

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



Untersuchung autophagischer Prozesse mit Fokus auf BAG3 und seine Interaktoren

Dissertation

Zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

Vorgelegt am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

von

Mario Schwarz

geboren am 26.03.1989 in Bad Honnef

Mainz, 2020

Dekan: [REDACTED]

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2020

Ich Mario Schwarz erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Mainz, Juni 2020

Mario Schwarz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Danksagung	XI
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Proteostase.....	3
1.1.1 Proteostase schädigende Faktoren	5
1.1.2 Proteostase schützende Faktoren	7
1.2 Autophagie.....	14
1.2.1 Chaperonvermittelte Autophagie (CMA)	16
1.2.2 Mikroautophagie	16
1.2.3 Makroautophagie.....	17
1.3 Das HSP70 Co-Chaperon BAG3	23
1.3.1 Aufbau, Lokalisation und Regulation von BAG3	23
1.3.2 BAG3 in der Entwicklung	26
1.3.3 BAG3 in Apoptose und Krebs	26
1.3.4 BAG3 in Proteostase, Autophagie und neurodegenerativen Erkrankungen	27
1.3.5 BAG3 in Myopathien und Regulation und Wartung von Cytoskelettelementen	30
1.4 Nicht muskuläre Myosine und NMIIIC/MYH14	33
1.4.1 Aufbau, Lokalisation und Regulation von nicht muskulären Myosinen	34
1.4.2 NMII unter physiologischen Bedingungen.....	41
1.4.3 NMII unter pathophysiologischen Bedingungen.....	45
1.4.4 Das nicht muskuläre Myosin NMII-C/MYH14	48
2. Zielsetzung	51
3. Material	53
3.1 Bakterien.....	53
3.2 Zelllinien	53
3.3 Antikörper	54
3.3.1 Primärantikörper	54
3.3.2 Sekundärantikörper	55
3.4 Plasmide, Primer und siRNA.....	56
3.4.1 Plasmide	56
3.4.2 Primer.....	57
3.4.3 siRNA	57
3.5 Protein- und DNA-Größenstandards	57

3.6 Chemikalien	58
3.7 Puffer und Lösungen.....	60
3.7.1 Hergestellt	60
3.7.2 Erworben	68
3.8 Laborkits	69
3.9 Geräte und Verbrauchsmaterial	69
4. Methoden	72
4.1 Zellbiologische Methoden	72
4.1.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien.....	72
4.1.2 Kryokonservierung von Zellen	74
4.1.3 Zellkultur für Immunocytochemie	74
4.1.4 Transiente Transfektion von Plasmiden und siRNA	74
4.1.5 Behandlung von Zellen mit Glukose- und Aminosäure-depletiertem Medium	75
4.1.6 Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A1 und MG132	76
4.2 Proteinbiochemische Methoden	77
4.2.1 Aufbereitung von Proteinen für die SDS-PAGE	77
4.2.2 Proteingehaltsbestimmung mit Hilfe der BCA-Probe.....	84
4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	84
4.2.4 Westernblot und Westernblotanalyse	86
4.2.5 Kolloidal-Comassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen	88
4.2.6 Immunfärbung von Zellen für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.....	89
4.3 Molekularbiologische Methoden.....	90
4.3.1 RNA-Isolation aus Gewebe	90
4.3.2 cDNA-Synthese	91
4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion	91
4.3.4 Agarosegelelektrophorese.....	92
4.3.5 Transformation und Selektion kompetenter Bakterien	92
4.3.6 Plasmidpräparation.....	93
4.3.7 Massenspektrometrie	95
4.3.8 Sequenzierung	95
4.4 Statistik	96
Ergebnisse	97
5.1 Untersuchung des autophagischen Fluxes unter Glukose- und Aminosäureentzug	97
5.1.1 Aminosäureentzug führt in HeLa-Zellen zu einem erhöhten autophagischen Flux	97
5.1.2 Weder Aminosäureentzug noch Glukoseentzug zeigen einen signifikanten Unterschied des autophagischen Flux von SH-SY5Y-Zellen.	100

5.2 Untersuchung des Co-Chaperons BAG3 in synaptosomalen Präparationen aus adultem Rattengehirn.....	102
5.2.1 Etablierung eines Isolationsprotokolls für Synaptosomen aus adultem Rattenhirngewebe	102
5.2.2 BAG3 interagiert mit synaptosomalem Syntaxin-1	106
5.2.3 Mögliche kleinere, synaptosomale BAG3-Isoform.....	109
5.3 Untersuchung der Interaktion von BAG3 und NMII-C (MYH14).....	116
5.3.1 Verifizierung der Interaktion zwischen BAG3 und NMII-C in endogenen Immunopräzipitationen aus Hep-G2-Lysaten.....	116
5.3.2 Immunocytochemische und proteinbiochemische Untersuchung der Lokalisation von BAG3 und MYH14	117
5.4 Untersuchung von MYH14 unter SOD1-G85R-GFP-Transfektion und MG132 Behandlung	132
5.4.1 Untersuchung des Einflusses von MYH14 auf den BAG3-vermittelten Abbau von SOD1	132
5.4.2 Untersuchung des Einflusses von MYH14 auf HEK293-T-Zellen unter MG132 Behandlung.....	136
5.5 Untersuchung des Einflusses von MYH14 auf den autophagischen Flux	144
5.5.1 Der autophagische Flux in HEK293-T-Zellen ist unter dem Knockdown von MYH14 erhöht.....	144
5.5.2 Die Überexpression von MYH14 verringert den autophagischen Flux in HEK293-T-Zellen.....	146
6. Diskussion.....	148
6.1 HeLa-Zellen, aber nicht SH-SY5Y-Zellen reagieren mit einem erhöhten autophagischen Flux auf den Entzug von Aminosäuren.....	148
6.2 BAG3 interagiert mit Syntaxin-1 in synaptosomalen Präparationen aus Rattenhippocampus und -cortex	152
6.3 Ausschließlich die 74 kDa große BAG3 Isoform ist in synaptosomalen Präparationen aus Rattenhippocampus und -cortex zu finden.	155
6.4 NMII-C/MYH14 ist hauptsächlich im Cytosol lokalisiert und interagiert mit BAG3.....	157
6.5 Der Knockdown von MYH14 in mit SOD1-G85R-GFP transfizierten Zellen erhöht die gemessenen GFP- und BAG3-Spiegel, verändert aber nicht die aggregativen Eigenschaften von SOD1-G85R-GFP	161
6.6 Die MYH14/NMII-C-Spiegel zeigen keine Beeinflussung durch MG132 und NMII-C beeinflusst nicht die BAG3 vermittelte Aggresombildung unter MG132-Behandlung.....	162
6.7 MYH14/NMII-C besitzt einen signifikanten Einfluss auf den autophagischen Flux.....	164
6.8 Zusammenfassung	167
7. Literaturverzeichnis	168
8. Anhang.....	206

8.1 Abbildungsverzeichnis	206
8.2 Tabellenverzeichnis	208
8.3 Lebenslauf	209

Abkürzungsverzeichnis

4-HAP	4-hydroxyacetophenon
ABAM	Antibiotic Antimycotic
ACD	assembly competend domains
ACSF	künstliche Cerebrospinalflüssigkeit
AD	Alzheimersche Krankheit
ADP	Adenosin-diphosphat
AHA1	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1
AKT/PKB	Proteinkinase B
AlbZIP	Androgene-Induced bZIP
ALS	amyotrphe Lateralsklerose
AMBRA-1	Autophagie und Beclin 1 Regulator 1
AMOTL	Angiomotin like Protein 2
AMP	Adenosin-monophosphat
AMPAR	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic acid receptor
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APOBEC	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ATF-6	Activating transcription factor 6
ATG/Atg	autophagy related gene
ATP	Adenosin-triphosphat
BAG	BCL-2 assoziiertes Anthanogen
BCA	Bicinchoninsäure

BCL-2	B-cell lymphoma 2
Bif-1/ SH3GLB1	Endophilin-B1
BIS	Synonym für BAG3
BRCA	Breast cancer 1, early onset
BSA	Bovines Serumalbumin
CAIR	Synonym für BAG3
CASA	Chaperon vermittelte selektive Autophagie
CDC37	cell division cycle 37, HSP90 cochaperone
cDNA	komplementäre DNA
CHIP	C terminus of HSC70-Interacting Protein
CK2	Caseinkinase 2
CMA	Chaperon vermittelte Autophagie
CNP	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
CXCR4	C-X-C Chemokinrezeptor Typ 4
DAP3K/ZIPK	Death-associated protein kinase 3/Zipper interacting protein kinase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	dilatativen Kardiomyopathie
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DFCP-1	Double FYVE-containing protein 1
DIC	Intermediäre Dyneinkette
DM-1	myotonischer Dystrophie vom Typ 1
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBSS	Earle's balanced salt solution
ECL	Luminol enhancer solution

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	Enhanced green fluoreszent protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELC	Essentielle leichte Kette
eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi intermediäres Kompartiment
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum
FGF2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FOXM1	Forkhead box protein M1
GLUT4	Glucose transporter type 4, insulin-responsive
H7-CM	human stem cell derived cardiomyocytes
HBSS	Hank's balanced salt solution
HD	Chorea Huntington
HEK	Human embryonic kidney
HeLa	Henrietta Lacks Zellen
HEP-G2	Hepatozelluläres Karuinom G2
HESC2-CM	human embryonic stem cell derived cardiomyocytes
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HIF-1	Hypoxie induzierbarer Faktor 1
HIV	Hmanes Immunodefizienzvirus
HM	Homogenisierungsmedium
HOP	Presenilin hop-1
HSC70	konstitutiv active Form von HSP70
HSF-1	Hitzeschockfaktor 1

HSP	Hitzeschockprotein
HuR	Hu-Antigen R
IFITM-2	Interferon induziertes Transmembranprotein 2
IgG	Immunglobulin G
IKK γ	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma
IP	Immunopräzipitation
IRE-1	Inositol-requiring protein 1
LAMP2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
LATS	Large tumor suppressor homolog 2
LB-Medium	lysogeny broth
LC3 (MAP1LC3)	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3
LCK	Leichte Ketten Kinase
Leu	Leucin
LIR	LC3 interagierende Region
LP	Lysepuffer
LSM	Laser-Scan-Mikroskop
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7
MEF	Mausembryofibroblasten
miRNA	mikro RNA
MLCK	Myosin light chain kinase
MR	Mentale Retardation
MRCK	Myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase
mRNA	Boten-RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MVP	Major vault protein
MYO	Myosin

NBR-1	Neighbor of BRCA1 gene 1 protein
NDP-52	Nuclear domain 10 protein 52
NEF	nucleotide exchange factor
NFT	Neurofibrilläre Tau-Tangle
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
NMHC	nichtmuskuläre Myosin schwere Kette
NMII/MYH	nichtmmuskuläres Myosin
ns siRNA	nonsense small interfering RNA
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	p21-activated kinase
PAS	Phagophore assembly site
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat gepufferte Salzlösung Tween 20
PLC γ	Phosphoinositid-Phospholipase C
PDCA	pancreatic ductal adenocarcinoma
PDZGEF2	PDZ domain-containing guanine nucleotide exchange factor 2
PE	Phosphatidylethanolamine
PERK	Proline-rich receptor-like protein kinase
PI	Phosphatidylinositol
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PIK3C3/ PtdIns3KC3/ VSP34	Phosphatidylinositol-3-Kinase Komplex der Klasse III
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinmkinase C
PLO	Poly-L-Ornithin
PN	Proteostasenetzwerk
PQC	Proteinqualitätskontrolle
PREM	platinum replica elektron microscopy
PSD95	Postsynaptic density protein 95
Rab6	Ras-related protein 6

RAPTOR	Regulatory-associated protein of TOR
Rh4	Cellosaurus RH4
RHOA	ras homolog family member A
RLC	Regulatorische leichte Kette
RLCK	Kinase der regulatorischen leichten Kette
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK1	Rho-associated protein kinase 1
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institut-Medium
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH3	Src-homology 3
sHSP	kleine Hitzeschockproteine
SIM	structured-illumination microscopy
siRNA	small interfering RNA
SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25
SOD	Superoxiddismutase
Src	Tyrosinkinase Src
STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1
SYHNPO2	Synaptopodin 2
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAX1BPI	Tax1 binding protein 1
TAZ	Tafazzin
TDP-43	TAR DNA-binding protein 43
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming growth factor beta
TGN	Transgolginetzwerk
Thr	Threonin
TOM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20

TriC/CCT	chaperonin-containing T-complex
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TRPM6/7	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 6/7
TSC	Tuberous sclerosis 1 protein
t-SNARE	target synaptosome-associated protein receptor
UBD	Ubiquitinbindedomäne
Ubl	ubiquitnähnlichen
ULK	Unc-51-like kinase 1
UPR	Unfolded protein response
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	Untranslatierte Region
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene
vATPase	vesikuläre ATPase
WIPI	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein
WP	Waschpuffer
WT1	Wilms- Tumorprotein/ Wilms Tumorsupressorgen
YAP	Yes-associated protein 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula occludens protein 1

Danksagung

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Zusammenfassung

In Zellen laufen ständig anabole und katabole Prozesse ab, die dafür Sorge tragen, dass der menschliche Organismus lebensfähig bleibt. Neben Fetten, Kohlenhydraten und anderen Stoffen besitzen vor allem Proteine wichtige Funktionen, indem sie als Enzym, Strukturbaustein, Rezeptor etc. fungieren. Zur Aufrechterhaltung eines funktionalen Metabolismus ist es daher von größter Wichtigkeit ein Gleichgewicht zwischen Neusynthese und Abbau von Proteinen zu gewährleisten. Dieses Gleichgewicht der Proteine, auch als Proteostase bezeichnet, bedient sich dabei verschiedener Mechanismen zur Kontrolle und Regulation.

Einer dieser Mechanismen, der dem degradativen Teil der Proteostase zugehörig ist, ist die Autophagie. Der Prozess der Autophagie stellt einen streng regulierten Vorgang zur Degradation großer Mengen cytosolischen Materials oder spezifischer Substrate dar, wobei man zwischen chaperonvermittelter Autophagie, Mikroautophagie und Makroautophagie unterscheidet. Die verschiedenen, anhand ihrer Substrate benannten Formen der Makroautophagie haben dabei alle die Degradation über die Bildung von Autophagosomen mit anschließender lysosomaler Fusion gemeinsam. Initiation, Nukleation, Elongation und Reifung bzw. Abschluss der Autophagosomensynthese werden durch eine Vielfalt verschiedener Proteine und Faktoren reguliert. Zwei dieser Faktoren, die eine wichtige Funktion während makroautophagischer Prozesse einnehmen, sind das HSP70-Co-Chaperon BAG3 und die nicht muskulären Myosine (NMII). BAG3 fungiert hier vor allem in der Erkennung und dem Abtransport aggregierter bzw. nichtnativer Proteine in einem Vorgang der als BAG3-vermittelte Makroautophagie oder auch als chaperonvermittelte, selektive Autophagie (CASA) bezeichnet wird. Für nicht muskuläre Myosine wie z.B. NMII-A werden Funktionen in der Rekrutierung von für die Elongation wichtigen Membranquellen angenommen.

In der vorliegenden Arbeit sollten nun verschiedene Aspekte der Autophagie, vor allem der BAG3-vermittelten Makroautophagie untersucht werden. Die Experimente gliedern sich dabei in die allgemeine Untersuchung der Autophagie in neuronalen und nicht neuronalen Zellen unter Nährstoffentzug, in Untersuchungen von BAG3 in seiner Funktion in neuronalen Systemen, sowie möglicher Interaktoren und die Untersuchung des Einflusses einer NMII-Isoform, NMII-C, auf die autophagische Aktivität.

Hierbei zeigte sich, dass SH-SY5Y-Zellen, als neuronale Zellen, weder auf den Entzug von Aminosäuren noch von Glukose durch eine Erhöhung der autophagischen Aktivität reagieren.

Untersuchungen von BAG3 ergaben, dass es nachweislich mit dem SNARE-Protein Syntaxin-1 und vermutlich auch mit SNAP25 interagiert. Die durch massenspektrometrische Interaktomanalysen vorläufig gefundene Interaktion von BAG3 und dem nicht muskulären Myosin NMII-C hingegen konnte bestätigt werden. Allerdings scheint NMII-C nicht an der BAG3-vermittelten Aggresombildung beteiligt zu sein, besitzt aber einen Einfluss auf die autophagische Aktivität, wie durch siRNA- und Überexpressionsexperimente gezeigt werden konnte.

1. Einleitung

1.1 Proteostase

In menschlichen Zellen laufen ständig anabole und katabole Prozesse ab, die dafür Sorge tragen, dass der menschliche Organismus lebensfähig bleibt. Neben Fetten, Kohlehydraten und anderen Stoffen besitzen vor allem Proteine eine wichtige Funktion, indem sie als Enzym, Strukturbaustein, Rezeptor etc. fungieren. Die Menge an Funktionen bedingt dabei die Menge an Proteinen in der Zelle. So befinden sich in menschlichen Zellen zu jeder Zeit an die 10000

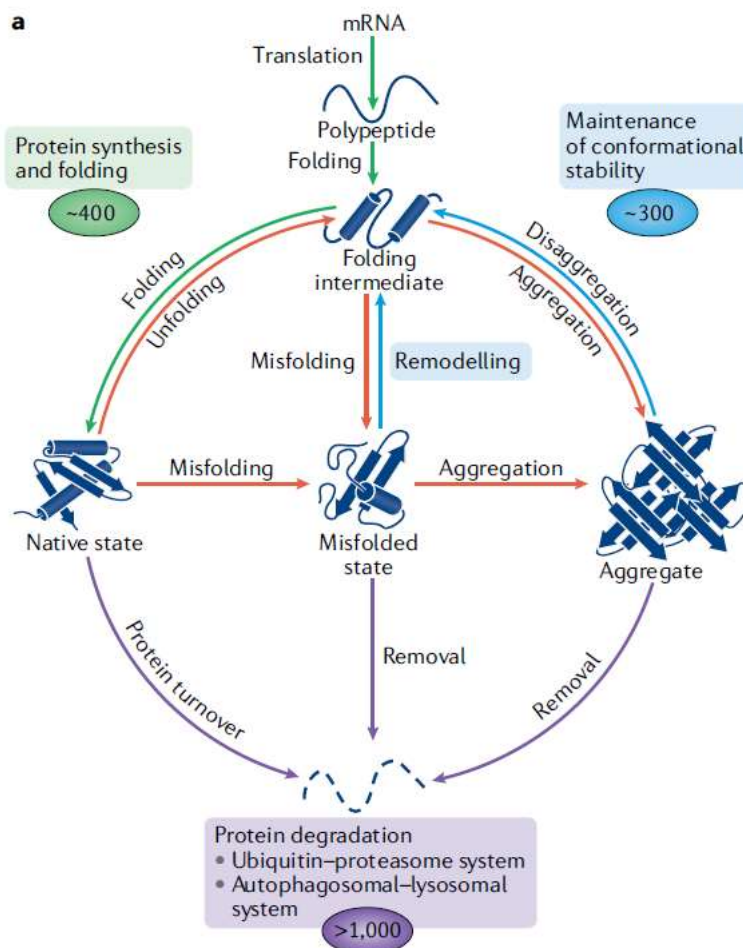


Abbildung 1: Das Proteostasenetzwerk verhindert die Formation toxischer Aggregate. Schematische Darstellung des Proteostasenetzwerks und dessen Funktion nach Hipp et al. 2019. Rot: Generierung ungefalteter Proteine und Aggregate; Grün: Proteinsynthese und -faltung; Blau: Konformelle Wartung; Lila: Proteindegradation. Übernommen von Hipp et al. 2019

verschiedene Proteine (Kulak et al., 2017), die spezifische Funktionen übernehmen. Dabei ist es wichtig, dass zu jeder Zeit für bestimmte Prozesse notwendige Proteine vorhanden sind, während nicht mehr notwendige, oder beschädigte Proteine entsorgt werden, um in einem stark befüllten Raum wie dem Cytosol (ca. 300g Protein pro Liter) (Ellis and Minton, 2006, Klaips et al., 2018) keine wichtigen Vorgänge zu behindern oder Schäden zu verursachen. Die Gesamtheit der Proteine in einer Zelle befindet sich in einem stetigen, dynamischen Gleichgewicht, das sowohl auf von innen als auch von außen verursachte Änderungen der Proteinkomposition reagieren muss und als Proteinhomöostase

oder Proteostase beschrieben wird. Für die Aufrechterhaltung der Proteostase ist eine strikte Kontrolle von Proteinsynthese und -faltung, konformeller Wartung der Proteine, der Häufigkeit und der subzellulären Lokalisation, sowie die der Proteindegradation unabdingbar (Klaips et al., 2018). Hierzu haben Zellen ein Netzwerk bestehend aus Chaperonen und anderen qualitätssichernden Faktoren entwickelt, das als Proteostasennetzwerk (PN) bezeichnet (Balch et al., 2008) wird und aus ca. 2000 verschiedenen, zusammenarbeitenden Komponenten besteht. Die Akteure des PN und deren Wirken lassen sich in drei Hauptprozesse einteilen: 1. Proteinsynthese und -faltung, 2. Aufrechterhaltung konformeller Stabilität und 3. Proteindegradation (Hipp et al., 2019, Klaips et al., 2018). Chaperone agieren dabei innerhalb der Prozesse und verbinden diese miteinander. Das PN verhindert dabei vor allem die Entstehung toxischer Proteinaggregate, sorgt für deren Disaggregation bzw. Ent- und Rückfaltung sowie für deren Degradation (vgl. Abbildung 1). Allerdings besitzt dieses Netzwerk keine grenzenlosen Kapazitäten, da Häufigkeit und Aktivität der PN-Faktoren begrenzt sind. Eine Überschreitung der PN-Kapazität führt zum Fehlschlag der Proteinqualitätskontrolle und damit zur Anhäufung toxischer Aggregate was mit der Entstehung von Krankheiten wie Typ II Diabetes und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Huntington und ALS verbunden ist (Bruns and Kopito, 2007, Iadanza et al., 2018, Klaips et al., 2018, Mukherjee et al., 2015, Ross and Poirier, 2004). Die Überforderung des Systems ist dabei oft mit einer verringerten Funktion des PN verbunden, die z.B. durch Mutationen in PN-Komponenten (Kakkar et al., 2014) oder durch toxische Interaktionen aggregierter Proteinspezies mit der PN-Funktion (Hipp et al., 2014) bedingt ist. Des Weiteren verringert sich die Kapazität des PN mit dem Alter (Hipp et al., 2019, Labbadia and Morimoto, 2015, Taylor and Dillin, 2011, Kern et al., 2010) was es neben dem erhöhten Aufkommen von Mutationen (Milholland et al., 2017) schwieriger macht die Proteostase aufrecht zu erhalten.

1.1.1 Proteostase schädigende Faktoren

Ein Hauptfaktor der sowohl das Ergebnis als auch ein Grund für eine gestörte Proteinhomeostase sein kann, ist die Aggregationsfähigkeit von Proteinen die sich aus ihren intrinsischen Eigenschaften ergibt. Proteinen benötigen für die Ausübung ihrer Funktion eine

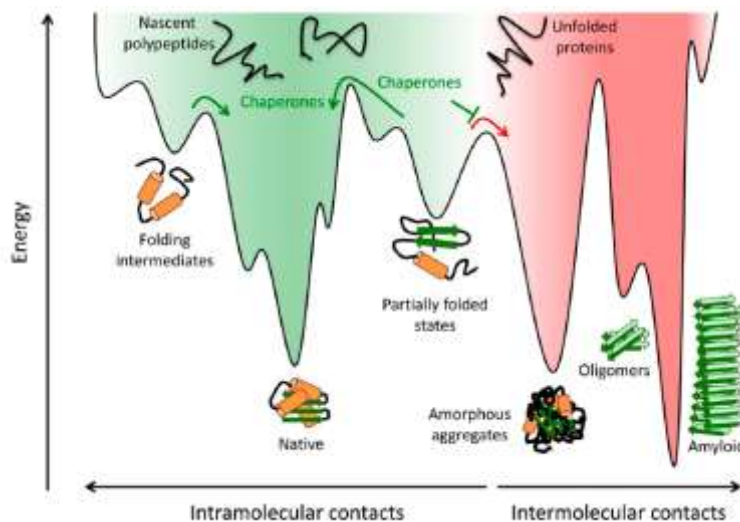


Abbildung 2: Proteinfaltung und -aggregation. Schematische Darstellung der Energiekinetik der Proteinfaltung in native und aggregierte Formen. Während der Faltung von Proteinen kann es dazu kommen das Faltungsintermediate in lokalen Energieminima gefangen werden, was die Entstehung thermodynamisch stabilerer Aggregatformen begünstigt. Übernommen von Hipp et al. 2019.

dreidimensionale Struktur (Tertiär- oder Quartärstruktur) die durch die Komposition der Aminosäuresequenz, der sogenannten Primärstruktur, vorgegeben ist (Anfinsen, 1973). Für die effiziente Ausbildung dieser Strukturen in biologisch relevanten Zeiträumen benötigen die meisten Proteine Unterstützung durch Chaperone, die bei der Faltung assistieren (Balchin et al., 2016). Allerdings ist der Faltungsprozess inhärent durch die vielen verschiedenen Faltungsmöglichkeiten der Peptidketten fehleranfällig (Bartlett and Radford, 2009, Dobson et al., 1998). Eine weitere Herausforderung ist, dass die Faltung von Proteinen meist über Zwischenstadien erfolgt, die oftmals metastabil sind und eine starke Akkumulationsneigungen zeigen. Des Weiteren können die initialen Energiebarrieren für die Durchführung der korrekten Faltung höher liegen als die für die Bildung von Aggregaten (Klaips et al., 2018) (vgl. Abb. 2) und trotz der Assistenz durch Chaperone ist die Faltung von 5-30 % der neu synthetisierten Proteine inkorrekt und fehlerhaft, was folglich im Normalfall zur Degradation führt (Duttler et al., 2013, Schubert et al., 2000, Vabulas and Hartl, 2005). Einige Proteine benötigen eine vom Cytosol abweichende Umgebung für eine korrekte Faltung. Die meisten sekretorischen Proteine werden zwar im Cytosol translatiert, benötigen aber die oxidative Umgebung des endoplasmatischen Retikulums (ER), um eine funktionale Konformation zu erreichen. Kommt es zu einem ineffizienten Transport dieser Proteine aus dem reduzierenden Cytosol ins oxidative ER oder ist dieser Transport inhibiert, können diese Proteine nicht richtig falten und es besteht eine erhöhte Gefahr der Aggregation (Hipp et al., 2019, Park et al., 2007, Wrobel et al., 2015). Zusätzlich zu den intrinsischen Faktoren während

der Proteinfaltung können auch externe Stressfaktoren wie Hitze- und oxidativer Stress (Sies et al., 2017) oder toxische Stoffe wie Cadmium (Jacobson et al., 2017) dazu führen, dass auch bereits gefaltete Proteine denaturieren und aggregieren können (Hipp et al., 2019). Doch auch bereits vor der Translation existieren Faktoren, die die Aggregation von Proteinen begünstigen. So besitzen defekte mRNAs ein großes Potential zur Erzeugung aberranter Proteine, indem z.B. mRNAs mit fehlendem Stoppcodon in Ribosomen verweilen und damit Faltungsincompetent sind (Hipp et al., 2019). Zusätzlich kann die Verfügbarkeit von tRNAs die Translationsraten beeinflussen. Dies kann bei einem Mangel an tRNA zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Proteinaggregation führen, da die Wahrscheinlichkeit für Fehler beim Ablesen der mRNA und *Frameshifts* erhöht wird. Zusätzlich steigt das Risiko, dass neu gebildete Peptidketten nicht produktive Faltungszwischenstadien einnehmen, die wiederum

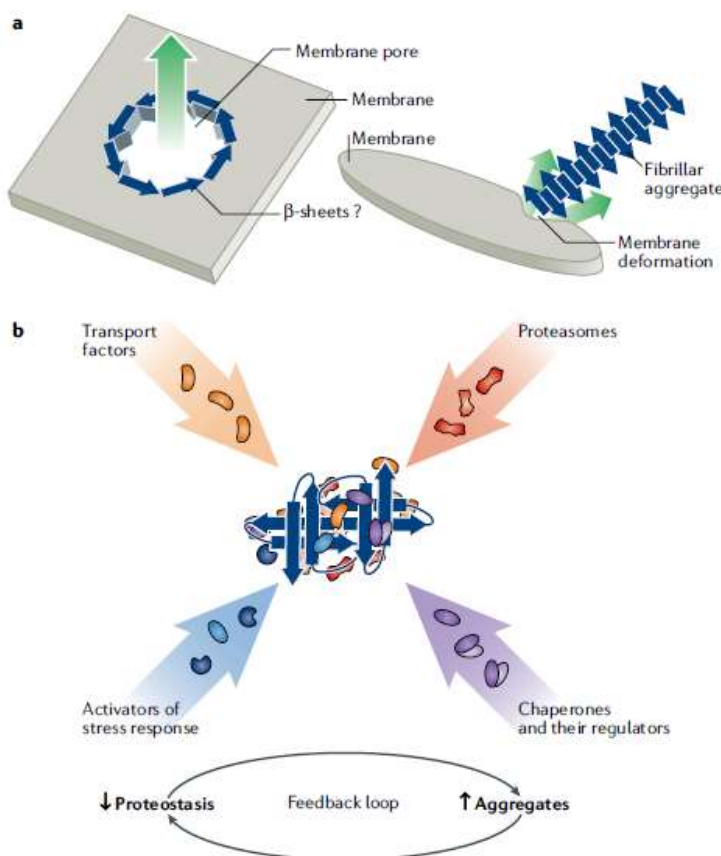


Abbildung 3: Mechanismen der Aggregattoxizität. A) Oligomere Aggregate könne Membranporen bilden (links), während fibrilläre Formen Membranen deformieren können (rechts). B) Aggregate binden verschiedenste Faktoren des PN was zu einer positiven Rückkopplungsschleife der Aggregatbildung führt und schlussendlich den Kollaps der Proteostase verursacht. Übernommen von Hipp et al. 2019.

anfällig für Aggregationen sein können (Hipp et al., 2019, Nedialkova and Leidel, 2015). Ein weiteres Problem für die Aufrechterhaltung der Proteostase ist die Unterversorgung der Zellen mit Nährstoffen und der damit einhergehende Mangel an ATP. Da die Aktivität einiger Schlüssel-Chaperone ATP-abhängig ist (Balchin et al., 2016, Carra et al., 2017, Hartl et al., 2011, Kim et al., 2013, Klaipe et al., 2018, Lee et al., 2018, Wandinger et al., 2008) kann Entsprechender Mangel zum Versagen von wichtigen PN-Komponenten, wie Rückfaltungs- und Dissaggregationsmechanismen oder auch zu einem Versagen von degradativen Mechanismen führen.

Persistieren fehlerhaft oder unvollständig gefaltete Proteine kann es zur Bildung toxischer Aggregate kommen. Hierbei spielen vor allem lösliche Oligomere eine entscheidende Rolle. Diese löslichen Oligomere sind meist strukturell dynamisch und zeigen freiliegende hydrophobe Aminosäurereste und ungepaarte β -Faltblattstrukturen, was zu einer hohen Interaktivität mit zellulären Proteinen und Membranen führt (Cheon et al., 2007, Kim et al., 2016, Klaips et al., 2018, Miller et al., 2011, Sangwan et al., 2017). Die Folgen dieser Interaktionen können zum einen die Inhibition wichtiger Faktoren zur Aufrechterhaltung der Proteostase wie z.B. die Inhibition von Proteasomen (Deriziotis et al., 2011, Guo et al., 2018), Chaperonen (Park et al., 2013, Yu et al., 2014), nukleocytoplasmatischen Transportfaktoren (Woerner et al., 2016) und Stressreaktion auslösenden Faktoren (Chafekar and Duennwald, 2012, Olzscha et al., 2011, Woerner et al., 2016) sein, indem sie von den Aggregaten gebunden werden (vgl. Abbildung 3). Dies führt wiederum zu einer Depletion eben genannter Faktoren, was über eine positive Rückkopplungsschleife zu einer erhöhten Bildung von Aggregaten führt, was schlussendlich den Kollaps der Proteostase verursacht. Zum anderen sind oligomere bzw. fibrilläre Aggregate in der Lage mit zellulären Membranen zu interagieren indem sie im Falle der Ersteren in der Lage sind Poren in Membranen zu bilden (Anguiano et al., 2002, Lashuel et al., 2002, Lashuel and Lansbury, 2006) und im Falle der Zweiteren Membranen zu deformieren oder zu durchdringen (Bauerlein et al., 2017, Milanesi et al., 2012, Tipping et al., 2015) (vgl. Abbildung 3).

