

**„Die Regulation der Ubiquitinligase CHIP
durch das Cochaperon BAG2
im zellulären System und im Kontext
der replikativen Seneszenz“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Bianca Schönbühler,
geb. Ackermann, am 14. Juni 1978 in Mainz

Mainz, im Juni 2014

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Proteinqualitätskontrolle in der Zelle	1
1.1.1 Proteinfaltung und Aggregation	1
1.1.2 Molekulare Chaperone	3
1.1.3 Das HSP72/HSC70-System	5
1.1.4 Proteindegradation	7
1.1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	7
1.1.4.2 Autophagie	8
1.1.5 Cochaperone und Proteintriage	9
1.1.6 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des C-Terminus von HSP70	10
interagierenden Proteins (CHIP)	10
1.1.7 Die BCL2-assoziierte Athanogen (BAG)-Proteinfamilie	12
1.1.8 Das Cochaperon BAG2	15
1.1.9 Das Cochaperon HSP70 Bindeprotein 1 (HSPBP1)	17
1.2 Alterung.....	18
1.2.1 Theorien zur Alterung	18
1.2.2 Altersassoziierte Veränderungen in der Proteinqualitätskontrolle und neuro-	20
degenerative Erkrankungen.....	20
1.3 Zielsetzung der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Zellbiologische Methoden	23
2.1.1 Kultivierung von Zelllinien.....	23
2.1.2 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidasefärbung.....	25
2.1.3 Stressinduzierte, vorzeitige Seneszenz.....	25
2.1.4 Transiente Transfektion mittels Elektroporation.....	25
2.1.5 Hitzestress	27
2.2 Proteinbiochemische Methoden	27
2.2.1 Proteinextraktion aus Zellen.....	27
2.2.2 Proteinextraktion aus Mausgewebe.....	28
2.2.3 Proteinquantifizierung	28
2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.2.5 Western Blot-Analyse und immunologischer Proteinnachweis.....	30
2.2.6 Coimmunpräzipitation (Co-IP) und Ubiquitinanalyse	33

2.3 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.3.1 Konstruktion der Expressionsplasmide.....	35
2.3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
2.3.1.2 Linearisierung des Zielvektors mittels Restriktion	36
2.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	37
2.3.1.4 Präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.3.1.5 Fusion von Insert-DNA und Zielvektor mit dem <i>In-Fusion Advantage</i>	38
<i>PCR Cloning Kit</i>	38
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Spektralphotometrie.....	40
2.3.3 Gerichtete Mutagenese	41
2.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen.....	42
2.3.5 cDNA Synthese mittels Reverser Transkription (RT-PCR)	42
2.3.6 Quantitative Echtzeit-PCR (Echtzeit-qPCR)	43
2.3.7 Statistische Methoden	44
2.4 Geräte	45
2.5 Chemikalien	46
3. ERGEBNISSE	49
3.1 Der Einfluss von BAG2 auf die Ubiquitinligase CHIP im zellulären System.....	49
3.1.1 Einfluss von BAG2 auf die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP in HEK-293T ...	49
Zellen.....	49
3.1.2 BAG2 reguliert die Proteinspiegel des CHIP-Substrates HSP72 in IMR-90.....	51
Zellen.....	51
3.1.3 BAG2 inhibiert die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP in IMR-90 Zellen	52
3.2 Funktionelle Charakterisierung des CHIP-Modulators BAG2.....	55
3.2.1 Einfluss von BAG2 auf den Verlauf einer Hitzeschockantwort	55
3.2.2 Einfluss von BAG2 auf das Zellüberleben bei chronischem Hitzestress.....	56
3.3 Die Funktion von BAG2 im Kontext der zellulären Alterung	57
3.3.1 Charakterisierung des zellulären Alterungsmodells.....	57
3.3.2 BAG2 inhibiert die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP im IMR-90 Modell der ...	61
zellulären Seneszenz	61
3.3.3 Proteinspiegel des CHIP-Substrates und Seneszenzregulators p53 werden in	63
gealterten IMR-90 Zellen BAG2-abhängig reguliert.....	63
3.3.4 Alterung ist mit erhöhten BAG2- und verringerten HSPBP1-Proteinspiegeln <i>in</i> ...	64
<i>vitro</i> und <i>in vivo</i> assoziiert	64

4. DISKUSSION	71
4.1 BAG2 als Inhibitor der Ubiquitinligaseaktivität von CHIP im zellulären System 71	
4.1.1 BAG2 als HSP72-Regulator.....	74
4.1.2 Der Einfluss von BAG2 auf den Verlauf einer Hitzeschockantwort und auf das... Zellüberleben im chronischen Hitzestress.....	75
4.2 Einfluss zellulärer Alterung auf CHIP-Aktivität und -Regulation durch BAG2... 76	
4.2.1 Altersabhängige Regulation des Seneszenzmediators p53 durch BAG2.....	78
4.2.2 Altersassoziierte, reziproke Regulation der Proteinspiegel zweier funktionell redundanter CHIP-Modulatoren.....	80
4.2.3 Alterungsbedingte Veränderung der CHIP-Regulation und deren mögliche..... Relevanz für altersassoziierte Erkrankungen	81
5. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	86
6. LITERATURVERZEICHNIS	90
7. ANHANG	104
7.1 Abbildungsverzeichnis	104
7.2 Tabellenverzeichnis	105
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	105
7.4 Plasmidkarten und Sequenzen	110
7.4.1 Vektor pCHIP-WTmyc-His	110
7.4.2 Vektor pBAG2-N1	114
7.4.3 Vektor pCHIP-N1	116
7.4.4 Vektor pHSPBP1-N1	119
Eidesstattliche Erklärung	1222
Publikationen	Fehler! Textmarke nicht definiert.3

1. EINLEITUNG

1.1 Proteinqualitätskontrolle in der Zelle

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle, die in einem Organismus mannigfaltige Funktionen ausüben. Strukturproteine verleihen der einzelnen Zelle, und damit auch ganzen Geweben, Struktur und bestimmen so die Körperbeschaffenheit eines Organismus. In Muskelzellen sind sie außerdem maßgeblich an der Muskelkontraktion und dadurch an der Bewegung des Lebewesens beteiligt. Des Weiteren können Proteine den Körper gegen Mikroorganismen schützen, sie sind am Metabolismus und am Stofftransport beteiligt sowie in Signalwegen involviert. Als Reservestoff können Proteine auch als Energielieferanten dienen. Die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment wird als Proteom bezeichnet. Das Proteom steht in einem hoch dynamischen Gleichgewicht zwischen ständiger Neusynthese und gleichzeitigem Abbau von Proteinen. Die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes (Proteostase) ist einer Reihe von regulatorischen Prozessen unterworfen, die außerdem die Funktionalität von Proteinen gewährleisten und vor schadhafte Proteinansammlungen schützen. Diese Mechanismen werden auch als Proteinqualitätskontrolle bezeichnet und sind für das Überleben einer Zelle von enormer Bedeutung (Bukau *et al.*, 2006).

1.1.1 Proteinfaltung und Aggregation

Die Funktion eines bestimmten Proteins wird neben seiner Aminosäuresequenz vor allem durch seine spezifische, dreidimensionale Struktur determiniert. Diese bildet sich während der *de novo* Proteinbiosynthese bei und nach der Translation über Disulfidbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen sowie Van-der-Waals-Kräfte innerhalb der Polypeptidkette aus. Je nach struktureller Komplexität durchläuft das sich faltende Protein dabei eine Reihe von metastabilen Intermediärkonformationen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Abb. 1). Während dieses Prozesses liegen hydrophobe Aminosäurereste exponiert vor, welche im Inneren des reifen Proteins voneinander und vom zellulären Milieu abgeschirmt sind (Dill *et al.*, 2008). In der entstehenden Polypeptidkette tendieren diese hydrophoben Anteile dazu, miteinander zu assoziieren, was eine kinetisch stabile Fehlfaltung des Proteins bewirken kann. Dies wird insbesondere dadurch begünstigt,

dass sich eine Polypeptidkette aufgrund der physikalischen Beschaffenheit des Ribosoms erst bei einer erreichten Länge von 50-300 Aminosäuren effektiv falten kann. Außerdem dauert die Translation mehrere Sekunden bis hin zu Minuten und in diesem Zeitraum ist das reifende Protein sehr anfällig für Fehlfaltungen (Vabulas *et al.*, 2010). Mehrere unreife Polypeptidketten können wiederum über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen unspezifisch Aggregate ausbilden. Zusätzlich begünstigt die hohe Dichte an Proteinen im Zytosol (300-400 g/l Protein und andere Makromoleküle in *Escherichia coli*; Ellis, 2001), besonders an Polyribosom-Komplexen, diesen Effekt (Dobson und Karplus, 1999; Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Radford, 2000; Abb.1). Neben dieser Form der Aggregation kann es durch eine bestimmte Anordnung von β -Faltblättern zur Formation hoch geordneter, fibrillärer Strukturen kommen, den amyloiden Fibrillen (Abb. 1). Diese sind thermodynamisch äußerst stabil. Oligomere Intermediate dieser Aggregate werden häufig mit Zytotoxizität und amyloiden Krankheiten, insbesondere neurodegenerativen Störungen, in Verbindung gebracht (Haass und Selkoe, 2007).

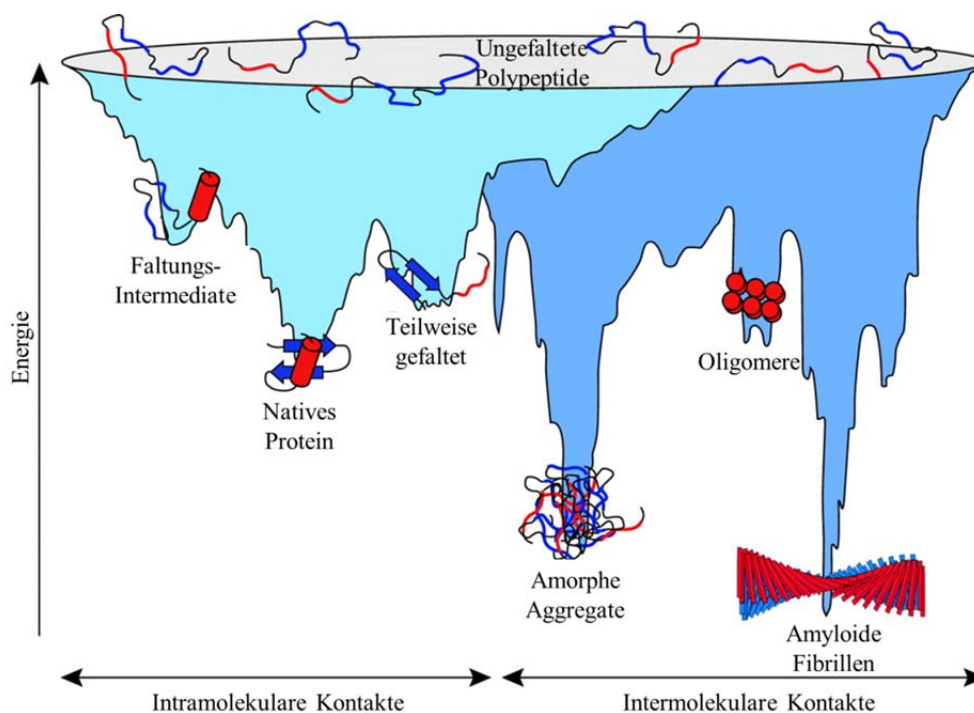


Abbildung 1: Energetik der Proteinfaltung und Aggregation. Der hellblaue Bereich repräsentiert die Vielzahl von Zwischenkonformationen, die ein Protein während des Reifungsprozesses durch intramolekulare Kontakte durchläuft. Der dunkelblaue Bereich symbolisiert amorphe Aggregate und amyloide Fibrillen, die durch intermolekulare Assoziationen entstehen können. Intermediate können während der *de novo* Proteinbiosynthese solche Formationen ausbilden, doch auch eine Destabilisierung der nativen Proteinkonformation kann zur Aggregatbildung führen. Während dieses Prozesses können oligomere Strukturen entstehen, die toxisch für die Zelle sind. Molekulare Chaperone sind in der Lage, Proteinaggregationen vorzubeugen, aufzulösen oder abzubauen. Abbildung teilweise übernommen von Vabulas *et al.*, 2010.

1.1.2 Molekulare Chaperone

Um Fehlfaltungen und Aggregation von Polypeptiden zu verhindern, katalysieren molekulare Hilfsproteine, die Chaperone, den Faltungsprozess bereits co- und posttranslational (Frydman *et al.*, 1994). Auch ein reifes, funktionelles Protein befindet sich mit seinen Intermediaten in einem dynamischen Gleichgewicht und kann sich spontan fehlfalten und zu Aggregation tendieren. Außerdem können native Proteine unter bestimmten Stressbedingungen wie Hitze oder oxidativem Stress denaturieren (Ferreira *et al.*, 2006). In diesen Fällen helfen ebenfalls Chaperone dabei, Proteinaggregation zu verhindern, indem sie fehlgefaltete Proteine renaturieren oder der Degradation zuführen (Hartl, 1996). Sie erkennen und binden hydrophobe Anteile im Substratprotein und unterstützen durch mehrere Zyklen von Bindung und Freisetzung den Faltungsprozess der Polypeptidkette, ohne dabei selbst Teil der Struktur zu werden. Reguliert wird die Aufeinanderfolge von Substratbindung und -freisetzung durch die Aktivität einer Adenosin Triphosphatase (ATPase) und durch den Einfluss verschiedener gebundener Cofaktoren (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Wenn die Faltung eines Polypeptids scheitert, führen Chaperone diese Proteine der proteolytischen Degradationsmaschinerie der Zelle zu (Höhfeld *et al.*, 2001; Wickner *et al.*, 1999). Daneben sind sie außerdem an der Assemblierung oligomerer Proteinstrukturen und an intrazellulären Transportprozessen beteiligt (Vabulas *et al.*, 2010).

Chaperone werden in der Zelle zum Teil konstitutiv exprimiert. Viele sind jedoch durch bestimmte Stressbedingungen, wie beispielsweise Hitzeeinwirkung, induzierbar. Daher hat sich die Bezeichnung Hitzeschockproteine (HSPs) für einen Großteil der Chaperone etabliert (Gething und Sambrook, 1992). Hauptchaperone im Zytoplasma und Nukleus sind die 70 und 90 kDa Hitzeschockproteine, HSP70 und HSP90. Sie regulieren die Faltung einer ganzen Reihe von Proteinen (10-15 % des Gesamtproteins), wobei HSP90 zusätzlich zu HSP70 vor allem für den Faltungsprozess von Signalproteinen (z.B. Steroidhormonrezeptoren, Tyrosinkinase, Nitritoxidsynthase, Calcineurin) benötigt wird. HSP40 Proteine sind Cochaperone, die mit einer konservierten J-Domäne an HSP70 binden, dort die ATP-Hydrolyse stimulieren und somit die Substrataffinität von HSP70 erhöhen. HSP40 ist außerdem in der Lage, Substrate selbst zu binden und HSP70 zuzuführen (Muchowski und Wacker, 2005). HSP100 Chaperone wiederum gehören zur AAA+ Proteinfamilie (Adenosin Triphosphatasen), die eine ATPase- und eine Substratbindedomäne besitzen und ringförmige Strukturen ausbilden. Als HSP70-Homolog übt HSP110 selbst Chaperonaktivität aus, bindet jedoch auch als Cochaperon an die ATPase-Domäne von HSP70 und stimuliert dort den

Austausch von ADP gegen ATP (Dragovic *et al.*, 2006; Polier *et al.*, 2008). Durch die Assoziation von HSP70 mit HSP40 und HSP110 wird die Effektivität der Substratfaltung gesteigert und möglicherweise auch die Substratspezifität des Chaperonkomplexes reguliert (Muchowski und Wacker, 2005).

Daneben gibt es noch eine Gruppe von kleinen Hitzeschockproteinen (*small heat shock proteins*, sHSPs), deren molekulare Masse unterhalb von 40 kDa liegt. Sie bilden durch Protein-Protein-Interaktionen oligomere Strukturen aus, welche über die konservierte, carboxyterminale α -Crystallin-Domäne vermittelt werden. Die sHSPs binden und stabilisieren fehlgefaltete Proteine bevor sie von der HSP70/HSP40 Maschinerie aktiv gefaltet, bzw. rückgefaltet werden können (Muchowski und Wacker, 2005).

Ribosomenassoziierte Chaperone, wie der *nascent chain associated complex* (NAC) oder der *ribosome associated complex* (RAC), binden an die große ribosomale Untereinheit in unmittelbarer Nähe der sich verlängernden Polypeptidkette, wo sie hydrophobe Anteile des reifenden Proteins binden und an Chaperone wie den HSP70/HSP40-Komplex weiterleiten. Die sehr spezialisierte Gruppe der Chaperonine ist ebenfalls Teil des Chaperonnetzwerkes. Dabei handelt es sich um multimere, zylindrisch geformte Proteinkomplexe, die definierte Kompartimente ausbilden. Abgeschirmt vom Zytoplasma werden in Chaperoninen ca. 10 % aller Proteine gefaltet. Zu den Chaperoninen zählen die Mitglieder der HSP60-Familie (Gruppe I Chaperonine, mitochondrial) und der TCP-1 Ring Komplex (TRiC, Gruppe II Chaperonine, zytosolisch). HSP70 und ein ca. 90 kDa großer Chaperonkomplex, Prefoldin (PFD), interagieren direkt mit TRiC und übertragen ihre Substrate auf das Chaperonin (Hartl und Hayer-Hartl, 2002).

Gemeinsam mit einer Vielzahl an Cochaperonen stellen die Chaperone und die zelluläre Degradationsmaschinerie ein komplexes Netzwerk für eine funktionelle Proteinqualitätskontrolle dar, welches ein sensibles Gleichgewicht zwischen Proteinfaltung und Protein-degradation aufrechterhält (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Wickner *et al.*, 1999; Abb. 2).

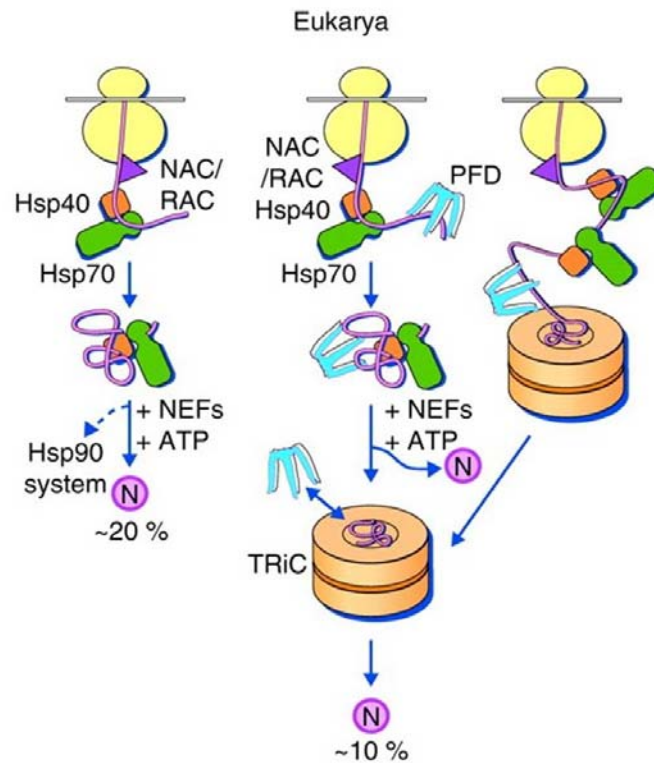


Abbildung 2: Modell zur Chaperon-assoziierten Proteinbiosynthese in Eukarya. Bereits während der Translation wird die Proteinfaltung von Chaperonen wie dem *nascent chain associated complex* (NAC) oder dem *ribosome associated complex* (RAC) unterstützt. Ca. 20 % der neu synthetisierten Polypeptidketten erreichen ihre native Konformation (N) co- oder posttranslational mit Hilfe des HSP70/HSP40-Komplexes, wobei sich teilweise eine Reaktion mit dem HSP90-Komplex anschließt. Diese ATP-verbrauchende Reaktion wird auch durch die Bindung von Nucleotid-Austauschfaktoren (*nucleotide exchange factors*, NEFs) beeinflusst. Ca. 10 % der unreifen Proteine werden co- oder posttranslational zum Chaperonin TCP-1 Ring Komplex (TRiC) geleitet. Dies wird über HSP70 und Prefoldin (PFD) vermittelt, welche beide direkt mit TRiC interagieren. Abbildung teilweise übernommen von Vabulas *et al.*, 2010.

1.1.3 Das HSP72/HSC70-System

Zur HSP70 Chaperonfamilie gehört das konstitutiv exprimierte HSC70 (*heat shock cognate*, auch: HSP73) und das induzierbare HSP72. Beide sind strukturell durch eine aminotermine (N-terminale) ATPase-Domäne und eine carboxyterminale (C-terminale) Substratbindedomäne charakterisiert. Letztere besteht aus einer β -Sandwich Subdomäne und einem α -helikalen Deckelsegment (Zhu *et al.*, 1996). Die β -Sandwich Struktur erkennt hydrophobe Abschnitte in der Polypeptidkette eines Substratproteins (Rudiger *et al.*, 1997). Im ATP-gebundenen Zustand befindet sich das Deckelsegment in einer offenen Konformation und erlaubt die Bindung des Substrates (Abb. 3). Durch die Assoziation mit HSP40 wird die Hydrolyse von ATP zu ADP vorangetrieben. Eine damit einhergehende Konformations-

änderung führt zu einer geschlossenen Deckelstruktur. In diesem Zustand ist das Substrat stabil gebunden. Verschiedene Nukleotid-Austauschfaktoren (*nucleotide exchange factors*, NEFs) binden an die ATPase-Domäne von HSP72/HSC70 und katalysieren den Austausch von ADP gegen ATP. Dadurch wird der Deckel wieder geöffnet und das Substrat freigesetzt (Abb. 3).

Durch die Bindung an HSP72/HSC70 werden hydrophobe Abschnitte in einer Polypeptidkette transient verdeckt und vor Fehlfaltung und Aggregation geschützt. Wenn das Substrat aus der Bindung entlassen wird, hat es die Möglichkeit, sich vollständig oder teilweise richtig zu falten. Wenn eine komplette Faltung nicht innerhalb weniger Sekunden erreicht wird, bindet das noch unreife Protein erneut an HSP72/HSC70 und der Reaktionszyklus beginnt von vorne. Je nach Komplexität der Proteinstruktur können mehrere solcher Zyklen notwendig sein, bis die native Konformation erreicht wird. Einem Teil der Substrate reichen die kurzen Zeitintervalle im HSP72/HSC70 Reaktionszyklus zur korrekten Faltung nicht aus und sie müssen an HSP90 oder an ein Chaperonin weitergeleitet werden (Abb. 3).

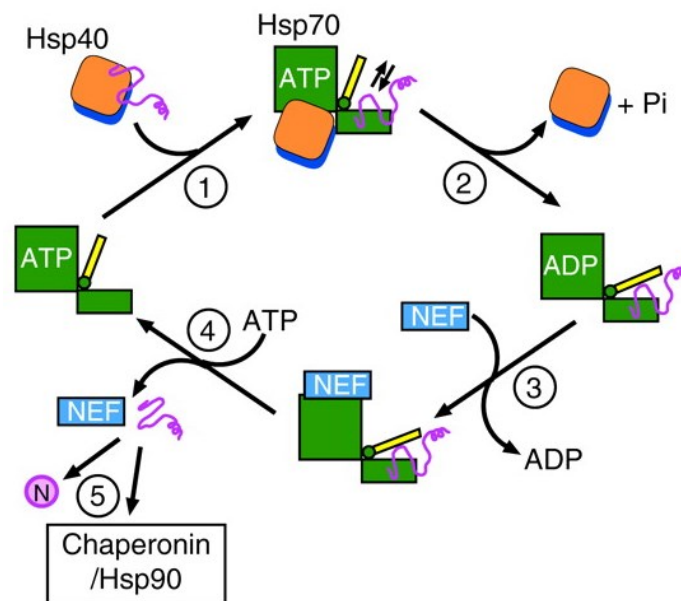


Abbildung 3: Der HSP72/HSC70 Reaktionszyklus. Im ATP-gebundenen Zustand befindet sich die Substratbindedomäne von HSP72/HSC70 in einer offenen Konformation, was die Substrataffinität erhöht [①]. Durch die Bindung von HSP40 wird die ATP-Hydrolyse begünstigt, die wiederum eine geschlossene Konformation der Substratbindedomäne von HSP72/HSC70 bewirkt [②]. Verschiedene Nukleotid-Austauschfaktoren (*nucleotide exchange factors*, NEFs) katalysieren die ADP-Freisetzung [③] und die anschließende Bindung von ATP. Dabei vollzieht sich eine Konformationsänderung, die zur Freisetzung des Substrates führt [④]. Zum Erreichen der nativen Konformation eines Proteins können mehrere solcher Reaktionszyklen notwendig sein. Für einen Teil der Chaperonsubstrate ist für eine vollständige Faltung eine Weiterleitung an HSP90 oder ein Chaperonin erforderlich [⑤]. N, natives Protein. Abbildung übernommen von Vabulas *et al.*, 2010.

1.1.4 Proteindegradation

Wie bereits erwähnt, gehört zu einer funktionierenden Proteinqualitätskontrolle neben der korrekten Faltung von Polypeptiden auch eine effektive Degradationsmaschinerie, die irreversibel beschädigte Proteine beseitigt. Molekulare Chaperone kooperieren mit dieser Degradationsmaschinerie und führen Substrate ihrem Abbau zu (Bercovich *et al.*, 1997; Esser *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 1996). In der Zelle existieren zwei grundsätzliche Haupt-Proteinabbauwege: Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS; Hershko und Ciechanover, 1998) und die Autophagie (Kabeya *et al.*, 2000; Klionsky und Emr, 2000).

1.1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Über das UPS werden vor allem polyubiquitinierte Proteine abgebaut, wobei Ubiquitinketten von vier oder mehr Molekülen als Degradationssignal dienen. Die kovalente Verknüpfung mit dem 8,5 kDa großen Ubiquitin erfolgt dabei über eine Enzymkaskade, in der das Signalmolekül von einem E1 Ubiquitin-aktivierenden Enzym zunächst auf ein E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym übertragen wird, bevor eine E3 Ubiquitinligase eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest von Ubiquitin und einem Lysinrest des Substratproteins (oder eines bereits gebundenen Ubiquitinmoleküls) knüpft (Thrower *et al.*, 2000). Ein Ubiquitinmolekül enthält insgesamt sieben oberflächenexponierte Lysinreste, die innerhalb einer Polyubiquitinkette zur Ausbildung von Isopeptidbindungen genutzt werden können (Peng *et al.*, 2003). K48-G76 Verknüpfungen gelten dabei als prinzipielles Signal zum proteasomalen Abbau, wobei auch andersartig verknüpfte Ubiquitinketten als Degradationssignal identifiziert wurden (Xu *et al.*, 2009). Ubiquitinketten, die aus weniger als vier Molekülen bestehen oder Monoubiquitinierungen können auch ein Signal für zahlreiche andere zelluläre Funktionen wie z.B. Proteintransport und DNA-Reparatur darstellen (Haglund und Dikic, 2005; Marx, 2002).

Polyubiquitinierte Proteine werden im 26S Proteasom degradiert, einem 1700 kDa großen Proteinkomplex, der sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommt. Dieser setzt sich aus einer 20S Untereinheit und zwei 19S Untereinheiten zusammen. Die 20S Untereinheit ist zylindrisch geformt und hat die Funktion einer multikatalytischen Protease, wobei die proteolytische Aktivität im Innenraum des Zylinders lokalisiert ist. Der Durchmesser dieser Struktur erlaubt es lediglich entfalteten Proteinen (aufgelöste Tertiärstruktur) in das Innere des

20S Proteasoms zu gelangen. Die 19S Untereinheiten sitzen jeweils als regulatorische Komplexe beidseitig auf den Öffnungen der 20S Untereinheit. Jede 19S Untereinheit setzt sich aus einer Basis- und einer Deckelkomponenten zusammen. Die Basis hydrolysiert ATP, welches für die Substratentfaltung benötigt wird. Die Deckelstruktur erkennt und bindet Polyubiquitinketten (Baumeister *et al.*, 1998). Nach der Deubiquitinierung, der Entfaltung und der Translokation werden proteasomale Substrate im Inneren der 20S Untereinheit in Oligopeptide zerlegt, welche von zytoplasmatischen Peptidasen in einzelne Aminosäuren gespalten werden (Lam *et al.*, 1997a; Lam *et al.*, 1997b; Tamura *et al.*, 1996).

1.1.4.2 Autophagie

Der Begriff Autophagozytose oder Autophagie umfasst unterschiedliche Degradationsprozesse, in denen vor allem langlebige Proteine und Zellorganellen im Lysosom abgebaut werden (Mizushima, 2004). Über die Autophagie können auch unlösliche Proteinaggregate beseitigt werden (Ding und Yin, 2008; Gamerding *et al.*, 2011). Neben der Aufrechterhaltung der basalen Proteostase spielt die Autophagie außerdem als Antwort auf einen Nährstoffmangel eine besondere Rolle und ist durch diesen induzierbar, so dass u.a. einzelne Aminosäuren *recycelt* und als Ausgangsmaterial für neue Zellbestandteile zur Verfügung gestellt werden können (Mortimore und Poso, 1987). Daneben ist Autophagie in Zelldifferenzierung, Apoptose und in pathophysiologischen Prozessen involviert (Clarke, 1990; Petersen *et al.*, 2001; Tsukada und Ohsumi, 1993). Unterschieden werden bisher drei Hauptformen der Autophagie: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass diese Prozesse nicht immer so klar voneinander abgrenzbar sind, wie es die Nomenklatur impliziert (Behl, 2011).

In der Mikroautophagie wird ein Teil des Zytoplasmas direkt vom Lysosom durch eine Invagination der Lysosomenmembran aufgenommen (Todde *et al.*, 2009). Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden selektiv solche Proteinsubstrate, welche ein KFERQ-Motiv als Erkennungssequenz besitzen, von HSC70 und von Cochaperonen erkannt und von diesen an das Lysosom herangeführt. Dort werden die Substrate vom Lysosomen-assoziierten Membranprotein 2A (LAMP-2A) erkannt, gebunden, und schließlich über einen multimeren Translokationskomplex in das Lumen des Lysosoms geschleust (Orenstein und Cuervo, 2010).

Die Makroautophagie gilt als Hauptform der Autophagie und wird derzeit mit Hochdruck erforscht (Behl, 2011). Sie ist dadurch charakterisiert, dass die abzubauenen zytoplasmatischen Bestandteile zunächst von einer doppelten Isolationsmembran umschlossen werden, wodurch das sogenannte Autophagosom entsteht. Autophagosomen entstehen am oder in der Nähe des endoplasmatischen Retikulums (ER), so dass die ER Membran wahrscheinlich den Ursprung der Isolationsmembran darstellt. Die Herkunft dieser Membran wird jedoch zurzeit in der Literatur kontrovers diskutiert, so dass auch andere Entstehungsorte in Frage kommen (Hailey *et al.*, 2010; Mizushima *et al.*, 2011; Ravikumar *et al.*, 2010; Tooze und Yoshimori, 2010). Die äußere Autophagosomenmembran verschmilzt mit einem Lysosom und es entsteht das Autolysosom. In dessen Lumen wird die innere Autophagosomenmembran zusammen mit den Autophagiesubstraten von lysosomalen Hydrolasen degradiert. Freigesetzte Aminosäuren und andere kleine Moleküle werden im Zytoplasma zum *Recycling* oder zur Energiegewinnung wieder zur Verfügung gestellt (Mizushima *et al.*, 2010). Lange Zeit wurde die Makroautophagie als ein unspezifischer Abbauweg angesehen, jedoch konnte die Forschung in den letzten Jahren zeigen, dass selektive Formen der Makroautophagie existieren. Die Ubiquitinierung als Degradationssignal gewinnt im Kontext der selektiven Autophagie ebenfalls immer mehr an Bedeutung (Kraft *et al.*, 2010; Shaid *et al.*, 2013). Molekulare Chaperone und ihre Cochaperone spielen außerdem bei der Auswahl und der Übermittlung von Autophagiesubstraten eine entscheidende Rolle (Gamerding *et al.*, 2009; Gamerding *et al.*, 2011).

1.1.5 Cochaperone und Proteintriage

Ob ein Chaperon ein Substratprotein beim Erreichen seiner nativen Konformation unterstützt oder es der Degradation zuführt, ist ein Entscheidungsprozess, der häufig als Proteintriage bezeichnet wird (Triage = Sortierung, Zuteilung; Wickner *et al.*, 1999). Reguliert wird dieser Prozess von der Aktivität eines breiten Spektrums von Cochaperonen. Sie sind in der Lage, die ATPase-Aktivität und damit die Substrataffinität der Chaperone zu beeinflussen und/oder diese an bestimmte Proteinkomplexe und subzelluläre Kompartimente heranzuführen und zu übergeben (Höfeld *et al.*, 2001). Neben den bereits erwähnten HSP40 und HSP110 Cochaperonen sei vor allem eine Gruppe von Chaperonmodulatoren erwähnt, die durch ein typisches HSP70-Bindemotiv charakterisiert sind, welches aus drei tandemartig angeordneten Wiederholungen von 34 Aminosäuren besteht (*tetratricopeptide repeats*, TPRs; Frydman und

Höhfeld, 1997). Damit binden sie an eine für Eukaryoten spezifische EEVD Sequenz am C-Terminus von HSP70. Das HSP70/HSP90-organisierende Protein (HOP) beispielsweise besitzt mehrere TPR-Domänen und ist deshalb in der Lage, HSP70 und HSP90 simultan zu binden und so die Kooperation zwischen den Chaperonen bei der Regulation von Signaltransduktionskaskaden zu fördern (Buchner, 1999; Caplan, 1999).

Ein weiteres Cochaperon ist das HSP70-interagierende Protein (HIP), welches an die ATPase-Domäne von HSP70 bindet und den Chaperonkomplex im ADP-gebundenen Zustand stabilisiert. Dies wiederum verhindert die Freisetzung des Substrats und stimuliert die Proteinfaltung (Höhfeld und Jentsch, 1997).

Neben Cochaperonen, die den Faltungsprozess fördern, gibt es auch solche, die den Chaperonkomplex direkt mit der Degradationsmaschinerie verbinden, wie beispielsweise das C-Terminus von HSP70-interagierende Protein (CHIP). CHIP ist eine E3 Ubiquitinligase, die über TPR-Motive ebenfalls am C-Terminus von HSP70 bindet (Ballinger *et al.*, 1999). Verschiedene Cochaperone konkurrieren demnach um die gleiche HSP70-Bindungsstelle und ermöglichen unterschiedliche Richtungen der Proteintriage.

1.1.6 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des C-Terminus von HSP70 interagierenden Proteins (CHIP)

Unter den Metazoa ist CHIP (auch genannt *STIP1 homology and U-Box containing protein 1*, STUB1) ein hoch konserviertes Cochaperon und gilt als ein zentraler Faktor für Proteintriage-Entscheidungen. CHIP bindet mit drei N-terminalen TPR-Motiven an den C-Terminus von HSP70 (und HSP90; Ballinger *et al.*, 1999) und enthält eine C-terminale RING Finger-ähnliche Domäne mit E3 Ubiquitinligaseaktivität, die U-Box (Connell *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2001; Abb. 4). Die TPR- und die U-Box-Domäne werden von einem zentralen Bereich getrennt, der zahlreiche geladene Aminosäurereste sowie zwei mögliche nukleäre Translokationsmotive enthält. Die Funktion dieser geladenen Domäne ist noch nicht gänzlich geklärt, jedoch ist sie für TPR-abhängige Protein-Protein-Interaktionen notwendig (Ballinger *et al.*, 1999; Abb. 4). CHIP ubiquitiniert Chaperonsubstrate und führt sie somit der Degradation zu. Obwohl konstitutiv in allen Zelltypen exprimiert, ist die CHIP-Expression in solchen Geweben besonders hoch, in denen eine hohe metabolische Aktivität und ein hoher Proteinumsatz stattfinden wie z.B. im Skelettmuskel, im Herz und im Gehirn (Ballinger *et al.*, 1999). CHIP ist im Zytoplasma, vermehrt an der äußeren ER-Membran,

lokalisiert. Unter Stressbedingungen kommt es zu einer Translokation von CHIP in den Nukleus. Dies wird durch eine von der Ubiquitinligaseaktivität unabhängigen Funktion von CHIP bedingt. Unter akutem Stress aktiviert CHIP den Hitzeschockfaktor 1 (HSF1), den zentralen Transkriptionsfaktor für HSPs. Im Komplex mit HSP70 und aktiviertem HSF1 induziert CHIP die Transkription von HSPs im Kern und ist somit an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt (Dai *et al.*, 2003).

Zahlreiche Studien konnten für CHIP zellprotektive Eigenschaften nachweisen, da es den Abbau von aberranten Polypeptiden fördert, welche mit zahlreichen Pathologien assoziiert sind, wie z.B. Tau (Petrucci *et al.*, 2004), *cystic fibrosis conductance regulator* (CFTR; Meacham *et al.*, 2001), *leucin-rich repeat kinase-2* (LRRK-2; Ko *et al.*, 2009), Polyglutamin-expandiertes Huntingtin (Jana *et al.*, 2005), Ataxin-1 (Al-Ramahi *et al.*, 2006) und Alpha-Synuclein (Shin *et al.*, 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass CHIP die Proteindegradation vom UPS in Richtung der Aggresomen-Formation lenkt, wenn die Funktion des Proteasoms gestört ist. Aggresomen sind Proteinstrukturen, die eine Art intrazelluläres Depot für beschädigte Proteine darstellen. Wenn der Ubiquitin-vermittelte proteasomale Abbauweg gestört oder überlastet ist, findet ein aktiver Transport zum Mikrotubulibildenden Zentrum (MTOC) in der Nähe des Zellkerns statt, an dem Proteinaggregate über die Autophagie abgebaut werden (Johnston *et al.*, 1998). Ein Mausmodell, in dem CHIP genetisch ausgeschaltet wurde, entwickelte einen verfrühten Alters-Phänotyp und eine verkürzte Lebensspanne. Damit wurde demonstriert, dass CHIP die Alterung in Säugern beeinflusst (Min *et al.*, 2008). Dies könnte, zumindest teilweise, mit der Regulation von p53-Aktivität durch CHIP zusammenhängen. p53 ist ein zentraler Kontrollfaktor des Zellzyklus, der als Antwort auf eine Vielzahl von Stressoren diverse zelluläre Programme wie DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz initiiert (Sisoula *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2007). CHIP führt p53 über Ubiquitinierung der proteasomalen Degradation zu (Esser *et al.*, 2005).

Auch die Aktivität von CHIP selbst wird durch weitere Cochaperone in Assoziation mit dem HSP72/HSC70-Komplex reguliert. Vorangegangene Forschungen entdeckten zwei evolutionär, strukturell und mechanistisch unterschiedliche HSP72/HSC70-NEFs, BAG2 und HSPBP1. Beide inhibieren die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP und sind somit in ihrer Funktion redundant (Alberti *et al.*, 2004; Arndt *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2005; Shomura *et al.*, 2005). BAG2 ist ein Mitglied der BCL2-assoziierten Athanogen (BAG)-Proteinfamilie, welche im Folgenden näher charakterisiert wird.

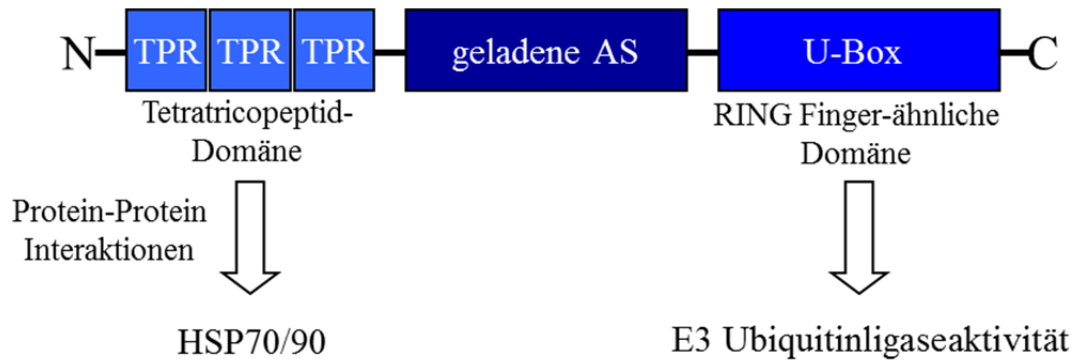


Abbildung 4: Das Cochaperon Carboxy-Terminus von HSP70-interagierende Protein (CHIP). Die Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen Cochaperons CHIP ist charakterisiert durch drei Domänen: Eine N-terminale Tetratricopeptid (TPR)-Domäne, eine C-terminale RING Finger-ähnliche Domäne (U-Box) und eine dazwischengeschaltete Domäne aus geladenen Aminosäureresten. Über die TPR-Domäne interagiert CHIP mit HSP72/HSC70 und HSP90, die U-Box zeichnet sich durch eine E3 Ubiquitinligaseaktivität aus. CHIP besitzt eine duale Funktion: **1.)** Chaperonsubstrate werden von CHIP ubiquitiniert und der Degradation zugeführt, weshalb CHIP als wichtiges Bindeglied zwischen dem Chaperonsystem und der Degradationsmaschinerie angesehen wird. **2.)** Unabhängig von der Ubiquitinligaseaktivität induziert CHIP die Trimerisierung von HSF1, welcher die Transkription von HSP-Genen aktiviert. CHIP ist somit an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt und moduliert simultan die Faltungs- und die Degradationskapazität des Chaperonnetzwerkes. AS, Aminosäurereste.

