

Analyse der kraftregulierten Proteinhomöostase in Muskelzellen der Maus

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Ricarda Michaela Jahnke

aus

Schwäbisch Hall

Bonn, Oktober 2021

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

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Höfeld

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dieter Fürst

Tag der Promotion: 13.01.2022

Erscheinungsjahr: 2022

Publikation

Christina Klimek, **Ricarda Jahnke**, Judith Wördehoff, Barbara Kathage, Daniela Stadel, Christian Behrends, Alexander Hergovich & Jörg Höfeld. **The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy.** 2019, doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.07.007, BBA - Molecular Cell Research Volume 1866, Issue 10, Pages 1556-1566,

Kongressbeiträge

Ricarda Jahnke, Julia Friedrich, Alessandra Esch, Faith Osu Walter & Jörg Höfeld. **Differentiation and force dependent regulation of the muscular BAG3 proteostasis network** (2021). Poster internationale Konferenz FOR 2743.

Christina Klimek¹, **Ricarda Jahnke**¹, Judith Wördehoff¹, Barbara Kathage¹, Daniela Stadel², Christian Behrends³, Alexander Hergovich⁴ & Jörg Höfeld. **The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy** (2019). Poster GBM/DGZ Herbstkonferenz in Tübingen.

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

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Proteostase.....	3
1.2 Das Chaperon der HSP70-Familie	4
1.2.1 HSP70-Cochaperone	4
1.2.2 BAG3 als Nukleotid-Austauschfaktor.....	5
1.2.3 Kleine Hitzeschockproteine	6
1.3 Das Cochaperon BAG3 als Abbaufaktor	7
1.4 Abbauwege der Zelle zum Erhalt der Proteostase.....	9
1.4.1 Autophagie.....	10
1.4.2 Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA).....	11
1.5 Das Hippo-Signalnetzwerk	13
1.5.1 Die Kinase STK38.....	15
1.6 Abbau unabhängige Funktionen von BAG3.....	16
1.7 Muskelzellen als Modell zur Analyse von kraftinduzierten Veränderungen.....	17
1.8 Zielsetzung.....	19
2 Material	20
2.1 Geräteliste.....	20
2.1 Chemikalienliste	21
2.2 Reagenzsysteme	24
2.3 Bakterien- und Säuger-Stämme	24
2.4 Antikörper.....	24
2.5 Plasmide	25
2.6 Oligonukleotide	26
3 Methoden	27
3.1 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.3 Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i>	28
3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien	28
3.2.1 Kultivierung von C2-Zellen	28
3.2.2 Differenzierung von C2-Zellen zu Myotuben.....	29
3.2.3 Transfektion mittels JetPRIME® Reagenz.....	29
3.2.4 Behandlung mit Inhibitoren in eukaryotischen Zellen.....	30
3.3 Molekularbiologische Methoden	30

3.3.1	Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i>	30
3.3.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	31
3.3.3	Sequenzierung.....	31
3.4	Proteinbiochemische Methoden	31
3.4.1	Herstellung von Proteinextrakten	31
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	32
3.4.3	TCA-Fällung.....	33
3.4.4	Gelfiltration mittels einer Superose 6 Säule.....	33
3.4.5	Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	35
3.4.6	Western Blot	36
3.4.7	Immundekektion.....	37
3.5	Zellbiologische Methoden.....	38
3.5.1	Erzeugung mechanischer Belastung in Myotuben mittels Elektrostimulation ...	38
3.6	Statistik	39
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Myogenese umfasst eine Induktion der CASA-Maschinerie und weiterer Proteostase-Faktoren	40
4.2	In differenzierten Myotuben wird CASA aktiviert.....	41
4.3	In differenzierten Myotuben werden neben CASA-Komponenten auch weitere Proteostase-Faktoren autophagisch umgesetzt	42
4.4	Die CASA-regulierende Komponente STK38 unterliegt in Myotuben einem autophagischen Abbau	45
4.5	In Myotuben ist der autophagische Abbau von FLNC und SYNPO2 strikt von BAG3 abhängig.....	46
4.6	In Myotuben wird RhoA mittels BAG3 autophagisch abgebaut.....	47
4.7	Der autophagische Abbau von FILIP1L in differenzierten Myotuben erfolgt in Abhängigkeit von BAG3.....	49
4.8	In differenzierten Myotuben operieren BAG3-unabhängige Autophagiewege unter Beteiligung von FILIP1, HSPB5 und HSPB1	50
4.9	EPS-induzierte mechanische Schädigung führt zum Abbau von Filamin C in murinen Myotuben	51
4.10	Mechanische Schädigung von Myotuben führt zu einer Umstellung autophagischer Abbauwege.....	53
4.11	Nach einem mechanischem Schaden werden BAG3-unabhängige Autophagiewege abhängig von BAG3.....	55
4.12	EPS-induzierte mechanische Stimulierung und Belastung verändert die Ausbildung und Komposition von Proteostase-relevanten Proteinkomplexen.....	57
5	Diskussion.....	59
5.1	Myogenese führt zur Induktion von CASA und weiteren autophagischen Abbauvorgängen	59

5.2	Identifizierung von RhoA als Klient der BAG3-vermittelten Autophagie	62
5.3	Identifizierung von FILIP1L als Klient der BAG3-vermittelten Autophagie.....	64
5.4	BAG3-unabhängige Autophagiewege in Muskelzellen	65
5.5	Intakte Proteinsynthese ist für Abbau unter mechanischer Schädigung wichtig.....	67
5.6	Akuter mechanischer Stress führt zum Abschalten von CASA und zu neuen BAG3-abhängigen Abbauwegen	68
5.7	Fazit	74
6	Verzeichnisse	75
6.1	Literaturverzeichnis	75
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	85
6.3	Tabellenverzeichnis.....	86
6.4	Abkürzungsverzeichnis	86
	Danksagung.....	90

Zusammenfassung

Die Zelle als kleinste Einheit eines Organismus ist auf die dynamische Erhaltung ihrer Proteinausstattung - des Proteoms - angewiesen. Nur so kann sie sich an äußere Reize, wie mechanische Belastung und Umwelteinflüsse, aber auch an Zell- und Gewebe-spezifische Veränderungen anpassen. Die Gesamtheit der Prozesse, die bei der Proteom-Erhaltung eine Rolle spielen, werden unter dem Begriff der Proteostase zusammengefasst. Wichtig ist dabei vor allem das Ausbalancieren von Proteinsynthese und Proteinabbau. Für die Proteostase unter mechanischer Belastung spielt in Muskelzellen das Protein *Bcl2 associated anthanogene 3* (BAG3) eine wichtige Rolle. BAG3 vermittelt den Abbau von mechanisch beschädigten Zytoskelettproteinen durch die sogenannte Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA), bei der abzubauen Material von Membranen umschlossen und dann zu Abbauorganellen, den Lysosomen, transportiert wird. Gleichzeitig stimuliert BAG3 durch die Regulation bestimmter Signalwege die Neusynthese von Zytoskelettproteinen und erhält so die Zellstruktur unter mechanischem Stress. Ein wichtiger Teil der Funktion von BAG3 beruht auf der Fähigkeit mit molekularen Chaperonen zu interagieren, welche entfaltete Proteine in der Zelle binden. Tatsächlich besteht der CASA-Komplex aus BAG3, dem Chaperon und kleinen Hitzeschockprotein HSPB8, dem Chaperon HSP70 und der HSP70-assoziierten Ubiquitin-Ligase CHIP. Letztere ist in der Lage an Komplex-gebundene, entfaltete Proteine ein Abbausignal in Form einer Kette von Ubiquitin-Molekülen anzuhängen und so eine Entsorgung durch CASA einzuleiten. Durch diesen Mechanismus wird das Aktin-vernetzende Zytoskelettprotein Filamin nach einer mechanischen Schädigung abgebaut.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine eingehende zellbiologische und biochemische Analyse der BAG3-Proteostase-Maschinerie in Maus-Skelettmuskelzellen durchgeführt. Die Zellen wurden in Kulturschalen zu Myotuben differenziert und dann durch elektrische Pulsstimulierung (EPS) zur Kontraktion gebracht. Abhängig von den gewählten EPS Parametern konnten kraftinduzierte Anpassungsvorgänge der Proteostase untersucht werden. Durch siRNA-vermittelte Depletion einzelner Proteine wurde deren Bedeutung für die mechanische Stressbewältigung analysiert.

Die durchgeführten Arbeiten erlaubten es neben Filamin weitere, neue Klientenproteine zu identifizieren, die in Muskelzellen mittels CASA abgebaut werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass unter akutem mechanischem Stress der konventionelle CASA-Abbauweg abgestellt wird. BAG3 kooperiert dann nicht mehr mit HSPB8 sondern mit anderen kleinen Hitzeschockproteinen und dem Protein FILIP1, um eine Entsorgung mechanisch beschädigter Proteine zu gewährleisten.

Die Arbeiten belegen eine äußerst komplexe Regulation der BAG3-Proteostase-Maschinerie in Muskelzellen während der Differenzierung und unter mechanischem Stress. Es konnten neue Klientenproteine identifiziert werden, die einem BAG3-vermittelten Abbau unterliegen, und eine unerwartete Variabilität in Bezug auf BAG3-vermittelte Autophagie-Wege wurde aufgedeckt. Die erzielten Befunde tragen zu unserem Verständnis von humanen Erkrankungen bei, die auf einer gestörten BAG3-vermittelten Proteostase beruhen, wie zum Beispiel bestimmten Muskelschwächen bei Kindern und der Herzinsuffizienz.

1 Einleitung

1.1 Proteostase

Protein-Homöostase (Proteostase) basiert auf einem Gleichgewicht zwischen der Proteinsynthese, bestehend aus Transkription und Translation, und dem Proteinabbau. Die Proteostase ermöglicht es der Zelle sich an biotische und abiotische Faktoren wie beispielsweise Hitzestress oder mechanische Belastung anzupassen und damit die zelluläre Integrität zu erhalten (Hipp et al., 2019). Proteine müssen sich in ihre korrekte dreidimensionale Struktur falten, um ihre biologischen Funktionen in der Zelle ausüben zu können (Balch et al., 2008). Wenn ein Protein seine korrekte dreidimensionale Struktur nicht annehmen kann, besteht die Gefahr der Bildung von Proteinaggregaten, die für die Zelle toxisch sein können. Verschiedene Faktoren wie mechanischer oder oxidativer Stress können zur Entfaltung von Proteinen beitragen (Arndt et al., 2010; Korovila et al., 2017). Auch bei der Neusynthese von Proteinen kann es zur Bildung von aggregationsanfälligen Proteinen in der Zelle kommen. Ein Netzwerk aus molekularen Chaperonen, welche entfaltete Proteine erkennen, und Proteinabbau-Systemen wirkt üblicherweise der Proteinaggregation entgegen (Hartl et al., 2011; Kim et al., 2013)(Abb. 1).

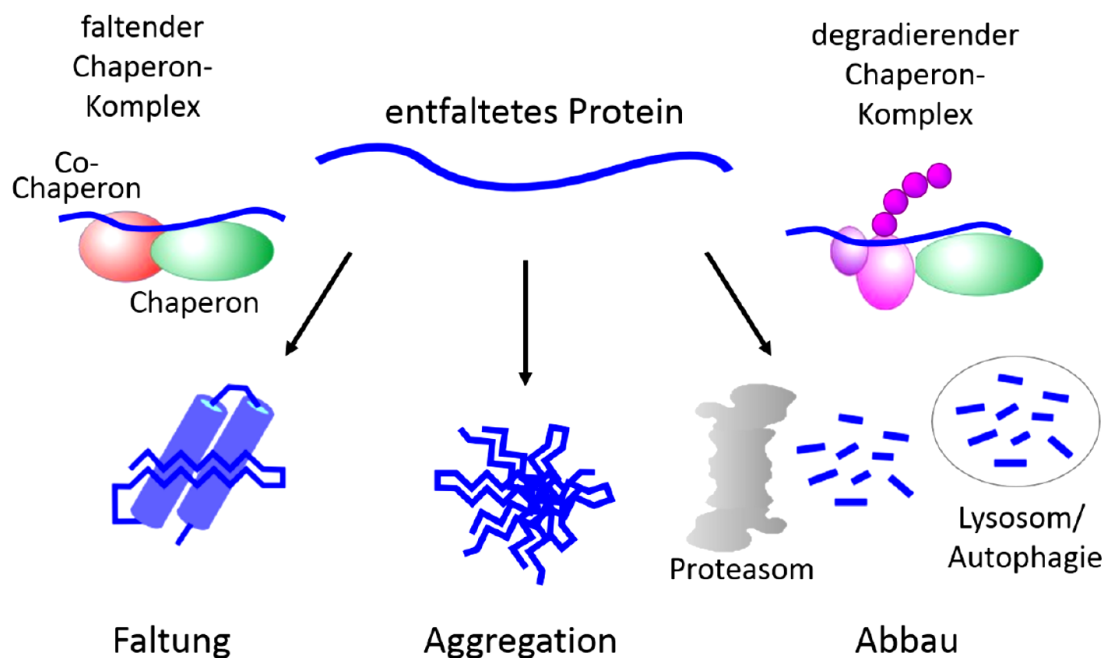


Abbildung 1: Proteostase.

Proteine werden nach ihrer Synthese oder nach einer Beschädigung Chaperon- vermittelt in ihre native Form gefaltet. Durch verschiedene Einflüsse kann es zur Entfaltung oder Beschädigung von Proteinen kommen. Die Proteinaggregate sind für die Zelle toxisch und werden durch degradierende Chaperon-Komplexe proteasomal oder lysosomal/autophagisch abgebaut.

Ist dieses Proteostase-Netzwerk gestört, kommt es zur Aggregation fehlgefalteter Proteine in der Zelle und damit häufig zu schwerwiegenden Krankheiten. Viele neurodegenerative Krankheiten wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson sind auf eine dysfunktionale Proteostase zurückzuführen, aber auch verschiedene Muskelerkrankungen gehen mit einer Proteinaggregation und gestörten Proteostase einher (Hipp et al., 2019). Diese Krankheiten treten häufig auch mit zunehmendem Alter auf, was auf eine altersbedingte Einschränkung der Proteostase hindeutet (Balch et al., 2008; Klaijs et al., 2018).

1.2 Das Chaperon der HSP70-Familie

Als Chaperone werden Proteine bezeichnet, die mit anderen Proteinen interagieren und diesen helfen in ihre dreidimensionale Struktur zu falten, ohne dabei selbst Teil des Proteins oder der endgültigen Proteinstruktur zu sein (Hartl, 1996; Kim et al., 2013). Viele Vertreter dieser Proteinfamilie werden als Stressproteine oder Hitzeschockproteine (HSP) bezeichnet, da diese häufig unter Stressbedingungen vermehrt synthetisiert werden (Hartl et al., 2011; Hipp et al., 2019). Chaperone werden nach ihrem molekularen Gewicht eingeteilt (HSP40, HSP70, HSP90). Das Chaperon der HSP70-Proteinfamilie ist an der Faltung neu-synthetisierter Proteine, der Rückfaltung von beschädigten Proteinen, sowie am Erhalt der Proteinkonformation von bestehenden Proteinen beteiligt (Hipp et al., 2019). Vertreter der HSP70 Chaperone sind zum Teil konstitutiv exprimiert, um wichtige Haushaltsfunktionen zu erfüllen, während andere HSP70-Familienmitglieder zum Beispiel durch Hitzestress induzierbar sind. HSP70-Proteine bestehen aus einer N-terminalen Nukleotidbindedomäne und einer C-terminalen Substratbindungsdomäne (Mayer and Bukau, 2005). HSP70 bindet in dynamischer Weise an hydrophobe Bereiche entfalteter Proteine. Der Bindungs- und Freigabezyklus des Substratproteins wird durch das Umschalten von HSP70 zwischen ATP-gebundenen Zustand mit niedriger Substrat-Affinität und dem hochaffinen ADP-gebundenen Zustand gesteuert. Somit ist die ATP-Bindung und Hydrolyse essentiell für die Chaperonaktivität von HSP70-Proteinen (Esser et al., 2004; Jeng et al., 2015; Mayer and Bukau, 2005).

1.2.1 HSP70-Cochaperone

Der Begriff Cochaperone bezeichnet Proteine, die die Funktion der Chaperone und die Bindung dieser an das Substrat regulieren. Einige Cochaperone können auch selbst

Chaperonaktivität besitzen und mit einem Substrat direkt interagieren (Caplan, 2003). Um die vielfältigen zellulären Aufgaben von HSP70 zu ermöglichen, wird eine genaue Regulation der HSP70 Aktivität benötigt. Die Proteine der HSP40-Familie, auch bekannt als J-Dömanenproteine (JDPs), haben eine Schlüsselrolle in der Regulation der HSP70-Aktivität (Faust et al., 2020). JDPs sind Multidomeänenproteine, die durch die konservierte J-Domäne an die Schnittstelle zwischen der Nukleotidbindedomäne und der Substratbindedomäne von HSP70 binden. Darüber hinaus binden die J-Proteine auch an ungefaltete Proteine, um Proteinaggregation zu verhindern und rekrutieren HSP70 zu diesen Substratproteinen. Das Chaperon HSP40 beschleunigt den ATPase-Zyklus von HSP70 und stabilisiert die HSP70-Substrat Interaktion (Jeng et al., 2015). Die nachfolgende Bindung von Nukleotid-Austauschfaktoren (NEFs) an die Nukleotidbindedomäne von HSP70 katalysiert wiederum die Substratfreigabe (Kim et al., 2013). Können fehlgefaltete oder entfaltete Proteine nicht mehr in ihre funktionelle Form zurückgefaltet werden, ist das HSP70-System in der Lage, mit dem proteasomalen oder autophagischen Abbausystem bei der Proteinentsorgung zu kooperieren (Hartl et al., 2011; Kim et al., 2013).

1.2.2 BAG3 als Nukleotid-Austauschfaktor

NEFs wie *Bcl2 associated anthanogen 3* (BAG3) Proteine spielen eine entscheidende Rolle beim ATPase-Zyklus von HSP70. Sie stimulieren die ATPase-Aktivität von HSP70, da sie für einen Austausch von ADP zu ATP sorgen, was zur Dissoziation des Zielproteins von HSP70 führt (Kim et al., 2013; Rauch et al., 2017). Dieser Zyklus aus Bindung und Freigabe ermöglicht ein produktives Falten des Substratproteins, da während der Zeit der Bindung des Proteins, Aggregation verhindert wird (Kampinga and Craig, 2010).

BAG3 ist ein stress-induzierbares Protein, welches durch eine Multidomänenstruktur charakterisiert wird. BAG3 ist Mitglied der BAG-Proteinfamilie (Gamerdinger et al., 2009; Homma et al., 2006). Die sechs Proteine der BAG-Familie haben alle die konservierte BAG-Domäne gemeinsam, die sich aus etwa 45 Aminosäuren nahe des C-Terminus zusammensetzt (Behl, 2016; Takayama et al., 1999). Die BAG-Domäne bindet an die Nukleotidbindedomäne von Mitgliedern der HSP70-Familie. Diese Protein-Protein-Interaktion unterstützt die ADP Freisetzung von HSP70 und erleichtert wiederum die erneute Bindung von ATP (Rauch et al., 2017). BAG3 bindet als NEF am stärksten an HSP70 neben den anderen NEFs wie beispielsweise BAG1 oder BAG2 (Rauch and Gestwicki, 2014). BAG3 besitzt neben der BAG-Domäne weitere Interaktionsdomänen mit verschiedenen Funktionen (Klimek et al., 2017).

Über zwei IPV-Motive kann BAG3 an kleine Hitzeschockproteine, wie HSPB8, HSPB5, HSPB1 oder HSPB6 binden und kann so deren Funktion mit dem HSP70-System verknüpfen (Fang et al., 2019; Hishiya et al., 2011; Klimek et al., 2017; Rauch et al., 2017).

1.2.3 Kleine Hitzeschockproteine

Neben den ATP-abhängigen Chaperonen wie den HSP70-Proteinen gibt es auch Chaperone, die ATP-unabhängig arbeiten. Zu Letzteren zählen die kleinen Hitzeschockproteine (*small heat shock proteins*, sHSPs), die in der Regel ein Molekulargewicht unter 40 kDa aufweisen (Hartl et al., 2011; Jeng et al., 2015). Die ATP-unabhängigen sHSPs fungieren häufig als „holdasen“, die die Aggregation von Proteinen verhindern (Kim et al., 2013). Die sHSPs haben eine große Bedeutung für den Erhalt der Proteinhomöostase und sind auch pathophysiologisch von steigender Relevanz (Sarparanta et al., 2020). Sie besitzen hochkonservierte Domänen, die innerhalb aller Phyla vorkommen (Boelens, 2020; Hayashi and Carver, 2020). Im menschlichen Genom werden 10 sHSPs kodiert (sHSP1-10, auch *heat shock protein family B (small) member 1-10*, HSPBs genannt). Einige liegen dabei ubiquitär vor, wohingegen andere nur in bestimmten Geweben exprimiert werden (Boelens, 2020). Die sHSPs werden sowohl konstitutiv als auch stressinduziert exprimiert. Sie schützen die Zellen vor zytotoxischen Aggregaten, indem sie an diese binden bzw. mit entfalteten Proteinen co-aggregieren. Die sHSPs liegen dabei selbst in oligomerer Form vor und können Komplexe ausbilden, die von einem dimeren Zustand bis hin zu hocholigomere Strukturen mit bis zu 24 Untereinheiten (ca. 600 kDa) reichen können. Die oligomeren Komplexe können auch aus unterschiedlichen sHSPs zusammengesetzt sein (Arrigo, 2013; Hayashi and Carver, 2020; Zantema et al., 1992). Das entscheidende Strukturmerkmal von sHSPs ist die α -Crystallin-Domäne (ACD), die notwendig für die Vermittlung der Dimerisierung von sHSPs zu Homo- oder Heterodimeren ist (Boelens, 2020; Haslbeck et al., 2019). Die ACD wird von einer flexiblen N-terminalen Region (NTR) flankiert, die in ihrer Länge und Sequenz variiert und einer kürzeren C-terminalen Region (Haslbeck et al., 2019; Riedl et al., 2020). Die N- und C-terminalen Regionen vermitteln die Chaperon-Aktivität und sind verantwortlich für die funktionale Spezifität der einzelnen sHSPs (Kriehuber et al., 2010; Sarparanta et al., 2020). Die Assoziation von Monomeren zu großen Komplexen sowie die Dissoziation großer Oligomere in Dimere und Monomere, wird durch posttranslationale Modifikation moduliert, wie beispielsweise die Phosphorylierung. Der Oligomerisierungszustand reguliert wiederum die Funktionen der sHSPs (Arrigo and Gibert, 2013; Carra et al., 2017). sHSP-Funktionen sind sehr vielfältig in den verschiedenen

Zelltypen und beinhalten Chaperon-ähnliche Aktivität sowie eine Regulation interagierender Proteine (Arrigo and Gibert, 2013). Mutationen in sHSPs führen zur Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen, Myopathien und Katarakt-Erkrankungen (Arrigo and Gibert, 2013; Carra et al., 2005; Vicart et al., 1998). Drei wichtige durch Stress induzierbare - aber auch konstitutiv exprimierte - sHSPs sind HspB1 (Hsp27), HspB5 (α B-Crystallin) und HspB8 (Hsp22) (Arrigo and Gibert, 2013). Diese sind für eine Vielzahl von Aufgaben innerhalb der Zelle von Bedeutung, wie der Signalweitergabe oder Apoptose (Arrigo and Gibert, 2013). Zusätzlich sind sie Schlüsselfaktoren für die Aufrechterhaltung der Integrität der Zytoskelett-Architektur und haben antioxidative, antiapoptotische, tumorerzeugende und metastasierende Eigenschaften (Arrigo and Gibert, 2013). In Skelettmuskelzellen und anderen sich bewegenden Zellen kommt es aufgrund von mechanischer Belastung zu einer gesteigerten Expression und Vielfalt von sHSPs. Zusätzlich interagieren diese mit Schlüsselkomponenten des Zytoskeletts und damit assoziierten Proteinen wie Aktin, Titin und Intermediärfilamentproteinen (Collier and Benesch, 2020). sHSPs beeinflussen so auch die Muskelkontraktion und -elastizität und zeigen spezielle Funktionen unabhängig ihrer Chaperonaktivität gegen mechanischen Stress auf (Chebotareva et al., 2020; Collier and Benesch, 2020).

1.3 Das Cochaperon BAG3 als Abbaufaktor

BAG3 ist ein Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von rund 61 kDa und wird in nahezu allen Säugetiergeweben exprimiert. Die höchste Expression von BAG3 ist in Herz- und Skelettmuskeln zu finden (Homma et al., 2006; Sarparanta et al., 2020). Im Skelettmuskel ist BAG3 vorwiegend an der Z-Scheibe und den Sarkolemma lokalisiert (Sarparanta et al., 2020; Selcen et al., 2009). Die unterschiedlichen Domänen in BAG3 erlauben es dem Protein unterschiedliche Interaktionen mit anderen Proteinen einzugehen und diese so zu verbinden (Abb. 2). BAG3 kann als eine Art Plattform angesehen werden, die verschiedene Klassen von molekularen Chaperonen zur Stabilisierung und Beseitigung beschädigter Proteine physikalisch und funktionell verbindet (Guilbert et al., 2018). BAG3 kann die Formation von großen Chaperon-Komplexen induzieren, die zur Substrat-Sequestrierung und -Ubiquitinierung führen.

Durch Interaktionen mit HSP70, sHSPs wie HSPB8, der Ubiquitin-Ligase CHIP und dem Ubiquitin-Bindendeprotein p62 ist BAG3 direkt mit der Abbau-Maschinerie in Zellen verknüpft und wichtig für den Erhalt der Proteostase (Guilbert et al., 2018; Rauch et al., 2017; Sarparanta et al., 2020). Substratproteine die über einen Komplex aus HSP70-HSPB8-BAG3 gebunden sind und CHIP präsentiert werden, werden anschließend autophagisch abgebaut (Arndt et al., 2010; Crippa et al., 2010; Klimek et al., 2017). BAG3 stimuliert darüber hinaus die Kooperation von HSP70 und HSPB8 während dem Abbau von Stressgranula (Ganassi et al., 2016).

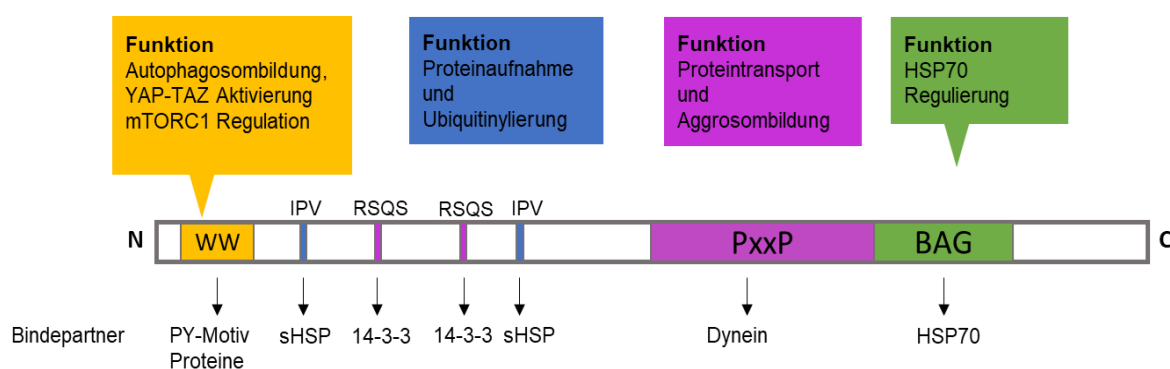


Abbildung 2: Schematische Darstellung der BAG3-Interaktionsdomänen.

BAG3 interagiert über seine spezifische N-terminale WW-Domäne (gelb) mit Prolin-reichen Sequenzen anderer Proteine wie SYNPO2. Über die IPV-Motive kann BAG3 mit kleinen Hitzeschockproteinen wie HSPB8 interagieren. Das PXXP-Motiv (lila) ermöglicht die Bindung an Dynein. Die C-terminale BAG-Domäne (grün), welche alle Mitglieder der BAG-Familie kennzeichnet, vermittelt die Wechselwirkung mit dem Hitzeschockprotein HSP70 (verändert nach Klimek et al. 2017).

BAG3 ist entscheidend am Abbau von aggregationsanfälligen Proteinen beteiligt und so führen Störungen im BAG3-vermittelten selektiven Abbau zu neurodegenerativen Erkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Chorea Huntington (Carra et al., 2008a; Crippa et al., 2010; Klimek et al., 2017; Stürner and Behl, 2017). Verschiedene Mutationen des BAG3 Gens im Menschen führen häufig zu Myopathien, diese betreffen auch das Herz und können zu Kardiomyopathien führen (Franaszczyk et al., 2014; Homma et al., 2006). Auch ein reduzierter BAG3-vermittelter Sarkomerumsatz in Herzmuskelzellen führt zur Entwicklung von Herzinsuffizienz (Höfeld et al., 2021; Martin et al., 2021b). Die heterozygote Punktmutation im *Bag3* Gen, welche zu einer Änderung der Aminosäure von Prolin im Codon 209 zu Leucin (BAG3^{P209L}) führt, ist verantwortlich für eine Muskelschwäche, Herzinsuffizienz und respiratorischen Insuffizienzen bereits im Kindesalter (Meister-Broekema et al., 2018; Selcen et al., 2009). Diese Symptome lassen sich auf den Zerfall der Z-Scheibe und einer

Ansammlung von Proteinaggregaten zurückführen, die mit mutiertem und aggregiertem BAG3 gefüllt sind (Selcen et al., 2009). BAG3 ist ein entscheidender Abbaufaktor und damit wichtig für den Erhalt der Proteostase.

1.4 Abbauege der Zelle zum Erhalt der Proteostase

Der häufigste zelluläre Abbauege von beschädigten oder entfalteten Proteinen erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Das UPS vermittelt die Degradation einzelner Proteine im 26S-Proteasom, indem diese zunächst durch Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbauege markiert werden (Schreiber and Peter, 2014). Das 26S Proteasom ist ein molekulare Komplex bestehend aus zwei Subkomplexen, der katalytischen 20S Einheit und ein bis zwei regulatorischen 19S Untereinheiten (Budenholzer et al., 2017; Schreiber and Peter, 2014; Tanaka, 2009). Das 26S Proteasom kommt sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma vor (Schreiber and Peter, 2014). Die Polyubiquitinierung eines Proteins dient als Erkennungssignal für die 19S Untereinheit und wird anschließend durch den proteolytisch aktiven 20S-Komplex abgebaut. Für die spezifische Ubiquitinierung der abzubauenden Proteine verwendet die Zelle eine Konjugationsmaschinerie bestehend aus drei Enzymen (E1, E2 und E3).