1.1.2 Proteostase schützende Faktoren

Ein Ungleichgewicht der Proteostase wirkt sich entsprechend schädlich auf die Vitalität von Zellen aus indem sich toxische Proteinaggregate bilden, die mit vielen zellulären Prozessen interagieren können. Zur Erhaltung der Proteostase haben Organismen und Zellen verschiedenste Methoden entwickelt wie beispielhaft in Abbildung 4 und 5 dargestellt. So ist es möglich das Zellen mit einer geringeren PN-Kapazität regulatorische Elemente wie Chaperone, miRNAs, aber auch ganze Zellorganellen wie Lysosomen und andere Bestandteile protektiver und degradativer Prozesse von Zellen mit einer höheren PN-Kapazität über Nanotubes oder Exosomen erhalten (Astanina et al., 2015, Burtey et al., 2015, Kaushik and Cuervo, 2015, Takeuchi et al., 2015, Wang and Gerdes, 2015). Allerdings können nicht nur Komponenten des PN oder andere protektive bzw. regulatorische Komponenten übertragen werden, sondern es ist auch möglich die Aggregatlast einer Zelle zu vermindern, indem durch die oben erwähnten Nanotubes oder Exosomen Aggregate von überlasteten Zellen zu Zellen mit weniger ausgeschöpftem PN-Potential zur weiteren Prozessierung

übertragen werden (Kaushik and Cuervo, 2015) (vgl. Abbildung 4). Ein Problem dieses Mechanismus ist allerdings, dass sich pathogene Proteine ähnlich wie Prionen über diese Transportwege verbreiten und wie Initiationsstartpunkte für die Aggregatbildung in anderen Zellen wirken können (Agosta et al., 2015, Gousset et al., 2009, Kaushik and Cuervo, 2015, Russo et al., 2012). Zusätzlich ist es möglich aggregationsanfälliges Material in anderen

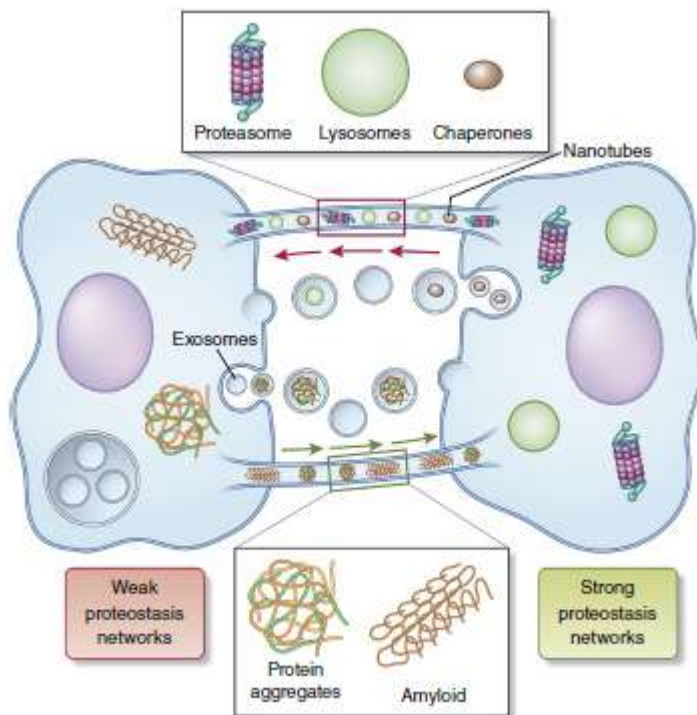


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Austausches von PN Komponenten und Aggregaten zwischen Zellen. Der Austausch von protektiven und regulatorischen Elementen sowie Aggregaten zwischen Zellen fördert die Entlastung des PN-Netzwerk und verhindert ein Ungleichgewicht der Proteostase. Übernommen von Kaushik et al. 2015

was mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht (Arrasate et al., 2004). Zum anderen ermöglicht es die asymmetrische Verteilung dieser Aggregate/Aggresome in der Zelle, und damit eine Verdünnung der Aggregatlast durch die mitotische Teilung von Zellen, bei der die Hauptlast der Aggregate in der Mutterzelle verbleibt (vgl. Abbildung 5) (Liu et al., 2010).

Eine zelluläre Antwort zur Aufrechterhaltung der Proteostase unter Stressbedingungen ist die Aktivierung von spezifischen Signalwegen, die auf solche Stressfaktoren wie Hitze oder oxidativen Stress reagieren. Diese Signalwege unterliegen dabei einer zellautonomen Regulation was eine Koordination innerhalb und zwischen Geweben und Organen ermöglicht (Sala et al., 2017, Taylor et al., 2014). Unterschieden wird dabei zwischen dem cytosolischen *heat shock response* (HSR) (Hipp et al., 2019) und dem *unfolded protein response* (UPR) von

Kompartimenten einzulagern die zum Beispiel eine höhere Toleranz für solche Proteine besitzen, wie dies bei ER und Mitochondrien der Fall ist (Hill et al., 2017, Rousseau et al., 2004, Ruan et al., 2017, Sontag et al., 2017, Vincenz-Donnelly et al., 2018).

Eine weitere Möglichkeit die Aggregatlast zu vermindern ist die Konzentration von aggregierten Proteinen in einem chaperon- und mikrotubuliabhängigem Prozess in so genannten Aggresomen am mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) (Kopito, 2000). Hierdurch werden zum einen die Möglichkeiten aberranter Interaktionen vermindert (Kim et al., 2016, Ramdzan et al., 2017),

ER und Mitochondrien (Frakes and Dillin, 2017, Jovaisaite et al., 2014, Schulz and Haynes, 2015, Walter and Ron, 2011). Beide Stressantworten zielen darauf ab das Vorkommen von aggregationsanfälligen Proteinen zu verhindern indem sie zum einen die Translation von Proteinen dämpfen und Expression von Komponenten des PN wie die der Chaperone zu erhöhen (Hipp et al., 2019, Klaipts et al., 2018). Der cytosolische *Heat shock response* wird dabei hauptsächlich durch den *heat shock transcription factor 1 (Hsf1)* reguliert. Dieser ist in der Abwesenheit von Stressfaktoren an HSP70 und HSP90 gebunden, wird jedoch bei zellulärem Stress durch das Abdiffundieren dieser Chaperone freigesetzt und induziert damit die Transkription einer weiten Reihe von Proteostasekomponenten wie zum Beispiel die der Chaperone (Anckar and Sistonen, 2011, Zheng et al., 2016, Zou et al., 1998). Nach Abklingen der Stressfaktoren wird Hsf1 erneut durch HSP70 und HSP90 gebunden und kehrt nach der Wiederherstellung der Proteostase in seine inaktive Form zurück (Akerfelt et al., 2010, Gomez-Pastor et al., 2017, Gomez-Pastor et al., 2018). Der UPR von Mitochondrien und ER bedient sich anderer Faktoren für die Aktivierung. So wird beispielsweise die Akkumulation aggregierter Proteinspezies im ER durch die Proteine IRE-1, PERK und ATF6 erkannt die darauf folgend die Transkription verschiedener Proteostasekomponenten erhöhen. Neben der Erhöhung der Expression von Chaperonen u.Ä. führt die Aktivierung von PERK zu einer Phosphorylierung von eIF2 α , was wiederum zu einer Dämpfung der generellen Translation führt (Frakes and Dillin, 2017, Walter and Ron, 2011).

Ist es nicht möglich die fehlerhafte Faltung von Proteinen zu verhindern und es besteht keine Möglichkeit der Disaggregation oder Rückfaltung müssen diese Proteine, wenn möglich, degradiert werden. Hierzu besitzen Zellen zwei Hauptsysteme. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und das autophagisch-lysosomale System (Ciechanover, 2017, Dikic, 2017, Varshavsky, 2012). Beide Prozesse sind in der Lage ATP abhängig und mit Assistenz von Chaperonen Proteine zu degradieren (Finley, 2009, Plomp et al., 1987, Tanaka, 2013) indem sie Chaperone und weitere Moleküle wie Ubiquitin zur Markierung ihrer Substrate nutzen (Cuervo and Wong, 2014, Nixon, 2013, Tanaka and Matsuda, 2014). Das UPS nutzt zur Degradation ubiquitinmarkierter Proteine das Proteasom, ein fassförmiger Multiproteinkomplex bestehend aus einem 20S Kernpartikel, der die für die Proteolyse benötigten Domänen enthält, und ein oder zwei regulatorischen 19S Partikeln, die für die Substraterkennung, -entfaltung und -prozessierung verantwortlich sind (Finley, 2009, Livneh et al., 2016, Saeki and Tanaka, 2012, Voges et al., 1999). Ein wichtiger Faktor, der das Proteasom und damit das UPS vom autophagisch-lysosomalen System absetzt ist, dass die Substrate des Proteasoms vor der Degradation ATP abhängig entfaltet und linearisiert werden müssen, da es wie *in vitro* Versuche zeigen nicht in der Lage ist Aggregate zu degradieren (Hipp et al., 2019, Sturner and Behl, 2017, Venkatraman et al., 2004, Verhoef et al., 2002). So

sind aggregierte Proteine sogar dazu in der Lage die proteasomale Aktivität *in vivo* zu verringern indem sie z.B. Proteasome aktiv binden und blockieren (Bence et al., 2001, Bennett et al., 2005, Holmberg et al., 2004). Nicht entfaltbare Proteinaggregate wie die von mutantern Huntingtin werden hingegen durch das autophagisch-lysosomale System degradiert (Hipp et al., 2019, Iwata et al., 2005, Lamark and Johansen, 2012, Ravikumar et al., 2004).

Eine Übersicht der existierenden Prozesse, die der Aggregattoxizität entgegenwirken, ist in Abbildung 5 dargestellt.

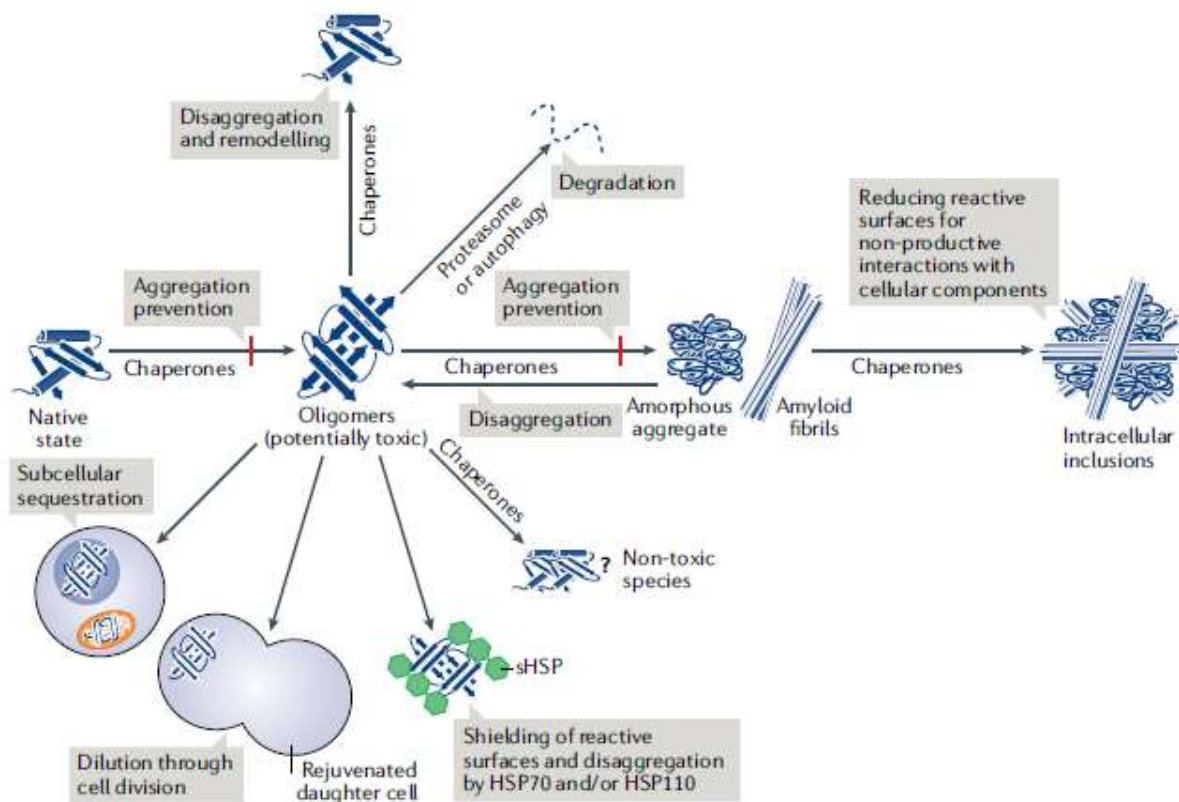


Abbildung 5: Mechanismen um der Aggregattoxizität entgegenzuwirken. Zellen haben verschiedenste Mechanismen entwickelt um die Gefahr potentiell toxischer Proteinaggregate zu vermindern oder zu vermeiden. So ist es möglich die Aggregatlast über eine mitotische Verdünnung zu vermindern oder Aggregate in zelluläre Kompartimente einzulagern die eine höhere Toleranz für aggregierte Proteine besitzen. Des Weiteren sorgen Chaperone dafür, dass die Reaktive Oberfläche von Aggregaten verringert wird, dass potentiell toxische Oligomere und Aggregate disaggregiert oder degradiert werden. Chaperone sind ebenfalls in der Lage die Fehlfaltung von Proteinen gänzlich zu verhindern.

1.1.2.2 Chaperone

Schlüsselproteine der meisten Prozesse zur Aufrechterhaltung der Proteostase sind Chaperone, Proteine die auch als Hitzeschockproteine bezeichnet werden. Chaperone sind Proteine die mit anderen Proteinen interagieren, diese stabilisieren oder bei der korrekten, funktionellen Faltung assistieren, oder bei der Wartung der Konformation von Proteinen helfen ohne dabei Teil der finalen Struktur zu werden (Brockwell and Radford, 2007, Dinner et al., 2000, Ellis, 1987, Hartl and Hayer-Hartl, 2009). Dabei lassen sich grob sechs verschiedene Klassen durch ihr molekulares Gewicht voneinander unterscheiden: HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 und die kleinen Hitzeschockproteine (sHSP) (Hartl et al., 2011).

1.1.2.2.1 HSP100 Chaperone

Bei den HSP100 Proteinen handelt es sich um eine Chaperonklasse, die ausschließlich in Pilzen und Bakterien zu finden und dort an der Disaggregation von Aggregaten in Zusammenarbeit mit HSP70 und HSP40 Chaperonen beteiligt ist (Glover and Lindquist, 1998, Parsell et al., 1994). In Metazoen werden die Aufgaben dieser Chaperone von HSP70 und HSP110 (HSP70 Homologe) Chaperonen übernommen (Mogk et al., 2018, Nillegoda et al., 2015).

1.1.2.2.2 HSP60 Chaperone/Chaperonine

Proteine der HSP60 Chaperone gehören zur Familie der Chaperonine. Chaperonine sind zylindrische, Doppelringkomplexe, die ATP abhängig einzelne Substratproteine umschließen, um eine aggregationsungestörte Proteinfaltung in einer zentralen Kavität zu ermöglichen. (Bukau and Horwich, 1998, Hartl, 1996, Hartl et al., 2011, Hayer-Hartl et al., 2016, Lopez et al., 2015). Damit wird nicht nur die korrekte Faltung von Proteinen unterstützt und beschleunigt (Baumketner et al., 2003, Chakraborty et al., 2010, England et al., 2008, Hartl and Hayer-Hartl, 2002, Hayer-Hartl and Minton, 2006, Lin and Rye, 2004, Tang et al., 2006, Tian and Garcia, 2011), sondern auch die Aggregation vieler krankheitsassoziiertes Proteine inhibiert (Behrends et al., 2006, Kim et al., 2013, Kitamura et al., 2006, Tam et al., 2006). Chaperonine könne in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden (Frydman, 2001, Horwich et al., 2007, Tang et al., 2007), wobei das mitochondriale HSP60 zur ersten Klasse gehört, die sich durch die

funktionelle Notwendigkeit eines „deckelförmigen“ Co-Chaperons HSP10 auszeichnet. (Kim et al., 2013). Zur zweiten Gruppe der Chaperonine gehört das cytosolische TriC/CCT, das ebenso wie HSP60 nichtnative Proteine für die Faltung umschließt (Douglas et al., 2011, Kim et al., 2013). Der Unterschied zwischen beiden Chaperoninen ist zum einen die Lokalisation, und zum anderen die fehlende Notwendigkeit eines Co-Chaperons der zweiten Gruppe der Chaperonine, sowie die unterschiedliche Anzahl an Untereinheiten pro Ring und deren räumlicher Anordnung (Cong et al., 2010, Cong et al., 2012, Dekker et al., 2011, Horwich et al., 2007, Huo et al., 2010, Kalisman et al., 2012, Kim et al., 2013, Leitner et al., 2012, Munoz et al., 2011, Pereira et al., 2010, Shomura et al., 2004, Zhang et al., 2011b). Des Weiteren ist der Reaktionszyklus von TriC langsamer als der von HSP60, was längere Umschließung und damit einen längeren Faltungszeitraum ermöglicht (Reissmann et al., 2007).

1.1.2.2.3 HSP90 Chaperone

HSP90 Chaperone sind ebenfalls ATP-abhängige HSPs. Sie gehören zu den am häufigsten im Cytosol vorkommenden Proteinen unter physiologischen Bedingungen (Hipp et al., 2019, Kim et al., 2013, Mayer, 2010, Schopf et al., 2017) und ihre Expression ist bei Stressantworten wie dem *heat shock response* ebenfalls erhöht (Ritossa, 1996). Sie agieren hierarchisch nach den HSP70 Chaperonen und kontrollieren durch die Erleichterung der Faltung nicht nur Funktion und Aktivität vieler Proteine des Zellzyklus, der Telomerwartung, der Apoptose, der mitotischen Signaltransduktion, des Vesikel vermittelten Transports, sowie des angeborenen Immunsystems und der gezielten Proteindegradation (Hartl et al., 2011), wie zum Beispiel von Kinasen (Brugge and Erikson, 1977) und Steroidhormonrezeptoren (Pratt et al., 1996), sondern auch die Bindung von Liganden an deren Rezeptoren, sowie den Zusammenschluss von Multiproteinkomplexen. (McClellan et al., 2007, Schopf et al., 2017, Sharma et al., 2012, Taipale et al., 2010, Taipale et al., 2012). Für ihre Funktion interagieren sie mit verschiedenen Co-Faktoren wie CDC37 (Inhibition der ATPase-Aktivität), HOP (Inhibition der N-terminalen Dimerisation), AHA1 (Stimulierung der ATP-Hydrolyse) und p23 (Stabilisierung der Dimerisierung), sowie HSP70.

1.1.2.2.4 HSP40 Chaperone/J-Proteine

Die HSP40 Chaperone oder auch J-Proteine (Hipp et al., 2019), sind wichtige HSP70 Co-Chaperone die maßgeblich mit an der Chaperonaktivität von HSP70 beteiligt sind. Ihre

Hauptfunktion ist die Regulation der ATP-abhängigen Bindung verschiedener Peptide durch HSP70. Hierbei fördern sie Umsetzung von ATP zu ADP und damit die Entstehung des HSP70-Peptid-Komplexes (vgl. Abb. 4). (Cyr et al., 1992, Langer et al., 1992, Liberek et al., 1991, Palleros et al., 1993, Szabo et al., 1996, Wickner et al., 1991). Allerdings regulieren sie nicht nur die HSP70 Aktivität. Sie sind zum einen auch in der Lage direkt mit ungefalteten Polypeptiden zu interagieren und diese an HSP70 zu vermitteln (Cheetham and Caplan, 1998, Cyr et al., 1994, Kampinga and Craig, 2010, Langer et al., 1992) und zum anderen ermöglichen sie durch ihre unterschiedliche Lokalisation im selben zellulären Kompartiment die Bindung spezifischer Klienten an HSP70 (Brodsky and Schekman, 1993, Cyr and Neupert, 1996, Fan et al., 2003, Shen et al., 2002).

1.1.2.2.5 kleine Hitzeschockproteine

HSPB1-HSPB10 bilden die Familie der kleinen Hitzeschockproteine. Eine Familie von ATP unabhängigen Chaperone, die große bis zu 1 MDa große heterogene Oligomere bilden können und über eine α -kristalline Domäne verfügen (Haslbeck et al., 2019, Hipp et al., 2019). Diese Chaperone sind in der Lage nichtnative Peptidketten, aber auch nichtnative Proteine zu binden um eine irreversible Aggregation zu vermeiden (Haslbeck et al., 2019). Allerdings sind sie nach der ATP unabhängigen Bindung an misgefaltete oder im entfalteten begriffene Proteine nicht wie andere Chaperone in der Lage diese weiter zu prozessieren und zeigen entsprechend keine Rückfaltungsaktivität. Vielmehr stabilisieren sie ungefaltete Intermediate und aggregationsanfällige Proteine (de Jong et al., 1993, Haslbeck et al., 1999, Horwitz, 1992, Jakob et al., 1993, McHaourab et al., 2002, Ungelenk et al., 2016). Sie agieren also als eine Art *holdase* und sorgen damit für disaggregations und rückfaltungsfähige Proteine, indem sie mit ihren Substraten weniger toxische, reversible Aggregate bilden (Haslbeck et al., 2019, Hipp et al., 2019). Dieser Vorgang schützt zum einen die Proteine vor einem unerwünschten Abbau durch Proteasen z.B. bei Hitzestress und verhindert zum anderen die Interaktion zwischen ungefalteten Proteinen, indem sie die Exponierung hydrophober Oberflächen verhindert (Haslbeck et al., 2019). Die entstandenen Aggregate können anschließend über das HSP70-Chaperonsystem disaggregiert, zurückgefaltet oder dem Degradationssystem übergeben werden (Ben-Zvi et al., 2004, Escusa-Toret et al., 2013, Malinowska et al., 2012, Mogk et al., 2003, Nillegoda and Bukau, 2015, Rampelt et al., 2012, Ungelenk et al., 2016, Zwirowski et al., 2017).

1.1.2.2.6 HSP70 Chaperone

Die HSP70 Chaperone bilden mit ihren dreizehn, ca. 70 kDa großen, ATP abhängigen Familienmitgliedern, die sowohl konstitutiv (z.B. HSC70/HSPA8) als auch stressinduziert (z.B. HSP70/HSPA1A) ubiquitär exprimiert werden einen zentralen Knotenpunkt des Proteostase-netzwerks (Kampinga et al., 2009, Klaijs et al., 2018). Dabei sind sie nicht nur an der initialen Faltung neu synthetisierter Proteine beteiligt, sondern sie agieren sowohl bei der Wartung der Proteinkonformation, der Disaggregation von Proteinaggregaten, der Rückfaltung fehlgefalteter Proteine und der Degradation terminal faltungsinkompetenter Proteine und disaggregationsunfähiger Aggregate (Diamant et al., 2000, Kettern et al., 2010, Kim et al., 2013, Mashaghi et al., 2016, Mayer and Bukau, 2005, Saibil, 2013, Young, 2010). HSP70 Hitzeschockproteine sind dabei in der Lage über ihre C-terminale Substratbindestelle kurze, etwa sieben Reste lange, hydrophobe Peptidsequenzen, die üblicherweise von neu synthetisierten und nicht nativen Proteinen exponiert werden, zu erkennen und zu binden (Clerico et al., 2015, Mayer et al., 2000, Rudiger et al., 1997). Die Bindung und Freisetzung der Substrate erfolgt dabei in einem ATP abhängigen Reaktionszyklus, der durch J-Domänen tragende HSP40-Chaperone und *nucleotide exchange factors (NEFs)* reguliert wird (Kampinga and Craig, 2010, Mayer, 2010). Die HSP40 Chaperone interagieren über ihre J-Domäne mit der N-terminalen ATPase-Domäne von HSP70 und stimulieren die Umsetzung von ATP zu ADP und damit die Entstehung des HSP70-Substrat-Komplexes (Clerico et al., 2015, Hartl et al., 2011, Sturner and Behl, 2017). NEFs wie die Chaperone der HSP110- oder die Co-Chaperone der BAG-Familie katalysieren den Austausch von ADP mit ATP nach erfolgter ATP-Hydrolyse und ermöglichen somit die Freigabe von Substraten wodurch der Zyklus erneut gestartet wird (Bracher and Verghese, 2015, Brehmer et al., 2001, Kityk et al., 2015, Mayer and Bukau, 2005, Schuermann et al., 2008, Young, 2010).

1.2 Autophagie

Der Prozess der Autophagie, für den Yoshinori Osumi mit seinen Arbeiten 2016 den Nobelpreis erhielt und der auch als Autophagocytose bezeichnet wird, wurde das erste Mal von Keith R. Porter und Thomas P. Ashford im Jahre 1962 beschrieben, wobei der Begriff der Autophagie erst 1963 von Christian de Duve geprägt wurde (Ashford and Porter, 1962, de Duve, 1983, Geng and Klionsky, 2008). Als Autophagie wird ein Prozess des „Selbstverzehens“ (aus dem Griechischen *autóphagos*: „sich selbst verzehrend“) bezeichnet, ein evolutionär hoch konservierter Prozess bei dem cytosolische Komponenten wie Proteine

aber auch ganze Zellorganellen über das Lysosom degradiert werden (Johansen and Lamark, 2011, Klionsky et al., 2016, Parzych and Klionsky, 2014, Sturner and Behl, 2017). Basale autophagische Prozesse, welche obligat in jeder Zelle ablaufen, sind dabei ein wichtiger Teil des PN und bilden mit ihrer degradativen Funktion einen wichtigen Stützpfiler der Proteinhomöostase, indem sie sowohl disaggregationsunfähige und damit terminale Proteinaggregate, als auch beschädigte Zellorganellen beseitigen (Glick et al., 2010, Sturner and Behl, 2017). Äußere Stressfaktoren wie der Entzug von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren oder Sauerstoff sind in der Lage Autophagie zu induzieren (Chen and Klionsky, 2011, Sturner and Behl, 2017). So sorgt die erhöhte autophagische Aktivität unter Nährstoffentzug durch die Degradation von cytosolischem Material sowohl für die Entstehung von Di- und Tripeptiden als auch von freien Aminosäuren (Mizushima and Komatsu, 2011). Diese können entweder für die Synthese neuer Proteine, Proteinen des lysosomale System und der Atmungskette, antioxidative Enzyme und Proteine der Aminosäure-biosynthese, oder für die ATP-Produktion in den Mitochondrien genutzt werden, indem sie in Intermediate des Citratzyklus oder über die Glukoneogenese in Glukose umgewandelt werden (Guo et al., 2011, Levine and Yuan, 2005, Onodera and Ohsumi, 2005, Suzuki et al., 2011). Eine exzessiv induzierte autophagische Aktivität führt hingegen zum kontrollierten Zelltod des Typ II (*Type II programmed cell death; type II PDC*), der sich vom Typ I, der Apoptose, und von der Nekrose deutlich unterscheidet (Chen et al., 2010, Levine and Yuan, 2005, Maiuri et al., 2007, Platini et al., 2010). Des Weiteren übernimmt die Autophagie eine wichtige Rolle in Entwicklung (Levine and Klionsky, 2004), Alterung (Young et al., 2009), Verlängerung der Lebensspanne und in der Immunität bzw. der Abwehr von Pathogenen (Deretic and Levine, 2009, Vellai et al., 2009). Entsprechend hat ein Versagen der Autophagie schwerwiegende Folgen und ist mit vielen pathologischen Konditionen wie Krebs, Myopathien, neurodegenerativen Krankheiten, Herz- und Lebererkrankungen assoziiert (Deretic and Levine, 2009, Klionsky, 2005,

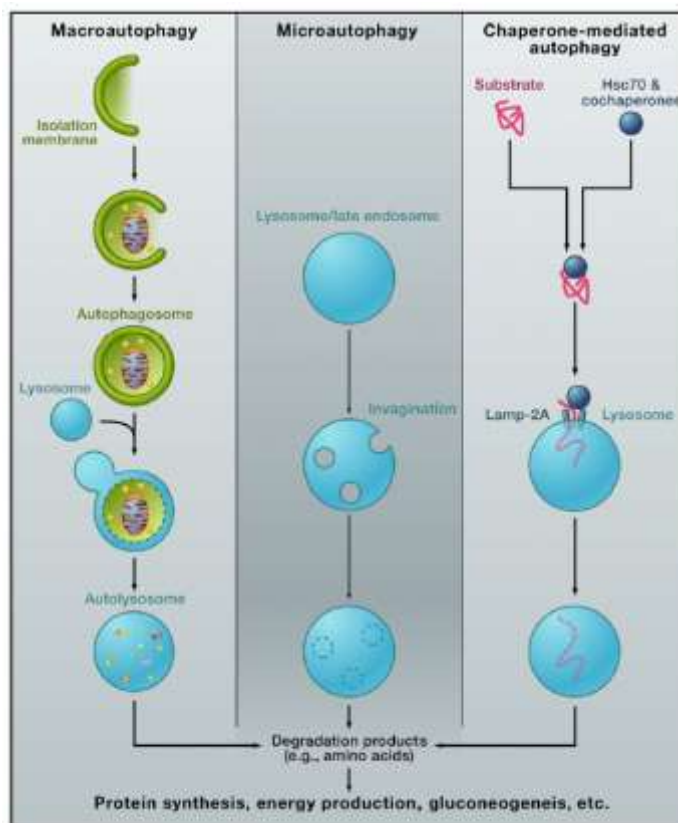


Abbildung 6: Die drei Formen der Autophagie. Simplifizierte Darstellung der drei verschiedenen Autophagietypen: Makroautophagie, Mikroautophagie und chaperonvermittelte Autophagie (CMA). Übernommen von Mizushima et al. 2011

type II PDC), der sich vom Typ I, der Apoptose, und von der Nekrose deutlich unterscheidet (Chen et al., 2010, Levine and Yuan, 2005, Maiuri et al., 2007, Platini et al., 2010). Des Weiteren übernimmt die Autophagie eine wichtige Rolle in Entwicklung (Levine and Klionsky, 2004), Alterung (Young et al., 2009), Verlängerung der Lebensspanne und in der Immunität bzw. der Abwehr von Pathogenen (Deretic and Levine, 2009, Vellai et al., 2009). Entsprechend hat ein Versagen der Autophagie schwerwiegende Folgen und ist mit vielen pathologischen Konditionen wie Krebs, Myopathien, neurodegenerativen Krankheiten, Herz- und Lebererkrankungen assoziiert (Deretic and Levine, 2009, Klionsky, 2005,

Mizushima et al., 2008, Vellai et al., 2009). Der Vorgang der Autophagie bedarf daher einer besonderen Kontrolle und Regulation. Die Initiierung und der Prozess der Autophagie werden durch ca. 35 bekannte Autophagie assoziierte Gene und Proteine (Atgs/ATGs) in Hefe, sowie ihrer humanen Homologe reguliert und kontrolliert (Jin and Klionsky, 2014, Klionsky et al., 2003, Klionsky and Schulman, 2014, Mizushima and Komatsu, 2011, Wesselborg and Stork, 2015), wobei Atg 1-10, 12-14,16 und 18 neben Atg 17, 29, und 31 die Kern-Atg-Proteine der Autophagie darstellen (Nakatogawa et al., 2009). Weitere nicht-Atg-Proteine, die wichtig für den Ablauf und die Regulation der Autophagie von Bedeutung sind, sind Chaperone allgemein, vor allem HSP70, mTOR, AMPK, AKT/PKB, AMBRA1, BCL-2, DFCP1, VPS34/PIK3C3, UVRAG, Bif1 und Rubicon (Chen and Klionsky, 2011, Wesselborg and Stork, 2015). Autophagische Prozesse können Aufgrund ihrer Funktionsweise in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden wie es in Abbildung 6 dargestellt ist. Unterschieden wird zwischen chaperonvermittelter Autophagie (CMA), Mikroautophagie und Makroautophagie (Boya et al., 2013, Klionsky et al., 2016, Parzych and Klionsky, 2014).

1.2.1 Chaperonvermittelte Autophagie (CMA)

Bei der chaperonvermittelte Autophagie werden Proteine die ein KFERQ Motiv innerhalb ihrer Aminosäuresequenz besitzen selektiv von HSP70 erkannt und zum Lysosom transportiert. Dort bindet der HSP70-Substratkomplex an LAMP2, ein integrales Membranprotein von Lysosomen, und das Substrat wird nach seiner Entfaltung über einen multimeren Translokationskomplex in das Lysosom Überführt (Massey et al., 2004, Orenstein and Cuervo, 2010). Da für diese Art der Autophagie die Entfaltung der Substrate nötig ist, ist CMA nicht in der Lage größere Aggregate oder Zellorganellen zu degradieren.

1.2.2 Mikroautophagie

Mikro- und Makroautophagie hingegen sind sehr wohl in der Lage auch größere Aggregate und ganze Zellorganellen zu degradieren. In mikroautophagischen Prozessen kommt es hierbei zur Invagination der lysosomalen Membran und damit zum Einschluss cytosolischen Materials ins Lysosom (Mijaljica et al., 2011).

1.2.3 Makroautophagie

Im Gegensatz zur Mikroautophagie und CMA wird während der Makroautophagie zu degradierendes Material von einer Lipiddoppelmembran umschlossen, es bildet sich ein Autophagosom (Mizushima, 2007). Die entstandenen Autophagosomen fusionieren anschließend direkt mit einem Lysosom oder zunächst mit frühen und späten Endosomen, um ein Amphisom zu bilden, was anschließend mit dem Lysosom fusioniert.

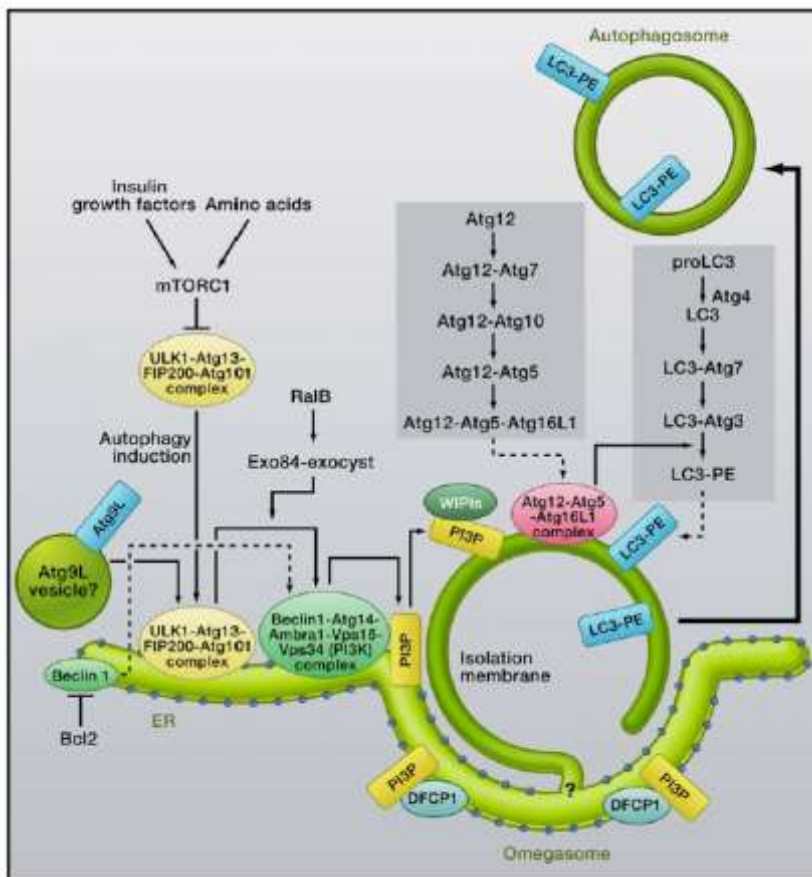


Abbildung 7: Entstehung eines Autophagosoms. Vereinfachte Darstellung der Initiations, Nukleation und Elongation eines Autophagosoms mit der Darstellung einiger wichtiger Proteinkomplexe. Übernommen von Mizushima et al. 2011

Makroautophagie ist ein äußerst komplexer, streng regulierter, vielschrittiger Vorgang an dem viele verschiedenen Proteinkomplexe beteiligt sind (Feng et al., 2014, Klionsky et al., 2016, Parzych and Klionsky, 2014). Abbildung 7 zeigt schematisiert und vereinfacht die Entstehung eines Autophagosoms in Zellen von Säugern.