1.1.7 Die BCL2-assoziierte Athanogen (BAG)-Proteinfamilie

Die BAG-Proteinfamilie ist durch eine evolutionär konservierte C-terminale BAG-Domäne charakterisiert (Abb. 5), die an die N-terminale ATPase-Domäne von HSP72/HSC70 bindet, den Nukleotidaustausch von ADP gegen ATP induziert, und damit die Freisetzung des Substrates begünstigt (Doong *et al.*, 2002; Takayama *et al.*, 1999). Ursprünglich wurden die BAG-Proteine durch ihre Assoziation mit dem anti-apoptotischen Protein *B-cell lymphoma 2* (BCL2) identifiziert (Lee *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 1995), welches im Kalziumhaushalt eine wichtige Rolle spielt. Eine Dysregulation von BCL2-Spiegeln führt zu einer gestörten Kalziumhomöostase. Als Konsequenz kommt es zu einer Aktivierung der Caspase-3, welche wiederum Teil einer proteolytischen Enzymkaskade im Verlauf der Apoptose ist (Sultana *et al.*, 2010). Abhängig von den diversen N-terminalen Motiven der einzelnen BAG-Proteinfamilienmitglieder regulieren sie die Chaperonfunktion in mannigfaltiger Art und Weise. Zum einen beeinflussen sie die Substratspezifität des Chaperonkomplexes, zum anderen sorgen sie für die richtige Lokalisierung der Chaperone, um Substrate bestimmten zellulären Prozessen zuführen zu können (Alberti *et al.*, 2003). BAG-Proteine sind in zahlreichen zellulären Vorgängen wie Apoptose, Tumorgenese, neuronaler Differenzierung,

Stressantworten und Zellzyklusregulation involviert und werden allgemein als wichtige Faktoren für das Zellüberleben angesehen (Kabbage und Dickman, 2008).

Im Menschen wurden bislang sechs Mitglieder der BAG-Proteinfamilie identifiziert, BAG1-6. BAG1 wird durch alternatives Spleißen in vier Isoformen exprimiert: BAG1L (50 kDa), BAG1M (46 kDa), BAG1 (33 kDa) und BAG1S (29 kDa, Abb. 5). BAG1L kommt hauptsächlich im Zellkern vor und besitzt eine N-terminale nukleäre Translokationsdomäne (Takayama *et al.*, 1998). BAG1L und BAG1M weisen außerdem am N-Terminus repetitive TRSEEX-Einheiten (Threonin, Arginin, Serin, 2x Glutaminsäure, beliebige Aminosäure; TRS nicht in allen Einheiten identisch) auf. Für diese Elemente wurde eine stimulierende Wirkung auf transkriptionelle Prozesse nachgewiesen (Zeiner *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde demonstriert, dass die TRSEEX-Einheiten die transkriptionelle Aktivität des Glucocorticoidrezeptors hemmen (Crocoll *et al.*, 2000). Allen BAG1-Isoformen ist eine Ubiquitin-ähnliche Domäne gemein, welche eine Interaktion mit dem Proteasom ermöglicht (Luders *et al.*, 2000; Abb. 5). Da BAG1 auch die Dissoziation des Substratproteins induziert, vermittelt BAG1 dessen Transfer vom Chaperonkomplex zum Proteasom für eine anschließende Degradation (Höhfeld und Jentsch, 1997; Luders *et al.*, 1998; Sondermann *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass BAG1 für eine effektive proteasomale Degradation essenziell ist und es altersabhängig, einhergehend mit einer reduzierten proteasomalen Aktivität, vermindert exprimiert wird (Gamerdinger *et al.*, 2009). Zusätzlich wurde für BAG1 auch eine Rolle in der Chaperon-vermittelten Autophagie nachgewiesen (Arias und Cuervo, 2011).

BAG3 (CAIR-1/BIS) besitzt als einziges BAG-Protein eine N-terminale WW-Domäne (Tryptophan, Tryptophan), ein Motiv für Protein-Protein-Interaktionen, welches Prolin-reiche Liganden wie den PDZ-Domänen enthaltenden Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor 2 (PDZGEF2) bindet (Iwasaki *et al.*, 2010). Zwischen N-terminaler WW-Domäne und C-terminaler BAG-Domäne befindet sich eine Prolin-reiche Region (PXXP). Diese bindet Proteine mit einem *Src homology 3* (SH3)-Motiv wie die Phospholipase C- γ (PLC- γ), welche wiederum in der Zellproliferation eine wichtige Rolle spielt (Doong *et al.*, 2000; Abb. 5). Es konnte gezeigt werden, dass BAG3 in der selektiven Makroautophagie die Degradation von ubiquitinierten Substraten p62-abhängig stimuliert (Carra *et al.*, 2008; Gamerdinger *et al.*, 2009). p62/Sequestosom 1 (SQSTM1) ist ein stressreguliertes Multiadapterprotein, das simultan an Ubiquitin und das Autophagosomenmembran-assoziierte Protein *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) binden kann (Bjorkoy *et al.*, 2005). Einhergehend mit einer gesteigerten autophagischen Aktivität in der Alterung ist auch die BAG3-

Expression altersabhängig erhöht (Gamerding *et al.*, 2009). Im Kontext der selektiven Makroautophagie wurde außerdem gezeigt, dass BAG3 über das PXXP-Motiv an den Dyneinmotor bindet und den Transport von HSP70-Substraten zu Aggresomen vermittelt (Gamerding *et al.*, 2011).

Von BAG4 (*Silencer of death domains*, SODD, Abb. 5) ist bekannt, dass es an sogenannte Todesdomänen von Mitgliedern der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie bindet und deren Aktivierung mit Hilfe von HSP72/HSC70 inhibiert (Jiang *et al.*, 1999). Damit wird eine Transduktionskaskade unterbunden, die ansonsten über die Aktivität verschiedener Caspasen zur Apoptose führt.

BAG5 besitzt als einziges BAG-Protein fünf BAG-Domänen (Abb. 5). Es wurde als Inhibitor der E3 Ubiquitinligase Parkin identifiziert (Kalia *et al.*, 2004). Funktionsverlustmutationen im Parkin-Gen sind für familiäre Formen der Parkinson-Krankheit verantwortlich. In einem *in vivo* Modell der Parkinson-Krankheit wurde gezeigt, dass BAG5 durch die Inhibition von Parkin das Absterben der dopaminergen Neuronen fördert. Dies belegt, dass sich BAG-Proteine nicht ausschließlich positiv auf das Zellüberleben auswirken, wie bis dahin allgemein angenommen wurde.

Auch für BAG6 (BAT3/Scythe) wurde eine pro-apoptotische Funktion nachgewiesen, da es die Proteinstabilität des mitochondrialen Intermembranproteins Apoptose-induzierender Faktor (AIF) erhöht (Desmots *et al.*, 2008). Wie BAG1 besitzt BAG6 eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (Abb. 5), so dass zu vermuten wäre, dass BAG6 ebenfalls HSP72/HSC70 Substrate dem Proteasom zuführt. Im Falle von AIF scheint jedoch BAG6 den proteasomalen Abbau dieses Faktors zu inhibieren (Desmots *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass BAG6 eine nukleo-zytoplasmatische Transportaktivität besitzt und es unter Stressbedingungen den Import des Komplexes aus HSP72/HSC70, aktiviertem HSF1 und CHIP in den Nukleus fördert, wobei BAG6 die Faltungsaktivität des Chaperonkomplexes inhibiert. Durch die induzierte Translation von HSPs kommt es zu einer Akkumulation von HSP72, welche wiederum in einer Rückkopplungsreaktion die Ubiquitinierung und Depletion von BAG6 stimuliert. BAG6 wird somit als ein zentraler Regulator für den intrazellulären Gehalt an HSP72 angesehen (Corduan *et al.*, 2009).

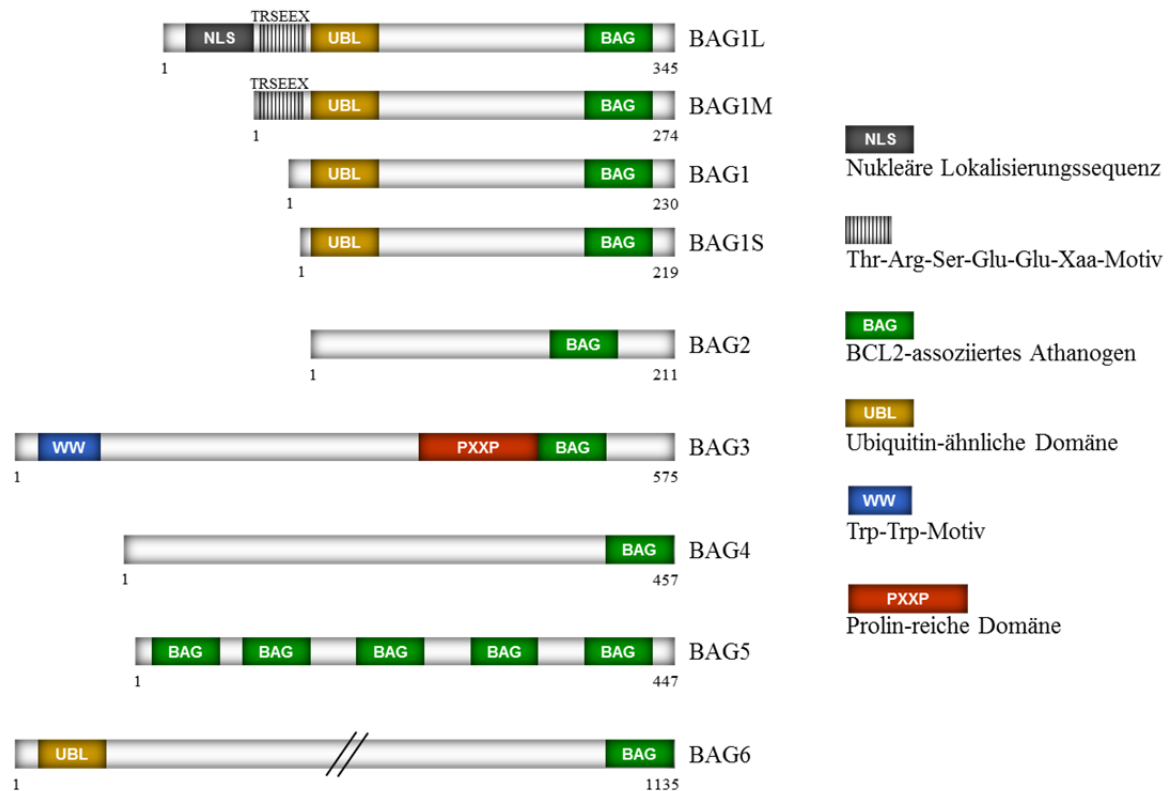


Abbildung 5: Domänenstruktur der BCL2-assoziierten Athanogen (BAG)-Proteinfamilie. Den bisher im Menschen identifizierten sechs Mitgliedern der BAG-Proteinfamilie ist die evolutionär konservierte BAG-Domäne gemein, die eine Bindung an die ATPase-Domäne von HSP72/HSC70 vermittelt und den Nukleotidaustausch von ADP gegen ATP im Chaperonkomplex begünstigt. Bedingt durch die hohe Diversität innerhalb ihrer N-terminalen Domänenstrukturen üben die BAG-Proteine unterschiedliche Funktionen in der Regulation von Chaperonaktivität aus. BAG1 kommt in vier Isoformen vor, wobei BAG1L ein nukleäres Translokationsmotiv (*Nuclear localization sequence*, NLS) besitzt und vornehmlich im Kern vorkommt. Am N-Terminus von BAG1L und BAG1M befinden sich mehrere repetitive Einheiten des Hexapeptids TRSEEX (Threonin, Arginin, Serin, Glutaminsäure, Glutaminsäure, beliebige Aminosäure), welches in transkriptionelle Prozesse involviert ist. In allen BAG1-Varianten und in BAG6 kommt eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (*Ubiquitin-like domain*, UBL) vor, die eine Interaktion mit dem Proteasom ermöglicht. Das N-terminale WW-Motiv (Tryptophan, Tryptophan) in BAG3 bindet Prolin-reiche Liganden. Die PXXP-Domäne von BAG3 ist eine Prolin-reiche Region, die für die Bindung von Proteinen mit dem *Src homolgy 3* (SH3)-Motiv wie der Phospholipase C- γ benötigt wird. Abbildung gestaltet nach Mayer und Bukau, 2005.

1.1.8 Das Cochaperon BAG2

BAG2 nimmt unter den BAG-Proteinen in vielerlei Hinsicht eine besondere Rolle ein. Zum einen bildet seine BAG-Domäne eine nicht-kanonische dimere Struktur aus, die eine relativ geringe Homologie zu anderen BAG-Domänen aufweist und deshalb auch als „*brand new bag*“ (BNB)-Domäne bezeichnet wird (Xu *et al.*, 2008b). Zum anderen ist BAG2 das einzige BAG-Protein, das fehlgefaltete Chaperonsubstrate direkt binden und deren Aggregation

verhindern kann (Arndt *et al.*, 2005). BAG2 unterscheidet sich durch seine Struktur sehr stark im Oligomerisierungsstatus und in der HSP72/HSC70-Bindung von anderen BAG-Proteinen und HSP72/HSC70-NEFs, weshalb zurzeit in der Literatur diskutiert wird, ob die Klassifizierung von BAG2 in die BAG-Proteinfamilie als korrekt angesehen werden kann (Xu *et al.*, 2008b). Anders als isolierte BNB-Domänen bildet das Volllängen-BAG2 Tetramere und Oligomere höherer Ordnung aus, ähnlich wie die kleinen Hitzeschockproteine HSP25 oder α -Crystallin (Ehrnsperger *et al.*, 1999; Haley *et al.*, 1998). Zudem überlappen Substrat- und HSP72/HSC70-Bindedomäne, so dass Xu und Kollegen ein Modell postulieren, in dem BAG2 Substrate an HSP72/HSC70 überträgt, während es gleichzeitig seine Funktion als NEF ausüben und den Faltungsprozess vorantreiben kann. In Oligomeren angeordnete BAG2-Moleküle können simultan mit mehreren physikalisch separierten Epitopen eines einzelnen Substrates während der Faltungszyklen assoziiert bleiben und es so vor Fehlfaltungen und Aggregation schützen. An ein komplexes Substrat kann BAG2 außerdem mehrere HSP72/HSC70-Moleküle gleichzeitig heranführen. Alternativ kann der HSP72/HSC70-Substrat-Komplex BAG2 rekrutieren, um den Nukleotidaustausch und die Proteinfaltung zu katalysieren (Xu *et al.*, 2008b).

Wenn CHIP und BAG2 simultan an HSP72/HSC70 gebunden sind, inhibiert BAG2 die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP, indem es die Assoziation mit dem Ubiquitin-konjugierenden E2 Enzym UbcH5a verhindert. Jedoch ist CHIP weiterhin an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt, so dass der Chaperon/Cochaperon-Substrat-Komplex insgesamt in einem faltungskompetenten Status verbleibt (Arndt *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2005; Abb. 6). BAG2 reguliert die Aktivität von HSP72/HSC70 somit in Richtung der Proteinfaltung, im Gegensatz zu beispielsweise BAG1 oder BAG3, welche die Substratproteine der Degradation zuführen. Ein Modell zur antagonistischen Modulation von Chaperonaktivität ist am Beispiel von BAG1 und BAG2 in Abbildung 6 dargestellt.

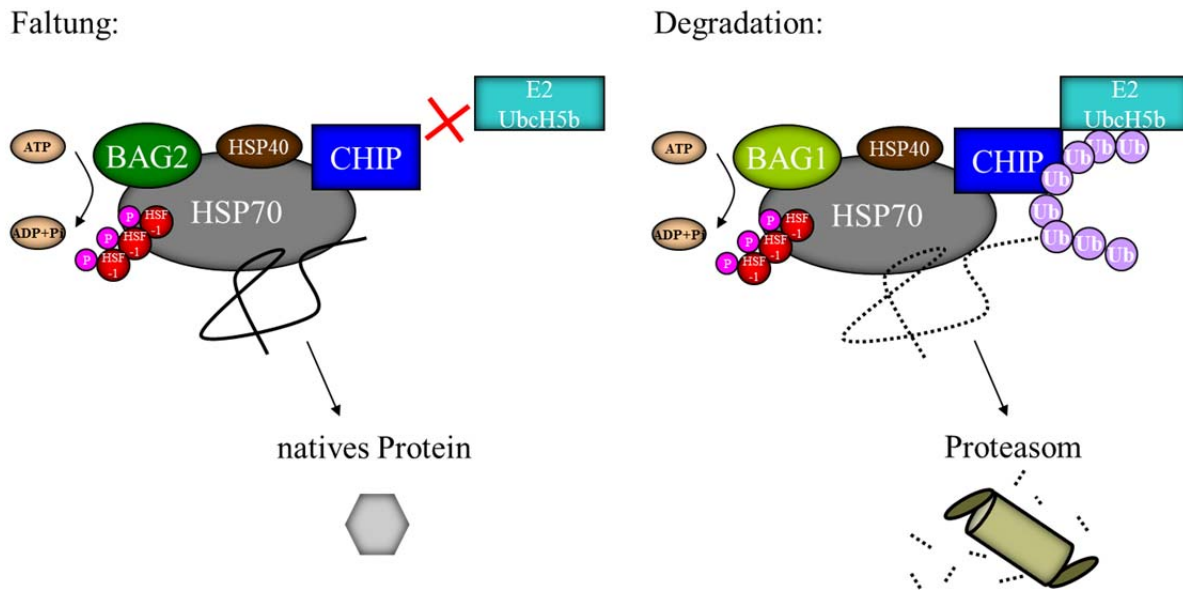


Abbildung 6: Modell zur antagonistischen Regulation der Chaperonaktivität durch BAG2 und BAG1. Die Bindung von HSP40 stimuliert die ATP-Hydrolyse und erhöht die Substrataffinität von HSP70. Weitere Cofaktoren wie BAG2 oder BAG1 katalysieren den Nukleotidaustausch von ADP gegen ATP. Sind BAG2 und CHIP simultan an HSP70 gebunden, ist die Bindung zwischen CHIP und dem Ubiquitin-konjugierenden E2 Enzym gestört und die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP ist inhibiert. Dieses kann jedoch weiterhin die Trimerisierung und damit die Aktivierung von HSF1 induzieren und ist an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt. Der Chaperon/Cochaperon-Komplex befindet sich in einem faltungskompetenten Status. Kann das Substratprotein seine native Konformation trotz mehrerer Bindungszyklen mit HSP72/HSC70 nicht erreichen, versetzt eine Bindung von BAG1 den Chaperon/Cochaperon-Komplex in einen degradationskompetenten Status. Das E2 Enzym assoziiert mit CHIP, so dass dieses das Substrat ubiquitinieren kann. Über die Ubiquitin-ähnliche Domäne von BAG1 wird das zu degradierende Protein an das Proteasom zu dessen Abbau herangeführt.

1.1.9 Das Cochaperon HSP70 Bindepotein 1 (HSPBP1)

HSPBP1 ist ein weiteres CHIP-modulierendes Cochaperon. Es katalysiert den Nukleotidaustausch von HSP72/HSC70 durch einen anderen Mechanismus als BAG-Proteine. Während letztere eine konservierte Konformationsänderung der ATPase-Domäne von HSP72/HSC70 bewirken, generiert HSPBP1 eine gravierende Umstrukturierung dieser Domäne, was eine reduzierte Nukleotidaffinität zur Folge hat (Shomura *et al.*, 2005). Diese Konformationsänderungen werden auch als Ursache für eine gestörte CHIP-vermittelte Ubiquitinierung von Chaperonsubstraten angesehen (Alberti *et al.*, 2004; Arndt *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2005). HSPBP1 enthält vier konservierte zentrale Armadillo-ähnliche Motive, d.h. tandem repetitive Kopien einer ca. 40 Aminosäuren langen Sequenz. Neben dieser Kerndomäne besitzt HSPBP1 keine andere erkennbare Domäne. BAG2 und HSPBP1 repräsentieren somit zwei evolutionär und mechanistisch unterschiedliche Klassen von NEFs,

die jedoch funktionell äquivalent in Bezug auf CHIP-Modulation sind. Dies demonstriert, wie relevant die Regulation der Ubiquitinligaseaktivität für die Zelle ist.

Generell führen Störungen in den Systemen der Proteinqualitätskontrolle zu Proteinfehlfaltungen und Proteinaggregation. Dies wiederum sind ebenso Hauptcharakteristika der zellulären Alterung und vieler altersabhängiger Krankheiten. Diese Zusammenhänge zu erforschen und aufzuklären ist daher Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten.

1.2 Alterung

Altern ist ein fortschreitender, nicht umkehrbarer, hochkomplexer, physiologischer Prozess, der die Lebensdauer von Zellen, Organen, Geweben und Organismen maßgeblich beeinflusst und mit dem Tod endet. Er ist fester Bestandteil des Lebens aller höheren Lebewesen und, da immer noch relativ schlecht verstanden, ein Gebiet intensivster Forschungsarbeit (Behl und Ziegler, 2014). Allgemein kann gesagt werden, dass es in der Alterung zu einer allmählichen Abnahme bestimmter physiologischer Funktionen kommt, z.B. zu einem Verlust an Muskelmasse, abnehmender Funktionsfähigkeit des Immunsystems, reduzierter Produktion von Insulin und Wachstumshormonen, eingeschränkter Nierenfunktion und zu veränderten, kognitiven Fähigkeiten (Erickson *et al.*, 2006). Es gibt zahlreiche Theorien, die versuchen, die Ursachen des Alterns auf zellulärer und molekularer Ebene zu erklären. Bis heute existiert jedoch keine vollständige und/oder ausschließliche Erklärung dieses vielschichtigen Vorgangs. Es gibt außerdem immer wieder einzelne Fallbeispiele, die bestimmten Theorien nicht entsprechen. Am weitesten verbreitet sind die sogenannten Schadenstheorien, die den Alterungsprozess als eine Summe bestimmter Schäden betrachten, welche durch zerstörerische Prozesse im zellulären Stoffwechsel verursacht werden (Goldsmith, 2010).

1.2.1 Theorien zur Alterung

Eine der ältesten Theorien zum Altern ist die Lebensratentheorie (*Rate-of-Living-Theorie*), die 1928 von Raymond Pearl aufgestellt wurde. Sie besagt, dass sich der Grundumsatz eines Organismus umgekehrt proportional zu seiner maximalen Lebenserwartung verhält. Das bedeutet, je höher die massenspezifische Stoffwechselrate ist, desto kürzer ist die

Lebensspanne. Pearl vermutete, dass durch den erhöhten Stoffwechsel bestimmte Zellbestandteile schneller abgebaut oder beschädigt werden, welche sich auf die Lebenserwartung auswirken (Olshansky und Rattan, 2005).

Die bekannteste Alternstheorie ist die Theorie der freien Radikale, die auf der Lebensratentheorie aufbaut. Sie wurde 1956 von Denham Harman aufgestellt und beschreibt, dass freie Radikale wie z.B. das Hydroxyl-Radikal als Nebenprodukt von Stoffwechselprozessen mit molekularem Sauerstoff entstehen (vor allem in den Mitochondrien). Als äußerst reaktive Moleküle schädigen sie Zellbestandteile wie DNA, RNA, Lipide und Proteine nachhaltig (Harman, 1956). Zwar ist die Zelle mit Enzymen der oxidativen Abwehr wie der Katalase oder der Superoxiddismutase (SOD) ausgestattet, welche diese Radikale zum Teil abfangen können. Dennoch kommt es mit der Zeit zu einer Akkumulation geschädigter Komponenten. Interessanterweise gehen Zellen in eine vorzeitige Seneszenz über, wenn sie oxidativem Stress ausgesetzt waren (Lim *et al.*, 2008; Toussaint *et al.*, 2000). Dies demonstriert den direkten Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) auf zelluläre Seneszenz und Alterung. Aus einem Ungleichgewicht zwischen radikalbildenden und radikalentgiftenden und dadurch protektiven Prozessen in der Zelle resultiert ein erhöhter oxidativer Stress. Dieser wird nicht nur mit der Alterung, sondern auch mit zahlreichen Krankheiten wie Krebs, Diabetes mellitus, Arteriosklerose und Alzheimer in Verbindung gebracht (Ames *et al.*, 1993). Kalorische Restriktion auf der anderen Seite mindert den oxidativen Stress in der Zelle und bewirkt in einigen Modellorganismen eine signifikante Erhöhung der Lebenserwartung (Sohal und Weindruch, 1996).

Die Telomertheorie des Alterns wurde 1991 von Calvin Harley aufgestellt und baut auf der 1965 von Leonard Hayflick entdeckten Hayflick-Grenze auf. Hayflick beobachtete, dass eine Zelle nur eine Spezies-spezifische, begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchlaufen kann, bevor sie die Proliferation komplett einstellt (Hayflick, 1965). Die Telomertheorie greift die Tatsache auf, dass die DNA-Polymerase bei der DNA-Replikation nur an einem 3'-Ende Nukleotide anheften kann und somit jeweils eine Lücke am 5'-Ende des neu synthetisierten Stranges übrig bleibt, wo sich zuvor der RNA-Primer befand. Demnach verkürzen sich die Telomere an den Chromosomenenden immer weiter, je häufiger eine Zelle sich teilt. Daher verringert sich die Zellteilungsrate mit der Zeit. Ab einer bestimmten Telomerlänge stellt die Zelle die Proliferation komplett ein, sie wird seneszent. Die Verkürzung der Telomere ist vor allem in mitotisch aktiven Geweben zu beobachten, wie z.B. in Hautfibroblasten (Allsopp und Harley, 1995), peripheren Blutzellen (Satoh *et al.*, 1996), Magen-Darm-Epithelzellen

(Furugori *et al.*, 2000), Zellen der Nebenniere und des Nierenkortex (Melk *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001), der Leber (Aikata *et al.*, 2000) und der Milz (Takubo *et al.*, 2002). In diesen Geweben kommt es während des Alterungsprozesses zu einer Anreicherung von seneszenten Zellen (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007). In post-mitotischen Zellen und Geweben jedoch, wie den Nervenzellen des Gehirns sowie dem Herzmuskel, bleiben die Telomerlängen weitgehend konstant (Takubo *et al.*, 2002). Allerdings sind terminal differenzierte Zellen wie Neuronen vom Alterungsprozess besonders betroffen, so dass die Telomertheorie hierfür keine hinreichende Erklärung liefert.

Eine ebenfalls wichtige evolutionäre Alternstheorie ist die der antagonistischen Pleiotropie (Williams, 1957). Sie besagt, dass sich Gene oder Prozesse, die in jungen Organismen einen selektiven Vorteil erbringen, negativ auf den älteren Organismus auswirken können. Zahlreiche Studien belegen, dass beispielsweise zelluläre Seneszenz in jungen Geweben einen potenten Tumorsuppressor-Mechanismus darstellt (Campisi, 2001; Wright und Shay, 2001), welcher jedoch im Laufe der Zeit zur Ausprägung eines gealterten Phänotyps beiträgt (Campisi, 2005; Hornsby, 2002).

1.2.2 Altersassoziierte Veränderungen in der Proteinqualitätskontrolle und neurodegenerative Erkrankungen

Im Zuge der Alterung kommt es zu zahlreichen physiologischen Veränderungen in der Zelle. Dazu gehört auch eine reduzierte Kapazität des Proteostase-Netzwerkes, welche eine abnehmende proteasomale Aktivität und eine veränderte Induzierbarkeit und/oder Funktionalität von molekularen Chaperonen beinhaltet (Chondrogianni und Gonos, 2005; Derham und Harding, 1997; Erickson *et al.*, 2006; Heydari *et al.*, 2000; Soti und Csermely, 2000). Daneben nehmen oxidative Schädigungen zu (Brunk und Terman, 2002; Sohal, 2002), wodurch sich die Ausprägung von Proteinfehlfaltungen ebenfalls erhöht. Dadurch wird die Akkumulation von extra- und intrazellulären Proteinaggregaten, Zelleinschlüssen und amyloiden Ablagerungen begünstigt. Vor allem postmitotische Zellen wie z.B. Neurone sind dem gegenüber besonders vulnerabel, da sie sich nicht durch Zellteilung von diesen Strukturen befreien können. Dies liefert, zumindest teilweise, eine Erklärung für erst im Alter auftretende Krankheiten, welche durch aberrante Proteinkonformationen (Proteinopathien) charakterisiert sind. Zu diesen gehören neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Krankheit, die Parkinson-Krankheit, die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die Huntington-

Krankheit und andere Polyglutaminerkrankungen (Balch *et al.*, 2008). Entgegen der jahrelangen Annahme, dass die unlöslichen Proteinaggregate selbst die Ursache für den neuronalen Zelltod darstellen, häufen sich die Hinweise darauf, dass lösliche Intermediärkonformationen, die während des Aggregationsprozesses entstehen, die Pathologie hervorrufen (Nagai *et al.*, 2007; Ross und Poirier, 2004). Es wird vermutet, dass diese Intermediate eine toxische Funktion ausüben, indem sie mit anderen Proteinen oder mit Membranen unspezifisch interagieren und deren funktionelle Eigenschaften verändern (Cohen *et al.*, 2006; Cohen und Kelly, 2003). Auf der Suche nach einer effektiven therapeutischen Strategie ist es daher Ziel der Forschung, das Gleichgewicht zwischen der Produktion fehlgefalteter Proteine und der Faltungskapazität des Chaperonnetzwerkes in gealterten Zellen wieder herzustellen. In einigen Studien konnte die protektive Wirkung der Chaperonaktivität in Bezug auf Aggregation und Toxizität eines krankheitsrelevanten Proteins nachgewiesen werden (Finkbeiner *et al.*, 2006; Muchowski *et al.*, 2000; Sittler *et al.*, 2001; Westerheide und Morimoto, 2005). Neuroprotektiv wirkt auch die effektive Degradation schadhafter Proteinintermediate, was z.B. mit Hilfe der Ubiquitinligase CHIP demonstriert wurde, welche aberrante und krankheitsrelevante Proteinspezies dem Abbau zuführt (s. Abschnitt 1.1.6). Für eine effektive medizinische Intervention in altersassoziierte Pathologien ist es daher wichtig, mögliche Veränderungen in der Proteinqualitätskontrolle im Zuge der zellulären Alterung weiter zu erforschen und zu verstehen. Zum einen könnte so die Lebensqualität in der Alterung erhöht werden und zum anderen der Ausbruch degenerativer Erkrankungen verzögert, bzw. die Schwere des Krankheitsverlaufes abgemildert werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Ubiquitinligase CHIP ist ein wichtiger Faktor in Proteintriage-Entscheidungsprozessen (Faltung oder Degradation) und wird daher besonders im Zusammenhang mit altersassoziierten Proteinopathien intensiv erforscht. Auch diese Arbeit hatte das primäre Ziel, die CHIP-Funktion näher zu charakterisieren, besonders in Bezug auf die Regulation der Ubiquitinligaseaktivität durch das Cochaperon BAG2. Der Mechanismus der hemmenden Wirkung von BAG2 auf die Ligaseaktivität von CHIP wurde bislang ausschließlich zellfrei mit rekombinanten Proteinen aufgezeigt (Arndt *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2005). In dieser Studie sollte der Mechanismus erstmals in einem zellulären System nachgewiesen werden. Hierzu sollte die humane IMR-90 Fibroblasten-Zelllinie herangezogen werden. Die

Ubiquitinierungsaktivität von CHIP sollte anhand der induzierbaren HSP70-Variante (HSP72) als Modell-CHIP-Substrat untersucht werden. Neben dem Einfluss von BAG2 auf die Ubiquitinierung durch CHIP sollten die Auswirkungen einer BAG2-Modulation auf die intrazellulären HSP72-Proteinspiegel und die Genexpression aufgezeigt werden. Daran anknüpfend sollte ein durch BAG2 möglicherweise veränderter Verlauf einer Hitzeschockantwort analysiert werden.

Besonderes Interesse in dieser Studie galt außerdem der Untersuchung möglicher Veränderungen in der CHIP-Aktivität und/oder der Regulation von CHIP durch BAG2 im Zuge der zellulären Alterung. Dazu sollte, wie in jungen Fibroblasten, der Einfluss von CHIP und BAG2 auf die Ubiquitinierung von HSP72 in seneszenten Zellen analysiert werden.

Um eine mögliche Rolle von BAG2 bei der replikativen Seneszenz aufzudecken, sollte eine potentielle Regulation des Seneszenzregulators und CHIP-Substrates p53 durch BAG2 untersucht werden. Darüber hinaus sollten Veränderungen der Proteinspiegel von CHIP, BAG2 und HSPBP1 in jungen und gealterten Zellen aufgezeigt werden, wobei eine reziproke Regulation von BAG2 und HSPBP1 entdeckt wurde. Um diese im Weiteren auf ihre Spezifität bezüglich des Alterungsprozesses hin zu testen, sollten die Proteinspiegel beider CHIP-Modulatoren im Modell der induzierten Seneszenz sowie im Kontext eines reversiblen Zellzyklusarrestes in jungen Zellen untersucht werden. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die beiden Cochaperone als Antwort auf einen akuten oxidativen Stress ebenfalls reziprok reguliert werden und ob sie sich gegenseitig kompensatorisch regulieren. Um die gewonnenen Daten auf den Gesamtorganismus übertragen zu können, sollte die gegenläufige, altersabhängige Regulation von BAG2 und HSPBP1 außerdem in unterschiedlichen Geweben von jungen und alten Mäusen betrachtet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

In dieser Arbeit wurden embryonale Epithelzellen aus humanem Nierengewebe (*human embryonic kidney*, HEK-293T) als immortalisierte Zelllinie verwendet. Außerdem wurde mit primären, humanen IMR-90 Fibroblasten (*Coriell Institut for Medical Research*, Camden, USA) gearbeitet, welche 1975 aus dem Lungengewebe eines weiblichen, klinisch unauffälligen, 16 Wochen alten Fötus entnommen wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kompletmedium im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Konzentration. Im Verlauf der Zellkultivierung wurde das Medium alle 3-4 Tage gewechselt, unter experimentellen Bedingungen alle 24 h. Um die Kultur aufrecht zu erhalten, wurden die Zellen vor Erreichen der Konfluenz in entsprechenden Verdünnungen passagiert. Dazu wurden sie mit 1x PBS gewaschen und 5 min bei 37 °C mit 1-2 ml 1x Trypsinlösung inkubiert, um die Zellen von der Kulturschale zu lösen. Nachdem sie mit 5-10 ml Kompletmedium abgespült wurden, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 4 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert, die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, und daraufhin die geeignete Zellzahl ausgesät. Hierzu wurden 20 µl Zellen mit 20 µl Trypanblau vermischt um tote Zellen anzufärben und von lebenden unterscheiden zu können. Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Lebendzellzahl / ml} = \text{Mittelwert lebender Zellen der vier Großquadrate} * 2 * 10^4,$$

wobei 2 dem Verdünnungsfaktor mit Trypanblau entspricht und 10⁴ dem Umrechnungsfaktor auf 1 ml Medium, welches zum Resuspendieren der Zellen verwendet wurde.

Für experimentelle Ansätze wurden in der Regel subkonfluente (60-80 % Konfluenz) Kulturen verwendet, mit Ausnahme der vergleichenden biochemischen Analyse von subkonfluenten und konfluenten IMR-90 Zellen.

Zur Ermittlung des zellulären Alters der IMR-90 Kulturen wurden die Populationsverdopplungen (*population doubling levels*, PDLs) nach folgender Formel berechnet, bzw. aufsummiert:

$$\log \text{Zellzahl Ernte} - \log \text{Zellzahl Aussaat} / \log 2.$$

IMR-90 Fibroblasten wurden bis 30 PDL als jung/proliferierend definiert. Terminale Seneszenz, in der keine Zellteilung mehr erfolgt, erreichen diese Zellen mit 60 PDL und wurden ab 45 PDL als alt/seneszent bezeichnet. Für eine langfristige Lagerung der Zelllinien wurden subkonfluente Kulturen trypsiniert, in Medium abzentrifugiert (s.o.) und das Pellet in Kompletmedium resuspendiert, welches mit 10 % DMSO versetzt war. Die Zellen wurden à 1 ml in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox bei -80 °C langsam eingefroren (-1 °C/min) und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Kompletmedium

Phenolrothaltiges *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM)

10 % [V / V]	aktives FBS
1 % [V / V]	Natriumpyruvat
1 % [V / V]	<i>non-essential amino acids</i> (NEAA)
100 U / ml	Penicillin / Streptomycin

1x Trypsin-Lösung (pH 7,4)

0,05 % [m / V]	Trypsin
0,1 % [m / V]	EDTA
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄ , Anhydrat
1,8 mM	KH ₂ PO ₄

1x PBS (pH 7,4)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄ , Anhydrat
1,8 mM	KH ₂ PO ₄

2.1.2 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidasefärbung

Zur Ermittlung des Seneszenzstatus einer IMR-90 Fibroblastenkultur wurden die Zellen auf 6 cm Kulturschalen ausgesät und nach 48 h mit dem *Senescence Cells Histochemical Staining* Kit von Sigma-Aldrich (CS0030) angefärbt und mikroskopisch analysiert. In seneszenten Zellen liegt bei pH 6 eine erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase vor, einem Enzym, das endständige Zuckerreste von Polysacchariden abbaut. Daher wird die β -Galaktosidaseaktivität als klassischer Marker für Seneszenz eingesetzt (Dimri *et al.*, 1995). Durch die hydrolytische Spaltung des Substrates X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) zu Galaktose und einem blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff wurden seneszente Zellen anhand einer Blaufärbung identifiziert. Die Anzahl an gefärbten Zellen wurde in Prozent gegen die Gesamtzellzahl ermittelt.

2.1.3 Stressinduzierte, vorzeitige Seneszenz

Um in jungen IMR-90 Zellen eine vorzeitige Seneszenz einzuleiten, wurden diese auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert und nach 48 h mit 200 μ M und 500 μ M H₂O₂ für jeweils 2 h behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Fibroblasten mit frischem Medium versetzt und weiter in Kultur gehalten. Nach 4 Tagen erfolgte eine zweite H₂O₂-Behandlung für 2 h. Nach erneutem Waschen und der Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen weiter kultiviert und die Seneszenz-assoziierten, morphologischen Veränderungen der Zellen regelmäßig mikroskopisch verfolgt. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und biochemisch mittels Western Blot analysiert.

2.1.4 Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Die Zellen wurden 24 h vor einer Transfektion passagiert und in der für das entsprechende Experiment benötigten Zellzahl ausgesät. Seneszente Fibroblasten wurden 72 h vorher passagiert. Für die Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, pelletiert und in Elektroporationspuffer (400 μ l/Transfektion) resuspendiert. Nach Durchmischung mit einer entsprechenden Menge an Plasmid-DNA oder siRNA, wurden die Zellen in Elektroporationsküvetten mit 0,4 cm Spaltbreite (Sigma) überführt und mit Hilfe des Amaxa

Nucleofector I (Programm U-24) elektroporiert. Nach einer Erholungszeit von 10 min in der Kuvette bei Raumtemperatur wurden die transfizierten Zellen in frisches Komplettmedium überführt und auf Zellkulturschalen ausgesät. Weiterführende Experimente wurden 48 h nach der Transfektion durchgeführt, bei gealterten IMR-90 Zellen nach 72 h. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und siRNA-Sequenzen sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Elektroporationspuffer

135 mM	KCl
0,2 mM	CaCl ₂
2 mM	MgCl ₂
5 mM	EGTA
10 mM	HEPES (pH 7,5)
25 % [m / V]	FBS

Tabelle 1: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung (mit Restriktionsschnittstelle für die Klonierung)	Referenzquelle
pEGFP-N1	Überexpressionsplasmid, 4,7 kb, zur Herstellung einer C-terminalen EGFP-Markierung, Kan ^r	Clontech, 78100 Saint-Germain-en-Laye (France)
pN1	Leervektor, pEGFP-N1 ohne <i>egfp</i> , <i>Bam</i> HI- <i>Not</i> I, 4,0 kb, Kan ^r	Martin Gamerdinger, AG Behl, 2009
pcDNA TM 3.1/ <i>myc</i> -His(-)A	Überexpressionsplasmid, 5,5 kb, <i>c-myc</i> , His-Tag (6x), Amp ^r	Invitrogen, Darmstadt
pRK5-HA-Ubiquitin-WT	pRK5-HA mit <i>ubiquitin</i> -WT, <i>Sall</i> - <i>Not</i> I, 5,2 kb, Amp ^r	Addgene, Cambridge (USA)
pFLAG-HSP72-WT-N1	pFLAG-BAG3-N1 mit <i>hsp72</i> -WT, <i>Bam</i> HI- <i>Not</i> I, 6 kb, Kan ^r	Martin Gamerdinger, AG Behl, 2009
pCHIP-WTmyc-His	pcDNA TM 3.1/ <i>myc</i> -His(-)A mit <i>chip</i> -WT, <i>Bam</i> HI, 6,4 kb, Amp ^r	Diese Arbeit
pCHIP-D253N/R254Gmyc-His	pcDNA TM 3.1/ <i>myc</i> -His(-)A mit <i>chip</i> -D253N/R254G, <i>Bam</i> HI, 6,4 kb, Amp ^r	Diese Arbeit
pBAG2-N1	pEGFP-N1 mit <i>bag2</i> , <i>Hind</i> III- <i>Bsr</i> GI, 4,9 kb, Kan ^r	Diese Arbeit
pCHIP-N1	pEGFP-N1 mit <i>chip</i> -WT, <i>Hind</i> III- <i>Bsr</i> GI, 5,0 kb, Kan ^r	Diese Arbeit
pCHIP-D253N/R254G	pEGFP-N1 mit <i>chip</i> -D253N/R254G, <i>Hind</i> III- <i>Bsr</i> GI, 5,0 kb, Kan ^r	Diese Arbeit
pHSPBP1-N1	pEGFP-N1 mit <i>hspbp1</i> , <i>Bam</i> HI- <i>Not</i> I, 5,2 kb, Kan ^r	Diese Arbeit

Die Karten und Sequenzen der konstruierten Plasmide sind dem Anhang zu entnehmen (s. Abschnitt 7.4).