Das E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym) hydrolysiert ATP und bildet ein Thioester-gebundenes Konjugat zwischen sich selbst und Ubiquitin, E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) erhält im Anschluss das Ubiquitin von E1 und bindet E3 (Ubiquitin-Ligase). Die Ubiquitin-Ligase erkennt das abzubauende Protein und durch E2 wird das Ubiquitin auf das Substrat übertragen (Rubinsztein, 2006).

Neben dem 26S Proteasom erfüllt auch das Lysosom wichtige Abbau-Funktionen (Schulze et al., 2009). Lysosomen können dabei eine Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Substanzen wie Proteine aber auch Nukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipide abbauen (Schulze et al., 2009). Das Lysosom enthält hierfür spezifische Säurehydrolasen (Ballabio and Bonifacino, 2020). Der saure pH-Wert in Lysosomen wird durch eine vakuoläre ATPase (v-ATPase) Protonenpumpe, welche in der lysosomalen Membran eingebettet ist, aufrechterhalten. Darüber hinaus umfasst die lysosomale Membran weitere Ionenkanäle sowie Lipidtransporter, die am Export von Zuckern und Aminosäuren teilhaben. Lösliche N-Ethylmaleinimid-sensitive Anheftungsrezeptoren (SNAREs) vermitteln die Fusion von Lysosomen mit anderen Organellen (Ballabio and Bonifacino, 2020). Die lysosomale Membran selbst besteht aus glykosylierten Proteinen, welche diese vor dem Verdau schützt.

Das Zellinnere wird somit durch die lysosomale Membran und dem sauren Enzymaktivitätslevel der Hydrolasen vor unkontrolliertem Abbau geschützt (Schulze et al., 2009). Die Autophagie, bei welcher zelleigene Bestandteile in Lysosomen verdaut werden, soll im nächsten Abschnitt gesondert erläutert werden.

1.4.1 Autophagie

Die Autophagie ist ein komplexer Prozess innerhalb der Zelle, der die Degradation zelleigener Bestandteile wie fehlgefalteter Proteine oder beschädigter Zellorganellen im Lysosom beschreibt. Der Begriff Autophagie bedeutet dabei so viel wie „sich selbst verzehrend“ und wurde erstmals 1859 von M. Anselmier verwendet (Ktistakis, 2017). Er nutzte dabei den Begriff, um das Überleben während Hungerperioden durch eigene Ressourcen und damit einen eher unselektiven Prozess zu beschreiben. Auch heute noch wird Autophagie als ein zellulärer Prozess angesehen, der durch externe Stimuli wie Nährstoffmangel, oxidativen oder mechanischen Stress induziert werden kann (Ulbricht et al., 2013; Wang and Qin, 2013). Aber auch ohne spezielle Stimuli findet in praktisch allen Zellen basaler autophagischer Abbau statt (Levine and Kroemer, 2008; Yang et al., 2013). Die Hauptfunktion der Autophagie ist die Bereitstellung von Nährstoffen für lebenswichtige zelluläre Funktionen während Nährstoffmangel und anderer Stressformen aber auch die Beseitigung potenziell schädlichen, zytosolischen Materials wie beschädigter Organellen oder Proteinaggregate (Dikic and Elazar, 2018). Die Autophagie stellt somit ein wichtiges zytoprotektives System dar. Es können grundsätzlich drei Autophagieformen unterschieden werden. Zum einen die Makroautophagie (im Folgenden als Autophagie bezeichnet), die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (*CMA chaperone mediated autophagy*).

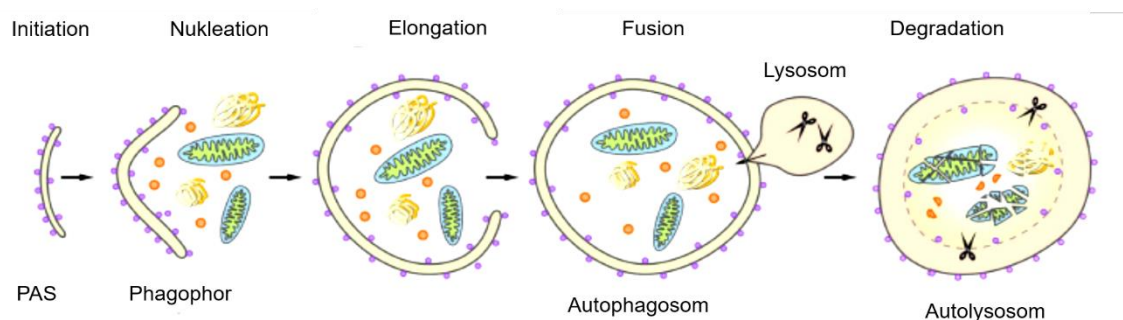


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Autophagosomenformation.

Autophagie ist ein komplexer Prozess, welcher aus verschiedenen Schritten besteht. Während der Initiationsphase bildet sich das Phagophor an der *phagophore assembly site* (PAS). Daran anschließend erweitert sich die Phagophore durch verschiedene intrazelluläre Quellen und es kommt durch Elongation und Fusion zum Einschluss des abzubauenen Materials. Das so entstandene Autophagosom fusioniert mit dem Lysosom zum Autophagosom, in welchem der Abbau stattfindet (verändert nach Stürner und Behl, 2017).

Bei der Mikroautophagie kommt es zur direkten Umschließung des abzubauenen Zellmaterials durch Einstülpungen oder Vorwölbungen der lysosomalen Membran im Zytoplasma (Parzych and Klionsky, 2014). Bei der CMA werden HSP70-gebundene Substrate abgebaut.

Die Substrate werden dabei über einen Translokationskomplex, der mit dem lysosomalen Adapter LAMP-2A interagiert, direkt ins Lysosom überführt, ohne dass es zur Ausbildung von Autophagosomen kommt (Eskelinen and Saftig, 2009; Kettern et al., 2010; Mizushima and Komatsu, 2011; Parzych and Klionsky, 2014).

Die am besten beschriebene Autophagieform ist die Makroautophagie. Diese Form der Autophagie kann in verschiedene Schritte unterteilt werden. So bildet sich zunächst eine intrazelluläre Doppelmembran (Phagophor-Membran), welche lösliches Zytoplasmamaterial, Proteinaggregate und Organellen sequestriert. Die anschließende Elongation, Wölbung und Fusion der Phagophor-Membran lässt ein Vesikel-ähnliches Organell namens Autophagosom entstehen (Abb. 3). Durch die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom kommt es zur Bildung des Autolysosoms, in welchem die Degradation der Substrate durch saure Hydrolasen stattfindet (Dikic and Elazar, 2018; Lamb et al., 2013; Parzych and Klionsky, 2014). In den letzten Jahren wurden zunehmend selektive Autophagie-Mechanismen identifiziert, über die gezielt Substrate abgebaut werden (Khaminets et al., 2016).

1.4.2 Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA)

Bei der Chaperon-assistierten selektiven Autophagie (CASA) handelt es sich um einen selektiven makroautophagischen Abbauweg, der maßgeblich an der Integrität von Muskel- und Nervenzellen beteiligt ist (Arndt et al., 2010; Ulbricht et al., 2013). Ausschlaggebend für die Durchführung von CASA ist das Zusammenspiel von Chaperonen, Cochaperonen und Adapterproteinen. Wichtige Bestandteile des CASA-Komplexes ist das Chaperon HSP70, das Cochaperon BAG3 und das kleine Hitzeschockprotein HSPB8 (Arndt et al., 2010; Ulbricht and Höfeld, 2013). HSP70 bindet zusammen mit HSPB8 und BAG3 an das abzubauenen Substrat, woraufhin CASA induziert wird (Abb. 4). Die abzubauenen Proteine werden durch die Ubiquitin-Ligase CHIP/STUB1 (*C terminus of HSC70-interacting protein*) ubiquitiniert und so für die Degradation gekennzeichnet. Dieses Abbausignal wird durch den Ubiquitin-Adapter SQSTM1/p62 erkannt, woraufhin die Kopplung an ATG8/LC3 (*autophagy-related protein 8*) auf der Phagophormembran vermittelt wird (Ulbricht and Höfeld, 2013). Im Anschluss wird

die Bildung von Autophagosomen und der Abbau in Lysosomen initiiert (Levine and Kroemer, 2008). Zusätzlich bindet BAG3 in Muskelzellen über die N-terminale WW-Domäne an die Prolin-reiche Domäne von Synaptopodin 2 (SYNPO2). Eine PDZ-Domäne in SYNPO2 (auch Myopodin genannt) kann gleichzeitig an einen membranfusionierenden Komplex aus SNARE und *vacuolar protein sorting* (VPS)-Proteinen binden und verknüpft so die CASA-Maschinerie mit einem System zur Autophagosomenbildung (Ulbricht et al., 2013). Hierbei sind vor allem die SYNPO2-Isoformen a-c relevant, da nur diese eine PDZ-Domäne besitzen. SYNPO2 ist somit essentiell an der Autophagosomenbildung beteiligt und wird selbst mit abgebaut.

Die CASA-Maschinerie ist in der glatten Muskulatur mit Aktin-Stressfasern und in der quergestreiften Muskulatur mit Z-Scheiben assoziiert und für den Abbau von beschädigten Komponenten des Aktin-Zytoskeletts wie dem Filamin (FLN) verantwortlich (Arndt et al., 2010). Unter mechanischer Belastung entfalten sich mechanosensitive Komponenten des kontraktiven Apparats und können mechanisch beschädigt werden. In der quergestreiften Muskulatur ist die Z-Scheibe starker mechanischer Belastung ausgesetzt. Filamin agiert als Aktin-Quervernetzer sowie Mechanosensor in der Z-Scheibe und ist für deren Funktionalität und Stabilität entscheidend. Filamin ist ein Homodimer, das sich aus zwei 250 kDa großen, stabähnlichen Strukturen mit einer N-terminalen Aktin-Bindedomäne sowie 24 Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen zusammensetzt (Ehrlicher et al., 2011; Nakamura et al., 2011). BAG3 bindet an die entfaltete mechanosensitive Ig- Domäne 19-21 von Filamin und rekrutiert HSC70 sowie HSPB8, sodass entfaltetes Filamin selektiv autophagisch abgebaut wird (Klimek et al., 2017; Ulbricht and Höfeld, 2013). Filamin-C (FLNC) ist die in der quergestreiften Muskulatur vorkommende Isoform des FLN, wohingegen Filamin-A (FLNA) ubiquitär - zum Beispiel auch in Glattmuskelzellen - vorkommt (Mao and Nakamura, 2020). FLNC gilt als wichtiges Protein für den Aufbau der Sarkomere im Rahmen der Myogenese. Kommt es zu Beeinträchtigungen im Abbau von entfaltetem und aggregiertem FLNC, führt dies zu skelettalen Muskeldystrophien (Kley et al., 2013). Für CASA konnte auch eine essentielle Rolle für den Filaminabbau im humanen Muskel gezeigt werden. Durch Krafttraining mechanisch belastete Muskeln zeigten eine Reduktion der Proteinmenge von Filamin und eine Induktion in der Expression der CASA-Komponenten (Ulbricht et al., 2015). Dies belegt die essentielle und Organismus-übergreifende Bedeutung von CASA für die muskuläre Proteostase.

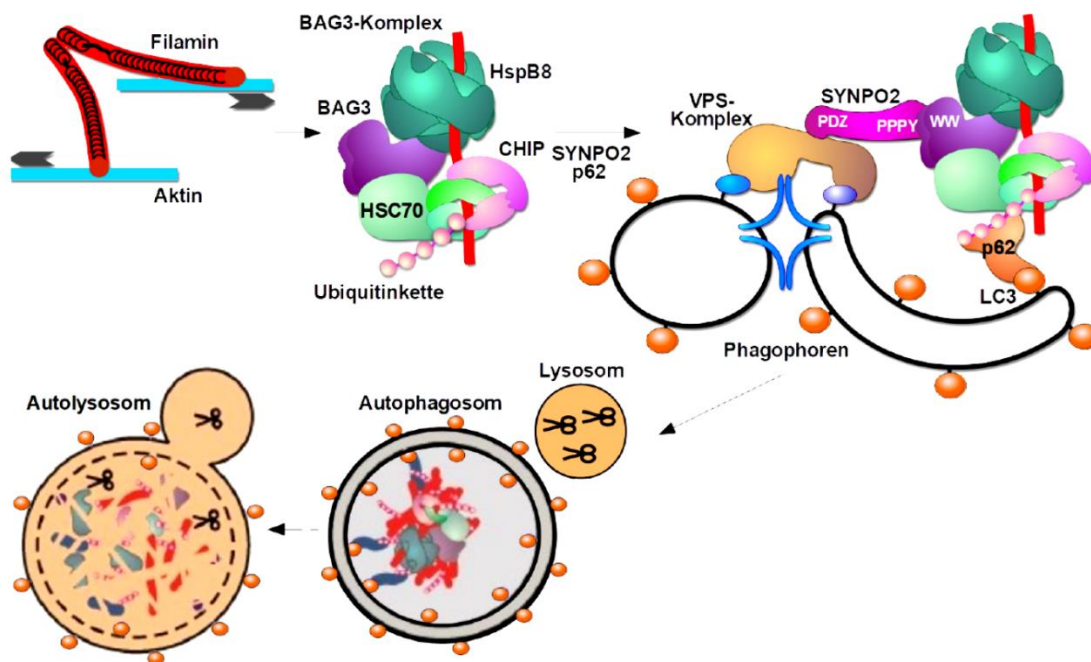


Abbildung 4: Abbau von Filamin über die CASA Maschinerie.

Filamin ist als Mechanosensor an den Aktinfasern des Zytoskeletts assoziiert und wird durch mechanische Belastung entfaltet. Der Abbau von beschädigtem Filamin erfolgt über CASA. Der CASA-Komplex umfasst die molekularen Chaperone Hsc70 (Hitzeschockprotein, *heat shock cognate*) und HSPB8 sowie das Cochaperon BAG3 und die HSC70-assoziierte Ubiquitin-Ligase CHIP/STUB1, welche mit Ubiquitin-konjugierenden Enzymen kooperiert. SYNPO2 und p62 vermitteln als Adapterproteine die Bildung von Autophagosomen und werden im Zuge von CASA mit abgebaut. Das Autophagosom entsteht durch Membran-*tethering* aus Phagophoren und fusioniert mit dem Lysosom zum Autolysosom (verändert nach Ulbricht et al. 2013 und Klimek et al. 2017).

Im Zusammenhang mit der Proteostase-Funktion von BAG3 ist es auch interessant die Regulation der Transkription von BAG3 zu betrachten. BAG3-Transkription wird in Säugern durch den *heat shock transcription factor 1* (HSF1) reguliert. Mechanische Belastung von Zellen und die damit verbundene Akkumulation mechanisch entfalteter Proteine führt zu einer Aktivierung von HSF1, woraufhin es zur erhöhten Expression von BAG3 kommt (Ulbricht and Höfeld, 2013). So kann die CASA-Aktivität und damit zusammenhängend die Expression von BAG3 an die Kraftbelastung im Aktinzytoskelett angepasst werden.

1.5 Das Hippo-Signalnetzwerk

Das Hippo-Signalnetzwerk ist für die Hemmung der Proliferation in Zellen von Bedeutung und fördert darüber hinaus die Differenzierung und die Apoptose. So kontrolliert das Hippo-Signalnetzwerk die Gewebemöostase und Regeneration.

Durch genetische Studien an *Drosophila melanogaster* wurde das Hippo-Signalnetzwerk entdeckt und definiert (Klimek et al., 2019; Yu and Guan, 2013).

Der Hippo-Pfad integriert eine große Zahl von Signalen, um viele zelluläre Schlüsselprozesse zu steuern (Ma et al., 2019). Es wird dabei durch Zell-Zellkontakte, Zellpolarität mechanische Signale oder Stresssignale reguliert (Dupont et al., 2011; Meng et al., 2016; Yu and Guan, 2013). Wichtige Kinasen des in Säugern konservierten Signalweges sind die Serin-Threonin-Kinasen 3 und 4 (STK3 und STK4 auch MST1 und MST2) sowie die *large tumor-suppressor* Kinasen 1 und 2 (LATS1 und LATS2) (Hergovich, 2016). Des Weiteren sind Salvador (SAV1) und *Mps One Binder Kinase Activator 1* (MOB1) -Adapterproteine Teil der Signalkaskade. Zusammen mit den Transkriptions-Co-Aktivatoren YAP und TAZ funktionieren sie als Haupteffektoren des Hippo-Signalnetzwerkes (Hong and Guan, 2012). Kommt es zur Phosphorylierung von STK3 und STK4 z.B. in Abwesenheit eines mechanischen Reizes wird das Hippo-Signalnetzwerk aktiviert. Die Phosphorylierung führt wiederum zur einer weiteren Phosphorylierung von Komponenten der Signalkaskade wie SAV1- als auch MOB1-Proteinen sowie von LATS1/2 (Klimek et al., 2019; Ma et al., 2019; Yu and Guan, 2013). Diese phosphorylieren dann die Transkriptions-Co-Aktivatoren YAP und TAZ, die so in einem inaktiven Zustand an 14-3-3-Proteine binden und dadurch im Zytoplasma verbleiben (Klimek et al., 2019; Ma et al., 2019). Wird der Hippo-Signalweg durch z.B. mechanische Belastung ausgeschaltet, bleiben LATS1/2 und somit auch YAP und TAZ unphosphoryliert. In diesem aktiven Zustand können YAP und TAZ in den Zellkern wandern. Dort binden sie wichtige Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise TEAD und induzieren so die Transkription von Zielgenen wie Filamin (Dupont et al., 2011; Klimek et al., 2019; Meng et al., 2016). Das Hippo-Signalnetzwerk kontrolliert insofern, die dynamische Verteilung von YAP und TAZ zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern. Der Hippo-Pfad muss jedoch nicht nur an- oder ausgeschaltet sein, es kommt auch zu einer partiellen zytoplasmatischen als auch nukleären Lokalisation von YAP (Ma et al., 2019). Durch die Identifizierung weiterer Hippo-Kinasen wie die Serin-Threonin Kinase STK38, welche wiederum auch YAP phosphorylieren kann, zeichnet sich eine zusätzliche Bedeutung für die Regulation des Hippo-Signalnetzwerkes ab (Hergovich, 2016; Klimek et al., 2019). Ebenso zeigt sich eine Verknüpfung des Hippo-Signalnetzwerkes mit der Regulation der Autophagie. So phosphorylieren die Kinasen STK3 und STK4 den Phagophorenmembranmarker LC3 an Threonin 55 und sind an der Aktivierung der Autophagie beteiligt (Wilkinson et al., 2015). Diese posttranslationale Modifikation von LC3 ist entscheidend für die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen (Wang et al., 2020).

1.5.1 Die Kinase STK38

Die Serin-Threonin-Kinase 38 (STK38, auch *nuclear Dbf2-related kinase 1* NDR1 genannt), ist eine Hippo-Kinase, welche wie LATS1/2 zu der Familie der NDR-Kinasen gehört und eine hochkonservierten N-terminale regulatorische (NTR)-Domäne besitzt (Hergovich, 2016). Des Weiteren umfasst STK38 ein hydrophobes Motiv und ein Aktivierungssegment. Zur Aktivierung von STK38 wird eine Phosphorylierung an Threonin 444 des hydrophoben Motivs benötigt und zusätzlich eine Autophosphorylierung am Serin 281 (Hergovich et al., 2005). Darüber hinaus ist eine Bindung von MOB1-Proteinen an die NTR-Domäne zur Aktivierung notwendig (Hergovich et al., 2006; Hergovich, 2016). STK38 kann durch STK3 und STK4 sowie STK24 am hydrophoben Motiv an Threonin 444 phosphoryliert werden (Klimek et al., 2019). Die Aktivierung von STK38 beeinflusst eine ganze Reihe von Prozessen und die phosphorylierenden vorgeschalteten Kinasen spielen somit eine entscheidende Rolle. Interessanterweise scheint jede Funktion von STK38 von einem anderen Mitglied der Serin-Threonin-Kinase-Familie reguliert zu werden, was auf eine starke Abhängigkeit der NDR-Kinase-Funktionen von verschiedenen Eingangssignalen hinweist: Während die vorgeschalteten Kinase STK24 STK38 in der G1-Phase des Zellzyklus kontrolliert, reguliert STK4 die Kinase STK38 im Zusammenhang mit der Zentrosomen-Duplikation in der frühen S-Phase (Cornils et al., 2011; Hergovich, 2016; Vichalkovski et al., 2008). In Herzmuskelzellen trägt STK38 zur Proteinhomöostase bei, indem es die Aktivierung des RNA-bindende Protein RBM24 vermittelt. RBM24 ist ein wichtiger Regulator für die Herzentwicklung und die Zytoskelettbildung in Herzmuskelzellen (Klimek et al., 2019; Liu et al., 2017). Des Weiteren zeigt STK38 spezifische Wirkungen auf die Autophagie bzw. die Autophagosomenbildung. STK38 wurde als positiver Regulator der durch Hunger induzierten Autophagie identifiziert. So bewirkt Nahrungsmangel die Phosphorylierung von STK38 an Threonin 444, aufgrund dessen es zur Interaktion der Exozystkomponenten Exo84 mit Beclin1 und RalB kommt. Diese sind notwendige Komponenten für die Autophagosomenbildung (Joffre et al., 2015; Martin et al., 2021a). STK38 stimuliert so die hungerinduzierte Autophagie. Die Mitophagie, ein autophagischer Abbauweg für beschädigte Mitochondrien, wird ebenso durch STK38 aktiviert (Bettoun et al., 2016). Für die BAG3-vermittelte Autophagie hat STK38 jedoch eine inhibierende Wirkung. Hierbei kommt es durch die Interaktion von STK38 und BAG3 zu einer Umstrukturierung des Chaperon-Komplexes, indem die Interaktion von BAG3 mit HSPB8 und SYNPO2 unterbrochen wird. Entgegen der Bedeutung der Kinaseaktivität von STK38 für verschiedene zelluläre Prozesse wie der hungerinduzierten Autophagie, vermittelt STK38 die Umstrukturierung des Chaperon-Komplexes unabhängig von der Kinaseaktivität (Klimek et al., 2019).

Indem STK38 in unterschiedlicher Weise auf verschiedene Autophagiewege regulatorisch einwirkt, kann es anscheinend als zellulärer Schalter zwischen diesen Autophagiewegen agieren und Auf- und Abbau-Prozesse während der Zytoskeletthomöostase koordinieren (Klimek et al., 2019).

1.6 Abbau unabhängige Funktionen von BAG3

Neben der Funktion als NEF oder als Cochaperon bei der selektiven Autophagie hat BAG3 noch weitere Funktionen, die zur Aufrechterhaltung der Proteostase beitragen.

So interagiert BAG3 über seine N-terminale WW-Domäne mit verschiedenen Signalproteinen des Hippo-Signalwegs und sorgt durch die Bindung der Inhibitoren LATS1/2 und AMOTL1/2 für die Freisetzung der Transkriptions-Co-Aktivatoren YAP und TAZ (Kathage et al., 2017; Salah and Aqeilan, 2011; Ulbricht et al., 2013). Diese wandern in den Zellkern und stimulieren dort die Transkription von Filamin. BAG3 ermöglicht so die Erhaltung des Aktinzytoskeletts unter mechanischer Belastung.

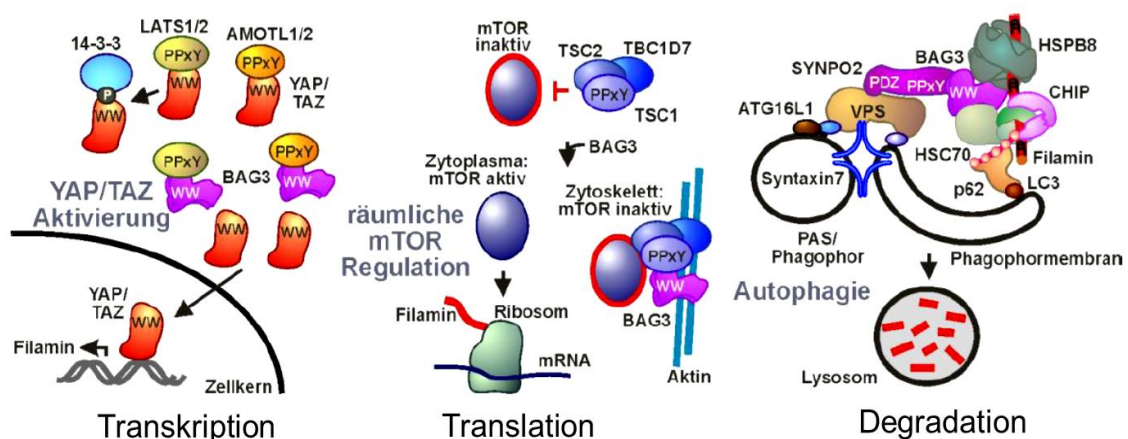


Abbildung 5: BAG3 vermittelte Regulation der Transkription, Translation und der Degradation.

BAG3 ist für den Erhalt der Proteostase entscheidend und vermittelt dabei die Transkription, Translation und die Degradation. Links: Die Bindung von BAG3 über die WW-Domäne an das PPXY-Motiv der Hippo-Signalweg Proteine AMOTL1/2 und LATS1/2 ermöglichen die Freisetzung von YAP/TAZ. Diese können so in den Zellkern wandern und dort die Transkription von Filamin stimulieren. Mitte: BAG3 bindet am Zytoskelett an den TSC-Komplex und inhibiert dort mTOR, sodass Proteine am Zytoskelett autophagisch abgebaut werden können. Im Zytosol liegt mTOR weiterhin aktiv vor und regt dort die Translation von Filamin an. Rechts: Der CASA-vermittelte Filamin-Abbau benötigt die Interaktion von BAG3 mit den Hitzeschockproteinen HSPB8 sowie HSC70. Diese binden beschädigtes/entfaltetes Filamin. Durch die Interaktion von BAG3 mit SYNPO2 werden phagophorbundene Proteine an den Komplex rekrutiert und es kommt zum Abbau von Filamin (verändert nach Kathage et al., 2017).

Des Weiteren interagiert BAG3 am Zytoskelett mit dem TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*)-Komplex und es kommt lokal zur Hemmung von mTOR (*mechanistic target of rapamycin*). Diese Hemmung von mTOR führt zur Induktion von CASA an den mechanisch belasteten Stressfasern. Im Zytosol bleibt mTOR jedoch aktiv und stimuliert dort die Proteintranslation von Filamin (Kathage et al., 2017)(Abb.5). Im menschlichen Muskel kommt es durch maximale exzentrische Übungen zu einer sofortigen Induktion der BAG3-Transkription sowie der CASA-Aktivität. Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung von mTOR und TSC wird zu Aktin-verankernden Strukturen im beanspruchten menschlichen Muskel rekrutiert (Kathage et al., 2017; Ulbricht et al., 2015). So kann die BAG3-vermittelte TSC-Sequestrierung auch als entscheidender Schritt in der Muskeladaptation an mechanische Belastung angesehen werden, der mTOR aktiviert, um die Proteinsynthese zu stimulieren und die Muskelmasse so zu erhöhen (Kathage et al., 2017).

1.7 Muskelzellen als Modell zur Analyse von kraftinduzierten Veränderungen

Muskeln repräsentieren die größte Gewebegruppe im Körper von Menschen und Tieren. Sie ermöglichen Bewegung und unterstützen Abläufe im Körper. Die Kraftgenerierung, um beispielsweise zu gehen, geschieht in Muskelzellen, weshalb der Funktionsverlust oder der Verlust der regenerativen Eigenschaften von Muskelzellen zu einer Schwächung des Bewegungsapparates führen (Chal and Pourquié, 2017). Muskelzellen können in drei Gruppen unterteilt werden: den Herzmuskelzellen, den Glattmuskelzellen und den Skelettmuskelzellen. Die Skelettmuskulatur kann als einzige Gruppe bewusst durch den Organismus kontrolliert werden (Chal and Pourquié, 2017). Die Skelettmuskulatur setzt sich aus Bündeln von gestreiften Muskelfasern (Synzytien) zusammen. Diese Muskelfasern entstehen durch die Verschmelzung von Muskelvorläuferzellen (Myoblasten) zu mehrkernigen Myotuben, die letztlich zur Bildung von Muskelfasern führen (Abb. 6). Die Skelettmuskulatur ist plastisch und anpassungsfähig, sodass die Muskelmasse bei anspruchsvollen Übungen an Größe zunimmt und bei Immobilisation oder während des Alterns und bei Krankheiten abnimmt (Orfanos et al., 2016). Um die Adaptation von Muskelzellen an mechanische Belastung zu analysieren, haben Orfanos *et al.* (2016) ein System entwickelt, das Muskelzellen *in vitro* durch elektrische Puls-Stimulierung (EPS) zur Kontraktion anregt.

Durch eine Veränderung der EPS-Parameter können in differenzierten Mausmuskelzellen unterschiedliche Belastungen und Trainingsprogramme nachgeahmt werden und Einblicke in resultierende physiologische Anpassung gewonnen werden (Abb. 6).

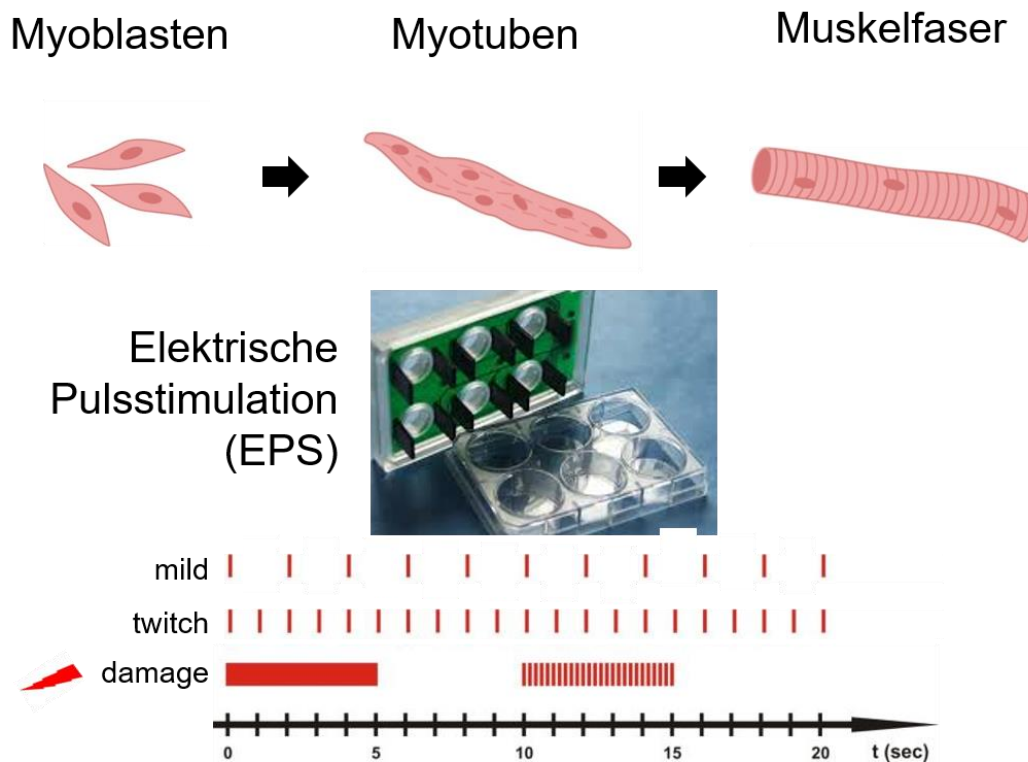


Abbildung 6: Myogenese und elektrische Pulsstimulationsprogramme.