Die **Initiation** der Makroautophagie ist dabei abhängig vom ULK1-Komplex. Dieser aus ULK1 - dem Säugerhomolog von Atg1 -, ATG13, FIP200 und Atg101 bestehende Proteinkinasekomplex initiiert über

eine Phosphorylierung von Beclin-1 die Nukleation der Makroautophagie (Hara et al., 2008, Hosokawa et al., 2009a, Hosokawa et al., 2009b, Mercer et al., 2009, Mizushima, 2010, Russell et al., 2013). Reguliert wird dieser Komplex über eine Phosphorylierung durch den mTOR1-Komplex vermittelt durch RAPTOR, die unter nährstoffreichen Bedingungen dafür sorgt, dass der ULK1-Kinasekomplex inaktiviert wird (Hung et al., 2012). Der mTOR1-Komplex wird wiederum über PKA phosphoryliert und damit aktiviert (Mavrakis et al., 2006). PKA inhibiert die Makroautophagie allerdings nicht nur über die Aktivierung des mTORC1, sondern

auch indirekt über die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung von AMPK (Djouder et al., 2010) oder die Phosphorylierung von LC3 (Cherra et al., 2010). AMPK ist der Energiesensor der Zelle indem sie auf das Verhältnis von AMP zu ATP reagiert (Egan et al., 2011). Steigt das Verhältnis von ADP zu ATP oder wird AMPK durch ROS via ATM aktiviert, kann sie mTORC1 entweder direkt oder über die Aktivierung von TSC2, einem negativen Effektor von mTORC1, der durch die Aktivität von Akt/PKB reguliert wird, inhibieren und damit die Makroautophagie initiieren (Egan et al., 2011, Gwinn et al., 2008, Inoki et al., 2003, Rubinsztein et al., 2011, Yang and Klionsky, 2010). Des Weiteren ist eine aktive AMPK in der Lage den ULK1 Komplex über ULK1 direkt zu aktivieren und damit die Regulation durch mTORC1 zu umgehen (Egan et al., 2011).

Ist die Initiation der Makroautophagie erfolgreich schließt sich die **Nukleation** des Autophagosoms bzw. die Entstehung des Omegasoms an (Axe et al., 2008). Während in Hefezellen die Entstehung des Autophagosoms an die PAS gebunden ist, ist in Säugerzellen keine solche cytosolische Struktur bekannt. Allerdings scheint die Formation von Autophagosomen mit dem ER gekoppelt zu sein (Hayashi-Nishino et al., 2009, Klionsky, 2007, Mizushima and Komatsu, 2011, Tooze and Yoshimori, 2010, Yla-Anttila et al., 2009). Ein für die Nukleation wichtiger Proteinkomplex in Säugerzellen ist der Phosphatidylinositol-3-Kinase Komplex der Klasse III (PtdIns3KC3), bestehend aus den Kernkomponenten Beclin1, der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Vps34), und Vps15 (Funderburk et al., 2010, Mizushima and Komatsu, 2011, Yang and Klionsky, 2010). Der PtdIns3K Klasse 3-komplex existiert dabei in drei verschiedenen Varianten (Parzych and Klionsky, 2014, Yang and Klionsky, 2010). Eine Variante besitzt zusätzlich zu den Kernkomponenten ATG14 und ist über die Bindung von AMBRA1 oder BCL-2 an Beclin1 reguliert, wobei Erstere die Aktivität des Komplexes stimuliert und Zweitere den Komplex inhibiert. Im UVRAG Komplex wird ATG14 mit UVRAG und AMBRA1 mit SH3GLB1 ausgetauscht, wobei SH3GLB1 ein positiver Regulator von UVRAG ist. Der Dritte Komplex besitzt anstatt SH3GLB1 Rubicon, was eine inhibitorische Wirkung auf UVRAG besitzt. Im Gegensatz zu den ersteren beiden Komplexen besitzt dieser Komplex eine negative, regulierende Wirkung auf mikro-autophagischen Prozesse (Feng et al., 2014). Nach der Aktivierung des PtdIns3KC3 über die Phosphorylierung von Beclin1 durch ULK1 und der dadurch erfolgenden Lokalisierung des Komplexes ans ER besteht die Hauptaufgabe dieses Komplexes darin aus Phosphatidylinositol (PI) Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns3P) zu generieren (Di Bartolomeo et al., 2010, Russell et al., 2013, Xie and Klionsky, 2007). PtdIns3P ist anschließend in der Lage weitere regulatorische, für die Nukleation und Elongation notwendige Faktoren wie DFCP1 und Mitglieder der WIPI-Familie wie WIPI1/2 zu binden (Axe et al., 2008, Wesselborg and Stork, 2015). DFCP1 scheint dabei vor allem an der Ausbildung des Omegasoms beteiligt zu sein (Axe et al., 2008, Mizushima and Komatsu, 2011), während

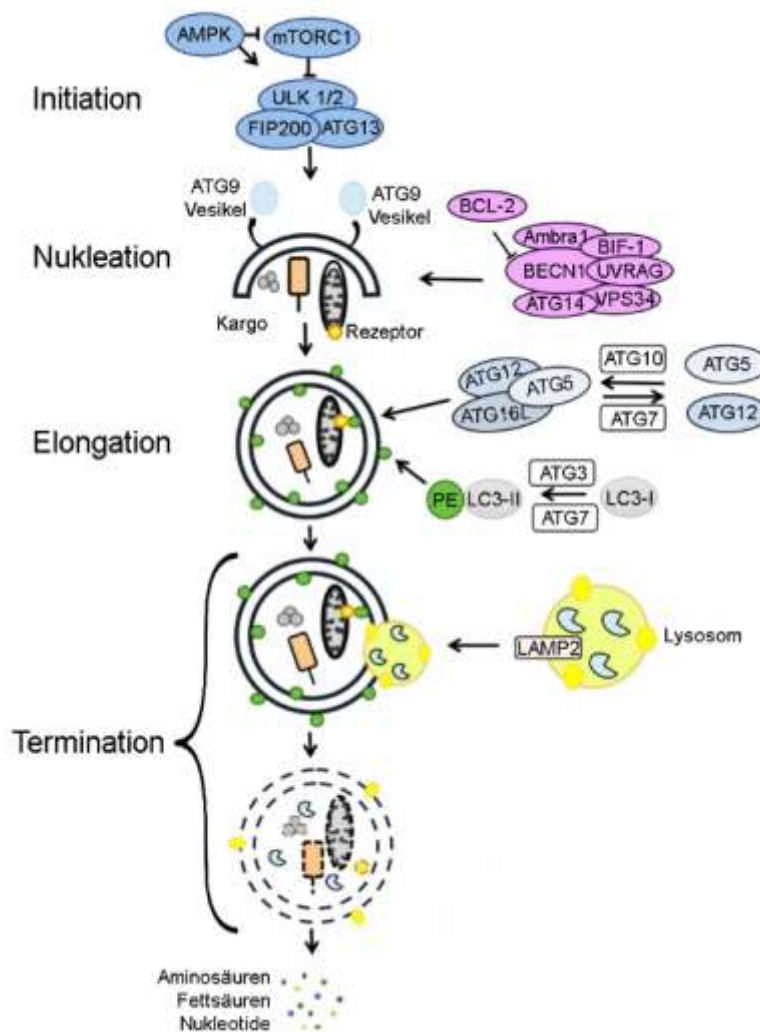


Abbildung 8: Der Prozess der Makroautophagie. Schematisierte und vereinfachte Darstellung des makroautophagischen Prozesses von der Initiation bis zur Termination. Übernommen und verändert von *Kocaturk and Gozuacik, 2018*

das hauptsächlich mit der Phagophore assoziierte WIPI1/2 an der Lipidierung von LC3 beteiligt ist, was die Reifung vom Omegasom zum Autophagosom vorantreibt (Mizushima and Komatsu, 2011, Polson et al., 2010). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Nukleation und die anschließende Elongation ist die Akquise von Lipidmembranen. Vor allem Atg9 positive Vesikel scheinen bei der Nukleation der Phagophore eine wichtige Rolle einzunehmen (Mari et al., 2010, Nair et al., 2011, Orsi et al., 2012, Puri et al., 2013, Sekito et al., 2009, Shirahama-Noda et al., 2013, Yamamoto et al., 2012, Young et al., 2006).

Bei Atg9 handelt es sich um ein Multitransmembranprotein das Reguliert durch den ULK1 und WIPI-ATG2 Komplex in der Lage ist Lipidmembranen an den Entstehungsort des Autophagosoms zu transportieren und nach erfolgtem Transport wieder zurück ins Cytoplasma überzugehen ohne Teil der entstehenden Membran zu werden (Reggiori et al., 2004, Sekito et al., 2009, Tooze et al., 2010, Webber and Tooze, 2010, Yamamoto et al., 2012). Allerdings scheinen die durch Atg9 bereitgestellten Lipidmembranen nicht vollständig für die Entstehung von Autophagosomen auszureichen (Ge et al., 2014, Yamamoto et al., 2012). Stattdessen konnte gezeigt werden, dass Membranen des intermediären ER-Golgi-Kompartiments (ERGIC) nicht nur für die LC3-Lipidierung notwendig und ausreichend sind, sondern auch als eine Art Membranvorlage für die LC3-Lipidierung während der Nukleation zu wirken (Ge et al., 2013). Des Weiteren scheint ein kleiner Teil der Atg16 Proteine mit dem endocytotischen Wiederverwertungssystem assoziiert zu sein und agiert möglicherweise

zusammen mit Atg9 bei der Lipidation von LC3 während der Initiation der Phagophorenbildung (Moreau et al., 2011, Puri et al., 2013, Ravikumar et al., 2010).

Auf die Nukleation folgend beginnt die **Elongation** des Omegasoms und die Reifung des Autophagosoms. Hierbei sind vor allem zwei ubiquitinähnliche Systeme wichtig, das Atg12-Atg5- und das LC3-PE-Konjugationssystem, wobei die ubiquitinähnlichen (Ubl) Proteine jeweils Atg12 und LC3 sind (Kirkin et al., 2009, Mizushima, 2007). Für die Elongation der Phagophore ist die Konjugation von LC3 an Phosphatidylethanolamin (PE) und die Lokalisation dieses Komplexes an den Entstehungsort des Autophagosoms von höchster Wichtigkeit. Die Konjugation von LC3 an PE wird dabei von einem Multiproteinkomplex bestehend aus Atg12, Atg5 und Atg16L, der eine E3 ähnliche Funktion besitzt, übernommen und der zusätzlich wie auch WIPI und Atg12 in der Lage ist LC3-PE an den Ort der Phagophorensynthese zu binden (Fujioka et al., 2008, Fujita et al., 2008, Geng and Klionsky, 2008, Hanada et al., 2007, Mizushima et al., 2003, Mizushima et al., 2001, Nair et al., 2010). Für die Formation des Atg12-Atg5-Atg16L Komplexes muss zunächst ATG12 über Atg7, dass die Funktion eines E1-Enzyms besitzt, ATP abhängig aktiviert werden, um im Anschluss über einen Transfer an das E2 ähnliche Atg10 an Atg5 gekoppelt zu werden (Geng and Klionsky, 2008, Glick et al., 2010, Mizushima et al., 1998a, Mizushima et al., 1998b, Mizushima et al., 2002, Shintani et al., 1999, Tanida et al., 1999, Tanida et al., 2001). Anschließend interagiert der gebildete Atg12-Atg5-Komplex mit Atg16L und bildet einen multimeren Atg12-Atg5-Atg16 Komplex, der die oben beschriebenen Funktionen übernimmt (Fujita et al., 2008, Glick et al., 2010, Mizushima et al., 2003, Mizushima et al., 2001) und nach der Komplettierung des Autophagosoms wieder von der Membran ins Cytoplasma dissoziiert (Barth et al., 2010, Mizushima et al., 2003, Mizushima et al., 2001). Die Lipidierung von LC3 mit PE erfolgt ähnlich wie die Entstehung des Atg12-Atg5-Atg16-Komplexes mit der Hilfe von verschiedenen E1, E2 und E3 ähnlichen Proteinen und Proteinkomplexen. Pro-LC3 wird zunächst durch Atg4 C-Terminal trunziert, und das entstandene LC3-I kann anschließend ähnlich wie Atg12 durch Atg7 aktiviert und auf Atg3, ein E2 ähnliches Protein, übertragen werden, was letztendlich zur Lipidierung von LC3-I durch den Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex führt (Barth et al., 2010, Geng and Klionsky, 2008, Glick et al., 2010, Hemelaar et al., 2003, Ichimura et al., 2000, Kim et al., 2001, Kirisako et al., 2000). Nach der Komplettierung des Autophagosoms wird auf der Außenseite befindliches LC3 durch ATG4 von PE dekonjugiert während innerhalb des Autophagosoms befindliches LC3 nach der Fusion mit dem Lysosom degradiert wird (Kirisako et al., 2000). Die Dekonjugation von LC3 und PE durch Atg4 und damit die Dissoziation vom Autophagosom, muss zeitlich korrekt und nicht zu früh erfolgen, damit die Elongation der Phagophore nicht inhibiert wird. Hierzu stellten *Nair et al.* 2010 eine Hypothese auf in der sie eine Abschirmung von LC3-PE durch ATG18/WIPI und Atg12 zusammen mit dem Atg12-Atg5-Atg16/tg16L Komplex gegenüber

Atg4 vorschlagen, die nach der Dissoziation dieser Proteine bei Fertigstellung des Autophagosoms aufgehoben wird (Nair et al., 2010). Die Quelle der für die Elongation notwendigen Lipidmembranen ist noch nicht vollständig geklärt. Als mögliche Herkunftsorte werden allerdings das ER (Axe et al., 2008, Hayashi-Nishino et al., 2009, Yla-Anttila et al., 2009), der Golgi (Geng et al., 2010, Ohashi and Munro, 2010, van der Vaart et al., 2010, Yen et al., 2010), das Atg9-Kompartiment (Mari et al., 2010, Nair et al., 2011, Orsi et al., 2012, Popovic et al., 2012, Sekito et al., 2009, Yamamoto et al., 2012, Young et al., 2006), die Plasmamembran (Moreau et al., 2011, Ravikumar et al., 2010), wiederverwertende Endosome (Longatti et al., 2012, Puri et al., 2013) und Mitochondrien (Hailey et al., 2010) vermutet.

Der letzte Schritt makroautophagischer Prozesse ist die **Termination**. Nach der Fertigstellung des Autophagosoms erfolgt die Degradation der in der Doppelmembran eingeschlossenen Substrate durch die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom. Nach der Fusion wird die innere autophagische Membran und deren Inhalt durch lysosomale Proteasen degradiert und über lysosomale Permeasen werden die entstandenen Fragmente wieder ins Cytosol entlassen (Sturner and Behl, 2017).

1.2.3.1 Selektive Makroautophagie

Makroautophagie wurde lange Zeit für einen unspezifischen Prozess, der große Mengen cytosolischen Materials degradiert, gehalten (Kopitz et al., 1990). Allerdings handelt es sich bei der Makroautophagie um einen hoch spezifischen und selektiven Vorgang, der über die simultane Interaktion zwischen Autophagierezeptoren wie p62 und NBR1, deren Fracht, meist ubiquitinierte aber auch nicht ubiquitinierte Substrate, und entsprechenden ATG8 Orthologen in der Lage ist gezielt Substrate über den lysosomalen Abbau zu degradieren (Khaminets et al., 2016, Pankiv et al., 2007, Rogov et al., 2014, Slobodkin and Elazar, 2013, Stolz et al., 2014). Die Interaktion zwischen den Autophagierezeptoren, den ubiquitinierten Substraten und den Atg8 Orthologen wird dabei über verschiedene Domänen der Autophagierezeptoren vermittelt. So konnte für p62 gezeigt werden, dass die Interaktion mit Ubiquitin über eine Ubiquitinbindedomäne (UBD) stattfindet, während es für die Interaktion mit LC3 über eine LC3 interacting region (LIR) verfügt (Duran et al., 2008). Die verschiedenen selektiven Formen der Makroautophagie werden nach ihren Substraten oder auch Interaktoren benannt. So wird der spezifische Abbau von aberranten und krankheitsassoziierten Proteinaggregaten als Aggrephagie beschrieben, der makrophagische Abbau von intrazellulären Pathogenen oder

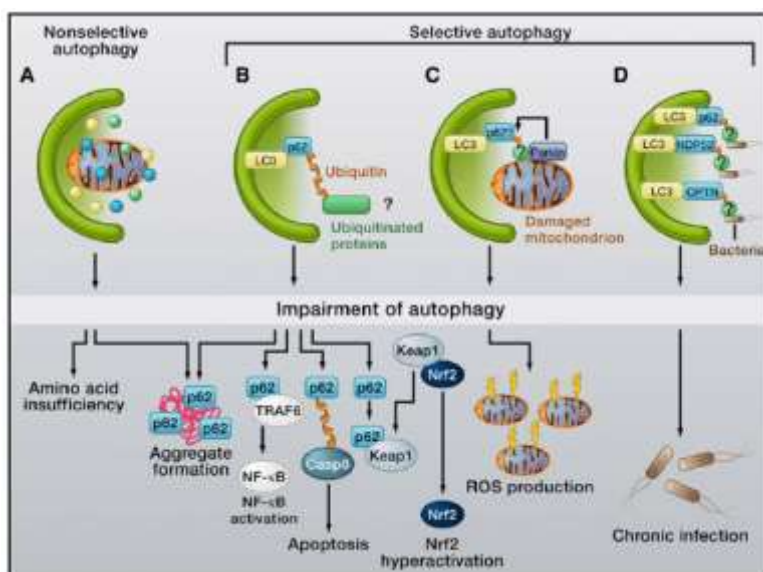


Abbildung 9: Nicht selektive und selektive Makroautophagie. Vereinfachte Darstellung von selektiven und nicht selektiven makroautophagischen Vorgängen und die Folgen bei deren funktionellem Versagen. Übernommen von Mizushima et al. 2011

Mitochondrien entsprechend als Xenophagie und Mitophagie (vgl. Abbildung 9) (Rogov et al., 2014). Neben den oben genannten autophagischen Rezeptoren existieren weitere Faktoren die Teils zelltyp-, alters- oder krankheitsabhängig während der selektiven Makroautophagie eine wichtige Funktion einnehmen. So z.B. das HSP70 Co-Chaperone BAG3, dass neben HSP70, HSPB8 und Dynein einer der wichtigsten Faktoren in der BAG3 vermittelten selektiven

Makroautophagie und der Chaperone assistierten, selektiven Autophagie in Drosophila ist (Arndt et al., 2010, Behl, 2016, Gamerding et al., 2009).

1.3 Das HSP70 Co-Chaperon BAG3

Das Co-Chaperone BAG3 (BCL-2 assoziiertes Anthanogen 3) ist eines von 6 verschiedenen, evolutionär hoch konservierten Co-Chaperonen der BAG-Familie, deren Gemeinsamkeit das Vorhandensein mindestens einer ca. 110-124 Aminosäuren langen Bag-Domäne ist, die sie dazu befähigt mit Proteinen wie Bcl-2, dessen Interaktion mit Bag1 namensgebend war, HSF-1 und der ATPase-Domäne von HSP70 zu interagieren (Bracher and Verghese, 2015, Briknarova et al., 2002, Brive et al., 2001, Colinet and Hoffmann, 2010, Coulson et al., 2005, Doukhanina et al., 2006, Rosati et al., 2007a, Sturner and Behl, 2017, Takayama and Reed, 2001, Takayama et al., 1995, Takayama et al., 1999). Erstmals wurde Bag3 1999 von Takayama et al. als Ergebnis eines *yeast two hybrid screens* auf HSC/HSP70 Interaktoren beschrieben (Takayama et al., 1999). Als multifunktionelles Protein ist es ein wichtiger Faktor in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Apoptose, Entwicklung, Wartung und Arrangement von cytoskelettalen Elementen, Zelladhäsion, Zellmotilität, viraler Replikation, sowie der selektiven Makroautophagie und übernimmt eine wichtige Rolle in verschiedenen Krankheiten wie Myopathien, Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen (Behl, 2011, Behl, 2016, Chen et al., 2013, Gamerdinger et al., 2011a, Knezevic et al., 2015, Rosati et al., 2011).

1.3.1 Aufbau, Lokalisation und Regulation von BAG3

BAG3/CAIR-1/BIS ist ein ca. 75 bzw. 43 kDa großes Protein, das eine Vielzahl verschiedener interaktiver Domänen besitzt (vgl. Abbildung 10) (McCollum et al., 2009). Wie alle Mitglieder der BAG-Familie besitzt es eine C-terminal liegende, ca. 80 Aminosäuren lange, konservierte BAG-Domäne, die es ihm ermöglicht mit HSP70, Bcl-2 und HSF1 zu interagieren (Behl, 2016, Doong et al., 2003, Jin et al., 2015, Lee et al., 1999). Neben der konservierten BAG-Domäne besitzt BAG3 vier weitere Domänen: eine WW-Domäne, zwei IPV Motive, ein 14-3-3-Bindungsmotiv und eine PxxP-Region. Die WW-Domäne ermöglicht es BAG3 mit PxxP-Motiv oder PY Motiv tragenden Proteinen, wie PDZGEF2, SYNPO2, LATS1/2, AMOTL1/2 und TSC1 zu interagieren (Gout et al., 2010, Iwasaki et al., 2010, Kathage et al., 2017, Klimek et al., 2017, Ulbricht et al., 2013), während über die IPV Motive die Bindung von BAG3 an sHSP wie HSPB8, HSPB6 etc. vermittelt wird (Carra et al., 2008b, Fuchs et al., 2009, Rauch et al., 2017). Zwischen den beiden IPV Motiven liegt das 14-3-3 Bindemotiv, was wie bereits der Name vermittelt, die Interaktion zwischen BAG3 und 14-3-3 γ ermöglicht. Die prolinreiche PxxP-Region vermittelt vor allem Interaktionen zwischen BAG3 und SH3-Domänen tragenden Proteinen. Hierzu gehören vor allem PLC γ , Dynein und Src (Colvin et al., 2014, Doong et al.,

2000, Gamerding et al., 2011 a). Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der BAG3-Struktur sind zwei konservierte Caspase-Schnittstellen. Die erste befindet sich in der PxxP-Region und wird bei ³⁴⁴KVED geschnitten, während Zweitere C-terminal, hinter der BAG-Domäne bei ⁵¹⁵LEAD liegt (Virador et al., 2009).

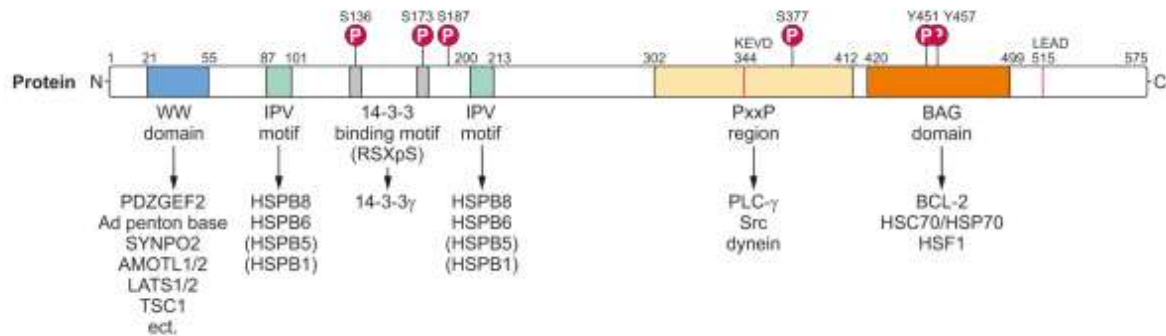


Abbildung 10: Das Multidomänenprotein BAG3. Schematische Darstellung des BAG3-Proteins mit eingezeichneten Interaktionsmotiven (WW Domäne, IPV Motive, 14-3-3 Bindungsmotiv, PxxP-Region und BAG-Domäne), sowie Phosphorylierungs- (S 136, S173, S167, S377, Y451, Y457) und Caspaseschnittstellen ³⁴⁴KVED, ⁵¹⁵LEAD. Übernommen von Stürner und Behl 2017

BAG3 ist ein vornehmlich cytosolisch lokalisiertes Protein, welches ubiquitär in allen humanen Zellen exprimiert wird, wobei eine besonders hohe konstitutive Expression von BAG3 in Herz- und Skelettmuskulatur, sowie in Zellen verschiedener Krebsarten (z.B. lymphoide oder myeloide Leukämien, Neuroblastome, Glioblastome, Prostatakarzinom, Ovarial und Mammakarzinom, Pankreaskarzinom) zu finden ist (Felzen et al., 2015, Gentilella and Khalili, 2011, Homma et al., 2006, Liao et al., 2001, Rosati et al., 2007a, Rosati et al., 2011, Sherman and Gabai, 2015, Sturner and Behl, 2017, Kogel et al., 2020). Neben der cytosolischen BAG3 Population kann in verschiedenen Zelltypen wie in Zellen des Pankreaskarzinoms eine kleinere, nukleäre BAG3 Fraktion beobachtet werden (Gentilella and Khalili, 2009, Rosati et al., 2011). Eine nukleäre Lokalisation ist allerdings nicht nur unter physiologischen Bedingungen beobachtbar. Durch bestimmte Stressfaktoren wie zum Beispiel einer Viralen Infektion, transloziert BAG3 in den Nukleus oder wird in perinukleären Aggregaten angereichert (Gamerding et al., 2009, Jin et al., 2015, Kyratsous and Silverstein, 2008). Des Weiteren konnten Bruno et al. 2008 eine kleinere, ca. 43 kDa große, synaptosomenassoziierte Form von BAG3 beschreiben, die zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht näher charakterisiert ist (Bruno et al., 2008).

Neben der Veränderung der Lokalisation führen Stressbedingungen wie oxidativer Stress, erhöhte Temperatur, Schwermetalle, HIV-Infektion und Proteasominhibition zu einer erhöhten Expression von BAG3, die sich auch in alternden Zellen bemerkbar macht (Bonelli et al., 2004,

Gamerding et al., 2009, Pagliuca et al., 2003, Rosati et al., 2007b, Wang et al., 2008). Die stressbedingte erhöhte Expression von BAG3 ist dabei vor allem auf die Induktion durch HSF1 zurückzuführen (Franceschelli et al., 2008, Jacobs and Marnett, 2009, Nguyen and Kim, 2017, Song et al., 2010), wobei auch NF- κ B über einen indirekten Mechanismus die Expression von BAG3 nach Stresseinwirkung erhöht (Nivon et al., 2012, Rapino et al., 2015). Neben HIF1 und NF- κ B sind auch das Onkogen WT1, der Transkriptionsfaktor AlbZIP und FGF2 dazu in der Lage die Expression von BAG3 zu erhöhen und im Zusammenhang mit FGF2 konnte in Neuroblastomzellen ebenfalls gezeigt werden das die BAG3-Aktivität abhängig von EGR-1 ist (Ben Aicha et al., 2007, Cesaro et al., 2010, Gentilella and Khalili, 2010, Gentilella et al., 2008). Zusätzlich ist es BAG3 in einigen Zellarten möglich, die eigene Expression durch Anbinden an den eigenen Promotor zu beeinflussen (Gentilella and Khalili, 2009). Die Regulation der BAG3-Expression ist nicht die einzige Möglichkeit die BAG3-Spiegel oder Aktivität zu modulieren. Bei der posttranslationalen Regulation beeinflussen vor allem Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen Funktion, Interaktionen und Aktivität von BAG3. (vgl. Abbildung 10). So ist ein korrekter Phosphorylierungsstatus von Serin 136 und Serin 173 wichtig für die Interaktion zwischen BAG3 und 14-3-3 beim Dynein vermittelten Transport von Aggregaten zum Aggresom. Eine Mutation dieser beiden Serine kann zu inkorrekten oder fehlenden Phosphorylierungen und damit zu einer abgeschwächten oder fehlenden Interaktion führen (Xu et al., 2013). Ein weiterer Vorgang, bei dem der Phosphorylierungsstatus von BAG3 eine wichtige Funktion einnimmt, ist die BAG3 vermittelte Insulin Ausschüttung pankreatischer Betazellen nach Glukosestimulation. Hier sorgt die Phosphorylierung von BAG3 durch FAK für den Verlust der Interaktion zwischen BAG3 und SNAP25, was zur Bildung des t-SNARE-Komplexes mit Syntaxin-1 und damit zur Vesikelausschüttung führt (Iorio et al., 2015). Neben diesen physiologischen Funktionen finden sich vor allem BAG3-Phosphorylierungen in verschiedenen Pathologien. In thyroiden Krebszellen sorgt eine Phosphorylierung von BAG3 durch PLC δ an Serin 187 für die Aktivierung der epithelial-mesenchymalen Transition und die Einwanderung von Krebszellen ins Gewebe (Li et al., 2013), während die Inhibition des Proteasoms mit Bortezomib in Zellen des multiplen Myeloms eine erhöhte Phosphorylierung von Serin 377 verursacht. CDK5 vermittelte Phosphorylierung von Serin 297/291 in der Alzheimerschen Krankheit sorgt für die Destabilisierung von BAG3 und damit zu einer übersteuerten, degradativen Wirkung von HSP70, was in Neuronen zu einem Verlust von Proteinen glutamaterger Synapsen führt (Zhou et al., 2020). Neben den posttranslationalen Phosphorylierungen, konnte gezeigt werden, dass, zum einen BAG3 durch CHIP im Laufe von CASA ubiquitiniert und nach Einschluss mit dem zu degradierenden Substrat durch das Autophagosom degradiert wird (Arndt et al., 2010) und zum anderen die basale Ubiquitinierung von BAG3 unter Staurosporinstress erhöht ist, was zur proteasomalen Degradation führt (Virador et al., 2009).

1.3.2 BAG3 in der Entwicklung

In verschiedenen physiologischen und pathologischen Funktionen übernimmt BAG3 eine wichtige Rolle. So auch in der Entwicklung von ZNS, Herz und dem hämatopoetischem System. So konnte gezeigt werden, dass im sich entwickelnden ZNS von Ratten BAG3 zunächst transient in Cortex und Hippocampus exprimiert wird, in der ersten postnatalen Woche BAG3-Spiegel abrupt ansteigen und danach wieder abfallen (Choi et al., 2006). Des Weiteren wurden eine transiente Expression von BAG3 in sich entwickelnden, radialen Gliazellen in Hirnstamm und Rückenmark von Ratten beobachtet (Choi et al., 2009). Zusätzlich konnten *Gentilella et al.* 2010 zeigen, dass BAG3-Expression die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen in Abhängigkeit von FGF2 aufrechterhält (Gentilella and Khalili, 2010). Neben der neuronalen Entwicklung sorgt die Expression von BAG3 während der Differenzierung von Kardiomyoblasten für die Aufrechterhaltung der Myogeninexpression (De Marco et al., 2011) und sorgt in skelettaler Muskulatur für die strukturelle Integrität von Z-Disks (Arndt et al., 2010, Hishiya et al., 2010). *Kwon et al.* zeigen, dass eine Störung der BAG3 Expression zum Verlust hämatopoetischer Stammzellen führt und eine entsprechend veränderte Stammzellnische zu einer gestörten Entwicklung von B-Zellen führt (Kwon et al., 2010). Schlussendlich beeinflusst BAG3 über die Bindung der YAP/TAZ Inhibitoren LATS1/2 und AMOTL1/2 direkt den die Zellproliferation und Apoptose regulierenden Hippo-Signalweg und die durch YAP/TAZ vermittelte Transkription (Meriin et al., 2018, Ulbricht et al., 2013).

1.3.3 BAG3 in Apoptose und Krebs

Viele der menschlichen Krebszellen zeigen erhöhte Expressionsspiegel von BAG3 und eine Reihe von unterschiedlichsten Studien konnte zeigen, dass durch eine Inhibition oder Überexpression von BAG3 spontane, aber auch medikamentös induzierte, apoptotische Prozesse verstärkt oder respektive inhibiert werden (Ammirante et al., 2010, Cesaro et al., 2010, Chiappetta et al., 2007, Doong et al., 2002, Festa et al., 2011, Jacobs and Marnett, 2009, Jung et al., 2010, Liu et al., 2009a, Mani et al., 2016, Pasillas et al., 2015, Rapino et al., 2015, Rosati et al., 2007a, Wang et al., 2009, Zhu et al., 2014, Kogel et al., 2020). So interagiert BAG3 mit MVP was dessen nukleäre Akkumulation und damit die verstärkte Aktivierung des überlebensfördernden ERK1/2 Signalwegs ermöglicht (Pasillas et al., 2015) oder vermittelt NIK induziert Resistenz gegen proteotoxischen Stress bei gleichzeitiger PQC Inhibition (Rapino et al., 2015). Des Weiteren konnten Depletionen von BAG3 zeigen, dass zum einen urotheliale Krebszellen unter BAG3 Depletion verstärkt auf BH3-Mimetika induzierte Apoptose

reagieren (Mani et al., 2016), und dass BAG3 in CLL-Zellen Apoptose inhibiert und die Zellmigration fördert (Zhu et al., 2014). Eine Studie von *Ammirante et al.* konnte unterdessen zeigen, dass BAG3 IKK- γ vor dem proteasomalen Abbau schützt, was zu einer anhaltenden NF- κ B Aktivierung führt (Ammirante et al., 2010). Neben seiner anti-apoptotischen Wirkung ist BAG3 nicht nur in der Lage, wie für hepatozelluläre Karzinome gezeigt werden konnte, Invasivität und Angiogenese zu fördern (Xiao et al., 2014), sondern es fungiert in PDCA auch als Signalmolekül, das über IFITM-2 Makrophagen aktiviert und über die PI3K und p38 Signalwege die Ausschüttung weiterer proliferationsstimulierender Faktoren auslöst (Rosati et al., 2015). Vor allem aber scheint das Zusammenwirken von BAG3 und HSP70 von Wichtigkeit für Krebs-signalwege zu sein, indem sie mit Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, FoxM1, Translationsregulatoren wie HuR und Zellzyklusregulatoren wie p21 und Survivin interagieren. Entsprechend zeigen Agenzien, die die Interaktion zwischen HSP70 und BAG3 stören eine anti-proliferative Wirkung in verschiedenen Krebsarten und sie sind in der Lage das Tumorstadium zu hemmen (Antonietti et al., 2017, Colvin et al., 2014, Li et al., 2015a).