Tabelle 2: *Small interfering RNA* (siRNA)-Sequenzen (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Name	Sequenz (5' → 3')
BAG2 siRNA	AGAUUCCUGUGUCUCAUAA
HSPBP1 siRNA	UCAGCAUUCCUGCUGCAGA
<i>nonsense</i> siRNA	AUUCUCCGAACGUGUCACG

2.1.5 Hitzestress

Um die Auswirkungen einer BAG2-Überexpression auf den Verlauf einer Hitzeschockantwort zu untersuchen, wurden IMR-90 Zellen nach Transfektion mit pBAG2-N1 oder mit pEGFP-N1 als Kontrolle auf 6 cm-Kulturschalen ausgesät. Nach 38-40 h wurde ein Mediumwechsel mit Komplettmedium durchgeführt, welches auf 43 °C vorgewärmt war. Die Kulturschalen wurden dann für 30 min in einen auf 43 °C vorgeheizten Inkubator gestellt. Eine Kontroll-Schale (0 h-Wert) verblieb nach einem Mediumwechsel mit auf 37 °C temperiertem Medium im Brutschrank (37 °C). Nach Ablauf der 30 min wurde das Medium der Zellen aus dem 43 °C Inkubator entfernt und durch frisches 37 °C Medium ersetzt. In der Erholungsphase wurden die Zellen im 37 °C Brutschrank inkubiert. Nach 0, 2, 4, 6 und 8 h wurden jeweils Zellen mit SDS-Lysispuffer geerntet und proteinbiochemisch mittels Western Blot analysiert (s.u.).

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Proteinextraktion aus Zellen

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden subkonfluente Zellkulturen mit kaltem 1x PBS gewaschen, mit 1x SDS-Lysispuffer versetzt und mit einem Zellspatel von der Kulturschale abgelöst. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, wurden die Proben sonifiziert und anschließend für 3 min bei 99 °C inkubiert. Gelagert wurden die Proteinlysate bei -80 °C.

1x SDS-Lysispuffer

62,5 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
1 mM	EDTA
2 % [m / V]	SDS
10 % [m / V]	Saccharose
1 % [V / V]	Protease-Inhibitor-Cocktail
1 % [V / V]	Phosphatase-Inhibitor-Cocktail

2.2.2 Proteinextraktion aus Mausgewebe

Um Gewebe von jungen (4–4,5 Monate alt) und alten (21–27 Monate alt) Mäusen proteinbiochemisch zu analysieren, wurden aus den Versuchstieren nach Abtötung die entsprechenden Organe präpariert und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden die Proben mit 1x SDS-Lysispuffer versetzt und mit Hilfe eines Mörsers (Gehirngewebe) oder eines Glasstabhomogenisators (nicht-neuronale Gewebe) homogenisiert und intensiv sonifiziert. Aufbewahrt wurden diese Proteinpräparate bei -80 °C.

2.2.3 Proteinquantifizierung

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden mit Hilfe der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode durchgeführt. Hierbei bilden Proteine mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex (Biuretreaktion), in dem die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Diese reagieren mit BCA und bilden einen violetten Farbkomplex, der photometrisch evaluiert werden kann. Hierzu wurde das Thermo Scientific Pierce *BCA Protein Assay Kit* verwendet. Die Proben wurden dabei mit dem BCA-Reagenz versetzt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Jeweils 100 μl Probe wurde in eine 96-well-Platte überführt und die Absorption bei 562 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Rinderserumalbumin-Standardkurve ermittelt.

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen, wobei diese entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Zunächst werden Proteine dazu linearisiert. Hierfür wird das anionische Detergens SDS im Überschuss beigegeben, welches die Proteine denaturiert und mit einer negativen Ladung versieht. Für eine vollständige Auflösung von Sekundär- und Tertiärstrukturen werden die Proben zusätzlich bei 99 °C aufgeköcht. Disulfidbrücken können mit Hilfe eines reduzierenden Thiols wie β -Mercaptoethanol gespalten werden. Unabhängig von der Eigenladung der Proteine, wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode, wobei sie in einer porösen Polyacrylamidmatrix durch einen Molekularsiebeffekt entsprechend ihrer Kettenlänge aufgetrennt werden. Es erfolgt zunächst eine Aufkonzentrierung der Proteine in einem Sammelgel. Die eigentliche Auftrennung findet im Trenngel statt. Trenn- und Sammelgel unterscheiden sich vor allem in der Porengröße (kommerzielle Bis-Tris Gelsysteme) und im pH-Wert (diskontinuierliche SDS-PAGE; Laemmli, 1970).

Um die in dieser Arbeit zu analysierenden Proteinpräparate elektrophoretisch aufzutrennen, wurden die bereits aufgeköchten Proben entsprechend ihrer Proteinkonzentration normalisiert, mit 1x β -Mercaptoethanol-haltigem Ladepuffer versetzt und erneut für 3 min bei 99 °C im Heizblock aufgeköcht. Nach dem Abzentrifugieren für 1 min bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit wurden die Proben (5-15 μ g Gesamtprotein) auf das Gel aufgetragen. In der Regel wurden handgegossene 10 %ige Bis-Tris Gele (Tabelle 3) in MES Laufpuffer (Invitrogen) verwendet. Gegossen wurden diese Gele mit dem Mini-Protean III System von Bio-Rad. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Trennschicht zu erhalten. Nach Polymerisierung des Trenngels und Entfernung des Isopropanols erfolgte die Überschichtung mit dem Sammelgel (Tabelle 3). Die Aufkonzentrierung der Proteine verlief bei 90 V, die Auftrennung bei 130 V. Für Coimmunpräzipitationen und Ubiquitinanalysen wurden vorgegossene 4-12 % NuPAGE Bis-Tris Gele mit dem MES Laufpuffer (beides von Invitrogen) verwendet. Hierbei wurde das Gel zunächst bei 90 V gestartet und die Proteine bei 160 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde jeweils der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* der Marke Fermentas aufgetragen.

1x Proteinladepuffer für SDS-PAGE

62,5 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
2 % [m / V]	SDS
10 % [V / V]	Glycerin
0,01 % [V / V]	Bromphenolblau
5 % [V / V]	2-Mercaptoethanol

3,5x Gel Puffer

1,25 M Bis-Tris (pH 6,5-6,8)

Tabelle 3: Zusammensetzung der Bis-Tris Gele (für ein 1,5 mm Gel)

Trenngel:

ddH ₂ O	Gel Puffer	10 % Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 29:1)	APS (10 %)	TEMED
4,9 ml	3 ml	2,6 ml	74 µl	20 µl

Sammelgel:

ddH ₂ O	Gel Puffer	4 % Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 29:1)	APS (10 %)	TEMED
3,2 ml	1,5 ml	550 µl	42 µl	21 µl

2.2.5 Western Blot-Analyse und immunologischer Proteinnachweis

Zur weiteren Analyse werden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf Nitrozellulosemembranen übertragen. In einem senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichteten elektrischen Feld wandern die Proteine abermals Richtung Anode. Über ionische und polare Wechselwirkungen erfolgt eine Adsorption der Proteine an die Nitrozellulosemembran, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Auf diese Weise sind Proteine für weitere analytische Methoden, wie immunologische Nachweisreaktionen, zugänglich.

In dieser Arbeit wurden Western Blots mit dem Mini *Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell System* von Bio-Rad hergestellt. Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen erfolgte in 1x Transferpuffer bei 60 V für 2 h oder bei 30 V über Nacht, jeweils bei Raumtemperatur. Vorgegossene NuPAGE Bis-Tris Gele wurden bei 40 V für 2 h geblottet oder bei 30 V über Nacht, beides ebenfalls bei Raumtemperatur. Zur Überprüfung des Erfolges und der Qualität des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran reversibel mit Ponceau S-Lösung für 1 min inkubiert, wodurch die Proteine unselektiv angefärbt

wurden. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden anschließend durch eine Inkubation in Blockpuffer bei Raumtemperatur für mindestens 20 min abgesättigt. Zum spezifischen immunologischen Nachweis bestimmter Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit der Lösung des primären Antikörpers inkubiert. Alle primären Antikörper wurden in 1x PBS mit 0,05 % Tween (PBS-T) verdünnt, mit 0,02 % Natriumazid versetzt und mehrmalig verwendet. Nach Abnehmen der primären Antikörperlösung wurde die Membran drei Mal für 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit einer Lösung des sekundären Antikörpers für mindestens 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Alle sekundären Antikörper waren Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP)-gekoppelt und wurden jedes Mal frisch 1:4000 in PBS-T angesetzt. Nach dreimaligem Waschen à 5 min mit PBST-T wurde die Membran mit einer *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösung benetzt. Die Meerrettichperoxidase des an die Nitrozellulosemembran gebundenen sekundären Antikörpers reagierte mit einem in der ECL-Lösung enthaltenen Substrat. Dabei wurde eine detektierbare Chemilumineszenz erzeugt, die sich in einem bestimmten Intensitätsbereich proportional zur vorhandenen Proteinmenge verhielt. Visualisiert wurde das Signal mit der Fuji LAS-3000 *Intelligent Darkbox* oder dem Fusion-SL *Advance Chemiluminescence/Fluorescence System* von Peqlab. Die erhaltenen Proteinbanden wurden mit der *AIDA Image Analyzer* Software der Raytest Isotopenmessgeräte GmbH ausgewertet. Alle in dieser Studie verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 gelistet.

1x Transferpuffer

25 mM	Tris
250 mM	Glycin
0,1 % [m / V]	SDS
20 % [V / V]	Methanol

Ponceau S-Färbelösung

0,5 % [m / V]	Ponceau S
1 % [V / V]	Essigsäure

Blockpuffer

1x	PBS
0,05 % [V / V]	Tween 20
5 % [m / V]	Trockenmilchpulver

ECL-Lösung

0,1 M	Tris-HCl (pH 8,6)
0,025 % [m / V]	Luminol
0,011 % [V / V]	para-Hydroxy-coumarinsäure (in DMSO)
0,03 % [V / V]	Wasserstoffperoxid

Tabelle 4: In Western Blot-Analysen verwendete primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verd.	Kat.-Nr.	Hersteller
anti-STUB1 (CHIP)	Kaninchen	1:300	ab2917	Abcam, Cambridge (UK)
anti-HSP70/HSP72	Maus	1:1000	ADI-SPA-810	Stressgen, Lörrach
anti-BAG2	Kaninchen	1:500	2610-1	Epitomics, Hamburg
anti-BAG2	Kaninchen	1:500	AV42177	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-HSPBP1	Kaninchen	1:1000	DB090	Delta Biolabs, Gilroy (USA)
anti-BAG domain	Kaninchen	1:2000	BAG1M aa 151-263	Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl, Martinsried
anti-BAG3	Kaninchen	1:1000	10599-1-AP	Proteintech Group, Manchester (UK)
anti-Ubiquitin	Kaninchen	1:1000	Z0458	Dako, Hamburg
anti LC3B	Kaninchen	1:800	L7543	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-SQSTM1 (p62)	Maus	1:1000	sc28359	Santa Cruz, Heidelberg
anti-GFP	Maus	1:7000	MMS-118P	Covance, München
anti-GFP	Kaninchen	1:1000	632593	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (France)
anti-p53 (DO-1)	Maus	1:200	sc-126	Santa Cruz, Heidelberg
anti-p21	Maus	1:300	554228	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Caveolin 2	Maus	1:1000	610685	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Histone H3	Maus	1:500	ab6000	Abcam, Cambridge (UK)
anti-Tubulin	Maus	1:1000	T9026	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-GAPDH	Maus	1:1000	ab9482	Abcam, Cambridge (UK)
anti-Actin	Kaninchen	1:1000	A5060	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-HA	Kaninchen	1:1000	H6908	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Flag	Maus	1:1000	F3165	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Flag	Kaninchen	1:1000	F7425	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-c-Myc	Maus	1:200	631206	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (France)

2.2.6 Coimmunpräzipitation (Co-IP) und Ubiquitinanalyse

Mittels einer Coimmunpräzipitation können bestimmte Zielproteine mitsamt ihrer Interaktionspartner aus einem Proteingemisch immunologisch isoliert werden. HEK und IMR-90 Zellen wurden hierzu mit kaltem 1x PBS gewaschen und auf Eis in IP-Puffer mit einem Zellspatel von der Kulturschale abgelöst. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 1,7 ml ‚*Low Retention*‘ Mikrozentrifugengefäße (Kisker) überführt und 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues ‚*Low Retention*‘ Gefäß überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 170-800 µg Protein pro Probe mit IP-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 400-600 µl gebracht und mit 1 µg Antikörper versetzt, der gegen das Zielprotein im Zelllysate gerichtet war. Von jeder Probe wurde eine entsprechende Kontrolle mit aufgereinigten Maus IgGs anstelle des Antikörpers angesetzt. Die Proben wurden mindestens 1 h bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend mit Protein G Sepharosepartikeln versehen. Protein G bindet mit hoher Spezifität an die meisten Säuger-Immunglobuline. Die Antikörper-Protein-Komplexe aus dem Zelllysate wurden somit an die Protein G Sepharosepartikel gebunden. Alle Proben wurden wiederum 1 h bei 4 °C unter konstanter Rotation inkubiert und anschließend 5 min bei 600 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Protein G Sepharosepartikel wurden drei Mal mit 1 ml IP-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Ablösung des Zielproteins (und des Antikörpers) von den Sepharosepartikeln wurde durch einen Denaturierungsschritt bewirkt. Dazu wurden die gewaschenen Partikel mit 20 µl 2x Proteinladepuffer für SDS-PAGE versetzt und 5 min bei 99 °C und 1200 rpm aufgekocht. Nach 1 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit wurden jeweils 10 µl Überstand *via* SDS-PAGE aufgetrennt und das Zielprotein mit seinen Interaktionspartnern auf einem Western Blot visualisiert.

Zur Analyse der Ubiquitinierungsaktivität von CHIP wurden in HEK und in IMR-90 Zellen die Proteinspiegel von BAG2 und CHIP wie angegeben moduliert. Außerdem wurde das Säuger-Expressionsplasmid pRK5-HA-Ubiquitin-WT cotransfiziert. Die jeweiligen Auswirkungen der veränderten BAG2- und/oder CHIP-Expression auf den Ubiquitinierungsstatus des HSP72-Komplexes wurden mittels einer Co-IP untersucht.

In HEK Zellen wurde dazu das pFLAG-HSP72-WT-N1-Plasmid cotransfiziert und die Co-IP 48 h nach Transfektion mit einem FLAG-Antikörper durchgeführt. In IMR-90 Zellen wurde

48 h (junge Zellen), bzw. 72 h (alte Zellen) nach einer Transfektion der HSP72-Antikörper für eine anschließende Co-IP verwendet.

Um das Ubiquitinsignal in HEK und in IMR90 Zellen zu stabilisieren, wurde dem IP-Puffer ein Deubiquitinierungs-Inhibitor (N-Ethylmaleimid, 50 mM, Sigma) zugesetzt. Bei der Analyse von seneszenten Zellen war es notwendig, das Ubiquitinsignal weiter zu verstärken, da es ansonsten auf dem Western Blot nicht zu detektieren war. Dazu wurde zum einen pFLAG-HSP72-WT-N1 cotransfiziert, um die intrazellulären HSP72 Spiegel anzuheben. Zum anderen wurde 4 h vor Zellernte eine Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 (4 μ M, Calbiochem) durchgeführt, um den Gehalt an ubiquitinierten Proteinen zu erhöhen. Bei einer vergleichenden Analyse von jungen und alten Fibroblasten wurde mit den proliferierenden Zellen ebenfalls entsprechend verfahren. Der Ubiquitinierungsstatus des HSP72-Komplexes wurde in beiden Zellsystemen mit einem HA-Antikörper im Western Blot visualisiert.

IP-Puffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM	NaCl
2 mM	EDTA
1 mM	EGTA
0,5 % [V / V]	NP40
50 mM	N-Ethylmaleimid
1 % [V / V]	Protease-Inhibitor-Cocktail
1 % [V / V]	Phosphatase-Inhibitor-Cocktail

2x Proteinladepuffer für SDS-PAGE

125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
4 % [m / V]	SDS
20 % [V / V]	Glycerin
0,02 % [V / V]	Bromphenolblau
5 % [V / V]	2-Mercaptoethanol

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

2.3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Der PCR-Prozess verläuft in mehreren Zyklen, wobei die Produkte vorangegangener Zyklen als Ausgangsmaterial für folgende Zyklen dienen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Zunächst wird in einem Denaturierungsschritt durch Erhitzen auf 94-98 °C die doppelsträngige DNA durch Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen in Einzelstränge aufgeschmolzen. Bei einer bestimmten Temperatur wird dann das Anlagern (*Annealing*) von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primern) an beide DNA-Einzelstränge erlaubt, wo sie jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen und somit den zu replizierenden DNA-Abschnitt beidseitig begrenzen. Die *Annealing*-Temperatur sollte 5-10 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen und hängt damit von deren Länge, Sequenz und Nukleotidzusammensetzung ab. Am 3'-Ende jeden Primers synthetisieren im dritten Schritt, der Elongation, DNA Polymerasen den jeweils komplementären DNA-Strang. Dauer und Temperatur der Elongation hängen vom Arbeitsoptimum der verwendeten Polymerase ab. In der Regel kommen thermostabile Polymerasen zum Einsatz, wie die *Taq*-DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder die *Pfu*-DNA Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, welche einen Korrektur-Mechanismus besitzt.

Um die für diese Arbeit relevanten Gene zu klonieren, wurden deren kodierende Sequenzen mittels PCR amplifiziert. Als Ausgangs-DNA (*Template*) wurde hierzu entweder Plasmid-DNA (100 ng) oder humane cDNA verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, hergestellt und sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Standard PCR-Protokoll

10 µl	5x Phusion HF Puffer
1,5 µl	DMSO
1 µl	dNTPS (10 mM)
1-3 µl	<i>Template</i> DNA
0,5 µl	Primer <i>forward</i> (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer <i>reverse</i> (100 pmol/µl)
0,5 µl	Phusion HF Enzym (2 U/µl)
33-35 µl	ddH ₂ O

Standard PCR-Reaktion

98 °C	30 sec	initiale Denaturierung	} 35 Zyklen
98 °C	10 sec	Denaturierung	
55-65 °C	30 sec	Annealing	
72 °C	30 sec/kb	Elongation	
72 °C	10 min	finale Extension	
4 °C	∞		

Tabelle 5: Oligonukleotide zur Konstruktion der Expressionsplasmide (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
pBAG2-N1 For	TCTCGAGCTCAAGCTTATGGCTCAGGCGAAGATCAAC
pBAG2-N1 Rev	CCGCTTTACTTGTACAGCGTGATTCCATGCCAGAC
pCHIP-N1 For	TCTCGAGCTCAAGCTTATGAAGGGCAAGGAGGAGAAGG
pCHIP-N1 Rev	CCGCTTTACTTGTACAGTCCAGAGTCCAACAGCAGAAC
pCHIPmyc-His For	CTGGACTAGTGGATCATGAAGGGCAAGGAGGAGAA
pCHIPmyc-His Rev	TACCGAGCTCGGATCCGTAGTCCTCCACCCAGCCAT
pHSPBP1-N1 For	CGCGGGCCCGGGATCATCAGGACGCCAGAGCTGCTTC
pHSPBP1-N1 Rev	TCTAGAGTCGCGGCCTTGGGAGAGGGCCTTGTAGGTG

2.3.1.2 Linearisierung des Zielvektors mittels Restriktion

Für die Klonierung des gewünschten Gens in einen bestimmten Zielvektor, wurde dieser zunächst durch einen Restriktionsverdau mit Endonukleasen linearisiert. Dazu wurden 4-8 µg

Vektor mit 4-6 µl eines geeigneten Restriktionsenzym (NEB), 10 µl des entsprechenden 10x Restriktionspuffers (NEB) und 1 µl BSA (100x, NEB) versetzt, mit ddH₂O auf ein Volumen von 100 µl gebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Sowohl der linearisierte Zielvektor als auch das Amplifikat des Wunschgens wurden anschließend in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese extrahiert (s. Abschnitt 2.3.1.4).

2.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern negativ geladene Nukleinsäuremoleküle im elektrischen Feld durch eine poröse Gelmatrix aus Agarosepolymeren zur Anode. Durch einen Molekularsiebeffekt werden die einzelnen Moleküle dabei nach ihrer Größe aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden zur DNA-Auftrennung 1 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose [m / V] in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer durch Aufkochen aufgelöst und mit 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA, wodurch sich das Anregungsspektrum verändert und die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem (UV) Licht stark erhöht. Auf diese Weise können die DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Agarosegel wurde mit dem Agagel Mini Horizontal *Gel Electrophoresis Apparatus* von Biometra gegossen und die DNA in 1x TAE-Puffer bei 50 Milliampere aufgetrennt. DNA-Proben wurden zuvor mit 6x *MassRuler Loading Dye* (Fermentas) versetzt. Außerdem wurden 3,5 µl *MassRuler DNA Ladder Mix* von Fermentas als Größenstandard aufgetragen. Die Dokumentation der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht (366 nm).

1x TAE-Puffer

40 mM	Tris (pH 7,5)
20 mM	Na-Acetat-Trihydrat
1 mM	EDTA

2.3.1.4 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Für Klonierungen vorgesehene, linearisierte Vektoren und Amplifikate der einzubringenden Gene (Inserts) wurden in einem Agarosegel wie oben beschrieben aufgetrennt. Um die Konstrukte von nicht-linearisierten Plasmiden und unspezifischen DNA-Fragmenten zu isolieren, wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem *NucleoSpin Extract II Kit* (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3.1.5 Fusion von Insert-DNA und Zielvektor mit dem *In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit*

Zur Konstruktion der Expressionsplasmide wurden die generierten Amplifikate (s. Abschnitt 2.3.1.1) mit Hilfe des *In-Fusion Advantage PCR Cloning Kits* (Clontech) in den linearisierten Zielvektor (s. Abschnitt 2.3.1.2) eingebracht. Das Prinzip der Methode beruht auf der Amplifikation der Insert-DNA mit Hilfe von spezifischen Primern, die beidseitig von 15 bp Verlängerungen flankiert sind, die in ihrer Sequenz homolog zu den Enden des Zielvektors sind. Da das resultierende Amplifikat von diesen Sequenzen beidseitig begrenzt wird, kann es in einer einzigen Reaktion mit dem Zielvektor fusionieren, wobei auch die Orientierung des Inserts definiert wird.

Vektor und Insert wurden hierzu in einem molaren Verhältnis von 2:1 in einem 10 µl Reaktionsansatz gemäß Herstelleranleitung zusammengegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch Rekombination mit Hilfe des *In-Fusion* Enzyms erfolgte dabei die Fusion von Vektor und Insert. Nach Inaktivierung des Enzyms durch eine Inkubation für 15 min bei 50 °C wurde der Ansatz mit 20 µl ddH₂O verdünnt und 5 µl davon in eine Transformation des chemisch kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) Stammes DH5α (NEB) eingesetzt. Dazu wurden auf Eis aufgetaute Bakterien mit der DNA versehen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C und 1 min Abkühlung auf Eis erfolgte die Zugabe von 450 µl SOC-Medium und eine einstündige Inkubation der Bakteriensuspension unter Schütteln bei 37 °C. Im Anschluss wurden 50 µl Bakterien auf LB-Agarplatten mit einem für die Transformanten geeigneten Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden sechs Vorkulturen mit 3 ml LB-Medium, versetzt

mit entsprechendem Antibiotikum, mit einzelnen Kolonien beimpft und bei 37 °C unter Schütteln 18 h lang inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem *NucleoSpin Plasmid Kit* (Macherey-Nagel). Der Erfolg der Fusion wurde in einem Restriktionsverdau mit geeigneten Endonukleasen überprüft. Ein 10 µl Ansatz mit 2 µl Plasmid-DNA, 1 µl Restriktionsenzym (NEB), 1 µl des entsprechenden 10x Restriktionspuffers (NEB) und 1 µl BSA (10x, NEB), wurde bei 37 °C für 1,5 h inkubiert und die DNA *via* Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert. Proben mit dem gewünschten Konstrukt wurden mittels Sequenzierung von der Firma Genterprise (Mainz) kontrolliert. Die dazu verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Sequenzen wurden wiederum mit den Programmen *Clone Manager 7* (Sci Ed Software) und *Chromas* (Technelysium Pty Ltd) überprüft. Konnte dadurch die richtige DNA-Sequenz und die korrekte Fusion von Insert und Vektor bestätigt werden, wurde mit dem Rest der Vorkultur des entsprechenden Klons eine 200 ml Bakterienkultur in antibiotikahaltigem LB-Medium angeimpft und diese für 18 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte eine Plasmidisolierung mit dem *JetStar Maxi Kit* (Genomed) nach Anleitung des Herstellers.

SOC-Medium

20 g/l	Bacto-Trypton
5 g/l	Bacto-Hefeextrakt
0,584 g/l	NaCl
0,19 g/l	KCl
2,03 g/l	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
2,46 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
3,96 g/l	Glucose

LB-Medium

10 g/l	Bacto-Trypton
5 g/l	Bacto-Hefeextrakt
5 g/l	NaCl

Die Medien wurden autoklaviert (121 °C, 30 min) und bei 4 °C gelagert.

LB-Agarplatten

LB-Medium mit 15 g/l Bacto-Agar

Nach dem Autoklavieren und einer Abkühlung auf 60 °C, wurden die gewünschten Antibiotika zugegeben und 20 ml des Gemisches in Petrischalen gegossen. Die Schalen härteten bei Raumtemperatur aus und wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Antibiotika-Zusätze

(Endkonzentration)

100 µg/ml Ampicillin

50 µg/ml Kanamycin

Tabelle 6: Oligonukleotide zur Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
SeqPrim CMV for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
SeqPrim SV40 PolyA Rev	CCTCTACAAATGTGGTATGG
rev-pcDNA3hCB1	CAACAGATGGCTGGCAACTA

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Spektralphotometrie

Nukleinsäuren (DNA, RNA) besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Um die Konzentration an Nukleinsäuren in einer Lösung zu bestimmen, wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) und von 280 nm (OD₂₈₀, dem Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Um eine Aussage über die Qualität der Proben machen zu können, wird der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ berechnet. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 spricht hierbei für eine ausreichende Reinheit. Werte unter 1,8 deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen und/oder Phenol hin, Werte über 2,0 auf das Vorhandensein von RNA oder denaturierter DNA. Die Konzentration der Nukleinsäuren wird aus der gemessenen Absorption nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt:

$$A = c * d * \epsilon$$

A: Absorption, c: Konzentration, d: Schichtdicke (1 cm), ε: dekadischer Extinktionskoeffizient.

Demnach entspricht eine Absorption von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. In dieser Arbeit wurde die optische Dichte in einem Spektrophotometer (Beckmann, München) in Quarz-Küvetten gegen ddH₂O bestimmt.

2.3.3 Gerichtete Mutagenese

Um zu überprüfen, ob die Effekte durch die Überexpression von pCHIP-N1 von der Ubiquitinligaseaktivität von CHIP abhängig sind, wurde eine dominant-negative CHIP Mutante hergestellt, der diese Aktivität fehlt. Dazu wurden zwei Punktmutationen (D253N/R254G) mit Hilfe des *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene/Agilent Technologies) in den pCHIP-N1 Vektor eingeführt. Das Prinzip beruht auf einer PCR-Reaktion mit dem doppelsträngigen Ausgangsplasmid und zwei synthetischen, komplementären Oligonukleotidprimern, welche die gewünschte(n) Mutation(en) enthalten. Die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseprimer sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Primer binden an die beiden Einzelstränge des denaturierten Ausgangsplasmids. Ausgehend von diesen Primern synthetisiert die PfuUltra[®] *High-Fidelity* (HF) DNA Polymerase den jeweils komplementären DNA Strang. Im Anschluss wird die methylierte, parentale DNA über einen Restriktionsverdau mit *DpnI* abgebaut. Nach Transformation der zirkulären, doppelsträngigen Plasmid-DNA in XL10-Gold ultrakompetente Zellen, werden in diesen die am 3'-Ende verbliebenen DNA Einzelstrangbrüche (*Nicks*) von der Ligase repariert.

Nach der Mutagenese wurden sechs Antibiotika-haltige 3 ml Vorkulturen mit einzelnen Kolonien beimpft und bei 37 °C in schräger Schüttelkultur 18 h lang herangezogen. Die Plasmidisolation erfolgte mit dem *NucleoSpin Plasmid Kit* (Macherey-Nagel). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch eine Sequenzierung (Genterprise, Mainz) überprüft (s.o.).

Tabelle 7: Oligonukleotide zur gerichteten Mutagenese von pCHIP-N1 (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Name	Sequenz (5' → 3')
pCHIP-D253N/R254G-N1 For	AGTGGCATCACCTACAACGGCAAGGACATCGAGG
pCHIP-D253N/R254G-N1 Rev	CCTCGATGTCCTTGCCGTTGTAGGTGATGCCACT

2.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Gesamt-RNA wurde aus Zellen mit Hilfe des *NucleoSpin RNA II Kits* (Macherey-Nagel) oder des *Absolutely RNA Miniprep Kits* (Stratagene) nach Herstellerangaben gewonnen. Um eine mögliche Kontamination mit Ribonukleasen (RNasen) zu vermeiden, wurde stets mit sterilen, RNase-freien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen gearbeitet und nur Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes, bidestilliertes Wasser verwendet. DEPC modifiziert und inaktiviert RNasen chemisch. DNA wurde mit dem Enzym *DNaseI* verdaut. Dieser Ansatz wurde, abweichend vom Protokoll des Herstellers, 1 h lang bei 37 °C inkubiert. Das RNase-freie Wasser zur Elution der RNA (Macherey-Nagel) wurde zudem auf 70 °C vorgeheizt. Die präparierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.3.5 cDNA Synthese mittels Reverser Transkription (RT-PCR)

Mit dem Ziel, eine bestimmte mRNA aus dem Gemisch an Gesamt-RNA zu quantifizieren, ist zunächst eine Umschreibung der RNA in eine komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) erforderlich. Dazu werden zunächst durch Erhitzen auf 65-70 °C für wenige Minuten die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen. Ausgehend von Oligo-dT-Primern, die an den Poly-A-Schwanz von mRNAs binden, synthetisiert die RT dann die cDNA.

In dieser Arbeit wurde das *Omniscript RT PCR Kit* von Qiagen verwendet. Pro Ansatz wurden 1000 ng Gesamt-RNA eingesetzt und mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10 µl gebracht. Nach einem Denaturierungsschritt bei 65 °C für 5 min wurde die RNA auf Eis in einem 20 µl-Ansatz mit 2 µl RT-Puffer (10x, Qiagen), 2 µl dNTPs (5 mM, Qiagen), 2 µl Oligo-dT-15-Primern (10 µM, Promega), 10 U RNasin (Promega) und 4 U *Omniscript Reverse Transcriptase* (Qiagen) vermischt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Für jeden Versuch wurde zusätzlich eine Kontrolle ohne RT angesetzt (Mock), die in einer anschließenden quantitativen Echtzeit-PCR (s. u.) eine Aussage über eventuelle DNA-Kontaminationen ermöglichte. Wurde mit neu synthetisierter cDNA nicht sofort weiter gearbeitet, wurde sie bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.6 Quantitative Echtzeit-PCR (Echtzeit-qPCR)

Um eine bestimmte mRNA zu quantifizieren und damit die Expression des entsprechenden Gens zu beurteilen, nutzt man die Kinetik einer PCR-Reaktion aus, die sigmoidal verläuft. Nach einer Anlaufphase erfolgt die Amplifikation der DNA-Fragmente für eine begrenzte Zeitspanne exponentiell, bevor sie in eine Sättigungsphase übergeht, sobald die Kapazität des Systems erschöpft ist (aufgebrauchte Primer und/oder Nukleotide, hitzedenaturierte Polymerase, Anreicherung von hemmenden Reaktionsprodukten wie Pyrophosphat). Durch die Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an die DNA steigt während der exponentiellen Zunahme an DNA-Fragmenten die Fluoreszenzintensität proportional dazu an. Über die Fluoreszenz kann somit auf die Menge an ursprünglich vorhandener mRNA rückgeschlossen werden. Als Richtwert wird die Zykluszahl verwendet, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt und die exponentielle Phase der Amplifikation gewährleistet ist (*cycle threshold*-Wert, C_t -Wert). Dabei gilt, je niedriger der C_t -Wert, desto mehr mRNA lag ursprünglich vor. Für eine relative Quantifizierung wird ein Referenzgen mitgemessen, bei welchem es sich meist um ein Haushaltsgen handelt und das unter den gegebenen Versuchsbedingungen möglichst nicht reguliert wird. Einen relativen Expressionsunterschied R kann man über den ΔC_t -Wert ermitteln:

$$\Delta C_t = C_t(\text{Referenzgen}) - C_t(\text{Zielgen})$$

$$R = 2^{\Delta C_t(\text{Zielgen})} / 2^{\Delta C_t(\text{Referenzgen})}$$

Durch eine Schmelzkurven-Analyse wird die Spezifität von generierten PCR-Produkten überprüft. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich erhöht. Bei einer für ein DNA-Fragment spezifischen Temperatur denaturiert der DNA Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen. Dabei wird Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzänderung registriert. Die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten hat einen höheren Schmelzpunkt als unspezifische Primerdimere und kann so von ihnen unterschieden werden.

In dieser Arbeit wurde das Absolute SYBR *green fluorescein* von Thermo Fisher Scientific verwendet, welches alle für die Echtzeit-qPCR notwendigen Komponenten außer cDNA-Template und Primer enthält. SYBR *green* ist ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. In einem 25 μ l-Ansatz wurden 12,5 μ l des 2x Absolute SYBR *green fluorescein*, jeweils 0,5 μ l der *Sense*- und *Anti-Sense* Primer (10 pmol/ μ l, Eurofins

MWG Operon, Ebersberg) und 1 µl cDNA zusammengegeben. Jede Probe wurde als Triplikat angesetzt und neben der Mock wurde eine weitere Negativkontrolle ohne cDNA mitgeführt. Für die Reaktion wurde der *iCycler Real-Time PCR Thermocycler* (Bio-Rad) verwendet. In IMR-90 Zellen wurde RNA Polymerase II als Referenzgen verwendet. Die relative Genexpression wurde mit der REST Software (Pfaffl *et al.*, 2002) ermittelt. Die verwendeten Primer für die Echtzeit-qPCR sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Standard Echtzeit-qPCR-Reaktion

95 °C	15 min	initiale Denaturierung	} 35 Zyklen
95 °C	20 sec	Denaturierung	
60 °C	20 sec	Annealing	
72 °C	30 sec	Elongation	
95 °C	1 min	Denaturierung	} 88 Zyklen
55 °C	1 min	Annealing	
+ 0,5 °C pro Zyklus	8 sec	Schmelzkurvenanalyse	
4 °C	∞		

Tabelle 8: Oligonukleotide zur quantitativen Echtzeit-PCR (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Name	Sequenz (5' → 3')
hHSP72qPCR For	TTTGAGGGCATCGACTTCTACA
hHSP72qPCR Rev	CCAGGACCAGGTCGTGAATC
hRNA POLIIqPCR For	GGGCTCTGCCTCTTAGCTG
hRNA POLIIqPCR Rev	CATCACCATCCCGACCTACAG

2.3.7 Statistische Methoden

Für eine statistische Auswertung wurden für jeden Versuch die Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung herangezogen, sofern nicht anders angegeben. Eine statistische Signifikanz wurde mit dem *Student's t-test* und der Software SIGMA STAT (SPSS Science) kalkuliert und ab einem Wert von $p < 0,05$ akzeptiert.

2.4 Geräte

Absaugsystem VacuSafe	Integra, Fernwald
Agagel Mini Horizontal <i>gel electrophoresis apparatus</i>	Biometra, Göttingen
Amaxa Nucleofector I	Lonza, Köln
Axiovert Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Dampfsterilisator VarioClav	H+P, Oberschleißheim
Fluoreszenzmikroskop, MZ10 F	Leica, München
Fusion-SL <i>advance chemiluminescence/</i>	
<i>Flourescence system</i>	Peqlab, Erlangen
Heizblock, Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>iCycler Real-Time PCR Thermocycler</i>	Bio-Rad, München
Inkubatoren	Binder, Tuttlingen
Klimatisierte Brutschränke	Thermo, Dreieich
LAS-3000 <i>intelligent darkbox</i>	Fuji, Düsseldorf
<i>Micro ultrasonic cell disrupter</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Mikrotiterplattenlesegerät, Multiskan RC	Thermo Labsystems, Ulm
Mini <i>power pack</i> PS300T	Biometra, Göttingen
Mini <i>trans-Blot electrophoretic transfer cell system</i>	Bio-Rad, München
Mini-PROTEAN III System	Bio-Rad, München
PCR DNA Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	InoLab, Weilheim
<i>PowerPac™ basic power supply</i>	Bio-Rad, München
<i>PowerPac™ universal power supply</i>	Bio-Rad, München
Spektrophotometer	Beckmann, München
Stereomikroskop SZ61	Olympus, Hamburg
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
<i>XCell sure lock Western Blotting system (NuPAGE)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

2.5 Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
ABsolute SYBR <i>green fluorescein</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bafilomycin A1	Alexis/Enzo, Lörrach
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BisTris)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DEPC-Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Dimethylformamid	Fluka, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
ECL <i>Western Blotting substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Fötales bovines Serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Luminol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>MassRuler DNA ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>MassRuler Loading Dye</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	Roth, Karlsruhe
MG132	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Natrium-Acetat-Trihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe
N-Ethylmaleimid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Non-essential amino acids</i>	Gibco, Karlsruhe
<i>Page Ruler prestained protein ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
para-Hydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	Gibco, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protein G Sepharosekügelchen	GE Healthcare Europe, Freiburg
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Thiazolyl <i>Blue</i> Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Trockenmilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Whatman Gel Blotting Papier	A.Hartenstein, Würzburg
Whatman-Protran Nitrozellulose Transfermembran	A.Hartenstein, Würzburg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

3. ERGEBNISSE

3.1 Der Einfluss von BAG2 auf die Ubiquitinligase CHIP im zellulären System

BAG2 ist ein Regulator der Ubiquitinligase CHIP, der Chaperonsubstrate stabilisiert und vor einem vorzeitigen Abbau schützt (Arndt *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2006). Der zugrunde liegende Mechanismus, die Inhibition der Ligaseaktivität von CHIP, wurde bislang in Ubiquitinierungsversuchen mit rekombinanten Proteinen und zellfrei aufgedeckt (Arndt *et al.*, 2005). In dieser Arbeit sollte der Mechanismus erstmals in einem zellulären System nachgewiesen und analysiert werden. Hierzu wurde mit humanen immortalisierten HEK293T Nierenepithelzellen sowie mit humanen primären IMR-90 Lungenfibroblasten gearbeitet.

