und Serin289 in BAG3 oder bei der Dephosphorylierung von Serin289 in BAG3 kommt es zu einem Verlust der HSPB8-Bindung. Die HSPB8-Bindung scheint somit in dieser Region von BAG3 reguliert zu sein. Die Phosphorylierung von BAG3-T285/S289 sowie von BAG3-T285 allein führt außerdem zu der signifikanten Reduzierung des SYNPO2-Abbaus. SYNPO2 kooperiert mit BAG3 und wird dabei neben Filamin über CASA abgebaut. Der verminderte Abbau bedeutet somit, dass die CASA-Maschinerie durch den veränderten Phosphorylierungsstatus von BAG3 nicht mehr funktionsfähig ist.

2 Einleitung

2.1 Proteostase

Proteine sind an nahezu allen biologischen Prozessen beteiligt und daher essentiell für die Zelle. Die Proteinausstattung einer Zelle ist abhängig davon, dass Transkription, Translation und Proteinabbau in einem Gleichgewicht vorliegen (Balch et al., 2008). Dieses Gleichgewicht wird als Proteinhomeostase oder auch Proteostase bezeichnet. Durch koordinierte Veränderungen dieses Gleichgewichts kann sich der Organismus an abiotische Faktoren, wie Hitzestress und mechanischen Stress, und physiologische Faktoren, wie Wachstum oder Zellteilung, anpassen (Klaips et al., 2018). Besonders die mechanische Belastung von Zellen ist ein großer Störfaktor der Proteostase. Vor allem Muskelzellen sind durch die ständige Kontraktion von mechanischem Stress betroffen, wie z.B. Skelettmuskelzellen bei sportlicher Betätigung oder Kardiomyozyten beim Herzschlag (Clarkson and Hubal, 2002; van Putten et al., 2016). Aber auch Nichtmuskelzellen unterliegen dieser Belastung bei Migration, Adhäsion und Proliferation (Murrell et al., 2015). Chaperone und Cochaperone sorgen hier in einem komplexen System für den Erhalt der Proteostase.

2.1.1 Chaperone und Cochaperone sind essentiell für die Proteostase

Für die Funktionsweise eines Proteins ist seine korrekte Faltung essentiell. Die molekularen Chaperone der HSP60-, HSP70- und HSP90-Familie stimulieren die korrekte Faltung der Proteine. Das Chaperon HSP70 bindet dabei neu synthetisierte oder fehlgefaltete Proteine über eine Peptid-Bindedomäne. Die Faltung kann dann über die ATPase-Domäne des Chaperons, die die Öffnung bzw. Schließung der Peptidbindedomäne beeinflusst, gesteuert werden (Esser et al., 2004). Cochaperone sind Proteine, die Chaperone wie HSP70 in ihrer Funktion unterstützen. Dabei binden sie nicht das Substratprotein, sondern aktivieren die ATPase-Domäne des Chaperons (Caplan, 2003). Die korrekte Faltung von Proteinen ist während der Synthese nicht immer gewährleistet (Höhfeld et al., 2001). Gründe können ein chemisches Ungleichgewicht oder zellulärer Stress sein. Durch

die Aggregation fehlgefalteter Proteine kommt es zu pathogenen Veränderungen wie bei der Alzheimer-, Parkinson oder Huntington-Krankheit (Arndt et al., 2007). Proteine, die durch die Translation, Stress oder Konformationsänderungen fehlgefaltet sind, werden von Chaperonen gebunden und dem Abbau zugeführt (Hartl and Hayer-Hartl, 2009). Einige Chaperone sind durch Unterstützung von Cochaperonen in der Lage, terminal entfaltete Proteine speziellen Abbaumaschinerien zuzuführen (Kettern et al., 2010). Molekulare Chaperone besitzen somit eine zentrale Funktion im Proteostase-Netzwerk.

2.1.2 Proteasomaler und lysosomaler Abbau zum Erhalt der Proteostase

Um die Proteostase aufrecht zu halten, ist es wichtig, dass beschädigte und entfaltete Proteine abgebaut werden. Für den Abbau gibt es dabei verschiedene Möglichkeiten. Der Abbauweg, dem die meisten Proteine zugeführt werden, ist das zytosolische Proteasom. Das Proteasom besteht aus zwei Subkomplexen: Der zentralen 20S-Untereinheit und ein bis zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten (Tanaka, 2009). Diese Untereinheiten sind dabei wiederum aus mehreren Proteinen zusammengesetzt. Als Erkennungssignal für die 19S-regulatorischen Anteile des Proteasoms dient dabei die Polyubiquitinierung eines Proteins (Komander and Rape, 2012). Anschließend wird das Protein vom proteolytisch aktiven 20S-Komplex abgebaut. Eine weitere Möglichkeit für den Proteinabbau sind die Lysosomen. Diese Membran-umschlossenen Organellen enthalten verschiedene hydrolytische Enzyme. So können unterschiedliche Polymere, wie Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Fette abgebaut werden (Cooper, 2000). Für die Aktivität der Hydrolasen ist dabei ein pH-Wert von 4,5 bis 5,0 notwendig. Dieser wird durch den vATPase-Komplex sichergestellt, einer ATP-abhängigen Protonenpumpe. Enzyme, die aus beschädigten Lysosomen ins Zytosol gelangen, sind dort somit nicht funktionsfähig. Dadurch wird verhindert, dass wichtige zelluläre Bestandteile unkontrolliert abgebaut werden. Die Lysosomenmembran ist durch glykosilierte Proteine weitestgehend vor dem Abbau geschützt (Lübke et al., 2009). Lysosomen vermitteln einerseits den Abbau von Polymeren, die von der Zelle aufgenommen werden, andererseits den Abbau zelleigener Komponenten im Zuge der Autophagie.

2.2 Autophagie

Der Begriff Autophagie leitet sich aus dem Altgriechischen ab und bedeutet etwa „sich selbst verzehrend“. Geprägt wurde er erstmalig von Christian de Duve, der den Abbau von Mitochondrien und anderen intrazellulären Strukturen durch Lysosomen in der Leber der Ratte beobachtete (Deter and De Duve, 1967). Der Prozess wurde hierbei durch die Injektion des Pankreashormons Glukagon induziert.

Mittlerweile ist dieser Prozess genauer verstanden. Bei der Makroautophagie werden die Proteine von intrazellulären Membranen, den sogenannten Phagophoren, eingeschlossen (Lamb et al., 2013). Das so entstandene Autophagosom bewegt sich entlang des Aktin-Zytoskeletts und fusioniert anschließend mit einem Lysosom, wodurch sich ein Autolysosom bildet (Mizushima et al., 2002). Die Proteine werden dann durch lysosomale saure Hydrolasen abgebaut.

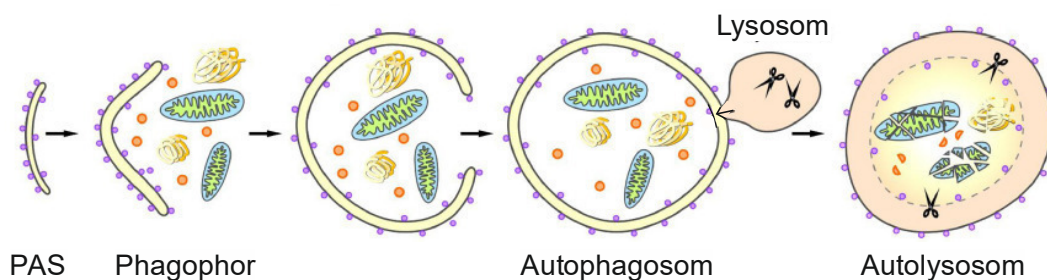


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Autolysosomenformation in der Zelle.

Die Bildung des Autophagosoms in der Makroautophagie erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird die Autophagie durch einen Faktor wie z.B. Stress induziert. Es bildet sich das Phagophor an der *phagophore assembly site* (PAS). Anschließend wird das Phagophor durch Membranen aus verschiedenen intrazellulären Quellen erweitert und schließt dabei die abzubauenen Komponenten ein. Das Phagophor bildet so ein geschlossenes Autophagosom, welches dann mit einem Lysosom fusioniert. Dabei entsteht das Autolysosom, in dem der Abbau stattfindet (Modifiziert nach Stürner and Behl, 2017).

2.3 Das Cochaperon BAG3

Das Cochaperon BAG3 (*BCL2 associated athanogene 3*) spielt in der Proteostase eine entscheidende Rolle. Es kann verschiedene Funktionen übernehmen, wie die Unterstützung der Chaperonfunktion von HSP70 und die Bindung ungefalteter Proteine. Es trägt zur Erhaltung der Proteostase bei, indem es Transkription, Translation und Autophagie reguliert (Klimek et al., 2017).

BAG3 besitzt als Multidomänenprotein verschiedene regulatorische Bereiche (Abbildung 2-2). Einige Domänen konnten bereits spezifischen Funktionen zugeordnet werden (Klimek et al., 2017). Charakterisierend ist vor allem die BAG-Domäne, die alle Proteine der BAG-Familie besitzen (Takayama et al., 1999). Diese Domäne ist entscheidend für die Interaktion von BAG3 mit HSP70 und somit für die Bildung des CASA-Komplexes. Wichtig ist außerdem die WW-Domäne. Sie bindet PY-Motive, Prolin-reiche Regionen. So sorgt die WW-Domäne unter anderem für die Bindung von SYNPO2 über das PPPY-Motiv (Ulbricht et al., 2013). SYNPO2 ist ein Z-Scheiben-Protein, das BAG3 mit einem Proteinkomplex verbindet, der Membrantransport und -fusion initiiert (Klimek et al., 2017). Dadurch kommt es zur Phagophorfusion und somit zum Proteinabbau.

BAG3 ist außerdem ein wichtiger Regulator der Chaperon-assistierten selektiven Autophagie (CASA).

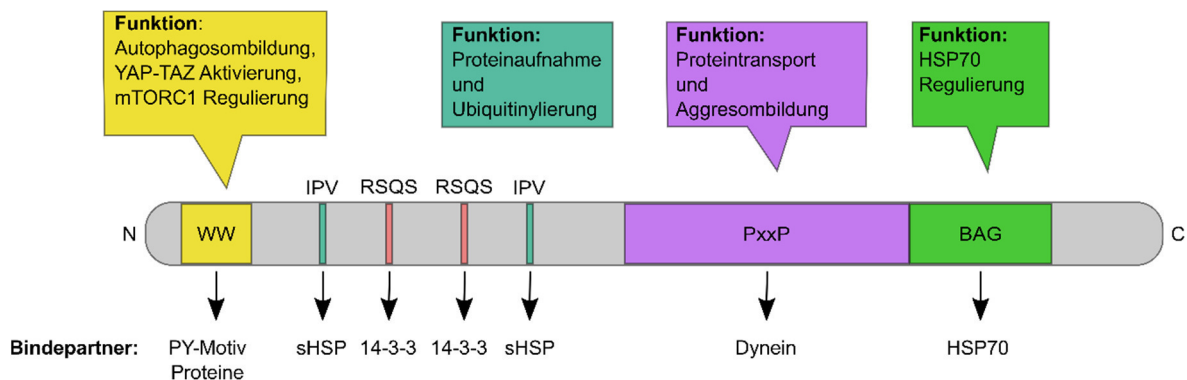


Abbildung 2-2: BAG3 ist ein Multidomänenprotein. Die verschiedenen Domäne erfüllen dabei verschiedene Funktionen in der Proteinhomeostase (verändert nach Klimek et al., 2017).

2.3.1 Chaperon-assistierte selektive Autophagie - CASA

Bei der Chaperon-assistierten selektiven Autophagie (CASA) handelt es sich um einen spezifischen makroautophagischen Abbauweg für fehlgefaltete Proteine in Muskel- und Nervenzellen. Der Abbau wird dabei durch einen Chaperon/Cochaperon-Komplex vermittelt. CASA trägt wesentlich zum Erhalt der Proteostase in unterschiedlichen Geweben bei (Arndt et al., 2010; Ulbricht et al., 2013, 2015). Essentiell ist CASA dabei unter anderem für den Abbau des Aktin-Quervernetzers Filamin, das sich bei mechanischer Belastung entfaltet.

Wichtige Komponenten des CASA-Komplexes sind die Chaperone HSP70 und HSPB8. HSP70 ist ein konstitutives Mitglied der HSP70-Familie. Es kommt im Cytosol und Zellkern von Vertebraten vor und kooperiert mit dem Cochaperon BAG3 (vgl. Kapitel 2.3) in der Bindung und dem autophagischen Abbau fehlgefalteter Proteine (Gamerdinger et al., 2011). Bei HSPB8 handelt es sich um ein kleines Hitzeschutzprotein (22 kDa), das ebenfalls eine hohe Affinität zu BAG3 besitzt (Arndt et al., 2010). Es fungiert zusammen mit BAG3 in der Muskelproteostase und der Organisation von Stressgranula (Ganassi et al., 2016). Stressgranula sind Aggregate, die in der Zelle bei Stress entstehen und vor allem Proteine und RNA enthalten (Mahboubi and Stochaj, 2017). Ist der Stress vorbei, werden die Stressgranula durch wieder abgebaut. Dies geschieht hauptsächlich durch eine Kooperation von HSPB8 mit BAG3 und nur zu einem kleinen Teil über das Proteasom. Nach der Bildung des Proteinkomplexes HSP70-BAG3-HSPB8 wird die Ubiquitinligase CHIP an den Komplex rekrutiert. CHIP markiert die Substratproteine durch Ubiquitinierung für den autophagischen Abbau (Arndt et al., 2010; Carra et al., 2008a). Durch die Bindung von p62 und damit LC3 kann der CASA-Komplex mit einer Phagophormembran verbunden werden (Pankiv et al., 2007).

In der quergestreiften Muskulatur ist der CASA-Komplex an der Z-Scheibe lokalisiert (Arndt et al., 2010). Die Z-Scheibe ist ein makromolekularer Komplex, der Aktinfilamente im Sarkomer stabilisiert (Gautel and Djinović-Carugo, 2016). Das Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit der Muskulatur. Die ständige mechanische Belastung in Muskelzellen führt zu einer hohen Proteindynamik. Dies gilt auch für die Proteine der Z-Scheibe. Filamin ist an der Z-Scheibe lokalisiert und ein Aktin-Quervernetzer (Fujita et al., 2012). Deshalb ist es ein essentieller Faktor

zur Aufrechterhaltung des Zytoskeletts. Filamin ist ein Homodimer und besteht aus zwei stabähnlichen Strukturen mit einem Molekulargewicht von je ca. 250 kDa (Ehrlicher et al., 2011). Es weist N-terminal Aktin-Bindedomänen auf. Durch diese beweglichen Bindedomänen ermöglicht Filamin die flexible Bindung von Aktin an die Z-Scheibe. In Muskelzellen ist vor allem die Isoform Filamin C vertreten (Leber et al., 2016). Unter mechanischer Belastung kommt es zur Entfaltung von Filamin. Diese Entfaltung führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HSF1, aus der eine gesteigerte BAG-Expression resultiert (Jacobs and Marnett, 2009). Das Cochaperon BAG3 bindet Filamin und rekrutiert HSP70 und HSPB8. Dadurch wird das entfaltete Filamin gebunden und selektiv abgebaut (Ulbricht et al., 2013, 2015). Eine Aggregation von Filamin kann so verhindert werden. BAG3 trägt so einen entscheidenden Teil zum Schutz der Zelle gegen mechanischen Stress bei.

2.3.2 BAG3 reguliert Proteintranskription und -translation

BAG3 spielt bei mechanischem Stress neben der Regulierung des Proteinabbaus über CASA auch in anderen Signalwegen eine Rolle. So sorgt BAG3 unter anderem durch die Bindung der Inhibitoren LATS1/2 und AMOTL1/2 für die Aktivierung der Hippo-Signalweg-Effektoren YAP und TAZ (Salah and Aqeilan, 2011; Sudol and Harvey, 2010; Ulbricht et al., 2013). YAP und TAZ binden verschiedene Transkriptionsfaktoren und initiieren dadurch die Transkription von Filamin. Daneben sorgt BAG3 für die Hochregulierung von aktivem mTOR im Zytoplasma. Durch die Bindung an den TSC-Komplex wird dieser am Zytoskelett fixiert, weshalb eine Inaktivierung von mTOR nur noch hier stattfinden kann. Im Zytoplasma hingegen ist mTOR aktiv und sorgt für eine Verstärkung der Translation von Filamin (Kathage et al., 2017).

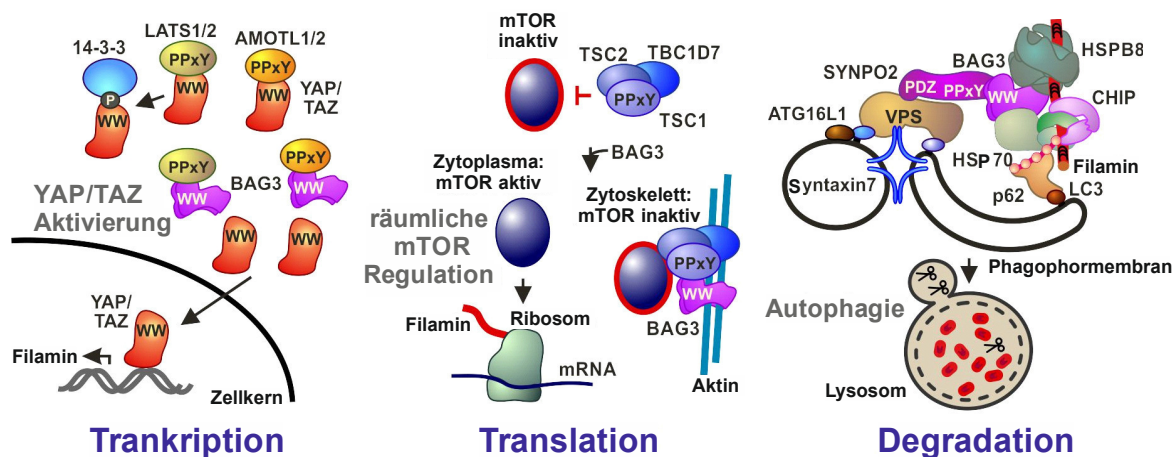


Abbildung 2-3: Regulierung durch BAG3

BAG3 ist ein Schlüsselprotein der Proteostase und reguliert die Transkription, Translation und Degradation von Proteinen. Links: BAG3 bindet über seine WW-Domäne das PPXY-Motiv der Hippo-Signalproteine LATS1/2 und AMOTL1/2 und aktiviert dadurch die Hippo-Signalweg-Effektoren YAP/TAZ. Diese wandern somit ungebunden in den Zellkern. Dort regen sie durch Bindung von Transkriptionsfaktoren die Transkription von Filamin an. Mitte: BAG3 bindet den TSC-Komplex am Zytoskelett, weshalb mTOR hier inaktiv ist. Dadurch können Proteine am Zytoskelett autophagisch abgebaut werden. Im Zytoplasma liegt mTOR dagegen aktiv vor und kann so die Translation von Filamin anregen. Rechts: BAG3 ist ein zentrales Protein des CASA-Komplexes. Es bindet Chaperone wie HSPB8 und HSP70. Diese Chaperone erkennen entfaltetes Filamin und binden es. Anschließend rekrutiert BAG3 SYNPO2 an diesen Komplex. Dadurch werden auch phagophorbundene Proteine rekrutiert und das entfaltete Filamin kann abgebaut werden (verändert nach Kathage et al., 2017).

Eine Fehlfunktion von BAG3 ist verantwortlich für verschiedene Erkrankungen. BAG3 hat eine wichtige Funktion für den Schutz gegen mechanischen Stress in Muskelzellen. Deshalb sind vor allem Myopathien die Folge von verändertem BAG3. Spezifisch für BAG3 ist eine Myopathie bei Patienten, die eine Mutation im bag3-Gen tragen (Selcen et al., 2009). Dabei ist das Prolin209 zu Leucin mutiert. Diese Mutation führt zu einer Muskeldystrophie, die unter anderem eine Kardiomyopathie und Atemprobleme zur Folge hat und tödlich verläuft (Kostera-Pruszczyk et al., 2015). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) konnte eine Störung des CASA-Komplexes festgestellt werden (Crippa et al., 2010).