1.3.4 BAG3 in Proteostase, Autophagie und neurodegenerativen Erkrankungen

Weitere Prozesse in denen BAG3 eine essentielle Funktion ausübt, ist die zelluläre Proteostase und die Autophagie vor allem im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen und das Altern. Hierbei ist vor allem die Rolle von BAG3 als Co-Chaperon von HSP70 und die Interaktion mit den sHSPs von großer Bedeutung. BAG3 bindet mit seiner BAG-Domäne an die ATPase-Domäne von HSP70, fördert in seiner Rolle als NEF die Entlassung von Substraten aus der katalytischen Domäne und zusammen mit HSP40 Chaperonen den Chaperonzyklus von HSP70 (Bracher and Verghese, 2015, Brehmer et al., 2001, Briknarova et al., 2002, Kityk et al., 2015, Rauch and Gestwicki, 2014, Sarparanta et al., 2012, Sondermann et al., 2001, Takayama et al., 1999). Über die IPV Motive bindet BAG3 sHSPs wie HSPB8, die in der Lage sind fehlgefaltete Proteine zu binden (siehe 1.1.2.2.5) und diese über die Interaktion mit BAG3 an HSP70 für die Rückfaltung oder eine weitere Verarbeitung zu vermitteln (Arndt et al., 2010, Crippa et al., 2010b, Haslbeck et al., 2005, Rauch et al., 2017, Ungelenk et al., 2016, Zwirowski et al., 2017). Der HSP70-BAG3-HSPB8 Komplex ist dementsprechend über die Kooperation der beiden Chaperonsysteme via BAG3 in der Lage, effizient Proteinaggregation zu vermindern oder zu vermeiden. Eine weitere Funktion dieses Komplexes besteht in der selektiven Degradation aggregierter Proteine in einem Prozess, der als *BAG3 vermittelte selektive Makroautophagie* bezeichnet wird (vgl. Abbildung 11) (Gamerding et al., 2009, Gamerding et al., 2011b). Hierbei bindet zunächst die

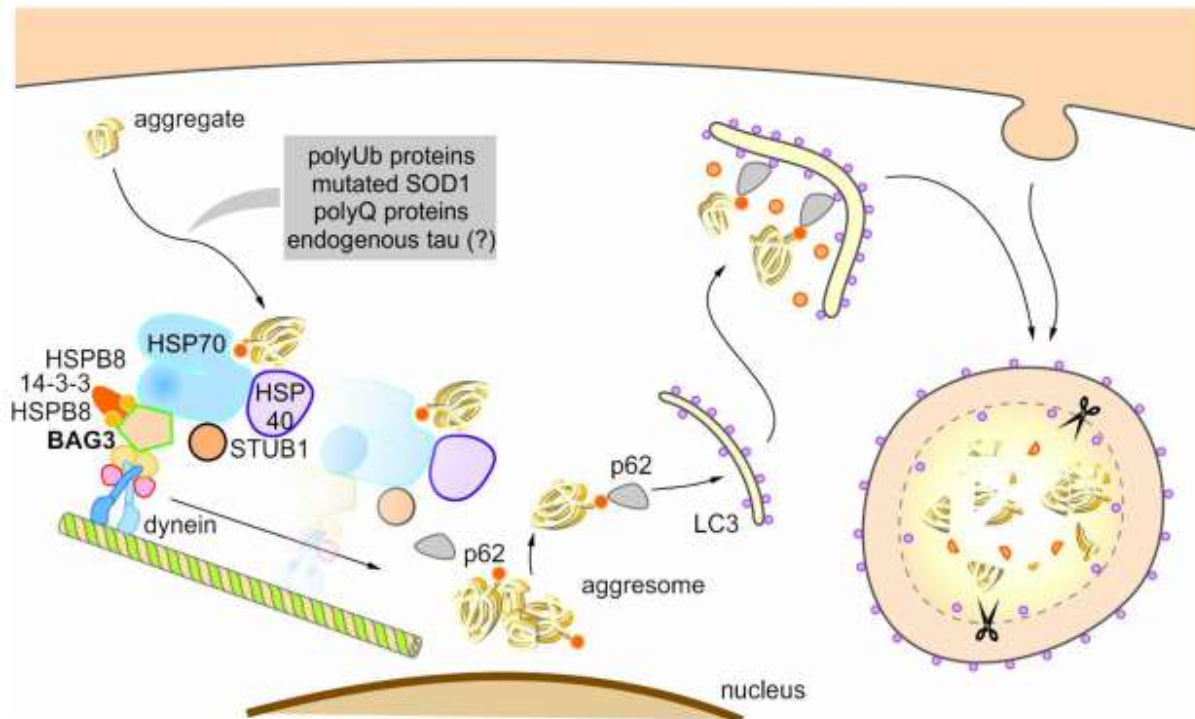


Abbildung 11: BAG3 vermittelte selektive Makroautophagie. Zu sehen ist eine vereinfachte Darstellung des Prozesses der Bag3 vermittelten selektiven Makroautophagie. Der Multiproteinkomplex aus HSP70, HSPB8, BAG3, CHIP(STUB1), 14-3-3, HSP40 und Dynein transportiert HSP70 gebundenen Substrate, mikrotubuliabhängig zu den perinukleären Aggresomen, wo sie über Autophagierezeptoren erkannt und dem autophagisch-lysosomalen System für die Degradation zugeführt werden. Übernommen von Behl 2016.

Ubiquitinligase CHIP (STUB1) an die C-terminale Substratbindestelle von HSP70 und ist so in der Lage mit Hilfe weiterer ubiquitinkonjugierender Enzyme HSP70 gebundene Substrate zu ubiquitinieren, wobei nicht alle über diesen Weg abgebauten Proteine einer Ubiquitinierung bedürfen (Arndt et al., 2010, Carra et al., 2008a, Gamerding et al., 2009, Gamerding et al., 2011b, Jiang et al., 2001, Stankiewicz et al., 2010, Zhang et al., 2015, Zhang et al., 2005b, Zhang and Qian, 2011). BAG3 ist in der Lage über seine PxxP Domäne diesen Proteinkomplex aus HSP70, HSPB8, BAG3 und CHIP an Dynein zu koppeln (Gamerding et al., 2011b, Garcia-Mata et al., 1999, Kopito, 2000), wobei diese Bindung durch das Adapterprotein 14-3-3 unterstützt wird indem es sowohl die entsprechenden Bindungsmotive in BAG3 (RSQS¹³⁶ und RSQS¹⁷³), als auch die Intermediäre Dyneinkette (DIC) bindet (Xu et al., 2013). Die Interaktion mit Dynein initiiert den Mikrotubuli assoziierten retrograden Transport der gebundenen Proteine in Richtung MTOC und der perinukleären Aggresome (Gamerding et al., 2011b, Johnston et al., 1998, Kopito, 2000, Zhang and Qian, 2011). Am Ort der Aggresome erfolgt die Erkennung der an HSP70 gebundenen Substrate über Autophagierezeptoren wie p62 und NBR1, die sie über LC3 an die autophagosomale Membran koppeln, was folglich zur Degradation über das autophagisch-lysosomale System führt (Gamerding et al., 2009). BAG3 wird laut *Gamerding et al.* dabei selbst nicht zum Ziel der autophagischen

Degradation. *Arndt et al.* konnten 2010 jedoch bei der Untersuchung einer BAG3 vermittelten selektiven Autophagie in *Drosophila* zeigen, dass BAG3 durch CHIP ubiquitiniert wird und die BAG3-Spiegel bei einer starken Induktion dieses Degradationsmechanismus reduziert sind, was wiederum für eine Degradation von BAG3 durch das autophagisch-lysosomale System sprechen könnte (*Arndt et al.*, 2010). Von Interesse ist, dass CHIP in diesem Komplex durch die Ubiquitinligase Parkin ausgetauscht werden kann und somit BAG3 mit mitophagischen Degradationsprozessen verbindet (*Imai et al.*, 2002, *Morishima et al.*, 2008, *Tahrir et al.*, 2017).

Der Prozess der BAG3 vermittelten Autophagie spielt vor allem in alternden Zellen und meist altersassoziierten, neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Huntington (HD) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich durch die krankhafte Extension von CAG Wiederholungen im Huntingtin-Gen auszeichnet. Überschreiten die Glutamine eine Anzahl von 35 Wiederholungen führt dies zur Entstehung hoch toxischer, Proteinbindender Aggregate (*Labbadia and Morimoto*, 2013). Für eine mutante Variante des Huntingtin mit 43 Glutaminen konnte gezeigt werden, dass sie selektiv über die BAG3 vermittelte Autophagie degradiert wird, wobei von entscheidender Bedeutung die Interaktion von BAG3 und Dynein zu sein scheint (*Carra et al.*, 2008a, *Carra et al.*, 2008b, *Carra et al.*, 2005, *Fuchs et al.*, 2009). Auch für die Alzheimersche Krankheit (AD), die durch das Entstehen und Vorhandensein von β -Amyloid enthaltenden Plaques und neurofibrillären *tau tangles* (NFT) charakterisiert ist (*Morawe et al.*, 2012), konnte gezeigt werden das BAG3 in der Regulation der Tau-Spiegel eine entscheidende Funktion übernimmt. *Lei et al.* konnten zeigen, dass zum einem induzierte BAG3-Spiegel unter Stressbedingungen die Degradation von Tau fördern, und zum anderen, dass ein entsprechender Knockdown von BAG3 die Verminderung der Tau-Spiegel verhindert. Eine Überexpression von BAG3 hat entsprechend eine starke Verringerung endogener Tau und Phospho-Tau-Spiegel zur Folge (*Lei et al.*, 2015). Neben HD und AD konnte auch für die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) eine Funktion der BAG3 vermittelten selektiven Autophagie gefunden werden. Bei ALS handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung der Motoneurone, vor allem des Rückenmarks, die durch die pathologische Akkumulation mutanter Formen von SOD1 oder TDP-43 gekennzeichnet ist (*Johnston et al.*, 2000, *Robberecht and Philips*, 2013). *Gamerding et al.* und *Crippa et al.* konnten für mutante Formen von SOD1, respektive SOD1^{G85R} bzw. SOD1^{G93A}, den BAG3 vermittelten Abbau bzw. eine BAG3 vermittelte Aggregation zeigen. So konnten sie zeigen, dass zum einen in SOD1^{G85R} transgene Mäuse SOD1^{G85R} mit autophagosomalen Markern und BAG3 in Aggregaten/ Aggresomen co-lokalisiert und dass die BAG3 Expression in spinalen Motoneuronen dieser Mäuse erhöht ist (*Gamerding et al.*, 2011b). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Expression des HSP70-HSPB8-BAG3 Komplexes in spinalen Motoneuronen transgener, SOD1^{G93A} tragender Mäuse erhöht und die Degradation von

SOD1^{G93A} durch das autophagisch-lysosomale System induziert ist (Crippa et al., 2013, Crippa et al., 2010a, Crippa et al., 2010b).

Allerdings ist der Vorgang der BAG3 vermittelten selektiven Autophagie nicht nur wichtig in pathologischen Vorgängen, sondern er übernimmt auch eine wichtige Funktion in der Erhaltung der Proteostase alternder Zellen. Unter physiologischen Bedingungen werden die meisten kurzlebigen und disaggregationsfähigen Proteine über einen HSP70-CHIP-BAG1-Komplex vermittelten proteasomalen Abbau degradiert (Alberti et al., 2003, Demand et al., 2001). *Gamerding et al.* konnten 2009 zeigen, dass die Expression von BAG3, LC3, p62 und weiterer autophagosomaler Marker, sowie der autophagische Flux in alternden Fibroblasten im Vergleich zu ihrer jüngeren Variante und in gealterten Neuronen von Nagetieren erhöht ist (Gamerding et al., 2009). BAG3 scheint also unter proteinaggregationsfördernden Bedingungen einen Umstieg von BAG1 vermitteltem, proteasomalem Abbau hin zum BAG3 vermittelten autophagosomalen/lysosomalen Abbau zu induzieren (Carra et al., 2008a, Gamerding et al., 2011a, Gamerding et al., 2009, Minoia et al., 2014).

1.3.5 BAG3 in Myopathien und Regulation und Wartung von Cytoskelettelementen

Wie weiter oben bereits erwähnt besitzt BAG3 eine wichtige Funktion in der Differenzierung von Kardiomyoblasten (De Marco et al., 2011) und in der Aufrechterhalten der strukturellen Integrität von Z-Disks in der skelettalen Muskulatur (Arndt et al., 2010, Hishiya et al., 2010). Die Wartung der Z-Disks und die Instandhaltung der muskulären Kontraktilität erfolgt über derzeit zwei bekannte Mechanismen. In einem von *Hishiya et al.* beschriebenen Mechanismus reguliert BAG3 die strukturelle Stabilität von filamentösem Aktin durch die Vermittlung der Interaktion zwischen HSP70 und CapZ β 1 und sorgt ebenfalls für die korrekte Lokalisation von CapZ β 1. Dysfunktionales BAG3 induziert die Degradation von CapZ β 1 durch das Proteasom und verursacht so die strukturelle Instabilität myofibrillärer Strukturen unter mechanischem Stress (Hishiya et al., 2010). Des Weiteren übernimmt BAG3 im Zusammenhang mit einem Prozess, der in *Drosophila* als Chaperone assistierte selektive Autophagie (CASA) beschrieben wird, die Qualitätskontrolle von Filamin, welches für die Vernetzung von Aktinfilamenten sarkomerer Z-Disks zuständig ist (Arndt et al., 2010, Nakamura et al., 2011). Um die Kontakte zwischen den Aktinfilamenten unter mechanischem Stress zu gewährleisten, besitzt Filamin eine mechanosensitive Region die es ihm ermöglicht sich unter Krafteinwirkung zu entfalten (Ehrlicher et al., 2011, Nakamura et al., 2014, Rognoni et al., 2012). BAG3 ist in der Lage an diese mechanosensitive Region zu binden, damit den konformeller Status von Filamin zu überwachen und im Falle einer Beschädigung oder irreversiblen Entfaltung Filamin

über den CASA-Komplex aus den Z-Disks zu extrahieren und zu degradieren (vgl. Abbildung 12) (Ulbricht et al., 2013). Bestätigt wird die durch mechanischen Stress induzierte Funktion von CASA durch die transkriptionelle Induktion der Filamin-, BAG3- und HSPB Expression unter Kraftereinwirkung, wobei die Induktion der BAG3-Expression auf eine durch das Entfalten von Cytoskelettproteinen bedingte Aktivierung von HSF1 zurückzuführen ist (Ulbricht et al., 2013, Ulbricht et al., 2015).

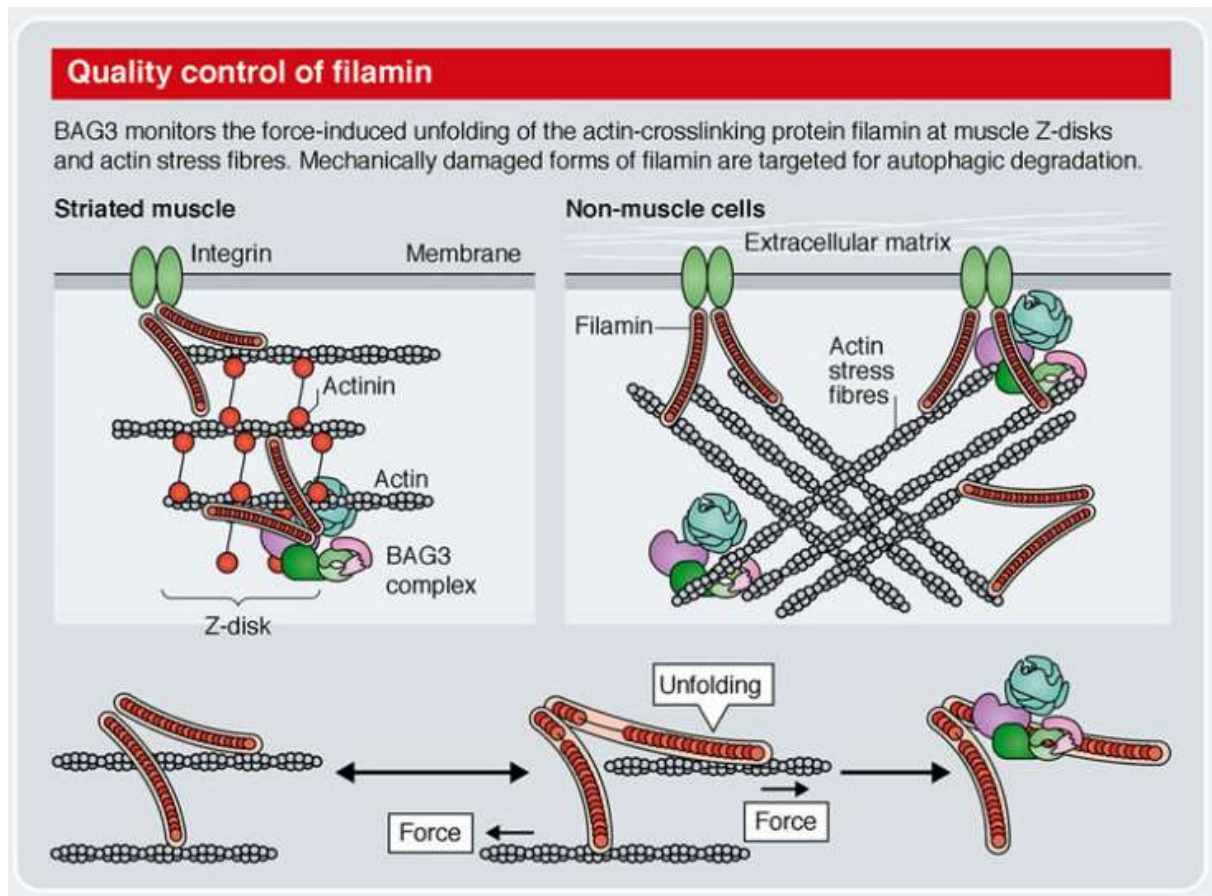


Abbildung 12: CASA-vermittelte Qualitätskontrolle von Filamin. BAG3 überwacht die kraftinduzierte Entfaltung des Aktin-vernetzenden Proteins Filamin an muskulären Z-Disks und Aktin-Stressfasern. Mechanisch beschädigte Filaminformen werden über das autophagisch-lysosomale System degradiert. Übernommen von Klimek et al. 2017

Zusätzlich ist BAG3 in der Lage durch die Interaktion mit dem Z-Disk Protein Synaptopodin-2 (SYNPO2) die Formation von Autophagosomen zu stimulieren, was SYNPO2 zu einem wichtigen Faktor der cytoskelettalen CASA Maschinerie macht (Ulbricht et al., 2013). Neben der Förderung der Entstehung von Autophagosomen durch die SYNPO2-Interaktion ist es BAG3 möglich lokal Autophagie und Translation zu induzieren. Hierzu bindet es nach der Interaktion mit beschädigtem Filamin über seine WW-Domäne den mTORC1 Inhibitor TSC1. Damit sorgt BAG3 für die Lokalisation des Inhibitors in der Nähe der beschädigten Filamente und hierdurch für eine lokal begrenzte Aktivierung der Autophagie durch die TSC1 vermittelte Inhibition von mTORC1. Die Folge hiervon ist die örtliche Konzentration von TSC1 und damit

die Aufhebung der Inhibition von mTORC1 durch TSC1 im restlichen Cytoplasma, was folglich zu einer Inhibition der Autophagie und einer Induktion der Translation führt (Kathage et al., 2017). Des Weiteren kann die Transkription von Filamin durch die beiden transkriptionalen Co-Faktoren YAP und TAZ, nach der Bindung ihrer Inhibitoren LATS1/2 und AMOTL1/2 über BAG3 induziert werden (Dupont et al., 2011, Ulbricht et al., 2013).

Die über CASA, BAG3-abhängig vermittelte Filaminqualitätskontrolle ist allerdings nicht auf Z-Disks gestreifter Muskulatur begrenzt. In glatter Muskulatur ist Filamin assoziiert mit Stressfasern, die sich in Zellen während der Adhäsion aber auch Migration bilden (Nakamura et al., 2011). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass während mechanischem Stress die BAG3 Expression induziert und entsprechend die autophagische Degradation von Filamin erhöht ist (Ulbricht et al., 2013), was BAG3 zu einem essentiellen Faktor für die Motilität und Adhäsionsfähigkeit verschiedener Krebszellen macht (Antonietti et al., 2017, Iwasaki et al., 2007, Iwasaki et al., 2010). Zusätzlich übernimmt BAG3 eine essentielle Funktion während der Zellteilung ein, indem es die korrekte Orientierung des Spindelapparates und den Abbau des kontraktilen Aktinrings während der Cytokinese beeinflusst (Fuchs et al., 2015, Varlet et al., 2017).

Die Wichtigkeit dieser Mechanismen wird vor allem dann deutlich, wenn es zu Mutationen in einzelnen Elementen und damit zum Ausfall oder zu fehlerhafter Funktion dieses Systems kommt. BAG3-Defizienzen in Tiermodellen zeigen den rapiden kraftbedingten Verfall von Z-Disks nach Muskelanstrengung und auch in Menschen sind Mutationen von BAG3 mit verfallenden Z-Disks und der Degeneration sowie Disorganisation von Myofibrillen verbunden (Arimura et al., 2011, Arndt et al., 2010, Behin et al., 2015, Homma et al., 2006, Kley et al., 2016, Selcen et al., 2009). Eine heterozygote Missensemutation von Prolin zu Leucin am Codon 209 im zweiten der beiden IPV-Motive von BAG3 führt zu einer schweren Form von myofibrillärer Myopathie (MFM), die sich vor allem durch eine fulminante Muskeldystrophie mit schnell voranschreitender Muskelschwäche in früher Kindheit auszeichnet und im zweiten Lebensjahrzehnt von Atmungsschwäche und Kardiomyopathien begleitet wird, die meist tödlich enden (Jaffer et al., 2012, Konersman et al., 2015, Kostera-Pruszczyk et al., 2015, Lee et al., 2012, Odgerel et al., 2010). Weitere Mutationen von BAG3 die mit einer oftmals familiären Form der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) verbunden sind, sind beispielhaft die Mutationen Arg218Trp, Leu462Pro, Glu455Lys, oder Arg309X. Zusätzlich kann es bei DCM zur Deletion einer bis mehrerer, ganzer Exons kommen. Charakterisiert ist diese Krankheit dabei durch das Auftreten von schwerem Herzversagen und plötzlichem Herztod (Arimura et al., 2011, Franaszczyk et al., 2014, Norton et al., 2011, Villard et al., 2011).

Eine weitere Proteinfamilie, die ebenfalls eine wichtige Funktion im Zusammenhang mit der Muskulatur und dem intrazellulären Aktinnetzwerk, aber auch der Autophagie übernimmt, ist die der Myosine, wobei in autophagischen Prozessen vor allem die nicht muskulären Myosine wichtige Aufgaben übernehmen (Kruppa et al., 2016, Berg et al., 2001).

1.4 Nicht muskuläre Myosine und NMII/MYH14

Myosine bilden mit über 30 distinkten Myosinklassen eine Superfamilie von ATP abhängigen, Aktin bindenden, molekularen Motormolekülen, wobei das menschliche Genom 38 Gene aus 12 dieser Klassen besitzt (Berg et al., 2001, Dulyaninova and Bresnick, 2013, Shutova and Svitkina, 2018). Über die Bindung an Aktin ist es diesen Molekülen möglich, über die Generation mechanischer Kräfte wichtige zelluläre Prozesse wie Zellmigration, -Division, Muskelkontraktion usw. zu beeinflussen (Even-Ram et al., 2007, Gupton and Waterman-Storer, 2006, Huxley, 1969, Mabuchi and Okuno, 1977, Sandquist et al., 2006, Spudich, 2014, Straight et al., 2003). Begründet wurde die Superfamilie der Myosine durch die Entdeckung der Klasse II oder konventionellen Myosine 1939 durch *Engelhardt et al.* (Engelhardt and Lyubimova, 1939). Sie bildet mit Vertretern in skelettaler, kardialer und glatter Muskulatur, aber auch drei nicht muskulären Myosinen die primär kraftausübende Familie von Proteine in Säugerzellen (Clark et al., 2007, Conti and Adelstein, 2008, Cremo and Hartshorne, 2007, Krendel and Mooseker, 2005, Reggiani and Bottinelli, 2007). Die Vertreter der nicht-muskulären Myosine (NMII) sind entgegen ihres Namens ubiquitär Exprimiert und übernehmen nicht nur als Hauptgenerator mechanischer Kräfte in nicht muskulären Zellen wichtige Funktionen in Migration, Adhäsion, Cytokinese, intrazellulärem Transport, Zellorganellmorphogenese, und Organisation bzw. Remodelierung des Aktincytoskeletts, sondern sie übernehmen auch distinkte Aufgaben in der Entwicklung und Differenzierung skelettaler Muskulatur, sowie der Aufrechterhaltung von Spannung in glatter Muskulatur (Yuen et al., 2009, Swailes et al., 2006, Shutova and Svitkina, 2018, Morano et al., 2000, Fenix et al., 2018). Unterschieden werden die nicht muskulären Myosine in drei Isoformen: NMII-A, -B und -C, die alle eine hohe Sequenzidentität zueinander besitzen, sowohl distinkte als auch überlappende Funktionen in vivo übernehmen, allerdings spezifische Gewebe- und Zellexpressionsmuster, sowie spezifische subzelluläre Lokalisationen zeigen (Golomb et al., 2004, Heissler and Manstein, 2011, Heissler and Manstein, 2013, Kawamoto and Adelstein, 1991, Kovacs et al., 2003, Sandquist and Means, 2008, Vicente-Manzanares et al., 2008, Vicente-Manzanares et al., 2009, Wang et al., 2011, Wang et al., 2003).

1.4.1 Aufbau, Lokalisation und Regulation von nicht muskulären Myosinen

Wie auch andere Myosine der Klasse II bestehen die drei Isoformen der nicht muskulären Myosine aus einem Hexamer von drei Paaren von Peptiden, die sich zu einem Homodimer zusammenschließen (vgl. Abbildung 13a). Eine Bildung von Heterodimeren während der Formation des Holoenzymen konnte bislang nicht beobachtet werden (Golomb et al., 2004, Kelley et al., 1996). Jedes Monomer besteht dabei aus je einer 230 kDa großen, schweren Kette und einer 20 kDa großen, regulatorischen, leichten Kette (RLC), sowie einer 17 kDa großen, essentiellen, leichten Kette (ELC), wobei die leichten Ketten die Struktur der schweren Kette stabilisieren (Sellers, 2000, Vicente-Manzanares et al., 2009). Eine wichtige Rolle bei der Funktion der NMIIs kommt den schweren Ketten der Homodimere zu. Sie bestehen aus je einer ca. 800 Aminosäuren langen, globulären, N-terminalen Motordomäne mit Mg^{2+} ATPase-Aktivität, die gefolgt von einer ca. 50 Aminosäuren langen *neck domain* dazu in der Lage ist, über den Verbrauch von ATP und die Nutzung der *neck domain* als Hebel im dimerisierten Zustand mechanische Kraft auf gebundene Aktinfilamente auszuüben. Zusätzlich bindet sowohl eine ELC und eine RLC über ein IQ Motiv der *neck domain* an je eine schwere Kette. Anschließend auf die *neck domain* folgt eine ca. 1100 Aminosäuren lange α -helikale Stabdomäne, die über die Ausbildung einer *coiled-coil* Formation verantwortlich für die Dimerisierung beider Homodimere ist und in einem kurzen, nicht helikalen, ca. 34-47 Aminosäure langem C-terminalem Segment endet (Dulyaninova and Bresnick, 2013, Shutova and Svitkina, 2018, Vicente-Manzanares et al., 2009).

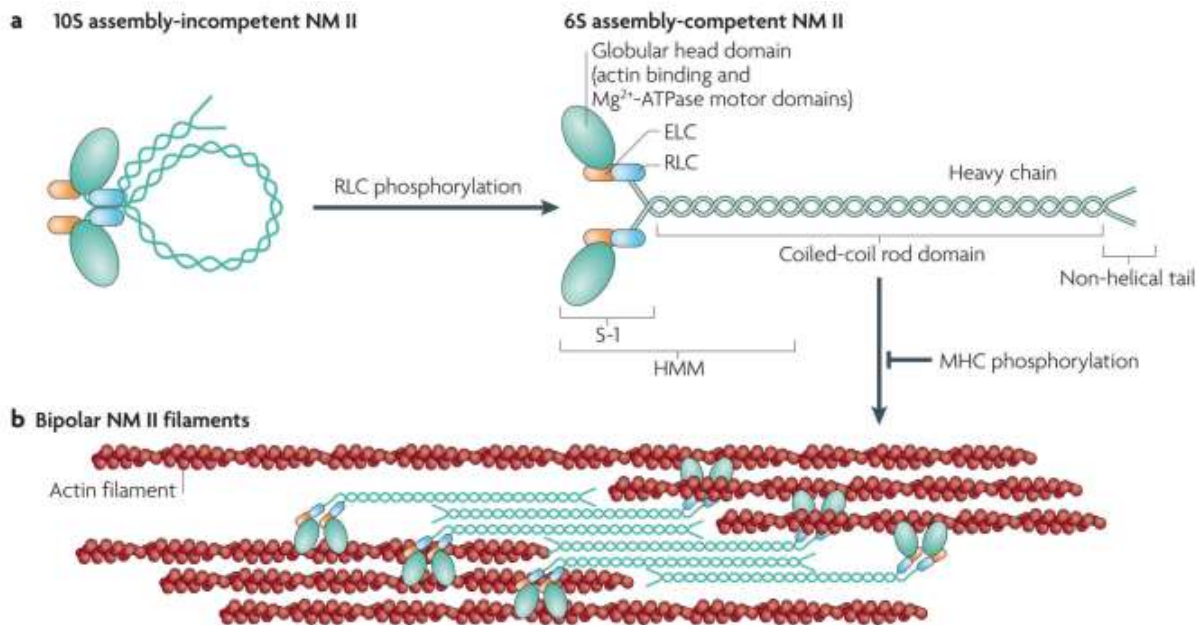


Abbildung 13: Aufbau und Struktur der NMII. A) Schematisierter Aufbau eines NMII Homodimers mit Mg^{2+} -ATPase-Domäne, *coiled-coil* Stabdomeäne und nicht helikalem Endstück der NMHC, sowie ELC und RLC. S-1 stellt ein ATPase haltiges Fragment dar, das nicht mehr zur Dimerisierung in der Lage ist, während *heavy meromyosin* (HMM) noch zur Beeinflussung der Dimerisierung Fähig ist. Ebenfalls dargestellt ist die RLC abhängige Aktivierung der NMII und der entsprechende Übergang von der 10S autoinhibierten Form zur 6S dimerisierungsfähigen, aktiven Form. B) Vereinfachte Darstellung der Interaktion von bipolaren NMII Filamenten mit Aktinfilamenten. Übernommen von *Vicente-Manzanares et al. 2009*

Über die schweren Ketten (NMHC) sind diese Homodimere in der Lage minifilamentöse Strukturen von bis zu 30 Molekülen zu bilden, indem sich zunächst zwei NMHCs über elektrostatische Interaktionen zwischen den beiden *assembly competent domains* (ACD1/2) am Ende der Stabdomeäne zu antiparallelen Dimeren zusammenlagern (vgl. Abbildung 13b) (Atkinson and Stewart, 1992, Dulyaninova and Bresnick, 2013, McLachlan and Karn, 1982, Nakasawa et al., 2005). Hierzu ist es allerdings nötig die Autoinhibition der NMII's zu beenden in der sie in unphosphorylierter Form und in der Anwesenheit von ATP vorliegen. In ihrer autoinhibitorischen Form (gefaltet, 10S) nehmen sie eine kompakte Konformation ein, die durch eine asymmetrische Interaktion der globulären ATPase-Domänen gekennzeichnet ist und damit die Funktionen dieser Domänen inhibiert. Zusätzlich kann die Stabdomeäne durch die Faltung in drei Segmente mit den Kopfdomänen interagieren, was zur Stabilisierung der kompakten Konformation und zur weiteren Inhibition führt (Kendrick-Jones et al., 1987, Liu et al., 2003, Trybus et al., 1982, Wendt et al., 2001). Durch die Phosphorylierung der RLC wird diese Autoinhibition beendet, was zur Einnahme einer entfalteten 6S Konformation führt und die Dimerisierung bzw. Nukleation der NMII-Moleküle ermöglicht (vgl. Abbildung 13a) (Craig et al., 1983, Trybus and Lowey, 1984). Nach erfolgter Nukleation können weitere Homodimere über alternierende elektrostatische Ladungen an das anfängliche Dimer hinzugefügt werden

(vgl. Abbildung 13b) (Rosenberg et al., 2008). Von Interesse hierbei ist, dass auch NMII Homodimere in ihrer autoinhibierten Form in der Lage sind antiparallele Dimere *in vitro* zu bilden und dass eine Addition zu entfalteten, bereits dimerisierten, NMII Molekülen die Entfaltung von autoinhibierten Formen fördert (Billington et al., 2013, Liu et al., 2017). Ein weiterer, kritischer Faktor für die Polymerisierung bzw. Filamentformation. Ist wie in verschiedenen Deletionsexperimenten und Studien in denen die Endstücke ausgetauscht wurden gezeigt werden konnte, das ca. 34-47 Aminosäuren lange, nichthelikale Endstück (*tail piece*) der NMHC. So konnte zum Beispiel gezeigt werden das die Deletion der Endstücke die Filamentformation von NMII-A und -B fördert und für NMII-C inhibiert (Breckenridge et al., 2009, Hosono et al., 2012, Ronen and Ravid, 2009). Neben dieser Funktion sind die Endstücke auch an der subzellulären Lokalisation der verschiedenen NMII-Isoformen beteiligt (Sandquist and Means, 2008, Vicente-Manzanares et al., 2008). Von Interesse ist, dass die gebildeten NMII-Polymere nicht zwingend aus denselben Isoformen bestehen müssen. *Shutova et al.* und *Beach et al.* konnten über *platinum replica elektron microscopy (PREM)* und *structured-illumination microscopy (SIM)* die Bildung heterotyper Filamente in Stressfaser, individuellen Filamenten im Cytoplasma und im kontraktilen Ring sich teilender Zellen zeigen (Beach et al., 2014, Shutova et al., 2014).