Die Skelettmuskulatur besteht aus Muskelfasern. Während der Bildung der Muskelfasern, der Myogenese differenzieren Muskelvorläuferzellen, die Myoblasten zu Myotuben. Diese Myotuben wiederum verschmelzen zu Muskelfasern. Myotuben und Muskelfasern können durch EPS zur Kontraktion in Kulturschalen anregt werden. Die Programme, die zur Kontraktion in Myotuben führen sollen, können in ihrer Dauer, Frequenz und Amplitude variieren.

Durch exzentrisches Training kommt es zu fokalen Störungen in den Muskelfasern, die als Läsionen bezeichnet werden. Diese Läsionen zeigen mechanische Beschädigung bzw. Umbau in Muskelfasern auf und können gezielt durch *damage* und *twitch* EPS-Programme in kultivierten Myotuben induziert werden (Orfanos et al., 2016). Die molekularen Auswirkungen von mechanischer Stressbelastung auf die Proteostase in Muskelzellen können so anhand der kontrahierenden Muskelzellen analysiert werden.

1.8 Zielsetzung

Der BAG3-vermittelte Abbau von fehlgefalteten oder beschädigten Proteinen über CASA ist für die korrekte Bildung sowie den Erhalt von Muskelgewebe essentiell. Diese Arbeit soll die Differenzierungs- und Kraft-abhängige Regulation der CASA-Maschinerie in murinen Muskelzellen aufdecken. Hierzu soll die EPS-Behandlung, als Modell zur Induktion von Stressbelastung in Mausmuskelzellen genutzt werden und induzierte Veränderungen der Proteostase-Maschinerie durch biochemische und zellbiologische Untersuchungen analysiert werden. Ein besonderes Augenmerk gilt der Identifizierung neuer Klientenproteine, Regulatoren und Kooperationspartner der CASA-Maschinerie. Durch siRNA-vermittelte Depletion von BAG3 wird die Bedeutung für die Proteostase in Mausmuskelzellen verifiziert.

2 Material

2.1 Geräteliste

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugsystem	HLC Biotech
Autoklav	Tuttnauer Systec
Äkta Purifier	Amersham
BioPhotometer Plus	Eppendorf
Blot-Apparatur Mighty Small Transphor	Amersham
C-Pace EP	Ion Opitx
Eismaschine MF22	Scotsman
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham
Entwicklermaschine	CURIX 60 AGFA
Feinwaage SI-234	Denver Instruments
Gefrierschrank (-80 °C)	Forma Scientific
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	Heildolph
Mikrowelle	Bosch

Milli-Q-Plus Reinstwasseranlage	Merck
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhelfer accu-jet pro	BRAND GmbH + CO KG
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	VWR
Thermoschüttler	Medline Scientific
TrayCell™	Hellma®
Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher Ultrasound Technology
Ultrazentrifuge Optima Max	Beckman Coulter
Vortex	Scientific Industries
Waage	KernKB
Wasserbad	Lauda/Grant
Zellkulturschalen	Sarstedt
Zentrifuge mini	VWR

2.1 Chemikalienliste

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Roth
3-Aminophthalhydrazid (Luminol)	Fluka
30 % H ₂ O ₂	Roth
Acrylamid (30 %)/bis-Acrylamid	Roth

Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin (Amp)	Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma Aldrich
Bacto-Hefeextrakt	Roth
Bacto-Trypton	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BSA (Bovine Serum Albumin)	Roth
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Roth
Complete EDTA-free	Roche
Coomassie Brillant blue R250	Sigma Aldrich
Cycloheximid	Sigma Aldrich
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	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

Imidazol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Kanamycin	Roth
M2-Agarose	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
MOPS	Roth
Natrium Pyruvat	Gibco
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdeoxycholat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco
Nonidet P-40 substitute	Sigma Aldrich
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
p-Cumarsäure	Sigma
Penicillin	Life Technology
Pferdeserum	Gibco
Phenolrot	Invitrogen
PhosSTOP Easypack	Roche
Ponceau S	Roth
Protein-G-Sepharose	GE Healthcare
Salzsäure (HCl)	Roth
Streptomycin	Life Technology

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Thermo Scientific
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tris	Roth
Triton X100	Roth
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco
Tween-20	Sigma Aldrich

2.2 Reagenzsysteme

Tabelle 3: Verwendete molekularbiologische Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren
InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit	Stratagene
Gel Filtration Calibration Kits High & Low Molecular Weight	Cytvia

2.3 Bakterien- und Säuger-Stämme

Tabelle 4: Verwendete Bakterien und eukaryotischen Zellen

Bezeichnung	Hersteller
<i>E. coli</i> TG1	Stratagene
C2-Zellen	Murine Myoblasten (Fähigkeit zur Differenzierung)

2.4 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller / Katalognummer
BAG3	Kaninchen	Proteintech / 10599-1-AP
DESMIN	Maus	AG Fürst
Filamin C (FLN)	Kaninchen	AG Fürst

FILIP1	Kaninchen	Sigma Aldrich / HPA053564
FILIP1L	Kaninchen	AG Fürst
HSPB1	Maus	Proteintech / 66767-1-Ig
HSPB8	Kaninchen	St John´s Lab / STJ24102
HSPB5	Kaninchen	Cloud Clone Corp. / PAC944Hu01
p(Ser59) HSPB5 (α B-Crystallin)	Kaninchen	Enzo / ADI-SPA-227-F
p62	Meerschweinchen	Progen / GP62-C
STK38	Maus	Abnova / H00011329-M03
SYNPO2	Kaninchen	AG Fürst
RhoA	Kaninchen	Cell Signaling / 10749-1-AP

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper

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

2.5 Plasmide

Tabelle 7: Verwendete Plasmide zur Amplifikation oder Expression in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen

Plasmide	Beschreibung
pcDNA3.1-BAG3	<i>bag3</i> -DNA wurde über die Schnittstellen XhoI und EcoRI in pcDNA3.1(+) kloniert

2.6 Oligonukleotide

Tabelle 8: Verwendete *short interfering* RNA (siRNA) zur spezifischen Depletion von Genprodukten

Genprodukt	Name der siRNA	Spezies	Hersteller
BAG3	Mm_BAG3_2+3 SI00208432 SI00208439	Maus	Qiagen
Allstars	Negativ Kontrolle SI03650318	-	Qiagen

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

3.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

LB-Medium (mit Ampicillin/Kanamycin)

1 % Bacto-Trypton

0,5 % Bacto-Hefeextrakt

0,5 % NaCl

pH 7,5 → autoklavieren

1:1000 Ampicillin [200 mg/ml]/Kanamycin
[50 mg/ml]

LB-Agar (mit Ampicillin/Kanamycin)

1 % Bacto-Trypton

0,5 % Bacto-Hefeextrakt

0,5 % NaCl

1,5 % Bacto-Agar

pH 7,5 → autoklavieren

1:1000 Ampicillin [200 mg/ml]/Kanamycin
[50 mg/ml]

Um Plasmide zu amplifizieren wurde der Bakterienstamm *E. coli* TG1 verwendet. Hierzu wurde flüssiges LB Medium mit Ampicillin oder Kanamycin versetzt und die Bakterien über Nacht bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Hierzu wurden entweder Klone gepickt oder von einer Übernachtskultur in 300 ml LB Medium angeimpft. Das Selektionsantibiotikum Ampicillin oder Kanamycin diente dabei zur spezifischen Amplifikation des gewünschten Plasmids, da nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, auch wachsen konnten.

3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Um die Aufnahme von Plasmiden in Bakterien zu erreichen, mussten *E. coli* TG1 Zellen chemisch kompetent gemacht werden. Hierzu wurden 100 ml einer LB-Flüssigkultur mit einer 2 ml Übernachtskultur angeimpft. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD600 von 0,3.

Bei dieser OD befinden sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase. Diese wurden daraufhin für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C bei 4.000 rpm und der Überstand wurde verworfen. Um die chemische Kompetenz der Bakterienzellen zu induzieren wurde das Zellpellet in 10 ml 0,1 M MgCl₂ resuspendiert. Die nun chemisch kompetenten Bakterien wurden erneut für 10 min bei 4°C und 4.000 rpm abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 20 ml einer 0,1 M eiskalten CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weitere Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4 °C für 10 min. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 1 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerin aufgenommen und als 100 µl Aliquot bei -80 °C eingefroren.

3.1.3 Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli*

Chemisch kompetente *E. coli* TG1 Bakterien wurden zur Amplifikation von Plasmiden genutzt. Hierzu wurden die Bakterien mit 1 µg aufgereinigtem Plasmid versetzt und das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C für 42 s durchgeführt und die Bakteriensuspension anschließend mit 1 ml LB Medium versetzt. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C und 350 rpm. Dieser Schritt diente zur Regeneration der Zellen bzw. benötigen die Zellen diese Zeit zur Expression des Resistenzgens. Anschließend wurden die Zellen bei 5.000 rpm für 1 min abzentrifugiert und in ca. 50 µl des Überstandes resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

3.2.1 Kultivierung von C2-Zellen

Proliferationsmedium für C2-Zellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium
(DMEM)

(+4,5 g/L Glucose, - L-Glutamine, -
Pyruvat)

15 % FCS

2 % Natrium-Pyruvat

1 % nicht essenzielle Aminosäuren
(NEAA)

100 IU/ml Penicillin/ Streptomycin

Die Kultivierung der murinen Myoblasten C2-Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden ca. alle 2 Tage bei einer Konfluenz von 80 % in neue Kulturgefäße umgesetzt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA benetzt und für 2-3 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in Medium resuspendiert und bei ca. 2.000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension im Verhältnis 1:6 oder 1:10 in neue Zellkulturschalen überführt.

3.2.2 Differenzierung von C2-Zellen zu Myotuben

Differenzierungsmedium für C2-Zellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium
(DMEM)

(+4,5 g/L Glucose, - L-Glutamine, -
Pyruvat)

2 % Pferdeserum

2 % Natrium-Pyruvat

1 % nicht essenzielle Aminosäuren
(NEAA)

100 IU/ml Penicillin/ Streptomycin

Die Differenzierung von C2-Zellen fand bei einer Konfluenz ab 90 % statt. Hierzu wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben wurde durch die Zugabe von Differenzierungsmedium induziert und als Tag 0 der Differenzierung gezählt. Anschließend wurde täglich das Differenzierungsmedium gewechselt. Für C2-Zellen konnten abhängig vom Differenzierungsstatus an Tag 5 spontane Kontraktionen der Myotuben beobachtet werden und die Myotuben für weiter Analysen genutzt werden.

3.2.3 Transfektion mittels JetPRIME® Reagenz

Zur Überexpression oder Depletion von Proteinen in C2-Zellen erfolgte eine transiente Transfektion von DNA bzw. siRNA mittels JetPRIME® Reagenz von Polyplus transfection®. Die Transfektion wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Für C2-Zellen wurden die Zellen am Tag 0 der Differenzierung nach Herstellerangaben für 6-well Schalen transfiziert.

Um eine bessere Transformationseffizienz über den Zeitraum der Differenzierung der Zellen zu gewährleisten, wurden diese erneut nach dem Differenzierungsmediumwechsel an Tag 2 der Differenzierung transfiziert.

3.2.4 Behandlung mit Inhibitoren in eukaryotischen Zellen

Um den autophagischen Abbau der Proteine zu hemmen, wurden die Zellen mit E64d/PepstatinA behandelt. Diese Inhibitoren komplexieren spezifisch mit den lysosomalen Proteasen und verhindern so deren enzymatische Aktivität (Yang et al., 2013). Während E64d Cystein-Proteasen hemmt, inhibiert PepstatinA die sauren Proteasen. Für die Behandlung der C2-Zellen wurde eine Endkonzentration von 5 µg/ml an Inhibitor verwendet. Hierzu wurde ein Ansatz aus in DMSO gelöstem E64d und in Ethanol gelöstem PepstatinA zu den differenzierten C2-Zellen pipettiert und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Darüber hinaus wurde auch der Autophagie-Inhibitor Ammoniumchlorid (NH₄Cl) zur Behandlung der C2-Zellen genutzt. Die schwache Base Ammoniumchlorid inhibiert durch Lumenalkalisation die Fusionierung des Lysosoms und dadurch die Degradierung des Autophagosoms (Hart and Young, 1991; Yang et al., 2013).

C2-Zellen wurden auch mit Cycloheximid behandelt. Diese Substanz inhibiert die Proteintranslation, indem es die Peptidübertragung auf die t-RNA und gleichzeitig deren Translokation an den Ribosomen verhindert (Obrig et al., 1971). Hier wurde eine Konzentration von 100 µM eingesetzt, um den Proteinabbau im Immun-Blot sichtbar zu machen.

Tabelle 9: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration
E64d	5 µg/ml
Pepstatin A	5 µg/ml
Cycloheximid	100 µM
NH ₄ Cl	20 mM

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Um Plasmide aus *E. coli* TG1 zu präparieren wurden die Bakterien zuvor durch Hitzeschock mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert oder in einer 3 bis

5 ml Vorkultur über Nacht angezogen. Darauffolgend wurde eine 300 ml-Kultur mit passendem Antibiotikum angezogen, um eine Maxi-Präparation des Plasmids durchzuführen. Hierzu wurde das Protokoll für NucleoBond® Xtra Maxi Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch am Nano-Drop (TrayCell) der Firma Hellma. Um den Gehalt von Nukleinsäuren in einer Lösung zu bestimmen, wird der Absorptionswert der Lösung bei 260 nm (A_{260}) verwendet, für Proteine bei 280 nm. So ergibt sich für eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration für RNA bei 40 ng/ μ l und bei doppelsträngiger DNA von 50 ng/ μ l. Die Quotientenbildung zur Ermittlung der Reinheit erfolgte durch das Nano-Drop™. Hierzu wurden die Quotienten aus OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} gebildet. Bei einem Wert von 1,8 wurden die DNA Präparationen als sauber erachtet, für RNA lag der Wert bei 2,0.

3.3.3 Sequenzierung

Um die korrekte DNA-Abfolge in Plasmiden zu überprüfen, wurden diese sequenziert. Die Sequenzierung wurde bei Eurofins Genomics Germany GmbH in Auftrag gegeben und nach dem Sanger-Sequenzierungsverfahren durchgeführt. Hierzu wurden die Plasmide in einer Konzentration von 0,05 μ g/ μ l und einem Volumen von 20 μ l verschickt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

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 "PhosSTOP" Phosphatase-Inhibitor
1x "Complete"-Protease-Inhibitor-Cocktail
3x SDS-Probenpuffer
0,1 M Tris/HCl
10 % Glycerin
3 % SDS
2 % Mercaptoethanol
0,05 % Bromphenolblau

Um die Auswirkungen der Überexpression oder Depletion sowie von Elektrostimulation (Kap. 3.5.1) auf Proteine in eukaryotischen Zellen zu analysieren wurden diese, wie in Kapitel 3.2.5 transfiziert. Zur Analyse der Auswirkung wurden im Regelfall 24 h nach der zweiten Transfektion oder unmittelbar nach der Elektrostimulation Proteine aus den Zellen extrahiert. Zur Isolation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen wurden diese einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml kaltem PBS mittels eines Zellschabers von der Zellkulturplatte gelöst. Die Zellsuspension wurde für 3-5 min bei 4°C und 13.200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RIPA-Lysepuffer resuspendiert, 3x für 10 s sonifiziert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Das Lysat wurde darauffolgend für 20 min bei 4 °C und 13.200 rpm zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung der im Überstand befindlichen Proteine, erfolgte nach dem Bradfordtest (siehe Kapitel 3.4.2). Die Proteinmenge wurde in RIPA-Puffer und dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer eingestellt.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Zelllysate erfolgte nach dem kolorimetrischen Bradfordtest (Ernst and Zor, 2010). Diese Methode beruht auf der Komplexbildung von *Coomassie Brilliant blue* G-250 mit den isolierten Proteinen. Dabei verschiebt sich das Absorptionsspektrum des ungebundenen *Coomassie Brilliant blue* G-250 von 465 nm zu 595 nm. Die Konzentration von Proteinen kann somit über die Zunahme des Absorptionsmaximums bei 595 nm photometrisch detektiert werden. Für den Bradford-Assay wurden 1 µl Proteinlysate mit 19 µl H₂O und 980 µl Bradford-Reagenz versetzt und nach einer Inkubation für 3-5 min bei Raumtemperatur im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm

gemessen. Für den Leerwert wurde Wasser anstatt des Proteinlysats pipettiert. Das Photometer wurde zuvor mit Hilfe einer Standard- γ -Globulin-Verdünnungsreihe geeicht.

3.4.3 TCA-Fällung

Um Proteinproben zu Konzentrieren wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden dazu mit 50 %iger TCA Lösung auf eine 12,5 %ige Konzentration eingestellt und anschließend für mindestens 30 min oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch die darauffolgende Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C pelletiert. Der TCA-haltige Überstand wurde komplett entfernt und das Proteinpräzipitat anschließend in SDS-Probenpuffer gelöst. Durch Gelbfärbung des Probenpuffers war ein pH-Wert *Shift* der Probe als sauer erkennbar, dieser wurde durch Zugabe von 1-2 μ l 1M pH 9,0 Tris-Base neutralisiert.

3.4.4 Gelfiltration mittels einer Superose 6 Säule

Lysepuffer
20 mM MOPS pH 7,2
100 mM KCl
1 mM EDTA
0,5 % Tween
Equilibrationspuffer
20 mM MOPS pH 7,2
100 mM KCl
0,5 mM EDTA

Mit Hilfe der Gelfiltration oder Größenausschluss-Chromatographie lassen sich Proteine anhand ihres molekularen Gewichts aufteilen. Hierbei ist es möglich ein Proteingemisch unter nativen Bedingungen zu fraktionieren und Protein-Protein Interaktionen zu erhalten. Je nach Größe der Proteine oder Proteinkomplexe durchlaufen diese das Säulenmaterial schneller oder langsamer. Dabei werden kleine Proteine oder Proteinkomplexe stärker vom Säulenmaterial zurückgehalten als Große. Mit der verwendeten Superose 6 10/300 GL Säule (24 ml Säulenvolumen) können Moleküle und Proteinkomplexe mit Molekulargewichten

zwischen 5.000 und 5.000.000 Da analysiert werden. Die Säule wurde dazu an einen Äktapurifier angeschlossen und die Steuerung erfolgte über die Unicorn Software. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor dem Gebrauch sterilfiltriert und entgast, um ein Verstopfen der Säule durch Partikel oder Lufteinschluss zu vermeiden. Alle Puffer und Lösungen wurden zusätzlich bei 4 °C gekühlt. Die Pumpen und Schläuche des Äktapurifiers wurden vor Gebrauch mit Equilibrierungspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 10 ml gespült. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen und einer Flussrate von 0,2 ml/min vor Beginn der Chromatographie equilibriert. Für die Chromatographien wurden je 50 µl des Lysats aus EPS stimulierten und unstimulierten C2-Zellen (Kapitel 3.5.1) mit Proteinkonzentrationen zwischen 4-7 µg verwendet. Hierzu wurden pro Ansatz 2 wells von differenzierten C2-Zellen benötigt. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mittels Zellschaber vom Kulturgefäß abgelöst. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das resultierende Zellpellet wurde dreimal für 20 s sonifiziert und in 350 µl Lysepuffer für 30 min auf Eis lysiert, anschließend wurde für 30 min bei 4 °C und 100.000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 0,2 ml/min und einem Druck von etwa 0,5 MPa. Es wurden 40 Fraktionen von 5 ml bis 25 ml mit einem Volumen von 500 µl gesammelt und die Proteine in diesen Fraktionen wurden mit TCA (siehe Kapitel 3.4.3) ÜN bei 4 °C gefällt. Die Pellets wurden anschließend entweder in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels Western Blot (Kapitel 3.4.4, Kapitel 3.4.5 und 3.4.6) analysiert oder zur weiteren Analyse der Proteinkomplexe mittels Massenspektrometrie zu Prof. Dr. Pitter Huesgen nach Jülich gebracht.

Die Kalibrierung der Säule zur tatsächlichen Feststellung der Elutionsvolumen der einzelnen Proteine erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Gel Filtration Kit von Cytvia. Der Lauf wurde wie zuvor beschrieben bei den gleichen Bedingungen und Puffern mit einem Volumen von 30 ml ohne Fraktionssammlung durchgeführt.

Tabelle 10: Verwendete Kalibrierungsproteine

Kalibrierungsproteine	Molekulargewicht in kDa	Elutionsvolumen in ml
Thyroglobulin	660	11,2
Ferritin	440	14,8
Aldolase	158	16,2
Ovalbumin	44	18,3
Ribonuklease A	13,7	19,4

3.4.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE

3x SDS-Probenpuffer
0,1 M Tris/HCl
10 % Glycerin
3 % SDS
2 % Mercaptoethanol
0,05 % Bromphenolblau
Laufpuffer
25 mM Tris
190 mM Glycin

Tabelle 11: Trenngel nach Laemmli - Mengenangaben für ein Gel

Trenngel nach Laemmli (für 1 Gel)			
Gelkonzentration	7,5%	12,5 %	15 %
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	1,51 ml	1,52 ml	1,52 ml
30 % Acrylamid	1,51 ml	2,52 ml	3,02 ml
H ₂ O	2,89 ml	1,87 ml	1,37 ml
10 % SDS	89 µl	89 µl	89 µl
10 % APS	39 µl	39 µl	39 µl
TEMED	3,8 µl	3,8 µl	3,8 µl

Tabelle 12: Sammelgel nach Laemmli - Mengenangaben für ein Gel

Sammelgel nach Laemmli (für 1 Gel)	
1,5 M Tris/HCl, pH 6,5	400 µl
30 % Acrylamid	266 µl
3 % SDS	882 µl
H ₂ O	48 µl

Bei der *Sodium dodecyl sulphate*-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem molekularen Gewicht (kDa) in einem denaturierenden Verfahren aufgetrennt, in dem diese durch ein elektrisches Feld wandern. Die Eigenladung der Proteine wird dabei durch die negative Ladung des SDS im Probenpuffer überlagert. Das anionische Detergens SDS bricht außerdem die Sekundär- und Quartären-Proteinstrukturen auf. Das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol trägt ebenso zur Denaturierung bei, indem es als reduzierendes Thiol die stabilen Disulfidbrücken in Proteinen spaltet. Zusätzlich fand eine Hitzedenaturierung für 5 min bei 95 °C im Heizblock statt. Die Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel konnte so anhand der relativen Größe der Polypeptidketten erfolgen. Das Polyacrylamidgel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Im Sammelgel werden Proteine unterschiedlicher Proben auf einer Höhe gebündelt, um eine gleiche Ausgangslaufhöhe der Proben für das folgende Trenngel zu schaffen. Die Proteine wandern dabei mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aufgrund ihrer Größe durch die Poren des Polacrylamidgels in Richtung des Pluspols. Je kleiner die Proteine sind desto schneller wandern diese durch das Gel. Es wurden 60 μ g Protein pro Spur eingesetzt.

Der Gel-Lauf wurde bei einer Stromstärke von 20 - 30 mA pro Gel durchgeführt. Als Größenreferenz wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Scientific aufgetragen.

3.4.6 Western Blot

Transferpuffer
20 mM Tris
144 mM Glycin
20 % Methanol
0,01 % SDS

Um spezifische Proteine in einem Immun-Blot nachzuweisen wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine zuvor in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und in einer Tankblot-Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Orthogonal zum Gel wird eine Spannung angelegt, sodass sich die negativ geladenen Proteine von der Kathode (-) zur Anode (+) bewegen und auf der Membran haften bleiben. Dementsprechend wurde das Polyacrylamidgel beidseitig von je drei Whatmanpapern® umgeben und auf einer Nitrocellulose-Membran platziert.

Die Whatmanpaper® sowie die Nitrocellulose-Membran wurden zuvor in Transferpuffer equilibriert, welcher die Verbindung zwischen den Polen darstellt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 300 mA und 300 V für 90-100 min.

3.4.7 Immundekektion

TBST-Puffer

20 mM Tris/HCl pH 7,6

137 mM NaCl

0,006 % Triton X-100M Tris/HCl

Blockierungslösung

5 % Milchpulver/TBST oder
5 % BSA/TBST

Ponceau S Färbelösung

0,1 % Ponceau S

5 % Essigsäure

ECL Lösung A

45 ml H₂O

5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5)

110 ml 90 mM p-Cumarsäure

250 µl 250 mM Luminol

ECL Lösung B

900 µl H₂O

100 µl 30 % H₂O₂

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran kurz in Wasser gewaschen, um die Reste des Transferpuffers zu entfernen. Anschließend wurden alle Proteine unspezifisch mit Hilfe von Ponceau S ca. 2-5 min lang gefärbt und die Membran nach Entfärben mit H₂O gescannt.

Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, welcher reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet. Die temporäre Ponceau-S-Färbung wurde sowohl als Transferkontrolle sowie für die spätere Quantifizierung als Ladekontrolle verwendet. Um die Proteinbanden auf der Membran zu visualisieren bzw. zu detektieren wurde eine Immundetektion durchgeführt. Hierzu wurde anschließend an die Färbung die Membran 1 h in 5 %iger Blockierungslösung blockiert, um Hintergrundsignale durch unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Die primären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:500 in Blockierungslösung gegen das zu detektierende Protein eingesetzt und die Membran auf dem Schüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschrinen von je 5 min mit TBST erfolgte im Anschluss die Inkubation mit einem entsprechenden Peroxidasegekoppelten, sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000. Nach drei weiteren TBST-Waschschrinen erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenz-Reaktion unter Verwendung von ECL-Lösung. Das entstandene Lumineszenz-Signal wurde auf einem Röntgenfilm aufgefangen und entwickelt.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Erzeugung mechanischer Belastung in Myotuben mittels Elektrostimulation

Tabelle 13: Verwendete Elektrostimulationsprogramme (EPS)

<i>damage</i>	<i>mild twitch (adaptiert)</i>
10 V	10 V
10 ms	4 ms
15 Hz für 5 s	0,5 Hz
5 s Pause	
5 Hz für 5 s	
5 s Pause	

Die Elektrostimulation (EPS) der zu Myotuben differenzierten C2-Zellen erfolgte in 6-well Schalen. Hierfür wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.4 ausgesät und differenziert. Für die Erzeugung mechanischer Belastung werden die differenzierten Myotuben an Tag 4 bei transfizierten Zellen und an Tag 5 bei nicht transfizierten Zellen in der 6-well Schale mit einer C-Pace Einheit verbunden. Für die Dauer der Elektrostimulation werden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die durch die Elektrostimulation ausgelöste Kontraktionen der Myotuben wurden unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Die Zellen wurden, um unterschiedliche mechanische Belastungen zu simulieren, verschiedenen Stimulationen ausgesetzt. Dabei führt „*damage*“ EPS zu starker mechanischer Belastung in den Zellen und „*mild twitch*“ zu geringer mechanischer Belastung. Die Zeiten variierten jeweils nach der verwendeten Elektrostimulation zwischen 5 h und 16 h. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 3.4.1 geerntet.

3.6 Statistik

Die Signifikanzen wurden in Excel mit dem Student's t-Test berechnet. Die Experimente wurden bis zu einer Anzahl (n) von mindestens 5 in unabhängigen Durchläufen durchgeführt. Die Quantifizierung der Intensitäten im Immun-Blot erfolgte mit ImageJ und die darauffolgenden Berechnungen in Excel.

4 Ergebnisse

4.1 Myogenese umfasst eine Induktion der CASA-Maschinerie und weiterer Proteostase-Faktoren

Um einen Einblick zu erhalten, wie sich die Komponenten der CASA-Maschinerie bei der Muskelzell-Differenzierung verhalten, wurden isolierte murine Myoblasten in der Petrischale zu Myotuben differenziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen geerntet, Zellysate präpariert und mittels Immun-Blot analysiert.

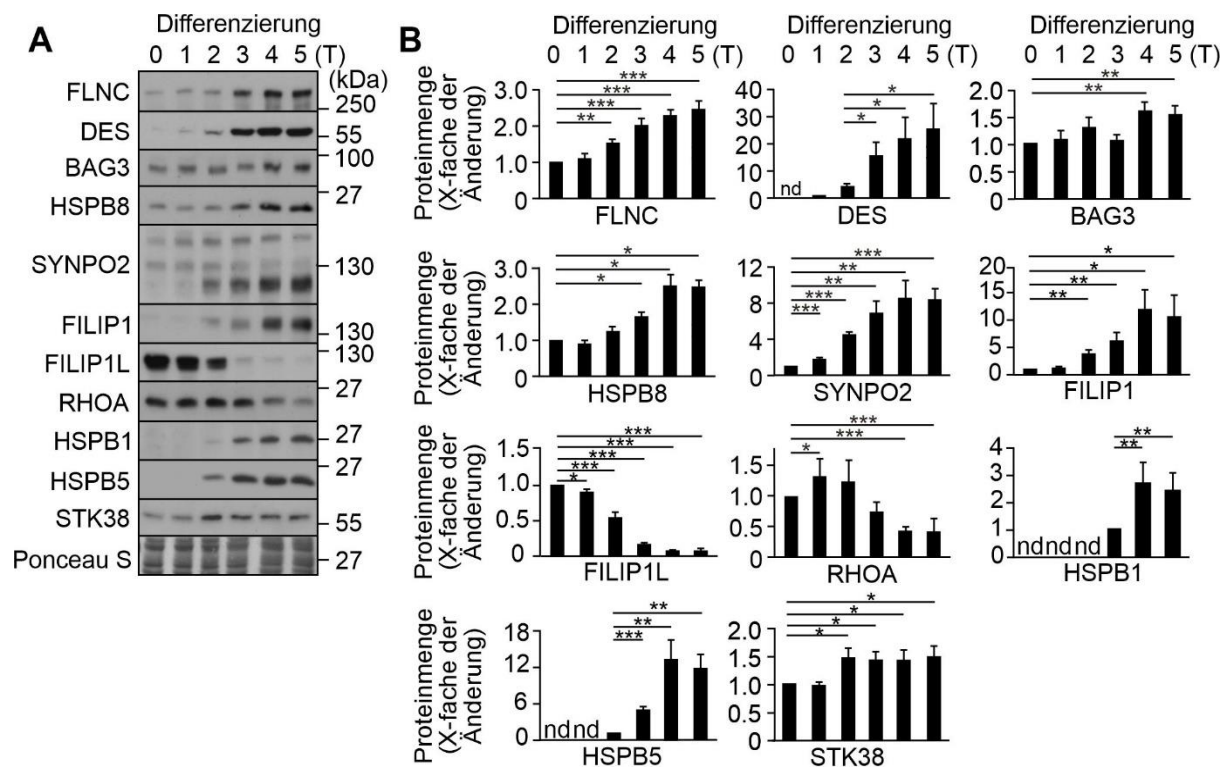


Abbildung 7: Expression von CASA-Komponenten, Zytoskelettproteinen und Proteostase-Faktoren während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben.