In Krebszellen hingegen liegen erhöhte BAG3-Level vor, die dem Tumor das Überleben sichern, für Wachstum oder sogar die Resistenz gegen Chemotherapie sorgen (Stürner and Behl, 2017). Die erhöhte BAG3-Synthese wird dabei durch den Transkriptionsfaktor HSF1 initiiert, der zur Tumorentstehung und -erhaltung bei einer Vielzahl von Krebsarten benötigt wird (Dai et al., 2007; Jacobs and Marnett, 2009).

2.3.3 Mechanisch regulierte Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3

BAG3 besitzt einige Phosphorylierungsstellen, die unter mechanischem Stress reguliert sind. Ein Großteil dieser Phosphorylierungsstellen wird bei mechanischer Belastung dephosphoryliert. Nur Serin195 stellt hier eine Ausnahme dar und liegt phosphoryliert vor. Die regulierten Phosphorylierungsstellen konnten bereits im humanen Muskel nach sportlicher Betätigung und in EPS-stimulierten Mäusemyotuben nachgewiesen werden (Hoffman et al., 2015; Warscheid and Fürst, unpubliziert). Einige dieser Phosphorylierungsstellen sind entscheidend für die Stressantwort bei oxidativem Stress (Kim et al., 2016). Die konservierten Phosphorylierungsstellen liegen dabei in keiner der bereits bekannten regulatorischen Domänen von BAG3 (vgl. Kapitel 2.3).

Der Phosphorylierungsstatus von BAG3 ist ein entscheidender Faktor für den Schutz der Muskelzelle gegen mechanischen Stress. Die entscheidenden Phosphorylierungsstellen sind in Abbildung 2-4 gezeigt und in Tabelle 2-1 aufgeführt.

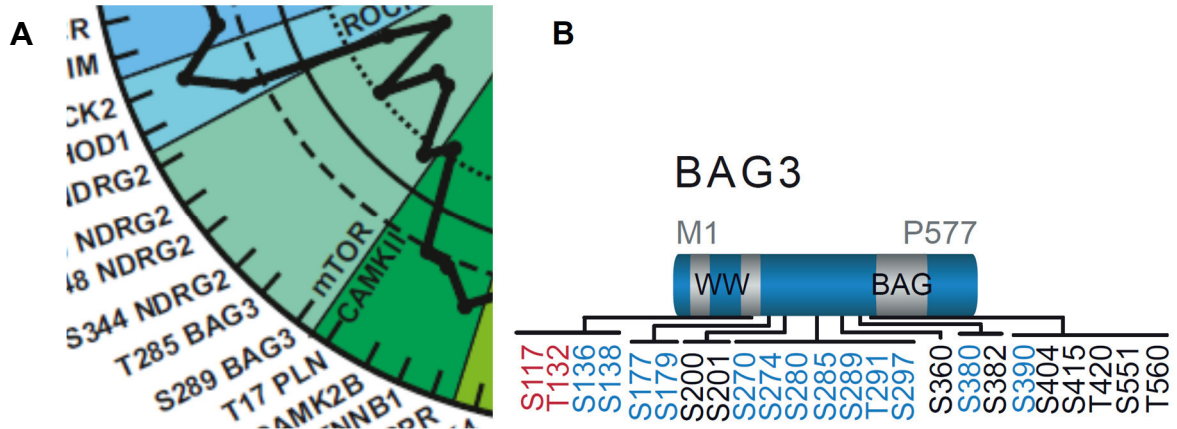


Abbildung 2-4: Regulierte Phosphorylierungsstellen von BAG3 unter mechanischem Stress.

Für BAG3 konnten unter mechanischer Belastung verschiedene regulierte Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden. A: Humaner Muskel bei sportlicher Betätigung (Hoffman et al., 2015).

B: EPS-stimulierte Mausmyotuben (Warscheid and Fürst, unpubliziert).

Tabelle 2-1: Regulierte Phosphorylierungsstellen von BAG3 unter mechanischer Belastung (Hoffman et al., 2015).

Humaner Muskel	EPS-stimulierte Mäusemyotuben
	S138 dephosphoryliert
	S179 dephosphoryliert
S195 phosphoryliert	
S264 dephosphoryliert	S270 dephosphoryliert
	S274 dephosphoryliert
S275 dephosphoryliert	
S279 dephosphoryliert	S285 dephosphoryliert
T285 dephosphoryliert	T291 dephosphoryliert
S289 dephosphoryliert	
	S297 dephosphoryliert
	S380 dephosphoryliert
	S390 dephosphoryliert
	S404 dephosphoryliert

Einige Phosphorylierungsstellen von BAG3 sind sowohl human als auch in der Maus konserviert und liegen bei mechanischer Belastung dephosphoryliert vor (vgl. Tabelle 2-1). Dabei handelt es sich um die Aminosäuren Serin264, Serin279 und Threonin285 (human), diese Nummerierung wird auch in der weiteren Arbeit verwendet.

2.4 Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation von Proteinen

Proteine können verschiedene posttranslationale Modifikationen besitzen, wie Phosphorylierungen, Hydroxylierungen oder Glykosilierungen (Walsh et al., 2005). Eine der am besten untersuchten Modifikationen ist die Phosphorylierung, die bis zu 30 % aller eukaryotischen Proteine betrifft (Cohen, 2000). Dabei werden die Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin phosphoryliert. Im humanen Genom konnten 518 putative Proteinkinasen identifiziert werden (Johnson and Hunter, 2005; Manning et al., 2002). Diese können in zwei Familien unterteilt werden und es sind etwa 90 Tyrosin-Kinasen (PTK) und 428 Serin/Threonin-Kinasen (PSK) bekannt.

Die Phosphorylierung ist ein entscheidender zellulärer Regulationsmechanismus. Viele Enzyme und Rezeptoren werden durch Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsereignisse aktiviert oder deaktiviert (Ardito et al., 2017). Auch Bindedomänen werden durch Phosphorylierungen reguliert, wie die PDZ-Domäne, die wichtigste Bindedomäne in Vertebraten (Cao et al., 1999).

Der Phosphorylierungsstatus ist entscheidend für die Funktionen in der Zelle. Deshalb spiegelt sich eine Fehlfunktion des Phosphorylierungsprozesses in unterschiedlichen Krankheitsbildern wider (Singh et al., 2017). Parkinson ist durch den Verlust dopaminerger Neuronen gekennzeichnet. Essentiell für die Dopaminsynthese ist die Tyrosinhydroxylase. Sie wird durch Phosphorylierungen reguliert, weshalb ein gestörter Phosphorylierungsstatus zu verminderter Dopaminsynthese und somit Parkinson führen kann (Zhu et al., 2012). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer spielt die Veränderung der Phosphorylierung von Tau eine Rolle (Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986). Tau ist wichtig für axonalen Transport, die Dynamik von Mikrotubuli und das Neuritenwachstum (Johnson and Stoothoff, 2004). Bei Krebs sind viele Gene

verändert, die für Proteine kodieren, die an der Regulation des Zellwachstums und der Zellteilung beteiligt sind (Hanahan and Weinberg, 2000). Der korrekte Phosphorylierungsstatus ist essentiell für die Funktion dieser entscheidenden Proteine. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine gestörte Phosphorylierung dieser Proteine an der Entstehung von Krebs beteiligt ist (Appella and Anderson, 2001; Jaggi et al., 2003). Der korrekte Phosphorylierungsstatus der Proteine in der Zelle ist somit entscheidend für die Gesundheit des Organismus. Dabei sind neben den phosphorylierenden Kinasen auch die dephosphorylierenden Phosphatasen entscheidend.

2.5 Dephosphorylierung von Proteinen durch Phosphatasen

Phosphorylierungen sind reversible posttranslationale Modifikationen. Durch Phosphatasen können Proteine dephosphoryliert werden. Bisher wurden im humanen Genom 107 putative Tyrosin-Phosphatasen (PTP) und etwa 30 putative Serin/Threonin-Phosphatasen (PSP) identifiziert (Alonso et al., 2004; Shi, 2009). Die Serin/Threonin-Phosphatasen lassen sich in drei Hauptklassen unterteilen: Phosphoprotein-Phosphatasen (PPP), Metall-abhängige Protein-Phosphatasen (PPM) und Aspartat-abhängige-Phosphatasen (Moorhead et al., 2009). Die Phosphatasen der PPP Familie besitzen neben der katalytischen Untereinheit viele verschiedene regulatorische Untereinheiten, über die die Aktivität der Phosphatasen reguliert wird. Wichtige Phosphatasen dieser Proteinfamilie sind die Proteinphosphatase 1 (PP1), PP2a, PP2b, PP4, PP5, PP6 und PP7. Zur PPM Familie gehören Proteinphosphatasen, die für ihre Funktion Magnesium oder Magnesiumionen (Mn^{2+}/Mg^{2+}) benötigen. Dazu zählen PP2c und die Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase. Diese Phosphatasen besitzen im Gegensatz zu den PPP keine regulatorische Untereinheit, dafür aber weitere Domänen und konservierte Sequenzen, die der Substratspezifität dienen. Sowohl für die PPP als auch die PPM spielen Metallionen eine wichtige Rolle, da sie ein H_2O -Molekül für die Dephosphorylierungsreaktion aktivieren.

PP1 ist eine wichtige Ser/Thr-Phosphatase und wird in allen eukaryotischen Zellen exprimiert. Sie spielt in verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle. Dazu zählen die Meiose und Zellteilung, Apoptose, Proteinsynthese und die Regulation

von Membranrezeptoren und -kanälen (Ceulemans and Bollen, 2004; Cohen et al., 2005).

PP2a ist eine der wichtigsten Phosphatasen, die an der Zellteilung beteiligt sind. Die Phosphatase ist an verschiedenen wichtigen Signalwegen in jedem Schritt des Zellzyklus beteiligt und ist deshalb entscheidend für die Tumorsuppression (Eichhorn et al., 2007). PP2a dephosphoryliert über 300 Substrate im Zellzyklus (Wlodarchak and Xing, 2016).

Auch andere Proteine werden durch PP2a dephosphoryliert, wie das Protein Tau, das den Zusammenbau von Mikrotubuli reguliert (Martin et al., 2013). Eine abnormale Tau-Phosphorylierung führt zur Proteinaggregation und spielt somit eine Rolle bei Alzheimer und dem Down Syndrom (Mondragón-Rodríguez et al., 2014). Auch in anderen Bereichen ist die Dephosphorylierung von Proteinen durch Phosphatasen entscheidend. So konnte gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung von Titin durch PP5 in Kardiomyozyten essentiell ist (Krysiak et al., 2018). Titin ist Teil des Sarkomers und sorgt für eine Zentrierung der Myosinköpfe zwischen den Aktinfilamenten der quergestreiften Muskulatur. PP5 wird durch HSP90 aktiviert und reguliert dann den Phosphorylierungsstatus und die Aktivität von Titin. Eine gestörte Funktion von Titin hat Myopathien zur Folge (Ware and Cook, 2018). Durch die Dephosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) kann der Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften verhindert werden. Rb ist ein Tumorsuppressor-Protein, das in vielen Tumoren durch Phosphorylierung an mehreren Aminosäuren inaktiviert ist (Burkhart and Sage, 2008).

2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von BAG3 auf die Aktivität von BAG3 und speziell auf die Bildung des CASA-Komplexes. Dazu wurden für die bereits bekannten Phosphorylierungsstellen von BAG3, die unter mechanischem Stress reguliert sind, verschiedene Mutanten generiert. Es erfolgte jeweils ein Aminosäureaustausch zu Alanin, das nicht phosphoryliert wird, und Asparaginsäure, das als Phosphorylierungsmimikry dient. Diese Mutationen wurden bereits in

verschiedenen Studien eingesetzt, um Phosphorylierungen zu untersuchen (Deek et al., 2016; Guerra-Castellano et al., 2016; Levy et al., 2019). Alternativ wurde in der Literatur statt Asparaginsäure Glutaminsäure verwendet. Asparaginsäure und Glutaminsäure sind saure Aminosäuren, die im physiologischen pH-Bereich negativ geladen sind (Müller-Esterl, 2011). Ihre Carboxylgruppe ähnelt dann der Phosphatgruppe, weshalb sie als Phosphorylierungsmimikry eingesetzt werden können (vgl. Abbildung 2-5).

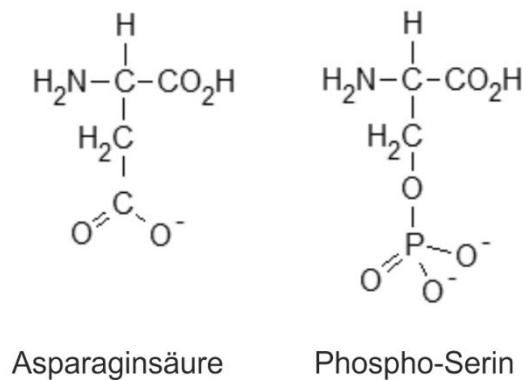


Abbildung 2-5: Struktureller Vergleich von Phospho-Serin und Asparaginsäure, die als Phosmomimikry dient. Asparaginsäure wird aufgrund der Carboxylgruppe in der Seitenkette zu den sauren Aminosäuren gezählt. Im physiologischen pH-Bereich ist die deprotoniert und damit negativ geladen. Aufgrund ihrer negativen Ladung entspricht die Asparaginsäure der Struktur der Phosphatgruppe des Phospho-Serins und kann als Phosphorylierungsmimikry eingesetzt werden.

Um den Einfluss dieser Mutanten auf die Bildung des CASA-Komplexes zu untersuchen, erfolgte die Überexpression in HeLa-Zellen, humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Anschließend wurden Immunopräzipitationen durchgeführt, um die Proteinkomplexe zu isolieren. Zusätzlich wurde der Einfluss dieser Mutanten auf die CASA-Aktivität analysiert. Neben den Phosphorylierungsmutanten sollte auch die komplette Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 untersucht werden. Dazu wurde eine Behandlung mit Phosphataseinhibitoren zur vollständigen Phosphorylierung oder Phosphatase zur vollständigen Dephosphorylierung durchgeführt. Die so behandelten Proteinkomplexe wurden anschließend ebenfalls durch Immunopräzipitation aufgereinigt. So konnte der Einfluss der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 in dieser Arbeit auf unterschiedliche Weise analysiert werden.

3 Material

3.1 Geräteliste

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugsystem	HLC Biotech/KNFlab Laboport
Autoklav	Tuttnauer Systec
Biofuge fresco	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Blot-Apparatur (Nassblot) Mighty Small Transphor	Amersham
Eismaschine MF22	Scotsman
Elektrophorese-Apparatur HE33	Hofer
Elektrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham
Entwicklermaschine CURIX 60	AGFA
Feinwaage SI-234	Denver Instruments
Gefrierschrank (-80 °C)	Forma Scientific
Gel-Dokumentationssystem Gel Doc	Biorad
Heizblock	Eppendorf
Inkubator	Heraeus/Binder/Biometra
Kippschüttler	Stuart
Kühlschrank	Siemens
Kühltruhe (-20 °C)	Liebherr/Siemens
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf
Laborfuge 400R	Heraeus
Lichtmikroskop ID03	Zeiss
LoBind Reaktionsgefäße	Eppendorf
Magnetrührer MR2002	Heidolph
Mikrowelle	Bosch

Material

Milli-Q-Plus Reinstwasseranlage	Merck
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Rotator	Renner
Schüttelinkubator	Thermo Scientific
SDS-PAGE-Apparatur Mighty Small II	Amersham
Sterilbank Microflow Biological safety cabinet	Nalge Nunc Industries
Thermo-Block	HLC Biotech QBT, Grant Industries
Thermocycler T3000	Eppendorf
Thermoschüttler	Bio-Rad
Thermo-shaker	Dunn Labortechnik
Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher Ultrasound Technology
Vortex	Scientific Industries
Waage	KernKB
Wasserbad	Lauda/Grant
Zellkulturschalen	Sarstedt
Zentrifuge mini	KA mini G

3.2 Chemikalienliste

Tabelle 3-2: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Roth
Acrylamid (30 %)/bis-Acrylamid	Roth
Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Amylose Resin	New England Biolabs
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth

ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma Aldrich
Bacto-Hefeextrakt	Roth
Bacto-Trypton	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	Roth
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Roth
Coomassie <i>Brilliant blue</i> R250	Sigma Aldrich
Complete EDTA-free	Roch
Cycloheximid	Sigma Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (absolut)	Roth
Fetales Kälber Serum (FCS)	PanBiotech
Fetales Kälber Serum (FCS) für A7r5-Zellen	Biochrom
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Glukose	Roth
Glutamin	Life Technology
Glycerin (wasserfrei)	Roth
Glycin	Roth
HCl (Salzsäure)	Roth
Imidazol	Roth
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Roth
K ₂ HPO ₄ (Di-Kaliumhydrogenphosphat)	Roth
Kanamycin	Roth
KCl (Kaliumchlorid)	Roth
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	Roth
Mercaptoethanol	Roth

Material

Methanol	Roth
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Roth
Milchpulver	Roth
MOPS	Roth
Mowiol	Roth
M2-Agarose	Sigma
Na ₂ HPO ₄ (Di-Natriumhydrogenphosphat)	Roth
NaCl (Natriumchlorid)	Roth
Natriumdeoxycholat	Roth
Natrium Pyruvat	Gibco
Ni-NTA-Agarose	Macherey-Nagel
Nonidet P-40 substitute	Sigma Aldrich
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin	Life Technology
Phenolrot	Invitrogen
PhosSTOP Easypack	Roche
Ponceau S	Roth
Protein-G-Sepharose	GE Healthcare
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Streptomycin	Life Technology
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat	Thermo Scientific
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Thermo Scientific
TCA (Trichloressigsäure)	Roth
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth
Tris	Roth
Triton X100	Roth
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco

Tween-20	Sigma Aldrich
γ -Globulin	Sigma

3.3 Reagenziensysteme

Tabelle 3-3: Verwendete molekularbiologische Reagenziensysteme

Bezeichnung	Hersteller
NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren

3.4 Enzyme

Tabelle 3-4: Verwendete Enzyme für Klonierung und cDNA-Synthese

Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Thermo Scientific
FastDigest® Restriktionsenzyme	Thermo Scientific
KOD DNA Polymerase	Merck
Proteinase K	AppliChem
RNase A	Segenetic

3.5 Bakterien- und Säuger-Stämme

Tabelle 3-5: Verwendet Bakterien und eukaryontische Zellen

Stamm	Merkmale
<i>E. coli</i> TG1-Bakterien	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1-Bakterien	Invitrogen
A7r5-Zellen	embryonale Glattmuskel-Zelllinie aus Ratten-Aorta
HeLa-Zellen	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms

3.6 Antikörper

Tabelle 3-6: Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
BAG3	Kaninchen	AG Höhfeld
CHIP	Kaninchen	Abcam
Filamin A/C	Kaninchen	AG Fürst/Abnova
HSPB8	Kaninchen	St John´s Lab
HSP70	Kaninchen	AG Höhfeld
Kaninchen IgG	/	Santa Cruz
SYNPO2	Kaninchen	AG Fürst
γ -Tubulin	Maus	Sigma Aldrich

Tabelle 3-7: sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
Maus IgG PO-gekoppelt	Ziege	Sigma Aldrich
Kaninchen IgG PO-gekoppelt	Ziege	Sigma Aldrich

3.7 Plasmide

Tabelle 3-8: Verwendete Plasmide zur Amplifikation oder Expression in *E. coli*-Bakterien und eukaryontischen Zellen