Die schweren Ketten der nicht muskulären Enzyme (NMHC) bestimmen auch die entsprechende Isoform des Moleküls. In Säugern kodieren drei Gene, MYH9, MYH10 und MYH10 für die drei entsprechenden Isoformen NMII-A, NMIIB und NMII-C. Die Deletion einer entsprechenden NMHC führt zum Verlust der jeweiligen Isoform und das kurze nicht helikale Endstück der NMHC reicht zur Generierung isoformspezifischer Antikörper aus (Golomb et al., 2004). Die Diversität der NMII wird weiter durch das Vorhandensein verschiedener Spleißvarianten von NMII-B und NMII-C erhöht, die durch das Einfügen von bis zu zwei verschiedenen Exons zustande kommen (vgl. Abbildung 14) (Golomb et al., 2004, Itoh and Adelstein, 1995, Jana et al., 2009, Kawamoto, 1996, Nakahata and Kawamoto, 2005, Takahashi et al., 1999). NMII-B0/C0 stellen die ungespleißten Formen dar, während NMII-B1/C1 eine Insertion von 10 (B1, AS 212) bzw. 8 (C1, AS 227) Aminosäuren in der ersten Schleife in der Nähe der ATP bindenden Region aufweisen (Golomb et al., 2004, Itoh and Adelstein, 1995). Diese Insertionen führen im Vergleich zu den nicht insertierten B0 und C0 NMIIIs in beiden Varianten zur Erhöhung der Aktin aktivierten MgATPase-Aktivität der Motordomänen, allerdings nicht zum Verlust der durch die RLC-Phosphorylierung vermittelten Aktivierung (Heissler and Manstein, 2011, Kim et al., 2005, Pato et al., 1996).

Die Spleißvarianten NMII-B2 und NMII-C2 tragen eine Insertion von 21 (B2, AS 622) und 33 (C2) Aminosäuren im Menschen bzw. 41 Aminosäuren im murinen System (C2, AS 636). Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Spleißvarianten ist die ATPase-Aktivität von B2/C2 nicht Abhängig vom Phosphorylierungsstatus der RLC und beide zeigen auch im nicht phosphorylierten Zustand eine Aktin aktivierte MgATPase-Aktivität (Golomb et al., 2004, Jana et al., 2009, Kim et al., 2008). Eine entsprechende Kombination beider Exoninsertionen ist ebenfalls möglich und führt zu den Varianten NMII-B1B2 und NMII-C1C2. Für NMII-A konnten bisher nur Spleißvarianten auf mRNA Ebene beobachtet werden (Li et al., 2008). Auch für die essentiellen und regulatorischen, leichten Ketten konnten alternative Spleißvarianten gefunden werden. Es ist allerdings keine Isoformspezifität für NMHCs bekannt und Untersuchungen zeigen, dass ELCs neben Nichtmyosinproteinen auch schwere Ketten verschiedener Myosine (-2, -5, -6 und 7) binden und RLCs mit schweren Ketten der Myosine der Klasse 2 und 18 interagieren (Conti et al., 2007, Heissler and Manstein, 2013, Tan et al., 2008).

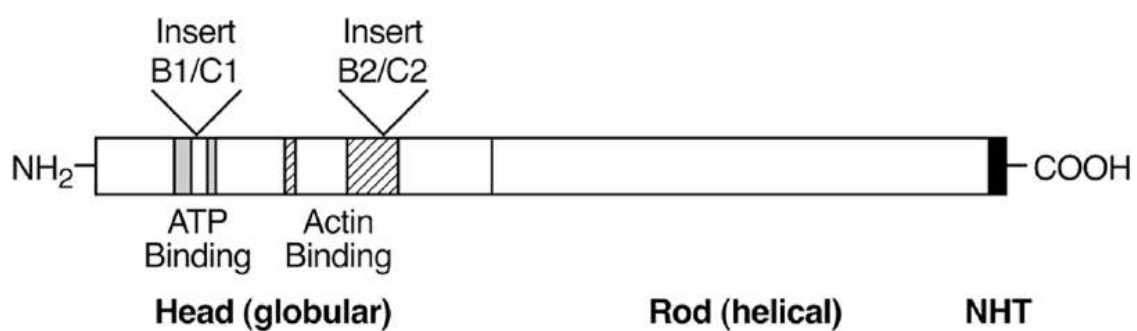


Abbildung 14: Insertionen zweier verschiedener Exons führen zu Entstehung neuer NMII-B und NMII-C Spleißvarianten. Schematische Darstellung der Insertionsstellen der beiden Exone die zur Entstehung der Spleißvarianten NMII-B1/C1, NMII-B2/C2 und NMII-B1B2/C1C2 führen. Übernommen von Ma und Adelstein 2014

Wie die Unterschiede in den Spleißvarianten vermuten lassen existieren auch zwischen den unterschiedlichen Isoformen trotz hoher Ähnlichkeiten der nicht muskulären Myosine (Dulyaninova and Bresnick, 2013) distinkte Unterschiede. Einer dieser Unterschiede betrifft die kinetischen Eigenschaften der Motordomänen vor allem in Bezug auf ATPase-Rate und Arbeitszyklus (die Zeit in der die Motordomäne der Myosine an Aktin gebunden ist, um mechanische Kraft auszuüben).

NMII-A zeigt die höchste ATPase-Rate und kann damit Aktinfilamente schneller als die beiden anderen Isoformen bewegen, während NMII-B einen sehr viel längeren Arbeitszyklus als NMII-A und eine sehr hohe Affinität für ADP zeigt, die sich unter entgegengesetztem Zug durch die Aktinfilamente noch verstärkt (Kim et al., 2005, Kovacs et al., 2007, Kovacs et al., 2003, Wang et al., 2003). Zusätzlich ergeben sich durch die verschiedenen NMHCs wie bereits erwähnt

Unterschiede in zellulärer/subzellulärer und gewebespezifischer Lokalisation sowie in Funktion der einzelnen Isoformen.

Die Aktivität der Mg^{2+} ATPase-Motordomänen als auch die Fähigkeit der Ausbildung filamentöser Strukturen durch die NMHC vermittelte Polymerisation der verschiedenen NMIIs wird hauptsächlich durch Phosphorylierungen, aber auch durch die Interaktion mit regulatorischen Proteinen beeinflusst (vgl. Abbildung 15).

Phosphorylierungen der RLC an Serin 19 (S19) und Threonin 18 (T18) durch die Kinasen ROCK, MLCK, MRCK, ZIPK (auch als DAPK3 bekannt), PAK und Citronkinase aktivieren und verstärken die Funktion der NMIIs (Cremo and Hartshorne, 2007, Heissler and Sellers, 2016, Matsumura, 2005, Somlyo and Somlyo, 2003, Tan et al., 2008). Die initiale Phosphorylierung an S19 ermöglicht sowohl den Übergang von der inaktiven in die aktive Form und damit die Filamentbildung, als auch die Erhöhung der MgATPase-Aktivität der Motordomänen, während die zusätzliche Phosphorylierung an T18 in Gegenwart von S19 die MgATPase-Aktivität weiter erhöht, wobei v_{max} und Rate der Aktinfilamentbewegung *in vitro* unverändert bleiben (Breckenridge et al., 2009, Craig et al., 1983, Ikebe et al., 1986, Kiboku et al., 2013, Trybus and Lowey, 1984, Umemoto et al., 1989). Die beiden Kinasen MLCK und ROCK sind hier von besonderem Interesse. Die Ca^{2+} /Calmodulin aktivierte MLCK ist die einzige der erwähnten Kinasen die spezifisch die RLC phosphoryliert (Heissler and Manstein, 2013, Vicente-Manzanares et al., 2009). ROCK als Rho aktivierte Kinase aktiviert zum einen NMII über die Phosphorylierung der RLC inhibiert aber auch gleichzeitig die Untereinheit MYPT1 der Proteinphosphatase 1 (PP1), die Hauptphosphatase der Myosine, und sorgt damit für eine Steigerung der Phosphorylierung und der NMII-Aktivität (Matsumura and Hartshorne, 2008).

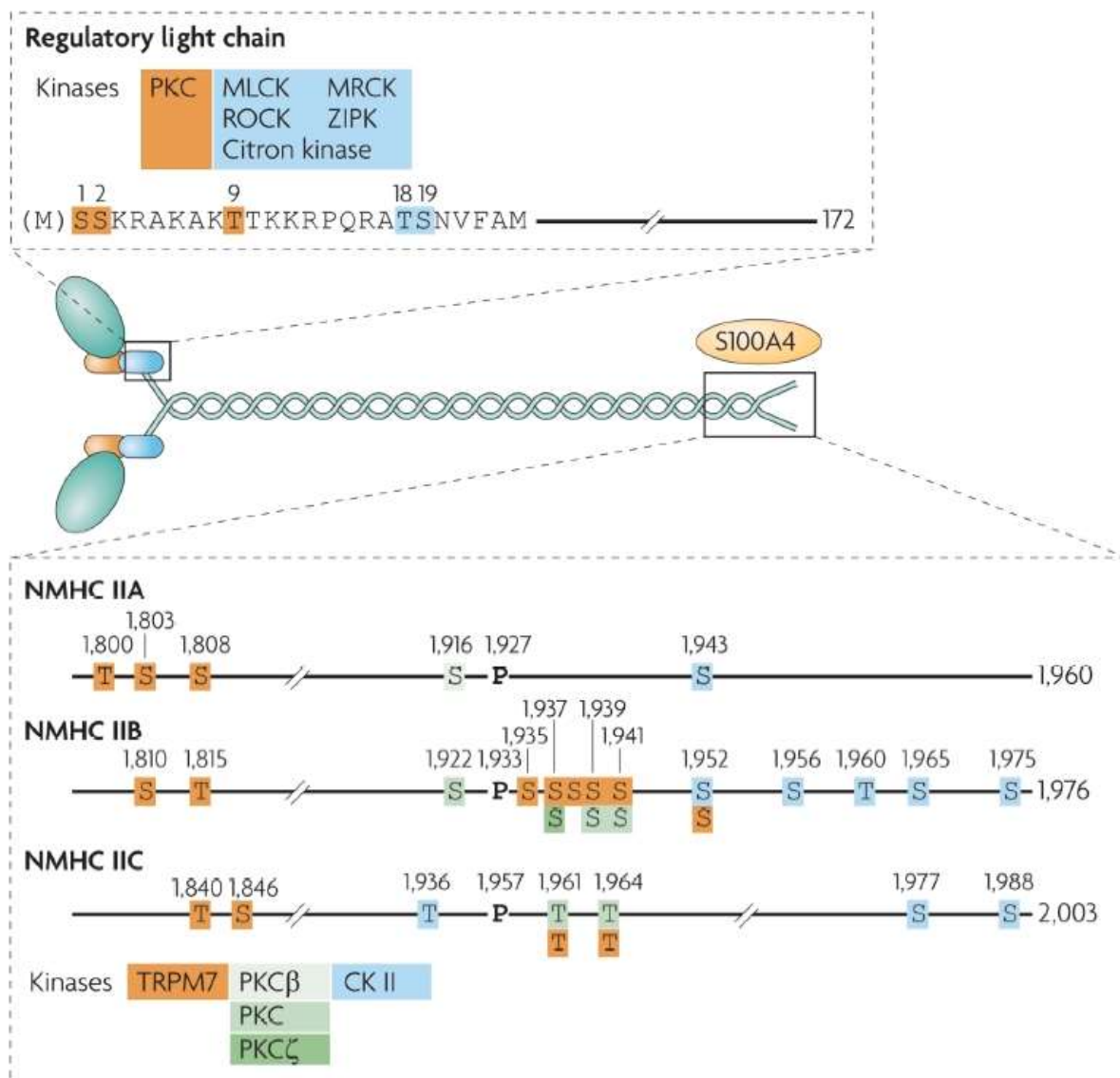


Abbildung 15: Regulation der NMII-Aktivierung und –Filamentformation. Schematische Darstellung der Phosphorylierungsstellen aller drei NMII Isoformen in RLC und NMHC zur Regulation der Aktivität und der Filamentformation. Phosphorylierungen der RLC steigern die Aktivität der Motordomänen und versetzen NMII von der inaktiven in die aktive Form. Nur Phosphorylierungen durch PKC wirken hier inhibitorisch. Phosphorylierungen der NMHC wirken sich allgemein negativ auf die Filamentformation aus. Übernommen von *Vicente-Manzanares et al.* 2009

Zusätzlich könne diese beiden Kinasen durch ihre unterschiedliche, subzelluläre Lokalisation in manchen Zellen - MLCK ist eher peripher, und ROCK eher zentral lokalisiert – für eine örtlich differenzierte NMII-Aktivierung sorgen (Heissler and Manstein, 2013, Totsukawa et al., 2004, Totsukawa et al., 2000). Phosphorylierungen der Serine 1 und 2 sowie von Threonin 9 durch die Proteinkinase C (PKC) wirken inhibierend auf die NMII-Aktivität, da sie die Affinität zwischen MLCK und RLC senkt, wobei Dreifachphosphorylierungen nicht speziell als wichtiger Regulationsmechanismus gewertet werden (Beach et al., 2011, Ikebe and Reardon, 1990, Komatsu and Ikebe, 2007, Nishikawa et al., 1984).

Nicht nur die RLC unterliegen einer Regulation durch Phosphorylierungen. Auch die NMHC wird in Endbereichen der *coiled-coil* Domäne und im nicht helikalen Endstück durch Kinasen wie TRPM6, TRPM7, PKC und CK2 phosphoryliert, wobei Phosphorylierungen der NMHC mit einer Dissoziation der Filamente bzw. der Inhibition der Filamentformation und damit mit einer Förderung der monomeren NMII-Form verbunden sind (Clark et al., 2006, Clark et al., 2008a, Clark et al., 2008b, Dulyaninova et al., 2007, Dulyaninova et al., 2005, Ludowyke et al., 2006, Murakami et al., 1998, Ronen and Ravid, 2009, Straussman et al., 2001, van Leeuwen et al., 1999). TRPM6 und -7 Phosphorylierungen von NMII-A beschränken sich auf die *coiled-coil* Domäne, wobei spezifische Phosphorylierungen von Threonin 1800, Serin 1803 und 1808 mit einer verringerten Filamentformation *in vitro* assoziiert sind (Clark et al., 2008a, Clark et al., 2008b). In NMII-B und -C scheinen sich Phosphorylierungen durch TRPM6 und -7 auf Bereiche in den nicht helikalen Endstücken zu beschränken ((Clark et al., 2008a). Die Phosphorylierung von NMII-A an Serin 1916 durch PKC, sowie mehrerer Serine in der *coiled-coil* Domäne und im nicht helikalen Endstück von NMII-B und zweier Threonin im nicht helikalen Endstück von NMII-C sind mit der Inhibition der Filamentformation *in vitro* verbunden (Betapudi et al., 2011, Conti et al., 1991, Murakami et al., 1998, Murakami et al., 2000, Ronen and Ravid, 2009). CKII phosphoryliert NMII-A an Serin 1943, NMII-B an 4 Serinen im nicht helikalen Endstück und NMII-C an einem Threonin am Ende der *coiled-coil*, sowie an zwei Serinen im nicht Helikalen Endstück (Dulyaninova et al., 2007, Ivkovic et al., 2012, Murakami et al., 1998, Olsen et al., 2006, Ronen and Ravid, 2009). Allerdings sind nicht nur Phosphorylierungen an der Regulation der NMII-Filamentformation beteiligt. *Lethal giant larvae, myosin binding protein H, 14-3-3, S100A4* und *S100P* sind Myosin II bindende, regulatorische Proteine, deren Interaktion mit einer Favorisierung der monomeren Form einhergeht (Ford et al., 1997, Hosono et al., 2012, Kriajevska et al., 1994, Shutova et al., 2012, Vasioukhin, 2006, West-Foyle et al., 2018, Zhou et al., 2010). Von gesondertem Interesse ist an dieser Stelle *S100A4* oder auch *Metastasin (mts1)*. Die Bindung von *mts1* an NMHCII-A depolymerisiert NMII-A Filamente. Diese Bindung kann jedoch durch die Phosphorylierung von Serin 1943 über PKC, die ebenfalls inhibitorisch auf die Filamentformation wirkt, unterbunden werden (Badyal et al., 2011, Elliott et al., 2012, Kiss et al., 2012, Li et al., 2003, Mitsuhashi et al., 2011).

1. 4.2 NMII unter physiologischen Bedingungen

Die Hauptfunktion der NMII ist die Ausübung kontraktiler, nicht sarkomerer Kräfte. Der Prozess der Zellmigration, sowie die Funktion der NMIIs in der Regulation der Vorläuferfront migrierender Zellen und der Zell-Substratadhäsion, der Zellkörpertranslokation und der Zellpolarität, gehören neben ihrer Funktion in Cytokinese, Zell-Zell-Adhäsion, Bestimmung der Zellmorphologie und vesikulärem Transport, sowie Endo- und Exocytose zu den am besten untersuchten Vorgängen (Conti and Adelstein, 2008, Heissler and Manstein, 2013, Kruppa et al., 2016, Shutova and Svitkina, 2018, Vicente-Manzanares et al., 2009). Entsprechend sind die nicht muskulären Myosine in Krankheiten wie Krebs, Entwicklungsstörungen usw. von wichtiger Bedeutung (Newell-Litwa et al., 2015).

Die Interaktion von NMII mit F-Aktin, dem Mikrotubulinnetzwerk und fokalen Adhäsionen während der Zellmigration ist von zentraler Bedeutung für die Festlegung der Zellpolarisation (Vorne und Hinten), die Regulation von Membranausläufern, Adhäsionsformation und -reifung, der Translokation des Zellkörpers und dem Nachzug des Zellendes (Even-Ram et al., 2007, Lauffenburger and Horwitz, 1996). Während der gerichteten Migration von Zellen bildet sich eine auf Aktin basierende Vorläuferfront, unterteilt in Lamellipodium und Lamellum, deren Vortrieb durch den über die Aktinfilamentpolymerisierung ausgeübten Druck auf die Zellmembran bedingt ist. Die Aktinpolymerisation und damit der Vorstoß der Vorläuferfront wird durch den retrograden Fluss von Aktin negativ reguliert, der zum einen durch den Widerstand der Plasmamembran im Lamellipodium bedingt ist und zum anderen durch eine NMII vermittelte Rückwärtsbewegung des Aktinnetzwerks des Lamellums verursacht wird (Anderson et al., 2008, Betapudi et al., 2006, Cai et al., 2006, Giannone et al., 2007, Heath and Holifield, 1991, Lo et al., 2004, Nemethova et al., 2008, Ponti et al., 2004, Shutova et al., 2008, Vicente-Manzanares et al., 2007). Wichtig ist hierbei, dass das Lamellum weniger dynamisch ist als das Lamellipodium, da es durch das Vorhandensein linearer Aktinbündel und reifer Adhäsionen charakterisiert ist und das NMIIs nicht physischer Teil der Aktinorganisation des Lamellipodiums sind, sondern regulatorisch über die Aktinbündel im Lamellum auf das Lamellipodium und den retrograden Aktinfluss wirken (Cai et al., 2006, Geiger et al., 2009, Humphrey et al., 2002, Ponti et al., 2004, Vicente-Manzanares et al., 2007). Depletionen von NMII oder die Inhibition von MLCK sind entsprechend mit einer inhibierten Zellmigration und einer Veränderung der lamellaren Ausbreitung verbunden (Betapudi et al., 2006, Lo et al., 2004).

Wichtig für diese Regulation, für die Fähigkeit der Migration, aber auch für andere mechanosensitive Vorgänge sind integrinbasierte Adhäsionen mit dem extrazellulären

Medium, deren Formation, Reife, Wartung und Abbau Abhängig von der NMII vermittelten Motoraktivität sind (Delorme-Walker et al., 2011, Sandquist et al., 2006, Schiffhauer et al., 2016, Vicente-Manzanares et al., 2009). Die Zellpolarität wird neben der räumlichen Kontrolle der Aktivität verschiedener LCKs und damit der NMII-Aktivität auch über den Anteil von NMII-A bzw. NMII-B in den Stressfasern reguliert. Der Anteil von NMII-A in Stressfasern verringert sich dabei mit steigendem Abstand zur Vorläuferfront (Heissler and Manstein, 2013, Kolega, 2003, Vicente-Manzanares et al., 2008). Dynamische Myosinfilamente in der Vorläuferfront bestehen zur Gänze aus NMII-A während Stressfasern am anterioren Teil der Zelle durch den Abbau von NMII-A Filamenten und das ausschließliche Vorhandensein von NMII-B-Filamenten gekennzeichnet sind (Heissler and Manstein, 2013, Shutova and Svitkina, 2018, Vicente-Manzanares et al., 2009). Eine wichtige Funktion bei der die integrinvermittelte Mechanotransduktion über NMII eine Rolle spielt ist die Reaktion von Zellen auf die extrazelluläre Steifheit des Substrats und die zelluläre Konfluenz (Patwari and Lee, 2008). Die mechanische Widerstandskraft bzw. Steifheit des Substrats fördert die Reifung fokaler Adhäsionen und damit die Steifheit der Zelle über die Entwicklung cytoskelettaler Spannung mittels NMII vermittelter Kontraktilität des Aktomyosinnetzwerks. Die aktomyosinvermittelte Kontraktilität kann dabei entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von Zellen haben. So konnte gezeigt werden, dass die mechanische Widerstandskraft von Substraten Einfluss auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) besitzt. Weichere Substrate sind hierbei neurogen und mit fortschreitender Härte fördern sie zunächst eine myogene Differenzierung, wobei rigide Substrate eine osteogene Differenzierung von MSC begünstigen. Entsprechende Beobachtungen können auch für den Einfluss der Konfluenz von Zellen bestätigt werden. Hier führt die Konfluenz von Zellen zur Differenzierung von Adipozyten während eine sehr niedrige Zelldichten zur Differenzierung von Osteoblasten führen (Beningo et al., 2006, Cristancho and Lazar, 2011, McBeath et al., 2004, Patwari and Lee, 2008). Neben der Interaktion mit integrinvermittelten Adhäsionen übernehmen NMII eine wichtige Funktion bei der Etablierung von epithelialen Adhäsionen bzw. Zell-Zellverbindungen indem sie die Lokalisation von Cadherinen, Cateninen, Occludinen, Claudinen und cytosolischen ZO-1 Proteinen kontrollieren (Conti and Adelstein, 2008, Conti et al., 2004, Ivanov et al., 2007, Shewan et al., 2005). NMII kontrollieren Entstehung und Formation von Zell-Zell-Verbindungen indem sie nach der Aktinpolymerisation-vermittelten Kontaktinitiation durch Krafteinwirkung über Aktomyosinnetzwerke für eine Annäherung der Zellmembranen sorgen. Zusätzlich sorgt eine RHOA-vermittelte Aktivierung von NMII für eine Kontaktinhibition der Zellbewegung und damit die Einstellung der Entstehung von Zellausläufern (Carmona-Fontaine et al., 2008, Yamada and Nelson, 2007). Allerdings besteht die Funktion der NMII nicht nur in der Stabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen. Eine erhöhte NMII vermittelte

Kontraktilität führt zur Auflösung endothelialer Verbindungen und ermöglicht beispielsweise die Transmission von Leukozyten (Muller, 2011, Newell-Litwa et al., 2015).

Der während dem Ende der Mitose stattfindende Vorgang der Cytokinese ist ebenfalls abhängig von der Anwesenheit der nicht muskulären Myosine. Alle Isoformen sind in der Lage die Cytokinese auszuführen, wobei die im kontraktilen Ring gefundenen Isoformen nicht direkt von der Isoform an sich abhängig sind, sondern von der relativen Häufigkeit in den jeweiligen Zellen (Bao et al., 2005, Ma and Adelstein, 2014). Während der Cytokinese sind NMII-Moleküle über die Generation mechanischer Kräfte, indem sie Aktinfilamente kreuzvernetzen, um der Expansion des kontraktilen Rings entgegenzuwirken, an der Konstriktion der Zellspaltungsfurche mitbeteiligt (Ma et al., 2012, Mabuchi and Okuno, 1977). Der Genaue Mechanismus indem die Aktinkreuzvernetzung eine solche Konstriktion als Folge hat sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollends geklärt (Ma et al., 2012, Shutova and Svitkina, 2018). Noch während der Interphase relokalisieren, zerlegte, Aktomyosin haltige Stressfasern an den Entstehungsort der Zellspaltungsfurche wo sie durch die Generation kontraktile Kräfte die Einfaltung und Konstriktion der Spaltungsfurche verursachen (Glotzer, 2001, Heissler and Manstein, 2013, Joo et al., 2007). Hierbei bilden die NMII-Moleküle ähnlich wie in Interphasezellen Polymerstapel aus bipolaren Filamenten mit sarkomerähnlichem Aufbau, deren Formation dem *Network contraction mechanism* folgt (Henson et al., 2017, Spira et al., 2017). Dieses Model impliziert dabei die Organisation einer unausgerichteten Aktinstruktur durch die Erzeugung mechanischer Spannungen über NMII in eine organisierte und geordnete Filamentstruktur (Verkhovskiy et al., 1999). Die Lokalisation der NMII- und Aktinfilamente an den kontraktilen Ring ist dabei unabhängig von der enzymatischen Aktivität der Motordomänen, da eine chemische Inhibition zwar die Cytokinese stört, aber nicht die Lokalisation an den kontraktilen Ring verhindert (Dean and Spudich, 2006, Miyauchi et al., 2006, Straight et al., 2003). Allerdings benötigt diese dynamische Struktur die Aktivierung der NMII durch RLCKs, da diese Regulation zum einen den Übergang von der inaktiven zur aktiven NMII-Konformation und damit die Filamentformation ermöglicht und zum anderen die für die Retention und den Umsatz von Aktin essentielle enzymatische Aktivität der Motordomänen beeinflusst (Conti et al., 2007, Guha et al., 2005, Miyauchi et al., 2006, Murthy and Wadsworth, 2005, Scholey et al., 1980). Entsprechend konnten Versuche mit phosphospezifischen Antikörpern eine Anreicherung von RLC-Phosphorylierungen von NMII im Bereich der Zellspaltungsfurche bzw. des kontraktilen Ringes zeigen (Matsumura et al., 1998).

Zusätzlich zu den bereits genannten Funktionen der NMII ist ihr Mitwirken in Exo- und Endocytose sowie vesikulärem Transport, von zentraler Bedeutung. Exocytotische Funktionen bei denen NMII-Isoformen von Bedeutung sind zeigen sich beispielhaft bei der β -adrenergen,

rezeptorvermittelten Exocytose sekretorische Vesikel in submandibulären Speicheldrüsen von Nagern, wo sie den Zusammenbruch von Granula nach Fusion mit der Plasmamembran regulieren (Masedunskas et al., 2011). Auch die cytotoxische Wirkung natürlicher Killerzellen ist abhängig von NMII. Hier sind sie an der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen Killerzelle und Zielzelle, sowie der effektiven Exocytose lytischer Granula beteiligt (Andzelm et al., 2007, Sanborn et al., 2009). Die Aktivierung des Insulinrezeptors führt zu einer erhöhten GLUT4 Exocytose in Adipocyten, in denen NMII die Vermittlung der Fusion zwischen GLUT4-Vesikeln und der Plasmamembran sowie eine regulatorische Funktion der GLUT4-Aktivität übernimmt (Fulcher et al., 2008). NMII-Isoformen Regulieren nicht nur die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran, sondern auch Öffnungs-Verschluss-Dynamiken und Größe der Fusionspore, was sich direkt auf die Entladekinetiken der Vesikel auswirkt, wie es für verschiedene Zelltypen gezeigt werden konnte (Aoki et al., 2010, Bhat and Thorn, 2009, Mochida et al., 1994, Neco et al., 2008, Wilson et al., 2001).

Die endocytotische Funktion der NMII besteht vor allem in der Vermittlung kontraktile Kräfte während des Aufbaus, der Abschnürung und dem Verschluss der rezeptorvermittelten, phagozytischen Invagination (Araki, 2006, Olazabal et al., 2002). Dies spielt nicht nur bei immunologischen Prozessen wie der Komplement oder Makrophagen vermittelten Phagozytose, der Internalisierung des Chemokinrezeptors CXCR4 durch T-Zellen nach Agonistaktivierung oder der Interferon-Gamma induzierten Endocytose von *tight junctions* eine Rolle, sondern auch bei der Phagozytose äußerer Segmente von Photorezeptoren (Araki, 2006, Caron and Hall, 1998, Olazabal et al., 2002, Rey et al., 2007, Strick et al., 2009, Utech et al., 2005).

Auch die Abschnürung von Golgi abgeleiteten Vesikeln und deren anterograder oder retrograder Transport zwischen verschiedenen Zellkompartimenten ist abhängig von NMII-Isoformen (DePina et al., 2007, Duran et al., 2003, Miserey-Lenkei et al., 2010, Neco et al., 2004). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass NMII-A mit Membranen des Golginetzwerks während der Vesikelabschnürung lokalisiert und dass ein spezifischer Teil der Golgi abgeleiteten Vesikel positiv für NMII-A ist (Ikonen et al., 1997, Musch et al., 1997, Stow et al., 1998). Zusätzlich führt eine Inhibition von Rab6 oder NMII zur Beeinträchtigung der Trennung zwischen Rab6-Substraten und Golgi Membran sowie des anterograden als auch retrograden Transports vom Golgi (Miserey-Lenkei et al., 2010). Die Interaktion zwischen NMII und dem Golgi scheint dabei über die Anbindung von Golgimembranen an das nicht helikale Endstück zustande zu kommen, so wie es für NMII-A gezeigt werden konnte (Fath, 2005).

Die Interaktion der nicht muskulären Myosine speziell von MNII-A mit dem trans-Golgi-Netzwerk ist von großer Wichtigkeit für die Formation von Autophagosomen. NMII-A interagiert

mit dem autophagischen, Transmembranprotein Atg9 und dem Transport Atg9 positiver Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) an den Ort des Omegasoms bzw. des entstehenden Autophagosoms. Hierbei ist noch unklar, ob es Atg9 positive Vesikel direkt transportiert oder zusammen mit Rab6 die Abschnürung Atg9 positiver Vesikel am TGN fördert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Knockdown der RLCK ZIPK oder von NMII-A die Größe und Anzahl der Autophagosomen verringert (Tang et al., 2011).

1.4.3 NMII unter pathophysiologischen Bedingungen

Aufgrund ihrer diversen Funktionen in physiologischen Prozessen sind die nicht muskulären Myosine oft an der Entstehung und Progression diverser Pathologien beteiligt, die neuronale Pathologien, Entwicklungsstörungen, vaskuläre Erkrankungen und Krebs mit einbeziehen (Ma and Adelstein, 2014, Newell-Litwa et al., 2015). Hier soll eine beispielhafte Auflistung verschiedener Pathologien folgen, in denen NMIIs eine Funktion übernehmen, wobei diese Auflistung bei weitem nicht vollständig ist, da eine Aufführung aller Krankheiten, in denen NMIIs am Krankheitsverlauf beteiligt oder involviert sind, den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde.

Zu den neuronalen Pathologien, die sich vor allem über eine veränderte post-synaptische Dichte oder Morphologie äußern, gehören vor allem Entwicklungsstörungen wie Autismus, nicht-syndromische, mentale Retardation und Schizophrenie, neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer oder Störungen neuronaler Migration wie Lissencephalie (Nadif Kasri and Van Aelst, 2008, Penzes et al., 2011, Tsai et al., 2007). Aber auch bei Prozessen, die eine gestörte Extension zellulärer Fortsätze zeigen, wie die auf eine Verletzung des ZNS folgende Regeneration von Axonen, werden durch NMIIs beeinflusst (Hur et al., 2011). In Fällen nicht-syndromaler, mentaler Retardation (MR) zeigen sich Mutationen in Proteinen, die in direktem Zusammenhang mit der Regulation der Aktomyosinaktivität stehen, wie beispielsweise die RLCK PAK (Ramakers, 2002). Die Erkrankung an sich ist mit einer veränderten Gehirnstruktur, sowie unreifen, dendritischen Dornen (*Spines*) und einer verringerten, dendritischen Dornendichte (*Spine density*) im Jugendalter assoziiert (Fiala et al., 2002, Ramakers, 2002). Ähnlich wie bei MR zeigen sich Veränderungen in der dendritischen Dornendichte bei Schizophrenie und Autismus, wobei Fälle von Autismus mit einer erhöhten, dendritischen Dornendichte korrelieren (Hutsler and Zhang, 2010, Penzes et al., 2011). Entsprechend der Funktion der NMIIs in der Ausbildung und Reifung dendritischer Dornen (Hodges et al., 2011, Ryu et al., 2006, Zhang et al., 2005a) konnten Studien von *de novo* Mutationen einen Zusammenhang zwischen NMII-A bzw. NMII-B Mutationen und Autismus sowie Schizophrenie herstellen (Li et al., 2016). Erhöhte Spiegel in der Phosphorylierung von

RLCs im cingulaten Cortex von Schizophrenen, die Beobachtung, dass der durch Inaktivierung von PAK verursachte Rückgang dendritischer Dornen in einem Model hippocampaler Neurone durch eine Co-Expression phosphomimetischer RLCs verhindert werden konnte, und dass die durch einen Knockdown des MR assoziierten Proteins Oligophrenin vermittelte Reduktion der dendritischen Dornendichte in hippocampalen Neuronen von Ratten durch die Inhibition der NMII-Aktivität verhindert werden konnte sind deutliche Indizien für eine Funktion der NMIIs in komplexen, neurologischen Erkrankungen (Govek et al., 2004, Nadif Kasri et al., 2009, Rubio et al., 2012, Zhang et al., 2005a). Gestützt werden diese Indizien weiterhin durch Arbeiten von *Krey et al.* die den Rückzug von Dendriten beim Timothy-Syndrom mit einer RhoA vermittelten NMII-Aktivierung koppeln konnten (Krey et al., 2013).