3.1.1 Einfluss von BAG2 auf die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP in HEK-293T Zellen

Die Hemmung der Ligaseaktivität von CHIP durch BAG2 sollte zunächst mit Hilfe der immortalisierten HEK-293T Zelllinie analysiert werden. Als Modell-CHIP-Substrat diente HSP72. Diese induzierbare HSP70-Variante wird CHIP-abhängig ubiquitiniert und damit dem Abbau über das UPS zugeführt. Dies folgt in einer hierarchischen Reihenfolge der Beseitigung fehlgefalteter Chaperonsubstrate (Qian *et al.*, 2006). Mit HSP72 wurden Immunpräzipitationen und Ubiquitinanalysen durchgeführt. Dazu wurden zunächst CHIP- und/oder BAG2-Proteinspiegel in den Zellen moduliert, wobei jeweils HA-Ubiquitin sowie FLAG-HSP72 cotransfiziert wurden. FLAG-HSP72 wurde mit einem spezifischen FLAG-Antikörper aus dem Zelllysate präzipitiert und der Grad an dessen Ubiquitinierung im Western Blot visualisiert. In diesem Kontext sollte erwähnt werden, dass es sich bei dem immunpräzipitierten FLAG-HSP72 um einen Chaperon/Cochaperon/Substrat-Komplex handelte und nicht um das einzelne FLAG-HSP72-Protein, da Interaktionspartner von HSP72 in diesem Versuch copräzipitierten. Um eine Aussage über die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP machen zu können, war dies jedoch irrelevant. Der Einfachheit halber wird im Folgenden der Chaperon/Cochaperon/Substrat-Komplex kurz als FLAG-HSP72 bezeichnet. Erhöhte Proteinspiegel von CHIP führten zu einer verstärkten Ubiquitinierung von FLAG-HSP72 (Abb. 7A, oben, Spur 6). Überexprimiertes BAG2 alleine oder kombiniert mit CHIP

fürte ebenfalls zu einer Verstärkung des Ubiquitinsignals (Abb. 7A, oben, Spuren 7 und 8). Gleichzeitig stiegen jedoch auch die Spiegel von unmodifiziertem FLAG-HSP72 deutlich an, sobald die BAG2-Proteinspiegel erhöht vorlagen (Abb. 7A, Spuren 7 und 8, siehe auch: Input). Letzteres war zu erwarten, da BAG2 durch die Inhibition CHIP-vermittelter Ubiquitinierung den Abbau von FLAG-HSP72 verringern sollte. Allerdings floss somit bereits im Vorfeld mehr FLAG-HSP72 in die Immunpräzipitation ein. Neben mehr unmodifiziertem FLAG-HSP72 lag daher höchstwahrscheinlich auch mehr ubiquitiniertes Protein vor, was zu den gezeigten Ergebnissen führte. Nach einer densitometrischen Quantifizierung des Ubiquitinsignals und einer Normalisierung gegen die Proteinspiegel von unmodifiziertem FLAG-HSP72 war zu erkennen, dass die BAG2-Überexpression tendenziell zu einer Abnahme der FLAG-HSP72-Ubiquitinierung führte (Abb. 7B). Die Daten konnten allerdings nicht durch eine statistische Signifikanz belegt werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die HEK-293T Zelllinie vermutlich kein geeignetes System repräsentiert, um die Funktion von BAG2 zellulär zu untersuchen. In den folgenden Experimenten wurde deshalb mit der IMR-90 Zelllinie gearbeitet.

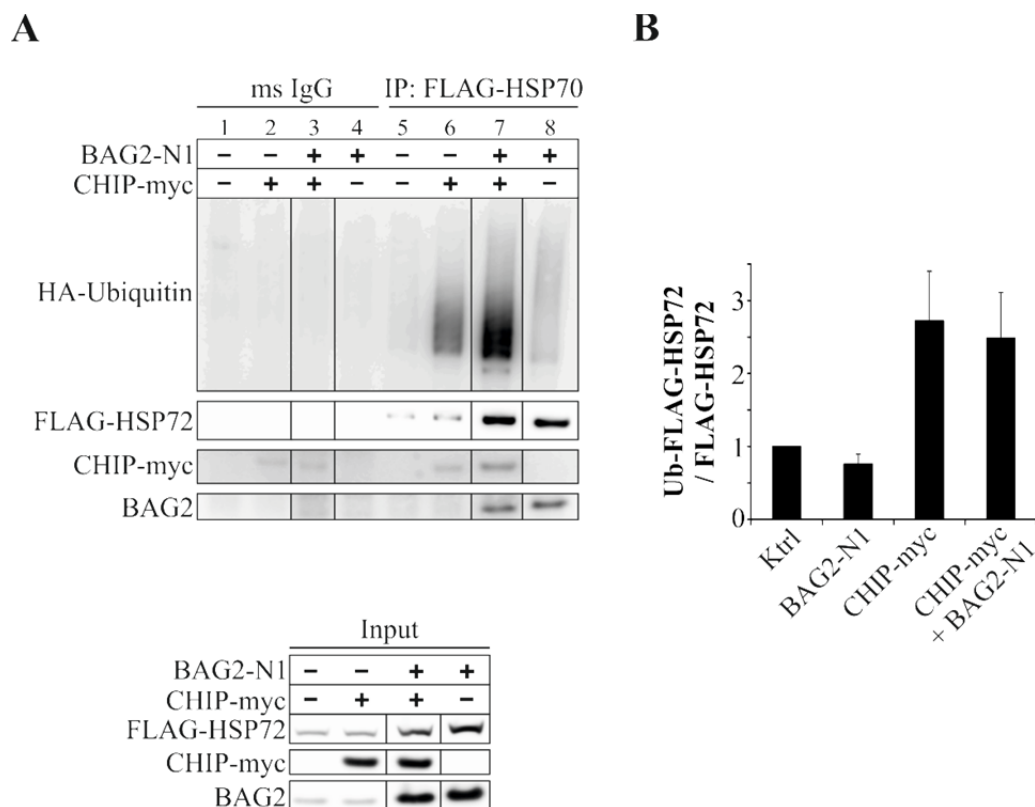


Abbildung 7: Einfluss von BAG2 auf die CHIP-vermittelte Ubiquitinierung im HEK-293T-Zellmodell. (A) HEK-293T Zellen wurden transient mit 0,25 µg FLAG-HSP72, 20 µg HA-Ubiquitin und entweder 10-40 µg des Leervektors als Kontrolle, 30 µg BAG2, 10 µg CHIP-myc oder BAG2 zusammen mit CHIP cotransfiziert. Nach 48 h erfolgte eine Coimmunpräzipitation (IP) mit dem FLAG-Antikörper. Der Gehalt an polyubiquitiniertem FLAG-HSP72 wurde im Western Blot mit

einem anti-HA-Antikörper visualisiert (oben). Aufgereinigte Maus (ms) IgGs dienten als Negativkontrolle. Nicht relevante Proteinbanden wurden herausgeschnitten und sind durch schwarze Striche gekennzeichnet. Alle analysierten Proteine wurden auch in dem für die IP verwendeten Zelllysate nachgewiesen (Input, unten). Die gezeigten Daten repräsentieren vier voneinander unabhängige Versuche. **(B)** Die Intensitäten der in (A) erhaltenen Ubiquitinsignale wurden densitometrisch ausgewertet und gegen die Spiegel von unmodifiziertem FLAG-HSP72 normalisiert. Dargestellt wurden Mittelwerte als relative Veränderungen zur Leervektorkontrolle \pm Standardabweichung des Mittelwertes (*Standard error of the mean*, S.E.M.), *Student's t-test*, nicht signifikant, n = 4.

3.1.2 BAG2 reguliert die Proteinspiegel des CHIP-Substrates HSP72 in IMR-90 Zellen

Um die Funktion von BAG2 im IMR-90 Zellsystem zu beleuchten, wurde zunächst untersucht, ob sich endogene Proteinspiegel eines CHIP-Substrates durch BAG2-Modulation beeinflussen lassen. Als Modell-CHIP-Substrat diente hier nun endogenes HSP72. Eine BAG2-Überexpression in IMR-90 Zellen führte zu einem signifikant erhöhten Proteingehalt an HSP72 (+110 %, Abb. 8A). Verringerte BAG2-Proteinspiegel, hervorgerufen durch die Behandlung mit einer spezifischen siRNA, bewirkten hingegen eine Abnahme der HSP72-Spiegel um 41 % (Abb. 8B). Um sicherzustellen, dass der Einfluss von BAG2 auf HSP72 tatsächlich auf einen veränderten Abbau und nicht auf eine modulierte Genexpression zurückzuführen war, wurde die Menge an HSP72-mRNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR nach einer BAG2-Überexpression und nach einer Reduktion von BAG2-Spiegeln bestimmt. Unter beiden Bedingungen war die HSP72-Expression tendenziell leicht erhöht (Abb. 8C). Da dies jedoch nach densitometrischer Auswertung nicht durch eine statistische Signifikanz belegt werden konnte, und da das HSP72-Expressionsmuster nach BAG2-siRNA-Behandlung nicht mit den Daten aus dem Western Blot übereinstimmte, wurde davon ausgegangen, dass sich die leicht erhöhten HSP72-mRNA-Spiegel nicht auf die Beobachtungen auf Proteinebene auswirkten.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass BAG2 an der Regulation endogener HSP72-Proteinspiegel beteiligt ist.

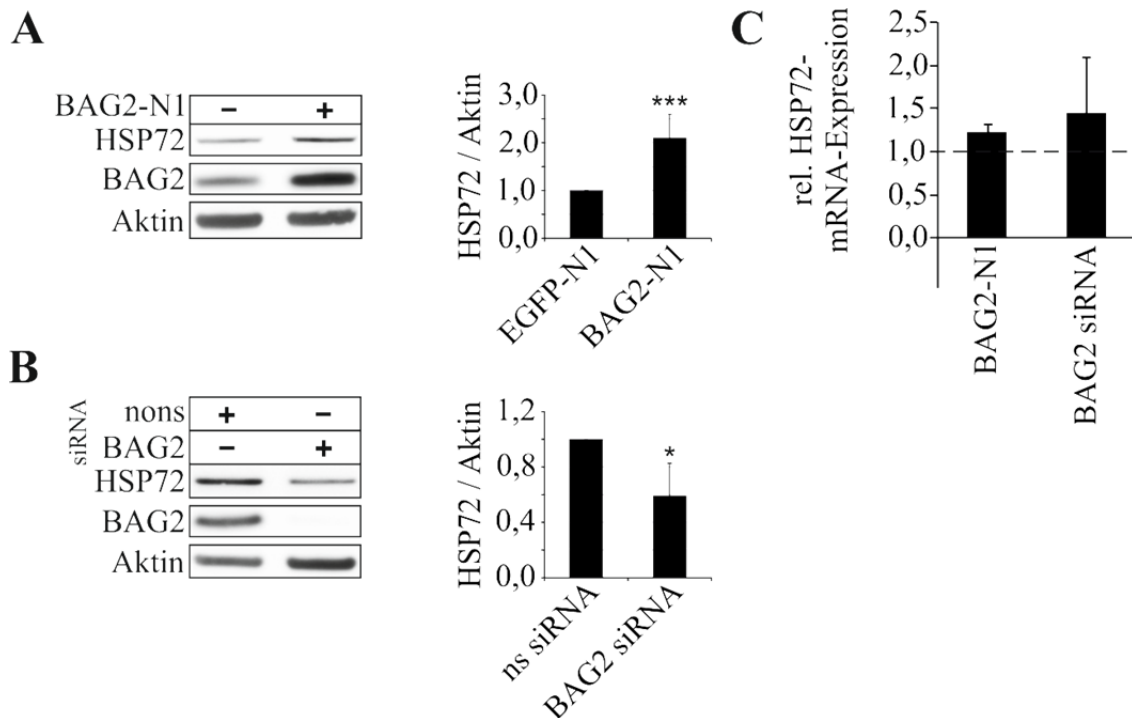


Abbildung 8: BAG2 beeinflusst endogene HSP72-Proteinspiegel. (A) IMR-90 Zellen wurden transient mit 30 μ g BAG2 oder EGFP als Kontrolle transfiziert. (B) Proteinspiegel von endogenem BAG2 wurden mit einer spezifischen siRNA (20 μ g) verringert. Als Kontrolle wurde eine *nonsense* (ns) siRNA transfiziert. (A+B) Nach 48 h erfolgte die Zellernte und eine proteinbiochemische Analyse der angegebenen Proteine mittels Western Blot (links) sowie eine densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. Gleichmäßige Probenbeladung wurde durch Aktinspiegel überprüft. Die gemittelten Daten wurden graphisch als relative Veränderung zur EGFP-Kontrolle (A) und zur *nonsense* siRNA-Kontrolle (B) dargestellt \pm Standardabweichung (rechts), *Student's t-test*, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, $n = 6$ (A), $n = 4$ (B). (C) 48 h nach BAG2-Überexpression und nach Transfektion einer BAG2-siRNA in IMR-90 Zellen wurde eine quantitative Echtzeit-PCR-Analyse von HSP72-mRNA-Spiegeln durchgeführt. Als Referenzgen diente die RNA Polymerase II (RNA POL II). Dargestellt wurden Mittelwerte als relative Veränderung der HSP72-mRNA-Expression zur EGFP- und *nonsense* siRNA-Kontrolle, welche gleich Eins gesetzt wurde \pm Standardabweichung, *Student's t-test*, nicht signifikant, $n = 3$.

3.1.3 BAG2 inhibiert die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP in IMR-90 Zellen

Mittels Immunpräzipitationen und Ubiquitinanalysen sollte gezeigt werden, dass BAG2 die HSP72-Spiegel durch die Inhibition der Ligaseaktivität von CHIP beeinflusste. Nach Modulation von BAG2- und/oder CHIP-Proteinspiegeln in IMR-90 Zellen wurde dazu endogenes HSP72 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus dem Zelllysat immunpräzipitiert und der Ubiquitinierungsstatus von HSP72 wurde im Western Blot dokumentiert. Auch in diesem Fall handelte es sich bei dem immunpräzipitierten HSP72 um einen Chaperon/Cochaperon/Substrat-Komplex (s. Abschnitt 3.1.1), der jedoch der Einfachheit halber im Folgenden mit HSP72 bezeichnet wird.

In die Analyse wurde eine dominant-negative U-Box Mutante von CHIP, CHIP-D253N/R254G, mit einbezogen. Diese kann keine Assoziation mit dem E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzym eingehen und weist somit keine Ubiquitinligaseaktivität auf (Xu *et al.*, 2002). Bei einer Überexpression dieser CHIP-Variante konnte die Aktivität von endogenem CHIP jedoch nicht komplett unterdrückt werden, so dass ein Ubiquitinsignal generiert wurde, welches vergleichbar mit der EGFP-Kontrolle war (Abb. 9A, oben, Spur 11). Die Ubiquitinierung von HSP72 war erwartungsgemäß in Gegenwart von überexprimiertem wildtypischem CHIP (CHIP-WT) deutlich erhöht (Abb. 9A, oben, Spur 9). Wenn BAG2 alleine oder zusammen mit einer der beiden CHIP-Varianten überexprimiert wurde, verringerte sich der Ubiquitinierungsstatus von HSP72 deutlich (Abb. 9A, oben, Spuren 8, 10, 12). So konnte gezeigt werden, dass der Effekt von CHIP-WT auf die HSP72-Ubiquitinierung von der Ligaseaktivität von CHIP abhing und dass BAG2 in der Lage war, diese Aktivität zu inhibieren.

In den Immunpräzipitationsstudien konnten außerdem die direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen HSP72 und BAG2, CHIP-WT und CHIP-D253N/R254G nachgewiesen werden (Abb. 9B), wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurden (Arndt *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2006). Dabei zeigte sich, dass die mutante CHIP-Variante in dem für die Coimmunpräzipitation verwendeten Zelllysate (Input) nur sehr schwach zu detektieren war (Abb. 9B, rechts unten). Allerdings cosedimentierte sie in einem sehr viel größeren Ausmaß mit HSP72 als das wildtypische CHIP (Abb. 9B, rechts oben). Daher konnte angenommen werden, dass die niedrigen Proteinspiegel von CHIP-D253N/R254G im Input auf einen verstärkten, HSP72-vermittelten Abbau zurückzuführen waren und nicht auf eine geringere Genexpression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktion von BAG2 als Inhibitor der Ubiquitinligaseaktivität von CHIP im IMR-90 Zellmodell bestätigt werden konnte.

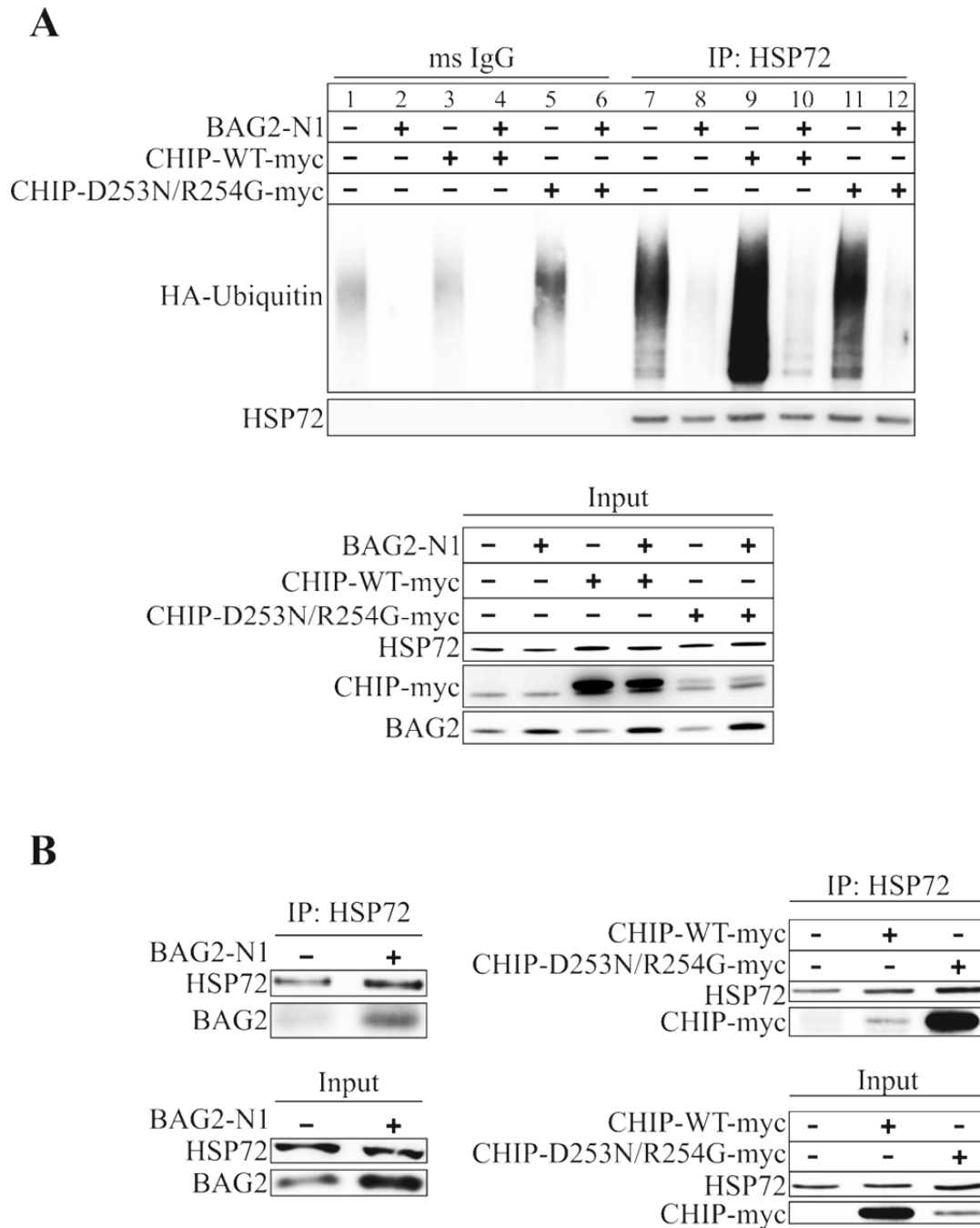


Abbildung 9: Im Komplex mit HSP72 inhibiert BAG2 die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP. (A) IMR-90 Zellen wurden transient mit 20 µg HA-Ubiquitin und mit entweder 10-55 µg EGFP als Kontrolle, 30 µg BAG2, 10 µg CHIP-WT-myc, 15 µg CHIP-D253N/R254G-myc oder BAG2 zusammen mit jeweils einer der CHIP-Varianten cotransfiziert. Nach 48 h wurde eine Coimmunpräzipitation (IP) mit dem HSP72-Antikörper durchgeführt und der Ubiquitinierungsstatus des HSP72-Komplexes mit einem anti-HA-Antikörper im Western Blot analysiert (oben). Aufgereinigte Maus (ms) IgGs dienten als Negativkontrolle. Im unteren Teil wurde das für die Co-IP verwendete Zelllysate *via* Western Blot untersucht (Input). Dargestellt wurden repräsentative Blots aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten. (B) IMR-90 Zellen wurden wie in (A) transfiziert. Die isolierten HSP72-Präzipitationskomplexe wurden bezüglich der relativen Mengen an cosedimentiertem BAG2 (links oben), CHIP-WT-myc und CHIP-D253N/R254G-myc (rechts oben) im Western Blot analysiert. Im jeweils unteren Abschnitt wurden die untersuchten Proteine im Zelllysate nachgewiesen, welches für die IP verwendet wurde (Input). Dargestellt wurden repräsentative Blots aus vier voneinander unabhängigen Experimenten.

3.2 Funktionelle Charakterisierung des CHIP-Modulators BAG2

3.2.1 Einfluss von BAG2 auf den Verlauf einer Hitzeschockantwort

Im nächsten Schritt sollten potentielle physiologische Konsequenzen der hemmenden Wirkung von BAG2 auf CHIP untersucht werden. Da es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell-CHIP-Substrat um die induzierbare Form von HSP70 handelt, lag es nahe, den Einfluss von BAG2 auf den Verlauf einer Hitzeschockantwort in der Zelle zu überprüfen. Insbesondere im Hinblick auf die Erholungsphase nach dem Hitzestress stellte sich die Frage, ob eine BAG2-Überexpression die induzierten Proteinspiegel von HSP72 über einen längeren Zeitraum hinweg erhöht halten kann im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrolle. Dazu wurden IMR-90 Zellen nach BAG2-Überexpression einem Hitzestress bei 43 °C für 30 min ausgesetzt. In einer anschließenden Erholungsphase bei 37 °C wurden über einen Zeitraum von insgesamt 8 h alle 2 h Zellen lysiert und die HSP72-Proteinexpression im Western Blot analysiert.

In der EGFP-Kontrolle konnte während der Erholungsphase ein typischer Verlauf der HSP72-Proteinspiegel verfolgt werden, ähnlich wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Qian *et al.*, 2006). Nach dem Hitzestress stiegen die Proteinspiegel sukzessive an und erreichten nach 4 h ihr Maximum. Danach erfolgte eine graduelle Abnahme an HSP72, so dass sich die Proteinspiegel nach 8 h wieder annähernd auf Ausgangsniveau befanden (Abb. 10A). In BAG2-überexprimierenden Zellen verlief die HSP72-Proteinexpression zunächst ganz ähnlich wie in der Kontrolle. Die HSP72-Spiegel schwankten jedoch innerhalb eines Versuchsansatzes, sowie von Experiment zu Experiment, in dem Zeitraum 4-8 h nach Hitzestress erheblich (Abb. 10B). Im Mittel war die Tendenz zu erkennen, dass HSP72-Proteinspiegel nach 8 h Regeneration im Gegensatz zur Kontrolle erhöht blieben, jedoch konnte dieser Sachverhalt nicht durch eine statistische Signifikanz belegt werden. Da die EGFP-Kontrolle nicht anfällig für derartig große Schwankungen war, musste davon ausgegangen werden, dass die BAG2-Überexpression einen störenden Einfluss auf den Verlauf der Hitzeschockantwort ausübte.

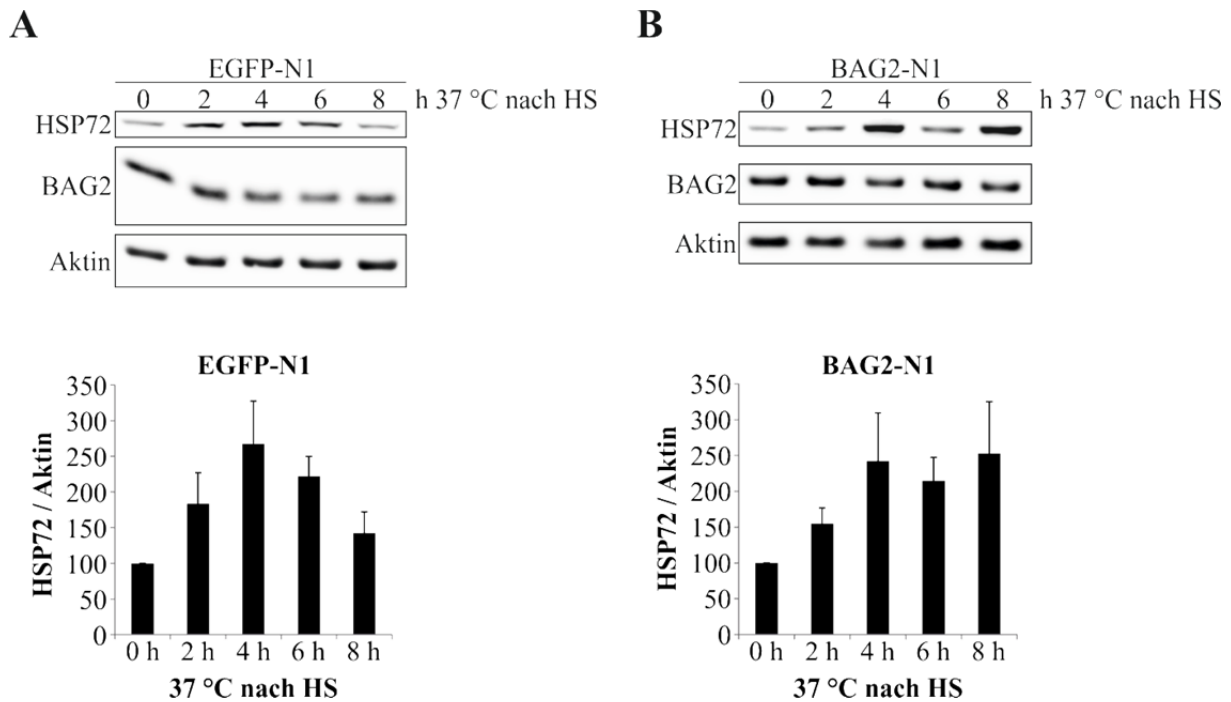


Abbildung 10: Einfluss einer BAG2-Überexpression auf die Hitzeschockantwort in IMR-90 Zellen. 40 h nach einer transienten Transfektion von IMR-90 Zellen mit 30 μ g EGFP als Kontrolle (A) oder mit 30 μ g BAG2 (B), wurden die Zellen einem Hitzestress (HS) bei 43 °C für 30 min ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine achtstündige Erholungsphase bei 37 °C, in welcher alle 2 h Zellen geerntet wurden. Die Zellysate wurden proteinbiochemisch analysiert und der Verlauf von HSP72-Proteinspiegeln im Western Blot verfolgt (oben). Die Bandenintensitäten wurden quantifiziert, gegen Aktin normalisiert und die Mittelwerte in den Graphen als prozentuale Veränderungen zur nicht-hitze gestressten Kontrolle (0 h) dargestellt (unten). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.E.M., n = 5.

3.2.2 Einfluss von BAG2 auf das Zellüberleben bei chronischem Hitzestress

Um festzustellen, ob die gestörte Hitzeschockantwort nach BAG2-Überexpression in Abschnitt 3.2.1 mit einer beeinträchtigten Zellvitalität in Zusammenhang stand, erfolgten Zellüberlebensversuche mit IMR-90 Zellen, die BAG2 oder EGFP als Kontrolle überexprimierten. Zunächst wurden die entsprechend transfizierten Zellen einem chronischen Hitzestress bei 42 °C für 5 h ausgesetzt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an überlebenden Zellen mit Hilfe eines MTT Überlebenstests ermittelt. In der Kontrolle waren nach 5 h Hitzestress noch 64 % der Zellen vital. Von den BAG2-exprimierenden Zellen hingegen überlebten nur 37 % den Dauerstress (Abb. 11). Zwar waren diese Daten statistisch nicht signifikant, dennoch konnte der Trend erkannt werden, dass die BAG2-überexprimierenden Zellen vulnerabler gegenüber dem chronischen Hitzestress waren als die Kontrollzellen.

Im Folgenden wurde der Fokus statt auf die Auswirkungen einer künstlich herbeigeführten BAG2-Modulation auf die Bedeutung einer natürlich vorkommenden BAG2-Regulation verlegt, wie sie in seneszenten Fibroblasten beobachtet wurde (s. Abschnitt 3.3.2 und 3.3.4).

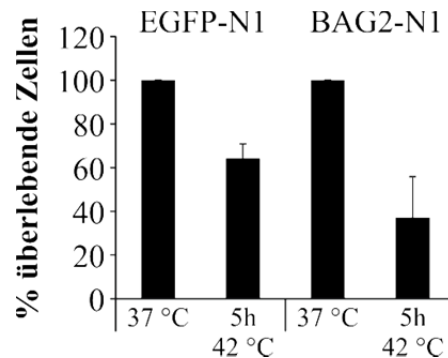


Abbildung 11: Einfluss von BAG2 auf das Zellüberleben im chronischen Hitzestress. IMR-90 Zellen wurden transient mit 30 μ g BAG2 oder EGFP als Kontrolle transfiziert und auf 96-well-Platten (5000 Zellen/Vertiefung) ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Hitzestress bei 42 °C für 5 h. Daraufhin wurde ein MTT Zytotoxizitätstest durchgeführt und der Anteil an lebenden Zellen als prozentuale Veränderung zur ungestressten 37 °C-Kontrolle ermittelt. Graphisch dargestellt wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung, *Student's t-test*, nicht signifikant, n = 3.

3.3 Die Funktion von BAG2 im Kontext der zellulären Alterung

Alterung wird in der Regel von einer Abnahme an proteostatischer Kapazität begleitet, während gleichzeitig eine gesteigerte Proteinoxidation auftritt, einhergehend mit vermehrter Akkumulation und Aggregation von fehlgefalteten Proteinen (Chondrogianni und Gonos, 2005; Derham und Harding, 1997; Erickson *et al.*, 2006). Die Zelle wirkt dem bis zu einem gewissen Grad mit einer Adaptation der Proteinqualitätskontrolle entgegen, unter anderem in Form von gesteigerter Autophagie (Gamerding *et al.*, 2009; Massey *et al.*, 2006). Im Kontext einer sich der Alterung anpassenden Proteinqualitätskontrolle sollten potentielle Veränderungen in der Funktion von BAG2 untersucht werden.

3.3.1 Charakterisierung des zellulären Alterungsmodells

Bei der in dieser Arbeit verwendeten IMR-90 Zelllinie handelt es sich um ein etabliertes zelluläres Alterungsmodell (Nichols *et al.*, 1977). Diese primären diploiden Lungenfibroblasten prägen im Laufe ihrer Lebenszeit Merkmale der zellulären Alterung aus, wie sie

bereits 1985 von L. Hayflick beschrieben wurden. Nach einer begrenzten Anzahl an Zellteilungen gehen die Zellen außerdem in den Zustand der sogenannten replikativen Seneszenz über, d.h. einem permanentem Zellzyklusarrest folgend stellen sie ihre Teilungsaktivität komplett ein (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007).

Zelluläre Seneszenz ist eine physiologische Antwort auf eine Vielzahl von Stressformen wie Telomerverkürzung, DNA-Beschädigung, Oncogenaktivierung, ribosomalen Stress und Hypoxia (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007; Olovnikov, 1973) und wird außerdem als ein Tumorsuppressor-Mechanismus angesehen (Campisi, 2001; Sager, 1991).

Um das Wachstum von IMR-90 Zellen zu beobachten, wurden diese über einen Zeitraum von 50 Tagen hinweg kultiviert und regelmäßig passagiert. Zu Beginn teilten sich die Zellen sehr rasch, was durch einen steilen Anstieg an Populationsverdopplungen (*population doubling levels*, PDL) gekennzeichnet war (Abb. 12). Über den Verlauf der Zeit nahm die Geschwindigkeit der Zellteilungen immer weiter ab, bis mit PDL 41 ein annähernder Wachstumsarrest erreicht wurde (Abb. 12).

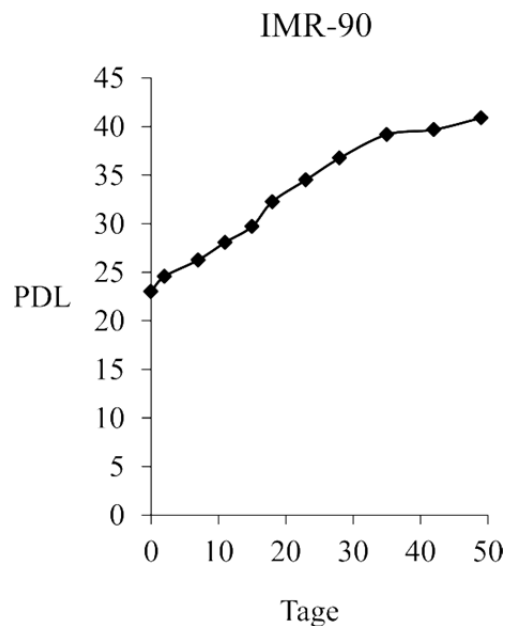


Abbildung 12: Wachstumskurve einer IMR-90 Fibroblastenkultur. Über einen Zeitraum von 50 Tagen wurde die Kultur regelmäßig passagiert und dabei die jeweilige Anzahl an Zellverdopplungen (*population doubling levels*, PDL) ermittelt. Nach einem annähernd exponentiell verlaufenden Anstieg an PDL, nahm die Teilungsaktivität der Zellen im Laufe der Zeit immer weiter ab.

Gealterte Fibroblastenkulturen wurden neben dem Proliferationsstopp auch anhand ihres seneszenten Phänotyps identifiziert. Während junge Zellen relativ einheitlich länglich und schmal erschienen, waren seneszente Fibroblasten polymorph, abgeflacht, und vor allem

durch einen vergrößerten Zellumfang und Zellkern gekennzeichnet. Sie erreichten außerdem eine geringere Zelldichte als junge Zellen (Abb. 13).

Der Seneszenzstatus einer IMR-90 Kultur wurde neben dem charakteristischen Phänotyp mit Hilfe der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidaseaktivität ermittelt, die in gealterten Zellen bei pH 6 verstärkt auftritt (Dimri *et al.*, 1995). Das Enzym katalysiert die Hydrolyse des Substrates X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) zu Galaktose und einem blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff. Seneszente Zellen ließen sich somit anhand einer Blaufärbung identifizieren (Abb. 13). Während in jungen Kulturen lediglich 2,55 % der Zellen gefärbt vorlagen, wiesen in gealterten Kulturen 82,74 % der Zellen eine deutliche Blaufärbung auf (Abb. 13).

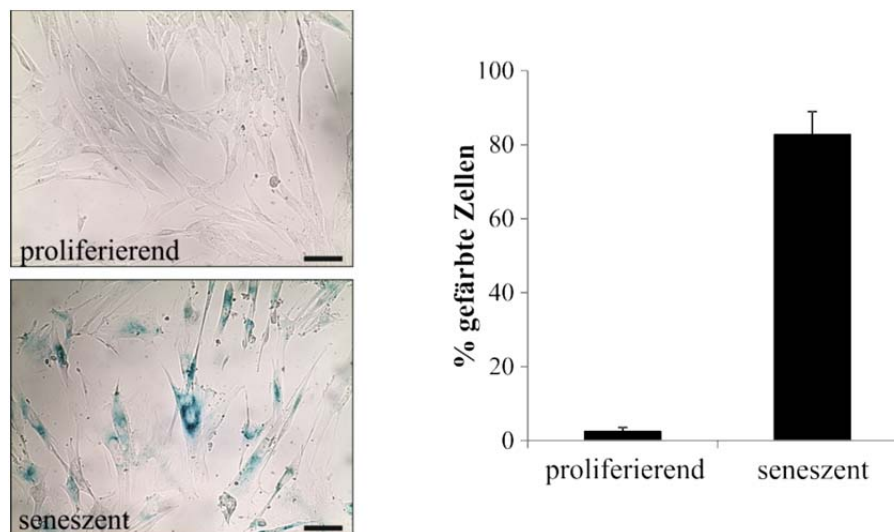


Abbildung 13: Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidaseaktivität. Der Seneszenzstatus von IMR-90 Kulturen wurde anhand der seneszenzabhängigen β -Galaktosidaseaktivität und einer damit einhergehenden Blaufärbung der Zellen ermittelt (links). Schwarzer Balken: 100 μ m. Insgesamt wurden 432 (proliferierend, PDL 20-30), bzw. 365 (seneszent, PDL 45-60) Zellen ausgezählt und der Anteil an blau gefärbten Zellen prozentual gegen die Gesamtzellzahl dargestellt \pm Standardabweichung (rechts).

Auch durch den proteinbiochemischen Nachweis einer altersassoziierten, erhöhten Expression bestimmter Markerproteine lässt sich replikative Seneszenz belegen. Caveoline (Caveolin 1-3) gelten als klassische Altersmarker, da sie in seneszenten Zellen vermehrt vorliegen. Bei Caveolinen handelt es sich um integrale Membranproteine, die Bestandteile von vesikulären Invaginationen der Plasmamembran (den Caveolae) sind, welche in gealterten Zellen gehäuft auftreten. Diese vesikulären Strukturen spielen gemeinsam mit den Caveolinen in der Regulation von Signaltransduktionskaskaden eine wichtige Rolle, wodurch eine Manifestation eines funktionellen Seneszenz-Phänotyps erst möglich wird (Park *et al.*, 2000).

Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb), einem Tumorsuppressor-Protein, für den Proliferationsstopp seneszenten Zellen relevant ist (Stein *et al.*, 1990). Dabei wird die Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) von CDK-Inhibitoren bewerkstelligt, zu denen p21^{CIP1} (p21) und p16^{INK4a} (p16) gehören (Serrano *et al.*, 1993). Beide wurden bereits mit der Regulation von replikativer Seneszenz in Verbindung gebracht (Alcorta *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass ein Wachstumsarrest in seneszenten Fibroblasten aus einem multifaktoriellen Prozess heraus resultiert, der erhöhte p21-Expression beim Übergang in die Seneszenz einschließt, gefolgt von einer anhaltenden p16-Induktion (Alcorta *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit konnten in einer proteinbiochemischen Analyse von proliferierenden und seneszenten IMR-90 Zellen erhöhte Caveolin 2- und p16-Proteinspiegel in gealterten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 14).

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass im IMR-90 Zellsystem die proteasomale Aktivität im Zuge der zellulären Alterung abnimmt, während die Autophagie hingegen zunimmt. Beide Prozesse werden von einer reziproken Regulation von zwei Schlüsselregulatoren der Proteinqualitätskontrolle begleitet, BAG1 und BAG3. BAG1 ist essentiell für einen effektiven proteasomalen Abbau und die BAG1-Expression ist in seneszenten IMR-90 Zellen sowie in neuronalen Geweben gealterter Mäuse reduziert. BAG3 spielt in der selektiven Autophagie eine wichtige Rolle und wird in gealterten Zellen und Mausgeweben verstärkt exprimiert (Gamerdinger *et al.*, 2009). Auch diese altersabhängige, reziproke Regulation von BAG1 und BAG3 konnte in dieser Arbeit im IMR-90 Zellmodell bestätigt werden (Abb. 14).

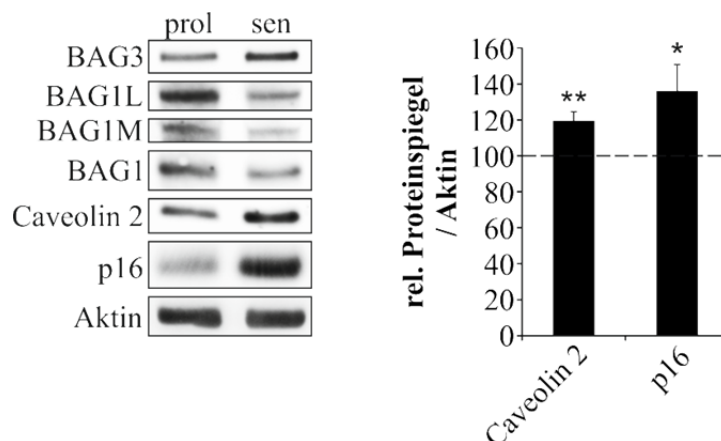


Abbildung 14: Seneszenz-assoziierte Veränderung der Proteinspiegel bestimmter Altersmarker. Proteinbiochemische Analyse von proliferierenden (prol) und seneszenten (sen) IMR-90 Zellen. Die angegebenen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert (links). Die Bandenintensitäten der Caveolin 2- und p16-Spiegel wurden quantifiziert und die Mittelwerte nach Aktinabgleich als prozentuale Veränderungen zu jungen Zellen, die gleich 100 % gesetzt wurden, graphisch dargestellt \pm Standardabweichung (rechts). *Student's t-test*, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $n = 3$ (BAG1 und BAG3 $n=1$).