(A) Zur Analyse der Veränderungen in der Proteinmenge während des Differenzierungsprozesses wurden C2-Zellen 5 Tage lang kultiviert und nach je einem Differenzierungstag geerntet. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Detektion der verschiedenen Proteine erfolgte über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten der gleichen Probe normalisiert. Die Proteinmenge der undifferenzierten Zellen wurde, mit Ausnahme von HSPB1 und HSPB5, gleich eins gesetzt. Für HSPB1 wurde die Proteinmenge der Zellen an Differenzierungstag 3 gleich eins gesetzt, für HSPB5 an Differenzierungstag 2. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; $n \geq 5$ * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Im Rahmen der Differenzierung kommt es zu einer starken Zunahme des Zytoskelettproteins und CASA-Klienten FLNC. Gleiches gilt für das Intermediärfilament Desmin (Capetanaki et al., 1997). Die Daten belegen die erfolgreiche Differenzierung der Myotuben unter den gewählten experimentellen Bedingungen. Weiterhin konnten für die Komponenten der CASA-

Maschinerie BAG3, HSPB8 und SYNPO2 eine deutliche Zunahme der Proteinmenge während der Myogenese beobachtet werden (Abb. 7). Die Ausbildung des sarkomeren Zytoskeletts geht also mit einer Induktion der CASA-Maschinerie einher.

Für eine weitergehende Analyse wurden auch Antikörper gegen verschiedene andere Zytoskelett-Komponenten und Proteostase-Faktoren eingesetzt. Dazu zählen die Filamin-interagierenden Proteine FILIP1 und FILIP1L, die Zytoskelett-regulierende GTPase RhoA, die kleinen Hitzeschockproteine und BAG3-Bindepartner HSPB5 und HSPB1, sowie die BAG3-regulierende Kinase STK38.

Die Proteinmengen von FILIP1 und dem verwandten Protein FILIP1L entwickeln sich während der Differenzierung gegenläufig. Für FILIP1L zeigte sich eine starke Abnahme während die FILIP1 Expression im Verlauf der Differenzierung, stark anstieg. Ein Rückgang der Expression wurde auch für die GTPase RhoA beobachtet. Die kleinen Hitzeschockproteine HSPB1 und HSPB5 waren in Myoblasten nicht detektierbar, zeigten aber eine sehr starke Zunahme zum Ende der Differenzierung (Abb. 7B).

Für die CASA-inhibierende Kinase STK38 wurde eine Zunahme der Proteinmenge bis zu Tag 2 der Differenzierung beobachtet, ab Tag 3 blieb die Proteinmenge hier annähernd gleich (Abb. 7).

Es wird deutlich, dass die Assemblierung sarkomerer Strukturen während der Myogenese mit signifikanten Veränderungen in der Expression der CASA-Maschinerie und weiterer Proteostase-Faktoren einhergeht.

4.2 In differenzierten Myotuben wird CASA aktiviert

Es sollte untersucht werden, ob die erhöhte Expression der CASA-Komponenten in differenzierten Myotuben auch zu einer Aktivierung des CASA-Abbauweges führt. Hierfür wurden Myoblasten und Myotuben für 3 h mit den Proteaseinhibitoren (vgl. Kap. 3.2.4) Pepstatin A und E64d behandelt. Diese hemmen die lysosomalen Proteasen und verhindern so den Proteinabbau. Aus dem Verhältnis der Proteinmengen der behandelten und unbehandelten Zellen kann ein Abbau abgeleitet werden. Ist die Proteinratio größer als 1 findet ein autophagischer Abbau statt.

Für das CASA-Substrat FLNC war in Myotuben ein geringer, aber deutlicher Umsatz sichtbar (Abb. 8). Da nur ein Teil der gesamten Filaminmoleküle eine Abbau-induzierende Schädigung erfährt, waren niedrige Umsatzraten zu erwarten gewesen. BAG3 und SYNPO2, welche beide beim autophagischen Abbau über CASA selbst mit abgebaut werden, zeigten eine deutliche, in Myotuben induzierte Umsatzrate (Abb. 8).

Die erzielten Werte waren dabei ähnlich zu dem Wert, der für den Autophagie-Marker p62 ermittelt wurde: ~1,5-fache Zunahme nach Autophagie-Inhibition für 3 h. Die Daten belegen, dass die Differenzierung der Myotuben zu einer Aktivierung des CASA-Abbauwegs führt.

Interessant ist dabei auch eine Betrachtung der Abbauraten in undifferenzierten Myoblasten, Die gering exprimierten CASA-spezifischen Komponenten BAG3 und SYNPO2 sind in dieser Situation nicht aktiv an Abbauvorgängen beteiligt, wie den nicht-signifikant über 1 liegenden Abbauraten zu entnehmen ist. Für den Autophagie-Adapter p62, der neben CASA auch an anderen Formen der selektiven Autophagie beteiligt ist, ist demgegenüber jedoch schon in Myoblasten ein Umsatz nachweisbar.

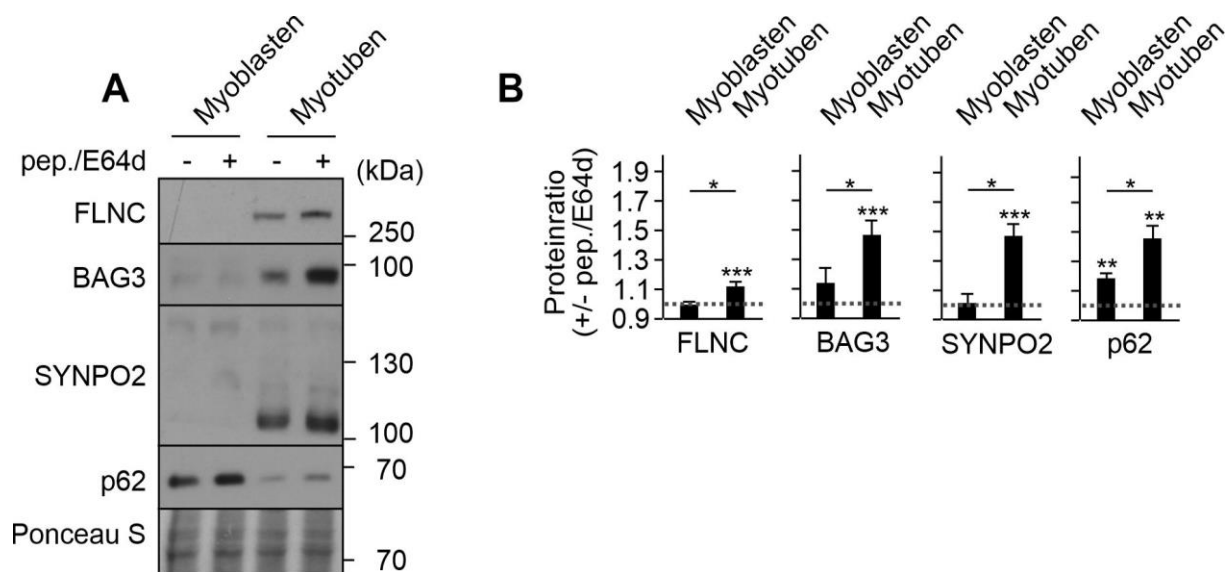


Abbildung 8: Autophagischer Abbau des CASA-Substrats FLNC und der Komponenten der CASA-Maschinerie in Myoblasten und Myotuben.

(A) C2-Zellen wurden 5 Tage lang kultiviert. Es wurden zu Beginn Myoblasten und an Differenzierungstag 5 Myotuben geerntet. C2-Myoblasten sowie Myotuben wurden, wenn angegeben mit den Proteaseinhibitoren Pepstatin A und E64d (pep./E64d je 5 µg/ml pro Inhibitor) für 3 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten der gleichen Probe normalisiert. Aus den Proteinmengen wurde die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; n ≥ 5; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

4.3 In differenzierten Myotuben werden neben CASA-Komponenten auch weitere Proteostase-Faktoren autophagisch umgesetzt

Für das kleine Hitzeschockprotein HSPB8, welches mit BAG3 interagiert und als Teil der CASA-Maschinerie selbst mit abgebaut wird, wurde ebenfalls ein deutlich erhöhter Umsatz in Myotuben festgestellt (Abb. 9). Dies belegt weiterhin die Aktivierung von CASA im Zuge der Muskelzell-Differenzierung.

Die kleinen Hitzeschockproteine HSPB5 und HSPB1 sind als Bindepartner von BAG3 in der Literatur beschrieben worden, aber wurden noch nicht als Partnerproteine von BAG3 im Zuge der Autophagie identifiziert. Interessanterweise, konnte für beide Chaperone ein signifikanter autophagischer Umsatz in Myotuben festgestellt werden (Abb. 9). Für HSPB5 wurde zusätzlich, die durch posttranslationale Modifikationen an Serin 59 phosphorylierte Form von HSPB5 analysiert. Für diese phosphorylierte Form von HSPB5 war in Myoblasten kein autophagischer Abbau nachweisbar (Abb. 9).

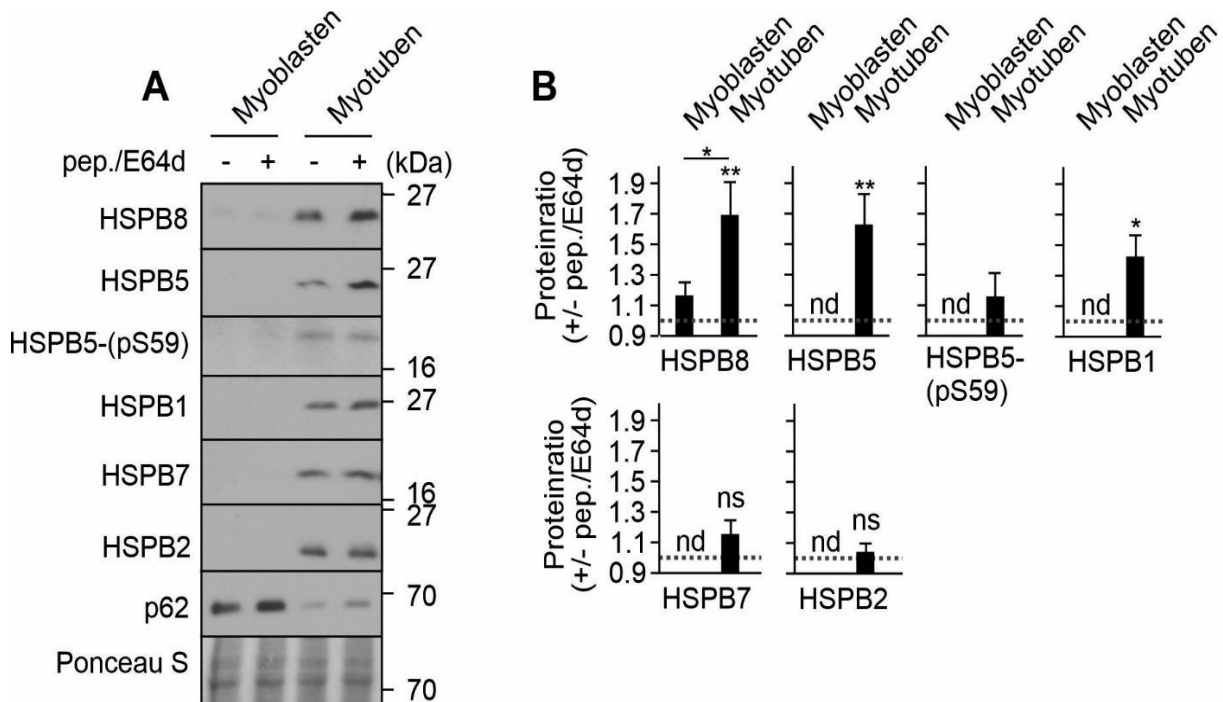


Abbildung 9: Autophagischer Abbau kleiner Hitzeschockproteine in Myoblasten und Myotuben.

(A) C2-Zellen wurden 5 Tage lang kultiviert. Es wurden zu Beginn Myoblasten und an Differenzierungstag 5 Myotuben geerntet. C2-Myoblasten sowie Myotuben wurden, wenn angegeben mit den Proteaseinhibitoren Pepstatin A und E64d (pep./E64d je 5 µg/ml pro Inhibitor) für 3 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten der gleichen Probe normalisiert. Aus den Proteinmengen wurde die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; n ≥ 5; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, nd= nicht detektierbar, ns= nicht signifikant.

Für die sHSPs HSPB2 und HSPB7, für die bisher keine Interaktionen mit BAG3 beschrieben wurden, konnte keine signifikante Umsatzrate in Myotuben festgestellt werden (Abb. 9).

Für RhoA, FILIP1L und FILIP1 wurde ebenfalls ein signifikanter autophagischer Umsatz in differenzierten Myotuben beobachtet (vgl. Abb. 10). Für FILIP1 war in Myotuben eine deutlich erhöhte ~2,5-fache Umsatzrate festzustellen. Im Falle von RhoA und FILIP1L könnte ein erhöhter Abbau mittels CASA gegebenenfalls die starke Abnahme der Expression, die für beide Proteine während der Differenzierung beobachtet wird, erklären.

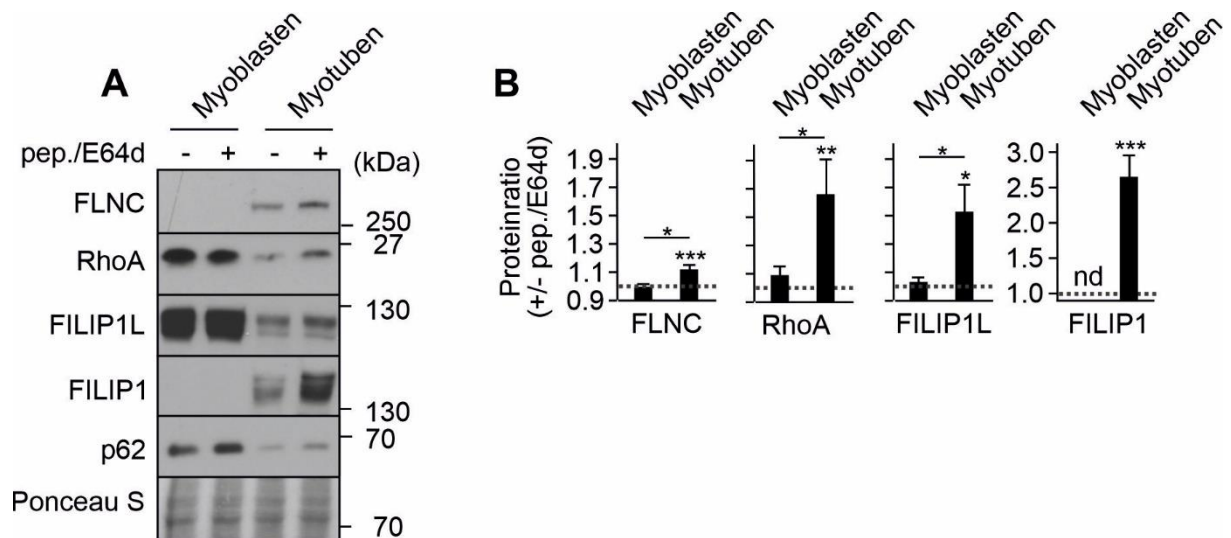


Abbildung 10: Autophagischer Abbau weiterer Zytoskelett-Komponenten und Proteostase-Faktoren RhoA, FILIP1 und FILIP1L in Myoblasten und Myotuben.

(A) C2-Zellen wurden 5 Tage lang kultiviert. Es wurden zu Beginn Myoblasten und an Differenzierungstag 5 Myotuben geerntet. C2-Myoblasten sowie Myotuben wurden, wenn angegeben mit den Proteaseinhibitoren Pepstatin A und E64d (pep./E64d je 5 µg/ml pro Inhibitor) für 3 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten der gleichen Probe normalisiert. Aus den Proteinmengen wurde die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; n ≥ 5; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, nd= nicht detektierbar, ns= nicht signifikant.

4.4 Die CASA-regulierende Komponente STK38 unterliegt in Myotuben einem autophagischen Abbau

Für die CASA-regulierende Kinase STK38 zeigte sich nach der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben eine signifikante Zunahme im Proteinumsatz und ein 1,5-facher Proteinumsatz wie bereits für den Autophagie-Marker p62 (Abb. 11). Aufgrund der Assoziation von STK38 mit BAG3 kommt es anscheinend zu einer Co-Degradation dieser BAG3-regulierenden Kinase, wenn CASA in Myotuben aktiviert wird.

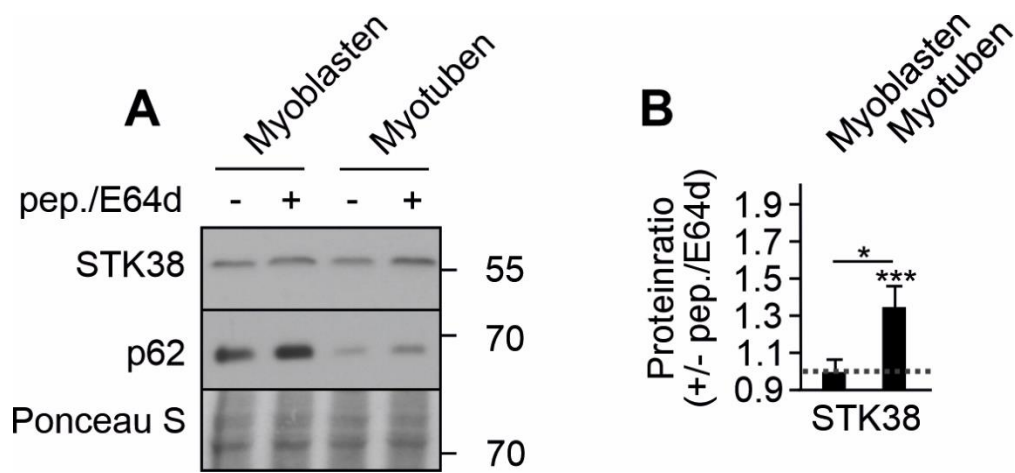


Abbildung 11 Autophagischer Abbau der CASA-regulierenden Kinase STK38.

(A) C2-Zellen wurden 5 Tage lang kultiviert. Es wurden zu Beginn Myoblasten und an Differenzierungstag 5 Myotuben geerntet. C2-Myoblasten sowie Myotuben wurden wenn angegeben mit den Proteaseinhibitoren Pepstatin A und E64d (pep./E64d je 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro Inhibitor) für 3 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 μg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten der gleichen Probe normalisiert. Aus den Proteinmengen wurde die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM; $n \geq 5$; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.5 In Myotuben ist der autophagische Abbau von FLNC und SYNPO2 strikt von BAG3 abhängig

Es sollte untersucht werden, welche der in Myotuben beobachteten autophagischen Abbauvorgänge von BAG3 abhängig sind. Dazu wurde das Cochaperon transient in C2-Zellen depletiert. Die Zellen wurden jeweils an den Tagen T0 und T2 der Differenzierung mit entsprechender siRNA transfiziert und an T4 mit Proteaseinhibitor (Pep./E64d) für 5 h behandelt und geerntet. Die BAG3-Depletion war in den Myotuben mit einer insgesamt rund 70 %igen Abnahme der Proteinmenge in der Zelle erfolgreich (Abb. 12B). Zur Kontrolle der erfolgreichen Proteaseinhibition wurde p62 als Autophagie-Marker detektiert und zeigte die erwartete Akkumulation in den behandelten Proben (Abb. 12).

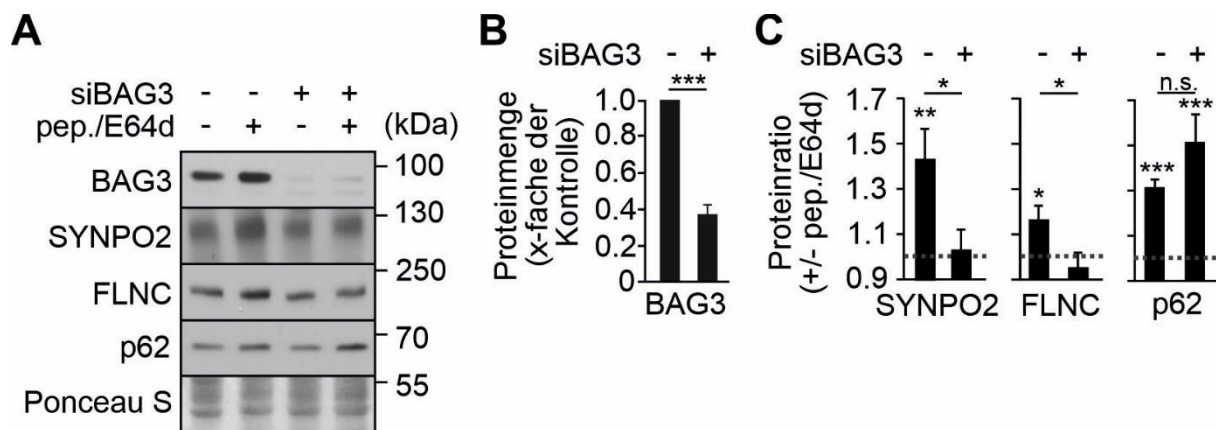


Abbildung 12: BAG3 Depletion in murinen Myotuben inhibiert den autophagischen Abbau von FLNC und SYNPO2.

(A) Um BAG3 zu depletieren wurden die C2-Zellen in Kultur jeweils an T0 und T2 der Differenzierung transient mit siRNA transfiziert (siBAG3); es wurde ebenfalls eine Kontroll-siRNA verwendet. Die Myotuben wurden an Differenzierungstag T4 geerntet. Es wurden sowohl BAG3-depletierte Zellen als auch Kontroll-Zellen mit Proteaseinhibitor (pep./E64d je 5 µg/ml pro Inhibitor) für 5 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten derselben Probe normalisiert. Die Proteinmenge der Kontrolle wurde auf eins gesetzt. (C) Aus den Proteinmengen wurde auch die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; n=9; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001 n.s.= nicht signifikant.

Für das CASA-Substrat FLNC wurde, wie bereits zuvor beobachtet (Abb. 8), ein leichter aber durchaus signifikanter Umsatz in den Kontrollzellen festgestellt (Abb. 12C). In den BAG3 depletierten und differenzierten Myotuben konnte jedoch kein signifikanter Umsatz mehr festgestellt werden. Für das zytoskelettale-Adapterprotein SYNPO2, welches mit BAG3 interagiert, konnte ebenfalls kein Umsatz mehr in den BAG3 depletierten Myotuben nachgewiesen werden (Abb. 12C). Die Daten belegen, dass der autophagische Abbau von FLNC und SYNPO2 in differenzierten Myotuben strikt von BAG3 abhängig ist und insofern über den CASA-Abbauweg erfolgt.

4.6 In Myotuben wird RhoA mittels BAG3 autophagisch abgebaut

Die kleine GTPase RhoA ist entscheidend an der Aktivierung von Stressfasern beteiligt und ein Aktivator der Myogenese (Bryan et al., 2005). Während der Differenzierung von Myotuben kommt es zu einer Abnahme der Proteinmenge von RhoA zu einem Zeitpunkt, wenn CASA-Komponenten verstärkt exprimiert werden und der CASA-Abbauweg aktiv wird. Es bestand daher die Möglichkeit, dass RhoA mittels CASA abgebaut wird. Um dies zu verifizieren, wurde der Umsatz von RhoA in BAG3-defizienten Myotuben untersucht.

In differenzierten Myotuben ist die Proteinmenge von RhoA gering und ein Umsatz deutlich zu erkennen (Abb. 13A, B). Eine Depletion von BAG3 in differenzierten Myotuben führt zu einem deutlichen Anstieg der Proteinmenge von RhoA und ein Umsatz kann nicht länger beobachtet werden. RhoA wird somit BAG3-abhängig autophagisch abgebaut, was auch zu einem Anstieg der Proteinmenge führt (Abb. 13A, B). Um diesen BAG3-abhängigen Effekt auf die Zunahme der Proteinmenge von RhoA zu überprüfen, wurden die C2-Zellen zusätzlich zur siRNA mit einem BAG3 Expressionsplasmid transfiziert (Abb. 13C). Hier zeigte sich ein ähnlicher Effekt auf die RhoA-Proteinmenge zwischen der Kontrolle und den BAG3 überexprimierten und gleichzeitig depletierten Myotuben (Abb. 13C). Die Zunahme der Proteinmenge von RhoA ist somit BAG3-abhängig.

Um festzustellen, ob die Veränderung der Proteinmenge zwischen den Myoblasten und den Myotuben, wie in Kapitel 4.1 und 4.3 bereits gesehen auf Änderungen der Transkriptmenge zurückzuführen sind, wurde dies mittels Transkriptom-*Shotgun*-Sequenzierung durch Philipp Leyendecker untersucht. Die mRNA Mengen wurden durch RNA-Seq Analyse für Myoblasten und Myotuben analysiert. Hierfür wurde zuvor die RNA aus Myoblasten und Myotuben isoliert. Die RNA wurde daraufhin sequenziert und mit Hilfe der Software DESeq2 von Philipp Leyendecker ausgewertet. Es konnte für die Transkriptmenge von RhoA zwischen den Myoblasten und den Myotuben keine Änderungen festgestellt werden (vgl. Abb. 13D). Die deutliche Abnahme der RhoA-Proteinmenge zwischen Myoblasten und Myotuben ist nur auf Translationsebene sichtbar (Abb. 13D). RhoA wird somit nicht auf Transkriptebeine reguliert.

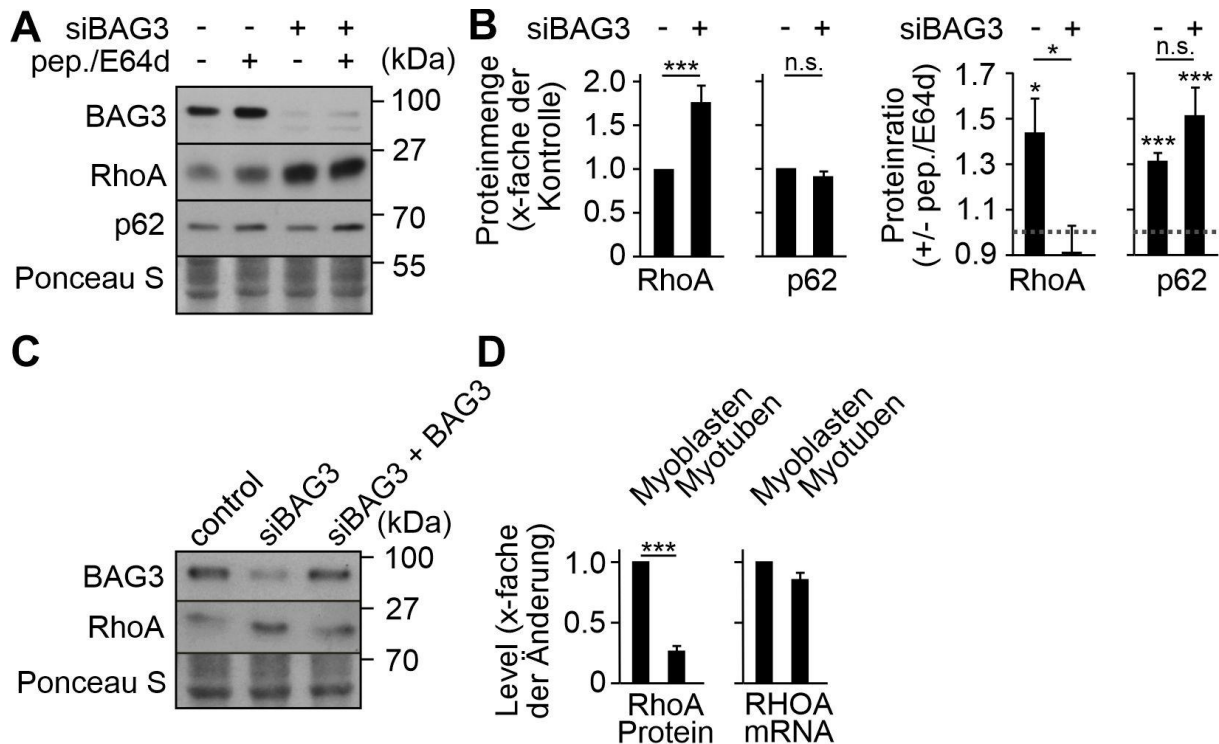


Abbildung 13: BAG3-Depletion führt zum Anstieg der RhoA-Proteinmenge und verhindert den autophagischen Abbau von RhoA.

(A) Um BAG3 zu depletieren wurden die C2-Zellen in Kultur jeweils an T0 und T2 der Differenzierung transient mit siRNA transfiziert (siBAG3); es wurde ebenfalls eine Kontroll-siRNA verwendet. Die Myotuben wurden an Differenzierungstag T4 geerntet. Es wurden sowohl BAG3-depletierte Zellen als auch Kontroll-Zellen mit Proteaseinhibitor (pep./E64d je 5 µg/ml pro Inhibitor) für 5 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten derselben Probe normalisiert. Aus den Proteinmengen wurde auch die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; n ≥ 8; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, n.s.= nicht signifikant. (C) Um die BAG3 Depletion aufzuheben wurden die C2-Zellen zusätzlich zur Transfektion mit siRNA (siBAG3) mit einem pcDNA-BAG3 Plasmid an T0 und T2 der Differenzierung transfiziert. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (D) Myoblasten und Myotuben wurden sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene auf die vorhandene RhoA-Menge analysiert. Hierzu wurden die Transkriptmengen nach RNA Isolation durch Transkriptom-*Shotgun*-Sequenzierung in Zusammenarbeit mit Philipp Leyendecker auf Änderungen der mRNA Menge in Myotuben untersucht. Die Proteine wurden über Western Blot mit dem RhoA-Antikörper detektiert. Die Bandenintensitäten wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten derselben Probe normalisiert. Die Proteinmenge sowie die Transkriptmenge der Myoblasten wurde gleich eins gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; n=5; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

Demnach wird RhoA BAG3-vermittelt autophagisch in Myotuben abgebaut und könnte ein neues Klientenprotein der CASA-Maschinerie sein.