Plasmid	Beschreibung
pCMV-Tag2B	Expression von Proteinen in Säugerzellen mit N-terminalem FLAG-Tag unter Kontrolle eines CMV-Promoters (Clontech)
pCMV-Tag2B –BAG3	bag3-DNA wurde über die Schnittstellen BamHI und EcoRI in pCMV-Tag2B kloniert
pCMV-Tag2B–BAG3-S264A	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Serin264 zu Alanin
pCMV-Tag2B–BAG3-S264D	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Serin264 zu Asparaginsäure
pCMV-Tag2B–BAG3-T279A	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Serin279 zu Alanin
pCMV-Tag2B–BAG3-T279D	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Serin279 zu Asparaginsäure
pCMV-Tag2B–BAG3-T285A	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Threonin285 zu Alanin
pCMV-Tag2B–BAG3-T285D	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Threonin285 zu Asparaginsäure
pCMV-Tag2B–BAG3-T285A S289A	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Threonin285 und Serin289 zu Alanin
pCMV-Tag2B–BAG3-T285D S289D	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Threonin285 und Serin289 zu Asparaginsäure
pCMV-Tag2B–BAG3-S289A	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Serin289 zu Alanin
pCMV-Tag2B–BAG3-S289D	Kloniert aus pCMV-Tag2B-BAG3, Mutation von Serin289 zu Asparaginsäure

3.8 Oligonukleotide

Tabelle 3-9: Verwendete Oligonukleotide zur Generierung der BAG3-Phosphomutanten

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
BAG3 S264A for	CCCCTGCGGGCGGCAGCCCCGTTTCAGGTCAT
BAG3 S264A rev	ATGACCTGAACGGGGCTGCCGCCCGCAGGGG
BAG3 S264D for	CCCCTGCGGGCGGCAGACCCGTTTCAGGTCATC
BAG3 S264D rev	GATGACCTGAACGGGTCTGCCGCCCGCAGGGG
BAG3 S279A for	TCGAGCCGGGAGGGCGCACCAGCCAGGAGCA
BAG3 S279A rev	TGCTCCTGGCTGGTGCGCCCTCCCGGCTCGA
BAG3 S279D for	CGAGCCGGGAGGGCGACCCAGCCAGGAGCAGC
BAG3 S279D rev	GCTGCTCCTGGCTGGGTCGCCCTCCCGGCTCG
BAG3 T285A for	CCAGCCAGGAGCAGCGCGCCACTCCACTCCC
BAG3 T285A rev	GGGAGTGGAGTGGCGCGCTGCTCCTGGCTGG
BAG3 T285D for	CAGCCAGGAGCAGCGACCCACTCCACTCCCC
BAG3 T285D rev	GGGGGAGTGGAGTGGGTCGCTGCTCCTGGCTG
BAG3 S289A for	AGCACGCCACTCCACGCCCCCTCGCCCATCC
BAG3 S289A rev	GGATGGGCGAGGGGGCGTGGAGTGGCGTGCT
BAG3 S289D for	GCACGCCACTCCACGACCCCTCGCCCATCCG
BAG3 S289D rev	CGGATGGGCGAGGGGTCGTGGAGTGGCGTGC
BAG3 T285A S289A for (aus T285A)	AGCGCGCCACTCCACGCCCCCTCGCCCATCC
BAG3 T285A S289A rev (aus T285A)	GGATGGGCGAGGGGGCGTGGAGTGGCGCGCT
BAG3 T275D S289D for (aus T285D)	AGCGACCCACTCCACGACCCCTCGCCCATCCG
BAG3 T285D S289D rev (aus T285D)	CGGATGGGCGAGGGGTCGTGGAGTGGGTCGCT

4 Methoden

4.1 Methoden im Umgang mit *Escherichia coli*-Bakterien

4.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Bakterien

Escherichia Coli (*E. coli*) wurde zur Amplifikation von Plasmiden und zur Proteinexpression eingesetzt. Dazu wurden die Mikroorganismen in LB Medium mit einem dem verwendeten Plasmid entsprechenden Antibiotikum zur Selektion kultiviert. Zur Plasmidamplifikation wurden 300 ml LB Medium mit *E. coli* TG1 von einer Festagarplatte oder aus einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm herangezogen. Für die Proteinexpression erfolgte die Anzucht von *E. coli* BL21 bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM Isopropyl-β-D thiogalactopyranosid (IPTG) initiiert, und es folgte eine weitere Inkubation für 3 h bei 200 rpm.

LB-Medium (mit Ampicilin/Kanamycin)

1 % Bacto-Trypton
0,5 % Bacto-Hefeextrakt
0,5 % NaCl
pH 7,5 → autoklavieren
(Ampicillin [20 µg/ml]/Kanamycin [5 µg/ml])

LB-Agar (mit Ampicilin/Kanamycin)

1 % Bacto-Trypton
0,5 % Bacto-Hefeextrakt
0,5 % NaCl
1,5 % Bacto-Agar
pH 7,5 → autoklavieren
(Ampicillin [20 µg/ml]/Kanamycin [5 µg/ml])

4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Eine Möglichkeit Plasmide in *E. coli* einzubringen setzt voraus, dass diese chemisch kompetent sind. Dazu werden zweiwertige Ionen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) verwendet. 2 ml einer Vorkultur des gewünschten Bakterienstammes wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm angezogen. 100 ml LB Medium wurden mit 500 µl der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,3, was der exponentiellen Wachstumssprache entspricht, kultiviert. Die übrige Übernachtskultur wurde im Kühlschrank gelagert. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte folgte eine Inkubation auf Eis von 10 min. Die Bakterien werden durch die Behandlung mit Calciumchlorid Lösung (CaCl_2) und Magnesiumchlorid (MgCl_2) gestresst, weshalb alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt werden. Die Bakterien aus dem Kühlschrank wurden zentrifugiert (10 min, 3000 rpm, 4 °C) und nach Verwurf des Überstandes in 10 ml 0,1 M MgCl_2 resuspendiert. Nach Zugabe der auf Eis gelagerten Übernachtskultur erfolgte eine Zentrifugation (10 min, 3000 rpm, 4 °C), die Resuspension des Pellets in 20 ml einer 0,1 M eiskalten CaCl_2 Lösung und eine Inkubation für 20 min auf Eis. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 0,1 M CaCl_2 Lösung mit 15 % Glycerin aufgenommen, und in Aliquots zu je 100 µL bei 80 °C eingefroren.

4.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden 12 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µg aufgereinigtes Plasmid zu chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42 °C, der die Plasmidaufnahme unterstützen sollte, wurden die Bakterien bei 5.000 rpm für 30 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet im Rücklauf des Überstandes resuspendiert. Die Selektion der plasmidtragenden Bakterien erfolgte auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Verschiedene Bakterienstämme wurden je nach Versuch eingesetzt. Für Klonierungen oder Amplifikationen von Plasmiden wurden *E. coli* TG1-Bakterien verwendet.

4.2 Methoden im Umgang mit eukaryontischen Zellen

4.2.1 Kultivierung von A7r5-Zellen

A7r5-Zellen eignen sich als Glattmuskelzellen aus der Aorta der Ratte besonders gut für die Untersuchung des Proteinabbaus durch mechanische Spannung. Die A7r5-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen gesplittet. Nach einem Waschschrift mit PBS folgte die Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA für 10 min bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 in neue Zellkulturschalen umgesetzt.

Kulturmedium für A7r5-Zellen:

Dulbecco's Modified Eagle Medium

(+ 1g/L D-Glucose Pyruvat,

- L-Glutamine, - Phenolrot)

10 % FCS

100 IU/ml Penicillin

100 IU/ml Streptomycin

4 mM L-Glutamin

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

1,4 mM KH₂PO₄

pH 7,4 -> autoklavieren

Trypsin-Lösung

0,05 % Trypsin/EDTA

4.2.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen gesplittet. Die Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA für 3 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte eine Resuspendierung der Zellen in frischem Medium und das Umsetzen 1:10 in neue Zellkulturschalen.

Kulturmedium für HeLa-Zellen:

Dulbecco's Modified Eagle Medium
(+4,5 g/L Glucose, L-Glutamine, -Pyruvat)
10 % FCS
100 IU/ml Penicillin
100 IU/ml Streptomycin

4.2.3 Transfektion mittels JetPRIME®

Zur Überexpression oder *knock down* von Proteinen in A7r5 Zellen erfolgte eine transiente Transfektion von DNA oder siRNA bei einer Konfluenz von 50 % mithilfe des JetPRIME® Transfektionsreagenzes von Polyplus transfection® nach Herstellerangaben. Wegen der niedrigen Zellzahl der A7r5-Zellen aufgrund ihrer Größe wurden für eine 10 cm Zellkulturschale die Angaben für 6 cm Schalen verwendet.

4.2.4 Transfektion mittels Calcium-Phosphat

Zur Überexpression von Proteinen wurden HeLa-Zellen mit Hilfe der Calcium Phosphat Methode transient transfiziert (Graham and van der Eb, 1973). Es bildete sich ein Copräzipitat aus DNA, Calciumchlorid und Phosphat, das nach Bindung an die Zelloberfläche über Endozytose aufgenommen wurde. Der Transfektionsansatz für 10 cm Schalen enthielt dabei Folgendes:

DNA	6-18 µg
CaCl ₂	87 µL
H ₂ O	x µL
<hr/>	
Gesamtvolumen:	700 µL

Zu diesem Ansatz wurde tropfenweise 700 µL 2x HBS auf dem Vortexer hinzugegeben. Die Zugabe zu den Zellen erfolgte nach 1 min Inkubation. Das Medium wurde nach 16 h gewechselt und die Zellernte erfolgte 48 h nach der Transfektion.

4.2.5 Behandlung eukaryontischer Zellen mit Inhibitoren

Zur Behandlung der Zellen mit Inhibitoren wurden diese vor der Zellyse dem Medium zugegeben. Cycloheximid wurde als Translationshemmer eingesetzt. Bei Calyculin A, Okadasäure und Fostriecin handelt es sich um Phosphataseinhibitoren.

Inhibitor	Konzentration	Dauer
CHX (Cycloheximid)	50 µM (A7r5)	variiert
	20 nM (HeLa)	10 min
Calyculin A	200 nM	variiert
Okadasäure	10 µM	variiert
Fostriecin	5 mM	variiert

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Plasmidpräparation aus *E.coli*-Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmiden erfolgte die Transformation in *E.coli* TG1 (vgl. 4.1.3). Die Plasmid-Aufreinigung erfolgte mit dem Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers.

4.3.2 PCR

Die Mutationen für die Phosphorylierungsstellen von BAG3 wurden durch eine PCR mithilfe von Primern generiert, die die gewünschte Mutation enthielten. Die Primer waren dabei 31 bis 32 Basen lang, je nachdem, ob ein oder zwei Basen geändert werden sollten, und enthielten die gewünschte Basenänderung in der Mitte (vgl. Tabelle 3-9).

500 ng	Template
5 µL	dNTP-Gemisch aus je 10 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP
3 µL	<i>sense</i> Primer 10 pmol
3 µL	<i>antisense</i> Primer 10 pmol
5 µL	10x KOD-DNA Polymerase-Puffer
2 µL	MgSO ₂
1 µL	KOD-DNA Polymerase (0.02 U/µl)
x µL	ddH ₂ O
50 µL	Gesamtvolumen

Da die Primer aufgrund der eingefügten Mutation nicht vollständig binden konnten, wurde die PCR in zwei Phasen mit 5 bzw. 25 Zyklen durchgeführt. Zunächst mit einer niedrigeren Annealingtemperatur ($T_{m1} - 5\text{ °C}$), die der Schmelztemperatur der unvollständig gebundenen Primer entsprach und anschließend mit einer höheren Schmelztemperatur ($T_{m2} - 5\text{ °C}$), was der Schmelztemperatur der Primer ohne Fehlbindung entsprach, da nun bereits ein mutiertes Template vorlag.

Tabelle 4-1: Temperatur der KOD-Polymerase für die verwendete PCR

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	20 s	} 5
Annealing	$T_{m1}-5$ °C	10 s	
Elongation	70 °C	25 s/kb	
Denaturierung	95 °C	20 s	} 25
Annealing	$T_{m2}-5$ °C	10 s	
Elongation	70 °C	25 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

4.3.3 Restriktionsverdau für die Klonierung der Phosphorylierungsmutanten

Um das Template aus dem PCR-Produkt zu entfernen, wurde ein Restriktionsverdau mit DpnI durchgeführt. Dieses Restriktionsenzym schneidet methylierte DNA und baut so das Template ab.

1 μ L *FastDigest*® DpnI

50 μ L PCR-Ansatz

6 μ L 10x *FastDigest*® Puffer

2 μ L H₂O

60 μ L Gesamtvolumen

Der Verdau erfolgte für 30 min bei 37 °C und die Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min. Anschließend folgte eine PCR-Aufreinigung mit dem Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die Elution wurde abweichend mit 20 μ L H₂O durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in *E. coli* XL1 transformiert (vgl. 4.1.2). Dieser Stamm besitzt die Besonderheit, dass er das lineare PCR-Produkt ligieren kann, sodass keine vorausgehende Ligation notwendig war. Anschließend wurden einzelne Klone gepickt und Flüssigkulturen (je

4 ml) angeimpft. Es folgten Plasmidpräparationen mit dem Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers, abweichend wurde mit 30 µL H₂O eluiert.

4.3.4 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde die Plasmidkonzentration mittels Nanodrop bestimmt. Es wurden jeweils 20 µL mit einer Konzentration von 50 µg/µL eingestellt. Die Sequenzierung erfolgte durch GATC. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann in Gentle mit der Gensequenz von bag3 verglichen, um positive Klone zu identifizieren, die die gewünschte Mutation besaßen.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurde das Zellkulturmedium abgenommen. Die Zellen wurden in der Zellkulturschale zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS pro Platte abgeschabt. Nach der Zentrifugation (13.200 rpm, 4 °C, 5 min) wurden die Zellpellets im RIPA-Lysepuffer (+SDS) für 20 min auf Eis lysiert und anschließend zentrifugiert (13.200 rpm, 4 °C, 20 min). Die Proteine wurden im Überstand abgenommen und anschließend konnte die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt werden.

RIPA-Lysepuffer (+SDS)

25 mM Tris, pH 8
150 mM NaCl
0,1 % SDS
0,5 % Natriumdeoxycholat
1 % Nonidet P-40
10 % Glycerol
2 mM EDTA
1x "Complete"-Protease-Inhibitor-Cocktail
nach Bedarf 1x "PhosSTOP" Phosphatase-Inhibitor

4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Mithilfe des BC-Protein-Assay kann die Gesamtkonzentration von Proteinen in wässriger Lösung bestimmt werden. Dazu wird eine chemische Farbreaktion der Proteine genutzt und die Adsorption mittels Photometrie bestimmt, um daraus auf den Proteingehalt rückschließen zu können. Beim BC-Assay, der auf der Biuret-Reaktion beruht, reduzieren die Proteine im alkalischen Milieu Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen. Die Cu^+ -Ionen bilden mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen farbigen Komplex, der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562 \text{ nm}$ photometrisch nachgewiesen

werden kann. Mit Hilfe von BSA wird eine Kalibriergerade erstellt, aus der die zu bestimmende Proteinkonzentration ermittelt werden kann.

1 μL Protein wurde zu 19 μl H_2O gegeben und mit 980 μl Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation (RT) erfolgte die Messung im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Leerwert wurden 20 μL H_2O versetzt mit 980 ml Bradford Reagenz vermessen.

4.4.3 Proteinfällung durch TCA

Proteine können durch die Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt werden, um sie umzupuffern oder aufzukonzentrieren. Dazu wurde TCA in einer Endkonzentration von 12,5 % zugegen und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 4 °C, 13.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 34 μL 1xSDS-Probenpuffer resuspendiert. Bei saurem pH-Wert, erkennbar an einer Gelbfärbung, wurden zur Neutralisierung des pH-Werts 1-2 μL 1 M Tris pH 9,0 zugegeben.

4.4.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Aufgrund ihrer Ladungseigenschaften lassen sich Proteine nicht einfach durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe auftrennen, da sie, im Gegensatz zu DNA, keine negative Nettoladung aufweisen bzw. sogar positiv geladen sein können (Clark and Pazdernik, 2009). Deshalb wurden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt, wodurch die Polypeptidketten aufgefaltet und mit negativ geladenem SDS umhüllt werden. Dadurch wanderten die Proteine im elektrischen Feld des Acrylamidgels. Pro Probe wurden 40 μg Protein eingesetzt und die Gelelektrophorese erfolgte bei 300 V und 20 mA pro Gel für 1 - 1,5 h.

Laufpuffer

25 mM Tris

190 mM Glycin

Probenpuffer (3x)

0,2 M Tris/HCl, pH 6,8

6 % SDS

30 % Glycerol

0,03 % Bromphenolblau

15 % β -Mercaptoethanol**Trenngel nach Laemmli (für 1 Gel)**

Gelkonzentration:		7,5 %	12,5 %	15 %
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8		1,52 ml	1,52 ml	1,52 ml
30 % Acrylamid (0,8% Bis Aa)		1,51 ml	2,52 ml	3,02 ml
H ₂ O		2,89 ml	1,87 ml	1,37 ml
10 % SDS		89 μ L	89 μ L	89 μ L
10 % APS		39 μ L	39 μ L	39 μ L
TEMED		3,8 μ L	3,8 μ L	3,8 μ L

Sammelgel für 1 Gel

1,5 M Tris/HCl, pH 6,5	400 μ L
30 % Acrylamid (0,8% Bis Aa)	266 μ L
H ₂ O	882 μ L
10 % SDS	48 μ L
10 % APS	16 μ L
TEMED	1,6 μ L

4.4.5 Western Blot

Für den Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wird ein Semi-Dry-Blot-System verwendet, bei dem die Blotting-Einheit aus drei Lagen Whatman-Paper als unterste Schicht, gefolgt von der Membran, dem SDS-Gel als dritte Schicht und abschließend drei weiteren Lagen Whatman-Paper besteht. Der Transfer erfolgt bei 300 mA für 90 – 100 min bei RT. Dabei wurden die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode auf die Nitrozellulose-Mambran transferiert. Die Darstellung der Proteine erfolgte anschließend über eine Immundetektion.

Transferpuffer

20 mM Tris

144 mM Glycin

20 % Methanol

0,01 % SDS

4.4.6 Immundetektion

TBST-Puffer

20 mM Tris/HCl pH 7,6

137 mM NaCl

0,006 % Triton X-100

Blockierungslösung

2 % Milchpulver/TBST

Ponceau S Färbelösung

0,1 % Ponceau S

5 % Essigsäure

Durch die Inkubation der Membran in Ponceau S und anschließendes Waschen mit Wasser wurde die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran sowie die gleichmäßige Proteinmenge in den Gelspuren überprüft. Die Proteine wurden dabei rot angefärbt. Die Nitrocellulosemembran wurde für 0,5 h bei RT auf einem Schüttler in Blockierlösung (5% Milchpulver in TBST) zur Absättigung unspezifischer Bindestellen inkubiert. Für die Immundetektion der Proteine erfolgte zunächst die Inkubation der Membran in primärem Antikörper (1:500 – 1:2000 in 2 %iger Milch/TBST) über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dreimal 10 min mit TBST gewaschen und mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (1h, RT). Nach weiteren 3 Waschschrritten kann der Sekundärantikörper über eine Chemilumineszenzreaktion detektiert werden, indem die Membran für 1 - 2 min nach Herstellerangaben in einer ECL-Lösung inkubiert wird. Über einen Röntgenfilm und dessen Entwicklung kann die Proteinmenge auf der Membran detektiert werden.