Wie oben bereits beschrieben übernehmen NMIIs wichtige Funktionen in Zellmigration, Cytokinese, Zell-Zelladhäsion und Mechanotransduktion. Eine Fehlregulation der NMIIs in diesen Bereichen ist oftmals mit kanzerösen Zellen und Krebs verbunden. So können eine veränderte Lokalisation und Regulation der NMIIs während der Mitose, wie es Mammakarzinom gezeigt werden konnte, zu Chromosomeninstabilität und Aneuploidie führen (Daniels et al., 2004, Takaoka et al., 2014). Des Weiteren können Tumorzellen eine verzögerte oder gestörte Cytokinese zeigen, die zu einer Erhöhung der Multinukleation führen kann und mit einer verminderten NMII-Aktivität assoziiert ist (Wu et al., 2010). Die NMII vermittelte Zellteilung ist auch bei der Invasion von Tumorzellen von Bedeutung, indem sie die Zellablösung und das Aufreißen der epithelialen Basalmembran fördern (Vasiliev et al., 2004). Die Regulation von Zell-Zell-Adhäsionen und der Motilität von Zellen durch NMIIs ist für die Migration von Tumorzellen von Bedeutung. So vermittelt die NMII abhängige Kontraktilität von Zellen nicht nur den Übergang zwischen kollektiver und einzelner Zellmigration durch Beeinflussung der Umsatzgeschwindigkeit von Zell-Zell-Verbindungen oder vermittelt entsprechend Traktion für die kollektive Migration von Zellaggregaten, sondern ermöglicht es Gliomzellen auch submikrometer Poren im Gehirn zu passieren (Beadle et al., 2008, Cai et al., 2014, Gaggioli et al., 2007, Ng et al., 2012, Peglion et al., 2014, Reffay et al., 2014, Salhia et al., 2008). Die Störung von Zell-Zell-Adhäsionen durch die Erhöhung der endothelialen NMII-Aktivität befähigt Tumorzellen zur transzellulären Migration und der Invasion von Geweben (Khuon et al., 2010, Li and Zhu, 2015, Li et al., 2015b). Zusätzlich fördern NMIIs die Migration von Tumorzellen und beeinflussen deren Eigenschaften, indem sie es ihnen durch mechanotransduktive Vorgänge ermöglichen auf biochemische und physikalische Signale zu reagieren (Friedland et al., 2009, Meshel et al., 2005, Zhong et al., 1998). So korreliert die steigende Rigidität des Tumormikromillieus mit einer erhöhten NMII-vermittelten Kontraktilität und einer Beeinflussung von Signalwegen die wiederum die Migration aber auch Proliferation positiv beeinflussen können (Calvo et al., 2013, Humphrey et al., 2014, Liu et al., 2009b, Ulrich

et al., 2009, Yamaguchi et al., 2014). Und auch biochemische Signale wie Wachstumsfaktoren, EGF, HGF, TGF β aber auch Cytokine können die NMII-Aktivität in Tumorzellen beeinflussen (Dulyaninova et al., 2007, Harrison et al., 2013, Huppert et al., 2010, Kharait et al., 2006, Nakashima et al., 2011, Shinto et al., 2010, Straussman et al., 2001, Weidert et al., 2014).

Eine weitere Pathologie bei der NMII eine wichtige Rolle besitzen ist die Arteriosklerose. NMIIs regulieren in den epithelialen Zellen der Blutgefäße die Zell-Zell-Adhäsionen und damit die vaskuläre Permeabilität in Reaktion auf die durch Blutstromfluktuationen verursachten Scherkräfte (Conway et al., 2013, Tornavaca et al., 2015) und ermöglichen als Antwort auf immunologische Vorgänge die Invasion von Leukozyten (Cane et al., 2012, Si et al., 2010). Im Falle der Arteriosklerose führen vermutlich, durch die für Arteriosklerose charakteristischen Plaques erzeugten, Perturbationen des Blutflusses zu veränderten Scherkräften, die wiederum über die NMII vermittelte Mechanotransduktion Einfluss auf die Genexpression ausüben. (Hahn and Schwartz, 2009). Folgend sind arteriosklerotische Plaques von erhöhten NMII-Spiegeln und erhöhter NMII-Aktivität sowie erhöhter Aktivität in den NMII-aktivierenden Signalwegen gekennzeichnet und die pharmakologische Inhibition von RLCK in murinen Modellen der Arteriosklerose reduziert die Entwicklung und den Fortschritt der arteriosklerotischen Plaques (de la Cuesta et al., 2011, Essler et al., 1999, Nikol et al., 1997, Wu et al., 2009, Zimman et al., 2010). Eine weitere Folge der dauerhaften NMII-Aktivierung in Plaques ist die Entstehung lokaler Entzündungen innerhalb der Tunica Intima bedingt durch die erhöhte Permeabilität des Endothels (Haidari et al., 2011).

Nicht muskuläre Myosine fungieren nicht nur als wichtiger Faktor in komplexen Pathologien. 40 verschiedene Mutationen innerhalb der Motor- und Enddomäne von NMHCII-A werden mit einer Reihe von autosomal-dominanten Pathologien assoziiert, die unter dem Term der *MYH9-related diseases* zusammengefasst werden und deren Symptome kongenitale Makrothrombozytopenie, progressive Nephritis, Taubheit und präsenilen Katarakt umfassen (Burt et al., 2008, Pecci et al., 2008). Hierbei schienen vor allem Mutationen in der Motordomäne ursächlich zu sein, da Mutationen innerhalb der Schwanzregion keine klinisch relevanten Defekte zeigen (Pecci et al., 2010, Pecci et al., 2008). Für NMII-B sind derzeit keine Pathologie assoziierten Mutationen der MYH9 kodierten NMHC bekannt.

1.4.4 Das nicht muskuläre Myosin NMII-C/MYH14

Das nicht muskuläre Myosin II-C (NMII-C) ist das am wenigsten gut untersuchte NMII von allen drei bekannten Isoformen. Wie die anderen Isoformen auch bilden zwei NMHCs, die in diesem Fall durch das auf Chromosom 19q13.3 lokalisierte Gen MYH14 kodiert werden, zwei RLCs und zwei ELCs ein funktionales Homodimer, das über Interaktionen der NMHCs dazu in der Lage ist Myosinfilamente zu bilden und über seine Motordomänen dazu befähigt ist, Aktinfilamente zu binden (Golomb et al., 2004, Ronen and Ravid, 2009, Rosenberg et al., 2013). Doch obwohl alle drei Isoformen hohe Sequenzidentitäten von 60-80 % aufweisen scheinen die Ähnlichkeiten zwischen NMII-A (MYH9), NMII-B (MYH10) und MYH11, dem Myosin der glatten Muskulatur höher zu sein, als zwischen NMII-C (MYH14) und jedem einzelnen dieser Myosine (Golomb et al., 2004). Entsprechend zeigen sich nicht nur Gemeinsamkeiten in Funktion und Aufbau, sondern auch Distinkte Unterschiede. Ähnlich wie für NMII-B konnten für NMII-C vier verschiedene Spleißvarianten entdeckt werden, die ebenfalls durch eine Exoninsertion in Schleife 1 (8 Aminosäuren) und/oder Schleife 2 (33 Aminosäure) der schweren Ketten (vgl. 1.4.1) erzeugt werden und die entsprechend unterschiedliche Enzymaktivität zeigen (Golomb et al., 2004, Jana et al., 2009). Die Insertion C1 von 8 Aminosäuren erhöht die MgATPase Aktivität und die *in vitro* Motilität, verringert aber gleichzeitig die Aktinaffinität im Vergleich zur nicht inserierten Form. Die Aktivität bleibt dabei abhängig von der phosphorylierungsgesteuerten Aktivität der RLC. Einspleißung von 33 Aminosäuren in Schleife zwei (NMII-C2) erhöht nicht nur die MgATPase-Aktivität und verringert die Aktinaffinität der Motordomänen, sondern führt auch zu einer RLC unabhängigen ATPase-Aktivität. Die *in vitro* Motilität steigt hingegen nur schwach. Durch Insertion beider Spleißvarianten (NMII-C1C2) erhöht sich die enzymatische Aktivität im Vergleich mit allen Spleißvarianten und im Vergleich zu den beiden Spleißvarianten C1 und C2 erhöht sich zusätzlich die Aktinaffinität. Die RLC-phosphorylierungsunabhängige Enzymaktivität bleibt wie bei C2 bestehen, wobei die Phosphorylierung der RLC zu einer Erhöhung der Aktinaffinität beiträgt (Heissler and Manstein, 2011, Jana et al., 2009). Allerdings zeigen sich in der Enzymaktivität auch Unterschiede zwischen den drei Isoformen, wobei NMII-C die geringste Enzymaktivität und *in vitro* Motilität zeigt (Golomb et al., 2004, Heissler and Manstein, 2013, Jana et al., 2009, Pato et al., 1996, Wang et al., 2000). Auch die Molekülanzahl pro Myosinfilament und damit Prozessivität von Aktinfilamenten, die abhängig von der Anzahl der Motordomänen und vom Arbeitszyklus ist, unterscheidet sich zwischen den Isoformen (Nagy et al., 2013). NMII-A- und NMII-B-Filamente bestehen aus 29 bzw. 30 Molekülen und besitzen entsprechend 58 bzw. 60 Motor, während NMII-C mit 14 Molekülen d.h. 28 Motordomänen sehr viel kleinere Filamente bildet. Daraus folgend sind 72 % der NMII-A- und 89 % der NMII-

B-Filamente, aber nur 47 % der NMII-C-Filamente Aktin gebunden, und führt damit zu einer 5-6 bzw. 8-9-fach schwächeren Tendenz von NMII-C Aktin kreuz zu vernetzen (Billington et al., 2013). In der für die Filamentformation wichtigen Regulation der schweren Ketten bzw. deren Eigenschaften zeigen sich klare Unterschiede in der Funktion des nicht helikalen Endstücks. Wie für die Isoformen NMII-A und NMII-B inhibieren Phosphorylierungen – im Falle von NMII-C von Thr¹⁹⁵⁷ und Thr¹⁹⁶⁰ – die Formation von Myosinfilamenten und erhöhen die Löslichkeit des Proteins (vgl. 1.4.1) (Rosenberg et al., 2013). Von Interesse ist allerdings, dass eine Deletion des nicht helikalen Endstückes bei NMII-A und NMII-B Grund für die Bildung stärkerer Filamente ist, während die Filamentbildung durch die Ablation des Endstückes bei NMII-C zur Schwächung der Filamente führt. Zusätzlich konnte neben anderen Beobachtungen gezeigt werden, dass die nicht helikalen Endstücke die Morphologie der Filamente bestimmen. Auch die zelluläre Lokation von NMII-A und NMII-B scheint das nicht helikale Endstück zu beeinflussen während dies für NMII-C nicht der Fall zu sein scheint (Ronen and Ravid, 2009).

In der zellulären Lokalisation gibt es ebenfalls Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Isoformen, aber auch zwischen den verschiedenen NMII-C Spleißvarianten. NMII-C0 und NMII-C1 sind ubiquitär Exprimiert und können im Gehirn, dem Herzen, in skelettaler Muskulatur, Lunge, Leber, Colon und Niere gefunden werden. Die höchsten Expressionen zeigen sich dabei in Pons, Corpus callosum, linkem Herzventrikel, skelettaler Muskulatur und Colon. In embryonalem Gewebe von Mäusen hingegen ist MYH14 bis zum Tag E11.5 nicht exprimiert (Golomb et al., 2004). NMII-C2 ist ähnlich wie die beiden Spleißvarianten NMII-B1 und NMII-B2 nur in neuronalem Gewebe zu finden (Jana et al., 2009, Ma et al., 2006, Tullio et al., 1997, Tullio et al., 2001). Von Interesse ist, dass eine starke NMII-C1 Expression in verschiedenen epithelialen Tumorzelllinien gefunden wurde und dass zwei Arbeitsgruppen die Beteiligung von NMII-C bzw. NMII-C1 an der Cytokinese in A549 Lungenkarzinomzellen nachweisen konnten (Jana et al., 2006, Takaoka et al., 2014). *Jana et al.* sind in der Lage deutlich die Abhängigkeit späterer Stadien der Cytokinese von NMII-C1 in A549 Zellen zu zeigen, da der Knockdown von NMII-C1 zu einer Verlängerung der Cytokinese von 2 auf 8-10 Stunden erhöht und sich entsprechend die Zellzahl nach 120 Stunden um das 5.5-fache verringert. Die Cytokinese wird allerdings nicht gänzlich gestoppt. Eine Überexpression von NMII-A oder NMII-B verhindert die Elongation der Cytokinese nicht und auch die Transfektion von NMII-C0 ist nicht in der Lage diesen Phänotyp vollständig zu beseitigen (Jana et al., 2006). In ihrer Arbeit von 2014 können *Takaoka et al.* die Beteiligung von NMII-C an der Cytokinese und die Lokalisation im Flemmingkörper noch einmal bestätigen, wobei sie nicht auf die spezifische Spleißvariante eingehen. Des Weiteren beweisen ihre Versuche, die Regulation von NMII-C und der NMII-C-Rings im Flemmingkörper durch die Aktivität von BRCA2. BRCA2 wird durch PLK1 phosphoryliert, worauf es mit NMII-C im Flemmingkörper Co-lokalisiert und

es die enzymatische Funktion von NMII-C aktiviert. Ein Knockdown von BRCA2 oder NMII-C führt entsprechend zu einem gestörten NMII-C Ring und einer gestörten Flemmingkörperentstehung gefolgt von einem Fehlschlag in der Zellabschnürung (Takaoka et al., 2014). Die C2 Insertion tragenden Spleißvarianten von NMII-C werden ausschließlich in neuronalen Zellen gefunden und übernehmen wichtige Funktionen in der Neuritogenese und der Aufrechterhaltung von fokalen Adhäsionen. Wylie und Chantler berichten in ihren Studien in N2A-Zellen nach NMII-C Knockdown von einer Suppression des Neuritenwachstums, einer erhöhten Vakuolisierung und einem vergrößerten Durchmesser des Zellkörpers, einhergehend mit einer 40 %igen Ablösung der Zellen nach 96 Stunden. Zusätzlich führte ein Knockdown zur Reduktion der durchschnittlichen Anzahl der Neuriten pro Zelle (Wylie and Chantler, 2008). Die Beobachtungen von Wylie und Chantler können durch die Experimente von *Saha et al.* weiter präzisiert werden. In ihrer Arbeit aus 2012 zeigen sie, dass NMII-C1C2 maßgeblich an der Neuritogenese und Adhäsionswartung beteiligt ist. Der Knockdown von NMII-C1C2 führt, wie bei Wylie und Chantler, zum reduzierten Wachstum von Neuriten und reduziert die Anzahl der Filopodien differenzierter N2A-Zellen. Zusätzlich zeigen sie die Co-Lokalisation von NMII-C1C2 mit β 1-Integrin, was für ihre Funktion in der Adhäsionswartung spricht. Von zusätzlichem Interesse an dieser Stelle sind Beobachtungen von *Saha et al.* die einen Wechsel von NMII-C1 zu NMII-C1C2 während der N2A-Differenzierung beschreiben, was sie zu der Hypothese führt, dass NMII-C1, ähnlich wie es andere Arbeitsgruppen gezeigt haben (Jana et al., 2006, Takaoka et al., 2014), für cytokinetische Vorgänge verantwortlich ist und NMII-C1C2 vor allem Aufgaben während der Neuritokinese übernimmt (Saha et al., 2013).

NMII-C scheint nicht nur in der Cytokinese von Tumorzellen von Bedeutung zu sein, sondern beeinflusst auch deren Reaktionsvermögen auf mechanische Signale und die Invasivität. *Surcel et al.* zeigen die Abhängigkeit der metastatischen Aktivität und der Mechanorezeption von NMII-C durch die Applikation von 4-hydroxyacetophenon (4-HAP) in Gewebssphäroiden von PDAC-Zellen. 4-HAP fördert die Filamentbildung von NMII-C, damit die Erhöhung der kortikalen Spannung bzw. der zellulären Rigidität und entsprechend einer Verminderung der Invasivität. Zusätzlich führt die Applikation von 4-HAP zum Verlust der Reaktionsfähigkeit von NMII-C auf mechanische Signale (Surcel et al., 2015, Surcel et al., 2019).

Eine weitere wichtige Funktion übernimmt NMII-C in der Karyokinese der Myocyten. Ähnlich wie NMII-B ist NMII-C in den interkalierenden Scheiben oder auch Glanzstreifen der myokardiellen Muskulatur lokalisiert und ist in der Lage den murinen, NMII-B Knockout vermittelten Phänotyp von binukleierten Kardiomyocyten mit defekter Cytokinese für 74 % der Zellen zu verhindern bzw. abzuschwächen. Der Knockdown von NMII-C alleine ist in Mäusen zunächst symptomlos und zeigt auch in der Karyokinese keine Anzeichen von Aberrationen. Der kombinierte Knockout von NMII-C und NMII-B verursacht allerdings die Multinukleation im

Großteil der Myocyten des kompakten Myokards was sich in einer gesteigerten Hypertrophie der kardialen Myocyten äußert. Der defekten Cytokinese entsprechend zeigen betroffene Myocyten Defekte in der Chromatidentrennung, der Bildung der mitotischen Spindel, erhöhte Stabilität der Mikrotubuli und eine abnormale Entstehung multipler Zentrosome. Zusätzlich entwickeln sich interstitielle Fibrosen die durch eine diffuse Lokalisation von N-Catherin und β -Catenin innerhalb Glanzstreifen charakterisiert sind (Ma and Adelstein, 2012, Ma et al., 2010).

Eine Fehlregulation der Menge der verschiedenen Spleißvarianten von NMII-C ist mit myotonischer Dystrophie vom Typ 1 (DM1) assoziiert. *Rinaldi et al.* beschreiben ein Ungleichgewicht in der Expression der beiden Spleißvarianten NMII-C0 und NMII-C1, mit vermehrter Expression von NMII-C0 und gleichzeitiger Reduktion der Transkript- und Proteinspiegel beider Varianten im Muskelgewebe von DM1 Patienten, wobei die subzelluläre Lokation erhalten bleibt (Rinaldi et al., 2012).

Ausgehend von den Ergebnissen von *Donaudy et al.* ist NMII-C stark in der Cochlea von Mäusen exprimiert, wobei es vornehmlich in Zellen der Scala media, mit Ausnahme von Reissner's Membran, lokalisiert ist und eine signifikante Expression im Organ von Corti und der Stria vascularis zeigt (Donaudy et al., 2004). Im Gegensatz zu Mäusen, bei denen der Knockdown von MYH14 zunächst unauffällig ist später aber zu einer erhöhten Anfälligkeit für lärminduzierten Hörverlust führt (Fu et al., 2016), verursachen Mutationen von MYH14 im Menschen eine Reihe von komplexen Phänotypen die vor allem mit Taubheit assoziiert sind, aber auch Heiserkeit, peripherer Neuropathie und distaler Myopathie einhergehen können. Derzeit sind sechs pathophysiologische Mutationen von MYH14 bekannt, wobei es sich um eine nonsense und fünf missense Mutationen handelt (Almutawa et al., 2019, Donaudy et al., 2004, Yang et al., 2005). Die von *Donaudy et al.* und *Yang et al.* gefundenen Mutationen sind dabei alle mit dem autosomal-dominanten Hörverlust von Patienten verbunden, während *Choi et al.* in einer koreanischen Familie die Missensemutation Arg941Leu mit einem komplexen, autosomal-dominanten Phänotyp verknüpfen konnte, der sich über Heiserkeit, peripherer Neuropathie, distaler Myopathie und Taubheit definiert (Choi et al., 2011, Donaudy et al., 2004, Yang et al., 2005). Periphere Neuropathien werden oft durch Defekte mitochondrieller Fusion oder Spaltung verursacht (Pareyson et al., 2015) und gemäß den Beobachtungen von *Choi et al.*, die eine Mutation von MYH14 mit Symptomen einer peripheren Neuropathie koppeln konnten, waren *Almutawa et al.* in der Lage zu beweisen, dass die von *Choi et al.* entdeckte Mutation mit einer gestörten mitochondrialen Fraktionierung zusammenhängt. Ihren Experimenten folgend lassen sich übermäßig fusionierte, mitochondriale Netzwerke in den Fibroblasten von Patienten beobachten, die eine Mutation in MYH14 aufweisen, was gestützt durch die erhöhte Fragmentationsrate von Mitochondrien

unter NMII-C-Überexpression, auf eine verringerte Spaltungsrate hindeutet. Zusätzlich konnten sie die Lokalisation von NMII-C an Fragmentierungsstellen bestätigen und sie vermuten, dass es durch die gestörte Fragmentation der Mitochondrien zu einer Reduzierung der Mitophagie kommt, die auf fragmentierte Mitochondrien angewiesen ist (Almutawa et al., 2019, Twig and Shirihai, 2011).

Die Ergebnisse von *Almutawa et al.* implizieren eine indirekte Funktion von NMII-C in autophagischen Prozessen. Interessanterweise konnte, in von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten, massenspektrometrischen Interaktomanalysen (Daten noch nicht veröffentlicht), NMII-C als potentieller Interaktionspartner von BAG3 gefunden werden; ein Protein, das sowohl an autophagischen Prozessen, als auch in der Wartung muskulärer Strukturen und in der Entstehung von Myopathien beteiligt ist (vgl. 1.3).

2. Zielsetzung

Aufgabe dieser Arbeit ist es, verschiedene Aspekte der Proteostase zu untersuchen. Hierzu lässt sich die Arbeit in drei Teile untergliedern.

Im ersten Teil soll untersucht werden, inwiefern es neuronalen Zellen möglich ist auf einen Entzug von Nährstoffen zu reagieren. Hierzu sollen HeLa-Zellen als Kontrolle und SH-SY5Y-Neuroblastomzellen, als neuronales Modell einem Glukose- oder Aminosäureentzug ausgesetzt und der autophagische Flux evaluiert werden. Dies ist deshalb von Interesse, da neuronale Zellen, wie z.B. Neurone, im ausdifferenzierten Zustand im Vergleich zu teilungsaktiven Zellen nicht mehr in der Lage sind, über eine mitotische Teilung die Proteinaggreatlast zu vermindern und somit auf ATP abhängige Mechanismen, wie Chaperon vermittelte Disaggregation und Degradation, zur Aggregatreduktion angewiesen sind. Entsprechend kann ein Entzug von Nährstoffen zum ATP-Mangel und einer gestörten Proteostase führen, weshalb es für die Proteostase von Neuronen von Wichtigkeit ist eine ständige ATP-Versorgung zu gewährleisten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine kleinere Isoform von BAG3 an der vesikulären Transmitterausschüttung an Neuronen beteiligt ist. *Iorio et al.* konnten zeigen, dass BAG3, ein Schlüsselprotein der BAG3-vermittelten, selektiven Makroautophagie und der chaperonvermittelten selektiven Autophagie in *Drosophila*, an der Glukose stimulierten Insulinsekretion in β -Zellen des Pankreas beteiligt ist, indem es mit den beiden SNARE-Proteinen SNAP25 und Syntaxin-1 interagiert (Iorio et al., 2015). Zusätzlich konnten Bruno et. al eine kleinere, synaptosomenassoziierte BAG3-Isoform finden, die allerdings nicht weiter charakterisiert wurde, und die Anwesenheit von BAG3-mRNA in synaptosomalen Polysomen bestätigen (Bruno et al., 2014, Bruno et al., 2008). Entsprechend dieser beiden Beobachtungen soll, zum einen die kleinere BAG3 Isoform weiter evaluiert und zum anderen die Interaktion von BAG3 mit SNAP25 und Syntaxin-1 in synaptosomalen Präparationen aus Cortex und Hippocampus adulter Ratten untersucht werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der näheren Untersuchung von BAG3 und dessen potentiellen Interaktionspartners NMII-C/MYH14, der vorläufig in massenspektrometrischen Interaktomanalysen, die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden (Daten noch nicht veröffentlicht), gefunden werden konnte. Für diese massenspektrometrischen Interaktomanalysen wurden HEK293-T-Zellen proteotoxischem Stress durch Überexpression von mutantern SOD-1 oder proteasomalem Stress durch MG132 vermittelte Inhibition des Proteasoms ausgesetzt. Anschließend wurden endogene

Immunopräzipitationen mit BAG3 durchgeführt und die Interaktoren über massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert. Ziel soll es hier sein, die Interaktion zwischen BAG3 und NMII-C/MYH14 zu charakterisieren und eine mögliche Rolle von NMII-C/MYH14 in autophagischen Prozessen zu untersuchen. Eine mögliche Funktion von NMII-C in autophagischen Prozessen ist hierbei über die Anteilnahme von NMII-C und anderer NMIIs an verschiedenen endo- und exocytotischen Prozessen, sowie vesikulärem Transport impliziert (vgl. 1.4.2). Insbesondere die Funktion von NMII-A in autophagischen Prozessen (Kruppa et al., 2016, Tang et al., 2011) könnte ein Hinweis für eine entsprechende Rolle von NMII-C sein.

3. Material

3.1 Bakterien

Tabelle 1: Bakterien. Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und deren Lieferant

Bakterienstamm	Lieferant/Hersteller
Escherichia Coli DH5 α	Invitrogen

3.2 Zelllinien

Tabelle 2: Zelllinien. Übersicht der verwendeten Zelllinien und deren Lieferanten

Zelllinie	Ursprungsorganismus	Zelltyp	Lieferant/Hersteller
HEK-293-T	Homo Sapiens	Embryonische Nierenzellen	ATCC/LGC
HEK-293-A	Homo Sapiens	Embryonische Nierenzellen	ATCC/LGC
HeLa	Homo Sapiens	Epitheliale Zervixkarzinomzellen	ATCC/LGC
MCF-7	Homo Sapiens	Epitheliale Mammakarzinomzellen	ATCC/LGC
Hep-G2	Homo Sapiens	Epitheliale Leberkarzinomzellen	ATCC/LGC
SH-SY5Y	Homo Sapiens	Epitheliale Neuroblastomzellen	ATCC/LGC

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

Tabelle 3: Primärantikörper. Übersicht der verwendeten Primärantikörper für Westernblot und Immunfluoreszenzfärbung mit genutzter Konzentration. WB: Westernblot, ICC: Immunocytochemie

Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung WB	Verdünnung ICC	Hersteller	Bestellnr.
LC3B-II	Kaninchen	1:1000	-	Sigma-Aldrich	L7543
p62	Meerschweinchen	1:1000	1:100	Progen	GP62-C
Tubulin α DM1A	Maus	1:1000	-	Sigma-Aldrich	T9026
NBR-1	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling	9891S
TOM20	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signalling	42406S
GM130	Maus	1:250	-	BD Transduction	610823
BAG3 N-terminal	Kaninchen	1:500	-	Novusbio	NBP1-86429
BAG3 C-terminal	Kaninchen	1:500	1:100	Proteintech	10599-1-AP
PSD95	Maus	1:1000	-	Antibodies incorporated (Neuromabs)	75-028 purified
CNPase	Maus	1:1000	-	Sigma-Aldrich	C5922
SNAP25	Kaninchen	1:1000	-	Antikörper-Online	ABIN372714
Syntaxin-1	Maus	1:1000	-	Synaptic Systems	110011
HSP70/72	Maus	1:1000	-	Enzo	ADI-SPA-810-F
HSC70/73	Ratte	1:1000	-	Enzo	ADI-SPA-815-D
MYH14	Kaninchen	1:250	1:100	Sigma-Adlrich	HPA067889
Dynein		1:1000	-	Sigma-Aldrich	D5167
LaminB1	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signaling	13435
LaminB1 (119D5-F1)	Maus	1:1000	1:100	Cell Signaling	68591
Histon H3	Maus	1:1000	-	Cell Signaling	14269
GFP	Kaninchen	1:1000	-	Clonetech	632592

GFP	Maus	1:1000	-	Sigma	SAB5300167
Ubiquitin	Kaninchen	1:1000	-	Dako	Z0458
Ubiquitin	Maus	1:1000	-	Cell Signaling	3936
FLAG	Maus	1:1000	1:100	Sigma-Aldrich	F1804

3.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 4: Sekundärantikörper. Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper für Westernblot und Immunfluoreszenzfärbung mit genutzter Konzentration. WB: Westernblot, ICC: Immunocytochemie

Fluorophor/Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung WB	Verdünnung ICC	Hersteller	Bestellnr..
Cy5-Anti-rabbit	Esel	-	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	711-175-152
Cy3-Anti-rabbit	Esel	-	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	711-165-152
Cy3-Anti-mouse	Esel	-	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	715-165-151
Cy2-Anti-mouse	Esel	-	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	715-225-151
Cy2-Anti-guineapig	Esel	-	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	706-225-148
Alexa Fluor 647-anti-rabbit	Esel	-	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	711-605-152
Horse radish peroxidase (HRP)-Anti-mouse	Esel	1:5000	-	Jackson Immuno Research	715-035-151

				Laboratories Inc.	
HRP-Anti-rabbit	Esel	1:5000 1:3000	-	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	711-035-152
HRP-Anti-guinea pig	Esel	1:5000	-	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	706-035-148
HRP-Anti-rat	Ziege	1:5000	-	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	112-035-003

3.4 Plasmide, Primer und siRNA

3.4.1 Plasmide

Tabelle 5 : Plasmide. Übersicht der verwendeten Plasmide, deren Resistenzen und Lieferanten

Vektor::Insert	Prokaryotische Resistenz	Eukaryotische Resistenz	Bezugsquelle
pEGFP-N1	Neomycin	Kanamycin	Clontech
pEGFP-N1:: hSOD1-G85R	Neomycin	Kanamycin	Siehe <i>Witan et al.</i> 2009
pEGFP-N1:: hSOD1	Neomycin	Kanamycin	Siehe <i>Witan et al.</i> 2009
pEGFP-N3::mNMHCII-C0	Neomycin	Kanamycin	Addgene
pEGFP-N3::mNMHCII-C1	Neomycin	Kanamycin	Addgene
pEGFP-N3::mNMHCII-C2	Neomycin	Kanamycin	Addgene
pEGFP-N3::mNMHCII-C1C2	Neomycin	Kanamycin	Addgene

3.4.2 Primer

Tabelle 6: Primer. Übersicht der verwendeten Primer und deren Sequenzen

Name	Primer	Sequenz
BAG3 PCR forward	Vorwärts-Primer	5'-GGTTCACTGCCCATCACC-3'
BAG3 PCR 5'UTR rev	Rückwärts-Primer	5'-AAGAGAAGCCCCCTTGGTTA-3'

3.4.3 siRNA

Tabelle 7: siRNA. Übersicht der verwendeten siRNAs und deren Sequenzen

Ziel	siRNA	Sequenz
-	Nonsense #1	5'-AUUCUCCGAACGUGUCACG-3'
-	Nonsense #2	5'-GGGAAAUGCGUUAGCAGUGAU-3'
Humanes BAG3	hBAG3 #1	5'-AAUGUGCCAGGAGCCAUAAG-3'
Humanes BAG3	hBAG3 #2	5'-GAGUGUGGCUACAGAAGAG-3'
Humanes NMII-C	hMYH14 #1	5'-GGUCAAGAGCCUCAUAAG-3'
Humanes NMII-C	hMYH14 #2	5'-CCAUCCGUCUUAGCAAGGA-3'

3.5 Protein- und DNA-Größenstandards

Tabelle 8: Marker. Übersicht der verwendeten Protein- und DNA-Marker und deren Hersteller

	Marker	Hersteller
DNA	MassRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
DNA	Quick-Load Purple 2-Log DNA-Ladder	New England Biolabs
Proteine	PageRuler Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa	Thermo Fischer Scientific

3.6 Chemikalien

Tabelle 9: Chemikalien. Übersicht der verwendeten Chemikalien, deren Hersteller und Bestellnummer

Chemikalie	Hersteller	Bestellnr.
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	A3678
Chloroform	Carl Roth	Y015.1
Dimethylsulfoxid DMSO	Carl Roth	A994.1
Ethanol 96%	Carl Roth	9065.2
Isopropanol	Carl Roth	6752.2
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth	6771.1
Salzsäure (HCl) rauchend 37%	Carl Roth	4625.1
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BioRad	1610302
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad	1610801
TRIS	Carl Roth	4855.2
TRIS-HCl	Carl Roth	9090.3
Bafilomycin A1 (BafA1)	Toronto research chemical	B110000
Saccharose	Carl Roth	4661.2
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem	A2937
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth	3054
Phosphataseinhibitor Phostop	Roche	4906837001
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	11873580001
Bromphenolblau	BioRad	161-0404
Glycerol	VWR	1.04092.1000
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3
Glycin	Carl Roth	3908.3
Methanol	VWR	20903.368
Natriumazid	Sigma-Aldrich	S8032
Magermilchpulver	AppliChem	A0830
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	3957.5

Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth	6781.3
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth	4984.1
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth	3904.1
Tween20	Carl Roth	9127
Luminol	Sigma-Aldrich	123072
p-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich	C9008
30%iges H_2O_2	Sigma-Aldrich	H1009
MG132	Calbiochem	47490
Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth	HN03.1
Kalziumchlorid Dihydrat (CaCl_2 $\times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth	HN04.1
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	AppliChem Panreac	A0384,1000
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich	H3375
D(+)-Glukose Monohydrat	Carl Roth	6780.2
Bisbenzimid H33258	Calbiochem	382061
BSA	Sigma-Aldrich	A7906
Elvanol (Polyvinyl-Alkohol)	Sigma-Aldrich	P-8136
p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich	624-18-0
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T-9284
Biozym LE-Agarose	Biozym	0000520839
Poly-L-Ornithin hydrobromide (PLO)	Sigma-Aldrich	P3655
Bacto Trypton	BD Bioscience	211705
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich	Y1625
Bacto Agar	BD Bioscience	214030

3.7 Puffer und Lösungen

3.7.1 Hergestellt

Bafilomycin A1-Lagerlösung

Bafilomycin A1 5 mM in DMSO

MG132-Lagerlösung

MG132 10 mM in DMSO

4x Sammelgelpuffer

TRIS-HCl 0,6 M
SDS 0,4% (m/V)
H₂O auf 1 l aufgefüllt
pH auf 8,8 mit HCl und NaOH eingestellt

4x Trenngelpuffer

TRIS 1,5 M
SDS 0,4 % (m/V)
H₂O auf 1 l aufgefüllt
pH auf 8,8 mit HCl und NaOH eingestellt

10%ige APS-Lösung

APS 1 g
H₂O auf 10 ml aufgefüllt

20%ige SDS-Lösung

SDS 10 g
H₂O 50 ml

10x Phosphataseinhibitor-Lösung

Phosphataseinhibitor Phosphostop 1 Tablette
H₂O 1 ml

25x Proteinaseinhibitorcocktail

cComplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette
H ₂ O	2 ml

3x Zellysepuffer

Saccharose	30 % (m/V)
TRIS-HCl	150 mM
EDTA	1,5 mM
EGTA	1,5 mM
pH	6,8 mit HCl und NaOH angepasst

1x Zellysepuffer

3x Zellysepuffer	333,33 µl
10x Phosphataseinhibitorlösung	100 µl
25x Proteinaseinhibitorcocktail	40 µl
20%ige SDS-Lösung	100 µl
H ₂ O	416 µl

5x SDS-PAGE-Ladepuffer

TRIS-HCl	750 mM
SDS	15 % (m/V)
Bromphenolblau	0,1 % (m/V)
Glycerol	3,85 ml
2-Mercaptoethanol	250 µl
H ₂ O	3,85 ml
pH	6,8 mit HCl und NaOH eigestellt

2x SDS-PAGE-Ladepuffer

TRIS-HCl	300 mM
SDS	6 % (m/V)
Bromphenolblau	0,1 % (m/V)
Glycerol	3,85 ml
2-Mercaptoethanol	250 µl
H ₂ O	3,85 ml
pH	6,8 mit HCl und NaOH eigestellt

10x SDS-PAGE-Laufpuffer

Glycin	1,92 M
TRIS	152,7 mM
TRIS-HCl	97,3 mM
SDS	1 % (m/V)
H ₂ O	auf 4 l aufgefüllt
pH	8,3 mit HCl und NaOH eingestellt

1x SDS-PAGE-Laufpuffer

10x SDS-PAGE-Laufpuffer	100 ml
H ₂ O	900 ml

10x Transferpuffer

Glycin	2,5 M
TRIS	250 mM
H ₂ O	auf 4 l aufgefüllt
pH	8 mit HCl und NaOH eingestellt

1x Transferpuffer (Methanol haltig)

10x Transferpuffer	10 %
Methanol	20 %
H ₂ O	70 %

1x Transferpuffer (Methanol frei)

10x Transferpuffer	10 %
H ₂ O	90 %

10x Phosphatpuffer (10x PBS)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,2 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
H ₂ O	auf 1 l aufgefüllt
pH	7,4 mit HCl und NaOH eingestellt

1x Phosphatpuffer (PBS)

10x PBS	10 %
H ₂ O	90 %
pH	7,4 mit HCl und NaOH eingestellt

1x Phosphatpuffer mit Tween20 (PBS-T)

10x PBS	200 ml
H ₂ O	1800 ml
Tween20	1 ml
pH	7,4 mit HCl und NaOH eingestellt

Blockierlösung Westernblot

Magermilchpulver	4 g
PBST	auf 100 ml auffüllen

1%ige Natriumazid (NaN₃) -Lösung

NaN ₃	0,1 g
H ₂ O	auf 10 ml auffüllen

Primärantikörperlösung Westernblot

PBS-T	13,5 ml
10%ige NaN ₃ -Lösung	1,5 ml
Primärantikörper	siehe Tabelle für Antikörper

Sekundärantikörperlösung Westernblot

PBS-T	7,5 ml
Sekundärantikörper	siehe Tabelle 4.