4.7 Der autophagische Abbau von FILIP1L in differenzierten Myotuben erfolgt in Abhängigkeit von BAG3

Für FILIP1L wurde eine Abnahme der Proteinmenge während der Differenzierung ähnlich wie für RhoA beobachtet (Kap.4.1). So wird auch der autophagische Abbau von FILIP1L in Myotuben zu einem Zeitpunkt festgestellt, wenn der CASA-Abbauweg aktiv wird (siehe Kapitel 4.1 und 4.2), sodass auch FILIP1L möglicherweise über CASA abgebaut wird. Um dies zu analysieren, wurde der Umsatz von FILIP1L in BAG3-depletierten Myotuben untersucht (vgl. Kapitel 4.5).

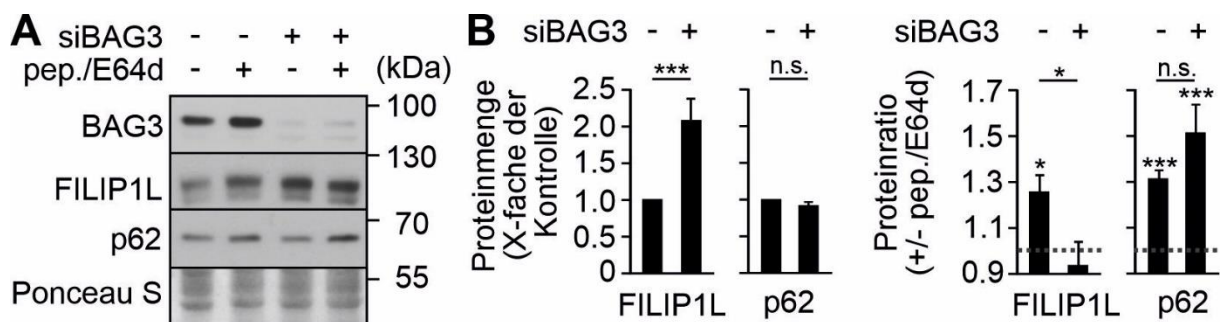


Abbildung 14: BAG3-Depletion beeinflusst die Proteinmenge und den autophagischen Abbau von FILIP1L.

(A) Um BAG3 zu depletieren wurden die C2-Zellen in Kultur jeweils an T0 und T2 der Differenzierung transient mit siRNA transfiziert (siBAG3); es wurde ebenfalls eine Kontroll-siRNA verwendet. Die Myotuben wurden an Differenzierungstag T4 geerntet. Es wurden sowohl BAG3-depletierte Zellen als auch Kontroll-Zellen mit Proteaseinhibitor (pep./E64d je 5 µg/ml pro Inhibitor) für 5 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten derselben Probe normalisiert. Die Proteinmenge der Kontrolle wurde auf eins gesetzt. Aus den Proteinmengen wurde auch die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; n ≥ 9; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, n.s.= nicht signifikant.

In den differenzierten Myotuben ist die Proteinmenge von FILIP1L gering und ein signifikanter autophagischer Umsatz deutlich zu erkennen (Abb. 14). In BAG3-depletierten Myotuben war hingegen für FILIP1L eine Verdoppelung der Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollzellen festzustellen und ein autophagischer Abbau konnte nicht länger beobachtet werden (Abb. 14). So wird FILIP1L BAG3-abhängig autophagisch in Myotuben abgebaut und kann als ein weiteres mögliches Klientenprotein der CASA-Maschinerie angesehen werden.

4.8 In differenzierten Myotuben operieren BAG3-unabhängige Autophagiewege unter Beteiligung von FILIP1, HSPB5 und HSPB1

Die Myogenese umfasste neben der Induktion der CASA-Maschinerie auch die Induktion weiterer Proteostase-Faktoren und sHSPs wie FILIP1, HSPB5 und HSPB1. Für diese Proteine konnte auch autophagischer Abbau in Myotuben festgestellt werden. Weshalb diese Proteine auf eine mögliche Beteiligung am autophagischen Abbau über CASA untersucht wurden. Hierfür wurde der Umsatz der Proteine, sowie die Proteinmengen in BAG3-depletierten Myotuben analysiert (vgl. Kapitel 4.5).

Die untersuchten Proteinmengen für FILIP1, HSPB5 und HSPB1 nahmen alle signifikant in BAG3-depletierten Myotuben ab (vgl. Abb. 15). Für FILIP1 wurde sowohl in den Kontroll- als auch den BAG3-defizienten Zellen ein autophagischer Abbau festgestellt. Wobei für FILIP1 in BAG3-depletierten Zellen eine induzierte Umsatzrate festgestellt werden konnte (Abb. 15B).

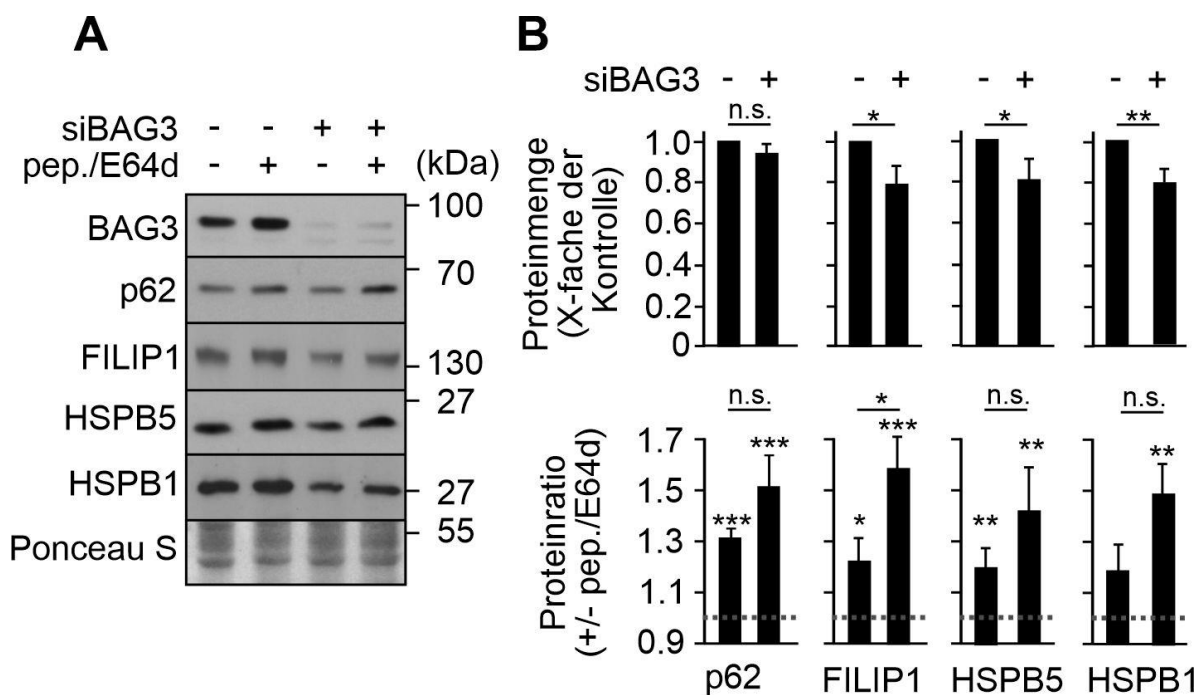


Abbildung 15: BAG3-Depletion beeinflusst den autophagischen Abbau von FILIP1, HSPB5 und HSPB1.

(A) Um BAG3 zu depletieren wurden die C2-Zellen in Kultur jeweils an T0 und T2 der Differenzierung transient mit siRNA transfiziert (siBAG3); es wurde ebenfalls eine Kontroll-siRNA verwendet. Die Myotuben wurden an Differenzierungstag T4 geerntet. Es wurden sowohl BAG3-depletierte Zellen als auch Kontroll-Zellen mit Proteaseinhibitor (pep./E64d je 5 µg/ml pro Inhibitor) für 5 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 60 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten derselben Probe normalisiert. Die Proteinmenge der Kontrolle wurde auf eins gesetzt. Aus den Proteinmengen wurde auch die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; $n \geq 5$; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, n.s.= nicht signifikant.

Ebenso konnte für HSPB5 in BAG3-defizienten Zellen und in Kontrollzellen autophagischer Abbau nachgewiesen werden (Abb. 15B). Für HSPB1 konnte ein signifikanter autophagischer Umsatz nur in BAG3-depletierten Zellen festgestellt werden (Abb.15B).

Die Zunahmen im autophagischen Abbau für FILIP1, sowie der Nachweis von autophagischen Abbau für die kleinen Hitzeschockproteine HSPB5 und HSPB1 in BAG3-defizienten Myotuben, lassen auf neue BAG3-unabhängig autophagische Abbauwege schließen.

4.9 EPS-induzierte mechanische Schädigung führt zum Abbau von Filamin C in murinen Myotuben

Im weiteren Verlauf sollten die Auswirkungen von mechanischem Stress auf die differenzierten C2-Zellen untersucht werden. Da Muskelzellen häufig mechanischem Stress ausgesetzt sind, wurden mit Hilfe einer C-Pace Maschine starke schadensauslösende mechanische Schädigungen (im Folgenden als „*damage*“ EPS bezeichnet) in murinen Myotuben ausgelöst und diese zur Kontraktion angeregt. Diese starke mechanische Schädigung führt zu vermehrten Läsionen innerhalb der Z-Scheibe der Myotuben (Orfanos et al., 2016). Für die Elektrostimulation wurde ein Puls von 10 V und 10 ms gewählt. Das Pulsprogramm wechselt dabei zwischen 15 Hz für 5 s gefolgt von 5 s Pause, erneuten Kontraktionen mit 5 Hz für 5 s und anschließend 5 s Pause. Dieses Programm wurde für den angegebenen Zeitraum 5 h angelegt (vgl. Kapitel 3.5.1). Hierfür wurden die C2-Zellen in 6-well Schalen elektrostimuliert und jede Stunde geerntet. Zur Analyse der Auswirkungen der mechanischen Schädigung in Myotuben wurde das CASA-Substrat FLNC sowie der Autophagie-Marker p62 in mechanisch gestressten Myotuben untersucht. Zusätzlich wurde der Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) genutzt und ein Teil der C2-Zellen über die Dauer von 5 h behandelt. CHX verhindert die Synthese neuer Proteine in der Zelle und wird üblicherweise in Glattmuskelzellen eingesetzt, um hier den Filamin-Abbau nach induzierter mechanischer Schädigung sichtbar zu machen.

Für FLNC zeigte sich bereits für die unbehandelten mechanisch geschädigten Myotuben eine Abnahme in der Proteinmenge nach 3 h und für bis zu 5 h (Abb. 16). Diese Abnahme der Proteinmenge von FLNC wurde von einer Zunahme der Proteinmenge des Autophagie-Markers p62 während mechanischer Schädigung begleitet (Abb. 16). In mechanisch geschädigten und mit CHX-behandelten Myotuben wurde hingegen eine annähernd gleichbleibende Proteinmenge für FLNC festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde bereits nach einstündiger CHX-Behandlung eine deutliche Abnahme der Proteinmenge in mechanisch geschädigten Myotuben für p62 beobachtet (Abb. 16). Das Ubiquitin-Bindeprotein p62 ist

dabei ausschlaggebend für den autophagischen Abbau, da es das Abbausignal erkennt und eine Kopplung an die Phagophormembran über LC3 initiiert. Die EPS-induzierte mechanische Schädigung in Myotuben führt hier bereits zu einem sichtbaren Abbau von FLNC. Diese Beobachtung führte zu einem Umdenken in der Analyse für den FLNC-Abbau in murinen Myotuben.

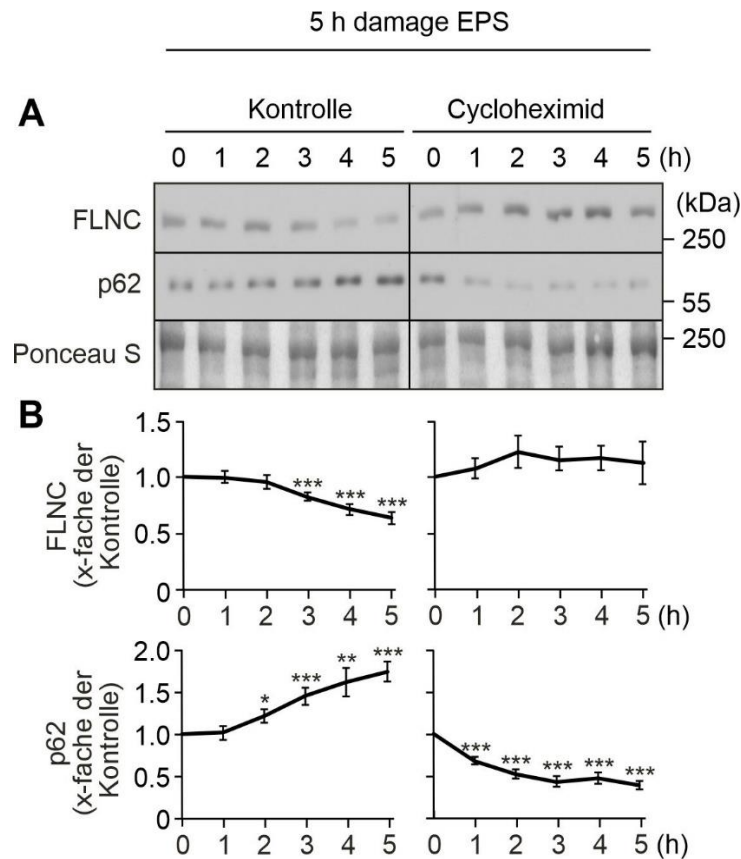


Abbildung 16: Mechanische Belastung führt zum Abbau von Filamin C in murinen Myotuben.

Der autophagische Abbau von FLNC findet in murinen Myotuben nach starker mechanischer Belastung statt. Der Autophagie-Adapter p62 ist dabei essenziell für den FLNC Abbau. (A) Zur Analyse des FLNC-Abbaus in C2-Zellen wurden diese in 6-well Schalen ausgesät und differenziert. Anschließend wurden die Zellen im Abstand von je einer Stunde geerntet und hierfür 5 h starker mechanischer Belastung (5h damage EPS) ausgesetzt. Zusätzlich wurde die Proteintranslation durch die Zugabe von 100 μ M Cycloheximid (CHX) in den mechanisch belasteten C2-Zellen gehemmt. Es wurden pro Spur jeweils 60 μ g geladen. Die Detektion der verschiedenen Proteine erfolgte über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten der gleichen Probe normalisiert. Die Proteinmenge der unstimulierten Zellen wurde gleich eins gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM; n= 9; *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001.

CHX ist in diesem Zellsystem nicht dafür geeignet den FLNC-Abbau nach mechanischer Belastung sichtbar zu machen. Weshalb im Folgenden zur Analyse des Proteinabbaus in mechanisch geschädigten Myotuben weiterhin die Proteaseinhibitoren E64d und Pepstatin A sowie Ammoniumchlorid (NH_4Cl) eingesetzt wurden.

4.10 Mechanische Schädigung von Myotuben führt zu einer Umstellung autophagischer Abbauwege

Nachdem für die CASA-Komponenten BAG3 und HSPB8, sowie für die weiteren kleinen Hitzeschockproteine HSPB1, HSPB5, und FILIP1 bereits autophagischer Abbau in Myotuben festgestellt werden konnte, sollten nun die Auswirkungen mechanischer Schädigung auf den autophagischen Abbau dieser Proteostase-Faktoren analysiert werden. Die Myotuben wurden dazu wie in Kapitel 4.9 beschrieben zur Kontraktion angeregt. Zusätzlich zur schadensauslösenden starken mechanischen Schädigung wurde auch ein adaptierter Zustand mit Hilfe der C-Pace Maschine in Myotuben ausgelöst. Für die adaptierten Zellen wurde das „*mild twitch*“ Programm für 16 h von Differenzierungstag 4 auf 5 angelegt und anschließend geerntet oder für weitere 5 h mit dem „*damage*“ EPS Programm die Myotuben stimuliert. Durch die Anregung der Myotuben mit einer milden Spannungssequenz (siehe Kap. 3.5.1) über einen Zeitraum von 16 h kommt es durch induzierte Sarkomer-Bildung zu einer Anpassung der Zellen an diese, was wiederum eine verbesserte Antwort auf mechanischen Stress zur Folge hat. In diesem Zusammenhang werden die Zellen als adaptierte Myotuben bezeichnet. Zusätzlich zur EPS-Behandlung wurden die C2-Zellen für 5 h mit dem Proteaseinhibitor Ammoniumchlorid (NH₄Cl) behandelt.

Für das Cochaperone BAG3 wurde sowohl in Myotuben als auch in adaptierten Myotuben nach mechanischer Schädigung ein Proteinumsatz festgestellt (Abb. 17B). Dieser Proteinumsatz war jedoch geringer als für den Autophagie-Marker p62 in Myotuben und adaptierten Myotuben nach mechanischer Schädigung (Abb. 17B). Für HSPB8 konnte, ähnlich wie für BAG3, nur noch ein geringer autophagischer Abbau in mechanisch geschädigten Myotuben festgestellt werden. In adaptierten Myotuben konnte hingegen kein Proteinumsatz für HSPB8 nach mechanischer Schädigung nachgewiesen werden (Abb. 17). HSPB8 wird in adaptierten und mechanisch geschädigten Myotuben nicht länger autophagisch abgebaut und zeigt hier eine Inaktivierung des konventionellen CASA-Abbauweges auf.

Für das in der Literatur als Bindepartner von BAG3 beschriebenen sHSP, HSPB5 wurde kein signifikanter Abbau in Myotuben nach mechanischer Schädigung erkannt (Abb. 17B).

Hier wurde jedoch ein Umsatz in adaptierten und mechanisch geschädigten Myotuben für HSPB5 festgestellt. Darüber hinaus zeigte die phosphorylierte Form von HSPB5 und auch HSPB1 einen deutlichen Proteinumsatz sowohl in den Myotuben als auch den adaptierten Myotuben nach mechanischer Schädigung.

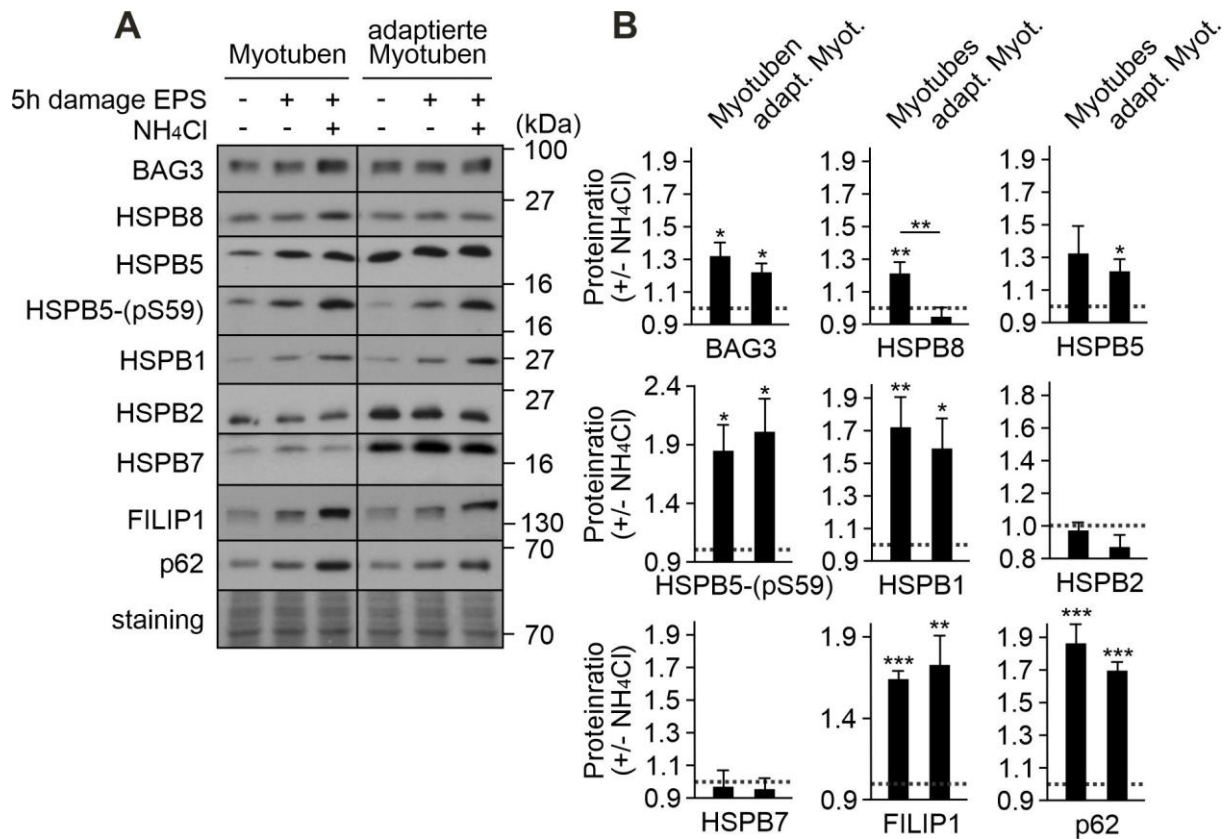


Abbildung 17: Starke mechanische Schädigung inhibiert den autophagischen Abbau von HSPB8 in adaptierten Myotuben während autophagischer Abbau weiterhin für BAG3, FILIP1, HSPB1 und pHSPB5 festgestellt wird.

(A) C2 Zellen wurden 5 Tage lang kultiviert. Es wurden an Differenzierungstag 5, Myotuben oder adaptierte Myotuben geerntet. Einige der C2-Myotuben wurden von Tag 4 auf Differenzierungstag 5 über elektrische Impulsstimulation (*mild twitch* EPS) 16 h lang an leichte mechanische Belastung adaptiert. Des Weiteren wurde starke mechanische Belastungen (*damage* EPS) in den adaptierten und nicht adaptierten Myotuben für 5 h ausgelöst. Die Myotuben wurden für die Dauer der EPS- Behandlung von 5 h mit dem Proteaseinhibitor NH₄Cl behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 6 µg Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten derselben Probe normalisiert. Aus den Proteinmengen wurde die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SEM; n ≥ 5; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

Für HSPB7 und HSPB2, für die bereits in differenzierten Myotuben kein Umsatz beobachtet wurde, konnte weder in Myotuben noch in adaptierten Myotuben nach 5-stündiger EPS-Behandlung ein autophagischer Umsatz festgestellt werden (Abb. 17). Für FILIP1 wurde hingegen in Myotuben und adaptierten Myotuben nach mechanischer Schädigung ein deutlicher autophagischer Abbau festgestellt (Abb. 17B).

Es wird deutlich, dass es durch mechanische Schädigung zu einer Umstellung autophagischer Abbauwege in Myotuben kommt, während neue Proteostase-Faktoren wie FILIP1 und die BAG3-interagierenden sHSPs HSPB5 bzw. pHSPB5 sowie HSPB1 weiterhin autophagischen Abbau zeigen.

4.11 Nach einem mechanischem Schaden werden BAG3-unabhängige Autophagiewege abhängig von BAG3

Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, ob FILIP1 und die sHSPs die zuvor in mechanisch geschädigten Myotuben autophagischen Abbau gezeigt hatten, BAG3-abhängig unter starker mechanischer Schädigung autophagisch abgebaut werden. Auch die zuvor analysierte GTPase RhoA und FILIP1L wurden auf BAG3-abhängige autophagische Abbauvorgänge unter starker mechanischer Belastung (*damage* EPS), untersucht. Dazu wurde das Cochaperon transient in C2-Zellen depletiert und die Proteaseinhibitoren (Pep./E64d) verwendet (vgl. Kapitel 4.5).

Für HSPB5 wurde kein signifikanter autophagischer Umsatz nach mechanischer Belastung, weder für die Kontroll- noch die BAG3-depletierten Zellen beobachtet (Abb. 18B). Im Gegensatz dazu, wurde jedoch ein deutlicher Umsatz nach mechanischer Belastung für die phosphorylierte Form von HSPB5 sichtbar (Abb. 18B). Dieser Umsatz konnte nicht länger in BAG3-depletierten Myotuben nach mechanischer Belastung festgestellt werden. Auch für HSPB1 und RhoA wurde ein signifikanter Umsatz in mechanisch geschädigten Myotuben nachgewiesen, dieser autophagische Abbau war nicht länger in BAG3-depletierten mechanisch geschädigten Myotuben festzustellen. Für FILIP1L war in mechanisch geschädigten Myotuben kein autophagischer Abbau nachweisbar (Abb. 18). Im Gegensatz dazu konnte für FILIP1 autophagischer Umsatz in mechanisch geschädigten Myotuben festgestellt werden (Abb. 18). In BAG3-depletierten und mechanisch geschädigten Myotuben konnte hingegen kein autophagischer Umsatz mehr für FILIP1 nachgewiesen werden (Abb. 18).

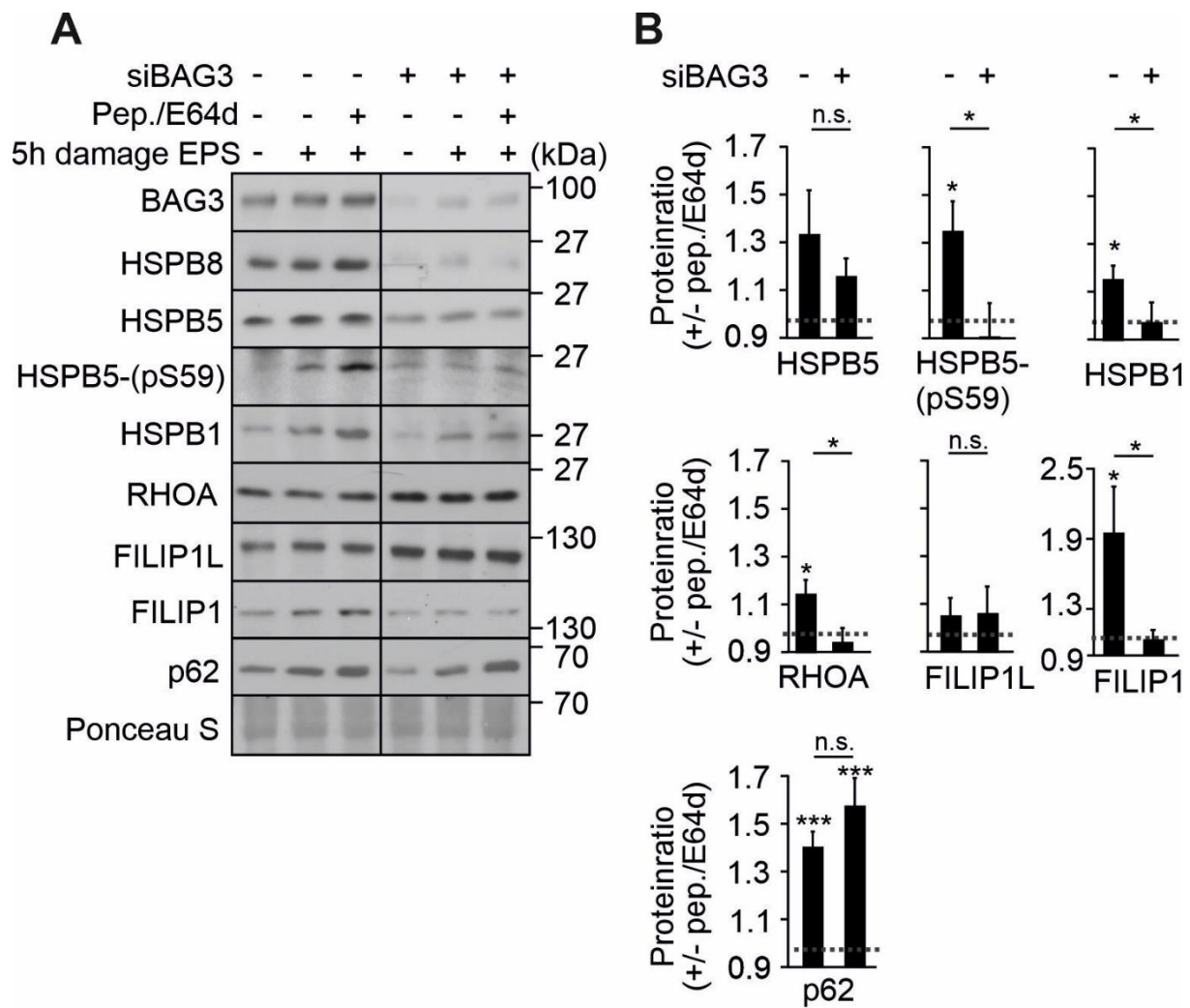


Abbildung 18: BAG3-abhängiger autophagischer Abbau von pHSPB5, HSPB1, RhoA und FILIP1 in mechanisch geschädigten Myotuben.

(A) Um BAG3 zu depletieren wurden die C2-Zellen in Kultur jeweils an T0 und T2 der Differenzierung transient mit siRNA transfiziert (siBAG3); es wurde ebenfalls eine Kontroll-siRNA verwendet. Einige der C2-Myotuben wurden an Tag 4 über elektrische Impulsstimulation (EPS) 5 h lang starker mechanischer Belastung (damage EPS) ausgesetzt. Die Myotuben wurden anschließend geerntet. Es wurden sowohl BAG3-depletierte Zellen als auch Kontroll-Zellen mit Proteaseinhibitor (pep./E64d) für 5 h behandelt. In der SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 6 μ g Protein geladen. Die Proteine wurden über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert. (B) Die Bandenintensitäten aus (A) wurden mittels ImageJ quantifiziert und auf die Ponceau S-Intensitäten derselben Probe normalisiert. Aus den Proteinmengen wurde die Ratio von Proteaseinhibitor-behandelten zu unbehandelten Zellen gebildet. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM; $n \geq 6$; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, n.s.= nicht signifikant.

Der autophagische Abbau von pHSPB5, HSPB1, RhoA, und FILIP1 ist in mechanisch geschädigten Myotuben abhängig von BAG3. Die Daten zeigen so neue mögliche BAG3-abhängige autophagische Abbauwege in mechanisch geschädigten Myotuben auf.