4.4.7 Coomassie-Färbung

Coomassie-Lösung

50 % Methanol

10 % Essigsäure

0,125 % Coomassie Brilliant Blue 250

Entfärbelösung

50 % Methanol

10 % Essigsäure

Zur unspezifischen Färbung von Proteinen über SDS-PAGE wurde Coomassie Brilliant blue G 250 eingesetzt. Das Gel wurde über Nacht bei RT in Coomassie und anschließend für 30 min in der Entfärbelösung geschwenkt. Das Gel kann anschließend in Wasser gelagert werden, dabei bleiben die Proteinbanden erhalten.

4.4.8 Immunpräzipitation

RIPA-Lysepuffer (ohne SDS)

25 mM Tris, pH 8

150 mM NaCl

0,5 % Natriumdeoxycholat

1 % Nonidet P-40

10 % Glycerol

2 mM EDTA

1x "Complete"-Protease-Inhibitor-Cocktail

1x "PhosSTOP" Phosphatase-Inhibitor

Waschpuffer

20 mM MOPS, pH 7,2

100 mM KCl

Elutionspuffer

0,1 M Glycin/HCl pH 3,5

Zur Isolation von Proteinkomplexen aus Zellextrakten wurde die Immunpräzipitation (IP) eingesetzt. Dafür wurden pro Ansatz 15 x 10 cm Zellkulturschalen A7r5-Zellen oder 5 x 10 cm Zellkulturschalen HeLa-Zellen benötigt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS (1 ml pro Zellkulturschale) abgeschabt. Die Zellen einer Probe wurden vereinigt und zentrifugiert (5 min, 2000 rpm, 4 °C). Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von RIPA ohne SDS (1 – 2 ml) für 20 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen 3 x 10 s mit Ultraschall behandelt und 20 min zentrifugiert (13200 rpm, 4 °C). Die Sepharose wurde 2-mal mit 1 ml RIPA gewaschen und jeweils 2 min bei 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Durch Bradford-Messung wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt und mit RIPA auf 10 µg/µL eingestellt. Eine Extraktprobe wurde entnommen und mit SDS-Probenpuffer auf 5 µg/µL eingestellt. Je nach Versuch erfolgte ein Preclear der

Proteinsuspension mit 50 μ L Sepharose für 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand 1:1 aufgeteilt und jeweils 50 μ L Sepharose hinzu gegeben. Nach der Zugabe von 4 μ g Antikörper bzw. IgG für die Kontrolle erfolgte die Inkubation bis zu 3 h auf dem Drehrad. Anschließend wurde die Sepharose 4x mit RIPA gewaschen und jeweils 2 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Es folgten 2 Waschschrte mit MOPS-KCl. Für die Elution wurden 1 ml Elutionspuffer hinzugegeben, die Sepharose 12 min auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich invertiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 min, 6000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen. Es folgte die Proteinfällung durch die Zugabe von 300 μ L 50 % TCA über Nacht im Kühlschrank oder mindestens 30 min auf Eis. Nach Zentrifugation (30 min, 13200 rpm, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 34 μ L 1x Probenpuffer resuspendiert. Bei saurem pH-Wert, erkennbar durch gelbe Färbung, wurde TRIS Base hinzu gegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C aufgekocht.

4.4.9 Immunopräzipitation mit Phosphatase-Behandlung

Für die Immunopräzipitationen, bei denen eine Phosphatasebehandlung durchgeführt werden sollte, wurde ein abweichender Lysepuffer verwendet, der dem Puffer aus dem Phosphatase-Kit in abweichender Form entsprach.

HEPES-Lysepuffer

50 mM HEPES

0,1 M NaCl

2 mM DTT

1 mM MnCl₂

1x "Complete"-Protease-Inhibitor-Cocktail

1x "PhosSTOP" Phosphatase-Inhibitor

Die Zellyse erfolgte wie unter 4.4.8 beschrieben, allerdings mit 6 x 10s Ultraschallbehandlung. Nach dem Einstellen der Proteinkonzentration auf 10 μ g/ μ L

wurden 3 μL λ Phosphatase (400 units/ μL) zu 500 μL Zellextrakt hinzugegeben. Die Phosphatasebehandlung erfolgte 30 min bei 30 °C. Anschließend erfolgte die Immunopräzipitation analog zu 4.4.8.

4.5 Statistik

Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit dem Students T-Test in Excel. Die Anzahl der Experimente betrug mindestens 5 unabhängige Durchläufe (n). Bei der Western Blot Analyse wurde die Intensität der ermittelten Banden über ImageJ quantifiziert und über Excel berechnet.

5 Ergebnisse

BAG3 bildet im Rahmen der CASA-Maschinerie Komplexe mit verschiedenen Interaktionspartnern, die bereits in vorangegangenen Arbeiten identifiziert werden konnten. Die genauen Mechanismen dieser Komplexbildung sind jedoch noch nicht genau verstanden. BAG3 weist unter mechanischer Belastung eine Regulierung verschiedener Phosphorylierungsstellen auf. Phosphorylierungen sind posttranslationale Modifikationen, die die Aktivität von Proteinen regulieren (vgl. Kapitel 2.4). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 auf die Formierung des CASA-Komplexes und somit auf die Funktion der CASA-Maschinerie auswirkt.

5.1 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3

Proteine werden durch Kinasen posttranslational modifiziert. Die so hinzugefügten Phosphorylierungen sind reversibel und können durch Phosphatasen wieder entfernt werden. Die Dephosphorylierung eines Proteins kann durch verschiedene Phosphataseinhibitoren verhindert werden. Dies sollte in dieser Arbeit genutzt werden, um BAG3 im vollphosphorylierten Zustand untersuchen zu können. Dazu wurden die Inhibitoren Calyculin A (CalA) und Okadasäure (OA) eingesetzt. Sie inhibieren die Phosphatasen PP1 und PP2a. Für A7r5-Zellen gab es noch keine Literaturangaben zur notwendigen Calyculin A- und OA-Konzentration. A7r5-Zellen sind Glattmuskelzellen der Ratte und waren deshalb für die Untersuchung von Muskelzellen gut geeignet. Deswegen sollte zunächst die Inhibitorkonzentration ausgetestet werden, die für einen Effekt notwendig war. Dazu wurden A7r5-Zellen in 10 cm Schalen ausgesät und für 72 h kultiviert. Je nach zu testender Kondition wurden 20 min bzw. 1 h vor der Zelllyse der entsprechende Inhibitor dem Medium zugegeben. Als Kontrolle für die Phosphorylierung wurde Phospho-Filamin mit einem entsprechenden Antikörper detektiert, da kein Phospho-BAG3-Antikörper verfügbar war. Die Phosphorylierung von BAG3 war somit nicht direkt über einen Antikörper detektierbar. In den Zelllysaten mit CalA- oder OA-Behandlung kam es jedoch für BAG3 zu einer Veränderung des apparativen Molekulargewichts im SDS-Gel (Abbildung 5-1). Dieser *shift* konnte als Indiz für die Phosphorylierung von BAG3 genutzt werden. Der Einsatz von CalA und OA führte zu einer Phosphorylierung von

BAG3. Das bedeutet, dass dauerhaft Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse stattfinden. Durch die Inhibitoren entfallen die Dephosphorylierungen, sodass BAG3 phosphoryliert vorliegt. Dies lässt auch darauf schließen, dass BAG3 von PP1 oder PP2a dephosphoryliert wird, da die eingesetzten Inhibitoren spezifisch für diese Phosphatasen sind. Da Calyculin A in geringerer Konzentration wirksamer war als Okadasäure, wurde dieser Inhibitor für weitere Experimente ausgewählt.

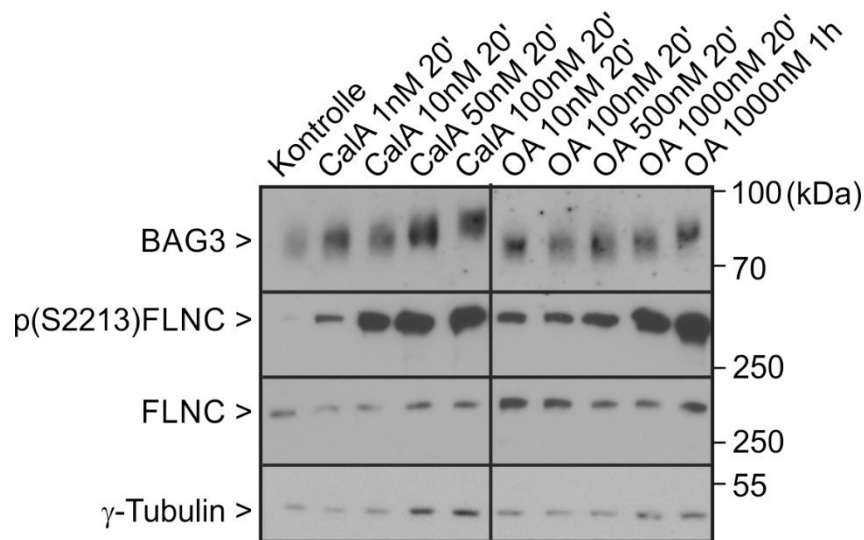


Abbildung 5-1: PP1 und PP2a sind verantwortlich für die Dephosphorylierung von BAG3.

A7r5-Zellen wurden mit Calyculin A (CalA) oder Okadasäure (OA) zur Inhibition von PP1 und PP2a in angegebener Konzentration und Zeitspanne behandelt. Nach der Lyse erfolgte die Detektion der angegebenen Proteine (40 µg pro Spur) durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. Durch die Inhibition der Phosphatasen kam es zu einer verstärkten Phosphorylierung von BAG3, die zu einem veränderten Laufverhalten im SDS-Gel führt, welches sich durch einen *shift* erkennen lässt.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die vollständige Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von BAG3 auf die Formierung des CASA-Komplexes auswirkt. Dazu wurde eine Immunopräzipitation von BAG3 nach der Behandlung mit Phosphatase oder Calyculin A durchgeführt. Eingesetzt wurden HeLa-Zellen, humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Die HeLa-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode mit FLAG-BAG3 transfiziert und für 72 h kultiviert. Die Probe, die vollständig phosphoryliert sein sollte, wurde 10 min vor der Lyse mit

20 nM CalA behandelt. Dies entsprach dem Literaturwert (Zhu et al., 1996). Die Probe, bei der BAG3 vollständig dephosphoryliert sein sollte, wurde mit λ -Phosphatase behandelt. Nach der Lyse und dem Einstellen der Proteinkonzentration erfolgte die Phosphatasebehandlung für 30 min bei 30 °C. Anschließend wurde FLAG-BAG3 an M2-Agarose gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurden die Proteinkomplexe eluiert. Im anschließenden Western Blot zeigte sich dabei unter vollständiger Phosphorylierung, also in den Calyculin A-behandelten Zellen, der Verlust der Bindung von BAG3 zu HSPB8 und CHIP (Abbildung 5-2). Die Phosphorylierung und damit die Aktivität des Phosphataseinhibitors konnte dabei durch den *shift* der BAG3-Bande bestätigt werden. Die Bindung von HSPB8 und CHIP an BAG3 ist somit abhängig vom Phosphorylierungsstatus von BAG3. Bei vollständiger Phosphorylierung von BAG3 kommt es nicht mehr zur Bindung, der CASA-Komplex bildet sich somit nur unvollständig aus.

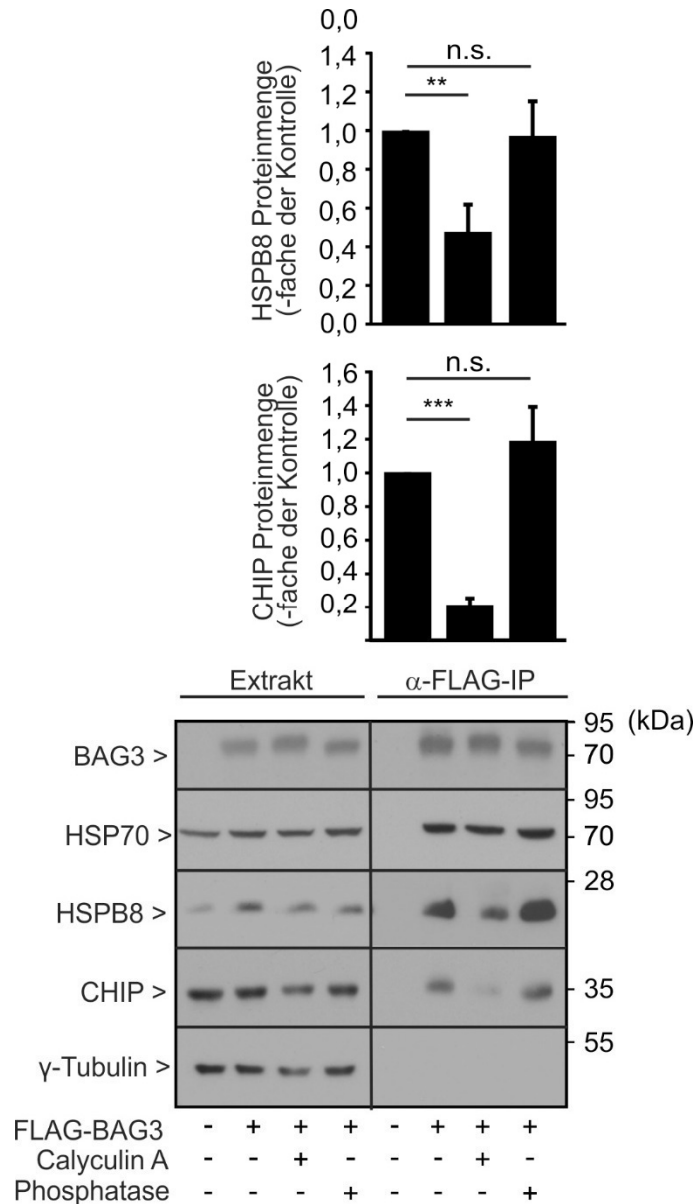


Abbildung 5-2: Phosphorylierung von BAG3 führt zum Verlust der Bindung von BAG3 an HSPB8 und CHIP

HeLa-Zellen wurden transient mit FLAG-BAG3 kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Wenn angegeben wurden die Zellen mit Calyculin A (20 nM, 10 min vor der Lyse) zur Inhibition von PP1 und PP2a oder mit Phosphatase (30 min, 30 °C nach der Lyse) behandelt. Anschließend erfolgte eine Immunopräzipitation der Proteinkomplexe über das FLAG-Epitop (α-FLAG). Die aufgereinigten Proteine wurden mit einem Glycin-haltigen Puffer eluiert. Die Detektion der angegebenen Proteine (40 µg pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. In der Probe, die mit Calyculin A behandelt wurde und somit phosphoryliert ist, geht die Bindung von BAG3 zu HSPB8 größtenteils verloren. Auch die Bindung von BAG3 zu CHIP ist deutlich verringert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardfehler, n ≥ 5, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, n.s = nicht signifikant.

5.2 Einfluss der konservierten Phosphorylierungsstellen von BAG3 auf die Formierung des CASA-Komplexes

Neben der vollständigen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 sollten auch Phosphorylierungsstellen spezifisch untersucht werden. Dabei wurden die Phosphorylierungsstellen von BAG3, die unter mechanischer Belastung reguliert und zwischen Mensch und Maus konserviert sind (Tabelle 2-1), genauer analysiert. Diese Phosphorylierungsstellen sind Serin264 (S264), Serin279 (S279) und Threonin285 (T285). Zusätzlich wurde eine Doppelmutante Threonin285/Serin289 generiert. Serin289 (S289) konnte im humanen Muskel als mechanisch reguliert nachgewiesen werden. In der Maus liegt hier ein Cystein und somit keine Phosphorylierungsstelle vor. Trotzdem ist diese Phosphorylierungsstelle von Interesse. Die beiden Phosphorylierungsstellen T285 und S289 liegen sehr nah beieinander. Deshalb ist anzunehmen, dass sie gemeinsam reguliert werden. Die Mutanten beruhten auf einem Aminosäureaustausch der Phosphorylierungsstellen. Es wurde jeweils eine Mutante (Alanin), die die Dephosphorylierung nachstellt, und eine Mutante mit Phosphorylierungsmimikry (Asparaginsäure) generiert. Durch Calciumphosphat-Transfektion wurden FLAG-BAG3 sowie die FLAG-BAG3-Mutanten in HeLa-Zellen überexprimiert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Zelllyse und die Immunopräzipitation der CASA-Komplexe durch Bindung an M2-Agarose. Nach einigen Waschschrritten wurden die Proteinkomplexe eluiert und durch TCA-Fällung ankonzentriert. Im Western Blot wurden die Proteinkomplexe dann durch spezifische Antikörper detektiert und quantifiziert. Analysiert wurden jeweils BAG3, CHIP, HSP70 und HSPB8 als Komponenten des CASA-Komplexes. Dabei zeigte sich, dass die sowohl in der Maus als auch human konservierten Phosphorylierungsstellen S264, S279 und T285 einzeln keinen Effekt auf die Bindung von BAG3 an die Interaktionspartner HSPB8, HSP70 und CHIP haben (Abbildung 5-3).

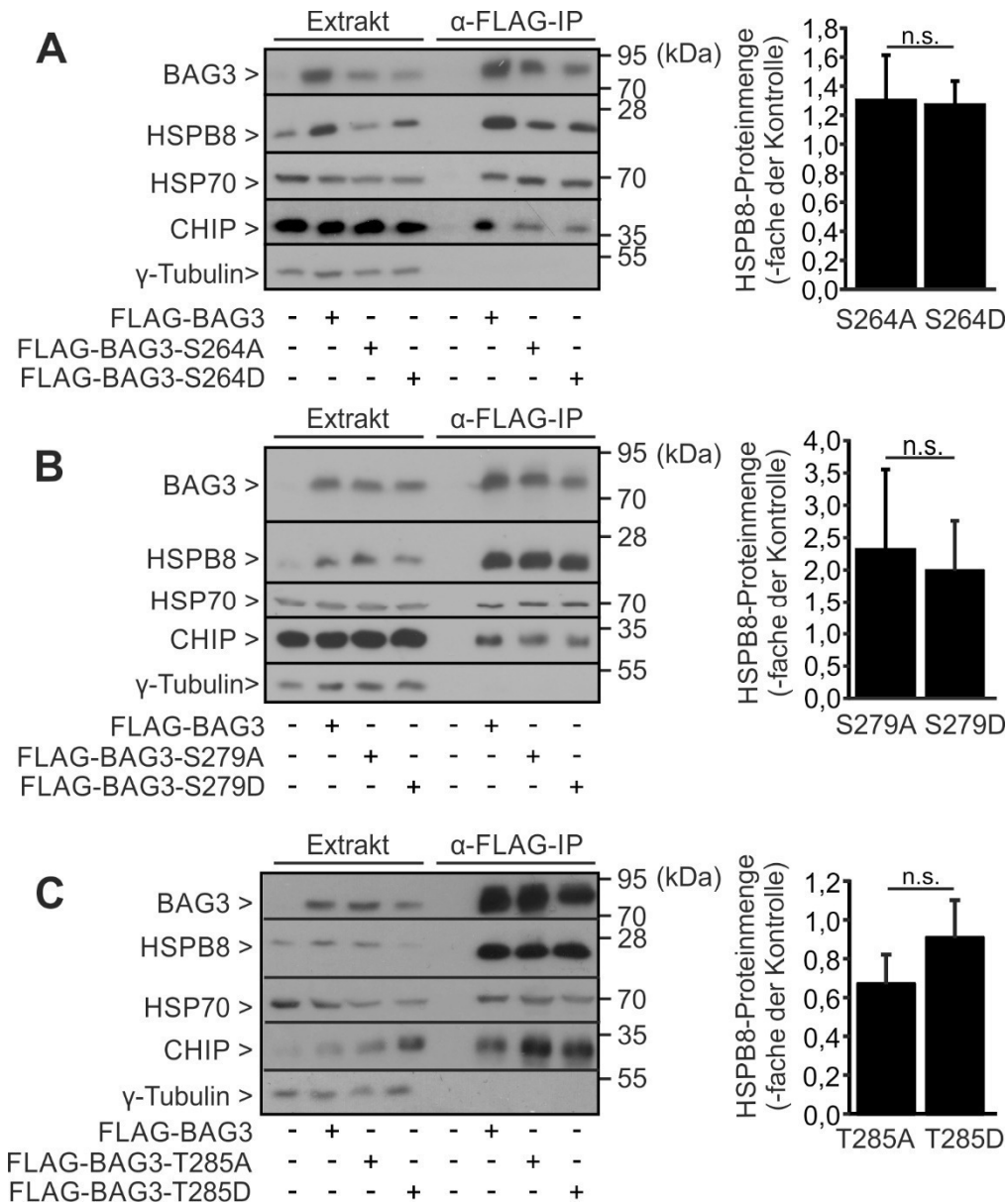


Abbildung 5-3: Phosphorylierungsmimikry an den Resten BAG3-S264, BAG3-S279 und BAG3-S264 beeinflusst die Bindung von BAG3 an HSPB8, CHIP und HSP70 nicht.