ECL Entwickler-Lösung A

0,1 M TRIS-HCl (pH8,6)	500 ml
Luminol	125 mg

ECL-Entwicklerlösung B

DMSO	50 ml
p-Hydroxycoumarinsäure	55 mg

WB-Chemilumineszenz-Entwicklerlösung

ECL-Entwicklerlösung A	2 ml
ECL-Entwicklerlösung B	200 µl
30%iges H ₂ O ₂	5 µl

Ringer-Lösung

NaH ₂ PO ₄	0,345 g
MgCl ₂	0,407 g
CaCl ₂	0,59 g
KCl	0,373 g
NaHCO ₃	4,2 g
NaCl	14,61 g
HEPES	11,915 g
H ₂ O	auf 2 l auffüllen
pH	7,21 mit NaOH eingestellt

Glukose-Ringer

Ringer	1 l
Glukose	4,954 g

10%ige BSA-Lösung

BSA	5 g
1% NaN ₃ -Lösung	5 ml
H ₂ O	auf 50 ml auffüllen

Blockierlösung Immunocytochemie

10%ige BSA-Lösung	30 % in PBS
-------------------	-------------

Primärantikörperlösung Immunocytochemie

10%ige BSA-Lösung	10 % in PBS
Primärantikörper	siehe Tabelle Primärantikörper

Sekundärantikörperlösung

10%ige BSA-Lösung	10 % in PBS
Sekundärantikörper	siehe Tabelle Primärantikörper

DAPI-Lagerlösung

Bisbenzimid H33258	5 mg
Methanol	100 ml

DAPI-Färbungslösung

DAPI-Lagerlösung	1 μ l
PBS	999 μ l

Eindeckmedium

1x PBS	7 ml
Elvanol	1 g (gelöst bei 60°C in 1x PBS)
Glycerol	3 ml
p-Phenylendiamin	10 mg
pH	8 mit HCl und NaOH eingestellt

Die Lösung wurde in 1ml Spritzen abgefüllt und bei -80°C eingefroren

2x Lysepuffer (LP) Immunopräzipitation (IP)

TRIS-HCl	100 mM
NaCl	300 mM
EDTA	4 mM
EGTA	1 mM
pH	7,4 mit HCl und NaOH eingestellt

1x Lysepuffer (LP) Immunopräzipitation (IP)

2x Lysepuffer IP	50 %
Glycerol	10 %
Triton X-100	1 %
10x Phosphataseinhibitorlösung	10 %
25x Proteinaseinhibitorcocktail	4 %
H ₂ O	25 %

2x Waschpuffer (WP) Immunopräzipitation (IP)

TRIS-HCl	100 mM
NaCl	400 mM
EDTA	4 mM
EGTA	1 mM
pH	7,4 mit HCl und NaOH eingestellt

1x Waschpuffer (WP) Immunopräzipitation (IP)

2x Waschpuffer IP	50 %
Triton X-100	1 %
10x Phosphataseinhibitor-Lösung	10 %
25x Proteinaseinhibitorcocktail	4 %
H ₂ O	35 %

Homogenisierungsmedium (HM)

Saccharose	0,32 M
HEPES	20 mM
EDTA	1 mM
pH	7,4 mit HCl und NaOH eingestellt

Krebspuffer

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
HEPES	25 mM
EDTA	1 mM
Glukose	10 mM
pH	7,4 mit HCl und NaOH eingestellt

Saccharoselösungen für Gradienten

1,2 M Saccharose in Krebspuffer

0,8 M Saccharose in Krebspuffer

50x TAE-Puffer

TRIS	2 M
NaOAc	1 M
EDTA	0,05 M

LB-Medium

Bacto Trypton	40 g
Hefeextrakt	20 g
NaCl	20 g
MilliQ-Wasser	auf 4 l auffüllen

LB-Agarplatten

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
5 N NaOH	200 µl
Bacto Agar	15 g
MilliQ-Wasser	auf 1 l auffüllen

3.7.2 Erworben

Tabelle 10: Lösungen und Puffer. Übersicht der verwendeten, erworbenen Lösungen und Puffer, deren Hersteller und Bestellnummer.

Lösung	Hersteller	Bestellnr.
DEPC behandeltes H ₂ O	Ambion	AM9916
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Gibco	41965-039
Dulbecco's modified eagle's medium F12 (DMEM F12)	Lonza	BE 12-719F/12M
0,5 % Trypsin-EDTA (10x)	Gibco	15400-054
Fetales Kalbsserum (FCS) aktiv	Gibco	10270
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich	P0781
Natriumpyruvat 100mM (100x)	Gibco	11360-039
Anti-Anti (100x) Antibiotic-Antimycotic	Gibco	15240-062
Dulbecco's Phosphate buffered Saline	Sigma-Aldrich	D8537
OmniPur Acrylamide: Bis Solution 29:1	Merck	1690-OP
CD Lipid Concentrate	Gibco	11905031
MEM Amino Acids (50x)	Gibco	11130-051
MEM NEAA (100x)	Gibco	11140-035
L-Glutamin	Sigma-Aldrich	G7513
MEM Vitamin Solution (100x)	Sigma-Aldrich	M6895
ROTI Histofix 4%	Carl Roth	A146.3
ROTI Seal	Carl Roth	6473.1
ROTI Blue 5x konz.	Carl Roth	A152.2
Ethidiumbromidlösung 0,07%	PanReac AppliChem	A2273,0015
TRI-Reagenz	Sigma-Aldrich	T9424

3.8 Laborkits

Tabelle 11: Laborkits. Übersicht der verwendeten Laborkits, deren Hersteller und Bestellnummer

Kit-Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.
Pierce BCA protein assay kit	Thermo Fisher	23225
Omniscript RT Kit	Quiagen	205113
Phusion High-Fidelity PCR Kit	ThermoFisher	F553S
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen	K210010
NucleoBond Xtra EF plasmid purification Kit	Macherey-Nagel	740420.50

3.9 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 12: Geräte und Verbrauchsmaterial. Übersicht der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien, sowie deren Hersteller bzw. Lieferanten

Gegenstand	Lieferant/Hersteller
10µl White, Graduated Tip	TipOne
100 Deckgläser 24x50 mm	Carl Roth
100µl Yellow, Graduated Tip	TipOne
1000µl Blue, Graduated Tip	TipOne
AF 80	Scotsman
Amersham imager 600	GE-Healthcare Life Sciences
Amersham Protran 0,2 µm NC Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Life Science
Analog Vortex Mixer	VWR
Axiovert 200	Zeiss
BL 6100	Sartorius
Blattwägebepapier	A.Hartenstein
Blotting paper	A.Hartenstein
Cellstar 24 Well Culture Plate	Greiner bio-one
CELLSTAR serological pipette (10 ml)	Greiner bio-one
CELLSTAR TUBES (15 ml)	Greiner bio-one
CELLSTAR TUBES (50 ml)	Greiner bio-one
CKX31	Olympus
CKX41	Olympus
Duomax 1030	Heidolph

Filter tip FT 10	Greiner bio-one
Filter tip FT 1000	Greiner bio-one
Filter tip FT 20	Greiner bio-one
Filter tip FT 200	Greiner bio-one
Fusion-SL 3500.WL	Peqlab
Gel iX20 Imager	Intas
Gilson PIPETMAN Classic 100-1000 µl	Fisher Scientific
Gilson PIPETMAN Classic 20-200 µl	Fisher Scientific
HERAcell 240i	Thermo Fisher
Heraeus Fresco 17 centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific
iCycler Thermal Cycler	BioRad
Immun-Blot PVDF Membranes	BioRad
Injekt-F 0.01-1ml	B/Braun
Micro Centrifuge AL 220VAC	Roth
Microscope Cover Glasses 12 mm	VWR
Mikrotestplatte 96 Well, F	SARSTEDT AG und Co.
Milli-Q reference A+	Millipore
Mini-PROTEAN Gel comb (10 lanes)	BioRad
Mini-PROTEAN Gel comb (15 lanes)	BioRad
Mini-PROTEAN Short plate	BioRad
Mini-PROTEAN Spacer plate (1.0 mm)	BioRad
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting clamp	BioRad
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting stand	BioRad
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	BioRad
Multiskan SC	Thermo Labsystems
NanoDrop 1000	Peqlab
Neubauer Zählkammer	OptikLabor
Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Parafilm	IDL GmbH & Co. KG
pH-Meter CG 825	Schott
Polycarbonate Centrifuge Tubes (11x24mm)	Beckman Coulter
Potter S	Sartorius
Power Pac 1000	BioRad

Power Pac 300	BioRad
PowerPac Basic	BioRad
Quali-“LowRetention” Mikrozentrifugengefäße	Kisker Biotech GmbH & Co. KG
QUINTIX214-1S	Sartorius
RCT basic	IKA Labortechnik
Reaction tube 1.5 ml	A.Hartenstein
Reaction tube 2 ml	A.Hartenstein
Research plus 0.5-10 µl	Eppendorf
ROCKER 2D basic	IKA
RS500XT DC Power Supply	Hofer Scientific Instruments
Shaking Incubator NB-205V	N-Biotek
Sorvall GSA 6 Rotor	Sorvall
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Sorvall
Sorvall SS-34 Rotor	Sorvall
Sterican Gr17/42 25G	B/ Braun
SterilGARD III Advance	Baker
SuperFrost Plus Objektträger	Hartenstein
TCS SP5 Confocal microscope	Leica
Test-Tube-Rotator 34528	Snijders
Thermomixer comfort	Eppendorf
TLS-55 Swinging-Bucket Rotor	Beckman Coulter
TProfessional BASIC 96 Gradient	Biometra
UP50H	Hielscher
Wägeschale aus PS	A.Hartenstein
Wasserbad 18L 462-0558	VWR
Zellkulturschale (147,8 cm ²)	TPP
Zellkulturschale (60,1 cm ²)	TPP
Zellkulturschale Cellstar (147,8 cm ²)	Greiner bio-one
Zellkulturschale Cellstar (22,1 cm ²)	Greiner bio-one
Zellkulturschale Cellstar (60,1 cm ²)	Greiner bio-one
Zellspatel	TPP

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien

Zur Kultivierung wurden alle hier verwendeten Zelllinien bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei jede Zelllinie in dem zu ihr passenden Medium und Wachstumsbehältnis kultiviert wurde (vgl. Tabelle 13). Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zelllinien passagiert. Hierzu wurde zunächst das jeweilige Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 1-2 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einer 0,5 %igen Trypsin-EDTA-Lösung von den jeweiligen Wachstumsbehältnissen gelöst. Die Trypsinisierung wurde durch die Hinzugabe des Kulturmediums (0,5-10 ml) gestoppt, die Zellen in diesem aufgenommen und mittels Zentrifuge bei 800 g für 4 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Medium entfernt und das entstandene Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen je nach Zelldichte und Wachstumsrate in einem Verhältnis von 1:5, 1:10, oder 1:20 verdünnt, oder für Versuche ausgezählt und je nach Versuch mit 0,8 – 1,5x10⁴ pro cm² Kulturfläche ausgesät.

Zum Auszählen der Zellen wurden 50 µl der nach der Zentrifugation und Resuspension erhaltenen Zellsuspension entnommen und mit 50 µl Trypanblau versehen, um mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Lebendzellzahl zu ermitteln. Hierzu wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Lebendzahl/ml} = \frac{\Sigma(\text{aller gezählten Zellen}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4(\text{Zellen/ml})}{(\text{Anzahl der gezählten Großquadrate})}$$

Anschließend wurde eine der benötigten Zellzahl entsprechende Menge an Zellsuspension in der benötigten Menge Medium aufgenommen und auf die entsprechenden Kulturschalen verteilt.

Zur Kultivierung der Hep-G2-Zellen war es erforderlich, die genutzten Zellkulturschalen vor der Aussaat der Zellen mit einer 1:100 in PBS verdünnten PLO-Lösung zu beschichten. Für die Beschichtung wurden die Kulturschalen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 1:300 in PBS verdünnten PLO-Lösung bei 37 °C und 5 % CO₂ für eine Stunde inkubiert,

wobei darauf geachtet wurde, dass die Schalen gut bedeckt waren. Abschließend wurden die Kulturschalen zweimal mit PBS und einmal mit Kulturmedium gewaschen.

Tabelle 13: Kulturmedien der Zelllinien. Übersicht der für die Kultivierung der entsprechenden Zelllinien genutzten Kulturmedien und deren Kulturgefäße

Zelllinie	Basismedium	Zusätze	Kulturgefäß	Beschichtung
HEK-T	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 10 %[V/V] FCS, ➤ 1 %[V/V] ABAM-Lösung, ➤ 1 %[V/V] Natriumpyruvat-lösung 	Greiner Zellkulturschalen	Keine
HEKT-A	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 10 %[V/V] FCS, ➤ 1 %[V/V] ABAM-Lösung, ➤ 1 %[V/V] Natriumpyruvat-lösung 	Greiner Zellkulturschalen	Keine
HELA	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 10 %[V/V] FCS inaktiv, ➤ 1 %[V/V] ABAM-Lösung, ➤ 1 %[V/V] Natriumpyruvat-lösung 	Greiner Zellkulturschalen	Keine
Hep-G2	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 10 %[V/V] FCS inaktiv, ➤ 1 %[V/V] ABAM-Lösung 	TPP Zellkulturschalen	1:100 PLO
MCF-7	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 10 %[V/V] FCS aktiv, ➤ 1 %[V/V] Penicillin/Streptomycin-Lösung, ➤ 1 %[V/V] Natriumpyruvat-lösung 	Greiner Zellkulturschalen	Keine
SH-SY5Y	DMEM/F12	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 10 %[V/V] FCS, ➤ 1 %[V/V] Penicillin/Streptomycin-Lösung, ➤ 1 %[V/V] Natriumpyruvat-lösung 	TPP Zellkulturschalen	Keine

4.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Für die langfristige Lagerung und die spätere Wiederverwendung von Zelllinien wurden diese in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurden ca. 80 % konfluente Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen nach dem Waschen mit PBS mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C und 5 % CO₂ trypsinisiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in 10 ml Kryomedium (Kulturmedium mit 1 % [V/V] DMSO) resuspendiert und hiervon je 1 ml in ein Kryogefäß gefüllt. Diese Kryogefäße wurden anschließend in einem *Mr. Frosty*, einem mit Isopropanol gefülltem Kryogefäß, bei -80 °C über Nacht gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.1.3 Zellkultur für Immunocytochemie

Für die Analyse fluoreszenzgefärbter Zellen wurden diese in einer 24-Loch-Platte auf kreisrunden Deckgläsern in einer Dichte von 0,8-1,0x10⁴ Zellen ausgesät. Vor der Aussaat der Zellen wurden diese Deckgläser mit einer 1:300 in PBS verdünnten PLO-Lösung beschichtet, um den Zellen einen besseren Halt zu bieten und um Wachstum auf der Glasfläche zu erlauben. Für die Beschichtung wurden die Kammern der 24-Loch-Platte zunächst mit Deckgläsern bestückt und einmal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Darauf folgend wurden die nun bestückten Kammern mit 0,5 ml einer 1:300 in PBS verdünnten PLO-Lösung bei 37 °C und 5 % CO₂ für eine Stunde inkubiert und anschließend zweimal mit 0,5 ml PBS und einmal mit 0,5 ml Kulturmedium gewaschen. Die Aussaat der Zellen erfolgte im letzten Schritt.

4.1.4 Transiente Transfektion von Plasmiden und siRNA

Zur transienten Transfektion der am Vortag in einer Dichte von 10⁴ Zellen/cm² ausgesäten Zellen wurde eine chemische, auf Ca₃(PO₄)₂ basierende Methode genutzt. Zur Herstellung eines Transfektionsansatzes für eine 10 cm Kulturschale mit 56,7 cm² Kulturfläche wurden 420 µl ddH₂O mit 60µl einer 2 M Ca(Cl)₂-Lösung und 12 µg des zu transfizierenden Plasmids bzw. 60 µg der zu transfizierenden siRNA versehen und gemischt. Die entstandenen Transfektionslösungen sowie 480 µl einer 2xHBSS-Lösung wurden bei 60 °C für 15 Minuten in einem Brutschrank erhitzt, anschließend mit einander vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es war zu beachten, dass bei einer Transfektion mit siRNA, die

siRNA erst nach der 15-minütigen Erhitzung bei 60 °C zu dem Transfektionsansatz hinzugegeben wurde.

Für die transiente Transfektion von 6 cm und 15 cm Kulturschalen, sowie 24-Loch-Platten wurde diese wie folgt angepasst:

6 cm Schalen wurden anstatt mit dem vollen Transfektionsansatz nur mit 330 µl aus dem entsprechenden Ansatz versehen, während für 15 cm Kulturschalen ein 3-facher Ansatz des für eine 10 cm Schale gedachten Ansatzes mit 30 µg Plasmid genutzt wurde. Die Transfektion in der 24-Loch-Platte erfolgte mit 35 µl des für eine 10 cm Kulturschale gedachten Ansatzes.

4.1.5 Behandlung von Zellen mit Glukose- und Aminosäure-depletiertem Medium

Die Behandlung von Zellen mit glukose- und aminosäurearmen Medium erfolgte mit selbst hergestellten Kulturmedien. Im ersten Schritt wurde inaktives FCS mittels Dialyseschlauch (1 kD Pretreated RC Tubing, Spectra/Por 6,4 ml/cm) dialysiert. Hierzu wurde zunächst der Dialyseschlauch mittels Ringerlösung equilibriert, indem er mit Ringerlösung gefüllt, beidseitig verschlossen für eine Stunde vollkommen überdeckt mit Ringerlösung bei 4 °C in einem Messzylinder unter Rühren inkubiert wurde. Nach erfolgter Inkubation wurde die Ringerlösung im Messzylinder mit frischer ersetzt und die Ringerlösung im Dialyseschlauch mit inaktivem FCS ausgetauscht. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C und eine weitere Inkubation bei 4 °C für eine Stunde nachdem zwischen beiden Inkubationen erneut die Ringerlösung des Messzylinders erneuert wurde. Das nun dialysierte, inaktive FCS konnte anschließend zur Herstellung der Entzugsmedien (vgl. Tabelle 14) genutzt werden. Die Behandlung der Zellen wurde für zwei Stunden mit dem entsprechendem Entzugsmedium oder dem Kontrollmedium durchgeführt.

Tabelle 14: Entzugsmedien. Übersicht der Zusammensetzung der verschiedenen Entzugsmedien

Vollmedium	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 250 ml Glukoseringer ➤ 30 ml dialysiertes FCS ➤ 5 ml CD Lipid Concentrate ➤ 5 ml 50x MEM Amino Acids ➤ 2,5 ml 100x MEM NEAA ➤ 5 ml 100x Glutamin ➤ 2,5 ml 100x Vitaminmix ➤ 2,5 ml 100x PenStrep ➤ 2,5 ml Na-Pyruvat
Glukoseentzugsmedium	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 500 ml Glukosefreier Ringer ➤ 60 ml dialysiertes FCS ➤ 5 ml CD Lipid Concentrate ➤ 5 ml 50x MEM Amino Acids ➤ 2,5 ml 100x MEM NEAA ➤ 5 ml 100x Glutamin ➤ 2,5 ml 100x Vitaminmix ➤ 2,5 ml 100x PenStrep
Aminosäureentzugsmedium	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 250 ml Glukoseringer ➤ 30 ml dialysiertes FCS ➤ 2,5 ml 100x Glutamin ➤ 2,5 ml 100x Vitaminmix ➤ 2,5 ml 100x PenStrep ➤ 2,5 ml Na-Pyruvat

4.1.6 Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A1 und MG132

Zur Behandlung von Zellen mit Bafilomycin A1 und MG132 wurden Stocklösungen mit einer Konzentration von 5 mM (Bafilomycin A1) bzw. 10 mM (MG132) genutzt, welche mit Kulturmedium auf 1-2 μ M bzw. 10 μ M verdünnt wurden. Der Behandlungszeitraum betrug jeweils 4h für die Behandlung mit Bafilomycin A1 und 4-6h für die Behandlung mit MG132.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Aufbereitung von Proteinen für die SDS-PAGE

4.2.1.1 Aufbereitung von Proteinen aus Zellen

Zur Analyse der Proteinspiegel mittels Westernblots mussten diese zunächst aus Zellen oder Gewebe aufbereitet werden. Im Falle von Zellen wurde im ersten Schritt das Kulturmedium entfernt und mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen entweder in 1 ml PBS durch auf und ab pipettieren aufgenommen, bei 1000 g 5 Minuten lang abzentrifugiert und dann in Zelllysepuffer aufgenommen bzw. bei -80 °C weggefroren, oder der Zelllysepuffer wurde nach dem Waschen der Zellen direkt auf die Zellen gegeben. In diesen Fall wurde mittels Zellspatel das Lysat auf den Kulturplatten zusammengekratzt und im Anschluss in ein 1 ml oder 2 ml Reaktionsgefäß überführt. In beiden Fällen wurden die Zelllysate unter Zuhilfenahme eines Sonifikators zweimal 10 Sekunden sonifiziert und waren anschließend bereit für die Proteinbestimmung.

4.2.1.2 Fraktionierung von Zellen in SDS-lösliche und SDS-unlösliche Fraktionen

Um SDS-lösliche und -unlösliche Fraktionen zu erhalten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend in 1 ml PBS mittels Zellspatel geerntet und für 15 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen zur Lyse in 300 µl Ripapuffer mit 1 % Triton x-100 resuspendiert und mittels Vortexer homogenisiert. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten auf Eis, wobei alle 5 Minuten das Lysat erneut mittels Vortexer aufgemischt wurde. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden im ersten Schritt 20-30 µl Lysat abgenommen und in 20-30 µl Ripapuffer gegeben. Im nächsten Schritt wurde das restliche Lysat bei 17000 g und 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert, um die beiden Fraktionen zu erhalten. Im Anschluss wurden 200 µl des Überstandes für die weitere Verwendung abgenommen während der restliche Überstand, zur Vermeidung eines Proteinübertrags aus dem Pellet in den Überstand, verworfen wurde. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl Ripapuffer aufgenommen und mittels Vortexer aufgemischt. Im letzten Schritt wurde zu allen Proben eine SDS-Lösung hinzugegeben, sodass die Endkonzentration von SDS im Lysat ca. 2 % beträgt. Auch hier erfolgte nach Zugabe der SDS-Lösung eine Sonifizierung wie bereits weiter oben beschrieben.

4.2.1.3 Subzelluläre Fraktionierung von Zellen

Die Lokalisierung von Proteinen einer Zelle bzw. in welchem Zellkompartiment sie sich grob befinden kann biochemisch über eine subzelluläre Fraktionierung geklärt werden. Für die Fraktionierung musste zunächst der Fraktionierungspuffer hergestellt werden, indem 5 ml fertig angesetzter 2x Fraktionierungspuffer mit 10 µl 1M DTT-Lösung, sowie mit Phosphostop und Proteinaseinhibitorcocktail versetzt wurden. Anschließend wurde mit ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt.

Die Zellen einer 10 cm Kulturschale wurden mit je 500 µl Fraktionierungspuffer und Zellspatel geerntet und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Trennung von Nucleus und Cytoplasma über entstehende Scherkräfte wurde das Lysat mit Hilfe einer 1 ml Spritze 10-mal durch eine 25 Ga Nadel gedrückt, und anschließend für 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach erfolgter Inkubation wurde das Lysat bei 720 g und 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert, um den nukleären Niederschlag vom restlichen Zellmaterial – löslichen cytosolischen Komponenten, Membranen und Membranfragmenten, sowie Mitochondrien – zu trennen. Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt während die nukleäre Fraktion anschließend in 500 µl Fraktionierungspuffer gewaschen, mittels Pipette resuspendiert und über eine 1ml Spritze 10-mal durch eine 25 Ga Nadel gedrückt wurde. Das nukleäre Lysat wurde ein weiteres Mal bei 720 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur weiteren Verarbeitung wurde die nun aufgereinigte Fraktion in regulärem Lysepuffer (vgl. Zellysepuffer) resuspendiert und 2-mal 10 Sekunden lang sonifiziert.

Der nach der ersten Zentrifugation erhaltene Überstand, welcher cytosolische, Membran- und mitochondriale Komponenten enthält, wird bei 10000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert, um cytosolische und Membranfraktion, die im Überstand verbleiben, von der mitochondrialen Fraktion, die sich im Niederschlag befindet, zu trennen. Die mitochondriale Fraktion wird anschließend, wie die nukleäre Fraktion, gewaschen und ebenso wie die cytosolische Fraktion sonifiziert.

4.2.1.4 Immunopräzipitation von Proteinen mit Protein-A/G gekoppelten magnetischen Kügelchen

Zur Ermittlung der Interaktion zweier Proteine oder auch zur Aufreinigung und Aufkonzentration von Proteinen kann eine Immunopräzipitation durchgeführt werden. Zunächst müssen die Zellen von ihren 15 cm Kulturschalen geerntet werden, wobei zwei Methoden verwendet wurden:

Bei Verwendung der ersteren Methode, welche hauptsächlich für Immunopräzipitationen aus Hep-G2-Lysaten verwendet wurde, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 0,5 % Trypsin-EDTA-Lösung für 2 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ abtrypsinisiert. Die Trypsinisierung wurde anschließend mit Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension bei 800 g für 4 Minuten abzentrifugiert. Darauffolgend wurde der Überstand entfernt, der Zelniederschlag in 10 ml PBS resuspendiert, die dann erhaltene Zellsuspension erneut bei 800 g für 4 Minuten abzentrifugiert und ein weiteres Mal Zelniederschlag vom Überstand getrennt. Die gewaschenen Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt, ein weiteres Mal bei 1000 g für 5 Minuten abzentrifugiert und entweder sofort für die Immunopräzipitation genutzt oder für spätere Verwendung trocken bei -80 °C eingefroren.

Die zweite Methode, welche hauptsächlich für HEK293-T-Zellen genutzt wurde, bestand darin, die Zellen nach dem Waschen mit PBS über Auf- und Abpipettieren von 1 ml PBS mit Hilfe einer Pipette von der Zellkulturschale hinunter zu waschen und in ein Eppendorfgefäß zu überführen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei 1000 g für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und entweder direkt für die Immunopräzipitation genutzt oder trocken bei -80 °C eingefroren.

Für die Durchführung der Immunopräzipitation wurden die geernteten Zellen in 400 µl IP-Lysepuffer resuspendiert und mittels Vortexer aufgemischt. Es folgte eine Inkubation von 15 Minuten auf Eis und ein weiteres Aufmischen mittels Vortexer. Im nächsten Schritt wurden die Lysate bei 1000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert, das Zentrifugationssediment verworfen, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und ein weiteres Mal für 10 Minuten bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Proteingehalt des erhaltenen Überstandes wurde über eine BCA-Probe (vgl. Bestimmung des Proteingehalts) bestimmt. Für eine Immunopräzipitation mit Magnetic Beads wurden für jede Probe zweimal 25 µl der Beads enthaltenden Lösung in Low-Retention-Eppendorfgefäße gegeben und 3-mal mit IP-Lysepuffer unter Verwendung eines magnetischen Gestells gewaschen.

Zu den gewaschenen Magnetkügelchen wurde ein Volumen das 1 mg Protein aus dem Überstand entspricht gegeben und das restliche Volumen mit IP-Lysepuffer auf 1 ml aufgefüllt. Des Weiteren wurden 30 µl des Lysats zur späteren Analyse via SDS-PAGE bei -80 °C gelagert. Die Suspensionen aus Magnetkügelchen und Probe wurden für 1 h bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen mit Hilfe eines magnetischen Gestells von den Magnetkügelchen befreit, der Überstand in neue Low-Retention-Eppendorfgefäße gegeben und mit 1 µg des für die Präzipitation genutzten Antikörpers bzw. 1 µg des korrespondierenden IgGs versehen. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht auf einem Rotationsschüttler. Am darauffolgenden Tag wurden erneut 2x 25 µl der magnetischen Kügelchen enthaltenden Suspension mit 3-mal 1 ml IP-Lysepuffer gewaschen und anschließend in 25 µl Lysepuffer aufgenommen. Diese 25 µl Suspension wurden im Folgenden zu den mit Antikörper inkubierten Proben gegeben und für 1 h bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Überstände entfernt und die Magnetkügelchen 3-mal mit 1 ml IP-Waschpuffer gewaschen und in 20 µl 2x-SDS-Ladepuffer aufgenommen. Um die Proteine von den Beads zu lösen wurde wie folgt vorgegangen:

Wurde ein Kaninchen-Antikörper für die Immunopräzipitation genutzt, wurden die Proben bei RT für 10 Minuten auf einem Schüttler bei 1200 rpm geschüttelt und 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und für die SDS-PAGE bei 99 °C für 5 Minuten aufgeköcht.

Wurde ein muriner Antikörper für die Immunopräzipitation genutzt, entfiel das Schütteln. Die Proteine wurden mit den Kügelchen bei 99 °C für 5 Minuten gekocht und erst dann wurden die Lysate von den Beads getrennt.

4.2.1.5 Immunopräzipitation mit FLAG-markierten Sepharosekügelchen

Die Ernte sowie die Lyse der Zellen für eine Immunopräzipitation über FLAG-markierte Sepharosekügelchen entspricht der über magnetische Kügelchen. Allerdings wurden hier zur Lyse 500 µl des IP-Lysepuffers verwendet. Die entstandenen Lysate wurden bei 1000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und der Proteingehalt des Überstandes mittels BCA-Probe bestimmt.