3.3.2 BAG2 inhibiert die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP im IMR-90 Modell der zellulären Seneszenz

Um die Funktion von BAG2 in seneszenten IMR-90 Zellen zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen und Ubiquitinanalysen ähnlich wie in jungen Zellen durchgeführt (s. Abschnitt 3.1.3). Da das Ubiquitinsignal jedoch in gealterten Zellen generell sehr schwach war, wurde zur Verstärkung des Signals zusätzlich FLAG-HSP72 transfiziert, um so den Proteingehalt von HSP72 zu erhöhen. Außerdem erfolgte vor der Zellernte eine Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 (4 μ M) für 4 h, um eine Akkumulation polyubiquitinerter Proteine zu bewirken. In den vergleichenden Analysen wurde mit jungen Zellen entsprechend verfahren. Endogenes und überexprimiertes HSP72 wurden mit dem HSP72-Antikörper immunpräzipitiert und im Western Blot analysiert.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu jungen IMR-90 Zellen HSP72 in gealterten Fibroblasten in einem erheblich geringeren Ausmaß ubiquitiniert vorlag (Abb. 15, links). Im Gegensatz dazu waren jedoch CHIP-Proteinspiegel in dem für die Co-IP verwendeten Zellysate (Input) in seneszenten Zellen erhöht (Abb. 15, rechts). Dies ließ vermuten, dass trotz gesteigerter Proteinspiegel die CHIP-Aktivität in der zellulären Alterung abnimmt, zumindest in Bezug auf den HSP72-Komplex als Modell-CHIP-Substrat. Auf der anderen Seite waren BAG2-Proteinspiegel in gealterten Zellen im Input ebenfalls erhöht (Abb. 15). In der Literatur sind bereits Hinweise darauf zu finden, dass BAG2 die Bindung zwischen HSP72 und CHIP negativ beeinflusst (Dai *et al.*, 2005). Die gestiegenen BAG2-Spiegel könnten somit möglicherweise mit der verminderten CHIP-Aktivität und der reduzierten Ubiquitinierung von HSP72 in seneszenten Zellen im Zusammenhang stehen.

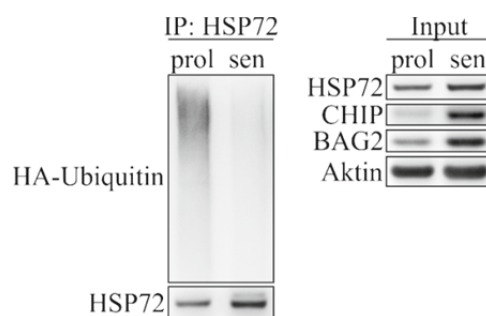


Abbildung 15: HSP72 liegt in seneszenten Fibroblasten weniger ubiquitiniert vor als in jungen Zellen. Mit proliferierenden (prol) und seneszenten (sen) Zellen wurden Coimmunpräzipitationsstudien durchgeführt, nachdem sie 48 h (prol), bzw. 72 h (sen) zuvor mit 20 μ g HA-Ubiquitin und 10 μ g FLAG-HSP72 transfiziert wurden. Vor der Zellernte erfolgte eine Behandlung mit MG132 (4 μ M) für 4 h. HSP72 wurde immunpräzipitiert und der Ubiquitinierungsstatus mit einem anti-HA-Antikörper im Western Blot detektiert (links). Das zur Immunpräzipitation (IP) verwendete Zellysate wurde ebenfalls bezüglich der relativen Proteinmengen analysiert (Input, rechts). Gezeigt sind repräsentative Blots aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Eine Überexpression von BAG2 in gealterten Zellen verringerte den Ubiquitinierungsstatus von HSP72 noch weiter (Abb. 16, links, Spur 2), was aufzeigt, dass BAG2 auch unter Alterungsbedingungen die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP direkt beeinflusst. Wie in jungen Fibroblasten, bewirkte eine Überexpression von CHIP eine Zunahme der Ubiquitinierung. Diese wurde durch gleichzeitige ektopische BAG2-Expression wieder kompensiert (Abb. 16, links, Spuren 3 und 4). Copräzipitiertes BAG2 und CHIP belegten außerdem, dass beide Cochaperone auch in seneszenten Fibroblasten mit HSP72 assoziiert sind. Es sei angemerkt, dass cosedimentiertes CHIP im Blot nur dann detektiert werden konnte, wenn es überexprimiert vorlag.

Zusammenfassend belegen die Daten, dass die Modulation der CHIP-Aktivität durch BAG2 auch in der zellulären Alterung stattfindet, vergleichbar mit den Beobachtungen in jungen Zellen.

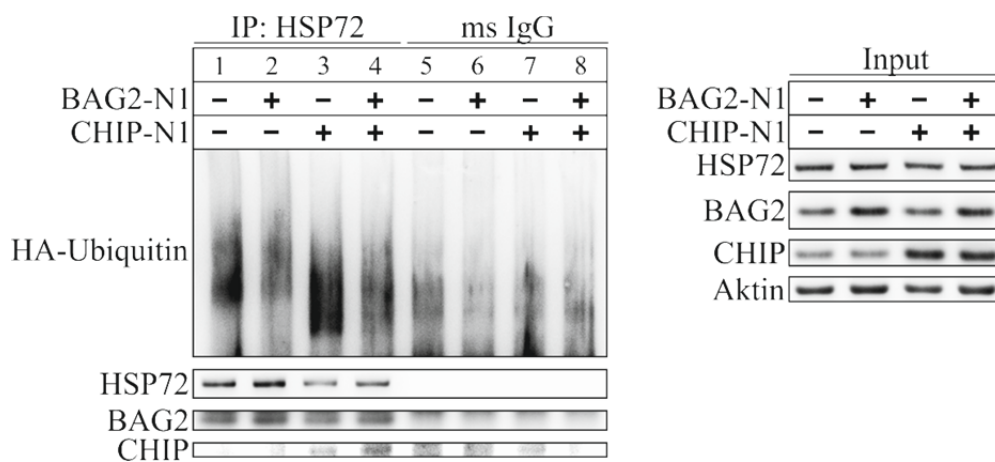


Abbildung 16: CHIP-Aktivität ist in seneszenten Zellen weiterhin durch BAG2 modulierbar. Seneszente IMR-90 Zellen wurden transient mit 30 µg HA-Ubiquitin, 30 µg FLAG-HSP72 und entweder 40-100 µg EGFP als Kontrolle, 60 µg BAG2, 40 µg CHIP oder BAG2 + CHIP transfiziert. Nach 72 h erfolgte eine vierstündige Behandlung mit MG132 (4 µM) und daraufhin eine Coimmunpräzipitation mit dem HSP72-Antikörper. Polyubiquitinierte und copräzipitierte Proteine wurden im Western Blot verifiziert (links). Als Negativkontrolle wurden aufgereinigte Maus (ms) IgGs verwendet. Die relativen Proteinmengen in dem für die IP verwendeten Ausgangsmaterial wurden mittels Western Blot ermittelt (Input, rechts). Die gezeigten, individuellen Blots repräsentieren beispielhaft das Ergebnis aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.3.3 Proteinspiegel des CHIP-Substrates und Seneszenzregulators p53 werden in gealterten IMR-90 Zellen BAG2-abhängig reguliert

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine CHIP-Defizienz in einem Mausmodell zu einem beschleunigten Seneszenz-Phänotyp führt (Min *et al.*, 2008) und dass verringerte CHIP-Proteinspiegel zelluläre Seneszenz induzieren (Sisoula und Gonos, 2011). Unter anderem könnte hierbei die Fähigkeit von CHIP eine wichtige Rolle spielen, die Aktivität des Seneszenzregulators p53 zu regulieren. p53 ist ein zentraler Faktor in der Zelle, der als Antwort auf multiple Stressoren verschiedene zelluläre Programme wie DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz in Gang setzt. CHIP wiederum ist in der Lage, p53 der proteasomalen Degradation zuzuführen, so dass die Menge an p53 in jungen Zellen unter physiologischen Bedingungen niedrig gehalten wird (Esser *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2007). Aufgrund der Fähigkeit von BAG2, die CHIP-Aktivität zu beeinflussen, stellte sich die Frage, ob BAG2 ebenso einen Einfluss auf p53-Proteinspiegel ausübt. Hierbei interessierten besonders seneszente Zellen, da gezeigt wurde, dass die CHIP-vermittelte p53-Regulation vor allem in diesen eine wichtige Rolle spielt (Sisoula *et al.*, 2011). Außerdem wurden in gealterten Fibroblasten erhöhte BAG2-Spiegel beobachtet (Abb. 15). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen BAG2 und p53 aufzudecken, wurde BAG2 zunächst in proliferierenden IMR-90 Zellen überexprimiert, um den Proteingehalt ähnlich wie in gealterten Zellen anzuheben. Seneszente Fibroblasten hingegen wurden mit einer BAG2-siRNA behandelt. Die Auswirkungen auf die p53-Proteinspiegel wurden jeweils in einer Western Blot-Analyse untersucht. In jungen Zellen bewirkte eine BAG2-Überexpression keine Veränderung im p53-Proteingehalt (Abb. 17A, oben). Verringerte BAG2-Spiegel in gealterten Zellkulturen führten jedoch zu signifikant erniedrigten p53-Proteinspiegeln (- 25 %, Abb. 17A, unten).

Inwieweit sich BAG2 auf die p53-mRNA-Expression auswirkte, wurde in jungen Fibroblasten vor dem Hintergrund von erhöhten sowie von reduzierten BAG2-Spiegeln mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR analysiert. In beiden Fällen stieg die p53-mRNA-Expression tendenziell an (Abb. 17B). Da dies jedoch nicht durch eine statistische Signifikanz belegt werden konnte und da das p53-Expressionsmuster nach BAG2-siRNA-Behandlung nicht mit den proteinbiochemischen Daten übereinstimmte, wurde davon ausgegangen, dass sich die leicht erhöhten mRNA-Spiegel nicht auf die Beobachtungen auf Proteinebene auswirkten und dass BAG2 die p53-Genexpression nicht beeinflusste. Die Daten demonstrieren somit, dass sich BAG2 vor allem in seneszenten Zellen auf den p53-

Proteingehalt auswirkt und damit möglicherweise an der Regulation von replikativer Seneszenz beteiligt ist.

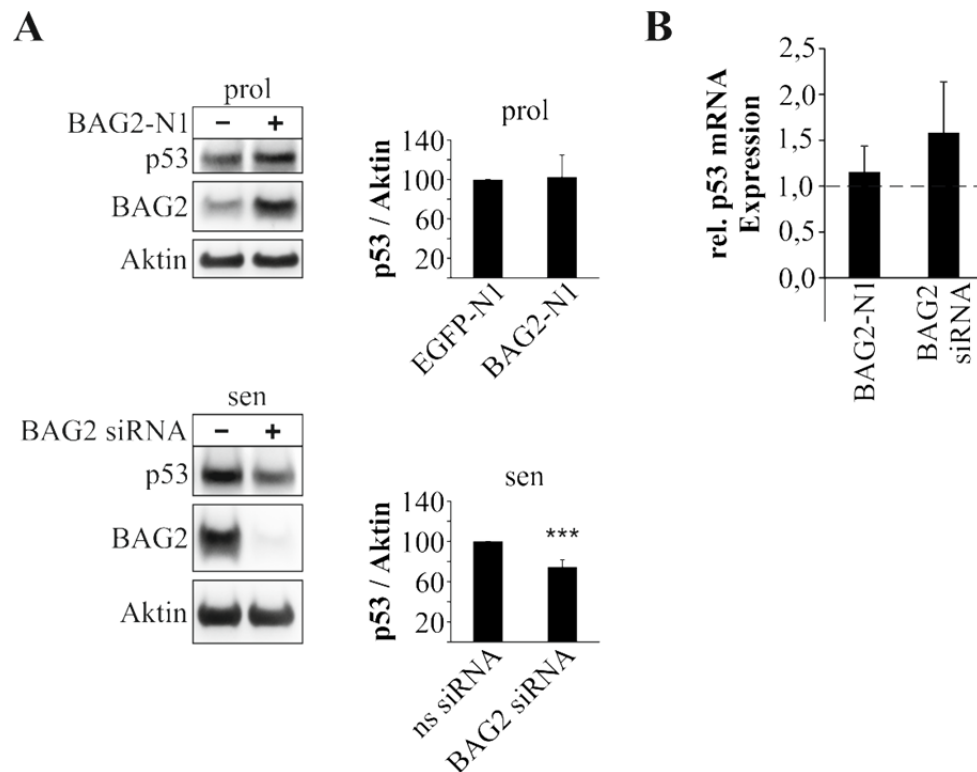


Abbildung 17: Erniedrigte BAG2-Proteinspiegel reduzieren den p53-Proteingehalt in seneszenten Fibroblasten. (A) Proliferierende (prol) und seneszente (sen) IMR-90 Zellen wurden transient mit 40 μg BAG2 oder EGFP als Kontrolle, bzw. mit 20 μg BAG2 siRNA oder einer *nonsense* siRNA transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Zellernte und eine proteinbiochemische Analyse im Western Blot (links). Die angegebenen Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert und die Bandenintensitäten densitometrisch quantifiziert. In den Graphen wurden die Mittelwerte als prozentuale Veränderungen zur EGFP-, bzw. *nonsense*-Kontrolle dargestellt \pm Standardabweichung (rechts). Mit Aktin wurde eine gleichmäßige Beladung geprüft. *Student's t-test*, *** $p < 0,001$, $n = 4$ (prol), $n = 5$ (sen). (B) 48 h nach einer BAG2-Überexpression, bzw. einer Transfektion mit einer BAG2 siRNA, wurde in jungen IMR-90 Zellen eine quantitative Echtzeit-PCR-Analyse von p53-mRNA-Spiegeln durchgeführt. Als Referenzgen diente die RNA POL II. Dargestellt wurden Mittelwerte als relative Veränderungen der p53-mRNA-Expression zur EGFP- und zur *nonsense*-Kontrolle, welche jeweils gleich Eins gesetzt wurden \pm Standardabweichung, $n = 3$.

3.3.4 Alterung ist mit erhöhten BAG2- und verringerten HSPBP1-Proteinspiegeln *in vitro* und *in vivo* assoziiert

Da bereits für andere BAG-Proteine wie BAG1 und BAG3 eine altersabhängige Regulation im Zusammenhang mit einer abnehmenden proteasomalen Aktivität, bzw. mit einer gesteigerten Autophagie gezeigt wurde (Gamerding *et al.*, 2009), erschien es wichtig, die erhöhten Proteinspiegel von BAG2 in seneszenten Zellen genauer zu betrachten. Junge und

gealterte IMR-90 Zellen wurden dazu proteinbiochemisch analysiert. Interessanterweise konnten neben erhöhten BAG2-Proteinspiegeln in seneszenten Zellen erniedrigte Mengen von HSPBP1 detektiert werden, einem weiteren Cochaperon, welches die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP inhibiert (Abb. 18). Der Proteingehalt von CHIP war ebenfalls in der zellulären Alterung erhöht, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Sisoula *et al.*, 2011). HSP72 Proteinspiegel hingegen blieben weitestgehend unverändert (Abb. 18).

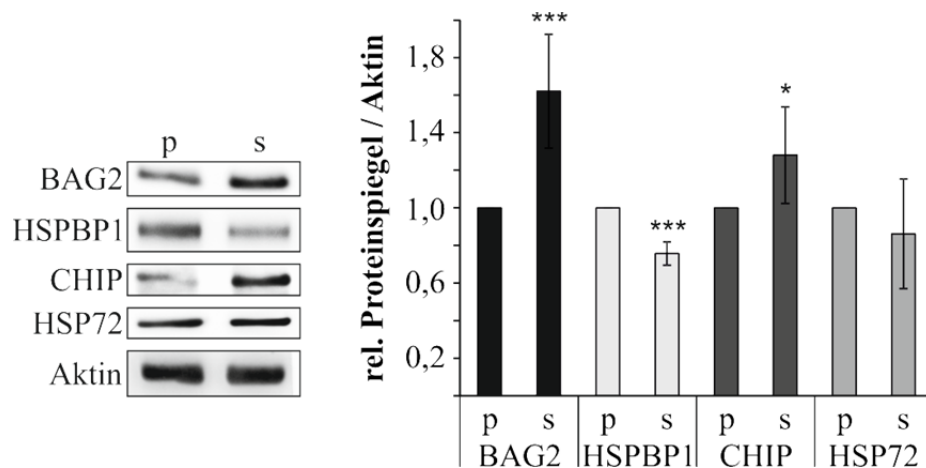


Abbildung 18: Im zellulären Alterungsmodell sind die Proteinspiegel von CHIP und BAG2 erhöht und von HSPBP1 reduziert. Proliferierende (p) und senescente (s) IMR-90 Zellen wurden mittels Western Blot analysiert und die angegebenen Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert (links). Um eventuelle Beladungsunterschiede auszugleichen, wurde gegen Aktin normalisiert. Die Mittelwerte der densitometrisch ausgewerteten Signalintensitäten wurden als relative Veränderungen zur Proteinexpression in jungen Zellen graphisch dargestellt \pm Standardabweichung (rechts), *Student's t-test*, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, $n = 7$ (BAG2, CHIP, HSP72), $n = 4$ (HSPBP1).

Um diese altersabhängige Regulation von BAG2, HSPBP1 und CHIP weiter zu untersuchen, wurden junge IMR-90 Zellen einem wiederholten, durch Wasserstoffperoxid ausgelösten, oxidativen Stress ausgesetzt, um eine vorzeitige Seneszenz zu induzieren. Auch in diesem etablierten Paradigma der stressinduzierten, vorzeitigen Seneszenz (Lim *et al.*, 2008; Toussaint *et al.*, 2000) konnten erhöhte BAG2- und CHIP- sowie reduzierte HSPBP1-Proteinspiegel nachgewiesen werden (Abb. 19).

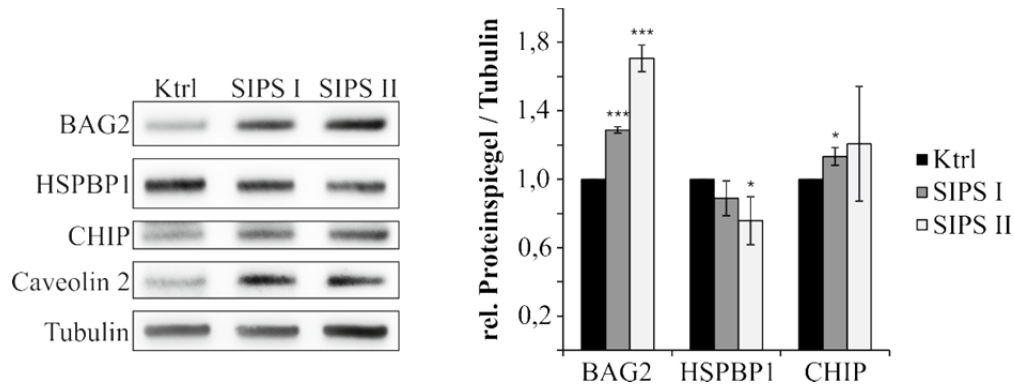


Abbildung 19: Im Modell der induzierten Seneszenz sind die Proteinspiegel von CHIP und BAG2 erhöht, von HSPBP1 reduziert. Expressionsanalyse der angegebenen Proteine in jungen IMR-90 Zellen, die wiederholt mit 200 μM (SIPS I) und 500 μM (SIPS II) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt wurden, um eine vorzeitige Seneszenz zu induzieren (*Stress-induced premature senescence*, SIPS). Erhöhte Caveolin 2-Proteinspiegel bestätigten den Seneszenzstatus der Kultur. Tubulin diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Probenbeladung (links). Graphisch dargestellt wurden die Mittelwerte der densitometrisch ausgewerteten Signalintensitäten als relative Veränderungen zur Negativkontrolle \pm Standardabweichung (rechts), *Student's t-test*, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, $n = 3$.

Da ein irreversibler Zellzyklusarrest ein typisches Merkmal von replikativer Seneszenz darstellt (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007), wurde analysiert, inwiefern bereits ein reversibler Zellzyklusarrest eine veränderte Proteinexpression von BAG2, CHIP und HSPBP1 bewirken kann. Dazu wurden subkonfluente und konfluente Zellkulturen proteinbiochemisch miteinander verglichen. Letztere stellen beim Erreichen einer gewissen Zelldichte ihre Teilungsaktivität reversibel ein (Abercrombie und Heaysman, 1954; Hayflick und Moorhead, 1961). In konfluent gewachsenen Zellen konnten deutlich erhöhte Mengen an BAG2 nachgewiesen werden, wohingegen HSPBP1 und CHIP nicht verändert vorlagen (Abb. 20). Die Daten zeigen, dass BAG2 im Gegensatz zu CHIP und HSPBP1 zellzyklusabhängig reguliert wird.

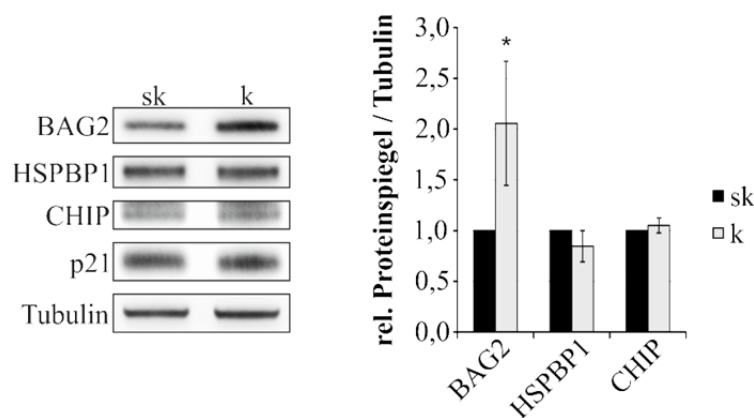


Abbildung 20: BAG2-Proteinspiegel werden zellzyklusabhängig reguliert. Vergleichende Western Blot-Analyse mit Proteinextrakten aus subkonfluenten (sk) und konfluenten (k) IMR-90 Zellkulturen. Induzierte p21-Spiegel bestätigten den Zellzyklusarrest (links). Die quantifizierten Bandenintensitäten wurden gegen Tubulin normalisiert und die Mittelwerte graphisch als relative Veränderungen zu subkonfluenten Zellen \pm Standardabweichung dargestellt (rechts), *Student's t-test*, * $p < 0,05$, $n = 3$.

Um die Untersuchungen auf zellulärer Ebene auch in aussagekräftigen *in vivo*-Modellen fortzuführen, wurden verschiedene Gewebe aus jungen (4-4,5 Monate alt) und alten Mäusen (21-27 Monate alt) mittels Western Blot analysiert. Eine gestörte Proteinqualitätskontrolle, die eine Akkumulation aberranter Proteinaggregate zur Folge hat, spielt insbesondere bei altersassoziierten, neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer- und der Parkinson- sowie der Huntington-Krankheit eine wichtige Rolle (Pankiv *et al.*, 2007). Daher lag der Fokus der *in vivo*-Studie vor allem auf neuronalen Geweben wie dem Hippocampus, dem Cortex und dem Cerebellum. Als nicht-neuronales Vergleichsgewebe wurde außerdem Lungengewebe untersucht. In letzterem konnte eine altersabhängige reziproke Regulation von BAG2 und HSPBP1 nachgewiesen werden. Die Proteinspiegel von BAG2 und CHIP waren erhöht (BAG2: + 37 %, CHIP: + 23 %), wohingegen der HSPBP1-Proteingehalt reduziert vorlag (- 33 %, Abb. 21A).

In den neuronalen Geweben zeigte sich hingegen eine variable Proteinexpression. Im Hippocampus gealterter Mäuse lagen die BAG2-Proteinspiegel verglichen mit jungen Mäusen zwar deutlich erhöht vor (+ 49 %), jedoch stiegen, bzw. sanken die CHIP- und HSPBP1-Proteinmengen jeweils nur tendenziell (Abb. 21B). Im gealterten Maus-Cortex wiederum waren die Proteinspiegel von HSPBP1 signifikant verringert und die von CHIP sichtbar gestiegen (HSPBP1: - 9 %, CHIP: + 19 %). Erhöhte BAG2-Spiegel konnten in diesem Gewebe nicht durch eine statistische Signifikanz belegt werden und waren lediglich im Trend zu erkennen (Abb. 21C). Im Cerebellum gealterter Mäuse zeigte sich, dass die BAG2-Proteinmenge im Vergleich zu jungen Mäusen deutlich verringert war (- 26 %), während die von CHIP unverändert blieb. HSPBP1-Proteinspiegel waren tendenziell reduziert (Abb. 21D).

Zusammenfassend konnte eine starke Gewebsspezifität bezüglich der Regulation der Cochaperone BAG2, HSPBP1 und CHIP festgestellt werden. Die Daten aus dem Lungengewebe der Mäuse bestätigten die Ergebnisse aus der Zellkultur, wohingegen die neuronalen Gewebe ein differenzielles Proteinexpressionsmuster aufwiesen. Insbesondere im Hippocampus und im Cortex gealterter Mäuse waren jedoch im Vergleich zu jungen Tieren teilweise erhöhte CHIP- und BAG2- sowie verringerte HSPBP1-Proteinspiegel tendenziell zu erkennen. Die in der zellulären Alterung beobachtete Proteinregulation von CHIP und die reziproke Regulation von BAG2- und HSPBP1-Proteinspiegeln konnten somit in einem *in vivo*-Modell bestätigt werden.

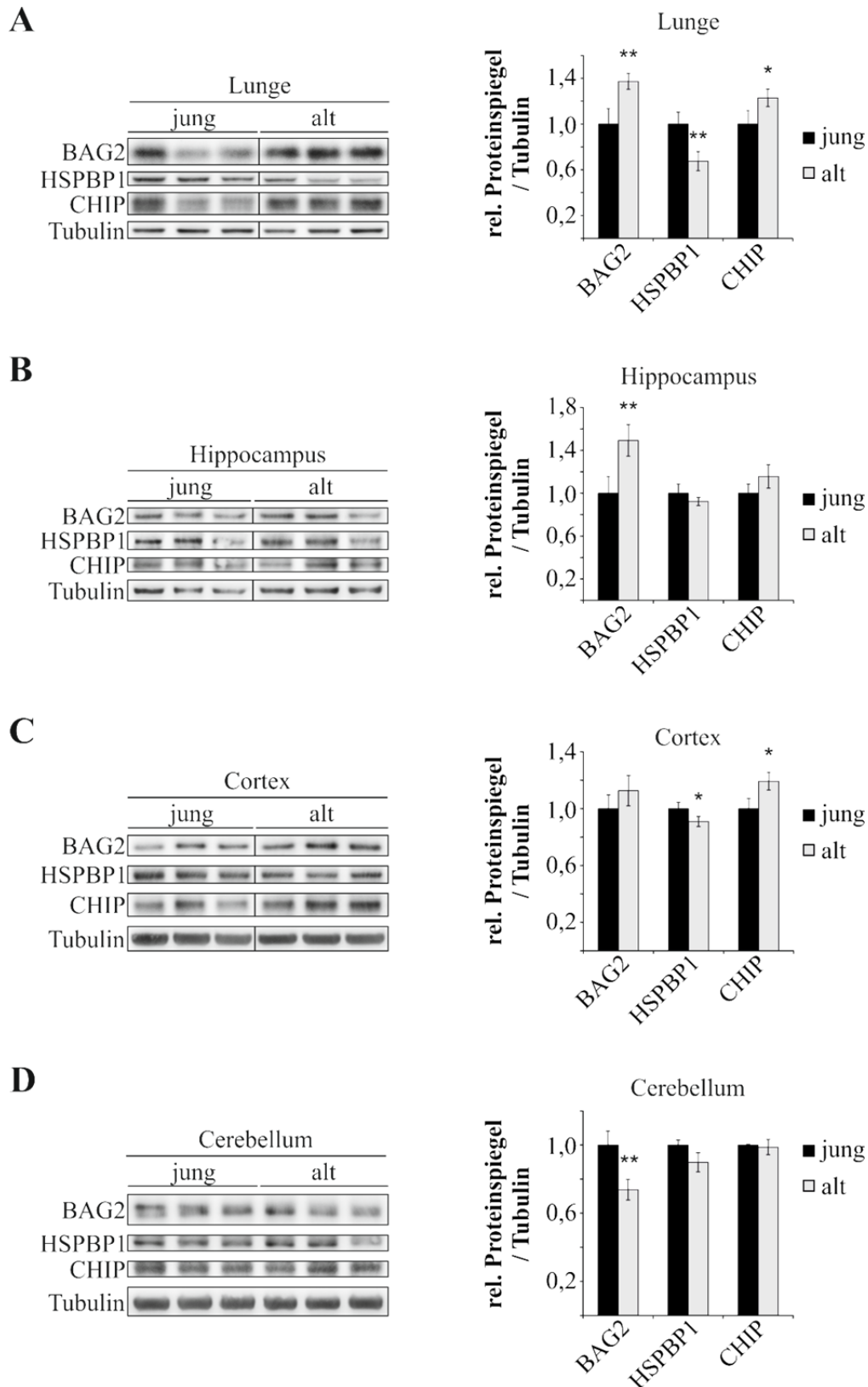


Abbildung 21: Regulation der Cochaperone BAG2, HSPBP1 und CHIP *in vivo*. Proteinextrakte aus Lungengewebe (A), aus dem Hippocampus (B), dem Cortex (C) und dem Cerebellum (D) von jungen (4-4,5 Monate) und alten (21-27 Monate) Mäusen wurden mittels Western Blot untersucht (links). Als Ladekontrolle diente Tubulin. Herausgeschnittene Banden sind durch schwarze Striche gekennzeichnet. Graphisch dargestellt wurden die Mittelwerte der quantifizierten Signalstärken als relative Veränderungen zu jungen Mäusen \pm S.E.M. (rechts), *Student's t-test*, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 4-6$.

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob es sich bei der reziproken Regulation der beiden CHIP-Modulatoren BAG2 und HSPBP1 um eine generelle Stressantwort handelt. Dazu wurden IMR-90 Zellen einem akuten oxidativen Stress ausgesetzt, induziert durch sublethale Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE). Als Reaktion auf diese Behandlungen kam es in den Zellen zu einer Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen, welche in diesem Versuch als Stressindikatoren dienten (Abb. 22). Die BAG2- und HSPBP1-Proteinexpression blieb in den Paradigmen des akuten Stresses unverändert (Abb. 22). Daraus konnte geschlossen werden, dass die reziproke Regulation der beiden Cochaperone, wie sie in seneszenten Zellen, in induziert seneszenten Fibroblasten und teilweise in gealterten Mausgeweben beobachtet wurde, sehr wahrscheinlich einen alterungsspezifischen Effekt darstellt.

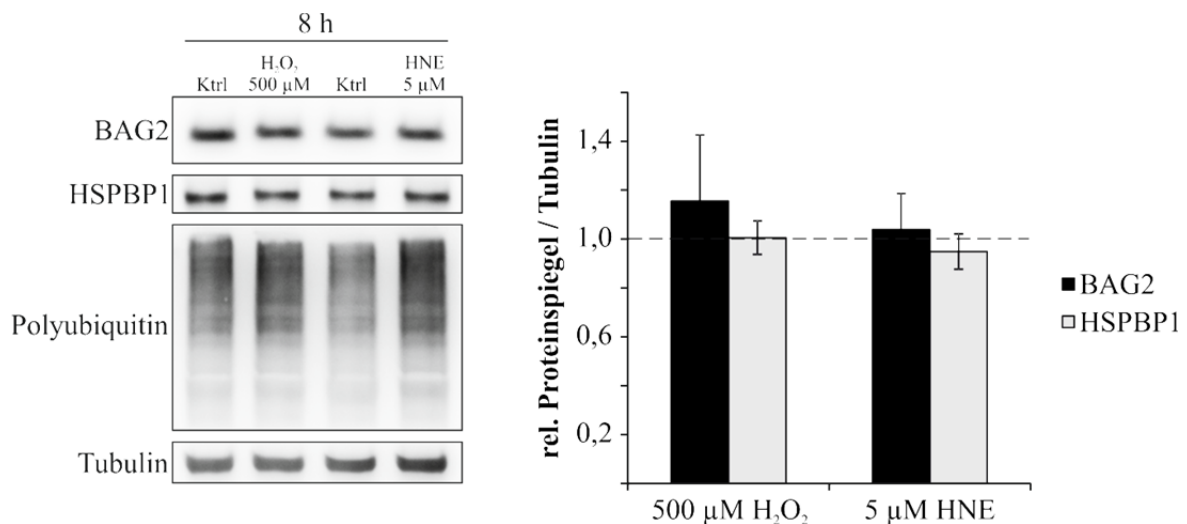


Abbildung 22: In Kurzzeitparadigmen des oxidativen Stresses bleiben BAG2- und HSPBP1-Proteinspiegel unverändert. IMR-90 Zellen wurden mit den angegebenen Substanzen für 8 h behandelt und im Western Blot analysiert. Eine Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen diente als Indikator für den oxidativen Stress in der Zelle. Eine gleichmäßige Probenbeladung wurde mit Tubulin überprüft (links). BAG2- und HSPBP1-Proteinspiegel wurden densitometrisch quantifiziert und die Mittelwerte als relative Veränderungen zur jeweiligen Negativkontrolle (gleich Eins gesetzt) graphisch dargestellt \pm Standardabweichung (rechts), $n = 3$ (Wasserstoffperoxid, H_2O_2), $n = 5$ (4-Hydroxy-2-Nonenal, HNE).

Um diese Schlussfolgerung weiter zu untermauern wurde untersucht, ob BAG2 und HSPBP1 einander kompensatorisch regulieren. Dazu wurden HSPBP1-Proteinspiegel vor dem Hintergrund modulierter BAG2-Mengen in jungen IMR-90 Zellen proteinbiochemisch analysiert und umgekehrt. Interessanterweise blieben die HSPBP1-Spiegel nach einer BAG2-Überexpression und nach der Transfektion mit einer BAG2-siRNA unverändert (Abb. 23A). Eine ektopische HSPBP1-Expression veränderte die BAG2-Proteinspiegel ebenfalls nicht.

Eine Behandlung mit einer HSPBP1-siRNA bewirkte auch eine Reduktion der BAG2-Proteinmenge (Abb. 23B). Auf diese Weise konnte demonstriert werden, dass es sich bei der reziproken Regulation der beiden CHIP-Modulatoren nicht um einen rein kompensatorischen Mechanismus handelt, sondern um einen spezifischen Effekt der zellulären Alterung.

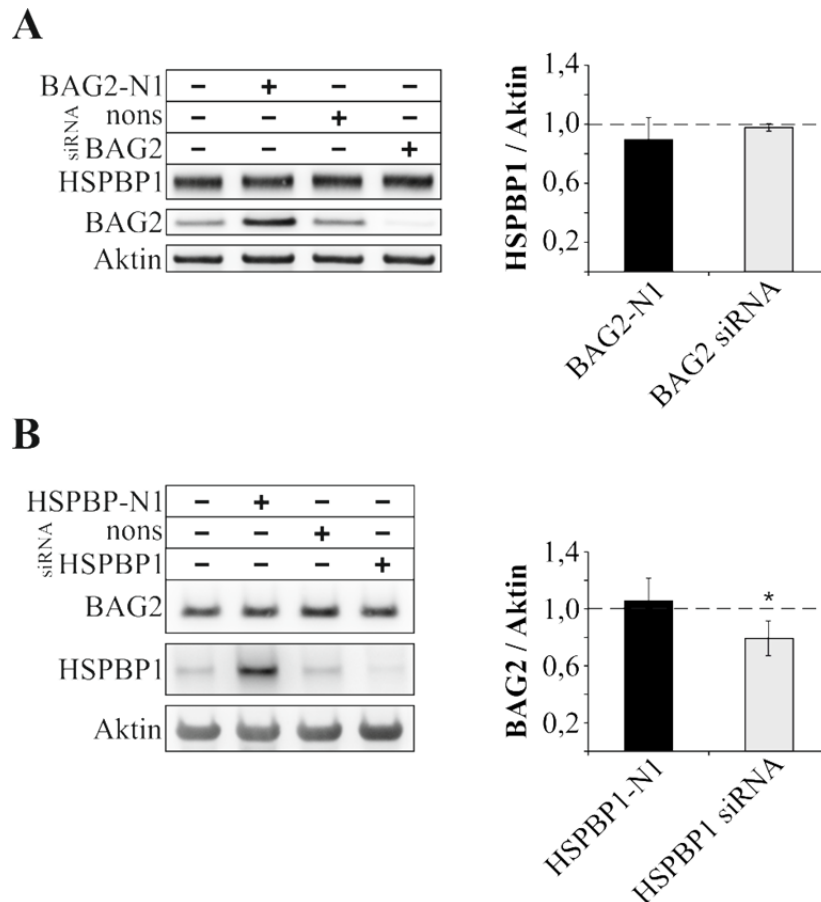


Abbildung 23: Keine kompensatorische Regulation von BAG2 und HSPBP1. IMR-90 Zellen wurden transient mit entweder 20-40 µg EGFP, 40 µg BAG2 (A), 20 µg HSPBP1 (B), 20 µg *nonsense* siRNA oder einer spezifischen siRNA gegen BAG2 (A) und HSPBP1 (B) transfiziert. Die Proteingehalte der genannten Cochaperone wurden im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper visualisiert. Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung herangezogen (links). Die Mittelwerte quantifizierter Bandenstärken wurden graphisch als prozentuale Veränderungen zur EGFP-, bzw. *nonsense* siRNA-Kontrolle dargestellt, welche gleich Eins gesetzt wurde \pm Standardabweichung (rechts), *Student's t-test*, * $p < 0,05$, $n = 4$ (A), $n = 3$ (B).

4. DISKUSSION

Das Zusammenspiel von molekularen Chaperonen und ihren Cochaperonen ist zentraler Bestandteil der Proteinqualitätskontrolle in der Zelle. Eine veränderte Proteostase ist ein Merkmal des Alterungsprozesses selbst sowie vieler altersassoziierter Pathologien. Daher wird intensiv daran geforscht, die regulatorischen Mechanismen besser zu verstehen und, davon ausgehend, mögliche therapeutische Strategien zu entwickeln. In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit die Regulation der Ubiquitinligase CHIP näher charakterisiert werden, die als wichtiger Faktor in Proteintriage-Entscheidungsprozessen angesehen wird. Das Cochaperon BAG2 konnte erstmals im zellulären System als ein wichtiger Modulator von HSP70/CHIP-Komplexen durch die Hemmung der Ubiquitinligaseaktivität von CHIP identifiziert werden. Es zeigte sich, dass BAG2 an der Regulation der CHIP-Substrate HSP72 und p53 beteiligt ist, ohne dabei deren Expression zu beeinflussen. Zudem erwies sich die Modulation der CHIP-Aktivität durch BAG2 im Zuge der replikativen Seneszenz als konstitutiv und die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP ließ im Vergleich zu jungen Zellen nach. Neben erhöhten BAG2-Proteinspiegeln in seneszenten Fibroblasten zeigte sich eine altersassozierte, reziproke Regulation des funktionell redundanten Cochaperons HSPBP1. CHIP-Aktivität und -Modulation unterliegen demnach einem alterungsspezifischen Anpassungsprozess, der für die Aufrechterhaltung der proteostatischen Kontrolle in gealterten Zellen relevant sein könnte. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen im Folgenden ausführlicher diskutiert werden.

4.1 BAG2 als Inhibitor der Ubiquitinligaseaktivität von CHIP im zellulären System

In vorangegangenen Studien wurde das Cochaperon BAG2 bereits als Inhibitor der Ubiquitinligase CHIP identifiziert. Der Mechanismus, mit dem BAG2 dies bewerkstelligt, wurde bisher ausschließlich biochemisch und zellfrei mit rekombinanten Proteinen gezeigt (Arndt *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte die Inhibition der Ubiquitinligaseaktivität von CHIP durch BAG2 erstmals erfolgreich in einem zellulären System bestätigt werden. Dies geschah mittels Coimmunpräzipitations- und Ubiquitinanalysen mit dem Modell-CHIP-Substrat HSP72. Dieses wird, in einer hierarchischen

Reihenfolge der Beseitigung fehlgefalteter Proteine folgend, von CHIP ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt (Qian *et al.*, 2006).

Im humanen IMR-90 Fibroblastenmodell bewirkte eine Überexpression von wildtypischem CHIP, nicht aber der Punktmutanten CHIP-D253N/R254G ohne Ligaseaktivität, eine erhebliche Zunahme an ubiquitiniertem HSP72. Dieser Effekt wurde deutlich durch ektopische Coexpression von BAG2 unterdrückt. Im Einklang mit den Erkenntnissen aus der Literatur konnte BAG2 somit als potenter CHIP-Regulator in Zellen identifiziert werden. Damit ist BAG2 ein wichtiger Bestandteil der Proteinqualitätskontrolle, der den HSP72/HSC70/CHIP-Komplex in einen faltungsaktiven Status konvertiert (Dai *et al.*, 2005). BAG2 fördert zum einen als NEF den Nukleotidaustausch von HSP72/HSC70. Zum anderen verhindert es die CHIP-vermittelte Ubiquitinierung und damit den Abbau von Substratproteinen. Unabhängig von der inhibierten Ubiquitinierungsaktivität, ist CHIP im Komplex mit HSP72/HSC70 und BAG2 durch die Aktivierung von HSF1 weiterhin an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt. Dies ist unter Stressbedingungen notwendig, um eine effektive Induktion der HSP72-Expression zu bewirken und damit die Menge an denaturierten Polypeptiden abzufuffern (Qian *et al.*, 2006).