HeLa-Zellen wurden transient mit FLAG-BAG3 oder den für die entsprechenden Mutanten kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte eine Immunopräzipitation der Proteinkomplexe über das FLAG-Epitop (α-FLAG). Die aufgereinigten Proteine wurden mit einem Glycin-haltigen Puffer eluiert. Die Detektion der angegebenen Proteine (40 µg pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. n ≥ 5, n.s. = nicht signifikant. A) Transfiziert wurden BAG3, BAG3-S264A und BAG3-S264D. Es ist kein Unterschied der Mutanten in der Bindung von HSPB8, HSP70 und CHIP erkennbar. B) Transfiziert wurden FLAG-BAG3, FLAG-BAG3-S279A und FLAG-BAG3-S279D. Auch hier zeigen die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung im Bezug auf die Bindung von HSPB8, HSP70 und CHIP. C) Auch bei der

Expression von FLAG-BAG3, FLAG-BAG3-S285A und FLAG-BAG3-S285D ist kein Unterschied in der HSPB8-, HSP70- und CHIP-Bindung erkennbar.

Die drei konservierten Phosphorylierungsstellen wurden ebenfalls als Dreifachmutante untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression dieser Dreifachmutante in dephosphorylierter Form (BAG3-T264A/S279A/T285A) zu einem kompletten Verlust der Bindung von BAG3 an HSPB8, HSP70 und CHIP führte (Abbildung 5-4). Bei BAG3-S264D/S279D/T285D kam es ebenfalls zu einer signifikanten Reduzierung der HSPB8-Proteinmenge. Der Effekt der Dephosphorylierung ist überraschend, da es den bisherigen Ergebnissen widerspricht (vgl. Kapitel 5.1). Außerdem kommt es sowohl beim Phosphorylierungsmimikry als auch bei der dephosphorylierten Mutante zu einem Verlust der HSPB8-Bindung. Dies deutet darauf hin, dass es in der Dreifachmutante zu einer Fehlfaltung kam. Deshalb wurde diese Mutante aufgrund ihrer unphysiologischen Konformation nicht weiter analysiert.

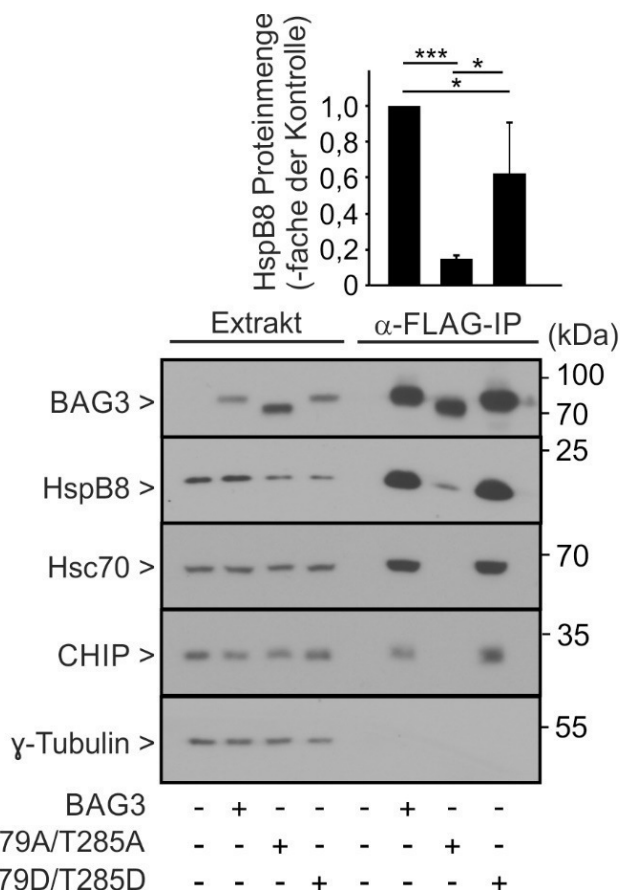


Abbildung 5-4: BAG3-S264/S279/S285 führt zum vollständigen Verlust der Bindung von BAG3 an HSPB8, HSP70 und CHIP.

HeLa-Zellen wurden für transient mit FLAG-BAG3, FLAG-BAG3-T264A/S279A/S285A oder FLAG-BAG3-S265D/S279D/S289D kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte eine Immunopräzipitation der Proteinkomplexe über das FLAG-Epitop (α -FLAG). Die aufgereinigten Proteine wurden mit einem Glycin-haltigen Puffer eluiert. Die Detektion der angegebenen Proteine (40 μ g pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardfehler, n = 3, *p \leq 0,05, ***p \leq 0,001.

Die regulierten Phosphorylierungsstellen Threonin285 und SerinS289 in BAG3 liegen sehr nah beieinander. Aus diesem Grund sollte hier eine Doppelmutante T285/S289 untersucht werden. Bei der Doppelmutante T285A/S289A zeigte sich kein Unterschied zum BAG3-Wildtyp im Bezug auf die Bindung von HSPB8, HSP70 und CHIP. Bei der Doppelmutante T285D/S289D, also dem Phosphorylierungsmimikry, zeigte sich ein Verlust der HSPB8-Bindung (Abbildung 5-5). Der CASA-Komplex wird hier somit nicht vollständig ausgebildet.

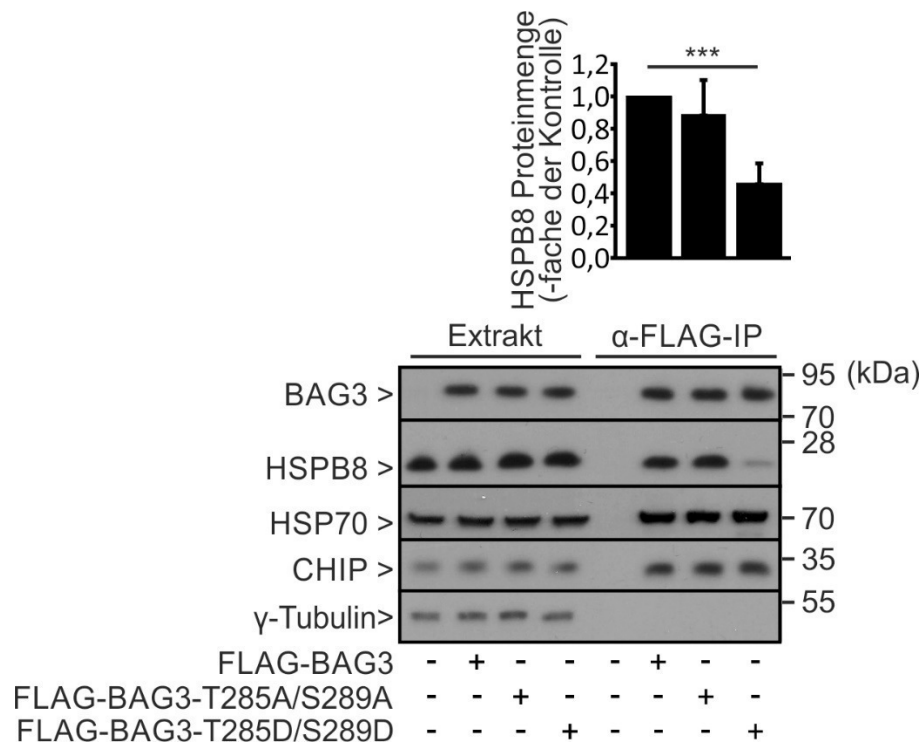


Abbildung 5-5: Die Phosphorylierung von BAG3-T285/S289 führt zum Verlust der HSPB8-Bindung

HeLa-Zellen wurden für transient mit FLAG-BAG3, FLAG-BAG3-T285A/S289A oder FLAG-BAG3-T285D/S289D kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte eine Immunopräzipitation der Proteinkomplexe über das FLAG-Epitop (α-FLAG). Die aufgereinigten Proteine wurden mit einem Glycin-haltigen Puffer eluiert. Die Detektion der angegebenen Proteine (40 µg pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. Für BAG3-T285A/S289A zeigt sich dabei in der Bildung von BAG3 an HSPB8, HSP70 und CHIP kein Unterschied zum BAG3 Wildtyp. Bei der Präzipitation von BAG3-T285D/S289D hingegen ist eine signifikant geringere Bindung von HSPB8 im Vergleich zum BAG3 Wildtyp zu erkennen. Für HSP70 und CHIP ist kein Unterschied in der Bindung erkennbar. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardfehler, n ≥ 5, ***p ≤ 0,001.

Aufgrund des Effekts von BAG3-T285D/S289D sollte auch die Phosphorylierungsstelle Serin289 weiter untersucht werden, obwohl hier in der Maus keine Phosphorylierungsstelle vorliegt. Für BAG3-S289D zeigte sich dabei im Bezug auf die HSPB8-, HSP70- und CHIP-Bindung von BAG3 kein signifikanter Unterschied. Bei der dephosphorylierten Mutante BAG3-S289A war die HSPB8-Menge im Komplex jedoch signifikant reduziert. Hier lagen nur noch 70 % der

Proteinmenge des BAG3-Wildtyps vor. Auch hier kam es somit zu einer Störung des CASA-Komplexes.

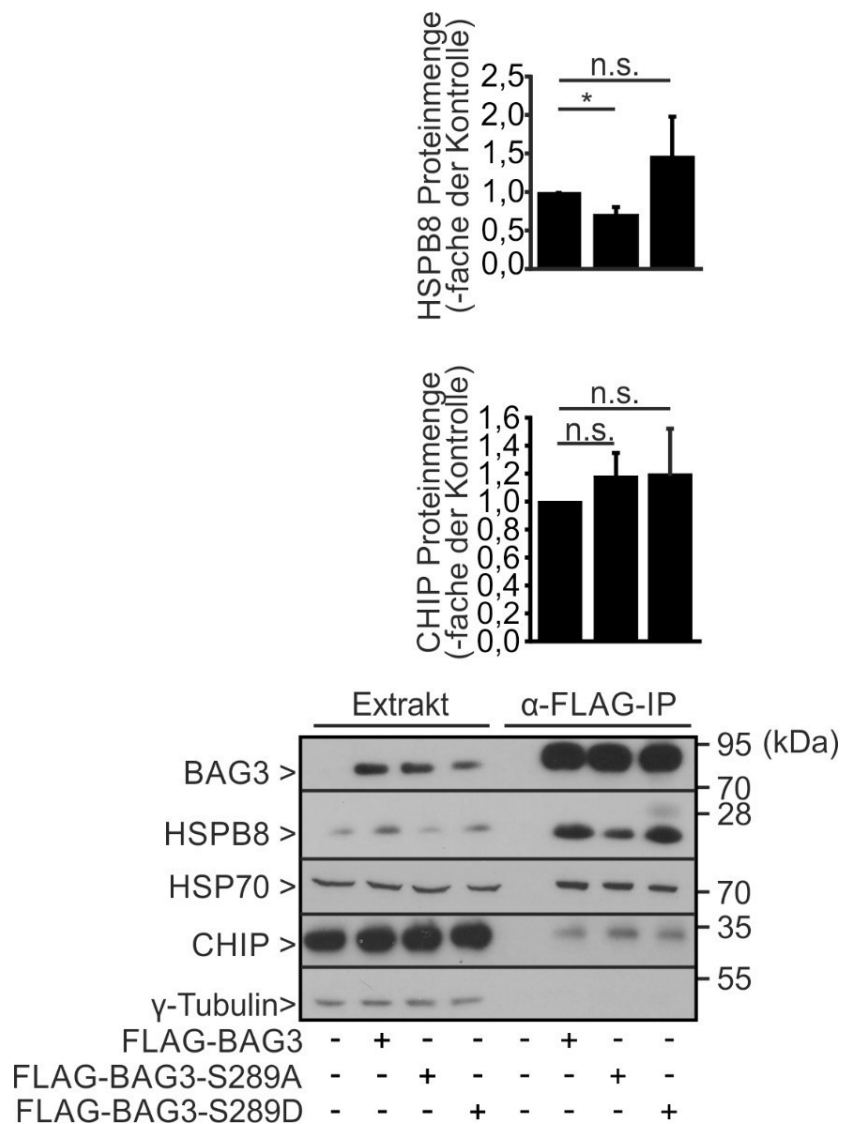


Abbildung 5-6: Die Dephosphorylierung von BAG3-S289 führt zum Verlust der HSPB8-Bindung.

HeLa-Zellen wurden transient mit FLAG-BAG3, FLAG-BAG3- S289A oder FLAG-BAG3-S289D kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte eine Immunopräzipitation der Proteinkomplexe über das FLAG-Epitop (α-FLAG). Die aufgereinigten Proteine wurden mit einem Glycin-haltigen Puffer eluiert. Die Detektion der angegebenen Proteine (40 µg pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. Für BAG3-S289D zeigt sich dabei in der Bildung von BAG3 an HSPB8, HSP70 und CHIP kein Unterschied zum BAG3 Wildtyp. Bei der Präzipitation von BAG3-S289A hingegen ist eine signifikant geringere Bindung von HSPB8 im Vergleich zum BAG3 Wildtyp zu erkennen. Für HSP70 und CHIP ist kein Unterschied in der

Bindung erkennbar. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardfehler, $n \geq 5$, $*p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Um die Effekte der einzelnen Mutanten besser vergleichen zu können, wurde jeweils das Proteinmengenverhältnis zwischen der Überexpression der D- und der A-Mutante berechnet (Abbildung 5-7). Es zeigte sich, dass das D/A-Verhältnis der gebundenen HSPB8-Menge bei BAG3-S279 und BAG3-T285 nicht signifikant von BAG3-S264 abwich. Bei allen drei Phosphorylierungsstellen lag das Verhältnis D/A bei etwa 1,2. Bei BAG3-S289 war das Verhältnis signifikant auf etwa 2,6 erhöht. Bei BAG3-T285/S289 war es dagegen signifikant auf etwa 0,5 reduziert. Dies macht wiederum deutlich, dass es bei der Doppelmutante T285/S289 zu einer deutlichen Reduzierung der HSPB8-Bindung in der D-Mutante kommt. Bei S289 hingegen führt die A-Mutante zu einer Abnahme der HSPB8-Bindung an BAG3. Bei T285D/S289D und S289A ist der CASA-Komplex also nur unvollständig ausgebildet.

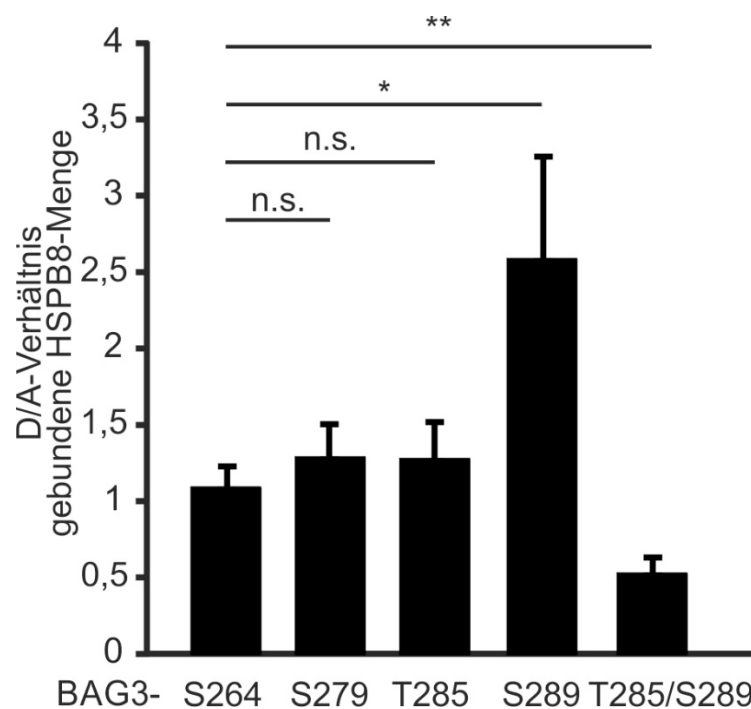


Abbildung 5-7: BAG3-S289A und BAG3-T285D/S289D schwächen die Bindung von BAG3 an HSPB8.

HeLa-Zellen wurden transient mit FLAG-BAG3 mit der für entsprechenden Mutation an der angegebenen Aminosäure kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte

eine Immunopräzipitation der Proteinkomplexe über das FLAG-Epitop (α -FLAG). Die aufgereinigten Proteine wurden mit einem Glycin-haltigen Puffer eluiert. Die Detektion der angegebenen Proteine (40 μ g pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. In dieser Abbildung ist das Verhältnis D/A für die Bindung von BAG3 an HSPB8 dargestellt. Bei BAG3-S289 ist die Bindung an HSPB8 in der S289A-Mutante deutlich reduziert, sodass das D/A-Verhältnis hier bei etwa 2,4 liegt ($p = 0,041$). Bei der Mutante, bei der T285 und S289 mutiert sind, ist die Bindung von BAG3 an HSPB8 in der T285D/S289D-Mutante deutlich reduziert, sodass das Verhältnis D/A hier bei etwa 0,4 liegt ($p = 0,0038$). Für die Phosphorylierungsstellen S264, S279 und T285 zeigt sich dagegen kein großer Unterschied zwischen der A- und der D-Mutante, sodass das Verhältnis nahezu 1 ist. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 5$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n.s. = nicht signifikant.

5.3 Funktionelle Charakterisierung der konservierten Phosphorylierungsstellen von BAG3 anhand des SYNPO2-Abbaus

Um zu überprüfen, ob sich die Veränderung des CASA-Komplexes auf dessen Funktion auswirkt, wurde die CASA-Aktivität über den SYNPO2-Abbau bestimmt. SYNPO2 kooperiert mit BAG3 und rekrutiert eine Membranfusionsmaschinerie, durch die Autophagosomen um die CASA-Komplexe gebildet werden (Ulbricht et al., 2013). Im Rahmen dieser Regulation wird SYNPO2 durch CASA ebenfalls autophagisch abgebaut. Vor der Lyse wurde dem Medium Cycloheximid für 1 bis 4 Stunden zugegeben, um die Proteintranslation zu inhibieren. Bei den für CASA relevanten Isoformen von SYNPO2 handelt es sich um SYNPO2a und SYNPO2b. Zunächst wurde die konservierte Phosphorylierungsstelle BAG3-T285 untersucht. Bei der Überexpression von BAG3 sank die SYNPO2-Proteinmenge nach 4 Stunden Cycloheximid-Behandlung auf etwa 50 % der Proteinmenge der Ausgangsmenge ohne Cycloheximidbehandlung. Für BAG3-T285A war ebenfalls eine vergleichbare Abnahme erkennbar, die sich nicht signifikant vom BAG3-Wildtyp unterscheidet. Bei der Überexpression von BAG3-T285D war hingegen nach 4 Stunden Behandlung keine Abnahme der SYNPO2-Menge im Vergleich zur Ausgangsmenge ohne Cycloheximid-Behandlung erkennbar. Die SYNPO2-Menge war nach 4 Stunden Cycloheximid-Behandlung im Vergleich zum BAG3-Wildtyp signifikant erhöht (Abbildung 5-8). Der SYNPO2-Abbau diente hier zur Analyse der CASA-Aktivität. Der ausbleibende SYNPO2-Abbau bei BAG3-T285D

bedeutet somit, dass der CASA-Komplex hier nicht mehr aktiv war. Deshalb wurde SYNPO2 nicht abgebaut.