4.12 EPS-induzierte mechanische Stimulierung und Belastung verändert die Ausbildung und Komposition von Proteostase-relevanten Proteinkomplexen in Muskelzellen

Aus den vorangegangenen Experimenten waren neue autophagische Abbauwege und damit zusammenhängend auch neue Proteostase-relevanten Proteinkomplexe denkbar. Daher wurden in diesem Experiment Komplexe in Myotuben für BAG3, den Autophagie-Marker p62, die Chaperone HSPB8 sowie HSBP5 untersucht, die zuvor starker mechanischer Belastung (*damage* EPS), sowie geringer mechanischer Belastung (adaptierte) und keiner mechanischer Belastung ausgesetzt waren. Das Cochaperon BAG3 ist, aufgrund der unterschiedlichen Interaktionsdomänen, dafür bekannt mit verschiedensten Proteinen zu interagieren und Komplexe zu bilden (Rauch et al., 2017). Ebenso bilden kleine Hitzeschockproteine häufig in ihrer Aufgabe als Chaperone im Zuge der „*holdase*“-Funktion heterooligomere Komplexe aus. Um die Komplexe nach erfolgter EPS-Behandlung der C2-Zellen sichtbar zu machen wurde die Gelfiltration bzw. Größenausschluss-Chromatographie genutzt. Die Zellen wurden anschließend geerntet und die so erhaltenen Zelllysate wurden, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben auf die Superose 6 Säule für die Größenfraktionierung geladen. Die erhaltenen Fraktionen wurden nach TCA-Fällung mittels Immun-Blot analysiert.

Für BAG3 war eine Verschiebung der Komplexe von ~440 kDa in Myotuben hin zu Komplexen um die 500-600 kDa mit zunehmender mechanischer Schädigung zu erkennen (Abb. 19). HSPB8 zeigte sich zunächst in einem ~160 kDa Oligomer in den differenzierten Myotuben. In den akut gestressten Myotuben verschiebte sich das HSPB8 Signal, ähnlich zum BAG3 Signal, von dem ~160 kDa Oligomer hin zu Komplexen um die ~500 kDa. In den adaptierten und stark mechanisch belasteten Zellen wurde zusätzlich das ~160 kDa Oligomer für HSPB8 wieder sichtbar, entkoppelt von der Verschiebung mit den BAG3-Komplexen bei ~500 kDa. Die Adaptation, also die Anpassung der Myotuben an mechanische Belastung, konnte anhand ähnlich großer Komplexe bei adaptierten als auch mechanisch geschädigten Myotuben beobachtet werden. Für den Autophagie-Marker p62 konnten keine Änderungen der gebildeten Komplexe zwischen rund 2.000 und 700 kDa nach mechanischer Belastung festgestellt werden. Hier war jedoch p62 besser in den EPS-behandelten Zellen nachweisbar (Abb. 19). Für HSPB5 wurden Komplexe um die 500 bis 670 kDa detektiert, welche deutlicher in adaptierten Myotuben nachgewiesen werden konnten (Abb. 19).

Die EPS-Behandlung von Myotuben zeigt also direkte Auswirkungen auf die Ausbildung von Proteinkomplexen in Muskelzellen.

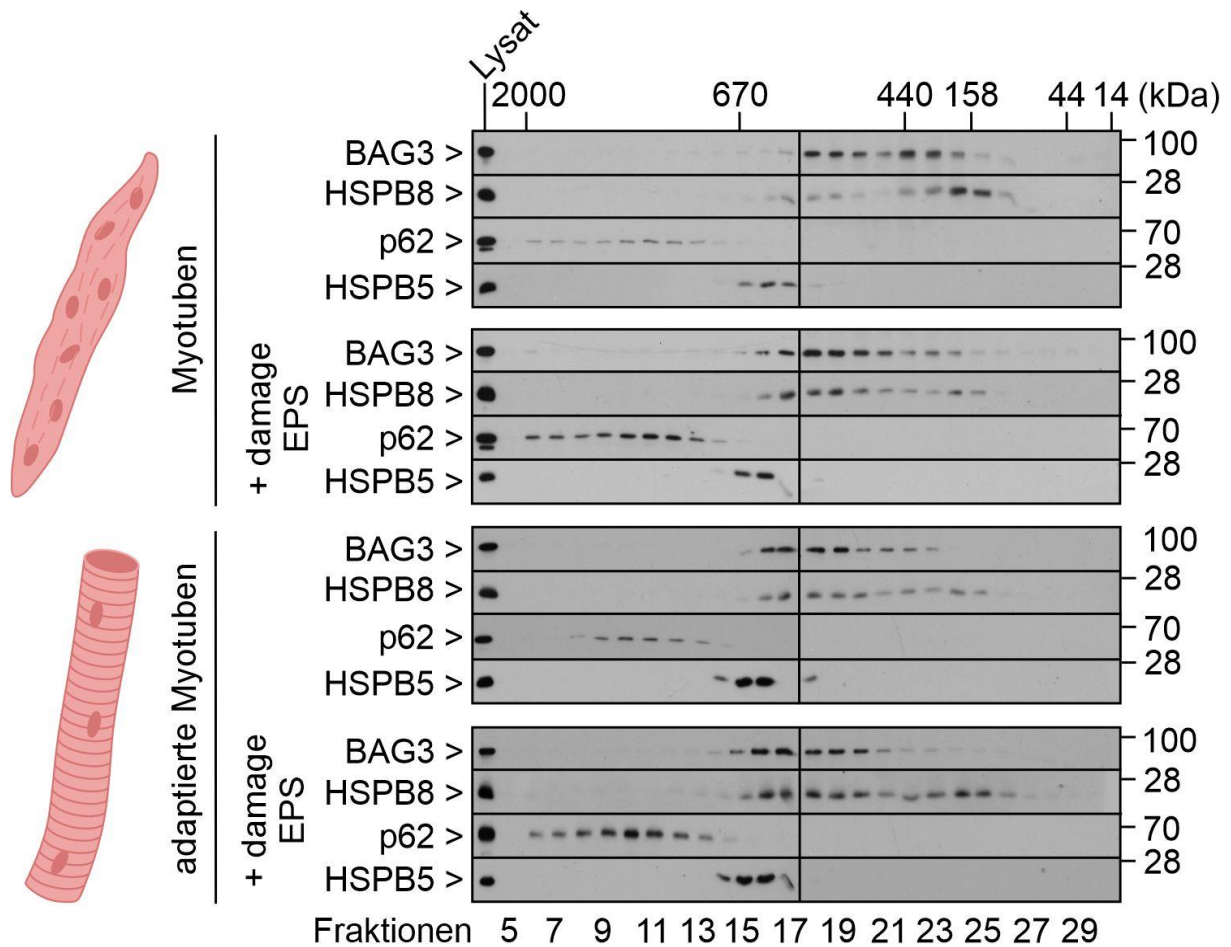


Abbildung 19: Komplexbildung von BAG3, HSPB8, HSPB5 und p62 in mechanisch geschädigten und ungeschädigten Myotuben.

C2-Zellen wurden 5 Tage lang kultiviert. Es wurden an Differenzierungstag 5, Myotuben oder adaptierte Myotuben geerntet. Einige der C2-Myotuben wurden von Tag 4 auf Differenzierungstag 5 über elektrische Impulsstimulation (*mild twitch* EPS) 16 h lang adaptiert. Des Weiteren wurde starke mechanische Schädigungen (*damage* EPS) in den Myotuben für 5 h ausgelöst. Nach anschließender Zellyse fand eine Größenfraktionierung mittels einer Superose 6 Säule statt. In der SDS-PAGE wurde das Zelllysat und die gesammelten Fraktionen 5-30 aufgetragen. Die Proteinkomplexe wurden nach der Größenfraktionierung über Western Blot mit den jeweils entsprechenden Antikörpern detektiert.

5 Diskussion

5.1 Myogenese führt zur Induktion von CASA und weiteren autophagischen Abbauvorgängen

Für die Bildung und den Erhalt von Muskelgewebe sind die Synthese neuer Proteine, deren korrekte Faltung und der Proteinabbau von entscheidender Bedeutung. CASA ist ein kraft-induzierter Abbauweg, der für den Erhalt der Muskulatur essentiell ist (Ulbricht et al., 2015). BAG3 erkennt fehlgefaltete oder beschädigte Proteine wie FLNC und vermittelt deren Abbau über CASA. Zusätzlich vermittelt BAG3 den Erhalt des Zytoskeletts unter Stressbedingungen durch Aktivierung der Genexpression und Proteintranslation in Assoziation mit Komponenten des Hippo- und mTOR-Signalwegs (Klimek et al., 2017).

Während der Myogenese kommt es zur Verschmelzung von Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben und letztlich zur Bildung von Muskelfasern (Chal and Pourquié, 2017). Dabei bilden sich Sarkomere aus, welche die kleinste funktionelle und kontraktile Einheiten der Muskelzellen sind. Das Aktin-quervernetzende FLNC und das Intermediärfilament Desmin sind dabei essentiell für die Assemblierung von Sarkomeren (Capetanaki et al., 1997; Dalkilic et al., 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion in der Expression zytoskelettaler Proteine wie FLNC und Desmin von einer nahezu gleichzeitigen Induktion in der Expression von CASA-Komponenten wie BAG3, SYNPO2 oder HSPB8 begleitet wird (Abb. 7). Zusätzlich konnte die CASA-Aktivität in Myotuben nachgewiesen werden (Abb. 8; Abb. 12). Da CASA ein kraft-induzierter Abbauweg ist, scheint es während der Myogenese bzw. in gebildeten Myotuben bereits zu einer Kraftgenerierung zu kommen. Diese mögliche Kraftgenerierung führt zur Entfaltung zytoskelettaler Proteine in den Myotuben, woraufhin CASA aktiviert wird, um für den Abbau dieser zu sorgen (Ulbricht et al., 2013). Dabei führt diese Kraftgenerierung in Muskelzellen möglicherweise bereits auch zur Aktivierung von Hitzeschocktranskriptionsfaktor 1 (HSF1), welcher ein wichtiger stressinduzierbarer Transkriptionsfaktor von Chaperonen, Cochaperon wie BAG3 und Ubiquitin ist (Ulbricht et al., 2013; Vihervaara and Sistonen, 2014). Die nahezu gleichzeitig induzierte Expression zytoskelettaler sowie CASA-assoziiierter Proteine könnte durch transkriptionelle Regulation erfolgen. Dabei könnten bestimmte Transkriptionsfaktoren, die für die Bildung zytoskelettaler Elemente notwendig sind, auch an die Promotoren für BAG3 bzw. die Komponenten der CASA-Maschinerie oder die sHSPs binden und es so zu einer annähernd gleichgeschalteten Induktion in der Expression der Proteine kommen. Die hier möglichen entwicklungsbedingten Transkriptionsfaktoren bleiben zu untersuchen.

Die Befunde zeigen, dass die Ausbildung der Sarkomere während der Myogenese mit einer Induktion der CASA-Maschinerie gekoppelt ist. Die Sarkomer-Entstehung ist somit direkt mit einer Qualitätskontroll-Maschinerie verknüpft, die bereits bei der Entstehung von Muskelfasern mechanisch beschädigte Zytoskelettproteine erkennt und abbaut, sodass eine korrekte Ausbildung der Muskelfasern gewährleistet werden kann.

Die Differenzierung führte auch zur Induktion weiterer Proteostase-Faktoren wie HSPB5, HSPB1 und FILIP1 (Abb. 7). Die sHSPs sind bereits bei der Myogenese durch Stabilisierung des Zytoskeletts für den Erhalt der Proteostase von Bedeutung. Als Reaktion auf mechanische Belastung co-lokalisieren und binden HSPB5 und HSPB1 Zytoskelett-Komponenten und andere Proteine die an der Muskelfunktion beteiligt sind (Collier and Benesch, 2020). Die zunehmende Expression von HSPB5 während der Myogenese kann mit einer möglichen Stabilisierung von Desmin-Intermediärfilamenten erklärt werden, die ebenfalls im Zuge der Differenzierung vermehrt gebildet werden (Dimauro et al., 2018). So zeigen Desmin und HSPB5 eine ähnliche zunehmende Expression in Myotuben auf, sodass hier möglicherweise auch ähnliche Transkriptionsfaktoren agieren könnten. HSPB1 ist wichtig für die Stabilisierung des Zytoskeletts und inhibiert die Bildung toxischer F-Aktin-Aggregate indem es lösliche Komplexe mit denaturiertem Aktin bildet, weshalb HSPB1 möglicherweise auch gegen Ende der Differenzierung vermehrt gebildet wird. (Pivovarova et al., 2007). Diese Zunahme in der zellulären Expression von sHSPs kann als ein hochmodulierbares System angesehen werden, welches es der Zelle erlaubt sich schnell an Veränderungen wie der Zelldifferenzierung anzupassen um Proteinaggregation hier zu verhindern (Arrigo, 2005, 2013; Pivovarova et al., 2007). Der Anstieg der FILIP1 Proteinmenge konnte (vgl. Abb. 7), wie bereits in der Literatur beschrieben, mit zunehmender FLNC-Menge beobachtet werden (Reimann et al., 2020). FILIP1 zeigt so eine Beteiligung am Differenzierungsprozess und der Bildung des kontraktile Apparates in Skelettmuskelzellen auf. Möglicherweise sind hier dieselben Mechanismen, die zur Induktion von FLNC beitragen für die Induktion der Expression von FILIP1 verantwortlich.

Neben den bekannten CASA-Komponenten und Proteostase-Faktoren wurde auch die CASA-regulierende Kinase STK38 untersucht. Hier zeigte sich während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben eine Zunahme der Proteinmenge von STK38 an den ersten Differenzierungstagen, welche anschließend stagnierte (Abb. 7). STK38 als Hippo-Signalprotein wird hier möglicherweise zu Beginn benötigt um die Zytoskelett-Assemblierung zu erleichtern und Zellteilungsprozesse in Gang zu bringen (Liu et al., 2017; Yu and Guan, 2013). Bemerkenswerterweise konnte auch zu einem Zeitpunkt, an dem CASA aktiv war autophagischer Abbau in differenzierten Myotuben für STK38 festgestellt werden. Auf CASA wirkt STK38 inhibierend, unabhängig der Kinaseaktivität (Klimek et al., 2019). Die Hemmung von CASA beruht auf einer Unterbrechung des funktionellen Zusammenspiels von BAG3 mit HSPB8 und SYNPO2 nach Bindung von STK38 an BAG3 (Klimek et al., 2019). Möglicherweise

kommt es hier zu einem Einschluss durch autophagische Membranen, während STK38 mit BAG3 assoziiert ist. Ebenso sind andere autophagische Abbauwege, die hier agieren könnten, denkbar.

Neben der Induktion der Proteostase-Faktoren während der Myogenese zeigte sich auch erstmalig ein autophagischer Abbau für FILIP1 (*Filamin A-interacting Protein 1*), HSPB5 sowie HSPB1 (Abb. 9, Abb. 10). FILIP1 kann sowohl mit FLNA als auch FLNC interagieren und den Abbau von Filamin über einen nicht-proteasomalen Weg vermitteln (Nagano et al., 2002; Reimann et al., 2020). Der in Myotuben gezeigte autophagische Abbau von FILIP1 könnte hier möglicherweise den FILIP1-vermittelten Abbau von unphosphoryliertem FLNC zeigen (Reimann et al., 2020). Darüber hinaus kann der autophagische Abbau von FILIP1 auch in Zusammenhang mit einem CASA-vermittelten Abbau von beschädigtem FLNC stehen und somit FILIP1 in Assoziation mit FLNC vom CASA-Komplex co-degradiert werden. Der autophagische Abbau von FILIP1 in Mausmuskelzellen kann ein Hinweis auf neue autophagische Abbauvorgänge in Muskelzellen sein.

Auch für die sHSPs HSPB5 und HSPB1 konnte erstmalig autophagischer Abbau in Muskelzellen gezeigt werden. Für HSPB1 und HSPB5 wurde bisher kein autophagischer Abbau in Muskelzellen beschrieben. HSPB5 ist an wichtigen zellulären Prozessen wie dem Proteintransport, der Stabilisierung des Zytoskeletts sowie der Regulation von Muskelkontraktionen involviert (Arrigo and Gibert, 2013; Chebotareva et al., 2020). In Muskelzellen ist HSPB5 notwendig für die Stabilisierung von Desmin und anderen Intermediärfilamenten sowie Aktin oder Tubulin (Sarparanta et al., 2020). Es verhindert die Aggregation und fördert die Filamentbildung der zytoskelettalen- und sarkomeren- Proteine (Arrigo and Gibert, 2013; Sarparanta et al., 2020). Möglicherweise interagiert HSPB5 in murinen Myotuben in seiner Funktion als Chaperon mit abzubauenen Substraten oder Autophagie-Markern und wird im Zuge dessen selbst autophagisch mit abgebaut. Für HSPB1 wurde bereits in neuronalen Zellen während der hungerinduzierten Autophagie eine direkte Interaktion mit dem Ubiquitin-Adapter p62 beschrieben und eine Beteiligung an dem autophagischen Proteinabbau gezeigt (Haidar et al., 2019). Die hier erzielten Befunde zeigen, dass HSPB1 auch in Muskelzellen an der Sortierung von Proteinen in Richtung Autophagie beteiligt ist. Für HSPB5 konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Beteiligung an der Autophagie als weitere Anlieferungskomponente nachgewiesen werden. Bisherige Arbeiten hatten lediglich gezeigt, dass mutierte Formen von HSPB5 als Klienten autophagisch entsorgt werden können (Hishiya et al., 2011). Ob die aktive Beteiligung von HSPB5 an der Autophagie, wie im Falle von HSPB1, auf einer direkten Interaktion mit p62 beruht, bleibt zu untersuchen. Für die sHSPs HSPB7 und HSPB2 wurde kein autophagischer Abbau in Mausmuskelzellen beobachtet (vgl. Abb. 9). Diese sHSPs nahmen in ihrer Expression von Myoblasten zu Myotuben ebenso wie HSPB1 oder HSPB5 zu, wurden aber in Myotuben nicht autophagisch

abgebaut. Für HSPB2 und HSPB7 ist bisher bekannt, dass diese vorwiegend in Herz- und Muskelzellen gebildet werden (Hayashi and Carver, 2020). In ihrer Funktion als Chaperone binden diese an entfaltete zytoskelettale Proteine um diese in einem faltungskompetenten Zustand in Muskelzellen zu halten und sind nicht mit autophagischem Abbau verbunden (Collier and Benesch, 2020; Juo et al., 2016). Der autophagische Abbau von FILIP1, HSBP5 und HSPB1 zeigt so neue Abbauvorgänge, zusätzlich zur CASA-Aktivität in differenzierten Mausmuskelzellen zum Erhalt der Proteostase auf.

5.2 Identifizierung von RhoA als Klient der BAG3-vermittelten Autophagie

Während der Myogenese, bei der die Komponenten der CASA-Maschinerie in ihrer Expression zunehmen, wurden sinkende Proteinmengen für die kleine GTPase RhoA bemerkt (Abb. 7). Für RhoA konnte eine deutliche Akkumulation in BAG3-defizienten Zellen im Gegensatz zu FLNC oder SYNPO2 erkannt werden (Abb. 12A), sowie BAG3-abhängiger autophagischer Abbau in dieser Arbeit erstmalig in Myotuben festgestellt und RhoA als ein neues Klientenprotein der BAG3-vermittelten Autophagie identifiziert werden (Abb. 14). Die Akkumulation von RhoA in BAG3-depletierten Muskelzellen und der damit einhergehende inhibierte autophagische Abbau zeigen, dass das Cochaperon BAG3 RhoA erkennt und der Abbau von RhoA in Myotuben über den CASA-Komplex bestehend aus BAG3-HSP70 und HSPB8 vermittelt wird. Ob dabei weitere Komponenten wie HSPB8 oder HSP70 mit RhoA interagieren bleibt zu untersuchen. Eine Interaktion zwischen RhoA und BAG3 ist bisher nicht beschrieben worden. Die GTPasen der Rho-Familie insbesondere RhoA sind Schlüsselregulatoren des Aktinzytoskeletts (Lessey et al., 2012). Während der Mechanotransduktion nimmt RhoA einen besonderen Platz ein. Hier reguliert RhoA die Aktivität von Myosin II, weshalb es für die intrazelluläre Spannung und Kraft, die innerhalb von Zellen erzeugt wird, verantwortlich ist (Lessey et al., 2012). Es ist bekannt, dass RhoA zunächst für die Auslösung der Muskelzell-Differenzierung wichtig ist (Charrasse et al., 2006). Im Verlauf der Myogenese muss jedoch die Aktivität von RhoA limitiert werden, um einen terminalen Differenzierungszustand zu erreichen (Bryan et al., 2005; Iwasaki et al., 2008). Die erzielten Befunde zeigen, dass RhoA über einen BAG3-vermittelten Weg autophagisch abgebaut werden kann (Abb. 14). Dies könnte die drastische Abnahme der RhoA-Menge zu späten Zeitpunkten der Differenzierung, wenn CASA aktiv wird, erklären (Abb. 7).

Mechanische Kräfte tragen zur Aktivierung von RhoA bei (Smith et al., 2003). RhoA wechselt dabei zwischen einer aktiven GTP- und einer inaktiven GDP-gebundenen Form. Durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide-exchange factors* GEFs), GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase-activating proteins* GAPs) und Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (*guanine nucleotide-dissociation inhibitors* GDIs) wird dieser Wechsel

reguliert (Lessey et al., 2012). Dabei aktivieren GEFs durch Nukleotidaustausch RhoA, wohingegen es durch Stimulation der GTPase-Aktivität zur Inaktivierung von RhoA kommt (Abb. 20). Die inaktive Form von RhoA ist im Zytosol durch GDIs gehalten (Lessey et al., 2012). Aktives RhoA sorgt für eine Erhöhung der Stabilität von Aktinfilamenten und vermittelt die Aktinfilament-Polymerisierung (Lessey et al., 2012). RhoA reguliert als Antwort auf mechanischen Stress auch die Zelladhäsion und Kontraktilität und interagiert mit Filamin während der Signalweitergabe (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Hu et al., 2017). Für die aktive RhoA-Form konnte bereits in Nicht-Muskelzellen ein autophagischer Abbau aufgezeigt werden, hier wird vorwiegend membrangebundenes und aktives RhoA autophagisch abgebaut (Belaid et al., 2013). Auch in mechanisch gestressten Myotuben konnte BAG3-abhängiger autophagischer Abbau von RhoA nachgewiesen werden (vgl. Abb. 18). So könnte hier durch mechanische Kräfte aktiviertes RhoA von BAG3 erkannt und autophagisch abgebaut werden, um einer gesteigerten Kontraktilität entgegen zu wirken. Da in mechanisch geschädigten Myotuben jedoch nicht länger der konventionelle CASA-Abbauweg aktiv ist, scheinen hier neue BAG3-abhängige autophagische Abbauwege für den RhoA-Abbau verantwortlich zu sein (Kap. 5.6). RhoA ist dabei ein Regulator der Kraftgenerierung innerhalb der Zellen. CASA bzw. BAG3 wirkt somit nicht nur an den durch mechanischen Kräften entfalteteten Zytoskelett-Komponenten wie FLNC, sondern auch direkt am Eingang der Signalkaskade, die für die Kraftgenerierung innerhalb der Zelle notwendig ist und zeigt so einen Mechanismus für mechanische Stressbewältigung auf (Abb. 20). Diese Arbeit liefert erste Hinweise auf Interaktionen zwischen den RhoA-vermittelten Signalwegen der Zelle und dem BAG3-vermittelten autophagischen Abbau der CASA-Maschinerie in murinen Muskelzellen (Abb. 20). CASA bzw. BAG3 können bei der Myogenese bzw. mechanischem Stress nicht nur auf Ebene des beschädigten Zytoskeletts wirken, sondern dem Stress durch eine Limitierung von Kraft-generierenden Signalwegen, durch den Abbau von RhoA, aktiv entgegenwirken.

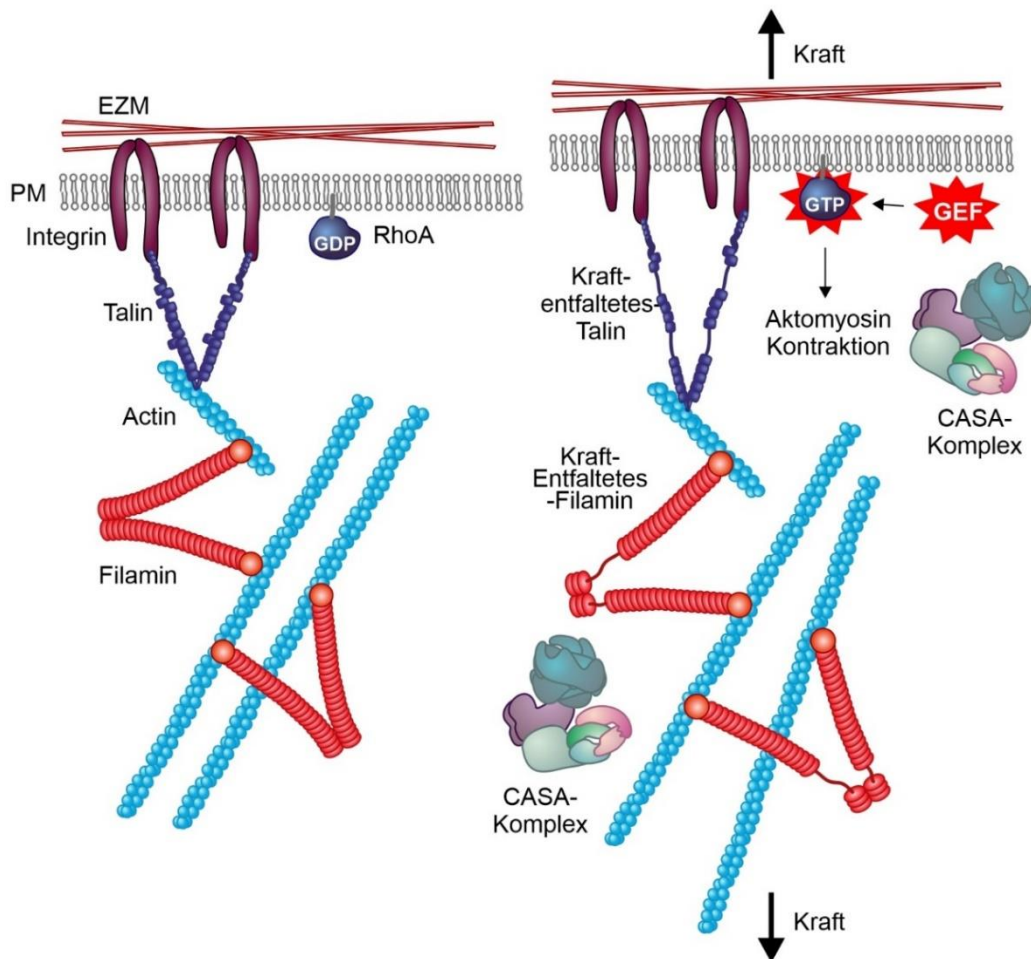


Abbildung 20: Schematische Darstellung der RhoA vermittelten Kraftgenerierung in Zellen in Zusammenhang mit dem CASA-vermittelten RhoA Abbau.

Durch mechanische Kräfte kommt es zur Aktivierung von RhoA. Die GTPasen der Rho Familie sind Schlüsselregulatoren des Aktinzytoskeletts. RhoA kann inaktiv in einem GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand innerhalb der Zelle vorliegen. Bei mechanischer Belastung kommt es zur Entfaltung des Aktin-quervernetzenden Filamin C in Muskelzellen. Mechanisch geschädigtes Filamin wird von BAG3 zusammen mit dem CASA-Komplex erkannt und autophagisch abgebaut. BAG3 vermittelt auch den autophagischen Abbau von RhoA in differenzierten und mechanisch belasteten Mausmuskelzellen. EZM= Extrazelluläre Matrix, PM= Plasmamembran.

5.3 Identifizierung von FILIP1L als Klient der BAG3-vermittelten Autophagie

Für FILIP1L (*Filamin A-interacting Protein 1-Like*) zeigte sich ebenso wie für RhoA eine Abnahme der Proteinmenge über den Verlauf der Differenzierung (Abb. 7). Die Abnahme der Proteinmenge von FILIP1L in Myotuben wird von einer zunehmenden CASA-Aktivität begleitet und es konnte erstmalig ein BAG3-vermittelter autophagischer Abbau für FILIP1L nachgewiesen werden (Abb. 13). Dieser BAG3-abhängige autophagische Abbau in differenzierten Myotuben ist neu und zeigt FILIP1L als neuen Klient BAG3-vermittelter Autophagie auf. Die Akkumulation von FILIP1L in BAG3-depletierten Muskelzellen und der so

inhibierte autophagische Abbau zeigen, dass das Cochaperon BAG3 FILIP1L erkennt und der Abbau von FILIP1L in Myotuben über BAG3 bzw. die CASA-Maschinerie vermittelt wird. Wie genau BAG3 und FILIP1L miteinander interagieren können und ob weitere Komponenten des CASA-Komplexes für den spezifischen Abbau von FILIP1L notwendig sind, bleibt zu untersuchen. Über FILIP1L ist bisher wenig bekannt und es wird als ein neues Tumor-Suppressor-ähnliches Protein beschrieben, welches in verschiedensten Krebsarten durch Promotormethylierung reduziert vorkommt. FILIP1L inhibiert die Tumorzellmigration sowie die Invasivität (Kwon and Libutti, 2014). Des Weiteren wurde für FILIP1L und HSF1 eine Interaktion beschrieben (Hu and Mivechi, 2011). FILIP1L vermittelt den proteasomalen Abbau von HSF1 und moduliert so die Hitzeschock-Antwort (Hu and Mivechi, 2011). Zusätzlich aktiviert auch mechanische Spannung die Transkription von HSF1 und kontrolliert auf diese Weise die BAG3 Expression (Ulbricht et al., 2013). So ist denkbar, dass die verminderte Expression von FILIP1L während der Myogenese zur Aktivierung von HSF1 führt und dadurch die vermehrte Bildung von BAG3 ermöglicht wird (vgl. Abb. 7). Der BAG3-vermittelte autophagische FILIP1L Abbau in Myotuben (vgl. Abb. 14) könnte wiederum die Stabilisierung und Aktivierung von HSF1 unterstützen und als eine zelluläre Stressantwort gesehen werden. Die Befunde lassen so auf einen Mechanismus zur Bewältigung von durch Myogenese-induzierten Kräften schließen, indem HSF1 stabilisiert wird.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit das FILIP1L als ein Partnerprotein von BAG3 in differenzierten Myotuben an einem anderen autophagischen Abbauweg als CASA involviert ist, ähnlich wie es für FILIP1 vermutet wird. Für mechanisch belastete Zellen konnte kein autophagischer bzw. BAG3-vermittelter FILIP1L Abbau mehr gesehen werden (Abb. 18), möglicherweise ist FILIP1L hier nur während der Myogenese für die Aktivierung und Stabilisierung von HSF1 von Bedeutung. Inwieweit FILIP1L im proteasomalen und autophagischen Abbau in Muskelzellen beteiligt ist und welche Rolle dabei die Interaktion mit BAG3, spielt muss durch weitere Experimente geklärt werden.