BAG2 inhibiert die Ubiquitinierung von Substraten, indem es die Kooperation zwischen CHIP und dem Ubiquitin-konjugierenden E2 Enzym UbcH5b verhindert. Wie genau BAG2 dies bewerkstelligt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite konnte eine kompetitive Bindung von BAG2 und UbcH5b an die U-Box von CHIP gezeigt werden (Dai *et al.*, 2005). Auf der anderen Seite konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen BAG2 und CHIP festgestellt werden und die inhibierte CHIP-UbcH5b-Assoziation wurde als die Folge einer Konformationsänderung des Chaperon/Cochaperon-Komplexes angesehen, welche durch die Bindung von BAG2 ausgelöst wurde (Arndt *et al.*, 2005). Auch die Frage, inwieweit BAG2 die Bindung zwischen dem Chaperonkomplex und CHIP negativ oder positiv beeinflusst, ist bislang noch nicht geklärt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die CHIP-HSP70-Assoziation durch BAG2 ATP-abhängig gestört wurde (Dai *et al.*, 2005). Zum anderen konnte eine BAG2-vermittelte, verstärkte Interaktion zwischen HSC70 und CHIP beobachtet werden (Arndt *et al.*, 2005). Ob und in welcher Form BAG2 die Bindung von CHIP an den Chaperonkomplex beeinflusst, gilt es in weiterführenden Coimmunpräzipitationsstudien zu analysieren.

Die Bestätigung der Funktion von BAG2 in einem zellulären System untermauert, dass es sich bei BAG2 um einen zellphysiologisch wichtigen Pro-Faltungsfaktor in der Chaperonmaschinerie handelt. In vorangegangenen Studien konnte dies anhand der durch

BAG2 stimulierten Reifung zytoplasmatischer Domänen von großen, sich langsam faltenden Membranproteinen wie dem *cystic fibrosis conductance regulator* (CFTR) demonstriert werden. Bei diesem handelt es sich um einen Chlorid-Ionenkanal in der Plasmamembran von Epithelzellen, dessen Faltung relativ ineffizient verläuft und dessen unreife Intermediate CHIP-vermittelt abgebaut werden (Meacham *et al.*, 2001). Weiterhin kann BAG2 aufgrund seiner intrinsischen Chaperonaktivität Substrate direkt binden, stabilisieren, und deren Aggregation verhindern. Dies konnte z.B. mit Hilfe der Mutation $\Delta F508$ im CFTR-Gen demonstriert werden, welche Zystische Fibrose auslöst. Die Mutation bewirkt die Fehlfaltung einer Zytoplasma-exponierten Nukleotidbindedomäne (NBD1) des Membranproteins. Es konnte gezeigt werden, dass BAG2 die Aggregation von NBD1 effektiv verringert (Arndt *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008b). Weiterhin wurde in einem funktionellen Rückfaltungsversuch mit hitzedenaturierter Glühwürmchen-Luziferase als Chaperonsubstrat gezeigt, dass BAG2 in den Reaktionsansätzen die Luziferaseaktivität steigerte und somit die Rückfaltung des Proteins begünstigte (Arndt *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008b).

Auch in HEK-293T Zellen wurde die Inhibition von CHIP durch BAG2 anhand des CHIP-Substrates FLAG-HSP72 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Ubiquitinierung von FLAG-HSP72 durch eine BAG2-Überexpression nicht beeinflusst wurde, bzw. dass sie im Trend abnahm. Eine Erklärung hierfür wäre eine möglicherweise abgeschwächte Funktion von BAG2 in HEK-293T Zellen, beispielsweise hervorgerufen durch posttranslationale Modifikationen. Die Funktion von Proteinen kann in diversen Zellsystemen aufgrund von Expressionsunterschieden und/oder posttranslationalen Modifikationen variieren. Es konnte z.B. bereits gezeigt werden, dass rekombinante Proteine in verschiedenen, häufig verwendeten Säuger-Expressionssystemen unterschiedliche Glykosylierungsmuster aufwiesen, welche unter anderem die Proteinaktivität beeinflussen können (Croset *et al.*, 2012). Inwieweit BAG2 posttranslational modifiziert wird wurde bislang noch nicht untersucht und sollte in zukünftigen Studien aufgeklärt werden. Des Weiteren haben HEK-293T Zellen durch Transformation künstlich den Charakter von Krebszellen erworben (Shein und Enders, 1962; Zur Hausen, 1967), während es sich bei IMR-90 Zellen um primäre Fibroblasten handelt. In dieser Arbeit wurde daher davon ausgegangen, dass sich das IMR-90 Zellmodell besser zur Studie der BAG2-Funktion unter physiologischen Bedingungen eignet als die immortalisierte Zelllinie.

4.1.1 BAG2 als HSP72-Regulator

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Cochaperon BAG2 einen neuen zellulären Faktor darstellt, welcher den Gehalt an induzierbarem HSP70 moduliert, ohne dabei selbst eine Hitzeschockantwort zu induzieren. Ohne die Applikation eines proteotoxischen Stresses beeinflusste BAG2 die Proteinspiegel des Beispiel-CHIP-Substrates HSP72, wobei die HSP72-mRNA-Expression weitestgehend unbeeinflusst blieb. Mit BAG2 bietet sich der Zelle somit eine Möglichkeit, die Verfügbarkeit von HSP72 unabhängig von HSF1 zu regulieren. Dies könnte insbesondere in der replikativen Seneszenz eine wichtige Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass in seneszenten Fibroblasten die Aktivierung von HSF1 gestört ist (Choi *et al.*, 1990; Heydari *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden erhöhte CHIP- und BAG2-Proteinspiegel in gealterten Zellen nachgewiesen. Dies könnte möglicherweise dazu dienen, der aberranten Regulation von HSF1 bis zu einem gewissen Grad entgegenzuwirken. CHIP wird für eine effektive Aktivierung des Transkriptionsfaktors benötigt, während BAG2 die Ubiquitinligaseaktivität inhibiert und den Abbau von HSP72 verhindert. Der Gehalt an HSP72 und damit die Faltungskapazität des Chaperons kann so in der Zelle stabilisiert werden. Übereinstimmend mit dieser Annahme wurden in dieser Arbeit keine Veränderungen der HSP72-Proteinspiegel in jungen und in gealterten Zellen beobachtet, bzw. konnte eine leichte Abnahme der HSP72-Spiegel in seneszenten Zellen lediglich im Trend erkannt werden.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass in den Ubiquitinierungs-Analysen nicht nachgewiesen werden konnte, dass BAG2 die Spiegel an nicht-ubiquitiniertem HSP72 beeinflusst. Eine BAG2-Überexpression bewirkte keinen Anstieg an HSP72, obgleich einer deutlich inhibierten Ubiquitinierung durch CHIP. Ein Grund für diese Beobachtung könnte sein, dass für diese Experimente die NP40-lösliche Fraktion des Zelllysats eingesetzt wurde. Somit wurde nicht die Gesamtheit an HSP72 in der Zelle erfasst, wodurch geringe Unterschiede im Proteingehalt möglicherweise nicht detektiert werden konnten. In den Experimenten, die den Einfluss von BAG2 auf die HSP72-Proteinspiegel eindeutig belegen, wurde hingegen mit einem SDS-löslichen Komplettlysat gearbeitet. Die Veränderungen im HSP72-Gehalt nach einer Modulation von BAG2 waren hier statistisch signifikant.

4.1.2 Der Einfluss von BAG2 auf den Verlauf einer Hitzeschockantwort und auf das Zellüberleben im chronischen Hitzestress

Um eine funktionelle Konsequenz aus der Regulation intrazellulärer HSP72-Proteinspiegel durch BAG2 aufzuzeigen, wurde der Einfluss des Cochaperons auf den Verlauf einer Hitzeschockantwort untersucht. CHIP wird sowohl für eine adäquate Induktion der HSP72-Expression unter Stressbedingungen benötigt, als auch für die Beseitigung von überschüssigem HSP72 in der Erholungsphase nach Stress, wenn keine Chaperonsubstrate mehr vorliegen (Qian *et al.*, 2006). BAG2 hat auf die HSF1-aktivierende Wirkung von CHIP keinen Einfluss (Dai *et al.*, 2005). Jedoch stellte sich die Frage, ob BAG2 durch die Inhibierung der Ubiquitinligaseaktivität von CHIP die stressbedingt induzierten HSP72-Proteinspiegel in der Stress-Erholungsphase auf erhöhtem Niveau halten kann. Ähnliches wurde bereits mit der ektopisch exprimierten, dominant-negativen U-Box-Mutanten CHIP-H260Q ohne Ligaseaktivität in einem Hitzestress-Experiment gezeigt (Qian *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch die anhaltende Induktion der HSP72-Spiegel durch BAG2 nach Hitzestress nicht eindeutig bewiesen werden. Im Trend war dies zwar zu erkennen, jedoch schwankten die Werte zu stark, als dass die Daten durch eine statistische Signifikanz belegt werden konnten. Ein Grund für die hohen Schwankungen in diesem Experiment könnte sein, dass es durch die dauerhaft induzierten HSP72-Spiegel zu einer Beeinträchtigung der Zellvitalität im Hitzestress kam. Das Absterben eines gewissen Anteils an Zellen unter den gegebenen Stressbedingungen, welcher von Kulturschale zu Kulturschale unterschiedlich groß ausfiel, könnte die inkonsistenten HSP72-Proteinspiegel erklären.

Um dies weiter zu analysieren, wurde das Zellüberleben nach einer BAG2-Überexpression in einem Paradigma des chronischen Hitzestresses untersucht. Hierbei konnte im Trend erkannt werden, dass BAG2-überexprimierende Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen unter Stress vermehrt abstarben. Die Ergebnisse implizierten, dass die durch BAG2 dauerhaft erhöhten HSP72-Spiegel die Zellvitalität unter Stressbedingungen negativ beeinflussten. Dies erscheint konträr zur zahlreich in der Literatur beschriebenen protektiven Wirkung von induziertem HSP72 in Zellen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Induktion von HSPs die Thermotoleranz einer Zelle erhöht und sich positiv auf das Zellüberleben unter Stressbedingungen auswirkt (Behl und Schubert, 1993; Landry *et al.*, 1982). Außerdem konnte Chaperonaktivität mit verminderter Aggregation und Toxizität aberranter Proteinspezies in pathophysiologischen Prozessen in Zusammenhang gebracht werden (Finkbeiner *et al.*, 2006; Muchowski *et al.*, 2000; Sittler *et al.*, 2001; Westerheide und

Morimoto, 2005). Eine gesteigerte HSP-Expression verlängerte zudem die Lebensspanne von *Caenorhabditis elegans* (Lithgow *et al.*, 1995). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen und denen aus vorangegangenen Studien könnte sein, dass der durch BAG2 gehemmte Abbau von HSP72 allein nicht ausreicht, die Stressresistenz der Zelle zu erhöhen. Hierzu könnte die HSF1-vermittelte Induktion weiterer Faktoren wie z.B. HSP40 vonnöten sein. Die durch BAG2 hervorgerufenen hohen HSP72-Proteinspiegel könnten jedoch die Aktivierung von HSF1 inhibieren, da die Hitzeschockantwort und die Aktivität von HSF1 durch akkumulierende Spiegel von HSP72 in einer Rückkopplungsreaktion abnehmen. HSP72 bindet aktives HSF1 und begünstigt die Überführung in dessen inaktive Form (Morimoto, 1993). Es stellt sich daher die Frage, ob BAG2 durch die Stabilisierung von HSP72, wie oben diskutiert (s. Abschnitt 4.1.1), einer gestörten HSF1-Aktivierung entgegenwirkt oder ob es sogar ursächlich daran beteiligt sein könnte.

Zudem muss berücksichtigt werden, dass es sich bei HSP72 um eines von vielen CHIP-Substraten handelt. Eine Modulation von BAG2 hat somit vermutlich weitgreifendere Folgen als die erhöhten HSP72-Proteinspiegel. Durch die Inhibition CHIP-vermittelter Ubiquitinierung greift BAG2 in das UPS ein und stört damit das Gleichgewicht zwischen Proteinfaltung und -degradation. Ein Ungleichgewicht in Proteintriage-Entscheidungsprozessen wurde bereits mit einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber Hitzestress in Verbindung gebracht (Wickner *et al.*, 1999). Gerade unter Stressbedingungen wirkt sich ein gestörter Abbau denaturierter Polypeptide über das UPS vermutlich negativ auf die Zelle aus, was unter Umständen durch eine BAG2-vermittelte, erhöhte Faltungskapazität von HSP72 nicht ausgeglichen werden kann.

4.2 Einfluss zellulärer Alterung auf CHIP-Aktivität und -Regulation durch BAG2

Da der Alterungsprozess im Allgemeinen mit zahlreichen Veränderungen in Systemen der Proteinqualitätskontrolle einhergeht und es vermehrt zu einer Akkumulation und Aggregation fehlgefalteter Proteine kommt (Chondrogianni und Gonos, 2005; Derham und Harding, 1997; Erickson *et al.*, 2006), lag in dieser Studie der besondere Fokus auf der Untersuchung der Funktion von CHIP und der Aktivitätsregulation durch BAG2 im Kontext der zellulären Alterung.

In einer vergleichenden Coimmunpräzipitations- und Ubiquitinanalyse von HSP72 in jungen und gealterten Zellen stellte sich interessanterweise heraus, dass HSP72 in seneszenten Zellen deutlich weniger ubiquitiniert vorlag als in proliferierenden Fibroblasten. In Bezug auf den Chaperon/Cochaperon/Substrat-Komplex als Modellsubstrat für CHIP-vermittelte Ubiquitinierung weist dies auf eine verringerte Aktivität der Ubiquitinligase in der zellulären Alterung hin. In einer vorangegangenen Studie wurde hingegen eine verstärkte Ligaseaktivität von CHIP in seneszenten HFL-1 Fibroblasten beschrieben (Sisoula *et al.*, 2011). Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Forschergruppe isoliertes CHIP als Ubiquitinierungssubstrat betrachtete, welches bekanntermaßen Autoubiquitinierungsaktivität besitzt (Jiang *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Ubiquitinierung durch CHIP anhand des gesamten Chaperon/Cochaperon-Komplexes untersucht. Da die Autoubiquitinierung von CHIP unabhängig von HSP72/HSC70 stattfindet (Xu *et al.*, 2008a), wurde sie in den hier vorgestellten Experimenten nicht berücksichtigt. Die Eigenubiquitinierung von CHIP in seneszenten Zellen könnte dazu dienen, das Cochaperon verstärkt dem Abbau zuzuführen. Andere E3 Ubiquitinligasen steuern ihren intrazellulären Gehalt und ihre Ligaseaktivität ebenfalls über Autoubiquitinierung und die daran anschließende Degradation (Nuber *et al.*, 1998). Die von Sisoula und Kollegen beschriebene verstärkte Eigenubiquitinierung von CHIP in der zellulären Alterung muss somit den hier vorgestellten Ergebnissen zur abnehmenden Ubiquitinierung von Chaperonsubstraten nicht zwangsläufig entgegenstehen.

Zudem ist in der besagten Studie davon die Rede, dass die gesteigerte CHIP-Aktivität bei der Etablierung des seneszenten Phänotyps durch die Degradation von akkumulierenden, mutanten p53-Spezies eine wichtige Rolle spielt. Eine mögliche Erklärung für die wieder sinkenden p53-Proteinspiegel in spät seneszenten Zellen, welche Sisoula und Kollegen mit induziertem CHIP in Verbindung brachten, könnten die höchst dynamischen Mechanismen sein, mit denen p53 zelluläre Prozesse steuert. Es konnte gezeigt werden, dass die Amplitude und die Frequenz von p53-Pulsen die Antwort auf bestimmte Stressoren regulieren. Auch in diesen Studien induzierten dauerhaft erhöhte p53-Spiegel Seneszenz, jedoch ebenso eine bestimmte Anzahl an p53-Pulsen über einen zeitlichen Schwellenwert hinaus (Purvis *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Je nachdem, zu welchem Zeitpunkt man zelluläre Proteinextrakte zur proteinbiochemischen Analyse gewinnt, können p53-Proteinspiegel demnach im Vergleich zu einem anderen Zeitpunkt erniedrigt vorliegen. Um die Frage endgültig zu klären, ob die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP in der zellulären Alterung abnimmt, sollten in Zukunft weitere CHIP-Substrate hinsichtlich ihrer Ubiquitinierung im Vergleich junge gegen gealterte Zellen untersucht werden. Als Beispiel-CHIP-Substrate würden sich z.B. mutante

Formen der Superoxiddismutase 1 (SOD1) eignen, welche vererbare Formen der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) verursachen. Alpha-Synuclein ist ebenso ein CHIP-Substrat. Es ist ein Hauptbestandteil von *Lewy Bodies*, die wiederum ein Hauptmerkmal der Parkinson-Krankheit darstellen (Arndt *et al.*, 2007).

Da sich die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP in gealterten Zellen durch BAG2 weiterhin modulieren ließ, konnte ein genereller Funktionsverlust von CHIP ausgeschlossen werden. Die Daten zeigen somit, dass CHIP-Aktivität auch in der replikativen Seneszenz durch BAG2 reguliert wird. Neben der beobachteten verringerten Ubiquitinierung von HSP72 in seneszenten Fibroblasten waren die Proteinspiegel von CHIP und von BAG2 erhöht. Es könnte somit in der zellulären Alterung zu einer durch BAG2 vermittelten verringerten Aktivität der Ubiquitinligase kommen, was möglicherweise vor dysregulierter Protein-Ubiquitinierung und -degradation schützt. Daneben wirkt sich BAG2 positiv auf die Faltungskapazität von HSP72/HSC70 aus. Dies könnte wiederum vorteilhaft für die gealterte Zelle sein, denn Alterung ist charakterisiert durch eine abnehmende proteasomale Aktivität und die Akkumulation von oxidierten, fehlgefalteten Proteinen (Chondrogianni und Gonos, 2005; Erickson *et al.*, 2006; Gamerdinger *et al.*, 2009; Rubinsztein, 2006). Eine konstitutive Regulation der CHIP-Aktivität durch BAG2 im Alterungsprozess, welche eine verringerte Ubiquitinierung von Chaperonsubstraten zur Folge hat und die Proteinfaltung begünstigt, könnte somit einer Ansammlung aberranter Polypeptide entgegenwirken, welche durch das Proteasom nicht mehr effektiv beseitigt werden können. Ein Zusammenhang zwischen BAG2 und einer verminderten proteasomalen Aktivität wurde bereits in der Literatur beschrieben. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass eine durch einen Proteasominhibitor ausgelöste Apoptose in Schilddrüsen-Krebszellen eine Induktion von BAG2 zur Folge hatte (Wang *et al.*, 2008).

4.2.1 Altersabhängige Regulation des Seneszenzmediators p53 durch BAG2

Der Transkriptionsfaktor p53 ist an zellulären Reparaturprozessen sowie an diversen Schutzmechanismen wie Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose beteiligt (Ryan *et al.*, 2001). p53-Proteinspiegel werden durch posttranslationale Modifikationen und durch einen ubiquitinabhängigen proteasomalen Abbau auf niedrigem Niveau gehalten (Kruse und Gu, 2008). Neben Ubiquitinligasen wie *mouse double minute 2 homolog* (Mdm2; Michael und Oren, 2003), *p53-induced protein with a RING-H2 domain* (Pirh2; Leng *et al.*, 2003), *constitutive photomorphogenesis protein 1* (Cop1; Dornan *et al.*, 2004) und *Topoisomerase I*

binding protein (TOPORS; Rajendra *et al.*, 2004), reguliert auch CHIP den Gehalt an p53, insbesondere im Kontext der replikativen Seneszenz (Sisoula *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnte eine altersabhängige Regulation der p53-Proteinspiegel durch den CHIP-Inhibitor BAG2 nachgewiesen werden. Herabgesetzte Proteinspiegel des Cochaperons bewirkten deutlich verringerte p53-Spiegel in seneszenten Fibroblasten, während eine Überexpression von BAG2 in jungen Zellen keinen Einfluss auf den p53-Proteingehalt ausübte. Letztere Beobachtung lässt sich damit erklären, dass die p53-Regulation durch CHIP in jungen Zellen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielt. In vorangegangenen Studien wurde beispielsweise gezeigt, dass herabgesetzte CHIP-Proteinspiegel in seneszenten Zellen eine p53-Akkumulation zur Folge hatten, nicht jedoch in proliferierenden Fibroblasten (Sisoula *et al.*, 2011). Der in dieser Arbeit gezeigte Einfluss von BAG2 auf p53 in gealterten Zellen legt nahe, dass die erhöhten BAG2-Proteinspiegel in der zellulären Alterung zu einer Stabilisierung von p53 beitragen, wodurch bekanntermaßen Seneszenz initiiert wird (Beausejour *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 1997; Lundberg *et al.*, 2000). Eine seneszenzinduzierende Wirkung von BAG2 konnte bereits in TRE293 Zellen nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2012). In humanen embryonalen HFL-1 Lungenfibroblasten führten reduzierte CHIP-Proteinspiegel zu einer Akkumulation von oxidierten Proteinen und zu einer vorzeitigen Seneszenz (Sisoula und Gonos, 2011). Es wäre daher denkbar, dass die Hemmung der CHIP-Aktivität durch BAG2 ebenfalls zur Ausprägung des seneszenten Phänotyps beiträgt. Als Gegenspieler zur destruktiven Aktivität von CHIP könnte BAG2 somit in der replikativen Seneszenz und in der Alterung eine maßgebliche Rolle spielen. Für CHIP selbst wurde bereits beschrieben, dass es die Alterung von Säugern beeinflusst. Es wurde in einem Mausmodell genetisch ausgeschaltet, was zu vorzeitigen Alterserscheinungen und zu einer verkürzten Lebensspanne der Tiere führte (Min *et al.*, 2008).

Die Rolle von BAG2 in der Regulation replikativer Seneszenz näher zu charakterisieren ist Gegenstand zukünftiger Studien. Dazu sollte der direkte Einfluss modulierter BAG2-Proteinpiegel auf diesen Prozess analysiert werden. In jungen Zellen mit ektopisch exprimiertem BAG2 könnte beispielsweise eine β -Galaktosidasefärbung Aufschluss über eine vorzeitige Seneszenz geben. Auch das Dokumentieren der Zellmorphologie und -proliferation vor dem Hintergrund modulierter BAG2-Spiegel könnte einen veränderten Seneszenzstatus demonstrieren.

4.2.2 Altersassoziierte, reziproke Regulation der Proteinspiegel zweier funktionell redundanter CHIP-Modulatoren

Erstmals wurde im Kontext der CHIP-Regulation durch BAG2 in dieser Arbeit eine altersabhängige, reziproke Regulation von HSPBP1 beobachtet. Dieses ist ein weiteres Cochaperon, welches die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP inhibiert. Auch für HSPBP1 wurde gezeigt, dass es die Reifung des CFTR stimuliert und dass es Chaperonsubstrate direkt bindet. Letzteres wurde anhand einer im Hitzestress durch HSPBP1 stabilisierten Luziferase demonstriert (Alberti *et al.*, 2004). Außerdem war das *Saccharomyces cerevisiae*-Ortholog von HSPBP1, der *factor exchange for SSA1 protein 1* (FES1), für eine effiziente *de novo* Proteinfaltung der Luziferase notwendig (Shomura *et al.*, 2005). Ähnlich wie BAG2 ist HSPBP1 somit an Proteintriage-Entscheidungsprozessen beteiligt und konvertiert den HSP72/HSC70-Komplex in einen faltungskompetenten Status. Die Existenz zweier evolutionär, strukturell und mechanistisch unterschiedlicher HSP72/HSC70 Cochaperone mit funktioneller Redundanz verdeutlicht, wie relevant die Regulation der CHIP-Aktivität ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die CHIP- und BAG2-Proteinspiegel in seneszenten Fibroblasten stiegen, während die HSPBP1-Proteinmenge abnahm. Dies konnte zudem in einem etablierten Modell vorzeitiger Seneszenz bestätigt werden. Die gegenläufige Regulation von BAG2 und HSPBP1 veranschaulicht die Komplexität, mit der sich die CHIP-Modulation in der zellulären Alterung offenbar verändert. Die Regulation der Ligaseaktivität von CHIP durch BAG2 erwies sich im Zuge der replikativen Seneszenz als konstitutiv. HSPBP1 hingegen könnte als CHIP-Modulator in seneszenten Zellen möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielen.

In der Analyse der reziproken Regulation von BAG2 und HSPBP1 zeigte sich, dass BAG2-Proteinspiegel bereits durch einen reversiblen Zellzyklusarrest stiegen, wohingegen CHIP und HSPBP1 unverändert blieben. Die induzierten BAG2-Spiegel stehen somit wahrscheinlich nicht ausschließlich mit replikativer Seneszenz im Zusammenhang, sondern werden zellzyklusabhängig reguliert. Da der Zellzyklusarrest jedoch auch wesentliches Merkmal replikativer Seneszenz ist (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007), kann eine spezifische Rolle von BAG2 im Prozess der zellulären Alterung dadurch nicht zwangsläufig ausgeschlossen werden. Nach der Applikation eines akuten oxidativen Stresses blieben BAG2-Spiegel unverändert, obwohl der Literatur nach diese Form von Stress ebenfalls einen reversiblen Zellzyklusarrest induziert (Guo *et al.*, 2010). Daher führt ein reversibler Proliferationsstopp scheinbar nicht grundsätzlich zu erhöhten BAG2-Proteinspiegeln. Eine

mögliche Erklärung für die Beobachtungen könnte eine zeitliche Komponente sein. Es wäre z.B. denkbar, dass es erst zu einer BAG2-Regulation kommt, wenn der Zellzyklusarrest einen zeitlichen Schwellenwert überschreitet.

In dem Modell des akuten oxidativen Stresses blieben HSPBP1-Proteinspiegel ebenfalls konstant und es konnte gezeigt werden, dass sich BAG2 und HSPBP1 nicht gegenseitig kompensatorisch regulieren. Die gegenläufige Regulation der beiden Cochaperone stellt daher einen Mechanismus der CHIP-Modulation dar, der spezifisch im Zuge der replikativen Seneszenz auftritt. Da beide Proteine jedoch in ihrer Funktion redundant sind, stellt sich die Frage, weshalb der Gehalt an HSPBP1 im Gegensatz zu BAG2 in seneszenten Zellen sinkt. Ein Grund könnte möglicherweise sein, dass BAG2 zusätzliche Funktionen ausübt, die für die gealterte Zelle relevant sein könnten, wie z.B. die Begünstigung von ubiquitinunabhängigen Proteinabbauwegen (Carrettiero *et al.*, 2009; s. Abschnitt 4.2.3). Bemerkenswerterweise sind BAG2 und CHIP außerdem evolutionär miteinander verlinkt. In Organismen, die CHIP exprimieren, findet man auch BAG2-Homologe vor. Ohne CHIP jedoch fehlt einem Organismus ebenfalls BAG2 (Xu *et al.*, 2008b). Weiterhin existieren CHIP- und BAG2-Orthologe in *Caenorhabditis elegans* (CHN-1 und UNC-23), jedoch wurde bisher keines für HSPBP1 identifiziert. Es ist denkbar, dass BAG2 und HSPBP1 als zwei voneinander unabhängige Klassen von HSP72/HSC70-NEFs entstanden sind. Möglicherweise kamen dann beide Cochaperone mit teilweise überlappenden Funktionen durch lateralen Gentransfer in einem Organismus vor und die Möglichkeiten der Modulation von Chaperonaktivität wurden damit komplexer (Shomura *et al.*, 2005). Der gemeinsame evolutionäre Ursprung von CHIP und BAG2 könnte eine weitere Erklärung dafür liefern, weshalb BAG2 in der zellulären Alterung der prominentere CHIP-Modulator zu sein scheint.

4.2.3 Alterungsbedingte Veränderung der CHIP-Regulation und deren mögliche Relevanz für altersassoziierte Erkrankungen

Aberrante Proteinaggregate treten aufgrund einer gestörten Proteostase in einer Vielzahl von Pathologien auf, wobei häufig das Nervensystem betroffen ist. Beispiele hierfür sind neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Krankheit, die Parkinson-Krankheit, die Amyotrophe Lateralsklerose oder die Huntington-Krankheit (Balch *et al.*, 2008). Post-mitotische Zellen wie Neurone sind demnach besonders vulnerabel gegenüber einer gestörten, bzw. einer sich im Zuge der Alterung ändernden Proteinqualitätskontrolle. Um eine mögliche

Relevanz der altersabhängigen Regulation von CHIP, BAG2 und HSPBP1 für den Gesamtorganismus und im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen aufzuzeigen, wurden die Proteinspiegel der Cochaperone in neuronalen Geweben sowie einem nicht-neuronalen Vergleichsgewebe von jungen und alten Mäusen untersucht. Die mit der Alterung einhergehenden Veränderungen im Proteingehalt der analysierten Proteine fielen gewebsspezifisch sehr unterschiedlich aus. Das Regulationsmuster aus den Lungenfibroblasten, insbesondere die reziprok veränderten Proteinspiegel von BAG2 und HSPBP1, konnten *in vivo* erstmals in murinem Lungengewebe bestätigt werden. Diese Entdeckung ist insofern interessant, da jede Veränderung im System der Proteinqualitätskontrolle in Pathomechanismen von vielen chronischen, teilweise altersassoziierten Lungenerkrankungen wie z.B. Lungenkrebs, Asthma oder der *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) von Signifikanz sein könnte (Meiners und Eickelberg, 2012). Krankheitsbedingt veränderte Regulationsmechanismen können wiederum Ansatzpunkte für therapeutische Strategien darstellen. Es gilt zu untersuchen, ob sich die in der Alterung konstitutiv auftretende CHIP-Regulation durch BAG2 im Verlauf der o.g. Krankheiten verändert. In diesem Falle könnte beispielsweise eine pharmakologische Induktion von BAG2 der Ansammlung und Aggregation aberranter Proteine entgegenwirken und durch die Begünstigung von Proteinfaltung gegenüber Proteindegradation einen positiven Effekt in pathophysiologischen Prozessen bewirken. In der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose) stellt BAG2 in ähnlicher Weise einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt dar. Mutationen im CFTR-Gen, die einen Funktionsverlust des Chloridkanals zur Folge haben, reduzieren das Faltungspotential der CFTR-Vorläuferproteine und es kommt zu deren vorzeitigen Abbau durch CHIP, was letztendlich die Krankheit auslöst (Kopito, 1999; Riordan, 1999). Durch die Inhibition der Ubiquitinligase fördert BAG2 jedoch die Reifung des CFTR und stabilisiert unreife Konformationen des Ionenkanals (Arndt *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2005).

In den gealterten neuronalen Geweben Hippocampus und Cortex konnten die erhöhten BAG2- und CHIP-Proteinspiegel sowie die gesunkenen HSPBP1-Spiegel nur teilweise, bzw. im Trend beobachtet werden. Aufgrund individueller Unterschiede in der Proteinexpression zwischen einzelnen Tieren könnte hier eine größere Tieranzahl ein klareres Bild ergeben, bzw. die Daten mit einer statistischen Signifikanz belegen. Im Rahmen der Doktorarbeit standen jedoch keine weiteren Tiere für eine Analyse zur Verfügung. Da sich allerdings im Lungengewebe mit ungefähr gleich vielen Tieren ein eindeutiges Bild ergab, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Regulation der Cochaperone gewebsspezifisch auftritt.

Interessanterweise konnten jedoch eindeutig erhöhte BAG2-Proteinspiegel im gealterten Hippocampus nachgewiesen werden, einer wichtigen Region im zentralen Nervensystem, die für das Lernen und für die Gedächtnis-Konsolidierung zuständig ist (Douglas, 1967; Meissner, 1967; Morris *et al.*, 2006). Der Hippocampus ist vom Alterungsprozess besonders betroffen, woraus eine generelle Abnahme an kognitiven Funktionen resultiert (Serrano und Klann, 2004). In neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer- oder der Parkinson-Krankheit ist insbesondere der Hippocampus durch neuropathologischen Veränderungen charakterisiert, so dass es von medizinischem Interesse sein könnte, die physiologische Bedeutung von BAG2 in dieser Gehirnregion im Kontext der Alterung intensiver zu erforschen. Inwieweit der in dieser Arbeit gezeigte Einfluss von BAG2 auf die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP in der Alzheimer-Krankheit eine bedeutende Rolle spielen könnte, wurde bereits dadurch demonstriert, dass BAG2 einen CHIP-vermittelten, ubiquitinabhängigen Abbauweg von Tau inhibiert. Bei diesem handelt es sich um ein Protein, das an Mikrotubuli bindet und deren Assemblierung reguliert. Ablagerungen von Tau-Protein sind ein Hauptmerkmal der Alzheimer-Krankheit, allerdings auch von vielen anderen neurodegenerativen Erkrankungen. In diesen sogenannten Tauopathien lagert sich hyperphosphoryliertes Tau zu polymeren Fibrillen zusammen, die gegen die zellulären Degradationsmechanismen resistent sind. Für BAG2 wurde gezeigt, dass es einen ubiquitinunabhängigen Abbau von unlöslichem phosphoryliertem Tau HSP70-abhängig vermittelt, wodurch abnormes Tau scheinbar effektiver beseitigt wird als über den CHIP- und ubiquitinabhängigen Weg. BAG2 wird wiederum von einer microRNA, miR-128a, reguliert. Diese liegt in der Alzheimer-Krankheit erhöht vor, was in einer Reduktion der BAG2-vermittelten Degradation von Tau resultiert (Carrettiero *et al.*, 2009; Lukiw, 2007). Der Abbau über den weniger effektiven ubiquitinabhängigen Weg fördert somit Tau-Aggregation und die Bildung neurofibrillärer Läsionen. Diesen Effekt über eine Induktion von BAG2 wieder umzukehren, könnte daher einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt in der Alzheimerforschung darstellen.

Eine weitere aktuelle Studie konnte erstmals einen Zusammenhang zwischen BAG2 und der Parkinson-Krankheit (PD) aufzeigen. Mutationen in der mitochondrialen Proteinkinase *phosphatase and tensin homologue-induced putative kinase 1* (PINK1) führen zu einer autosomal rezessiven Form der Parkinson-Krankheit. Es konnte gezeigt werden, dass BAG2 die Ubiquitinierung und den Abbau von PINK1, insbesondere von mutanten Formen der Kinase, inhibiert. Stabilisiertes PINK1 schützt vor mitochondrialer Dysfunktion, welche Teil

der pathophysiologischen Prozesse in PD ist. BAG2 selbst könnte in diesem Zusammenhang somit eine entscheidende neuroprotektive Rolle spielen (Che *et al.*, 2013).

Ein zusammenfassendes Modell zur Funktion von BAG2 und deren Bedeutung für die Proteinqualitätskontrolle, insbesondere im Kontext zellulärer Alterung, ist in folgender Abbildung 24 dargestellt.

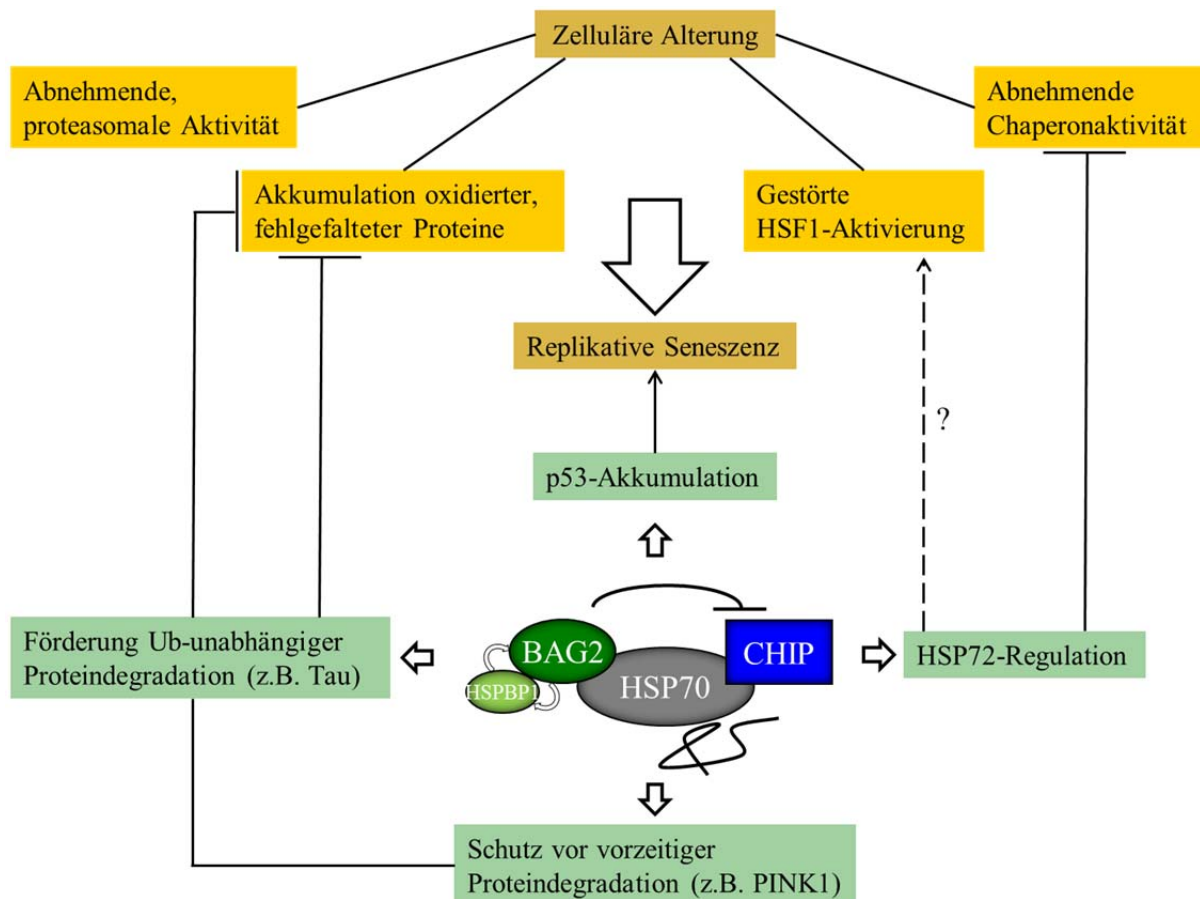


Abbildung 24: Modell zur Funktion von BAG2 in der Proteinqualitätskontrolle und deren Bedeutung in der zellulären Alterung. BAG2 ist als HSP70-NEF ein wichtiger Faktor in Proteintriage-Entscheidungsprozessen, der die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP im Chaperon/Chaperonkomplex inhibiert und eine intrinsische Chaperonaktivität aufweist. Dadurch begünstigt BAG2 die Faltung von Chaperonsubstraten und verhindert deren Degradation. Abnehmende proteasomale Aktivität und die Ansammlung aberranter Proteinkonformationen sind Merkmale der zellulären Alterung. Die konstitutive Aktivitätsregulation von CHIP durch BAG2 könnte hierbei der Bildung schädlicher Proteinspezies entgegenwirken, welche durch das Proteasom nicht mehr effektiv beseitigt werden können. Daneben bewahrt BAG2 instabile Intermediärkonformationen von Proteinen vor einem potentiell vorzeitigen Abbau, wie z.B. die Proteinkinase PINK1, die in einer familiären Form der Parkinson-Krankheit eine wichtige Rolle spielt. BAG2 fördert außerdem z.T. effektivere ubiquitin- und CHIP-unabhängige Proteinabbauwege, wie z.B. von phosphoryliertem Tau. Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau sind u.a. ein Hauptmerkmal der Alzheimer-Krankheit. Aufgrund der gehemmten Degradation des CHIP-Substrates p53 ist BAG2 wahrscheinlich an dessen Akkumulation und somit an der Regulation replikativer Seneszenz beteiligt. Weiterhin reguliert BAG2 intrazelluläre HSP72-Proteinspiegel, ohne dabei selbst eine Hitzeschockantwort zu induzieren. Dies

könnte die Chaperonkapazität der alternden Zelle stabilisieren und somit der abnehmenden Chaperonaktivität entgegenwirken. Jedoch tragen die durch BAG2 stabilisierten HSP72-Proteinspiegel möglicherweise zur ineffektiven HSF1-Aktivierung in gealterten Zellen bei. Im Vergleich zu erhöhten BAG2-Spiegeln in seneszenten Zellen ist das funktionell redundante Cochaperon HSPBP1 reziprok reguliert. Die Aktivitätsmodulation von CHIP unterliegt demnach einem alterungsspezifischen Anpassungsprozess, in welchem BAG2 wohlmöglich eine wichtige Rolle spielt. Ub, Ubiquitin.

Um die reziproke Regulation von BAG2 und HSPBP1 in der Alterung *in vivo* weiter zu untersuchen, sollten in der Zukunft weitere Gewebe von jungen und alten Mäusen analysiert werden, in denen sich über die Zeit hinweg seneszente Zellen anreichern, wie z.B. Magen-Darm, Niere, Leber oder Milz. Darüber hinaus wäre es interessant, die Funktionalität von HSPBP1 im Vergleich jung gegen alt zu überprüfen, ähnlich wie in dieser Arbeit für BAG2 geschehen. Anschließend sollten funktionelle Konsequenzen der gegenläufigen Regulation der beiden CHIP-Modulatoren erfasst werden. Beispielsweise könnte untersucht werden, inwieweit sich eine BAG2- und/oder HSPBP1-Modulation in gealterten Zellen positiv oder negativ auf Proteinaggregation, auf Chaperonaktivität und auf das Zellüberleben unter Stressbedingungen auswirkt.