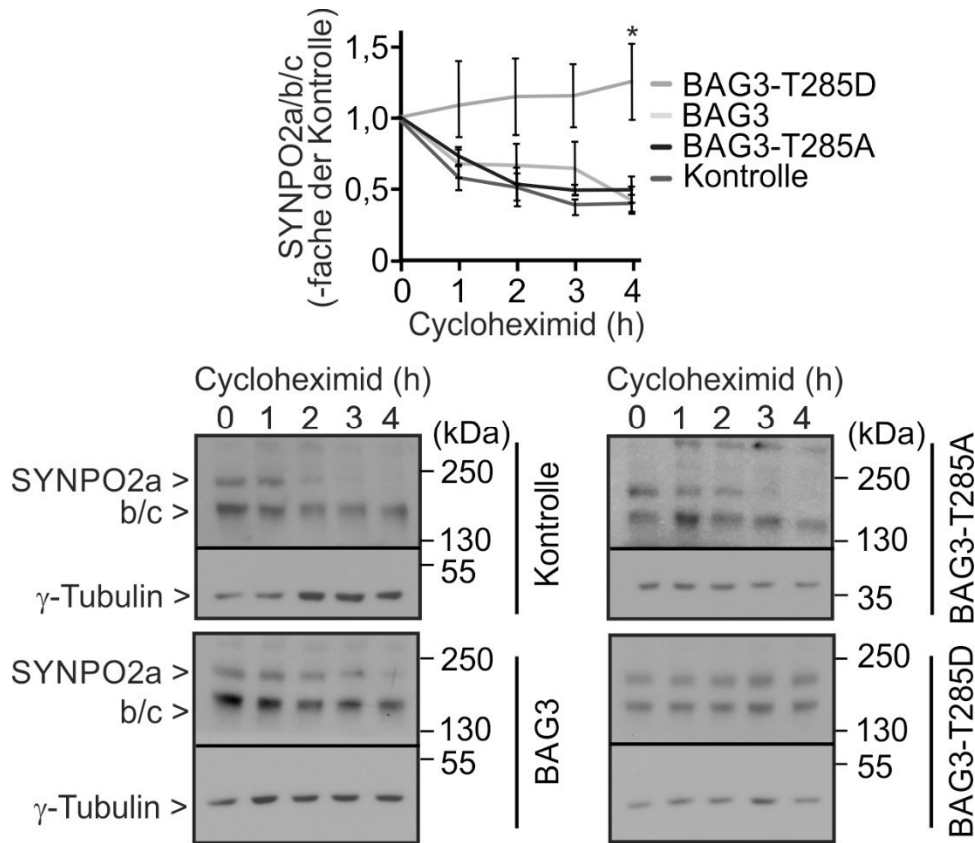


Abbildung 5-8: Bei Phosphorylierung von BAG3-T285 wird SYNPO2 nicht abgebaut.

A7r5-Zellen wurden transient mit FLAG-BAG3, FLAG-BAG3-T285A oder FLAG-BAG3-T285D kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Behandlung mit Cycloheximide (50 μ M, 1 – 4 h) und die Zellyse. Die Detektion der angegebenen Proteine (60 μ g pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. Durch den Einsatz von CHX kann der Abbau von SYNPO2 nachvollzogen werden. Bei der BAG3-T285D-Mutante findet kein Abbau von SYNPO2 statt, wohingegen der Abbau bei BAG3-T285A im Vergleich zum BAG3-Wildtyp unverändert ist. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 5$, $*p \leq 0,05$.

Neben der konservierten Phosphorylierungsstelle BAG3-T285 wurde auch die Doppelmutante BAG3-T285/S289 untersucht, da diese einen Effekt auf die Bindung von BAG3 an HSPB8 zeigte. Deshalb war anzunehmen, dass auch die Funktion der CASA-Maschinerie eingeschränkt war. Bei der Überexpression von BAG3 war die SYNPO2-Proteinmenge nach 3 Stunden Cycloheximid-Behandlung auf etwa 30 % reduziert. Der Wert bezieht sich auch hier auf die Ausgangsproteinmenge ohne

Cycloheximidbehandlung. Für BAG3-T285A/S289A war ebenfalls eine vergleichbare Abnahme erkennbar, die sich nicht signifikant vom BAG3-Wildtyp unterschied. Bei der Überexpression von BAG3-T285D/S289D war hingegen nach 3 Stunden Behandlung keine Abnahme der SYNPO2-Menge im Vergleich zur Ausgangsmenge ohne Cycloheximid-Behandlung erkennbar. Die SYNPO2-Menge war nach 3 Stunden Cycloheximid-Behandlung im Vergleich zum BAG3-Wildtyp signifikant erhöht (Abbildung 5-9). Auch hier deutet der fehlende SYNPO2-Abbau auf eine verminderte Funktion des CASA-Komplexes durch die Überexpression von BAG3-T285D/S289D hin.

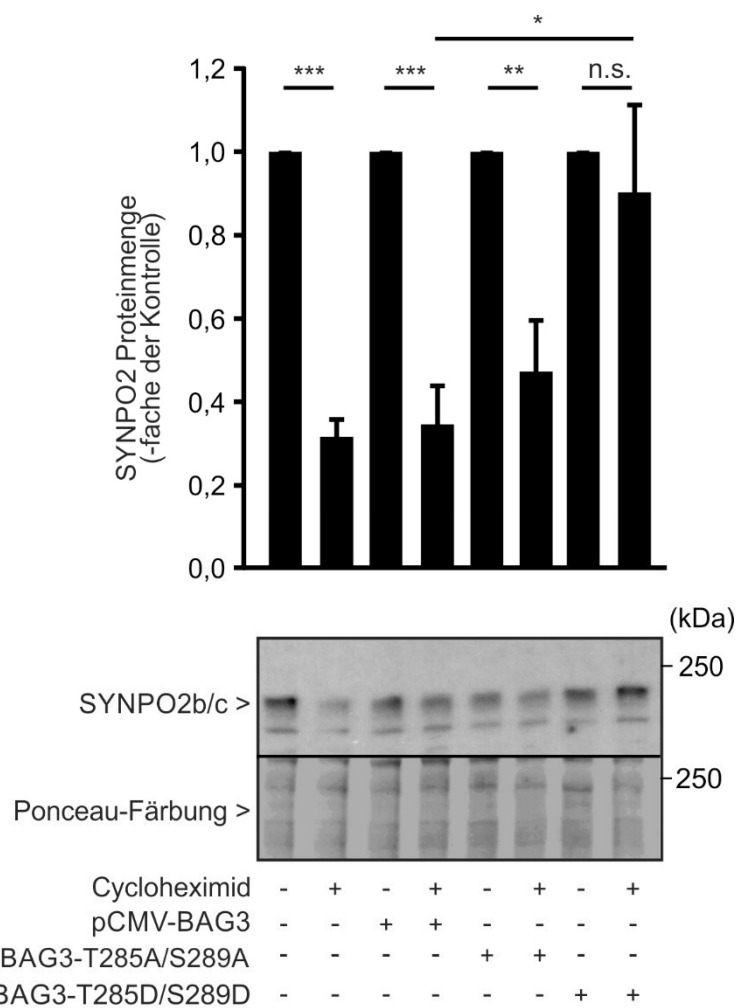


Abbildung 5-9: Bei Phosphorylierung von BAG3-T285/S289 wird SYNPO2 nicht abgebaut.

A7r5-Zellen wurden transient mit FLAG-BAG3, FLAG-BAG3-T285A/S289A oder FLAG-BAG3-T285D/S289D kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Behandlung mit Cycloheximide (50 µM, 3 h) und die Zellyse. Die Detektion der angegebenen Proteine (60 µg pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. Durch den Einsatz von CHX kann der Abbau von SYNPO2 nachvollzogen werden. Bei der BAG3-

T285D/S289D-Mutante findet im Gegensatz zum BAG3-Wildtyp kein Abbau von SYNPO2 statt, wohingegen der Abbau bei BAG3-T285A/S289A unverändert ist. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardfehler, $n \geq 5$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s = nicht signifikant.

Um zu überprüfen, ob auch eine der anderen konservierten Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die Funktion des CASA-Komplexes hat, wurde auch für BAG3-S264D, BAG3-S279D und BAG3-S289D der Einfluss auf den SYNPO2-Abbau untersucht. Da in den vorangegangenen Experimenten nur die Mutanten mit dem Phosphorylierungsmimikry einen Effekt auf die CASA-Aktivität zeigten, wurden auch hier die D-Mutanten untersucht. Bei der Überexpression von BAG3 war die SYNPO2-Proteinmenge nach 3 Stunden Cycloheximid-Behandlung auf etwa 35 % reduziert. Der Wert bezieht sich dabei auf die Ausgangsmenge ohne Cycloheximidbehandlung. Für BAG3-S264, BAG3-S279 und BAG3-S289 war ebenfalls eine vergleichbare Abnahme erkennbar, die sich nicht signifikant vom BAG3-Wildtyp unterschied. (Abbildung 5-10). Somit hatte keine dieser Mutanten einen Einfluss auf die CASA-Aktivität, da SYNPO2 in allen Fällen abgebaut wurde.

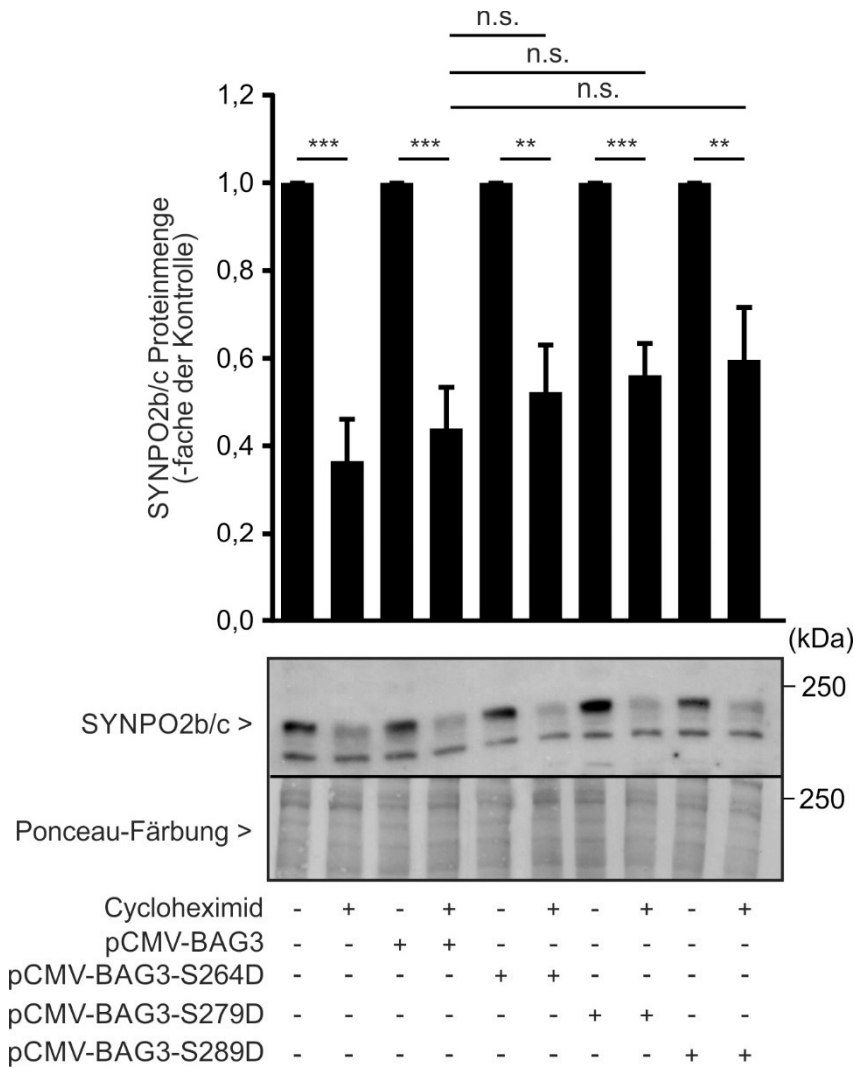


Abbildung 5-10: Die Phosphorylierung von BAG3-S264, BAG3-S279 und BAG3-S289 zeigt keinen Einfluss auf den SYNPO2-Abbau.

A7r5-Zellen wurden transient mit FLAG-BAG3, FLAG-BAG3-S264D, FLAG-BAG3-S279D oder FLAG-BAG3-S289D kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Behandlung mit Cycloheximide (50 μ M, 3 h) und die Zellyse. Die Detektion der angegebenen Proteine (60 μ g pro Spur) erfolgte durch Western Blot unter Einsatz entsprechender Antikörper. Durch den Einsatz von CHX kann der Abbau von SYNPO2 nachvollzogen werden. Bei den hier untersuchten Mutanten zeigt sich im Bezug auf den SYNPO2-Abbau kein Unterschied zum BAG3-Wildtyp. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardfehler, $n \geq 5$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, n.s = nicht signifikant.

6 Diskussion

6.1 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3

Phosphorylierungen sind als posttranslationale Modifikationen essentiell für die Funktion vieler Proteine (Ardito et al., 2017). So konnten bereits in verschiedenen Zelltypen phosphorylierte Proteine mit wichtigen Funktionen identifiziert werden. In Neuronen dient die Phosphorylierung der Reaktion auf extrazelluläre Signale (Johnson et al., 1971; Walaas and Greengard, 1991). In Muskelzellen ist die Kontraktion abhängig von der Phosphorylierung von Myosin, was sowohl in Glattmuskelzellen als auch in Skelettmuskelzellen gezeigt werden konnte (Chitano et al., 2017; Vandenboom, 2017). Auch die Regulation von Bindedomänen ist von Phosphorylierungen abhängig. So ist für die Funktion der PDZ-Domäne, die in Säugetieren am häufigsten vorkommt, der Phosphorylierungsstatus entscheidend (Cao et al., 1999). Die Phosphorylierungen sind dabei reversibel und die Proteine können durch Phosphatasen wieder dephosphoryliert werden.

Für das Cochaperon BAG3 konnten bereits einige Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die bei mechanischer Belastung reguliert sind (Hoffman et al., 2015; Warscheid and Fürst, unpubliziert). Diese Phosphorylierungsstellen liegen bei mechanischer Belastung fast alle dephosphoryliert vor. Zwei dieser Phosphorylierungsstellen, T285 und S289, wurden bereits hinsichtlich ihrer Funktion unter oxidativem Stress in A172-Zellen, humanen Glioblastom-Zellen, untersucht (Kim et al., 2016). Bei Depletion der Phosphorylierungsstellen stieg die Sensitivität der Zellen im Bezug auf den H₂O₂-induzierten Zelltod signifikant an. Gleichwertige Studien der konservierten Phosphorylierungsstellen in Bezug auf mechanischen Stress liegen noch nicht vor.

Der Einfluss von mechanischem Stress auf den Phosphorylierungsstatus von Proteinen wurde in der Literatur jedoch bereits beschrieben. So kommt es bei mechanischem Stress in Kardiomyozyten zur Aktivierung verschiedener Kinasen und der damit verbundenen Phosphorylierungskaskade (Yamazaki et al., 1993, 1995). Neben den Muskeln ist auch der Knorpel stark von mechanischer Belastung betroffen. In Chondrozyten wird bei mechanischem Stress durch Phosphorylierung die Proliferation und Matrixsynthese induziert (Liang et al., 2017). Auch Zellen des

Nucleus pulposus, des Gallertkerns der Bandscheibe, reagieren auf mechanischen Stress. Die Phosphorylierung reguliert hier die Migration der Zellen und die Ausbildung der Extrazellulären Matrix (Gao et al., 2016).

Auch die Dephosphorylierung von Proteinen bei mechanischem Stress wurde bereits beschrieben. So wird in murinen Skelettmuskelzellen die regulatorische leichte Kette des Myosins dephosphoryliert (Takemoto et al., 2015). Myosin ist neben Aktin ein wichtiger Bestandteil der kontraktilen Einheit des Muskels. In Kardiomyoblasten kommt es unter mechanischem Stress zur Dephosphorylierung verschiedener Proteine, wie z.B. Titin durch PP5 (Krysiak et al., 2018). Titin ist als Teil des Sarkomers entscheidend für die Funktion des Muskels. Eine gestörte Funktion von Titin hat Myopathien zur Folge (Ware and Cook, 2018). All diese Zelltypen vereint ihre Funktion, mechanische Belastung zu kompensieren.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von BAG3 einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung des CASA-Komplexes hat. Dabei wurde zum einen die komplette Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von BAG3 untersucht. Zum anderen wurden spezifische Phosphorylierungsstellen, die bereits als reguliert unter mechanischer Belastung beschrieben wurden, anhand von Punktmutationen betrachtet. Die vollständige Phosphorylierung von BAG3 inhibiert die Bildung des CASA-Komplexes.

Unter oxidativem Stress reguliert die Phosphorylierung von BAG3 den Transport von HSF1 in den Zellkern (Kim et al., 2016). Gleichwertige Studien zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 unter mechanischem Stress liegen noch nicht vor. Das Cochaperon BAG3 vermittelt unter mechanischem Stress den Abbau von Filamin über die Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) (Arndt et al., 2010; Ulbricht et al., 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von BAG3 entscheidend für die Bildung des CASA-Komplexes bei mechanischem Stress ist. Eine vollständige Phosphorylierung von BAG3, induziert durch den Phosphataseinhibitor Calyculin A, führt zu einem Verlust der HSPB8- und CHIP-Bindung. BAG3 bindet HSPB8 direkt über seine beiden IPV-Motive (Fuchs et al., 2010; Rauch et al., 2017).

CHIP wird hauptsächlich indirekt über HSP70 gebunden, das über seine ATPase-Domäne an die BAG-Domäne bindet (Arndt et al., 2007; Sondermann et al., 2001).

CHIP kann aber auch direkt an BAG3 binden (Arndt et al., 2010). Die HSP70-Bindung von BAG3 ist durch die Phosphorylierung von BAG3 nicht beeinträchtigt (Abbildung 5-2). Somit ist anzunehmen, dass die direkte Bindung von CHIP an BAG3 durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 reguliert ist. Der Effekt des Phosphataseinhibitors Calyculin A ist jedoch nicht auf die Phosphorylierung von BAG3 begrenzt. Auch andere Proteine liegen möglicherweise stärker phosphoryliert vor, was einen Einfluss auf Proteinbindungen haben kann. Die BAG3-HSP70-Bindung ist hier nicht gestört. Es liegen somit keine Veränderungen auf Seiten von HSP70 oder zumindest nicht in der ATPase-Domäne von HSP70 vor. CHIP hingegen wird nicht mehr in den CASA-Komplex rekrutiert. Hier könnte es aufgrund der vermehrten Phosphorylierung durch die Behandlung mit Calyculin A zu Konformationsänderungen gekommen sein, die eine Bindung von CHIP an HSP70 einschränken.