5.4 BAG3-unabhängige Autophagiewege in Muskelzellen

Für die Proteostase-Faktoren FILIP1, HSPB1 und HSPB5 wurde in murinen Myotuben, autophagischer Abbau gezeigt (Abb. 8, Abb. 9). Darüber hinaus wird in Myotuben CASA aktiviert. Es wurde daher analysiert, ob es sich bei den Proteostase-Faktoren um neue Komponenten der CASA-Maschinerie handeln könnte. Dabei fiel auf, dass bei der Depletion von BAG3 die Proteinmengen sowohl für FILIP1 als auch HSBP5 und HSPB1 abnahmen und gleichzeitig ein erhöhter autophagischer Abbau stattfand (vgl. Abb. 15). Die fehlende Interaktion mit BAG3 scheint die Proteinmengen von FILIP1, HSPB1 und HSPB5 zu verringern. BAG3 kann über die IPV-Motive mit sHSPs interagieren (Rauch et al., 2017).

Während HSPB8 aufgrund der starken Bindeaffinität zu BAG3, in BAG3-defizienten Zellen nicht länger nachgewiesen werden kann, könnte die schwächere Bindeaffinität zwischen den sHSPs HSPB1 und HSPB5 mit BAG3 möglicherweise die verringerten Proteinmengen erklären (Carra et al., 2008a; Fang et al., 2017; Rauch et al., 2017). Eine direkte Interaktion zwischen FILIP1 und BAG3, welche die Abnahme der Proteinmenge in BAG3-defizienten Zellen erklären könnte, ist bisher nicht beschrieben. Die verminderte Proteinmenge der Proteostase-Faktoren wird von einer Induktion im autophagischen Abbau für FILIP1 und weiterem autophagischen Abbau für HSPB5 und HSPB1 begleitet. Die BAG3-Deletion stimuliert scheinbar den autophagischen Abbau der Proteostase-Faktoren und die Befunde zeigen so erstmalig neue BAG3-unabhängige autophagische Abbauwege in murinen Muskelzellen auf. So könnte in differenzierten Muskelzellen für HSPB1 und möglicherweise auch für HSPB5 eine direkte Interaktion mit p62 ohne eine weitere direkte Interaktion über das Cochaperon BAG3 den autophagischen Abbau vermitteln und fehlendes BAG3 diesen Weg möglicherweise stimulieren (Abb. 21). Die hier gebundenen und abzubauenen zytoskelettalen Bindepartner von HSPB1 und HSPB5 bleiben zu untersuchen. Da beschädigtes Filamin in BAG3-defizienten Zellen nicht länger BAG3-vermittelt über CASA abgebaut werden kann, könnte es hier auch zu einer kompensatorischen Induktion von FILIP1 kommen. Für FILIP1 ist bekannt, dass es FLNC binden und in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus in Myotuben den Abbau vermitteln kann (Reimann et al., 2020). Möglicherweise vermittelt FILIP1 hier BAG3-unabhängig den FLNC-Abbau in murinen Myotuben und zeigt so neue Autophagiewege auf (Abb. 21). FILIP1 könnte auch mit HSPB5 und HSPB1 in einer BAG3-unabhängigen Weise zusammenarbeiten, um die Proteostase aufrecht zu erhalten. Die Befunde liefern so Hinweise auf BAG3-unabhängig operierende autophagische Abbauwege in murinen Muskelzellen. Die weiteren möglichen Interaktionspartner und abzubauenen Substrate in Zusammenhang mit den sHSPs und FILIP1 müssen allerdings noch näher charakterisiert werden.

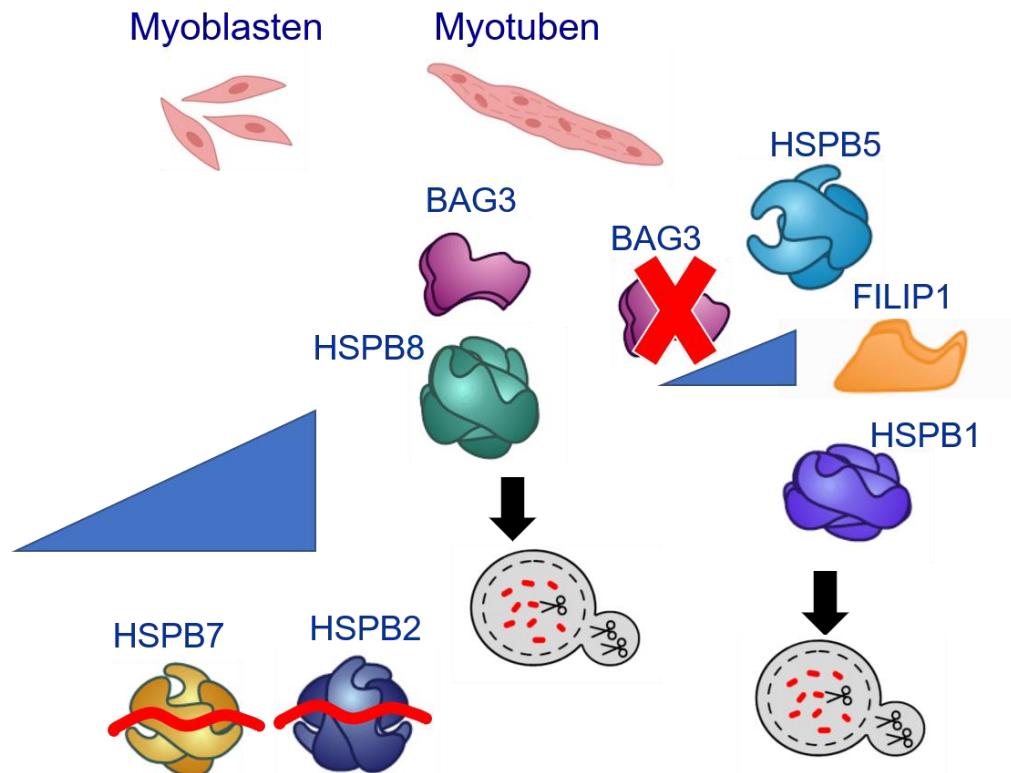


Abbildung 21: BAG3-unabhängige Abbauegung in Myotuben.

Während der Myogenese von Myoblasten zu Myotuben kommt es zur Zunahme der Proteinmengen der Komponenten der CASA-Maschinerie wie z.B. für BAG3 und HSPB8. Ebenso nimmt die zelluläre Expression der sHSPs HSPB1 und HSPB5 sowie für das Filamin-interagierende FILIP1 während der Differenzierung zu. In Myotuben ist der konventionelle CASA Abbauegung aktiv. Des Weiteren kann autophagischer Abbau für die Proteostase-Faktoren FILIP1, HSPB5 und HSPB1 festgestellt werden. Kommt es zu einer Depletion von BAG3 in Myotuben wird eine Induktion im autophagischen Abbau für FILIP1, als auch HSBP5 und HSPB1 wahrgenommen und zeigen so BAG3-unabhängige autophagische Abbauegung auf.

5.5 Intakte Proteinsynthese ist für Abbau unter mechanischer Schädigung wichtig

Zellen und vor allem Muskelzellen sind ständiger mechanischer Belastung ausgesetzt. In Muskelzellen kann mechanische Schädigung mit Hilfe einer EPS-Behandlung ausgelöst werden. Diese so induzierte mechanische Schädigung in murinen Muskelzellen führte zu einer signifikanten Abnahme der FLNC Proteinmenge, die mit einer Zunahme des Autophagie-Markers p62 einhergeht (Abb. 16), weshalb von einem autophagischen Abbau von FLNC über p62 ausgegangen werden kann. Dieser autophagische Abbau von FLNC kann über CASA stattfinden. Der CASA-Komplex erkennt mechanisch geschädigtes FLNC und es kommt zur Ubiquitinierung des abzubauenen Substrats über die Ubiquitin-Ligase CHIP. Dieses Abbausignal wird vom Ubiquitin-Bindeprotein p62 erkannt und der Abbau über Autophagosomen eingeleitet (Arndt et al., 2010; Ulbricht et al., 2013). Der Proteintranslationshemmer Cycloheximid (CHX) wird in Glattmuskeln dazu verwendet den

FLNC-Abbau während mechanischer Schädigung sichtbar zu machen, in der quergestreiften Mausmuskulatur verhinderte CHX jedoch den sichtbaren FLNC-Abbau (Abb. 16). Aufgrund der Proteintranslationshemmung kommt es in mechanisch geschädigten Muskelzellen der Maus zu einem rapiden Verlust des Autophagie-Markes p62, sodass mechanisch geschädigtes FLNC nicht länger autophagisch abgebaut werden kann. Um in mechanisch geschädigten murinen Muskelzellen FLNC-Abbau nachweisen zu können, wird eine ständige Proteinsynthese für Teile der Abbaumaschinerie wie p62 benötigt. Für den Erhalt der Proteostase in der quergestreiften Muskulatur wird neben dem Abbau von mechanisch geschädigten Zytoskelettproteinen und deren Neusynthese auch zwingend die Neusynthese für die Proteine der Abbau-Maschinerie benötigt.

5.6 Akuter mechanischer Stress führt zum Abschalten von CASA und zu neuen BAG3-abhängigen Abbauwegen

Nach der überraschenden Erkenntnis, dass zusätzlich zum CASA-vermittelten Abbauweg auch andere BAG3-unabhängige Autophagiewege in Myotuben aktiv sein können, sollten Autophagiewege in mechanisch geschädigten Myotuben aufgeklärt werden. Hierfür wurden adaptierte Myotuben, also Myotuben die zuvor milden mechanischen Belastungen ausgesetzt waren und sich an diese, durch Sarkomer-Bildung angepasst hatten sowie nicht adaptierte Myotuben, starker mechanischer Belastung ausgesetzt. Während für BAG3, FILIP1 und die sHSPs pHSPB5, HSPB1 weiterhin autophagischer Abbau in adaptierten und stark mechanisch belasteten Myotuben gezeigt werden konnte, konnte dieser Abbau für HSPB8 in adaptierten und mechanisch geschädigten Myotuben nicht länger gesehen werden (Abb. 17). So zeigt sich unter starker mechanischer Schädigung eine Entkopplung von HSPB8 im autophagischen Abbau. HSPB8 interagiert mit BAG3 während der Proteostase und erkennt entfaltete Proteine (Carra et al., 2008). In Muskelzellen war bisher eine Entkopplung von HSPB8 und BAG3 nicht beobachtet worden. In Nicht-Muskelzellen wurde diese BAG3-HSPB8 Entkopplung hingegen bereits beschrieben. In mit Arsenit oder Proteaseinhibitor behandelten Zellen, was zur Induktion von proteotoxischem Stress in den Zellen führt, ist es HSPB8 möglich in Stressgranula einzudringen und dabei ribosomale Proteine sowie Translationsprodukte zu binden und die Aggregatbildung gering zu halten (Ganassi et al., 2016). In mechanisch gestressten Zellen könnte die Entkopplung von BAG3 und HSPB8 als Schutzmechanismus in kontrahierenden Zellen dienen. HSPB8 könnte möglicherweise ebenso wie HSPB7 und HSPB2, für die kein autophagischer Abbau beobachtet werden konnte, die Aggregation von Zielproteinen verhindern und so die myofibrilläre Integrität in akut mechanisch geschädigten Muskelzellen erhalten, indem sie die Zielproteine in einem faltungskompetenten Zustand

halten oder zusammen mit anderen Chaperonen diese neu falten (Bakthisaran et al., 2015). Der autophagische Abbau für BAG3, FILIP1 und die sHSPs pHSPB5 und HSPB1 zeigt weiterhin autophagische Abbauewege auf, die zum Erhalt der Proteostase in den geschädigten Muskelzellen beitragen. Für diese Proteostase-Faktoren wurde in differenzierten Myotuben BAG3-unabhängige Autophagiewege entdeckt, sodass geklärt wurde, ob diese Autophagiewege in mechanisch geschädigten Muskelzellen weiterhin BAG3-unabhängig operieren. Die Myotuben konnten allerdings nicht zuvor adaptiert und anschließend starker mechanischer Schädigung ausgesetzt werden, da bereits die Transfektion mit siRNA die Myotuben belastet und eine Adaption über 16 h nicht möglich macht. Die zuvor beobachtete Entkopplung von BAG3 und HSPB8 kann hier deshalb nicht beobachtet werden, allerdings ist der autophagische Abbau für HSPB8 bereits gering (Abb. 17) und so sind möglicherweise bereits in mechanisch geschädigten Myotuben neue sHSPs wie HSPB1 und HSPB5 als BAG3 Interaktionspartner möglich (Rauch et al., 2017; Rauch and Gestwicki, 2014).

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein BAG3-abhängiger autophagischer Abbau von HSPB1 und pHSPB5 unter mechanischer Belastung gezeigt werden (vgl. Abb. 18). Für die sHSPs HSPB5 und HSPB1 ist bekannt, dass diese mit BAG3 über die IPV-Motive interagieren können (Rauch et al., 2017). sHSPs binden und stabilisieren entfaltete Zielproteine und halten diese in einem rückfaltungskompetenten Zustand (Boelens, 2020). BAG3 verknüpft die sHSPs mit den faltungskompetenten Chaperon HSP70 (Rauch et al., 2017). Ein Komplex bestehend aus BAG3-HSPB8 und HSP70 bindet an entfaltetes FLNC und vermittelt den Abbau über CASA. In mechanisch geschädigten Myotuben zeigte sich kein autophagischer Abbau mehr für die CASA-Komponente SYNPO2 (Höhfeld, unpubliziert) und in akut mechanisch geschädigten Myotuben zusätzlich eine Entkopplung von HSPB8 (vgl. Abb. 17), weshalb der konventionelle CASA-Abbaueweg nicht länger aktiv ist. In mechanisch geschädigten Myotuben findet somit eine Umstellung im autophagischen Abbau statt. Für mechanisch geschädigte Myotuben konnte erstmalig gezeigt werden, dass BAG3 neben dem bekannten Interaktionspartner HSPB8 im autophagischen Abbau, auch mit HSPB1 und pHSPB5 autophagischen Abbau vermitteln kann (vgl. Abb. 18). Da in mechanisch belasteten Myotuben nur ein autophagischer Abbau für phosphoryliertes HSPB5 gezeigt werden konnte, spielt die Phosphorylierung von HSPB5 für die Interaktion mit BAG3 eine besondere Rolle. Die posttranslationale Phosphorylierung von sHSPs nimmt mit dem Alter und unter Stressbedingungen zu (Treweek et al., 2015; van den IJssel et al., 1998). In humanen Muskelzellen konnte die induzierte Phosphorylierung nach mechanischer Beanspruchung bereits für HSPB5 gezeigt werden (Jacko et al., 2020). HSPB5 kann an drei Stellen phosphoryliert werden (Ser19, 45 und 59) (Treweek et al., 2015). Die Phosphorylierung von Ser45 wird dabei über die Mitogen-aktivierende Protein Kinase (MAPK) vermittelt, wobei die MAPK-aktivierende Protein Kinase 2 (MAPKAPK-2) an Ser 59 phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung verändert sich der

Oligomerisierungszustand und reduziert die durchschnittliche Oligomergröße (Treweek et al., 2015). Dabei steigert die Phosphorylierung die Chaperon-Aktivität von sHSPs gegen aggregierte Zielproteine als Folge des Zellstress (Treweek et al., 2015). Die Phosphorylierung von HSPB5 ermöglicht in gestressten Myotuben möglicherweise erst die Interaktion zwischen BAG3 und HSPB5, aufgrund kleinerer oligomerer Komplexe. Hierfür spricht auch, dass die phosphorylierte Form von HSPB5 kaum in differenzierten Myotuben mittels Antikörper im Western Blot nachweisbar war und der autophagische Abbau in differenzierten Myotuben nicht festzustellen ist (vgl. Abb. 9). pHSPB5 könnte möglicherweise neue entfaltete Substratproteine binden und stabilisieren und BAG3 transient mit dem pHSPB5-Substrat Komplex interagieren mit nachfolgender Sortierung zum Autophagosom. Die Interaktion zwischen pHSPB5 könnte hier transient sein, da BAG3 zusätzlich mit weiteren sHSPs wie HSPB8 und HSPB1 in mechanisch geschädigten Muskelzellen interagieren kann. Die vielfältigen Interaktionspartner von HSPB5 am Zytoskelett lassen die hier abzubauenen Substrate noch zu untersuchen.

Des Weiteren konnte auch für HSPB1 nur in mechanisch belasteten Zellen ein BAG3-vermittelter autophagischer Abbau festgestellt werden. Als Hauptfunktionen von HSPB1 in Muskelzellen wird der Schutz des Zytoskeletts vor stressinduzierten Schäden sowie die Modulation der Zytoskelettstruktur angesehen (Sarparanta et al., 2020). Dabei zeigt HSPB1 mechanosensitiven Funktionen, mit einer zunehmenden Bedeutung für die Proteostase in Muskelzellen auf (Sarparanta et al., 2020). So fördert phosphoryliertes HSPB1 den Aktin-Umbau in mechanisch beanspruchten Regionen des Aktinzytoskeletts (Hoffman et al., 2017) und phosphoryliertes HSPB1 moduliert auch die reversible Entfaltung von FLNC in Herzmuskelzellen, verursacht durch mechanischen Stress (Collier et al., 2019; Collier and Benesch, 2020). Da HSPB1, BAG3 und FLNC auch in sarkomeren Läsionen der Skelettmuskulatur co-lokalisieren, unterstützt dies, HSPB1 als ein weiteres transient mit BAG3 interagierendes sHSP neben pHSPB5 und HSPB8 in der Muskelproteostase (Chevessier et al., 2015). So ergibt sich anhand dieser Daten eine neue mögliche aktive Rolle von HSPB1 für den autophagischen Abbau von durch mechanischen Stress entfaltenen Interaktionspartnern. Ob BAG3 und HSPB1 hier beim Abbau von FLNC interagieren, neben der bekannten Interaktion von HSPB8 oder ob HSPB1 ein weiteres Substratprotein stabilisiert und mit BAG3 den Abbau vermittelt, bleibt jedoch zu untersuchen. Die Befunde zeigen, dass BAG3 mit HSPB1 und pHSPB5 an der autophagischen Entsorgung mechanisch geschädigter Proteine wirken können (Abb. 22). BAG3 ist hier aufgrund der vielfältigen Interaktionspartner für den Erhalt der Proteostase in mechanisch geschädigten Muskelzellen essentiell.

Überraschenderweise konnte in mechanisch geschädigten Muskelzellen BAG3-abhängiger autophagischer Abbau für FILIP1 gezeigt werden, welcher in differenzierten Muskelzellen zuvor BAG3-unabhängigen autophagischen Abbau zeigte (vgl. Abb. 15, Abb. 18). Der BAG3-

abhängige Abbau von FILIP1 in mechanisch geschädigten Myotuben steht im Gegensatz zum BAG3-unabhängigen, induzierten autophagischen Abbau in differenzierten Myotuben und deutet auf eine komplexe Regulation von BAG3 und FILIP1 zum Erhalt der Proteostase in murinen Muskelzellen hin. Der BAG3-abhängige autophagische Abbau von FILIP1 in akut gestressten Myotuben zeigt jedoch auch, dass diese Proteine beim Abbau miteinander interagieren können (Abb. 18). Möglicherweise führt mechanische Schädigung dabei zu einer veränderten Phosphorylierung von BAG3 oder FILIP1, ähnlich wie für pHSPB5, woraufhin es erst zu einer Interaktion der Proteine kommen kann. Für BAG3 ist bekannt, dass es zu Änderungen im Phosphorylierungsstatus aufgrund mechanischer Belastung in Muskelzellen kommt (Hoffman et al., 2015). Möglicherweise können veränderte Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen von BAG3 in mechanisch geschädigten Myotuben zu den neuen Interaktionen mit sHSPs und FILIP1 beitragen. Auch für FILIP1 ist eine Änderung aufgrund mechanischer Belastung im Phosphorylierungsstatus möglicherweise erst für die Interaktion mit BAG3 im autophagischen Abbau verantwortlich. Da sowohl BAG3 als auch FILIP1 FLNC binden können (Arndt et al., 2010; Reimann et al., 2020), könnten diese hier beim autophagischen Abbau von FLNC oder weiterer zytoskelettaler Proteine in mechanisch geschädigten Muskelzellen zusammenwirken. Wie dieser Abbau tatsächlich aussehen könnte und welche weiteren Proteine und Phosphorylierungsstellen dabei für die FILIP1 und BAG3 Interaktion in akut gestressten Myotuben von Bedeutung sind, wäre von Interesse für zukünftige Studien. Die Befunde zeigen eine komplexe Regulierung BAG3-vermittelter Proteostase in Muskelzellen auf (Abb. 22).

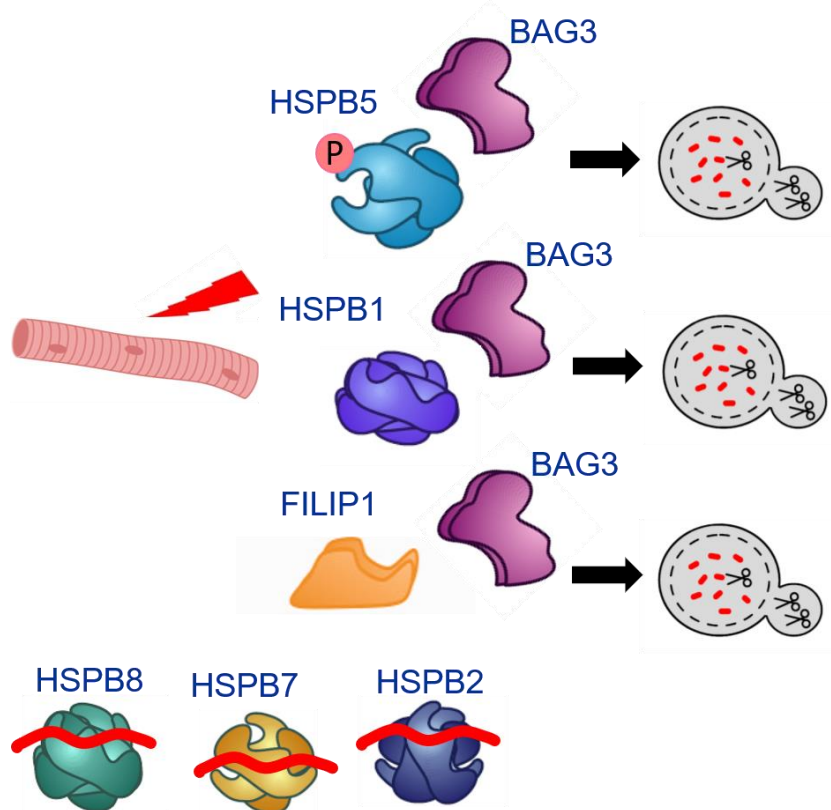


Abbildung 22: Neue BAG3-abhängige Abbauwege in akut gestressten Myotuben.

Unter akutem mechanischem Stress wird der konventionelle CASA-Abbauweg abgestellt. BAG3 kooperiert dann nicht länger mit HSPB8 sondern mit den kleinen Hitzeschockproteinen pHSPB5 und HSB1 sowie FILIP1. Unter akutem mechanischem Stress halten HSPB8, HSPB2 und HSPB7 Zielproteine in einem faltungskompetenten Zustand.

Aufgrund vorangegangener Befunde und um mögliche neue Komplexe von BAG3 in mechanisch belasteten Myotuben zu erkennen, wurde die Gelfiltration bzw. Größenausschluss-Chromatographie genutzt. Dabei bleiben Protein-Proteininteraktionen intakt und es können Proteinkomplexe im Immun-Blot sichtbar gemacht werden.

Die Ergebnisse zeigten eine gemeinsame Verschiebung von Komplexen aufgrund akuter mechanischer Belastung von BAG3 und HSPB8 auf. Für BAG3 ist bereits bekannt, dass es in Zusammenhang mit der CASA-Maschinerie Komplexe mit HSP70 und HSPB8 bildet. Es zeigten sich für BAG3 und HSPB8 sowohl in adaptierten als auch mechanisch belasteten Myotuben ähnlich große Komplexe um die 500-600 kDa (Abb. 19). Hier könnte es sich um einen Komplex bestehend aus BAG3, HSPB8 und HSP70 Proteinen sowie der Ubiquitin-Ligase CHIP mit gebundenem Substratprotein handeln, wie er für den autophagischen Abbau bereits beschrieben wurde (Arndt et al., 2010; Carra et al., 2005; Carra et al., 2008; Rauch et al., 2017). Hier sind allerdings auch neue Interaktionspartner von BAG3 wie FILIP1 in den

Komplexen in akut gestressten Myotuben denkbar. Des Weiteren kann auch die zuvor bereits beschriebene HSPB8 Entkopplung von den großen Komplexen unter akutem mechanischem Stress erkannt werden, da in Myotuben und adaptierten Myotuben unter mechanischer Belastung neben den Komplexen bei 500-600 kDa, HSPB8-Komplexe bei ~160 kDa wie in ungestressten Myotuben erneut sichtbar sind (Abb. 19). Diese HSPB8 Entkopplung könnte, wie bereits im Vorangegangenen näher beschrieben, mit der möglichen Beteiligung von HSPB8 in der Stressgranula-Bildung in akut gestressten Myotuben zusammenhängen. Möglicherweise erfüllt hier HSPB8 „*holding*“ Funktionen für mechanisch beschädigte zytoskelettale Proteine.

Für HSPB5 zeigte sich das wie in der Literatur beschriebene durchschnittliche Homooligomer bei ~650 kDa (Abb. 19) (Hayashi and Carver, 2020). Die Ergebnisse zeigten außer der verbesserten Löslichkeit in adaptierten Myotuben keine Veränderungen in der Oligomergröße unter mechanischer Schädigung auf. Für HSPB5 ist bekannt, dass es zusammen mit HSPB4 in differenzierten Linsenfaserzellen einen hetero-Oligomeren α -Crystallin-Komplex bildet der essentiell für die Linsenbrechung und Lichtfokussierung ist (Andley, 2007; Arrigo, 2013). Daneben kann HSPB5 auch mit weiteren sHSPs wie HSPB1 oder HSPB6 hetero-oligomere Komplexe bilden, wobei diese hetero-Oligomerbildung einen Einfluss auf die Aktivität der involvierten sHSPs zu haben scheint (Arrigo, 2013; Mymrikov et al., 2012; Mymrikov et al., 2020). Die Chaperon-Eigenschaften können so möglicherweise auf die abzubauenen Substrate abgestimmt werden (Mymrikov et al., 2020).

Auch für den selektiven Autophagie-Rezeptor p62 wurden keine Veränderungen aufgrund mechanischer Beanspruchung der Zelle festgestellt. Es fiel eher eine Änderung in der Löslichkeit der Proteinkomplexe selbst bei zunehmender mechanischer Belastung auf. Hier könnten die durch mechanische Belastung für den Abbau ubiquitinierten Substrate zu einer verbesserten Löslichkeit des Ubiquitin-Adapterproteins p62 beitragen. Durch die Multi-Domänenstruktur von p62 und die damit zusammenhängenden Möglichkeiten von Interaktions- bzw. Komplexpartnern sowie der ubiquitären Verteilung in der Zelle lassen sich auch die großen Komplexe für p62 zwischen 2.000 und 700 kDa erklären.

Tatsächlich können lediglich Spekulationen über die Komplexzusammensetzung und Veränderungen unter mechanischer Belastung gemacht werden, weshalb die Zellysate und erhaltenen Fraktionen aus je 5 Experimenten nach der Gelfiltration bzw. Größenausschluss-Chromatographie auch zur massenspektrometrischen Analyse nach Jülich zu Prof. Pitter Huesgen geschickt wurden. Hier soll die Komplexzusammensetzung abschließend geklärt werden, um einen Einblick in möglichen neuen Abbauewege und Interaktionspartner von BAG3 in mechanisch beanspruchten Zellen zu erhalten. Diese Daten lagen bis zum Erstellen dieser Arbeit noch nicht vor.

5.7 Fazit

In dieser Arbeit konnten wichtige neue Einblicke in die BAG3-vermittelte Proteinhomöostase in Muskelzellen gewonnen werden. In differenzierten Mausmuskelzellen wurden die kleine GTPase RhoA und das Filamin-interagierende Protein FILIP1L als neue Klientenproteine der BAG3-vermittelten Autophagie identifiziert. Das zeigt auf, dass BAG3 nicht nur auf Ebene des beschädigten Zytoskeletts, sondern auch an weiteren Signalwegen zur mechanischen Stressbewältigung wirkt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass neben dem konventionellen CASA-Autophagieweg, der eine Kooperation zwischen BAG3 und HSPB8 umfasst, alternative Autophagiewege in Myotuben aktiv sind, bei denen die kleinen Hitzeschockproteine HSPB1 und HSPB5 sowie das Filamin-interagierende Protein FILIP1 als Sortierfaktoren wirken. Diese alternativen Autophagiewege operieren in differenzierten Myotuben unabhängig von BAG3 und werden tatsächlich nach Depletion von BAG3 überaktiviert. Ein äußerst interessantes Umschalten der Autophagiewege ergibt sich unter akutem und schädigendem mechanischem Stress. In dieser Situation kommt es zu einem Abschalten des konventionellen CASA-Abbauweges aufgrund einer Entkopplung von HSPB8 und BAG3. Das Cochaperone arbeitet dann mit pHSPB5, HSPB1 und FILIP1 bei der autophagischen Entsorgung von Proteinen zusammen. Die Arbeit belegt insofern eine unerwartete Komplexität und eine umfassende Feinregulierung der BAG3-vermittelten Proteostase während der Differenzierung und der mechanischen Belastung von Muskelzellen.

Die Ergebnisse dieser Studie helfen somit die komplexen zellulären Vorgänge beim Erhalt der Proteostase in Muskelzellen besser zu verstehen. Dies trägt unmittelbar zur Analyse der molekularen Ursachen von Muskelerkrankungen bei.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- Andley, U.P., 2007. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in retinal and eye research* 26 (1), 78–98.
- Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D.O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B.K., Hoch, M., Höhfeld, J., 2010. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Current biology : CB* 20 (2), 143–148.
- Arrigo, A.-P., 2005. In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 94 (2), 241–246.
- Arrigo, A.-P., 2013. Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update. *FEBS letters* 587 (13), 1959–1969.
- Arrigo, A.-P., Gibert, B., 2013. Protein interactomes of three stress inducible small heat shock proteins: HspB1, HspB5 and HspB8. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 29 (5), 409–422.
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., Rao, C.M., 2015. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et biophysica acta* 1854 (4), 291–319.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science (New York, N.Y.)* 319 (5865), 916–919.
- Ballabio, A., Bonifacino, J.S., 2020. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 21 (2), 101–118.
- Behl, C., 2016. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends in pharmacological sciences* 37 (8), 672–688.
- Belaid, A., Cerezo, M., Chargui, A., Corcelle-Termeau, E., Pedeutour, F., Giuliano, S., Ilie, M., Rubera, I., Tauc, M., Barale, S., Bertolotto, C., Brest, P., Vouret-Craviari, V., Klionsky, D.J., Carle, G.F., Hofman, P., Mograbi, B., 2013. Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability. *Cancer research* 73 (14), 4311–4322.
- Bettoun, A., Joffre, C., Zago, G., Surdez, D., Vallerand, D., Gundogdu, R., Sharif, A.A.D., Gomez, M., Cascone, I., Meunier, B., White, M.A., Codogno, P., Parrini, M.C., Camonis, J.H., Hergovich, A., 2016. Mitochondrial clearance by the STK38 kinase supports oncogenic Ras-induced cell transformation. *Oncotarget* 7 (28), 44142–44160.
- Boelens, W.C., 2020. Structural aspects of the human small heat shock proteins related to their functional activities. *Cell stress & chaperones* 25 (4), 581–591.