Um das regulatorische Zusammenwirken von BAG2 und CHIP im Gesamtorganismus näher zu charakterisieren, würde sich für zukünftige Studien beispielsweise *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus sehr gut eignen. Wichtig wäre beispielsweise eine Analyse der Auswirkungen einer Modulation der Cochaperone auf die Vitalität und die Lebensspanne der Tiere, auf Proteinaggregation, Chaperonaktivität und/oder auf Proteindegradationswege. Bisher konnte in *C. elegans* gezeigt werden, dass eine funktionelle Mutante des BAG2-Homologs UNC-23 einen gestörten Muskel-Phänotyp zur Folge hat (Waterston *et al.*, 1980), was eine wichtige Rolle des Cochaperons im Aufbau und der Funktion von Muskelzellen impliziert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine funktionierende Proteinqualitätskontrolle ist essenziell für die Vitalität einer Zelle. Das dynamische Gleichgewicht zwischen Proteinfaltung und -degradation wird von molekularen Chaperonen aufrechterhalten, deren Aktivität wiederum durch die Interaktion mit zahlreichen Cochaperonen moduliert wird. Das Cochaperon CHIP ist ein zentraler Faktor in Proteintriage-Entscheidungsprozessen, da es als Ubiquitinligase Chaperonsubstrate dem Abbau zuführt und somit die Chaperonmaschinerie direkt mit den Systemen der Proteindegradation verbindet. Um Polypeptide vor einem vorzeitigen Abbau zu schützen, wird die destruktive Aktivität von CHIP durch weitere Cochaperone reguliert.

In dieser Arbeit konnte die Hemmung der Ligaseaktivität von CHIP durch das Cochaperon BAG2 mechanistisch erstmals in einem zellulären System nachgewiesen werden. Dazu wurde die humane IMR-90 Fibroblasten Zelllinie verwendet. Die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP wurde anhand von HSP72 als Modell-CHIP-Substrat untersucht. Durch die verringerte Ubiquitinierung, und damit dem reduzierten Abbau von HSP72, regulierte BAG2 dessen intrazelluläre Proteinspiegel, ohne dabei selbst eine Hitzeschockantwort zu induzieren. Überexprimiertes BAG2 wirkte sich trotz stabilisierter HSP72-Spiegel bei einem appliziertem Hitzestresses negativ auf die Zellvitalität aus, vermutlich da BAG2 durch die Inhibition von CHIP-vermittelter Ubiquitinierung massiv in das Gleichgewicht zwischen Substratfaltung und -degradation eingreift.

Da sich die Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle in der Alterung stark verändern und sich den wandelnden Bedingungen in der Zelle anpassen, wurde in einem zweiten Teil dieser Arbeit mit Hilfe des IMR-90 Zellsystems als etabliertes Modell zellulärer Seneszenz analysiert, inwieweit sich die Aktivität und die Regulation von CHIP durch BAG2 in der zellulären Alterung ändern. In seneszenten Zellen war HSP72 erheblich weniger ubiquitiniert als in jungen Fibroblasten, was auf eine reduzierte CHIP-Aktivität hinweist. Diese blieb jedoch durch BAG2 weiterhin modulierbar. Die Funktion von BAG2 als Inhibitor der Ubiquitinligase CHIP blieb demnach in seneszenten Zellen bestehen. In gealterten Fibroblasten regulierte BAG2 außerdem die Proteinspiegel des CHIP-Substrates und Seneszenzinitiators p53, was BAG2 eine mögliche Rolle in der Etablierung des Seneszenz-Phänotyps zuspricht. Weiterhin unterlagen die Proteinspiegel der beiden funktionell redundanten CHIP-Modulatoren BAG2 und HSPBP1 in der zellulären Alterung einer reziproken Regulation. In gealterten Mäusen trat die gegenläufige Veränderung der beiden

Cochaperone gewebsspezifisch in der Lunge auf. Außerdem waren die BAG2-Proteinspiegel im Hippocampus gealterter Tiere signifikant erhöht.

Zusammenfassend konnte anhand der erzielten Ergebnisse die Funktion von BAG2 als Inhibitor von CHIP im zellulären System bestätigt werden. Außerdem durchlaufen die Aktivität und die Regulation von CHIP einen seneszenzspezifischen Adaptationsprozess, welcher für die Erhaltung der Proteostase in der Alterung relevant sein könnte und in welchem die Funktion von BAG2 als CHIP-Modulator möglicherweise eine wichtige Rolle spielt.

Zukünftige Studien könnten die komplexen Mechanismen weiterführend aufklären, mit denen CHIP-Aktivität reguliert wird. Dies kann helfen, der altersbedingten Abnahme an proteostatischer Kontrolle entgegenzuwirken und aberrante Proteinaggregation in altersassoziierten Erkrankungen vorzubeugen.

SUMMARY

An efficient protein quality control is essential for cell viability. Molecular chaperones sustain the dynamic balance between protein folding and degradation. On the other hand, chaperone function is modulated by the interaction with a plethora of cochaperones. The cochaperone and ubiquitin ligase CHIP is a central factor in Proteintriage decisions, as it targets chaperone substrates for degradation and therefore links the folding machinery directly to protein turnover systems. To prevent premature degradation of client substrates, the destructive activity of CHIP is regulated by other cochaperones.

In this work, the inhibition of the ubiquitin ligase activity of CHIP by the cochaperone BAG2 was shown mechanistically for the first time in a cellular system, employing the human IMR-90 fibroblast cell line and HSP72 as a model CHIP substrate. By reducing the ubiquitination and therefore the degradation of HSP72, BAG2 regulated steady state levels of HSP72 without modulation of the heat shock response. Under conditions of applied heat stress, increased BAG2 levels had a negative effect on the progression of the heat shock response and on cell viability. Thus, stabilized HSP72 protein levels reduced the stress resistance of the cell, probably because BAG2 impaired the balance between substrate folding and degradation tremendously by inhibiting CHIP mediated ubiquitination.

As the mechanisms of protein quality control adapt to the changing conditions during aging, potential alterations of CHIP activity and regulation by BAG2 in cellular aging were analyzed in a second part of this work using IMR90 fibroblasts as a model of replicative senescence. In senescent cells the HSP72 ubiquitination status was diminished compared to young fibroblasts which suggested a reduced CHIP activity. Overexpressed BAG2 further lowered HSP72 ubiquitination in aged cells. Therefore, the potential of BAG2 to modulate CHIP activity still persisted during cellular aging. Furthermore, BAG2 regulated the protein levels of the CHIP substrate and senescence regulator p53 in senescent fibroblasts which implied a possible involvement of BAG2 in the establishment of the senescence phenotype. Interestingly, the protein levels of the two functional redundant CHIP-modulators BAG2 and HSPBP1 were regulated reciprocally during cellular aging. This opposing regulation also occurred in the lungs of old mice. Moreover, BAG2 protein levels were elevated significantly in the aged hippocampus.

Taken together, the results confirm the function of BAG2 as an inhibitor of the ubiquitin ligase CHIP. Furthermore, regulation of CHIP activity undergoes an age-dependent

adaptation process which might be relevant to preserve the proteostasis of aged cells and in which BAG2 as a CHIP-modulator might play an important role.

Future studies may further reveal the complex mechanisms of CHIP regulation. This may contribute to antagonize the age-dependent decline in proteostatic control and to prevent aberrant protein aggregation in age-related diseases.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abercrombie, M. and Heaysman, J. E.** (1954). Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. *Exp Cell Res* **6**, 293-306.
- Aikata, H., Takaishi, H., Kawakami, Y., Takahashi, S., Kitamoto, M., Nakanishi, T., Nakamura, Y., Shimamoto, F., Kajiyama, G. and Ide, T.** (2000). Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation. *Exp Cell Res* **256**, 578-82.
- Al-Ramahi, I., Lam, Y. C., Chen, H. K., de Gouyon, B., Zhang, M., Perez, A. M., Branco, J., de Haro, M., Patterson, C., Zoghbi, H. Y. et al.** (2006). CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* **281**, 26714-24.
- Alberti, S., Bohse, K., Arndt, V., Schmitz, A. and Höhfeld, J.** (2004). The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* **15**, 4003-10.
- Alberti, S., Esser, C. and Höhfeld, J.** (2003). BAG-1-a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones* **8**, 225-31.
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. and Barrett, J. C.** (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13742-7.
- Allsopp, R. C. and Harley, C. B.** (1995). Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* **219**, 130-6.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M.** (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7915-22.
- Arias, E. and Cuervo, A. M.** (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 184-9.
- Arndt, V., Daniel, C., Nastainczyk, W., Alberti, S. and Höhfeld, J.** (2005). BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell* **16**, 5891-900.
- Arndt, V., Rogon, C. and Höhfeld, J.** (2007). To be, or not to be-molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2525-41.
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. and Kelly, J. W.** (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* **319**, 916-9.
- Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L. J., Yin, L. Y. and Patterson, C.** (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* **19**, 4535-45.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E.** (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-80.

- Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. and Campisi, J.** (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* **22**, 4212-22.
- Behl, C.** (2011). BAG3 and friends: co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy* **7**, 795-8.
- Behl, C. and Schubert, D.** (1993). Heat shock partially protects rat pheochromocytoma PC12 cells from amyloid beta peptide toxicity. *Neurosci Lett* **154**, 1-4.
- Behl, C. and Ziegler, C.** (2014). Cell aging: molecular mechanisms and implications for disease. SpringerBriefs in Molecular Medicine, Springer, DOI 10.1007/978-3-642-45179-9.
- Bercovich, B., Stancovski, I., Mayer, A., Blumenfeld, N., Laszlo, A., Schwartz, A. L. and Ciechanover, A.** (1997). Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates *in vitro* requires the molecular chaperone Hsc70. *J Biol Chem* **272**, 9002-10.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. and Johansen, T.** (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**, 603-14.
- Brown, J. P., Wei, W. and Sedivy, J. M.** (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**, 831-4.
- Brunk, U. T. and Terman, A.** (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* **33**, 611-9.
- Buchner, J.** (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* **24**, 136-41.
- Bukau, B., Weissman, J. and Horwich, A.** (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**, 443-51.
- Campisi, J.** (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* **11**, S27-31.
- Campisi, J.** (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513-22.
- Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F.** (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729-40.
- Caplan, A. J.** (1999). Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol* **9**, 262-8.
- Carra, S., Seguin, S. J., Lambert, H. and Landry, J.** (2008). HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem* **283**, 1437-44.
- Carrettiero, D. C., Hernandez, I., Neveu, P., Papagiannakopoulos, T. and Kosik, K. S.** (2009). The cochaperone BAG2 sweeps paired helical filament-insoluble tau from the microtubule. *J Neurosci* **29**, 2151-61.

- Che, X., Tang, B., Wang, X., Chen, D., Yan, X., Jiang, H., Shen, L., Xu, Q., Wang, G. and Guo, J.** (2013). The BAG2 protein stabilises PINK1 by decreasing its ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* **441**, 488-92.
- Choi, H. S., Lin, Z., Li, B. S. and Liu, A. Y.** (1990). Age-dependent decrease in the heat-inducible DNA sequence-specific binding activity in human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* **265**, 18005-11.
- Chondrogianni, N. and Gonos, E. S.** (2005). Proteasome dysfunction in mammalian aging: steps and factors involved. *Exp Gerontol* **40**, 931-8.
- Clarke, P. G.** (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* **181**, 195-213.
- Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R. M., Kelly, J. W. and Dillin, A.** (2006). Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* **313**, 1604-10.
- Cohen, F. E. and Kelly, J. W.** (2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* **426**, 905-9.
- Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Höhfeld, J. and Patterson, C.** (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3**, 93-6.
- Corduan, A., Lecomte, S., Martin, C., Michel, D. and Desmots, F.** (2009). Sequential interplay between BAG6 and HSP70 upon heat shock. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1998-2004.
- Crocoll, A., Schneikert, J., Hubner, S., Martin, E. and Cato, A. C.** (2000). BAG-1M: a potential specificity determinant of corticosteroid receptor action. *Kidney Int* **57**, 1265-9.
- Croset, A., Delafosse, L., Gaudry, J. P., Arod, C., Glez, L., Losberger, C., Begue, D., Krstanovic, A., Robert, F., Vilbois, F. et al.** (2012). Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol* **161**, 336-48.
- Dai, Q., Qian, S. B., Li, H. H., McDonough, H., Borchers, C., Huang, D., Takayama, S., Younger, J. M., Ren, H. Y., Cyr, D. M. et al.** (2005). Regulation of the cytoplasmic quality control protein degradation pathway by BAG2. *J Biol Chem* **280**, 38673-81.
- Dai, Q., Zhang, C., Wu, Y., McDonough, H., Whaley, R. A., Godfrey, V., Li, H. H., Madamanchi, N., Xu, W., Neckers, L. et al.** (2003). CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *EMBO J* **22**, 5446-58.
- Derham, B. K. and Harding, J. J.** (1997). Effect of aging on the chaperone-like function of human alpha-crystallin assessed by three methods. *Biochem J* **328 (Pt 3)**, 763-8.
- Desmots, F., Russell, H. R., Michel, D. and McKinnon, P. J.** (2008). Scythe regulates apoptosis-inducing factor stability during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* **283**, 3264-71.
- Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S. and Weikl, T. R.** (2008). The protein folding problem. *Annu Rev Biophys* **37**, 289-316.

- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. et al.** (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-7.
- Ding, W. X. and Yin, X. M.** (2008). Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* **4**, 141-50.
- Dobson, C. M. and Karplus, M.** (1999). The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 92-101.
- Doong, H., Price, J., Kim, Y. S., Gasbarre, C., Probst, J., Liotta, L. A., Blanchette, J., Rizzo, K. and Kohn, E.** (2000). CAIR-1/BAG-3 forms an EGF-regulated ternary complex with phospholipase C-gamma and Hsp70/Hsc70. *Oncogene* **19**, 4385-95.
- Doong, H., Vrailas, A. and Kohn, E. C.** (2002). What's in the 'BAG'?-A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett* **188**, 25-32.
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G. D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H. and Dixit, V. M.** (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* **429**, 86-92.
- Douglas, R. J.** (1967). The hippocampus and behavior. *Psychol Bull* **67**, 416-22.
- Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A. and Hartl, F. U.** (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J* **25**, 2519-28.
- Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M. and Buchner, J.** (1999). The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species. *J Biol Chem* **274**, 14867-74.
- Ellis, R. J.** (2001). Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 114-9.
- Erickson, R. R., Dunning, L. M. and Holtzman, J. L.** (2006). The effect of aging on the chaperone concentrations in the hepatic, endoplasmic reticulum of male rats: the possible role of protein misfolding due to the loss of chaperones in the decline in physiological function seen with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**, 435-43.
- Esser, C., Alberti, S. and Höhfeld, J.** (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 171-88.
- Esser, C., Scheffner, M. and Höhfeld, J.** (2005). The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem* **280**, 27443-8.
- Ferreira, S. T., De Felice, F. G. and Chapeaurouge, A.** (2006). Metastable, partially folded states in the productive folding and in the misfolding and amyloid aggregation of proteins. *Cell Biochem Biophys* **44**, 539-48.

- Finkbeiner, S., Cuervo, A. M., Morimoto, R. I. and Muchowski, P. J.** (2006). Disease-modifying pathways in neurodegeneration. *J Neurosci* **26**, 10349-57.
- Frydman, J. and Höhfeld, J.** (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci* **22**, 87-92.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K. and Hartl, F. U.** (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**, 111-7.
- Furugori, E., Hirayama, R., Nakamura, K. I., Kammori, M., Esaki, Y. and Takubo, K.** (2000). Telomere shortening in gastric carcinoma with aging despite telomerase activation. *J Cancer Res Clin Oncol* **126**, 481-5.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U. and Behl, C.** (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* **28**, 889-901.
- Gamerding, M., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Clement, A. M. and Behl, C.** (2011). BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep* **12**, 149-56.
- Gething, M. J. and Sambrook, J.** (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Goldsmith, T.C.** (2010). The Evolution of Aging. 3. Ausgabe, Azinet, ISBN 978-0-9788709-0-4.
- Guo, Y. L., Chakraborty, S., Rajan, S. S., Wang, R. and Huang, F.** (2010). Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Dev* **19**, 1321-31.
- Haass, C. and Selkoe, D. J.** (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-12.
- Haglund, K. and Dikic, I.** (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* **24**, 3353-9.
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K. and Lippincott-Schwartz, J.** (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656-67.
- Haley, D. A., Horwitz, J. and Stewart, P. L.** (1998). The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure. *J Mol Biol* **277**, 27-35.
- Harman, D.** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Hartl, F. U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-9.
- Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-8.

- Hayflick, L.** (1965). The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-36.
- Hayflick, L. and Moorhead, P. S.** (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-79.
- Heydari, A. R., Wu, B., Takahashi, R., Strong, R. and Richardson, A.** (1993). Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol* **13**, 2909-18.
- Heydari, A. R., You, S., Takahashi, R., Gutschmann-Conrad, A., Sarge, K. D. and Richardson, A.** (2000). Age-related alterations in the activation of heat shock transcription factor 1 in rat hepatocytes. *Exp Cell Res* **256**, 83-93.
- Höhfeld, J., Cyr, D. M. and Patterson, C.** (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* **2**, 885-90.
- Höhfeld, J. and Jentsch, S.** (1997). GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J* **16**, 6209-16.
- Hornsby, P. J.** (2002). Cellular senescence and tissue aging *in vivo*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**, B251-6.
- Iwasaki, M., Tanaka, R., Hishiya, A., Homma, S., Reed, J. C. and Takayama, S.** (2010). BAG3 directly associates with guanine nucleotide exchange factor of Rap1, PDZGEF2, and regulates cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* **400**, 413-8.
- Jana, N. R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K. and Nukina, N.** (2005). Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem* **280**, 11635-40.
- Jiang, J., Ballinger, C. A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D. M., Höhfeld, J. and Patterson, C.** (2001). CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* **276**, 42938-44.
- Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W. and Goeddel, D. V.** (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* **283**, 543-6.
- Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R.** (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-98.
- Kabbage, M. and Dickman, M. B.** (2008). The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1390-402.
- Kabaya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.** (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-8.

- Kalia, S. K., Lee, S., Smith, P. D., Liu, L., Crocker, S. J., Thorarinsdottir, T. E., Glover, J. R., Fon, E. A., Park, D. S. and Lozano, A. M.** (2004). BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration. *Neuron* **44**, 931-45.
- Klionsky, D. J. and Emr, S. D.** (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717-21.
- Ko, H. S., Bailey, R., Smith, W. W., Liu, Z., Shin, J. H., Lee, Y. I., Zhang, Y. J., Jiang, H., Ross, C. A., Moore, D. J. et al.** (2009). CHIP regulates leucine-rich repeat kinase-2 ubiquitination, degradation, and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2897-902.
- Kopito, R. R.** (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* **79**, S167-73.
- Kraft, C., Peter, M. and Hofmann, K.** (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* **12**, 836-41.
- Kruse, J. P. and Gu, W.** (2008). SnapShot: p53 posttranslational modifications. *Cell* **133**, 930-30 e1.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lam, Y. A., DeMartino, G. N., Pickart, C. M. and Cohen, R. E.** (1997a). Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26S proteasomes. *J Biol Chem* **272**, 28438-46.
- Lam, Y. A., Xu, W., DeMartino, G. N. and Cohen, R. E.** (1997b). Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* **385**, 737-40.
- Landry, J., Bernier, D., Chretien, P., Nicole, L. M., Tanguay, R. M. and Marceau, N.** (1982). Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res* **42**, 2457-61.
- Lee, J. H., Takahashi, T., Yasuhara, N., Inazawa, J., Kamada, S. and Tsujimoto, Y.** (1999). Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene* **18**, 6183-90.
- Lee, Y. K., Liu, D. J., Lu, J., Chen, K. Y. and Liu, A. Y.** (2009). Aberrant regulation and modification of heat shock factor 1 in senescent human diploid fibroblasts. *J Cell Biochem* **106**, 267-78.
- Leng, R. P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J. M., Lozano, G., Hakem, R. and Benchimol, S.** (2003). Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**, 779-91.
- Lim, Y., Lee, E., Lee, J., Oh, S. and Kim, S.** (2008). Down-regulation of asymmetric arginine methylation during replicative and H₂O₂-induced premature senescence in WI-38 human diploid fibroblasts. *J Biochem* **144**, 523-9.

- Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. and Johnson, T. E.** (1995). Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7540-4.
- Luders, J., Demand, J. and Höhfeld, J.** (2000). The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem* **275**, 4613-7.
- Luders, J., Demand, J., Schonfelder, S., Frien, M., Zimmermann, R. and Höhfeld, J.** (1998). Cofactor-induced modulation of the functional specificity of the molecular chaperone Hsc70. *Biol Chem* **379**, 1217-26.
- Lukiw, W. J.** (2007). Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* **18**, 297-300.
- Lundberg, A. S., Hahn, W. C., Gupta, P. and Weinberg, R. A.** (2000). Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 705-9.
- Marx, J.** (2002). Cell biology. Ubiquitin lives up to its name. *Science* **297**, 1792-4.
- Massey, A. C., Kiffin, R. and Cuervo, A. M.** (2006). Autophagic defects in aging: looking for an "emergency exit"? *Cell Cycle* **5**, 1292-6.
- Mayer, M. P. and Bukau, B.** (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 670-84.
- Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M. and Cyr, D. M.** (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**, 100-5.
- Meiners, S. and Eickelberg, O.** (2012). What shall we do with the damaged proteins in lung disease? Ask the proteasome! *Eur Respir J*.
- Meissner, W. W.** (1967). Hippocampus and learning. *Int J Neuropsychiatry* **3**, 298-310.
- Melk, A., Ramassar, V., Helms, L. M., Moore, R., Rayner, D., Solez, K. and Halloran, P. F.** (2000). Telomere shortening in kidneys with age. *J Am Soc Nephrol* **11**, 444-53.
- Michael, D. and Oren, M.** (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* **13**, 49-58.
- Min, J. N., Whaley, R. A., Sharpless, N. E., Lockyer, P., Portbury, A. L. and Patterson, C.** (2008). CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol* **28**, 4018-25.
- Mizushima, N.** (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2491-502.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. and Levine, B.** (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-26.

- Mizushima, N., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y.** (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 107-32.
- Morimoto, R. I.** (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**, 1409-10.
- Morris, R. G., Inglis, J., Ainge, J. A., Olverman, H. J., Tulloch, J., Dudai, Y. and Kelly, P. A.** (2006). Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* **50**, 479-89.
- Mortimore, G. E. and Poso, A. R.** (1987). Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr* **7**, 539-64.
- Muchowski, P. J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E. E., Hayer-Hartl, M. K. and Hartl, F. U.** (2000). Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7841-6.
- Muchowski, P. J. and Wacker, J. L.** (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* **6**, 11-22.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. and Tanaka, K.** (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* **2**, 1133-8.
- Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H. and Toda, T.** (2007). A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 332-40.
- Nichols, W. W., Murphy, D. G., Cristofalo, V. J., Toji, L. H., Greene, A. E. and Dwight, S. A.** (1977). Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* **196**, 60-3.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M. and Smith, J. R.** (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* **211**, 90-8.
- Nuber, U., Schwarz, S. E. and Scheffner, M.** (1998). The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur J Biochem* **254**, 643-9.
- Olovnikov, A. M.** (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* **41**, 181-90.
- Olshansky, S. J. and Rattan, S. I.** (2005). What determines longevity: Metabolic rate or stability? *Discov Med* **5**, 359-62.
- Orenstein, S. J. and Cuervo, A. M.** (2010). Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 719-26.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. and Johansen, T.** (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**, 24131-45.

- Park, W. Y., Park, J. S., Cho, K. A., Kim, D. I., Ko, Y. G., Seo, J. S. and Park, S. C.** (2000). Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem* **275**, 20847-52.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S. P.** (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**, 921-6.
- Petersen, A., Larsen, K. E., Behr, G. G., Romero, N., Przedborski, S., Brundin, P. and Sulzer, D.** (2001). Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* **10**, 1243-54.
- Petrucelli, L., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A., De Lucia, M., McGowan, E., Lewis, J., Prihar, G. et al.** (2004). CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* **13**, 703-14.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36.
- Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, F. U. and Bracher, A.** (2008). Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell* **133**, 1068-79.
- Purvis, J. E., Karhohs, K. W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A. and Lahav, G.** (2012). p53 dynamics control cell fate. *Science* **336**, 1440-4.
- Qian, S. B., McDonough, H., Boellmann, F., Cyr, D. M. and Patterson, C.** (2006). CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature* **440**, 551-5.
- Radford, S. E.** (2000). Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* **25**, 611-8.
- Rajendra, R., Malegaonkar, D., Pungaliya, P., Marshall, H., Rasheed, Z., Brownell, J., Liu, L. F., Lutzker, S., Saleem, A. and Rubin, E. H.** (2004). Topors functions as an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53. *J Biol Chem* **279**, 36440-4.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. and Rubinsztein, D. C.** (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* **12**, 747-57.
- Riordan, J. R.** (1999). Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am J Hum Genet* **64**, 1499-504.
- Ross, C. A. and Poirier, M. A.** (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* **10 Suppl**, S10-7.
- Rubinsztein, D. C.** (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**, 780-6.

- Rudiger, S., Buchberger, A. and Bukau, B.** (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* **4**, 342-9.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C. and Vousden, K. H.** (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 332-7.
- Sager, R.** (1991). Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ Health Perspect* **93**, 59-62.
- Satoh, H., Hiyama, K., Takeda, M., Awaya, Y., Watanabe, K., Ihara, Y., Maeda, H., Ishioka, S. and Yamakido, M.** (1996). Telomere shortening in peripheral blood cells was related with aging but not with white blood cell count. *Jpn J Hum Genet* **41**, 413-7.
- Schneider, C., Sepp-Lorenzino, L., Nimmesgern, E., Ouerfelli, O., Danishefsky, S., Rosen, N. and Hartl, F. U.** (1996). Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14536-41.
- Serrano, F. and Klann, E.** (2004). Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* **3**, 431-43.
- Serrano, M., Hannon, G. J. and Beach, D.** (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-7.
- Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H. and Dikic, I.** (2013). Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ* **20**, 21-30.
- Shein, H. M. and Enders, J. F.** (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 1164-72.
- Shin, Y., Klucken, J., Patterson, C., Hyman, B. T. and McLean, P. J.** (2005). The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates alpha-synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways. *J Biol Chem* **280**, 23727-34.
- Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H. C., Tzvetkov, N., Young, J. C., Brodsky, J. L., Guerriero, V., Hartl, F. U. and Bracher, A.** (2005). Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol Cell* **17**, 367-79.
- Sisoula, C. and Gonos, E. S.** (2011). CHIP E3 ligase regulates mammalian senescence by modulating the levels of oxidized proteins. *Mech Ageing Dev* **132**, 269-72.
- Sisoula, C., Trachana, V., Patterson, C. and Gonos, E. S.** (2011). CHIP-dependent p53 regulation occurs specifically during cellular senescence. *Free Radic Biol Med* **50**, 157-65.
- Sittler, A., Lurz, R., Lueder, G., Priller, J., Lehrach, H., Hayer-Hartl, M. K., Hartl, F. U. and Wanker, E. E.** (2001). Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **10**, 1307-15.

- Sohal, R. S.** (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* **33**, 37-44.
- Sohal, R. S. and Weindruch, R.** (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59-63.
- Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Höhfeld, J., Hartl, F. U. and Moarefi, I.** (2001). Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* **291**, 1553-7.
- Soti, C. and Csermely, P.** (2000). Molecular chaperones and the aging process. *Biogerontology* **1**, 225-33.
- Stein, G. H., Beeson, M. and Gordon, L.** (1990). Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* **249**, 666-9.
- Sultana, R., Banks, W. A. and Butterfield, D. A.** (2010). Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of Bcl2 and Caspase 3 in hippocampus from subjects with amnesic mild cognitive impairment: insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of A β , and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **88**, 469-77.
- Takayama, S., Krajewski, S., Krajewska, M., Kitada, S., Zapata, J. M., Kochel, K., Knee, D., Scudiero, D., Tudor, G., Miller, G. J. et al.** (1998). Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* **58**, 3116-31.
- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J. A. and Reed, J. C.** (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**, 279-84.
- Takayama, S., Xie, Z. and Reed, J. C.** (1999). An evolutionary conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* **274**, 781-6.
- Takubo, K., Izumiyama-Shimomura, N., Honma, N., Sawabe, M., Arai, T., Kato, M., Oshimura, M. and Nakamura, K.** (2002). Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* **37**, 523-31.
- Tamura, T., Tamura, N., Cejka, Z., Hegerl, R., Lottspeich, F. and Baumeister, W.** (1996). Tricorn protease-the core of a modular proteolytic system. *Science* **274**, 1385-9.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C. M.** (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**, 94-102.
- Todde, V., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J.** (2009). Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 3-13.
- Tooze, S. A. and Yoshimori, T.** (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* **12**, 831-5.

- Toussaint, O., Medrano, E. E. and von Zglinicki, T.** (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* **35**, 927-45.
- Tripathi, V., Ali, A., Bhat, R. and Pati, U.** (2007). CHIP chaperones wild type p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **282**, 28441-54.
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y.** (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169-74.
- Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M. and Hartl, F. U.** (2010). Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a004390.
- Wang, H. Q., Zhang, H. Y., Hao, F. J., Meng, X., Guan, Y. and Du, Z. X.** (2008). Induction of BAG2 protein during proteasome inhibitor-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Br J Pharmacol* **155**, 655-60.
- Waterston, R. H., Thomson, J. N. and Brenner, S.** (1980). Mutants with altered muscle structure of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **77**, 271-302.
- Westerheide, S. D. and Morimoto, R. I.** (2005). Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem* **280**, 33097-100.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. and Gottesman, S.** (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-93.
- Williams, G. C.** (1957). Pleiotropy, natural-selection, and the evolution of senescence. *Evolution* **11**, 398-411.
- Wright, W. E. and Shay, J. W.** (2001). Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 98-103.
- Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D. and Peng, J.** (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133-45.
- Xu, W., Marcu, M., Yuan, X., Mimnaugh, E., Patterson, C. and Neckers, L.** (2002). Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12847-52.
- Xu, Z., Kohli, E., Devlin, K. I., Bold, M., Nix, J. C. and Misra, S.** (2008a). Interactions between the quality control ubiquitin ligase CHIP and ubiquitin conjugating enzymes. *BMC Struct Biol* **8**, 26.
- Xu, Z., Page, R. C., Gomes, M. M., Kohli, E., Nix, J. C., Herr, A. B., Patterson, C. and Misra, S.** (2008b). Structural basis of nucleotide exchange and client binding by the Hsp70 cochaperone Bag2. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1309-17.

Yang, L., Suwa, T., Wright, W. E., Shay, J. W. and Hornsby, P. J. (2001). Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells. *Mech Ageing Dev* **122**, 1685-94.

Zeiner, M., Niyaz, Y. and Gehring, U. (1999). The Hsp70-associating protein Hap46 binds to DNA and stimulates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10194-9.

Zhang, J., Lou, X., Yang, S., He, S., Yang, L., Liu, M., Zhu, H., Shan, Q., Su, S., Zhan, Q. et al. (2012). BAG2 is a target of the c-Myc gene and is involved in cellular senescence via the p21(CIP1) pathway. *Cancer Lett* **318**, 34-41.

Zhang, X. P., Liu, F. and Wang, W. (2011). Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8990-5.

Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E. and Hendrickson, W. A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**, 1606-14.

Zur Hausen, H. (1967). Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol* **1**, 1174-85.

7. ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Energetik der Proteinfaltung und Aggregation.....	2
Abbildung 2: Modell zur Chaperon-assoziierten Proteinbiosynthese in Eukarya.....	5
Abbildung 3: Der HP72/HSC70 Reaktionszyklus.....	6
Abbildung 4: Das Cochaperon Carboxy-Terminus von HSP70-interagierende Protein (CHIP).....	12
Abbildung 5: Domänenstruktur der BCL2-assoziierte Athanogen (BAG)-Proteinfamilie. ...	15
Abbildung 6: Modell zur antagonistischen Regulation der Chaperonaktivität durch BAG2 und BAG1.	17
Abbildung 7: Einfluss von BAG2 auf die CHIP-vermittelte Ubiquitinierung im HEK-293T Zellmodell.....	50
Abbildung 8: BAG2 beeinflusst endogene HSP72-Proteinspiegel.....	52
Abbildung 9: Im Komplex mit HSP72 inhibiert BAG2 die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP.....	54
Abbildung 10: Einfluss einer BAG2-Überexpression auf die Hitzeschockantwort in IMR-90 Zellen.....	56
Abbildung 11: Einfluss von BAG2 auf das Zellüberleben im chronischen Hitzestress.....	57
Abbildung 12: Wachstumskurve einer IMR-90 Fibroblastenkultur.....	58
Abbildung 13: Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidaseaktivität.....	59
Abbildung 14: Seneszenz-assoziierte Veränderung der Proteinspiegel bestimmter Altersmarker.....	60
Abbildung 15: HSP72 liegt in seneszenten Fibroblasten weniger ubiquitiniert vor als in jungen Zellen.....	61
Abbildung 16: CHIP-Aktivität ist in seneszenten Zellen weiterhin durch BAG2 modulierbar.....	62
Abbildung 17: Erniedrigte BAG2-Proteinspiegel reduzieren den p53-Proteingehalt in seneszenten Fibroblasten.....	64
Abbildung 18: Im zellulären Alterungsmodell sind die Proteinspiegel von CHIP und BAG2 erhöht und von HSPBP1 reduziert.....	65
Abbildung 19: Im Modell der induzierten Seneszenz sind die Proteinspiegel von CHIP und BAG2 erhöht, von HSPBP1 reduziert.....	66

Abbildung 20: BAG2-Proteinspiegel werden zellzyklusabhängig reguliert.	66
Abbildung 21: Regulation der Cochaperone BAG2, HSPBP1 und CHIP <i>in vivo</i>	68
Abbildung 22: In Kurzzeitparadigmen des oxidativen Stresses bleiben BAG2- und.....	69
HSPBP1-Proteinspiegel unverändert.	69
Abbildung 23: Keine kompensatorische Regulation von BAG2 und HSPBP1.....	70
Abbildung 24: Modell zur Funktion von BAG2 in der Proteinqualitätskontrolle und.....	84
deren Bedeutung in der zellulären Alterung.	84

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Plasmide	26
Tabelle 2: <i>Small interfering</i> RNA (siRNA)-Sequenzen.....	27
Tabelle 3: Zusammensetzung der Bis-Tris Gele (für ein 1,5 mm Gel).....	30
Tabelle 4: In Western Blot-Analysen verwendete primäre Antikörper	32
Tabelle 5: Oligonukleotide zur Konstruktion der Expressionsplasmide.....	36
Tabelle 6: Oligonukleotide zur Sequenzierung	40
Tabelle 7: Oligonukleotide zur gerichteten Mutagenese von pCHIP-N1	41
Tabelle 8: Oligonukleotide zur quantitativen Echtzeit-PCR.....	44

7.3 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
A	gealtert/seneszent
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	BCL2-assoziiertes Athanogen

BCA	Bicinchonininsäure
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BNB	<i>brand new bag</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-terminal	carboxyterminal
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	<i>cystic fibrosis conductance regulator</i>
CHIP	C-Terminus von HSP70-interagierendes Protein
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Coimmunpräzipitation
Cop1	<i>constitutive photomorphogenesis protein 1</i>
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	ultrareines Wasser (Elektrischer Widerstand > 18.2 MW cm, bei 25 °C; Organischer Kohlenstoff < 5 ppb)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dT	Desoxythymidin
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced grün fluoreszierendes Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i> (Latein: und andere)

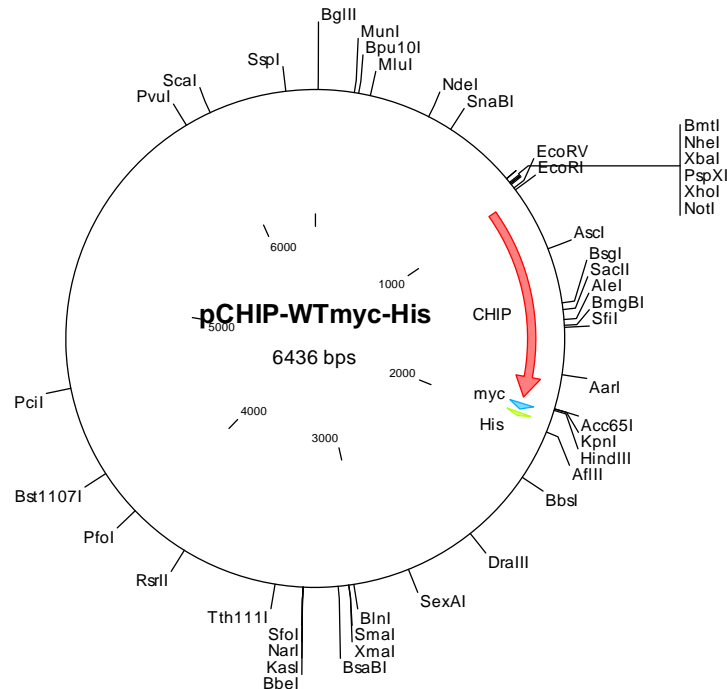
FBS	fötales bovines Serum
FES1	<i>factor exchange for SSA1 protein 1</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	<i>human influenza hemagglutinin</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIP	HSP70-interagierendes Protein
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
HOP	HSP70/HSP90-organisierendes Protein
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HS	Hitzestress
HSC	<i>heat shock cognate</i>
HSF1	Hitzeschockfaktor 1
HSP	Hitzeschockprotein
HSPBP1	HSP70 Bindeprotein 1
IgG	Immunglobulin G
J	jung/proliferierend
k	konfluent
Kat.-Nr.	Katalognummer
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LAMP-2A	lysosomenassoziiertes Membranprotein 2A
LB	<i>lysogeny broth</i>
LRRK-2	<i>leucin-rich repeat kinase-2</i>
m	Masse
M	molare Masse/molar
Mdm2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Ms	Maus
MTOC	mikrotubulibildendes Zentrum
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N-terminal	aminoterminal
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NAC	<i>nascent chain associated complex</i>
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
NEF	<i>nucleotide exchange factor</i>
nm	Nanometer
ns	<i>nonsense</i>
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDL	<i>population doubling levels</i>
PFD	Prefoldin
Pirh2	<i>p53-induced protein with a RING-H2 domain</i>
Poly-A	Polyadenin
prol	proliferierend
qPCR	quantitative PCR
RAC	<i>ribosome associated complex</i>
Rb	Retinoblastomprotein
rel.	relative
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>

RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
S.E.M.	<i>standard error of the mean</i>
s.u.	siehe unten
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
sen	seneszent
sHSPs	<i>small heat shock proteins</i>
SIPS	<i>stress-induced premature senescence</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sk	subkonfluent
SOC	<i>super optimal broth</i> Medium mit 20 mM Glucose
SOD	Superoxiddismutase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOPORS	<i>Topoisomerase I binding protein</i>
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
TRiC	TCP-1 Ring Komplex
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
u.a.	unter anderem
U	<i>units</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
Verd.	Verdünnung
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7.4 Plasmidkarten und Sequenzen

7.4.1 Vektor pCHIP-WTmyc-His



```

1  gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcaactct cagtacaatc tgctctgatg
61  ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg
121 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc
181 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt
241 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata
301 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc
361 cccgccatt  gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcccaata gggactttcc
421 attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt
481 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt
541 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca
601 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaatcaa tgggcgtgga tagcggtttg
661 actcacgggg atttccaagt ctcccaccca ttgacgtcaa tgggagttyg tttttggcacc
721 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgtg acaactccgc cccattgacg ccaatggcgc
781 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca
841 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacccaa gctggctagc
901 gtttaaacgg gccctctaga ctcgagcggc cgccactgtg ctggatatct gcagaattcc
961 accacactgg actagtggat catgaagggc aaggaggaga aggagggcgg cgcacggctg
1021 ggcgctggcg gcggaagccc cgagaagagc ccgagcgcgc aggagctcaa ggagcagggc
1081 aatcgtctgt tcgtgggccc aaagtaccgc gaggcggcgg cctgctacgg ccgctgatc
1141 acccggaacc cgctggtggc cgtgtattac accaaccggg ccttgctgta cctgaagatg
1201 cagcagcacg agcaggccct ggccgactgc cggcgcgccc tggagctgga cgggcagtct
1261 gtgaaggcgc acttcttctt ggggcagtgc cagctggaga tggagagcta tgatgaggcc
1321 atcgccaatc tgcagcgcgc ttacagcctg gccaaaggagc agcggctgaa cttcggggac
1381 gacatcccca gcgctcttcg aatcgcgaa gagaagcgc ggaacagcat tgaggagcgg
1441 cgcateccac aggagagcga gctgcaactc tacctctcca ggctcattgc cgcggagcgt
1501 gagagggagc tggaaagagt ccagcgaaac cacgagggtg atgaggacga cagccacgtc
1561 cgggcccagc aggcctgcat tgaggccaag cacgacaagt acatggcggg catggacgag
1621 cttttttctc aggtggatga gaagaggaag aagcgagaca tccccgacta cctgtgtggc
1681 aagatcagct ttgagctgat gcgggagccg tgcatacgc ccagtggcat cacctacgac
1741 cgcaaggaca tcgaggagca cctgcagcgt gtgggtcatt ttgaccccg gacccggagc
1801 cccctgaccc aggaacagct catcccacac ttggctatga aggaggttat tgacgcattc