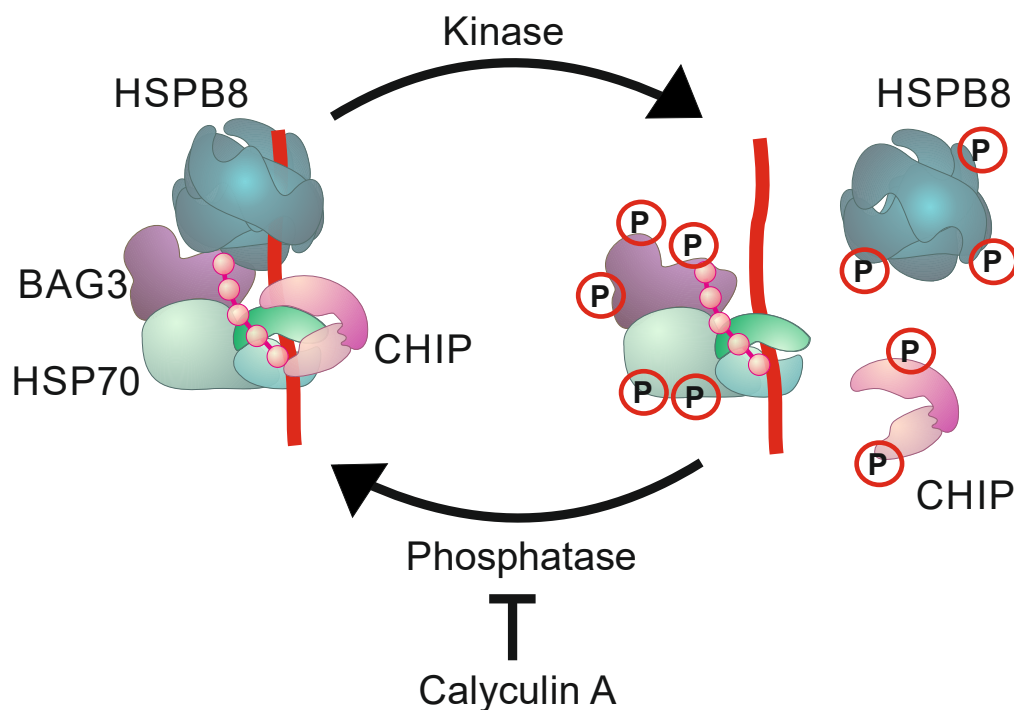


Abbildung 6-1: Die vollständige Phosphorylierung von BAG3 führt zum Verlust der HSPB8- und CHIP-Bindung. BAG3 unterliegt einer ständigen Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch Kinasen und Phosphatasen. HSPB8 und CHIP sind essentielle Bestandteile des CASA-Komplexes. Durch die Behandlung mit Calyculin A und damit vollständige Phosphorylierung von BAG3 kommt es nicht mehr zur Rekrutierung von HSPB8 und CHIP (modifiziert nach Ulbricht et al., 2013).

Fehlen die einzelnen Komponenten des CASA-Komplexes, kann dies einen Einfluss auf seine Funktion haben. So kooperiert HSPB8 mit BAG3 in der Proteostase und in der Organisation von Stressgranula (Ganassi et al., 2016). Stressgranula sind Aggregate nicht translatierender Ribonucleoproteine (mRNPs). Sie bilden sich aus mRNAs, die bei der Translation übrig bleiben und von Proteinen gebunden werden (Protter and Parker, 2016). Die Stressgranula werden nur zu einem sehr geringen Teil über das Proteosom abgebaut. Für den restlichen Abbau ist ein intakter HSPB8-BAG3-HSP70-Komplex notwendig (Ganassi et al., 2016). Das bedeutet, dass hier der Abbau der Stressgranula nicht mehr möglich ist, weil HSPB8 im Komplex fehlt. Die Akkumulation dieser Stressgranula spielt eine Rolle bei verschiedenen Krankheiten, wie der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und der Frontotemporalen Demenz (FTD), der Demenzform, die bei unter 65-jährigen am zweithäufigsten auftritt (Li et al., 2013; Zhang et al., 2019).

Auch das Fehlen von CHIP im CASA-Komplex hat Auswirkungen auf seine Funktionalität. CHIP ist als Ubiquitin-Ligase entscheidend für die Ubiquitinierung von fehlgefalteten Proteinen, die dem Abbau zugeführt werden sollen (Arndt et al., 2007). Durch die Ubiquitinierung werden die Proteine für verschiedene Abbauege markiert, wie den proteasomalen Abbau und Autophagie (Arndt et al., 2010; Connell et al., 2001). In *D. melanogaster*, *C. elegans* und humanen Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass CHIP durch die Regulation des Abbaus des Insulinrezeptors einen Einfluss auf die Proteostase und das Altern hat (Tawo et al., 2017). Während des Alterns treten vermehrt fehlgefaltete Proteine auf. Dadurch wird die Kapazität von CHIP für den Abbau des Insulinrezeptors eingeschränkt. Der Insulinrezeptor ist wichtig für den Insulin/*insulin-like growth factor 1* (IGF-I)-Signalweg. Die Funktion dieses Signalwegs ist entscheidend für ein langes Leben (Barbieri et al., 2003). Wenn CHIP im CASA-Komplex fehlt, ist die Ubiquitinierung der fehlgefalteten Proteine nicht mehr möglich. Durch die fehlende Markierung kann kein Abbau der Substratproteine mehr stattfinden. BAG3 spielt nicht nur in der CASA-Maschinerie eine entscheidende Rolle für die Regulation unter mechanischem Stress. Es ist außerdem für die Regulation der Transkription und Translation essentiell. BAG3 sorgt für die Aktivierung von YAP/TAZ, das dann in den Zellkern wandert und die Transkription von Filamin initiiert (Salah and Aqeilan, 2011; Sudol and Harvey,

2010; Ulbricht et al., 2013). Außerdem bindet BAG3 den TSC-Komplex am Cytoskelett, wodurch mTOR im Cytoplasma aktiv vorliegt und die Translation von Filamin initiieren kann (Kathage et al., 2017). Hier wäre es interessant zu untersuchen, wie sich die regulierten Phosphorylierungsstellen in BAG3 auf die YAP/TAZ-Aktivierung und die mTOR-Regulierung auswirken.

PP1 und PP2a sind wichtige Ser/Thr-Phosphatasen in eukaryotischen Zellen (Ceulemans and Bollen, 2004; Eichhorn et al., 2007). Calyculin A ist ein selektiver Inhibitor für diese Phosphatasen. Die effektive Inhibition der Dephosphorylierung durch Calyculin A zeigt, dass BAG3 durch PP1 und/oder PP2a dephosphoryliert wird. Beide regulieren die Zellteilung und sind deshalb entscheidend für die Tumorsuppression. In Krebszellen wurden erhöhte BAG3-Level nachgewiesen, die dem Tumor das Überleben sichern, für Wachstum oder sogar die Resistenz gegen Chemotherapie sorgen (Stürner and Behl, 2017). Hier könnte die Regulierung von BAG3 durch PP1 und PP2a eine Rolle spielen.

6.2 Regulierung des Phosphorylierungsstatus von BAG3 bei mechanischer Belastung

BAG3 ist ein essentieller Bestandteil des CASA-Komplexes und damit wichtig für den Erhalt der Proteostase. CASA spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Stressantwort der Zelle bei mechanischer Belastung. Deswegen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie sich die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von BAG3 an den konservierten Phosphorylierungsstellen auf die Bildung des CASA-Komplexes und dessen Funktion auswirkt.

Das Cochaperon BAG3 besitzt verschiedene Phosphorylierungsstellen. Für einen Teil dieser Phosphorylierungsstellen konnte bereits eine Regulierung unter mechanischer Belastung gezeigt werden (Hoffman et al., 2015; Warscheid and Fürst, unpubliziert). Einige dieser Phosphorylierungsstellen sind sowohl human als auch in der Maus konserviert. Dies spricht dafür, dass sie essentiell für die Mechanoregulation von BAG3 sind. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf die konservierten Phosphorylierungsstellen fokussiert.

Die konservierten Phosphorylierungsstellen sind Serin264, Serin279 und Threonin285. Es wurde jeweils eine Mutante mit einem Aminosäureaustausch zu

Alanin, das nicht phosphoryliert werden kann, oder einem Austausch zu Asparaginsäure als Phosphorylierungsmimikry generiert. Für diese Mutanten mit nur einer veränderten Aminosäure konnten keine Auswirkungen auf die Bildung des CASA-Komplexes gezeigt werden. Aus diesem Grund sollte auch eine Dreifachmutante BAG3-S264/S279/T285 untersucht werden. Es wurde dabei angenommen, dass die Phosphorylierungsstellen zusammen reguliert sind und deswegen einzeln keinen Effekt zeigen. Deshalb wurde auch mit diesen Dreifachmutanten eine Immunopräzipitation durchgeführt, um das Bindevverhalten von BAG3 an HSPB8, CHIP und HSP70 zu untersuchen. Aufgrund der anzunehmenden gemeinsamen Regulierung wurden eine dreifach dephosphorylierte Mutante und eine Mutante mit drei Phosphorylierungsmimikrys generiert. Bei der Immunopräzipitation zeigte sich jedoch, dass die Mutante BAG3-S264A/S279A/S285A keinen der Interaktionspartner des CASA-Komplexes mehr binden konnte. Auch bei BAG3-S264D/S279D/S285D kam es zu einer signifikanten Reduzierung der HSPB8-Bindung. Aufgrund dieses unspezifischen Verlusts der Bindung wurde angenommen, dass die Konformationsänderung dieser Phosphorylierungsmutanten sehr unphysiologisch ist. Deswegen wurde diese Mutante im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr berücksichtigt.

Besonders betrachtet wurden auch die Phosphorylierungsstellen T285 und S289, da sie sehr nah beieinander liegen. Die Mutante BAG3-T285 zeigte zwar als Einzelmutante keinen Effekt, allerdings kam es bei der Doppelmutante BAG3-T285/S289 zu einer signifikanten Abnahme der HSPB8-Bindung in der Mutante BAG3-T285D/S289D, also in der phosphorylierten Form. Dies zeigt, dass die Phosphorylierungsstelle S289 aufgrund der Nähe der beiden Phosphorylierungsstellen ebenfalls essentiell für die Regulation der Bildung des CASA-Komplexes ist. Deswegen ist ein Effekt nur in der Doppelmutante erkennbar, und nicht bei BAG3-T285. Für die Bindung von HSPB8 und somit für die Bildung des CASA-Komplexes ist es somit entscheidend, dass sowohl T285 als auch S289 dephosphoryliert ist.

BAG3 bindet HSPB8 über seine beiden IPV-Motive. Diese Motive liegen zwischen den Aminosäuren 87 – 101 und 200 – 213 von BAG3 (Myers et al., 2018). Die mechanisch regulierten Phosphorylierungsstellen befinden sich somit nicht in den

Bindemotiven. Jedoch ist das zweite IPV-Motiv nur 72 Aminosäuren von T285 entfernt. Eine Konformitätsänderung durch eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung an BAG3-T285 und BAG3-S289 könnte also durchaus zu einem regulierten Zugang in den IPV-Motiven führen.

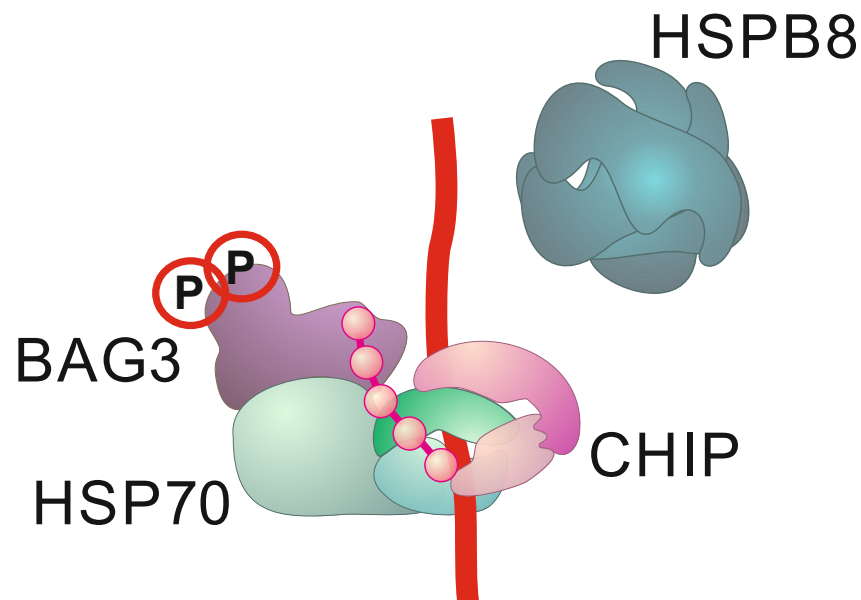


Abbildung 6-2: Die Phosphorylierung von BAG3 an T285 und S289 führt zum Verlust der BAG3-HSPB8-Bindung. Die Formierung des CASA-Komplexes ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus von BAG3. Bei gleichzeitiger Phosphorylierung von BAG3-T285/S289 kommt es zu einem Verlust der Bindung von BAG3 an HSPB8. HSPB8 ist ein essentieller Bestandteil des CASA-Komplexes. Somit wird der CASA-Komplex hier nicht mehr vollständig ausgebildet (modifiziert nach Ulbricht et al., 2013).

6.3 Dephosphorylierung von BAG3-S289A führt zum Verlust der HSPB8-Bindung

Die Phosphorylierungsstelle S289 ist nur human konserviert, in der Maus konnte bis jetzt kein Äquivalent identifiziert werden. Da jedoch ein Effekt für die Doppelmutante BAG3-T285D/S289D gezeigt werden konnte, wurde auch diese Phosphorylierungsstelle einzeln betrachtet. Im Gegensatz zur Doppelmutante BAG3-T285/S289 zeigt die Mutante BAG3-S289 im dephosphorylierten Zustand eine verminderte HSPB8-Bindung. Bei den generierten Mutanten wurde entweder eine Aminosäure eingefügt, die nicht phosphoryliert werden kann (Alanin) oder eine

Aminosäure, die einem Phosphorylierungsmimikry entspricht (Asparaginsäure). Es handelt sich hier also bei der Mutante mit der Asparaginsäure nicht tatsächlich um eine Phosphorylierung. Die Asparaginsäure weist nur eine ähnliche Struktur auf. Deshalb kann sich dem Status der phosphorylierten Aminosäure hier nur angenähert werden. BAG3-S289 zeigt eine verminderte HSPB8-Bindung im dephosphorylierten Zustand, also mit einem Aminosäureaustausch zu Alanin. Dies widerspricht den bisherigen Ergebnissen. Bei der vollständigen Dephosphorylierung von BAG3 durch Phosphatasebehandlung war die Rekrutierung von HSPB8 in den CASA-Komplex nicht gestört (Abbildung 5-2). Die Mutante BAG3-S289A besitzt somit Konformationsänderungen durch den Aminosäureaustausch. Diese Konformationsänderungen stören das strukturelle Arrangement im CASA-Komplex.

6.4 Bei Phosphorylierung von BAG3-T285D/S289D wird SYNPO2 nicht abgebaut

Um zu überprüfen, in wie weit die verminderte HSPB8-Bindung einen Einfluss auf die Funktion des CASA-Komplexes hat, wurde als Parameter der SYNPO2-Abbau genutzt. SYNPO2 kooperiert mit BAG3 und rekrutiert eine Membranfusionsmaschinerie. Durch diese werden Autophagosomen um die CASA-Komplexe gebildet (Ulbricht et al., 2013). Gleichzeitig wird SYNPO2 jedoch durch CASA autophagisch abgebaut. Durch die Verwendung von Cycloheximid als Translationsinhibitor konnte der SYNPO2-Abbau dargestellt und quantifiziert werden (Abbildung 5-9). Es konnte gezeigt werden, dass der Abbau von SYNPO2 bei der Überexpression von BAG3-T285D/S289D signifikant reduziert war. Die Phosphorylierung von T285 und 289 führt somit dazu, dass der CASA-Komplex nicht mehr funktionsfähig ist. Dies entspricht den vorherigen Ergebnissen. Sowohl unter vollständiger Phosphorylierung von BAG3 durch den Phosphataseinhibitor Calyculin A als auch bei Einsatz der Mutante BAG3-T285D/S289D war die HSPB8-Bindung an BAG3 signifikant reduziert. Das bedeutet, dass HSPB8 nicht mehr in den CASA-Komplex rekrutiert wurde. HSPB8 kooperiert mit BAG3 in der Proteostase und ist dabei zuständig für die Erkennung der entfalteten Proteine (Carra et al., 2008b). Wenn HSPB8 im Komplex fehlt, werden die entfalteten Proteine somit nicht erkannt und können nicht selektiv abgebaut werden. Deswegen

kommt es zu einer eingeschränkten CASA-Aktivität und auch SYNPO2 wird nicht mehr abgebaut.

6.5 Phosphorylierung von BAG3-T285 hemmt den Abbau von SYNPO2

Für die Mutante BAG3-T285 konnte kein Effekt auf die HSPB8-Bindung nachgewiesen werden (Abbildung 5-3). Trotzdem zeigt sich bei der Überexpression von BAG3-T285D/S289D ein signifikant verringerter Abbau von SYNPO2 (Abbildung 5-8). Die HSPB8-Bindung scheint somit nicht der einzige Faktor zu sein, der durch die Phosphorylierung von BAG3 reguliert wird und für die Funktionsfähigkeit des CASA-Komplexes entscheidend ist.

Die Mutanten BAG3-S264D, BAG3-S279D und S289D zeigten keine Stabilisierung von SYNPO2, hier war somit kein Unterschied zum BAG3-Wildtyp erkennbar. In diesen Experimenten wurde die D-Mutante, also die Mutante mit dem Phosphorylierungsmimikry, betrachtet. Dies geschah auf der Grundlage dessen, dass nur die D-Mutante zu diesem Zeitpunkt Effekte gezeigt hatte. Für BAG3-S289 zeigte sich jedoch später ein Effekt auf die HSPB8-Bindung bei der dephosphorylierten Form, also BAG3-S289A (Abbildung 5-6). Aus diesem Grund sollte auch diese Mutante in zukünftigen Experimenten in Bezug auf den SYNPO2-Abbau untersucht werden, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich war.

6.6 Ausblick

BAG3 spielt eine Rolle in verschiedenen Krankheiten, wie Myopathien, Krebs oder neurodegenerativen Erkrankungen. Aus diesem Grund ist das Verständnis der Regulierung von BAG3 von großer medizinischer Relevanz. In dieser Arbeit wurde ein weiterer Schritt dahingehend getan. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von BAG3 mit seinen Bindepartnern durch den Phosphorylierungsstatus reguliert wird.