-
- Bryan, B.A., Li, D., Wu, X., Liu, M., 2005. The Rho family of small GTPases: crucial regulators of skeletal myogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (14), 1547–1555.
- Budenholzer, L., Cheng, C.L., Li, Y., Hochstrasser, M., 2017. Proteasome Structure and Assembly. *Journal of molecular biology* 429 (22), 3500–3524.
- Capetanaki, Y., Milner, D.J., Weitzer, G., 1997. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell structure and function* 22 (1), 103–116.
- Caplan, A.J., 2003. What is a co-chaperone? *Cell stress & chaperones* 8 (2), 105–107.
- Carra, S., Alberti, S., Arrigo, P.A., Benesch, J.L., Benjamin, I.J., Boelens, W., Bartelt-Kirbach, B., Brundel, B.J.J.M., Buchner, J., Bukau, B., Carver, J.A., Ecroyd, H., Emanuelsson, C., Finet, S., Golenhofen, N., Goloubinoff, P., Gusev, N., Haslbeck, M., Hightower, L.E., Kampinga, H.H., Klevit, R.E., Liberek, K., Mchaourab, H.S., McMenimen, K.A., Poletti, A., Quinlan, R., Strelkov, S.V., Toth, M.E., Vierling, E., Tanguay, R.M., 2017. The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. *Cell stress & chaperones* 22 (4), 601–611.
- Carra, S., Seguin, S.J., Landry, J., 2008. HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy* 4 (2), 237–239.
- Carra, S., Sivilotti, M., Chávez Zobel, A.T., Lambert, H., Landry, J., 2005. HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Human molecular genetics* 14 (12), 1659–1669.
- Chal, J., Pourquié, O., 2017. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development (Cambridge, England)* 144 (12), 2104–2122.
- Charrasse, S., Comunale, F., Grumbach, Y., Poulat, F., Blangy, A., Gauthier-Rouvière, C., 2006. RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Molecular biology of the cell* 17 (2), 749–759.
- Chebotareva, N.A., Roman, S.G., Borzova, V.A., Eronina, T.B., Mikhaylova, V.V., Kurganov, B.I., 2020. Chaperone-Like Activity of HSPB5: The Effects of Quaternary Structure Dynamics and Crowding. *International journal of molecular sciences* 21 (14).
- Chevessier, F., Schuld, J., Orfanos, Z., Plank, A.-C., Wolf, L., Maerkens, A., Unger, A., Schlötzer-Schrehardt, U., Kley, R.A., Hörsten, S. von, Marcus, K., Linke, W.A., Vorgerd, M., van der Ven, P.F.M., Fürst, D.O., Schröder, R., 2015. Myofibrillar instability exacerbated by acute exercise in filaminopathy. *Human molecular genetics* 24 (25), 7207–7220.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., Burrige, K., 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *The Journal of cell biology* 133 (6), 1403–1415.
- Collier, M.P., Alderson, T.R., Villiers, C.P. de, Nicholls, D., Gastall, H.Y., Allison, T.M., Degiacomi, M.T., Jiang, H., Mlynek, G., Fürst, D.O., van der Ven, P.F.M., Djinojic-Carugo, K., Baldwin, A.J., Watkins, H., Gehmlich, K., Benesch, J.L.P., 2019. HspB1
-

-
- phosphorylation regulates its intramolecular dynamics and mechanosensitive molecular chaperone interaction with filamin C. *Science advances* 5 (5), eaav8421.
- Collier, M.P., Benesch, J.L.P., 2020. Small heat-shock proteins and their role in mechanical stress. *Cell stress & chaperones* 25 (4), 601–613.
- Cornils, H., Kohler, R.S., Hergovich, A., Hemmings, B.A., 2011. Downstream of human NDR kinases: impacting on c-myc and p21 protein stability to control cell cycle progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (12), 1897–1904.
- Crippa, V., Carra, S., Rusmini, P., Sau, D., Bolzoni, E., Bendotti, C., Biasi, S. de, Poletti, A., 2010. A role of small heat shock protein B8 (HspB8) in the autophagic removal of misfolded proteins responsible for neurodegenerative diseases. *Autophagy* 6 (7), 958–960.
- Dalkilic, I., Schienda, J., Thompson, T.G., Kunkel, L.M., 2006. Loss of FilaminC (FLNc) results in severe defects in myogenesis and myotube structure. *Molecular and cellular biology* 26 (17), 6522–6534.
- Dikic, I., Elazar, Z., 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19 (6), 349–364.
- Dimauro, I., Antonioni, A., Mercatelli, N., Caporossi, D., 2018. The role of α B-crystallin in skeletal and cardiac muscle tissues. *Cell stress & chaperones* 23 (4), 491–505.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., Piccolo, S., 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474 (7350), 179–183.
- Ehrlicher, A.J., Nakamura, F., Hartwig, J.H., Weitz, D.A., Stossel, T.P., 2011. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature* 478 (7368), 260–263.
- Ernst, O., Zor, T., 2010. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of visualized experiments : JoVE* (38).
- Eskelinen, E.-L., Saftig, P., 2009. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1793 (4), 664–673.
- Esser, C., Alberti, S., Höhfeld, J., 2004. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochimica et biophysica acta* 1695 (1-3), 171–188.
- Fang, X., Bogomolovas, J., Trexler, C., Chen, J., 2019. The BAG3-dependent and -independent roles of cardiac small heat shock proteins. *JCI insight* 4 (4).
- Faust, O., Abayev-Avraham, M., Wentink, A.S., Maurer, M., Nillegoda, N.B., London, N., Bukau, B., Rosenzweig, R., 2020. HSP40 proteins use class-specific regulation to drive HSP70 functional diversity. *Nature* 587 (7834), 489–494.
- Franaszczyk, M., Bilinska, Z.T., Sobieszcańska-Malek, M., Michalak, E., Sleszycka, J., Sioma, A., Malek, Ł.A., Kaczmarek, D., Walczak, E., Włodarski, P., Hutnik, Ł., Milanowska, B., Dzielinska, Z., Religa, G., Grzybowski, J., Zieliński, T., Płoski, R., 2014.
-

-
- The BAG3 gene variants in Polish patients with dilated cardiomyopathy: four novel mutations and a genotype-phenotype correlation. *Journal of translational medicine* 12, 192.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Hartl, F.U., Behl, C., 2009. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO journal* 28 (7), 889–901.
- Ganassi, M., Mateju, D., Bigi, I., Mediani, L., Poser, I., Lee, H.O., Seguin, S.J., Morelli, F.F., Vinet, J., Leo, G., Pansarasa, O., Cereda, C., Poletti, A., Alberti, S., Carra, S., 2016. A Surveillance Function of the HSPB8-BAG3-HSP70 Chaperone Complex Ensures Stress Granule Integrity and Dynamism. *Molecular cell* 63 (5), 796–810.
- Guilbert, S.M., Lambert, H., Rodrigue, M.-A., Fuchs, M., Landry, J., Lavoie, J.N., 2018. HSPB8 and BAG3 cooperate to promote spatial sequestration of ubiquitinated proteins and coordinate the cellular adaptive response to proteasome insufficiency. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32 (7), 3518–3535.
- Haidar, M., Asselbergh, B., Adriaenssens, E., Winter, V. de, Timmermans, J.-P., Auer-Grumbach, M., Juneja, M., Timmerman, V., 2019. Neuropathy-causing mutations in HSPB1 impair autophagy by disturbing the formation of SQSTM1/p62 bodies. *Autophagy* 15 (6), 1051–1068.
- Hart, P.D., Young, M.R., 1991. Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *The Journal of experimental medicine* 174 (4), 881–889.
- Hartl, F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381 (6583), 571–579.
- Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475 (7356), 324–332.
- Haslbeck, M., Weinkauff, S., Buchner, J., 2019. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *The Journal of biological chemistry* 294 (6), 2121–2132.
- Hayashi, J., Carver, J.A., 2020. The multifaceted nature of α B-crystallin. *Cell stress & chaperones* 25 (4), 639–654.
- Hergovich, A., 2016. The Roles of NDR Protein Kinases in Hippo Signalling. *Genes* 7 (5).
- Hergovich, A., Bichsel, S.J., Hemmings, B.A., 2005. Human NDR kinases are rapidly activated by MOB proteins through recruitment to the plasma membrane and phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 25 (18), 8259–8272.
- Hergovich, A., Stegert, M.R., Schmitz, D., Hemmings, B.A., 2006. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7 (4), 253–264.
-

-
- Hipp, M.S., Kasturi, P., Hartl, F.U., 2019. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (7), 421–435.
- Hishiya, A., Salman, M.N., Carra, S., Kampinga, H.H., Takayama, S., 2011. BAG3 directly interacts with mutated alphaB-crystallin to suppress its aggregation and toxicity. *PloS one* 6 (3), e16828.
- Hoffman, L., Jensen, C.C., Yoshigi, M., Beckerle, M., 2017. Mechanical signals activate p38 MAPK pathway-dependent reinforcement of actin via mechanosensitive HspB1. *Molecular biology of the cell* 28 (20), 2661–2675.
- 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., Stöckli, J., Burchfield, J.G., Jensen, T.E., Jothi, R., Kiens, B., Wojtaszewski, J.F.P., Richter, E.A., James, D.E., 2015. Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. *Cell metabolism* 22 (5), 922–935.
- Höhfeld, J., Benzing, T., Bloch, W., Fürst, D.O., Gehlert, S., Hesse, M., Hoffmann, B., Hoppe, T., Huesgen, P.F., Köhn, M., Kolanus, W., Merkel, R., Niessen, C.M., Pokrzywa, W., Rinschen, M.M., Wachten, D., Warscheid, B., 2021. Maintaining proteostasis under mechanical stress. *EMBO reports* 22 (8), e52507.
- Homma, S., Iwasaki, M., Shelton, G.D., Engvall, E., Reed, J.C., Takayama, S., 2006. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *The American journal of pathology* 169 (3), 761–773.
- Hong, W., Guan, K.-L., 2012. The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Seminars in cell & developmental biology* 23 (7), 785–793.
- Hu, J., Lu, J., Goyal, A., Wong, T., Lian, G., Zhang, J., Hecht, J.L., Feng, Y., Sheen, V.L., 2017. Opposing FlnA and FlnB interactions regulate RhoA activation in guiding dynamic actin stress fiber formation and cell spreading. *Human molecular genetics* 26 (7), 1294–1304.
- Hu, Y., Mivechi, N.F., 2011. Promotion of heat shock factor Hsf1 degradation via adaptor protein filamin A-interacting protein 1-like (FILIP-1L). *The Journal of biological chemistry* 286 (36), 31397–31408.
- Iwasaki, K., Hayashi, K., Fujioka, T., Sobue, K., 2008. Rho/Rho-associated kinase signal regulates myogenic differentiation via myocardin-related transcription factor-A/Smad-dependent transcription of the Id3 gene. *The Journal of biological chemistry* 283 (30), 21230–21241.
- Jacko, D., Bersiner, K., Schulz, O., Przyklenk, A., Spahiu, F., Höhfeld, J., Bloch, W., Gehlert, S., 2020. Coordinated alpha-crystallin B phosphorylation and desmin expression indicate adaptation and deadaptation to resistance exercise-induced loading in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology* 319 (2), C300-C312.
-

-
- Jeng, W., Lee, S., Sung, N., Lee, J., Tsai, F.T.F., 2015. Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states. *F1000Research* 4.
- Joffre, C., Dupont, N., Hoa, L., Gomez, V., Pardo, R., Gonçalves-Pimentel, C., Achard, P., Bettoun, A., Meunier, B., Bauvy, C., Cascone, I., Codogno, P., Fanto, M., Hergovich, A., Camonis, J., 2015. The Pro-apoptotic STK38 Kinase Is a New Beclin1 Partner Positively Regulating Autophagy. *Current biology : CB* 25 (19), 2479–2492.
- Juo, L.-Y., Liao, W.-C., Shih, Y.-L., Yang, B.-Y., Liu, A.-B., Yan, Y.-T., 2016. HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles. *Journal of cell science* 129 (8), 1661–1670.
- Kampinga, H.H., Craig, E.A., 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (8), 579–592.
- Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Lüdecke, L., Tapia, V.E., Orfanos, Z., Wenzel, D., Bloch, W., Volkmer, R., Fleischmann, B.K., Fürst, D.O., Höhfeld, J., 2017. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1864 (1), 62–75.
- Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R., Höhfeld, J., 2010. Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biological chemistry* 391 (5), 481–489.
- Khaminets, A., Behl, C., Dikic, I., 2016. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in cell biology* 26 (1), 6–16.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., 2013. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry* 82, 323–355.
- Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., Hartl, F.U., 2018. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *The Journal of cell biology* 217 (1), 51–63.
- Kley, R.A., van der Ven, P.F.M., Olivé, M., Höhfeld, J., Goldfarb, L.G., Fürst, D.O., Vorgerd, M., 2013. Impairment of protein degradation in myofibrillar myopathy caused by FLNC/filamin C mutations. *Autophagy* 9 (3), 422–423.
- Klimek, C., Jahnke, R., Wördehoff, J., Kathage, B., Stadel, D., Behrends, C., Hergovich, A., Höhfeld, J., 2019. The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1866 (10), 1556–1566.
- Klimek, C., Kathage, B., Wördehoff, J., Höhfeld, J., 2017. BAG3-mediated proteostasis at a glance. *Journal of cell science* 130 (17), 2781–2788.
- Korovila, I., Hugo, M., Castro, J.P., Weber, D., Höhn, A., Grune, T., Jung, T., 2017. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox biology* 13, 550–567.
- Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., Buchner, J., 2010. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock
-

-
- proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (10), 3633–3642.
- Ktistakis, N.T., 2017. In praise of M. Anselmier who first used the term "autophagie" in 1859. *Autophagy* 13 (12), 2015–2017.
- Kwon, M., Libutti, S.K., 2014. Filamin A interacting protein 1-like as a therapeutic target in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* 18 (12), 1435–1447.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., Tooze, S.A., 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (12), 759–774.
- Lessey, E.C., Guilluy, C., Burridge, K., 2012. From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry* 51 (38), 7420–7432.
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132 (1), 27–42.
- Liu, J., Kong, X., Lee, Y.M., Zhang, M.K., Guo, L.Y., Lin, Y., Lim, T.K., Lin, Q., Xu, X.Q., 2017. Stk38 Modulates Rbm24 Protein Stability to Regulate Sarcomere Assembly in Cardiomyocytes. *Scientific reports* 7, 44870.
- Ma, S., Meng, Z., Chen, R., Guan, K.-L., 2019. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annual review of biochemistry* 88, 577–604.
- Mao, Z., Nakamura, F., 2020. Structure and Function of Filamin C in the Muscle Z-Disc. *International journal of molecular sciences* 21 (8).
- Martin, A.P., Aushev, V.N., Zalzman, G., Camonis, J.H., 2021a. The STK38-XPO1 axis, a new actor in physiology and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 78 (5), 1943–1955.
- Martin, T.G., Myers, V.D., Dubey, P., Dubey, S., Perez, E., Moravec, C.S., Willis, M.S., Feldman, A.M., Kirk, J.A., 2021b. Cardiomyocyte contractile impairment in heart failure results from reduced BAG3-mediated sarcomeric protein turnover. *Nature communications* 12 (1), 2942.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (6), 670–684.
- Meister-Broekema, M., Freilich, R., Jagadeesan, C., Rauch, J.N., Bengoechea, R., Motley, W.W., Kuiper, E.F.E., Minoia, M., Furtado, G.V., van Waarde, M.A.W.H., Bird, S.J., Rebelo, A., Zuchner, S., Pytel, P., Scherer, S.S., Morelli, F.F., Carra, S., Weihl, C.C., Bergink, S., Gestwicki, J.E., Kampinga, H.H., 2018. Myopathy associated BAG3 mutations lead to protein aggregation by stalling Hsp70 networks. *Nature communications* 9 (1), 5342.
- Meng, Z., Moroishi, T., Guan, K.-L., 2016. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development* 30 (1), 1–17.
- Mizushima, N., Komatsu, M., 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147 (4), 728–741.
-

-
- Mymrikov, E.V., Riedl, M., Peters, C., Weinkauf, S., Haslbeck, M., Buchner, J., 2020. Regulation of small heat-shock proteins by hetero-oligomer formation. *The Journal of biological chemistry* 295 (1), 158–169.
- Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., Gusev, N.B., 2012. Heterooligomeric complexes of human small heat shock proteins. *Cell stress & chaperones* 17 (2), 157–169.
- Nagano, T., Yoneda, T., Hatanaka, Y., Kubota, C., Murakami, F., Sato, M., 2002. Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nature cell biology* 4 (7), 495–501.
- Nakamura, F., Stossel, T.P., Hartwig, J.H., 2011. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell adhesion & migration* 5 (2), 160–169.
- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L., Hardesty, B., 1971. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *The Journal of biological chemistry* 246 (1), 174–181.
- Orfanos, Z., Gödderz, M.P.O., Soroka, E., Gödderz, T., Rummyantseva, A., van der Ven, P.F.M., Hawke, T.J., Fürst, D.O., 2016. Breaking sarcomeres by in vitro exercise. *Scientific reports* 6, 19614.
- Parzych, K.R., Klionsky, D.J., 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* 20 (3), 460–473.
- Pivovarova, A.V., Chebotareva, N.A., Chernik, I.S., Gusev, N.B., Levitsky, D.I., 2007. Small heat shock protein Hsp27 prevents heat-induced aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin. *The FEBS journal* 274 (22), 5937–5948.
- Rauch, J.N., Gestwicki, J.E., 2014. Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. *The Journal of biological chemistry* 289 (3), 1402–1414.
- Rauch, J.N., Tse, E., Freilich, R., Mok, S.-A., Makley, L.N., Southworth, D.R., Gestwicki, J.E., 2017. BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins. *Journal of molecular biology* 429 (1), 128–141.
- Reimann, L., Schwäble, A.N., Fricke, A.L., Mühlhäuser, W.W.D., Leber, Y., Lohanadan, K., Puchinger, M.G., Schäuble, S., Faessler, E., Wiese, H., Reichenbach, C., Knapp, B., Peikert, C.D., Drepper, F., Hahn, U., Kreutz, C., van der Ven, P.F.M., Radziwill, G., Djinović-Carugo, K., Fürst, D.O., Warscheid, B., 2020. Phosphoproteomics identifies dual-site phosphorylation in an extended basophilic motif regulating FILIP1-mediated degradation of filamin-C. *Communications biology* 3 (1), 253.
- Riedl, M., Strauch, A., Catlici, D.A.M., Haslbeck, M., 2020. Proteinaceous Transformers: Structural and Functional Variability of Human sHsps. *International journal of molecular sciences* 21 (15).
-

-
- Rubinsztein, D.C., 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443 (7113), 780–786.
- Salah, Z., Aqeilan, R.I., 2011. WW domain interactions regulate the Hippo tumor suppressor pathway. *Cell death & disease* 2, e172.
- Sarparanta, J., Jonson, P.H., Kawan, S., Udd, B., 2020. Neuromuscular Diseases Due to Chaperone Mutations: A Review and Some New Results. *International journal of molecular sciences* 21 (4).
- Schreiber, A., Peter, M., 2014. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et biophysica acta* 1843 (1), 163–181.
- Schulze, H., Kolter, T., Sandhoff, K., 2009. Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochimica et biophysica acta* 1793 (4), 674–683.
- Selcen, D., Muntoni, F., Burton, B.K., Pegoraro, E., Sewry, C., Bite, A.V., Engel, A.G., 2009. Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Annals of neurology* 65 (1), 83–89.
- Smith, P.G., Roy, C., Zhang, Y.N., Chauduri, S., 2003. Mechanical stress increases RhoA activation in airway smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28 (4), 436–442.
- Stürner, E., Behl, C., 2017. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Frontiers in molecular neuroscience* 10, 177.
- Takayama, S., Xie, Z., Reed, J.C., 1999. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *The Journal of biological chemistry* 274 (2), 781–786.
- Tanaka, K., 2009. The proteasome: Overview of structure and functions // The proteasome: overview of structure and functions. *Laboratory of Frontier Science, Tokyo Metropolitan. The Japan Academy* 2009 // 85 (1), 12–36.
- Treweek, T.M., Meehan, S., Ecroyd, H., Carver, J.A., 2015. Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (3), 429–451.
- 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., Behrends, C., Fürst, D.O., Volkmer, R., Hoffmann, B., Kolanus, W., Höhfeld, J., 2013. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Current biology : CB* 23 (5), 430–435.
- Ulbricht, A., Gehlert, S., Leciejewski, B., Schiffer, T., Bloch, W., Höhfeld, J., 2015. Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy* 11 (3), 538–546.
- Ulbricht, A., Höhfeld, J., 2013. Tension-induced autophagy: may the chaperone be with you. *Autophagy* 9 (6), 920–922.
-

-
- van den IJssel, P.R., Overkamp, P., Bloemendal, H., Jong, W.W. de, 1998. Phosphorylation of alphaB-crystallin and HSP27 is induced by similar stressors in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications* 247 (2), 518–523.
- Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prévost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tomé, F., Dupret, J.M., Paulin, D., Fardeau, M., 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature genetics* 20 (1), 92–95.
- Vichalkovski, A., Gresko, E., Cornils, H., Hergovich, A., Schmitz, D., Hemmings, B.A., 2008. NDR kinase is activated by RASSF1A/MST1 in response to Fas receptor stimulation and promotes apoptosis. *Current biology : CB* 18 (23), 1889–1895.
- Vihervaara, A., Sistonen, L., 2014. HSF1 at a glance. *Journal of cell science* 127 (Pt 2), 261–266.
- Wang, D., He, J., Huang, B., Liu, S., Zhu, H., Xu, T., 2020. Emerging role of the Hippo pathway in autophagy. *Cell death & disease* 11 (10), 880.
- Wang, Y., Qin, Z., 2013. Coordination of autophagy with other cellular activities. *Acta pharmacologica Sinica* 34 (5), 585–594.
- Wilkinson, D.S., Jariwala, J.S., Anderson, E., Mitra, K., Meisenhelder, J., Chang, J.T., Ideker, T., Hunter, T., Nizet, V., Dillin, A., Hansen, M., 2015. Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy. *Molecular cell* 57 (1), 55–68.
- Yang, Y., Hu, L., Zheng, H., Mao, C., Hu, W., Xiong, K., Wang, F., Liu, C., 2013. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta pharmacologica Sinica* 34 (5), 625–635.
- Yu, F.-X., Guan, K.-L., 2013. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development* 27 (4), 355–371.
- Zantema, A., Verlaan-De Vries, M., Maasdam, D., Bol, S., van der Eb, A., 1992. Heat shock protein 27 and alpha B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock. *The Journal of biological chemistry* 267 (18), 12936–12941.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteostase.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der BAG3-Interaktionsdomänen.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Autophagosomenformation.....	10
Abbildung 4: Abbau von Filamin über die CASA Maschinerie.....	13
Abbildung 5: BAG3 vermittelte Regulation der Transkription, Translation und der Degradation.....	16
Abbildung 6: Myogenese und elektrische Pulsstimulationsprogramme.....	18
Abbildung 7: Expression von CASA-Komponenten, Zytoskelettproteinen und Proteostase-Faktoren während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben.....	40
Abbildung 8: Autophagischer Abbau des CASA-Substrats FLNC und der Komponenten der CASA-Maschinerie in Myoblasten und Myotuben.....	42
Abbildung 9: Autophagischer Abbau kleiner Hitzeschockproteine in Myoblasten und Myotuben.....	43
Abbildung 10: Autophagischer Abbau weiterer Zytoskelett-Komponenten und Proteostase-Faktoren RhoA, FILIP1 und FILIP1L in Myoblasten und Myotuben.....	44
Abbildung 11 Autophagischer Abbau der CASA-regulierenden Kinase STK38.....	45
Abbildung 12: BAG3 Depletion in murinen Myotuben inhibiert den autophagischen Abbau von FLNC und SYNPO2.....	46
Abbildung 13: BAG3-Depletion führt zum Anstieg der RhoA-Proteinmenge und verhindert den autophagischen Abbau von RhoA.....	48
Abbildung 14: BAG3-Depletion beeinflusst die Proteinmenge und den autophagischen Abbau von FILIP1L.....	49
Abbildung 15: BAG3-Depletion beeinflusst den autophagischen Abbau von FILIP1, HSPB5 und HSPB1.....	50
Abbildung 16: Mechanische Belastung führt zum Abbau von Filamin C in murinen Myotuben.....	52
Abbildung 17: Starke mechanische Schädigung inhibiert den autophagischen Abbau von HSPB8 in adaptierten Myotuben während autophagischer Abbau weiterhin für BAG3, FILIP1, HSPB1 und pHSPB5 festgestellt wird... ..	54
Abbildung 18: BAG3-abhängiger autophagischer Abbau von pHSPB5, HSPB1, RhoA und FILIP1 in mechanisch geschädigten Myotuben.....	56
Abbildung 19: Komplexbildung von BAG3, HSPB8, HSPB5 und p62 in mechanisch geschädigten und ungeschädigten Myotuben.....	58
Abbildung 20: Schematische Darstellung der RhoA vermittelten Kraftgenerierung in Zellen in Zusammenhang mit dem CASA-vermittelten RhoA Abbau.....	64
Abbildung 21: BAG3-unabhängige Abbauewege in Myotuben.....	67
Abbildung 22: Neue BAG3-abhängige Abbauewege in akut gestressten Myotuben.....	72

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	20
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.....	21
Tabelle 3: Verwendete molekularbiologische Reagenzien.....	24
Tabelle 4: Verwendete Bakterien und eukaryotischen Zellen.....	24
Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper.....	24
Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper.....	25
Tabelle 7: Verwendete Plasmide zur Amplifikation oder Expression in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen.....	25
Tabelle 8: Verwendete <i>short interfering</i> RNA (siRNA) zur spezifischen Depletion von Genprodukten.....	26
Tabelle 9: Verwendete Inhibitoren.....	30
Tabelle 10: Verwendete Kalibrierungsproteine.....	34
Tabelle 11: Trenngel nach Laemmli - Mengenangaben für ein Gel.....	35
Tabelle 12: Sammelgel nach Laemmli - Mengenangaben für ein Gel.....	35
Tabelle 13: Verwendete Elektrostimulationsprogramme (EPS).....	38

6.4 Abkürzungsverzeichnis

ACTN2	α -Actinin 2
ADP	Adenosindiphosphat
Ala, A	Alanin
AMOT	Angiomotin
AMOTL	Angiomotin- <i>like</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arg, R	Arginin
ATG	<i>Autophagy-Related-Gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	<i>BCL2 associated athanogene</i>
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BSA	Bovine Serum Albumin
CASA	Chaperon-assistierte selective Autophagie
CHIP	C-terminus of Hsc70- <i>Interacting</i> Protein
CMA	<i>chaperone mediated autophagy</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

E1	Ubiquitin-Aktivierungs Enzym 1
E2	Ubiquitin-Träger oder Konjugationsprotein
E3	Ubiquitin-Proteinligase
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
Exo84	<i>Exocyst complex component 84</i>
FCS	Fetales Kälber Serum
FLN(C)	Filamin(C)
GAP	GTPase- <i>activating</i> Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEF	<i>guanine nucleotide-exchange factor</i>
GDI	<i>guanine nucleotide-dissociation inhibitor</i>
GTPasen	Familie der Guanosintriphosphat Proteine
GDP/GTP	Guanosindi-/triphosphat
h	Stunde/Stunden
HSC	<i>Heat Shock Cognate</i>
HSF	<i>Heat shock factor</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JDP	J-Domänenprotein
LAMP-2A	<i>Lysosomal Associated Membrane Protein 2A</i>
LATS	<i>Large Tumor Suppressor Kinase</i>
LC3	<i>Light Chain 3</i>
Lys, K	Lysin
Min	Minute
MOB	<i>Mps1 One Binder</i>
Ms	Millisekunde
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1</i>
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant

NDR	<i>Nuclear dbf2-Related</i>
NEF	Nukleotid Austauschfaktor
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
PAS	<i>Preautophagosomal Structure</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
RalB	<i>RAS Like Proto-Oncogene B</i>
RBM24	<i>RNA-binding Motif 24</i>
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
RIPA-Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation assay-Puffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNARE	<i>Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor</i>
STK	<i>Mammalian Serin/Threonin Sterile 20 (STE20)-Like Kinases</i>
TAE-Puffer	TRIS Acetat EDTA-Puffer
TAZ	<i>transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEAD	<i>transcriptional enhanced associate domain</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr, T	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	<i>Tuberous Sclerosis Complex</i>
ün	über Nacht
UPS	Ubiquitin Proteasom System
V	Volt
Vgl.	vergleiche
VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
Xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

YAP *Yes-associated protein*
z.B. zum Beispiel

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Jörg Höfeld für die Möglichkeit diese spannende Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Herzlichen Dank für das in mich gesetzte Vertrauen und die stetige Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

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

Ebenso möchte ich mich für die großartige fachliche Zusammenarbeit und für die Transkriptomanalyse bei Philipp Leyendecker, Maithreyan Kuppusamy und Prof. Dr. Pitter Huesgen bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank meinen Arbeitskollegen für die gute Arbeitsatmosphäre, die fachliche Hilfe und Unterstützung in den letzten Jahren: Dr. Christina Klimek, Dr. Judith Würdehoff, Julia Friedrich, Alessandra Esch, Karen Himmelberg, Katharina Schecke, Jonas Rieger und Faith Osu-Walter. Danke für eure Unterstützung.

Allen Mitgliedern des Instituts für Zellbiologie danke ich für die Hilfsbereitschaft und die entspannte Atmosphäre.

Meinen Freunden danke ich für den stetigen guten Zuspruch und die Hilfsbereitschaft während dem Erstellen dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner großartigen Familie bedanken. Ich konnte in all den Jahren immer auf eure Unterstützung und euren bedingungslosen Rückhalt zählen. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann. Vielen Dank an meine großartigen Eltern, welche mir dieses Studium ermöglicht haben. Last but not Least- möchte ich meinem wunderbaren Mann Benedikt danken, der mich auf dem gesamten Weg vom Studium bis zur Promotion immer begleitet und unterstützt hat. Ich danke euch von ganzem Herzen.