```

1861 atctctgaga atggctgggt ggaggactac ggatccgagc tcggtaccaa gcttgggccc
1921 gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg aatagcgcg tcgaccatca tcatcatcat
1981 cattgagttt aaacgggtctc cagcttaagt ttaaaccgct gatcagcctc gactgtgcct
2041 tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgctgc cttccttgac cctggaaggt
2101 gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg
2161 tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac
2221 aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt ctgaggcgga aagaaccagc
2281 tggggctcta gggggtatcc ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg
2341 gtggttacgc gcagcgtgac cgtacactt gccagcgc ctagcgcgc cctttcgt
2401 ttcttccctt cctttctcgc cagcttcgccc ggccttcccc gtcaagctc aaactcgggg
2461 ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaaa acttgattag
2521 ggtgatgggt cacgtagtgg gccatcgc tgatagacgg ttttctgccc tttgacgttg
2581 gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc
2641 tcggtctatt cttttgattt ataagggtt ttgcccattt cggcctattg gttaaaaaat
2701 gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt cagttagggg
2761 gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt
2821 cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc
2881 atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc cctaactcc gcccatccc cccctaactc
2941 cgcccagttc cgcccattct ccgcccctat gctgactaat tttttttatt tatgcagagg
3001 ccgaggccgc ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc
3061 taggcttttg caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat tttcggatct gatcaagaga
3121 caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcagg tctccggccg
3181 cttgggtgga gaggtatct ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg
3241 ccgcccgtgt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgcaag accgacctgt
3301 ccggtgcctt gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg
3361 gcgttccctg cgcagctgtg ctgcagcttg tcaactgaagc ggggaaggga tggctgctat
3421 tggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaagtat
3481 ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tcccattcgc
3541 accaccaagc gaaacatcgc atcgcgcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtctgtcgc
3601 atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc
3661 tcaaggcgcg catgcccgc ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc
3721 cgaatatcat ggtggaaaaat ggccgctttt ctggattcat cgcactgtggc cggctgggtg
3781 tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgta tattgctgaa gagcttggcg
3841 gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgcctccgat tgcagcgca
3901 tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggg tcgaaatgac
3961 cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccc ccttctatga
4021 aagggtgggc ttcggaatcg ttttccggga cgcggctgg atgatcctcc agcgcgggga
4081 tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia
4141 ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg
4201 tggtttgtcc aaactcatca atgtatotta tcatgtctgt ataccgctga cctctagcta
4261 gagcttggcg taatcatggt catagctgtt tcctgtgtga aattgttatc cgtcacaat
4321 tccacacaa atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag
4381 ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg
4441 ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc
4501 ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgc ctggctcgtt cggctcggc caggcgtatc
4561 agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa
4621 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt
4681 tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg
4741 gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtcgc
4801 ctctcctggt ccgaccctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag
4861 cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgctcgtc
4921 caagctgggc tgtgtgcacg accccccgt tcagcccgc cgtcgcgct tatccggtaa
4981 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg
5041 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gaggctctga agtggtggcc
5101 taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatctgc gctctgctga agccagttac
5161 cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaaa accaccgctg gtagcgggtg
5221 tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt
5281 gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaaa tcacgttaag ggattttggt
5341 catgagatta tcaaaaagga tcttcaacta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa
5401 atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gctgacagt taccaatgct taatcagtga
5461 ggcacctatc tcagcgatct gtctatctgc ttcacataa gttgctgac tccccgctc
5521 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggccc agtgctgcaa tgataccgcg
5581 agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaaggccgca

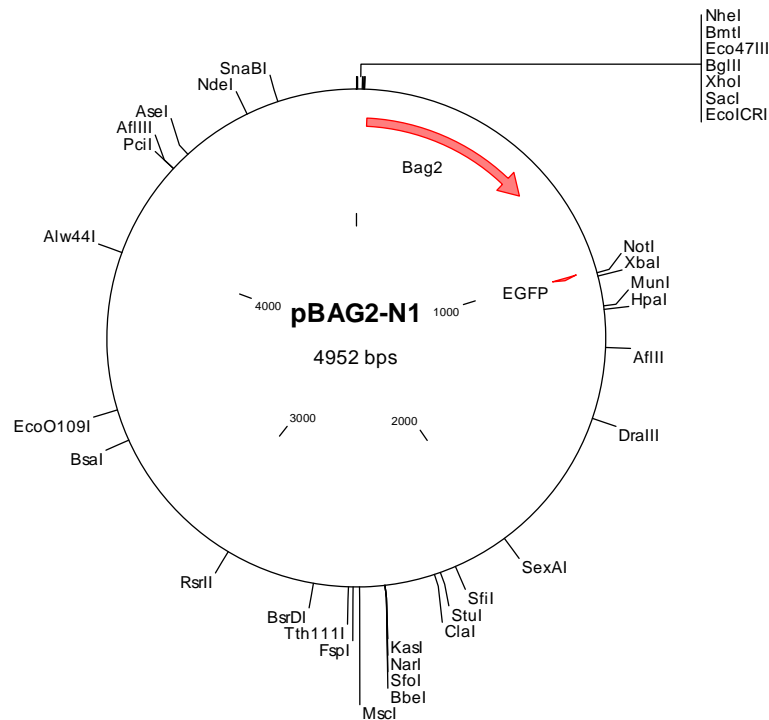
5641 ggcgagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccgga
5701 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg
5761 catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttgggtat ggcttcattc agctccgggtt cccaacgatc
5821 aaggcgagtt acatgatccc ccatggttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc
5881 gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atgggttatgg cagcactgca
5941 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac
6001 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacgy
6061 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacggtcttc
6121 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg
6181 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac
6241 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggggat aagggcgaca cggaaatggt gaatactcat
6301 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggg tattgtctca tgagcggata
6361 catatgtgaa tgtatttaga aaaataaaca aatagggggt ccgcgcacat ttccccgaaa
6421 agtgccacct gacgtc

Sequenz von pCHIP-D253N/R254Gmyc-His (Punktmutationen sind grau unterlegt)

1 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg
61 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg
121 cgagcaaaat ttaagctaca acaagccaag gcttgaccga caattgcatc aagaatctgc
181 ttagggttag gcgttttgcy ctgcttcgcy atgtacgggc cagatatacy cgttgactat
241 gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacggggtc attagttcat agcccatata
301 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc
361 cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc
421 attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgccc cttggcagta catcaagtgt
481 atcatatgcc aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt
541 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca
601 tcgctattac catgggtgat cggttttggc agtacaatca tgggcgtgga tagcggtttg
661 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc
721 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcy
781 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca
841 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc
901 gtttaaacgg gccctctaga ctcgagcggc cgccactgtg ctggatatct gcagaattcc
961 accacactgg actagtggat catgaagggc aaggaggaga aggagggcgg cgcacggctg
1021 ggcgctggcg gcggaagccc cgagaagagc ccgagcgcgc aggagctcaa ggagcagggc
1081 aatcgtctgt tcgtgggccc aaagtaccgc gaggcggcgg cctgctacgg ccgctgatc
1141 acccggaacc cgtcgggtggc cgtgtattac accaaccggg ccttgtgcta cctgaagatg
1201 cagcagcacg agcagcccct gggccagctc cggcgcgcc tggagctgga gggcagctc
1261 gtgaagggcg acttcttctt ggggcagtg cagctggaga tggagagcta tgataggtcc
1321 atcgccaatc tgcagcgcgc ttacagcctg gccaaaggagc agcggctgaa cttcggggac
1381 gacatcccca gcgctcttcg aatcgcaag aagaagcgtt ggaacagcat tgaggagcgg
1441 cgcattccacc aggagagcga gctgcaactc tacctctcca ggctcattgc cgcggagcgt
1501 gagagggagc tggaaagagt ccagcgaaac cacgaggggt atgaggacga cagccacgtc
1561 cgggcccagc aggcctgcat tgaggccaag cacgacaagt acatggcggg catggacgag
1621 cttttttctc aggtggatga gaagaggaag aagcagaca tccccgacta cctgtgtggc
1681 aagatcagct ttgagctgat gcgggagccg tgcatacgc ccagtggcat cacctacaac
1741 ggcaaggaca tcgaggagca cctgcagcgt gtgggtcatt ttgaccccg gaccggagc
1801 cccctgacc aggaacagct catccccaac ttggctatga aggaggttat tgacgattc
1861 atctctgaga atggctgggt ggaggactac ggatccgagc tcggtaccaa gcttggggcc
1921 gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg aatagcgcgc tcgaccatca tcatcatcat
1981 cattgagttt aaacggtctc cagcttaagt ttaaaccgct gatcagcctc gactgtgcct
2041 tctagttgcc agccatctgt tgtttgccc tccccgctg cttccttgac cctggaaggt
2101 gccactccca ctgtcctttc ctaataaaaat gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg
2161 tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac
2221 aatcagcagc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt ctgagggcga aagaaccagc
2281 tggggctcta ggggggatcc ccagcgcgcc tctagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg
2341 gtggttacgc gcagcgtgac cgtacactt gccagcgcgc tagcggccgc tcccttcgct
2401 ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg
2461 ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag
2521 ggtgatgggt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg
2581 gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc
2641 tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat

2701 gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt cagttagggt
 2761 gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt
 2821 cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc
 2881 atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc
 2941 cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg
 3001 ccgaggccgc ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc
 3061 taggcttttg caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat tttcggatct gatcaagaga
 3121 caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcagg tctccggccg
 3181 cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg
 3241 ccgccgtggt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt
 3301 ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg
 3361 gcggtccttg cgcagctgtg ctgcagcttg tcaactgaagc ggggaagggac tggctgctat
 3421 tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat
 3481 ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg
 3541 accaccaagc gaaacatcgc atcagagcag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgctg
 3601 atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc
 3661 tcaaggcgcg catgcccgcg ggcgaggatc tcgctgtgac ccatggcgat gcctgcttgc
 3721 cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg
 3781 tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgta tattgctgaa gagcttggcg
 3841 gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca
 3901 tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggg tcgaaatgac
 3961 cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg ccttctatga
 4021 aaggttgggc ttcggaatcg ttttcgggga cgccggctgg atgatcctcc agcgcgggga
 4081 tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia
 4141 ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgct attctagttg
 4201 tggtttgctc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgt ataccgtcga cctctagcta
 4261 gagctggcg taatcatggt catagctggt tctgtgtgta aattgttatc agtgcacaat
 4321 tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtcct aatgactgag
 4381 ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgcttcc cagtcgggaa acctgctgctg
 4441 ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgctga ttgggcgctc
 4501 ttcgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg ctccggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc
 4561 agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa
 4621 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa aaggccgcgt tgctggcgtt
 4681 tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg
 4741 gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg
 4801 ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaa
 4861 cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtag tcgctcgtc
 4921 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgc cgctgcgctt tatccggtaa
 4981 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg
 5041 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga agtggtggcc
 5101 taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatctgct gctctgctga agccagttac
 5161 cttcggaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtacgggtg
 5221 tttttttggt tgcaagcagc agattacgcy cagaaaaaa ggatctcaag aagatccttt
 5281 gatctttct acggggtctg acgctcagty gaacgaaaac tcacgttaa ggaatttgg
 5341 catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttaa aattaaat taagttttaa
 5401 atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taactcagtga
 5461 ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcacccata gttgcctgac tccccgctc
 5521 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg
 5581 agaccacgc tcaccggctc cagatttata agcaataaac cagccagccg gaagggccga
 5641 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga
 5701 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg
 5761 catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggat ggcttcattc agctccgggt cccaacgatc
 5821 aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcy gttagctcct tcggtcctcc
 5881 gatcgttgtc agaagtaagt tggcgcagc gttatcactc atggttatgg cagcactgca
 5941 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac
 6001 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccccg cgtcaatac
 6061 ggataatacc gcgccacata gcgaaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc
 6121 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcagatg aaccactc
 6181 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaa
 6241 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat
 6301 actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata
 6361 catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgccat tccccgaaa
 6421 agtgccacct gacgctc

7.4.2 Vektor pBAG2-N1



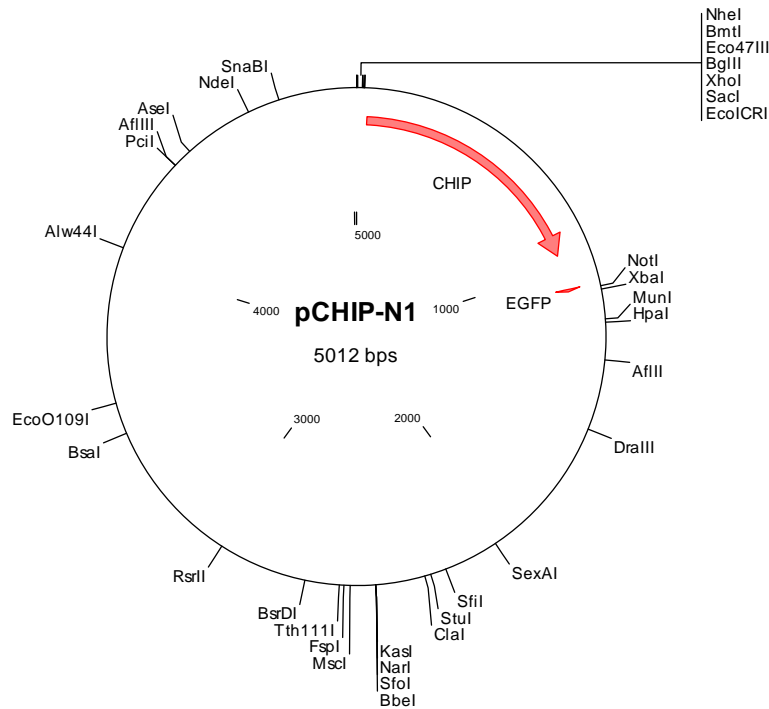
```

1   gctagcgcta cgggactcag atctcgagct caagcttatg gctcaggcga agatcaacgc
61  taaagccaac gggggcgct tctgcccgtc ctctccatg gctgaccgct ccagccgctt
121 gctggagagc ctggaccagc tggagctcag ggttgaagct ttgagagaag cagcaactgc
181 tgttgagcaa gagaaagaaa tccttctgga aatgatccac agtatccaaa atagccagga
241 catgaggcag atcagtgacg gagaaagaga agaattaaat ctgactgcaa accgtttgat
301 gggaagaact ctcaccgctt aagtgtcagt agaaacaatt agaaaccccc agcagcaaga
361 atccctaaag catgccacaa ggattattga tgagggtggtc aataagtttc tggatgattt
421 gggaaatgcc aagagtcatt taatgtcgtc ctacagtgca tgttcatctg aggtgccaca
481 tgggccagtt gatcagaagt ttcaatccat agtaattggc tgtgctcttg aagatcagaa
541 gaaaattaa agaaagattag agactctgct tagaaatatt gaaaactctg acaaggccat
601 caagctatta gagcattcta aaggagctgg ttccaaaact ctgcaacaaa atgctgaaag
661 cagattcaat tagtcttcaa acctaagagc atttacacaa tacacaagggt gtaaaaaatga
721 taaaatacta ttttaattga taactagttc tttgttaggt ataaccactt agttgacact
781 gatagttggt tcagatgagg aaaatattcc atcaagtatc ttcagttttg tgaataacaa
841 aactagcaat attttaatta tctatctaga gattttttag attgaattct tgtcttgtag
901 taggatctag catatttcac tattctgtgg atgaatacat agtttgtggg gaaaacaaac
961 gttcagctag gggcaaaaag catgactgct ttttctgtc tggcatggaa tcacgctgta
1021 caagtaaagc ggccgcgact ctagatcata atcagccata ccacatttgt agaggtttta
1081 cttgctttta aaaacctccc acacctccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt
1141 gttggtgta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca
1201 aatttcacaa ataaagcatt ttttccactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc
1261 aatgtatctt aaggcgtaaa ttgtaagcgt taatattttg ttaaaattcg cgttaaattt
1321 ttgttaaate agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc
1381 aaaagaatag accgagatag ggttgagtgt tgttccagtt tggacaaga gtccactatt
1441 aaagaacgtg gactccaacg tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcaggggc atggccactt
1501 acgtgaacca tcaccctaag caagtttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg
1561 gaaccctaaa gggagccccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag
1621 aaaggaaggg aagaaagcga aaggagcggg cgtaagggcg ctggcaagtg tagcggtcac
1681 gctgcgcgta accaccacac ccgcccgcgt taatgcccgc ctacagggcg cgtcagggtg
1741 cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta ttttctaaa tacattcaaa
1801 tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa
1861 gagtcttgag gcggaaagaa ccagctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc
1921 ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc agcaaccagg
1981 tgtggaaagt ccccaggctc ccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag

```

2041 tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc
 2101 gccattctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc
 2161 tcggcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc
 2221 aaagatcgat caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca
 2281 cgcaggttct cgggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac
 2341 aatcggtcgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg cagggggcgc cggttctttt
 2401 tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcaa gacgaggcag cgcggctatc
 2461 gtggctggcc acgacggggc ttccctgccc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg
 2521 aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctaccttgc
 2581 tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgccc cggctgcata cgcttgatcc
 2641 ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaac acatcgcatc gagcgcagac gtactcggat
 2701 ggaagccggt cttgtcgcac aggatgatct ggacgaagag catcagggggc tcgcgccagc
 2761 cgaactgttc gccaggctca aggcgagcat gcccgcggc gaggatctcg tcgtgacca
 2821 tggcgatgcc tgcttgcgca atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga
 2881 ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat
 2941 tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc
 3001 tcccgatctc cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gagcgggact
 3061 ctggggttcg aatgaccga ccaagcgcag cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc
 3121 accgccgctt tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg
 3181 atcctccagc gcgggggatct catgctggag ttcttcgccc accctagggg gaggctaact
 3241 gaaacacgga aggagacaat accggaagga acccgcgcta tgacggcaat aaaaagacag
 3301 aataaaacgc acggtgttgg gtctgttgtt cataaacgcg gggttcggtc ccagggctgg
 3361 cactctgtcg ataccccc gagacccat tggggccaat acgcccgcgt ttcttctttt
 3421 tccccacccc acccccccaag ttccgggtgaa ggcccagggc tcgcagccaa cgtcggggcg
 3481 gcaggccctg ccatagcctc aggttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat
 3541 ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatcctt
 3601 taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct
 3661 tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac accgtaacca
 3721 gcggtgggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactctt tccgaagg t aactggcttc
 3781 agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc
 3841 aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct
 3901 gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag
 3961 gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc
 4021 tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg
 4081 agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag
 4141 cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcgc ggtttcgcca cctctgactt
 4201 gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgctaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac
 4261 gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttctgcg
 4321 ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgccatgc attagttatt aatagtaatc
 4381 aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt
 4441 aatggcccgc cctggctgac cgcccacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta
 4501 tgttcccata gtaacgcca tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg
 4561 gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga
 4621 cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt
 4681 tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtga tgcggttttg
 4741 gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc
 4801 cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg
 4861 taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat
 4921 aagcagagct ggttttagtga accgtcagat cc

7.4.3 Vektor pCHIP-N1



```

1   gctagcgcta  cgggactcag  atctcgagct  caagcttatg  aagggcaagg  aggagaagga
61  gggcggcgca  cggctgggcg  ctggcggcg  aagccccgag  aagagccga  gcgcgcagga
121 gctcaaggag  cagggcaatc  gtctgttcgt  gggccgaaag  taccgggagg  cggcggcctg
181 ctacggccgc  gtgatcacc  ggaaccgcgt  ggtggccgtg  tattacacca  accgggcctt
241 gtgctacctg  aagatgcagc  agcagcagca  ggccctggcc  gactgccggc  gcgccctgga
301 gctggacggg  cagtctgtga  aggcgcactt  cttcctgggg  cagtgccagc  tggagatgga
361 gagctatgat  gaggccatcg  ccaatctgca  gcgagcttac  agcctggcca  aggagcagcg
421 gctgaacttc  ggggacgaca  tccccagcgc  tcttcgaatc  gcgaagaaga  agcgctggaa
481 cattgaccgc  gagcggcgca  tccaccagga  gagcgcagct  cactcctacc  tctccaggct
541 cattgccgcg  gagcgtgaga  gggagctgga  agagtgccag  cgaaaccacg  aggtgatgta
601 ggacgacagc  cacgtccggg  cccagcaggc  ctgcattgag  gccaaagcac  acaagtacat
661 ggcggacatg  gacgagcttt  tttctcaggt  ggatgagaag  aggaagaagc  gagacatccc
721 cgactacctg  tgtggcaaga  tcagctttga  gctgatgctg  gagccgtgca  tcacgcccag
781 tggcatcacc  tacgaccgca  aggacatcga  ggagcacctg  cagcgtgtgg  gtcattttga
841 ccccgtagcc  cggagcccc  tgaccagga  acagctcatc  cccaacttgg  ctatgaagga
901 ggttattgac  gcattcatct  ctgagaatgg  ctgggtggag  gactactgag  gttccctgcc
961 ctacctggcg  tcctggtcca  ggggagccct  gggcagaagc  ccccgcccc  tatacatagt
1021 ttatgttcct  ggccaccccc  accgcttccc  ccaagttctg  ctggttgact  ctggactgta
1081 caagtaaagc  ggccgcgact  ctgatcata  atcagccata  ccacatttgt  agaggtttaa
1141 cttgctttaa  aaaacctccc  acacctcccc  ctgaacctga  aacataaaat  gaatgcaatt
1201 gttgttgtaa  acttgtttat  tgcagcttat  aatggttaca  aataaagcaa  tagcatcaca
1261 aatttcacaa  ataaagcatt  tttttcactg  cattctagtt  gtggtttgtc  caaactcatc
1321 aatgtatctt  aaggcgtaaa  ttgtaagcgt  taatattttg  ttaaatttcg  cgttaaatct
1381 ttgttaaate  agctcatttt  ttaaccaata  ggccgaaatc  ggcaaaatcc  cttataaatc
1441 aaaagaatag  accgagatag  ggttgagtgt  tgttccagtt  tggacaaga  gtccactatt
1501 aaagaacgtg  gactccaacg  tcaaagggcg  aaaaaccgct  tatcagggcg  atgcccactc
1561 acgtgaacca  tcacccta  caagtttttt  tgggctgagg  tgccgtaaa  cactaaatcg
1621 gaaccctaaa  gggagcccc  gatttagagc  ttgacgggga  aagccggcga  acgtggcgag
1681 aaaggaaggg  aagaaagcga  aaggagcggg  cgctagggcg  ctggcaagtg  tagcggtcac
1741 gctgcgcgta  accaccacac  ccgcgcgcgt  taatgcgccg  ctacagggcg  cgtcaggtgg
1801 cacttttcgg  ggaaatgtgc  gcggaacccc  tatttgttta  tttttctaaa  tacattcaaa
1861 tatgtatccg  ctcatgagac  aataaccctg  ataaatgctt  caataatatt  gaaaaaggaa
1921 gagtctgag  gcggaagaa  ccagctgtgg  aatgtgtgtc  agttaggggtg  tggaaagtcc

```


1981 ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg
 2041 tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag
 2101 tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc gcccagttcc
 2161 gccattctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc
 2221 tcggcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc
 2281 aaagatcgat caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca
 2341 cgcaggttct cgggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac
 2401 aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt
 2461 tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcaa gacgaggcag cgcggctatc
 2521 tggtctggcc acgacgggcg ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg
 2581 aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcaccttgc
 2641 tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc
 2701 ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat
 2761 ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcagggggc tcgcccagc
 2821 cgaactgttc gccaggctca aggcgagcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca
 2881 tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggg ggaatatggc cgcttttctg gattcatcga
 2941 ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat
 3001 tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc
 3061 tcccgatctg cagcgcctcg ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gagcgggact
 3121 ctggggttcg aatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc
 3181 accgccgctt tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg
 3241 atcctccagc gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctagggg gaggctaact
 3301 gaaacacgga aggagacaat accggaagga acccgcgcta tgacggcaat aaaaagacag
 3361 aataaaacgc acggtgttgg gtcgtttgtt cataaacgcg gggttcggtc ccagggctgg
 3421 cactctgtcg ataccccacc gagacccat tggggccaat acgcccgcgt ttcttctttt
 3481 tccccacccc acccccacag ttcgggtgaa gggccagggc tcgcagcaa cgtcggggcg
 3541 gcagccctcg ccatgcctc aggttactca tatatacttt agattgatt aaaaattcat
 3601 ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac aaaaacctt
 3661 taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct
 3721 tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac accgctacca
 3781 gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaagg aactggcttc
 3841 agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc
 3901 aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct
 3961 gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag
 4021 gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc
 4081 tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg
 4141 agaaaggcgg acaggtatcc ggtaaagcggc agggctcggaa caggagagcg cacgagggag
 4201 cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcgg ggtttcgcca cctctgactt
 4261 gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgctcagg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac
 4321 gcggcctttt tacggttctt ggoccttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttctgcg
 4381 ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgccatgc attagttatt aatagtaatc
 4441 aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt
 4501 aatggccccg cctggctgac cgcccacgca ccccccca ttgacgtcaa taatgacgta
 4561 tgtttccata gtaacgcca tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg
 4621 gtaaacctgc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga
 4681 cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt
 4741 tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtga tgcggttttg
 4801 gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc
 4861 cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg
 4921 taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat
 4981 aagcagagct ggttttagtga accgtcagat cc

Sequenz von pCHIP-D253N/R254G-N1 (Punktmutationen sind grau unterlegt)

1 gctagcgccta ccggactcag atctcagact caagcttatg aagggcaagg aggagaagga
 61 gggcggcgca cggctgggcg ctggcggcgg aagccccgag aagagccga gcgcgcagga
 121 gctcaaggag cagggcaatc gtctgttcgt gggccgaaag taccggagg cggcggcctg
 181 ctacggccgc gtgatcacc ggaaccgct ggtggccgtg tattacacca accgggctt
 241 gtgctacctg aagatgcagc agcagagca ggccctggcc gactgccggc gcgccctgga
 301 gctggacggg cagtctgtga aggcgactt ctctctggg cagtgccagc tggagatgga
 361 gagctatgat gaggccatcg ccaatctgca gcgagcttac agcctggcca aggagcagcg
 421 gctgaacttc ggggacgaca tccccagcgc tcttcgaatc gcgaagaaga agcgcctgga

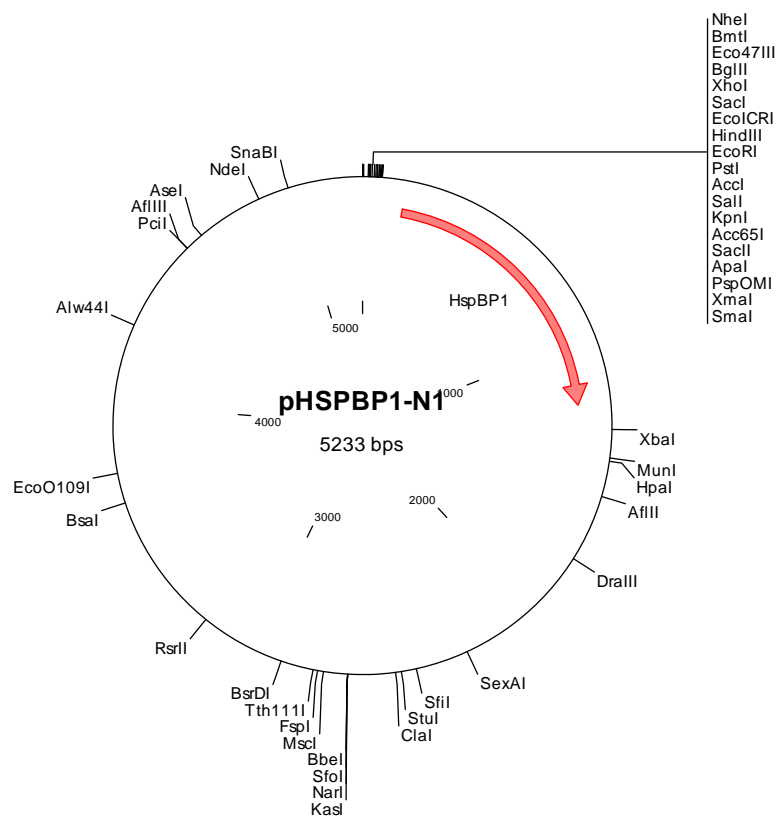
481 cagcattgag gagcggcgca tccaccagga gagcgagctg cactcctacc tctccaggct
 541 cattgccgcy gagcgtgaga gggagctgga agagtgccag cgaaaccacg agggatgatga
 601 ggacgacagc cacgtccggg cccagcaggg ctgcattgag gccaaagcac acaagtacat
 661 ggcggacatg gacgagcttt tttctcaggt ggatgagaag aggaagaagc gagacatccc
 721 cgactacctg tgtggcaaga tcagctttga gctgatgcyg gagccgtgca tcacgcccag
 781 tggcatcacc tacaacggca aggacatcga ggagcacctg cagcgtgtgg gtcattttga
 841 ccccgtagcc cggagccccc tgaccagga acagctcatc cccaacttgg ctatgaagga
 901 ggttattgac gcattcatct ctgagaatgg ctgggtggag gactactgag gttccctgcc
 961 ctacctggcy tccgtgtcca ggggagccct gggcagaagc ccccgcccc tatacatagt
 1021 ttatgttccct gggcaccctg accgcttccc ccaagttctg ctggtggact ctggactgta
 1081 caagtaaagc ggcgcgact ctagatcata atcagccata ccacatttgt agaggtttta
 1141 cttgctttaa aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga aacataaaaat gaatgcaatt
 1201 gttgtttgta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca
 1261 aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc
 1321 aatgtatctt aaggcgtaaa ttgtaagcgt taatattttg ttaaaattcg cgttaaattt
 1381 ttgttaaate agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc
 1441 aaaagaatag accgagatag ggttgagtg tgttccagtt tggacaaga gtccactatt
 1501 aaagaacgtg gactccaacg tcaaagggcg aaaaaccgct tatcagggcy atggcccact
 1561 acgtgaacca tcaccctaata caagtttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg
 1621 gaaccctaaa gggagccccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcygag
 1681 aaaggaaggg aagaaagcga aaggagcggg cyctagggcy ctggcaagtg tagcggtcac
 1741 gctgcgcgta accaccacac ccgcccgcgt taatgcgcyg ctacagggcy cgtcaggtgg
 1801 cacttttcgg ggaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa
 1861 tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa
 1921 gagtccctgag gcggaagaa ccagctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc
 1981 ccaggctccc cagcagggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc agcaaccagg
 2041 tgaggaaatc cccagggctc cccagcagc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag
 2101 tcagcaacca tagtccgcct cctaactcgc ccatccgc ccctaactcc ccaatttcc
 2161 gccatttctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttatt atgcagagggc cgaggccgcy
 2221 tcggcctctg agctattcca gaagtgtga ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc
 2281 aaagatcgat caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca
 2341 cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac
 2401 aatcggtgcy tctgatgcyg ccgtgttccg gctgtcagcy caggggcyg ccggttcttt
 2461 tgtcaagacc gacctgtccg gtgcccgtga tgaactgcaa gacgaggcag cgcggtatc
 2521 gtggctggcc acgacgggcy tcccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg
 2581 aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgc ggggcaggat ctctgtcat ctcccttgc
 2641 tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgttgatcc
 2701 ggctacctgc ccattcgacc accaagcga acatcgcatc gagcagcac gtactcggat
 2761 ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcyccagc
 2821 cgaactgttc gccaggctca aggcgagcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca
 2881 tggcgatgcc tgcttgcgca atatcatggt ggaatggc cgcttttctg gattcatcga
 2941 ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat
 3001 tgctgaagag cttggcggcy aatggctga ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc
 3061 tcccgatctc cagcgcattc ccttctatcg ccttcttgc gacttcttct gagtgggact
 3121 ctggggttcg aaatgaccga ccaagcagcy ccaacctgc catcacgaga tttcgattcc
 3181 accgcccct tctatgaaag gttgggctc ggaatcgtt tccgggagcy cggctggatg
 3241 atcctccagc gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctagggg gaggctaact
 3301 gaaacacgga aggagacaat accggaagga acccgcgcta tgacggcaat aaaaagacag
 3361 aataaaacgc acggtgttgg gtgctttgtt cataaacgcy gggttcggtc ccagggctgg
 3421 cactctgtcg atacccacc gagacccat tggggccaat acgcccgcgt ttcttcttt
 3481 tccccacccc accccccaaag ttgggtgaa ggcccagggc tcgagccaa cgtcggggcy
 3541 gcaggccctg ccatagcctc aggttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat
 3601 ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct
 3661 taacgtgagt tttcgtcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct
 3721 tgagatcctt tttttctgcy cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac accgctacca
 3781 gcgggtggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt aactggcttc
 3841 agcagagcgc agataccaaa tactgtcct ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc
 3901 aagaactctg tagcaccgcy tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct
 3961 gccagtgcyg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag
 4021 gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc
 4081 tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccagcct tccgaaggg
 4141 agaaagcgg acaggtatcc ggtaaagcgg agggctggaa caggagagcy cagaggggag
 4201 cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtccgtcgg ggtttcgcca cctctgactt

```

4261 gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac
4321 gcggcctttt tacgggttctt ggcctttttg tggccttttg ctcacatggt ctttcttgcg
4381 ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgccatgc attagttatt aatagtaatc
4441 aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcggttacat aacttacggg
4501 aatggcccgc cctgggtgac cgcccacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta
4561 tgttcccata gtaacgcca tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatattacg
4621 gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga
4681 cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt
4741 tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtg tgcggttttg
4801 gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc
4861 cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg
4921 taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat
4981 aagcagagct ggttttagtga accgtcagat cc

```

7.4.4 Vektor pHSPBP1-N1



```

1 gctagcgcta ccggactcag atctcgagct caagcttoga attctgcagt cgacggtacc
61 gcgggcccgg gatcatcagg acgccagagc tgcttcagcg gtgaccacct tctccctcta
121 acacattctt cccttcttca caaacggccc atgtcagacg aaggctcaag ggggagccgc
181 ctgcccctgg cgctgcccc ggccctccag ggttgctctt cagggggcgg cggcggcggc
241 tcctcggtcg ggggctcggg caattcccgg cccccacgca acctccaagg ctgtctgcag
301 atggccatca ccgcgggctc tgaagagcca gacctcctc cagaaccgat gaggtagggag
361 aggcgtcagt ggctgcagga ggccatgtcg gctgccttcc gaggccagcg ggaggagggtg
421 gagcagatga agagctgcct ccgagtgtcg tcacagccca tgccccccac tgctggggag
481 gccgagcagg cggccgacca gcaagagcga gagggggccc tggagctgct ggccgacctg
541 tgtgagaaca tggacaatgc cgcagacttc tgccagctgt ctggcatgca cctgctgggtg
601 ggccggtacc tggaggcggg ggctgcggga ctgcgggtgg gggcggcaca gctcatcggc
661 acgtgcagtc agaacgtggc agccatccag gagcagggtg tgggcctggg tgccctgcgt
721 aagctgctgc ggctgctgga ccgcgacgcc tgcgacacgg tgcgctcaa ggccctcttc
781 gccatctcct gtctggtccg agagcaggag gctgggctgc tgcagttcct ccgcctggac

```

841 ggcttctctg tgttgatgag ggccatgcag cagcaggtgc agaagctcaa ggtcaaatca
 901 gcattcctgc tgcagaacct gctgggtgggc caccctgaac acaaagggac cctgtgctcc
 961 atggggatgg tccagcagct ggtggccctg gtgcgagacag agcacagccc cttccacgag
 1021 cacgtgcttg gagccctgtg cagcctgggtg acagactttc cgcaggggtg gcgcgagtgt
 1081 cgggagccgg aactgggcct ggaggagctc ctccgccacc gctgtcagct gctgcagcag
 1141 catgaggagt accaggagga gctggagttc tgtgaaaagc tgctacagac ctgtttctcc
 1201 agcccagcgg acgacagcat ggatcgggtga aaccaggtgg cttcttgccc ccttctccgt
 1261 ggaacccca ggccctcttg ctcctcccc acctacaagg cctctccca aggccgagc
 1321 tctagatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc
 1381 cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttggtgtt aacttgctta
 1441 ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat
 1501 ttttttctact gcattctagt tgtgggtttgt ccaaactcat caatgtatct taaggcgtaa
 1561 attgtaagcg ttaatatattt gttaaaattc gcgttaaat tttgttaaat cagctcattt
 1621 tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc ccttataaat caaaagaata gaccgagata
 1681 ggggttgagt ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt ggactccaac
 1741 gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc gatggcccac tacgtgaacc atcacctaa
 1801 tcaagttttt tggggctgag gtgcccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc
 1861 cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga gaaaggaagg gaagaaagcg
 1921 aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcgggtca cgctgcgctg aaccaccaca
 1981 cccgccgccc ttaatgcgcc gctacagggc gcgctaggtg gcacttttcg gggaaatgtg
 2041 cgcggaacct ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga
 2101 caataacctt gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtcctga ggcggaaaaga
 2161 accagctgtg gaatgtgtgt cagttagggg gtggaaaagtc cccaggtccc ccagcaggca
 2221 gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaaag tccccaggct
 2281 ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc
 2341 ccctaactcc gcccaatccc cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg
 2401 gctgactaat tttttttatt tatgcagagg cggagggcgc ctggcctct ctgctattcc
 2461 agaagtagtg agggaggctt tttggaggcc taggcttttg caaagatcga tcaagagaca
 2521 ggatgaggat cgtttcgcct gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct
 2581 tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc
 2641 gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc
 2701 ggtgccctga atgaactgca agacgaggca gcgcggtat cgtggctggc cacgacgggc
 2761 gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg
 2821 ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgcccga gaaagtatcc
 2881 atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac
 2941 caccaagcga aacatcgcct cgagcagaca cgtactcggg tggagccgg tcttgctgat
 3001 caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcccag ccgaactggt cgccaggctc
 3061 aaggcgagca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg
 3121 aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg
 3181 gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc
 3241 gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcctc
 3301 gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg
 3361 accaagcgcg gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa
 3421 tcttgggctt cggaatcgtt ttccgggagc ccggctggat gatcctccag cgcggggatc
 3481 tcatgtgga gttcttcgcc caccctaggg tgaaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa
 3541 taccggaagg aaccgcgct atgacggcaa taaaagaca gaataaacg cacggtgttg
 3601 ggtcgtttgt tcataaacgc ggggttcggt cccagggctg gcactctgtc gataccccac
 3661 cgagacccca ttggggccaa tacgcccggc tttcttctt tccccacc cccccccaa
 3721 gttcgggtga aggccaggg ctgcagcca acgtcggggc ggcaggccct gccatagcct
 3781 caggttactc atataactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct
 3841 aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc
 3901 actgagcgtc agaccccgtg gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctg
 3961 gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt tgtttgcccg
 4021 atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa
 4081 atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc
 4141 ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt
 4201 gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tccggctgaa
 4261 cgggggggtc gtgcacacag cccagcttg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc
 4321 tacagcgtga gctatgagaa agcgcacagc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc
 4381 cggtaagcgg cagggctcgg acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaacgcct
 4441 ggtatcttta tagtctgtc ggggttccgc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat
 4501 gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgcccagca cgcggccttt ttacggttcc
 4561 tggccttttg ctggcccttt gctcacatgt tcttctgc gttatcccct gattctgtgg

4621 ataaccgtat taccgccatg cattagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt
4681 catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga
4741 ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca
4801 atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccaactggca
4861 gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac cccctattg acgtcaatga cggtaaattg
4921 cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc
4981 tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt
5041 ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt
5101 ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg
5161 acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tggtttagtg
5221 aaccgtcaga tcc

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den

Publikationen

Schönbühler, B., Schmitt, V., Huesmann, H., Kern, A., Gamedinger, M., Behl, C. BAG2 function and regulation of C-terminus of HSP70-interacting protein (CHIP) activity in the context of cellular aging. Manuskript zur Publikation eingereicht.

Kern, A., Ackermann, B., Clement, A.M., Duerk, H., Behl, C. (2010). HSF1-controlled and age-associated chaperone capacity in neurons and muscle cells of *C. elegans*. *PLoS One* **5**, e8568.

Luh, C., Kuhlmann, C.R., Ackermann, B., Timaru-Kast, R., Luhmann, H.J., Behl, C., Werner, C., Engelhard, K., Thal, S.C. (2010). Inhibition of myosin light chain kinase reduces brain edema formation after traumatic brain injury. *J Neurochem* **112**, 1015-25.

Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J., Krämer, J., Uden, G. (2009). The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. *J Biol Chem* **284**, 265-75.