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen sind als posttranslationale Modifikation wichtig für die Aktivität vieler Proteine. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist der Phosphorylierungsstatus von BAG3 entscheidend für die Formation des CASA-Komplexes und seine Funktionsfähigkeit. Es wurden einige grundlegende Experimente dahingehend durchgeführt, jedoch sind noch weitere Untersuchungen notwendig. So konnte noch nicht geklärt werden, warum für die Phosphorylierung von BAG3-T285 zwar kein Effekt auf die BAG3-HSPB8-Bindung gezeigt werden konnte, BAG3-T285D aber trotzdem den SYNPO2-Abbau einschränkt. Außerdem muss noch untersucht werden, wie sich die Überexpression von BAG3-T289A, die zum Verlust der HSPB8-Bindung führt, auf den SYNPO2-Abbau auswirkt.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., and Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*.
- Appella, E., and Anderson, C.W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.*
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., and Muzio, L. Lo (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.*
- Arndt, V., Rogon, C., and Höhfeld, J. (2007). To be, or not to be - Molecular chaperones in protein degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2525–2541.
- Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Saftig, P., Hoch, M., Höhfeld, J., Fürst, D.O., Saint, R., Hesse, M., Wenzel, D., et al. (2010). Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance. *Curr. Biol.* 20, 143–148.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., and Kelly, J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* (80-).
- Barbieri, M., Bonafè, M., Franceschi, C., and Paolisso, G. (2003). Insulin/IGF-I-signaling pathway: An evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*
- Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer.*
- Cao, T.T., Deacon, H.W., Reczek, D., Bretscher, A., and Von Zastrow, M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the β 2-adrenergic receptor. *Nature.*
- Caplan, A.J. (2003). What is a Cochaperone? *Cell Stress Chaperones.*
- Carra, S., Seguin, S.J., Lambert, H., and Landry, J. (2008a). HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 283, 1437–1444.
- Carra, S., Seguin, S.J., and Landry, J. (2008b). HspB8 and Bag3: A new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy.*
- Ceulemans, H., and Bollen, M. (2004). Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button. *Physiol. Rev.*
- Chitano, P., Wang, L., Tin, G.Y.Y., Ikebe, M., Paré, P.D., and Seow, C.Y. (2017). Smooth muscle function and myosin polymerization. *J. Cell Sci.*
- Clark, D.P., and Pazdernik, N.J. (2009). *Molekulare Biotechnologie : Grundlagen und Anwendungen* (Spektrum Akademischer Verlag).
- Clarkson, P.M., and Hubal, M.J. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. In *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, p.
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation - A 25 year update. *Trends Biochem. Sci.*
- Cohen, P.T.W., Philp, A., and Vázquez-Martin, C. (2005). Protein phosphatase 4 - From obscurity to vital functions. *FEBS Lett.*
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Höhfeld, J., and

- Patterson, C. (2001). The Cochaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.*
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. (Sunderland (MA): Sinauer Associates).
- Crippa, V., Sau, D., Rusmini, P., Boncoraglio, A., Onesto, E., Bolzoni, E., Galbiati, M., Fontana, E., Marino, M., Carra, S., et al. (2010). The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum. Mol. Genet.*
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A.B., and Lindquist, S. (2007). Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell.*
- Deek, J., Hecht, F., Rossetti, L., Wißmiller, K., and Bausch, A.R. (2016). Mechanics of soft epithelial keratin networks depend on modular filament assembly kinetics. *Acta Biomater.*
- Deter, R.L., and De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.*
- Ehrlicher, A.J., Nakamura, F., Hartwig, J.H., Weitz, D.A., and Stossel, T.P. (2011). Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature.*
- Eichhorn, P.J.A., Creighton, M.P., Wilhelmsen, K., Van Dam, H., and Bernards, R. (2007). A RNA interference screen identifies the protein phosphatase 2A subunit PR55 γ as a stress-sensitive inhibitor of c-SRC. *PLoS Genet.*
- Esser, C., Alberti, S., and Höhfeld, J. (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1695, 171–188.
- Fuchs, M., Poirier, D.J., Seguin, S.J., Lambert, H., Carra, S., Charette, S.J., and Landry, J. (2010). Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem. J.* 425, 245–255.
- Fujita, M., Mitsuhashi, H., Isogai, S., Nakata, T., Kawakami, A., Nonaka, I., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., Nishino, I., and Kudo, A. (2012). Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Dev. Biol.*
- Gamerding, M., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Clement, A.M., and Behl, C. (2011). BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep.* 12, 149–156.
- Ganassi, M., Mateju, D., Bigi, I., Mediani, L., Poser, I., Lee, H.O., Seguin, S.J., Morelli, F.F., Vinet, J., Leo, G., et al. (2016). A Surveillance Function of the HSPB8-BAG3-HSP70 Chaperone Complex Ensures Stress Granule Integrity and Dynamism. *Mol. Cell.*
- Gao, G., He, J., Nong, L., Xie, H., Huang, Y., Xu, N., and Zhou, D. (2016). Periodic mechanical stress induces the extracellular matrix expression and migration of rat nucleus pulposus cells by upregulating the expression of intergrin α 1 and phosphorylation of downstream phospholipase Cy1. *Mol. Med. Rep.*
- Gautel, M., and Djinović-Carugo, K. (2016). The sarcomeric cytoskeleton: From molecules to motion. *J. Exp. Biol.*
- Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.*
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired

- helical filaments. *J. Biol. Chem.*
- Guerra-Castellano, A., Díaz-Moreno, I., Velázquez-Campoy, A., De La Rosa, M.A., and Díaz-Quintana, A. (2016). Structural and functional characterization of phosphomimetic mutants of cytochrome c at threonine 28 and serine 47. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.*
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 574–581.
- Hoffman, N.J., Parker, B.L., Chaudhuri, R., Fisher-Wellman, K.H., Kleinert, M., Humphrey, S.J., Yang, P., Holliday, M., Trefely, S., Fazakerley, D.J., et al. (2015). Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. *Cell Metab.* **22**, 922–935.
- Höfeld, J., Cyr, D.M., and Patterson, C. (2001). Höfeld et al_2001.pdf. **2**, 885–890.
- Jacobs, A.T., and Marnett, L.J. (2009). HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J. Biol. Chem.*
- Jaggi, M., Rao, P.S., Smith, D.J., Hemstreet, G.P., and Balaji, K.C. (2003). Protein kinase C μ is down-regulated in androgen-independent prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Johnson, G.V.W., and Stoothoff, W.H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J. Cell Sci.*
- Johnson, S.A., and Hunter, T. (2005). Kinomics: Methods for deciphering the kinome. *Nat. Methods.*
- Johnson, E.M., Maeno, H., and Greengard, P. (1971). Phosphorylation of endogenous protein of rat brain by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*
- Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Lüdecke, L., Tapia, V.E., Orfanos, Z., Wenzel, D., Bloch, W., Volkmer, R., Fleischmann, B.K., et al. (2017). The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864**, 62–75.
- Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R., and Höfeld, J. (2010). Chaperone-assisted degradation: Multiple paths to destruction. *Biol. Chem.* **391**, 481–489.
- Kim, H.Y., Kim, Y.S., Yun, H.H., Im, C.N., Ko, J.H., and Lee, J.H. (2016). ERK-mediated phosphorylation of BIS regulates nuclear translocation of HSF1 under oxidative stress. *Exp. Mol. Med.* **48**, e260-10.
- Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., and Hartl, F.U. (2018). Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J. Cell Biol.*
- Klimek, C., Kathage, B., Wördehoff, J., and Höfeld, J. (2017). BAG3-mediated proteostasis at a glance. *J. Cell Sci.* **130**, 2781–2788.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., and Selkoe, D.J. (1986). Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Kostera-Pruszczyk, A., Suszek, M., Płoski, R., Franaszczyk, M., Potulska-Chromik, A., Pruszczyk, P., Sadurska, E., Karolczak, J., Kamińska, A.M., and Rędownicz, M.J.

- (2015). BAG3-related myopathy, polyneuropathy and cardiomyopathy with long QT syndrome. *J. Muscle Res. Cell Motil.*
- Krysiak, J., Unger, A., Beckendorf, L., Hamdani, N., Von Frieling-Salewsky, M., Redfield, M.M., Dos Remedios, C.G., Sheikh, F., Gergs, U., Boknik, P., et al. (2018). Protein phosphatase 5 regulates titin phosphorylation and function at a sarcomere-associated mechanosensor complex in cardiomyocytes. *Nat. Commun.*
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 759–774.
- Leber, Y., Ruparelia, A.A., Kirfel, G., van der Ven, P.F.M., Hoffmann, B., Merkel, R., Bryson-Richardson, R.J., and Fürst, D.O. (2016). Filamin C is a highly dynamic protein associated with fast repair of myofibrillar microdamage. *Hum. Mol. Genet.*
- Levy, R., Gregory, E., Borchers, W., and Daughdrill, G. (2019). p53 phosphomimetics preserve transient secondary structure but reduce binding to Mdm2 and MdmX. *Biomolecules.*
- Li, Y.R., King, O.D., Shorter, J., and Gitler, A.D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J. Cell Biol.*
- Liang, W., Li, Z., Wang, Z., Zhou, J., Song, H., Xu, S., Cui, W., Wang, Q., Chen, Z., Liu, F., et al. (2017). Periodic mechanical stress INDUCES chondrocyte proliferation and matrix synthesis via CaMKII-mediated Pyk2 signaling. *Cell. Physiol. Biochem.*
- Lübke, T., Lobel, P., and Sleat, D.E. (2009). Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*
- Mahboubi, H., and Stochaj, U. (2017). Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* (80-.).
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L., and Terro, F. (2013). Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: The leading role of PP2A. *Ageing Res. Rev.*
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 421–429.
- Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Acevedo-Aquino, M.C., and Williams, S. (2014). Phosphorylation of tau protein at sites Ser396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*
- Moorhead, G.B.G., De Wever, V., Templeton, G., and Kerk, D. (2009). Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem. J.*
- Müller-Esterl, W. (2011). *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Murrell, M., Oakes, P.W., Lenz, M., and Gardel, M.L. (2015). Forcing cells into shape: The mechanics of actomyosin contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Myers, V.D., McClung, J.M., Wang, J., Tahrir, F.G., Gupta, M.K., Gordon, J., Kontos, C.H., Khalili, K., Cheung, J.Y., and Feldman, A.M. (2018). The Multifunctional Protein BAG3. *JACC Basic to Transl. Sci.*
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *J. Biol. Chem.*
- Protter, D.S.W., and Parker, R. (2016). Principles and Properties of Stress

- Granules. *Trends Cell Biol.*
- van Putten, S., Shafieyan, Y., and Hinz, B. (2016). Mechanical control of cardiac myofibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Raffa, K. (2012). {U}npublished data. *Entomology.*
- Rauch, J.N., Tse, E., Freilich, R., Mok, S.A., Makley, L.N., Southworth, D.R., and Gestwicki, J.E. (2017). BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins. *J. Mol. Biol.*
- Salah, Z., and Aqeilan, R.I. (2011). WW domain interactions regulate the Hippo tumor suppressor pathway. *Cell Death Dis.*
- Selcen, D., Muntoni, F., Burton, B.K., Pegoraro, E., Sewry, C., Bite, A. V., and Engel, A.G. (2009). Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*
- Shi, Y. (2009). Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell.*
- Singh, V., Ram, M., Kumar, R., Prasad, R., Roy, B.K., and Singh, K.K. (2017). Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J.*
- Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Höhfeld, J., Hartl, F.U., and Moarefi, I. (2001). Structure of a Bag/Hsc70 complex: Convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science (80-).* 291, 1553–1557.
- Stürner, E., and Behl, C. (2017). The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Front. Mol. Neurosci.*
- Sudol, M., and Harvey, K.F. (2010). Modularity in the Hippo signaling pathway. *Trends Biochem. Sci.*
- Takayama, S., Xie, Z., and Reed, J.C. (1999). An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.*
- Takemoto, K., Ishihara, S., Mizutani, T., Kawabata, K., and Haga, H. (2015). Compressive stress induces dephosphorylation of the myosin regulatory light chain via RhoA phosphorylation by the adenylyl cyclase/protein kinase a signaling pathway. *PLoS One.*
- Tanaka, K. (2009). The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad.* 85, 12–36.
- Tawo, R., Pokrzywa, W., Kevei, É., Akyuz, M.E., Balaji, V., Adrian, S., Höhfeld, J., and Hoppe, T. (2017). The Ubiquitin Ligase CHIP Integrates Proteostasis and Aging by Regulation of Insulin Receptor Turnover. *Cell.*
- Ulbricht, A., Eppler, F.J., Tapia, V.E., Van Der Ven, P.F.M., Hampe, N., Hersch, N., Vakeel, P., Stadel, D., Haas, A., Saftig, P., et al. (2013). Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr. Biol.*
- Ulbricht, A., Gehlert, S., Leciejewski, B., Schiffer, T., Bloch, W., and Höhfeld, J. (2015). Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy.*
- Vandenboom, R. (2017). Modulation of skeletal muscle contraction by myosin phosphorylation. *Compr. Physiol.*
- Walaas, S.I., and Greengard, P. (1991). Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol. Rev.*
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., and Gatto Jr., G.J. (2005). Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew. Chemie Int. Ed.* 44, 7342–7372.

- Ware, J.S., and Cook, S.A. (2018). Role of titin in cardiomyopathy: From DNA variants to patient stratification. *Nat. Rev. Cardiol.*
- Warscheid, B., and Fürst, D.O. Unpublished data.
- Wlodarchak, N., and Xing, Y. (2016). PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*
- Yamazaki, T., Tobe, K., Hoh, E., Maemura, K., Kaida, T., Komuro, I., Tamemoto, H., Kadowaki, T., Nagai, R., and Yazaki, Y. (1993). Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*
- Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Mizuno, T., Takano, H., Hiroi, Y., Ueki, K., Tobe, K., et al. (1995). Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.*
- Zhang, P., Fan, B., Yang, P., Temirov, J., Messing, J., Kim, H.J., and Taylor, J.P. (2019). Chronic optogenetic induction of stress granules is cytotoxic and reveals the evolution of ALS-FTD pathology. *Elife.*
- Zhu, D.M., Tekle, E., Chock, P.B., and Huang, C.Y. (1996). Reversible phosphorylation as a controlling factor for sustaining calcium oscillations in HeLa cells: Involvement of calmodulin-dependent kinase II and a calyculin A-inhibitable phosphatase. *Biochemistry.*
- Zhu, Y., Zhang, J., and Zeng, Y. (2012). Overview of Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets.*

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Ala, A	Alanin
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
Asp, D	Asparaginsäure
BAG3	BCL2 associated athanogene 3
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CalA	Calyculin A
CASA	Chaperon-assistierte selektive Autophagie
CHIP	C-terminus of Hsc70-Interacting Protein
CHX	Cycloheximide
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemilumescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälber Serum
FTD	Frontotemporalen Demenz
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
IGF1	<i>insulin-like growth factor I</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein</i>
OA	Okadasäure
PP1 – PP7	Protein-Phosphatase 1 - 7

Verzeichnisse

PPM	Metall-abhängige Protein-Phosphatasen
PPP	Phosphoprotein-Phosphatase
PSK	Serin/Threonin-Kinasen
PSP	Serin/Threonin-Phosphatase
PTK	Tyrosin-Kinase
PTP	Tyrosin-Phosphatase
Rb	Retinoblastom-Proteins
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
vgl.	vergleiche
z.B.	Zum Beispiel

7.3 Abbildungsverzeichnis

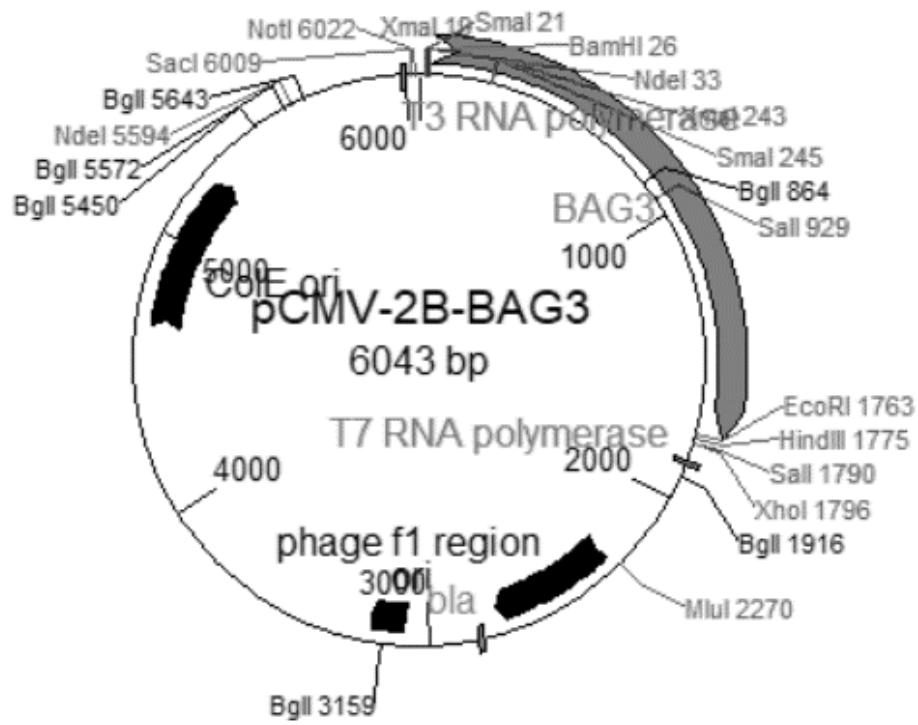
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Autolysosomenformation in der Zelle.	4
Abbildung 2-2: BAG3 ist ein Multidomänenprotein.	5
Abbildung 2-3: Regulierung durch BAG3	8
Abbildung 2-4: Regulierte Phosphorylierungsstellen von BAG3 unter mechanischem Stress.	10
Abbildung 2-5: Struktureller Vergleich von Phospho-Serin und Asparaginsäure, die als Phosmomimikry dient.	14
Abbildung 5-1: PP1 und PP2a sind verantwortlich für die Dephosphorylierung von BAG3.	40
Abbildung 5-2: Phosphorylierung von BAG3 führt zum Verlust der Bindung von BAG3 an HSPB8 und CHIP	42
Abbildung 5-3: Phosphorylierungsmimikry an den Resten BAG3-S264, BAG3-S279 und BAG3-S264 beeinflusst die Bindung von BAG3 an HSPB8 nicht.	44
Abbildung 5-4: BAG3-S264/S279/S285 führt zum vollständigen Verlust der Bindung von BAG3 an HSPB8, HSP70 und CHIP.	46
Abbildung 5-5: Die Phosphorylierung von BAG3-T285/S289 führt zum Verlust der HSPB8-Bindung	47
Abbildung 5-6: Die Dephosphorylierung von BAG3-S289 führt zum Verlust der HSPB8-Bindung.	48
Abbildung 5-7: BAG3-S289A und BAG3-T285D/S289D schwächen die Bindung von BAG3 an HSPB8.	49
Abbildung 5-8: Bei Phosphorylierung von BAG3-T285 wird SYNPO2 nicht abgebaut.	51
Abbildung 5-9: Bei Phosphorylierung von BAG3-T285/S289 wird SYNPO2 nicht abgebaut.	52
Abbildung 5-10: Die Phosphorylierung von BAG3-S264, BAG3-S279 und BAG3-S289 zeigt keinen Einfluss auf den SYNPO2-Abbau.	54
Abbildung 6-2: Die vollständige Phosphorylierung von BAG3 führt zum Verlust der HSPB8- und CHIP-Bindung.	57

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Regulierte Phosphorylierungsstellen von BAG3 unter mechanischer Belastung (Hoffman et al., 2015).....	10
Tabelle 3-1: Verwendete Geräte	15
Tabelle 3-2: Verwendete Chemikalien.....	16
Tabelle 3-3: Verwendete molekularbiologische Reagenziensysteme.....	19
Tabelle 3-4: Verwendete Enzyme für Klonierung und cDNA-Synthese.....	19
Tabelle 3-5: Verwendet Bakterien und eukaryontische Zellen	19
Tabelle 3-6: Primäre Antikörper.....	20
Tabelle 3-7: sekundäre Antikörper	20
Tabelle 3-8: Verwendete Plasmide zur Amplifikation oder Expression in <i>E. coli</i> -Bakterien und eukaryontischen Zellen	21
Tabelle 3-9: Verwendete Oligonukleotide zur Generierung der BAG3-Phosphomutanten	22
Tabelle 4-1: Temperatur der KOD-Polymerase für die verwendete PCR	29

8 Anhang

8.1 Plasmidkarte pCMV-BAG3



Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Jörg Höfeld für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für die Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Dieter Fürst danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Arbeitskollegen für die gute Arbeitsatmosphäre, fachliche Hilfe und viele konstruktive Diskussionen in den letzten Jahren. Dr. Christina Klimek, Dr. Barbara Kathage, Dr. Claudia Zeidler, Dr. Riga Tawo, Jan Daerr, Karen Himmelberg, Mirella Scraba, Julia Becker, Dr. Julia Kreuzberg, Susanne Kolek, Dustin Mikolajetz, Ricarda Jahnke, Julia Walther und allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Zellbiologie. Viele von euch darf ich mittlerweile zu meinen Freunden zählen, danke auch dafür.

Last but not least – herzlichen Dank an meine Familie, meinen Freund Patrick und meine Freunde für die Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Danke, dass ihr immer für mich da seid.