Während der Bestimmung des Proteingehaltes wurden pro Ansatz 60 µl der Sepharosekugelsuspension 3-mal mit 1ml IP-Lysepuffer in „Low-retention Eppendorfgefäßen“ gewaschen, wobei die markierten Kügelchen zwischen den Waschsritten bei 1000 g und

4 °C für eine Minute abzentrifugiert wurden. Zu 25 µl gewaschenen Sepharosekügelchen wurden im Anschluss 500 µg Protein der Proben in einer Konzentration von 1 µg/µl gegeben und diese über Nacht bei 4°C auf einem Rotationschüttler inkubiert, wobei ca. 1 % der Proteinmenge der IP-Lysate als Kontrolle vor der Inkubation mit den Kügelchen abgenommen wurde. Am darauffolgenden Tag wurden die FLAG-markierten Kügelchen 5-mal mit IP-Waschpuffer gewaschen, wobei auch hier zwischen jeder Resuspension für 1 Minute bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert wurde. Anschließend wurden die Sepharosekügelchen vom Überstand befreit und mit 35 µl eines 2x-SDS-Ladepuffers versetzt. Diese Suspension wurde anschließend 5 Minuten bei 99 °C und 900 rpm auf einem Thermoschüttler gekocht und durch eine ein-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit von den Beads getrennt. Der verbleibende Überstand wurde für die SDS-PAGE im nächsten Schritt verwendet.

4.2.1.6 Isolation von Synaptosomen aus dem Gehirngewebe adulter Ratten

Für die Isolation von Synaptosomen und somit synaptosomalen Proteinen wurden trächtige Sprague-Dawley-Ratten nach erfolgter Narkotisierung durch Isofluran mit Hilfe einer Guillotine abgetötet und der Kopf vom Rumpf getrennt. Zur Isolation des Gehirns wurde im ersten Schritt die Kopfschwarte sagittal mit einem Skalpell eingeschnitten und vorsichtig auf die Seite gedrückt, um den Schädel freizulegen. Im zweiten Schritt erfolgte die Eröffnung des Schädels, indem mit Hilfe eines Seitenschneiders drei Schnitte in den Schädel eingesetzt wurden. Der Erste Schnitt verlief in der Sagitalebene von caudal nach rostral an der dorsalen Seite des Schädels. Schnitt zwei und drei wurden in der Transversalebene lateral am Schädel von caudal nach rostral durchgeführt. Die befreiten dorsalen Schädelfragmente wurden anschließend mit einer Pinzette entfernt und das Gehirn freigelegt. Die Extraktion des Gehirns aus dem Schädel erfolgte mit Hilfe eines Spatels, der dorsal am Gehirn entlang und an der vorderen Schädelwand vor das Gehirn geführt wurde, um es anschließend aus der geschaffenen Öffnung und somit aus dem Schädel zu lösen. Nach der Extraktion wurde das Gehirn in PBS gelegt und Cortex und Hippocampus vom restlichen Hirngewebe getrennt. Cortex und Hippocampus wurden zusammen gewogen, in dem 10-fachen Volumen Homogenisierungspuffer des gemessenen Gewichts aufgenommen und unter Verwendung eines Gewebhomogenisators nach Potter-Elvehjem bei 500 rpm durch 6-10-maliges auf und ab bewegen homogenisiert. Für die Isolation der Synaptosomen wurde das Hirnhomogenat wie in Abbildung 16 schematisch dargestellt über mehrere Zentrifugationsschritte aufgearbeitet und die entstehenden Lysate über eine Saccharosedichtegradienten-ultrazentrifugation in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Die zu isolierenden Synaptosomen

befanden sich dabei in der Interphase zwischen den beiden unterschiedlich konzentrierten Saccharoselösungen.

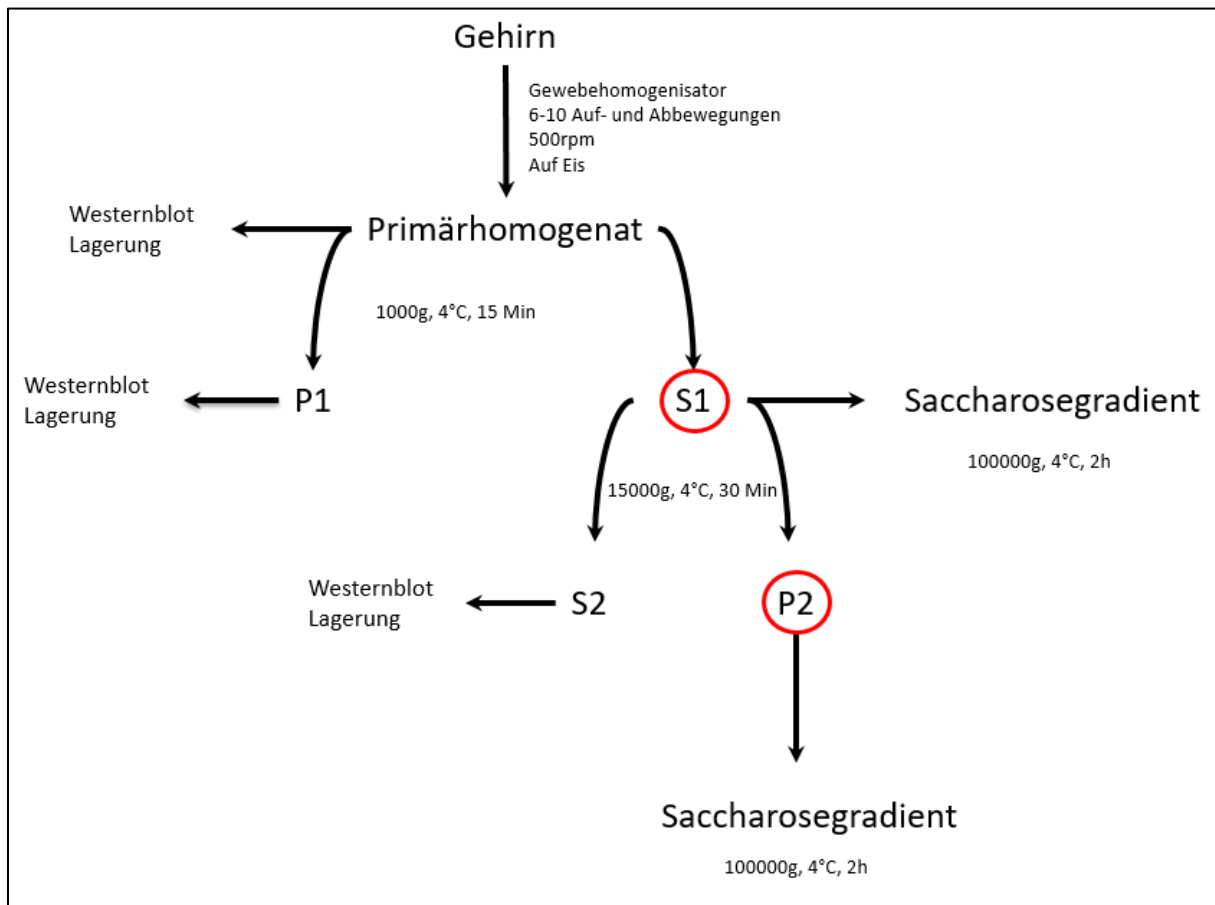


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Isolation von Synaptosomen aus dem Gehirn adulter Ratten. Die Isolierten Cortices und Hippocampi wurden zunächst homogenisiert und das Primärhomogenat anschließend über mehrere Zentrifugationssschritte aufgereinigt. Die Fraktionen S1 und P2 wurden für die Isolation der Synaptosomen auf einen Saccharosegradienten aufgetragen und ultrazentrifugiert. S: Supernatant (Zentrifugationsüberstand), P: Pellet (Zentrifugationsniederschlag)

Zur Aufarbeitung der Homogenate wurde zunächst das aus dem Gehirn gewonnene Primärhomogenat für 15 Minuten bei 1000 g und 4 °C abzentrifugiert und in Überstand 1 (S1) und Zentrifugationsniederschlag 1 (P1) geteilt. P1 wurde anschließend in Homogenisierungspuffer mit 2 % SDS aufgenommen und bei -20 °C gelagert während der gewonnene S1 entweder direkt auf den Saccharosegradienten zur Ultrazentrifugation bei 100000 g und 4 °C für 2 h aufgetragen oder ein weiteres Mal bei 15000 g und 4 °C für 30 Minuten abzentrifugiert wurde. Der nach 30-minütiger Zentrifugation erhaltene Überstand 2 (S2) wurde mit 2 % SDS versetzt und bei -20 °C gelagert. Der erhaltene Zentrifugations-niederschlag (P2) wurde im Gegensatz zu P1 in Krebspuffer resuspendiert und im Anschluss zur Ultrazentrifugation auf einen Saccharosegradienten aufgetragen.

Für die Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation wurden eine 0,8 M und eine 1,2 M Saccharoselösung genutzt, wobei 800 μl der 0,8 molaren Lösung in einem dickwandigen Polycarbonatröhrchen vorsichtig über 500 μl der 1,2 molaren Saccharoselösung geschichtet wurden. Auf die 0,8 molare Saccharoselösung wurden anschließend 100 μl mit 200 μg Protein der genutzten Fraktion (S1 oder P2) aufgetragen und der dann fertige Zentrifugationsansatz in einem Ausschwingrotor bei 4 °C und 100000 g für 2 h abzentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurden schrittweise, folgendem Schema entsprechend (vgl. Abbildung 17), bestimmte Volumenfraktionen des Gradienten abgenommen, um die Interphase von den Saccharoseschichten zu trennen und für eine spätere Westernblotanalyse zu nutzen.

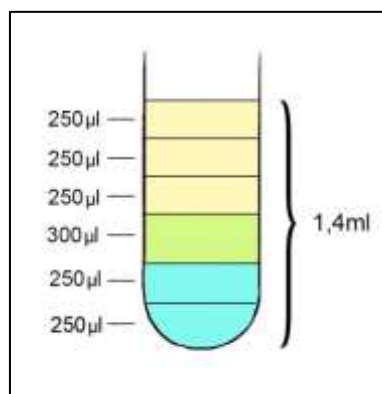


Abbildung 17: Schematische Darstellung der abgenommenen Fraktionen nach erfolgter Ultrazentrifugation.

Die gelblichen Fraktionen enthalten hauptsächlich die 0,8 molare Saccharoselösung und die in hellblau eingezeichneten Fraktionen hauptsächlich die 1,2 molare Saccharoselösung. Die in grün eingezeichnete Fraktion enthält die Synaptosomen tragende Interphase, sowie Teile der 0,8 M als auch der 1,2 M Saccharoselösung.

Soll auf eine erfolgreichen Synaptosomenisolation eine Immunopräzipitation erfolgen, musste die Synaptosomen beinhaltende Interphase zuvor von der Saccharose befreit werden. Hierzu wurden zunächst mehrere Interphasen des gleichen Versuchansatzes aus demselben Primärhomogenat in einem Eppendorfgefäß gesammelt und anschließend zu gleichen Volumina auf vier verschiedene Polycarbonatzentrifugationsröhrchen aufgeteilt und im Folgenden mit 1 ml Homogenisierungspuffer versetzt, worauf dabei zu achten war, dass 1,5 ml nicht überschritten wurden. Die mit HM-Puffer verdünnten Interphasen wurden bei 100000 g bei 4 °C für 2 h abzentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes im selben Volumen IP-Lysepuffer aufgenommen wie sie zuvor für das Waschen aufgeteilt wurden. Anschließend wurden die gewaschenen Interphasen gesammelt und konnten nach der Bestimmung des Proteingehalts für eine Immunopräzipitation genutzt werden.

4.2.2 Proteingehaltsbestimmung mit Hilfe der BCA-Probe

Zur Bestimmung des Proteingehalts verschiedener Proteinlösungen wurde die Bicinchoninsäure-Methode verwendet bei der Cu^{2+} -Kationen durch die Peptidbindungen von Proteinen zu Cu^+ -Kationen reduziert und wiederum von Bicinchoninsäure chelatisiert werden. Die Cu^+ -Bicinchoninsäure-Chelate bilden einen lilafarbenen Komplex dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann (Smith et al., 1985).

Zunächst musste eine BSA-Standardreihe zu Erstellung einer Kalibrierungskurve in den Lösungsmitteln der zu messenden Proteinlösungen hergestellt werden, die folgende Konzentrationen besaß:

1000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 62 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 31 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Für die photometrische Bestimmung bei 562 nm wurden 100 μl der, nach dem „Pierce BCA Protein Assay Kit“ angesetzten, Entwicklerlösung in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert und mit 2 μl des BSA-Standards und der Proben versetzt. Anschließend wurde die 96-Loch-Platte mit den zu messenden Proben für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert und die Absorption mit dem Multiskan SC bei 562 nm gemessen, wobei die Höhe der Absorption mit der Proteinmenge in der Probe korreliert. Die Messungen der Standards und der Proben erfolgte dabei in Duplets.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor der Proteinspiegelanalyse mussten die Proteine der Proteinlösungen über eine SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierbei wurde sich das Prinzip zu Nutze gemacht, dass in einem konstanten elektrischen Feld größere Proteine weniger schnell Proteine durch ein „molekulares Sieb“ wandern als Kleinere. Das SDS in dieser Art von Gelelektrophorese sorgt dabei für die Denaturierung bzw. Linearisierung der Proteine und für eine gleichmäßige, äußere, negative Ladung. Vor der Durchführung der SDS-PAGE mussten zunächst Laemmli-Polyacrylamid-Gele hergestellt werden. Die Zusammensetzung dieser Gele ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Laemmli-Gele. Übersicht der Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen.

Sammelgel						
Prozentigkeit	Acrylamid	Sammelgel-puffer (4x)	VE-Wasser	APS (10%)	TEMED	Gesamtvol.
1 %	1 ml	2,5 ml	6,5 ml	100 µl	10 µl	10 ml

Trenngel						
Prozentigkeit	Acrylamid	Trenngel-puffer (4x)	VE-Wasser	APS (10%)	TEMED	Gesamtvol.
7 %	1,75 ml	2,5 ml	5,75 ml	100 µl	10 µl	10 ml
10 %	2,5 ml	2,5 ml	5 ml	100 µl	10 µl	10 ml
12 %	3 ml	2,5 ml	4,5 ml	100 µl	10 µl	10 ml

Hierbei war zu beachten, dass zunächst die gewünschte Trenngellösung in eine 0,1 mm Gelgießkammer gefüllt und ausgehärtet wurde. Um zu gewährleisten, dass die entstehende Trennkante zwischen Sammel- und Trenngel vollkommen eben ist, wurde auf das Trenngel eine Schicht Aceton aufgetragen, die nach dem Aushärten des Geles von diesem heruntergewaschen wurde. Anschließend wurde das Sammelgel direkt auf das erhärtete Trenngel gegossen und mit einem 1 mm 10er Gelkamm versehen. Die Gele wurden 2-4 h bei RT auspolymerisieren gelassen und 24 h vor der Nutzung in einem feuchten Umschlag bei 4 °C gelagert. Die Proben für die SDS-PAGE wurden nach der Bestimmung des Proteingehalts über die BCA-Probe mit einem 5x SDS-Ladepuffer vermischt, wobei dessen Endkonzentration in einer Probenlösung mit 2-20 µg Protein verdünnt in den jeweiligen Lösungsmitteln 1x sein sollte. Ausnahmen bildeten die Immunopräzipitationen (vgl. 4.2.1.5) Im Anschluss werden die Proben für 10 Sekunden anzenrifugiert, bei 99 °C für 5 Minuten und 900 rpm auf einem Thermoschüttler gekocht, auf Eis für eine Minute abgekühlt und erneut 10 Sekunden anzenrifugiert. Die Gele wurden in eine Mini-PROTEAN Tetra Vertical Elektrophoresis Cell eingespannt, die Kammer mit ca. 1 L Laufpuffer gefüllt und die Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Größentrennung wurde zunächst eine Spannung von 80 V angelegt bis die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreichte und sich der SDS-PAGE-

Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder) anfang in seine unterschiedlichen Größenbanden aufzutrennen. Für die restlichen ca. 1,5 h wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Kurz bevor die Lauffront das Ende des Gels erreichte wurde die Elektrophorese abgebrochen, das Gel aus der Kammer entfernt und für eine Westernblotanalyse genutzt.

4.2.4 Westernblot und Westernblotanalyse

4.2.4.1 Proteintransfer auf verschiedene Membranen

Zur Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran wurden zwei verschiedene Methoden verwendet:

Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Für die zuverlässige Übertragung von Proteinen bis hin zu einer Größe von ca. 130 kDa wurden Membranen aus Nitrocellulose verwendet. Diese Membranen wurden in 1x Transferpuffer mit dem Gel sowie zwei Wattmanpapieren und zwei Schwämmen wie in Abbildung 18 dargestellt zusammengelegt und in die Kammer eines mit Transferpuffer befüllten Wet/Tank Blotting System Kammer eingespannt. Die anschließende Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 30 V und RT über Nacht.

Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran

Sollten Proteine größer als 130 kDa transferiert werden wurde auf PVDF-Membranen zurückgegriffen. Diese Membranen mussten vor der Nutzung mindestens 15 Sekunden in 100 %igem Methanol aktiviert werden und der hier genutzte Transferpuffer beinhaltete, im Gegensatz zu dem für die Nitrozellulosemembranen genutzten Puffer, kein Methanol. Der Aufbau der Transferapparatur gleicht der bereits oben beschriebenen und in Abbildung 18 dargestellten. Der Transfer der Proteine erfolgte allerdings in einem Kühlraum bei 4 °C und 30 V über Nacht.

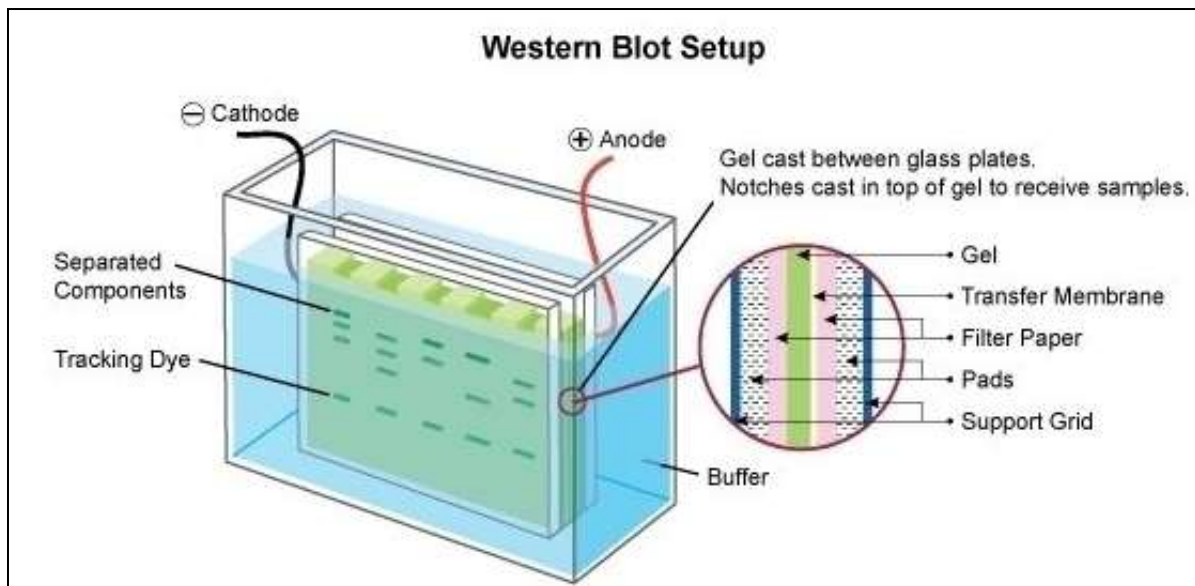


Abbildung 18: Darstellung einer Westernblottkammer mit eingespannter Haltevorrichtung und Schwamm, Blottpapier, Gel und Nitrocellulose Blotmembran „Sandwich“. Vergrößert sieht man die Schichtung der einzelnen Bestandteile und die Orientierung von Gel und Nitrocellulosemembran zu Anode und Kathode. (<http://www.antibodies-online.com/images/news/WesternBlotSetup.jpg>)

4.2.4.2 Entwickeln und Auswertung der Westernblots

Zur Auswertung der Proteinspiegel mussten diese zunächst auf den Blotmembranen sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde eine auf Antikörpern basierende Methode genutzt, bei der die Proteine über die Markierung mittels Primärantikörpers, der wiederum mit einem an eine Meerrettichperoxidase gekoppeltem Sekundärantikörper markiert wurde, in einem Chemilumineszenzentwickler sichtbar gemacht werden.

Blockierung der Membranen und Markierung der Proteine mit primären Antikörpern

Um unspezifische Antikörpersignale bei der späteren Entwicklung zu verhindern bzw. zu vermindern, wurden unspezifische Bindestellen auf den Membranen mit Hilfe einer Blockierlösung abgesättigt. Hierzu wurden die Membranen auf einem Schüttler (ROCKER 2D basic von IKA) bei 20-40 rpm für 1 h mit der Blockierlösung inkubiert und anschließend 3-mal 10 Minuten mit PBST gewaschen.

Die blockierten und gewaschenen Membranen wurden im Anschluss in einer 0,1 % Natriumazid haltigen PBST-Lösung mit unterschiedlichen Antikörperverdünnungen (1:1000, 1:500, 1:250) über Nacht bei 4 °C und 20 rpm auf einem Schüttler (DUOMAX 1030 von Heidolph) inkubiert.

Markierung der Westernblotmembranen mit sekundären Antikörpern und Entwicklung und Auswertung der Proteinbanden

Nach der erfolgten Primärantikörperinkubation wurden die Membranen zunächst 3-mal für 10 Minuten mit PBST gewaschen, um residuale Spuren des Primärantikörpers zu entfernen. Anschließend wurden die gewaschenen Membranen für 1,5 h bzw. 1 h für Sekundärantikörper aus dem Meerschweinchen bei RT mit den an eine Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden hierzu in einer Verdünnung von 1:5000 in PBST angesetzt. Ausnahme war der Sekundärantikörper bei einer Primärantikörperfärbung gegen MYH14. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:300 in PBST angesetzt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Membranen erneut 2-mal für 10 Minuten mit PBST gewaschen und konnten anschließend entwickelt werden.

Für die Entwicklung der Westernblots wurden die Membranen mit 2 ml einer zuvor hergestellten Entwicklerlösung benetzt und in einem Chemilumineszenzentwickler (Amersham Imager 600, Fusion-SL 3500.WL) bei semiautomatischer oder inkrementeller Belichtung entwickelt. Die Blots wurden anschließend 3-mal mit PBST für 10 Minuten gewaschen und konnten für neue Analysen mit neuen Primärantikörpern wiederbenutzt werden, solange es keine Kreuzreaktivitäten oder einen zu starken Hintergrund gab

Die Auswertung der entwickelten Westernblots erfolgte densitometrisch mit ImageJ Fiji.

4.2.5 Kolloidal-Comassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Die Kolloidal-Comassie-Färbung von Gelen wurde vor Allem zur Sichtbarmachung der Proteinbanden im Gel für eine spätere massenspektrometrische Analyse verwendet. Für die Färbung der Gele wurde zunächst die Färbelösung angesetzt indem eine Lösung aus 60 ml H₂O und 20 ml 100 % MeOH unter Rühren und tropfenweiser Zugabe mit 20 ml 5x konzentrierter Roti-Blue-Lösung versetzt wurde. Diese Lösung wurde anschließend

vollständig (100ml) auf ein Gel gegeben und über Nacht bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Comassielösung von den Gelen entfernt und diese bei RT mit ddH₂O gewaschen bis die bläuliche Hintergrundfärbung der Gele verschwunden war, wobei das Wasser mehrere Male ausgetauscht wurde.

4.2.6 Immunfärbung von Zellen für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Für eine fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen müssen diese mit fluorophor-gekoppelten Antikörpern gefärbt werden. Hierzu wurden entsprechend ausgesäte Zellen (vgl. 4.1.3) 1-mal mit 0,5 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml ROTI-Histofix 4 % für 15 Minuten bei RT fixiert. Nach Fixierung der Zellen wurden diese 3-mal mit 0,5 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml vorher auf -80 °C gekühltem, 100 %igem Methanol für 5 Minuten bei -20 °C permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut 3-mal mit PBS gewaschen und konnten gefärbt werden. Zur Färbung wurden die zelltragenden Deckgläser auf einen zuvor mit Parafilm abgedeckten Objektträger gelegt, wobei die Zellseite nach oben zeigt. Die Zellen wurden mit 100 µl PBS bedeckt, was wiederum mit einem Mikrofaser Tuch vorsichtig abgesaugt und mit 100 µl einer mit 0,1 % Natriumazid versetzten 3 %igen BSA-Lösung (vgl. 3.7.1) ausgetauscht. Die Blockierung der unspezifischen Antikörperbindestellen wurde für 5 Minuten bei 4 °C durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen, mit 100 µl einer 1:100 verdünnten Antikörperlösung (vgl. Tabelle 3) bedeckt und über Nacht in einem verschließbaren, befeuchteten Behälter bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Primärantikörperinkubation wurden die Zellen wiederholt mit 100 µl PBS gewaschen, mit 100 µl einer 1:200 verdünnten, fluorophoregekoppelten Sekundärantikörperlösung bedeckt und für 2 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss wurde erneut 3-mal mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend unter Lichtausschluss mit 100 µl einer 1:1000 in PBS verdünnten DAPI-Lösung bei RT behandelt, die nach 15-minütiger Dauer durch 3-maliges waschen mit 100 µl PBS entfernt wurde. Für das Eindecken der Zellen wurde der Parafilm mit den Deckgläsern vorsichtig von den Objektträgern entfernt und je ein Tropfen Eindeckmedium pro Deckglas auf einen Objektträger gegeben. Die Deckgläser wurden darauffolgend vorsichtig an einem Mikrofaser Tuch abgetupft und mit der zelltragenden Seite auf das Eindeckmedium gelegt, wobei darauf zu achten war, dass sich im Eindeckmedium keine Luftblasen bilden. Das überschüssige Eindeckmedium wurde vorsichtig mit einem Mikrofaser Tuch entfernt und die Deckgläser auf dem Eindeckmedium mit ROTI-Seal versiegelt. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der fertiggestellten Präparate wurden mit Hilfe eines LSM (TCS SP5 Confocal microscope) durchgeführt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Zur Isolation von RNA aus Gewebeproben wurde das TRI-Reagent-Protokoll von Sigma-Aldrich genutzt. Hierfür wurden zunächst wie in (Isolation von Synaptosomen aus dem Gehirngewebe adulter Ratten) beschrieben die Gehirne trächtiger, adulter Ratten isoliert. Diese wurden für die weitere Verarbeitung weiter in Cerebellum, Hippocampus, Cortex und restlichem Hirngewebe unterteilt und anschließend für die RNA-Isolation genutzt. Alternativ konnten zuvor präparierte und bei -80 °C gelagerte Hirngewebestücke für die Isolation genutzt werden. Cerebellum, Hippocampus, Cortex und restliches Gewebe wurden in einem 15 ml Falcon gewogen, in 1 ml TRI-Reagenz pro 100 mg Gewebe aufgenommen und mit einem Gewebehomogenisator nach Potter-Elvehjem bei 1300 rpm homogenisiert. Um die vollständige Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu gewährleisten wurden die Proben für 5 Minuten bei RT stehen gelassen. Im Anschluss wurden sie mit 0,2 ml Chloroform pro Milliliter genutztem TRI-Reagenz versehen, für 15 Sekunden stark geschüttelt und für weitere 15 Minuten bei RT stehen gelassen. Zur Phasentrennung in organische-, inter- und wässrige Phase wurden die Proben bei 10000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Die entstandenen Phasen enthielten entsprechen Proteine (organische Phase), DNA (Interphase) und RNA (wässrige Phase).

Für die anschließende RNA-Isolation wurde die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und mit 0,5 ml 2-Propanol pro eingesetztem Milliliter TRI-Reagenz vermischt. Diese Lösung wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert und bei 12000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene RNA-Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol pro 1 ml TRI-Reagenz aufgenommen. Die Proben wurden danach mittels Vortexer aufgemischt und nochmals bei 7500 g und 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend bei RT für 5-10 Minuten luftgetrocknet und in 300 µl 60 °C warmem DEPC-H₂O gelöst. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit DEPC-H₂O genulltem NanoDrop 1000.

4.3.2 cDNA-Synthese

Die Generierung von cDNA aus zuvor isolierter RNA bzw. mRNA erfolgte mit dem Omniscript-RT-Kit (Quiagen). Hierzu wurden zunächst RNA-Proben mit DEPC-H₂O auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt, bei 65 °C für 5 Minuten auf in einem Thermocycler erhitzt und anschließend auf Eis für 1 Minute abgekühlt. 10 µl dieser RNA-Verdünnung wurden im weiteren Vorgehen für die reverse Transkription zu 10 µl eines 5-fach Reaktionsansatzes (10 µl 10x RT Puffer [Quiagen], 10 µl dNTP-Mix [5 mM, Quiagen], 10 µl oligo(dT)15-Primer [10 µM, Promega], 5 µl RNAsin [Promega], 5 µl reverse Transkriptase [Quiagen], 10 µl DEPC-H₂O) gegeben und in einem Thermocycler bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Zur Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen wurde eine Mock-reverse Transkription durchgeführt, bei der die reverse Transkriptase im Reaktionsansatz durch DEPC-H₂O ersetzt wurde. Die hergestellte cDNA konnte, wenn sie nicht direkt im Anschluss für weitere Analysen genutzt wurde, bei -20 °C weggefroren werden.

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Mengenamplifikation der in der reversen Transkription hergestellten cDNA erfolgte mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion. Zunächst wurde hierzu ein 10-fach Reaktionsansatz aus 25 µl 10x PCR-Puffer [Invitrogen], 7,5 µl MgCl₂ [50 mM, Invitrogen], 5µl dNTPs [10 mM, PeqLab], 10 µl 1:10 verdünnter vorwärts und rückwärts Primer [100 pmo/µl] (vgl. Tabelle 6), 2 µl Taq-DNA-Polymerase [Invitrogen] und 190,5 µl ddH₂O hergestellt. Von diesem wurden 24 µl zu 2 µl cDNA aus der reversen Transkription gegeben bzw. für die Kontrolle zu 2µl ddH₂O und die PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Alternativ wurde für den PCR-Ansatz das Phusion High-Fidelity PCR Kit von Thermo Fisher genutzt. Für die PCR wurden die Proben initial 4 Minuten lang bei 95 °C erhitzt und anschließend für 35 Zyklen amplifiziert. Bei jedem Zyklus wurde dabei die cDNA für 1 Minute bei 95 °C denaturiert, die Primer bei 60 °C für 30 Sekunden an Selbige nun einzelsträngige gebunden und die gebundenen Primer bei 72 °C für 1 Minute elongiert und die cDNA amplifiziert. Die Abschließende Elongation erfolgte im letzten Schritt bei 72 °C für 5 Minuten, wonach die Ansätze auf 4 °C heruntergekühlt wurden. Die Analyse der PCR-Produkte wurde über eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

4.3.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden, ähnlich wie bei der SDS-PAGE, Moleküle in einem konstanten elektrischen Feld über ein molekulares Sieb nach ihrer Größe aufgetrennt. Es entfällt der Zusatz von Ladungsgebern, da die DNA dank ihres Phosphatrückgrats über eine natürliche negative Ladung verfügt, die es ihr ermöglicht in einem elektrischen Feld in Richtung Anode zu wandern. Die dabei genutzten Gele wurden aus in TAE-Puffer gelöster Agarose hergestellt, wobei die Agarosekonzentration die Porengröße und damit den Auftrennungsbereich des Gels bestimmt. Hierfür wurden zunächst 1 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer gemischt und in einer Mikrowelle für 2 Minuten aufgeköcht und mit ein bis zwei Tropfen Ethidiumbromid versetzt. Die leicht abgekühlte Agaroselösung wurde anschließend in eine horizontale Gussvorrichtung gegossen und für 30 Minuten bei RT erhärten lassen. Für die Elektrophorese wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überdeckt und die zuvor mit 5x Gel-Ladepuffer versehenen Proben auf das Gel aufgeladen. Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde bei 50 V durchgeführt, bis die Lauffront die Mitte des Gels erreichte. Sichtbar gemacht wurden die DNA-Banden mit Hilfe von UV-Licht (366 nm), da Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert und unter UV-Belichtung aufleuchtet.

Die Aufnahme der Gele erfolgte mit Hilfe des „Gel iX20 Imagers“.

4.3.5 Transformation und Selektion kompetenter Bakterien

Für die Transformation kompetenter D5 α -Bakterien wurden 2 μ l des zu transformierenden Plasmids noch vor dem Auftauen auf die Bakterien gegeben. Aufgetaut wurden die Bakterien im Anschluss für 30 Minuten bei RT. Die aufgetaute Bakterienlösung erhielt im nächsten Schritt bei 42°C für 30 Sekunden einen Hitzeschock und wurde für kurze Zeit auf Eis gestellt. Im Folgenden wurden 300 μ l LB-Medium zu der behandelten Bakterienlösung gegeben, worauf die angesetzten Bakterienkulturen bei 37°C für 60 Minuten auf einem Schüttler inkubiert wurden. Ausplattiert wurden 300 μ l des Transformationsansatzes auf zuvor bei 37°C erwärmten Antibiotika haltigen Agaroseplatten. Das Antibiotikum der Agaroseplatten richtete sich dabei nach der auf dem transfizierten Plasmid enthaltenen Antibiotikumsresistenz. Für das Wachstum der Kulturen wurden die Platten über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurden je zwei Klone für jedes Plasmid von den gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und 3 ml Selektionsantibiotikum haltiges LB-Medium mit je

einem der entsprechenden Klone beimpft. Die angeimpften Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert und entweder wurden 2 ml der Bakterienkultur für eine Mini-Plasmidpräparation genutzt oder es wurden weitere 400 ml eines selektionsantibiotikumhaltigen LB-Mediums mit 1 ml für eine Midi-Plasmid-Präparation beimpft. Bei Zweitem wurde die beimpfte Kultur bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator über Nacht inkubiert und am Folgetag für die Midi-Plasmid-Präparation genutzt.

4.3.6 Plasmidpräparation

4.3.6.1 Mini-Plasmid-Präparation

Die Mini-Plasmid-Präparation wurde mit Hilfe des PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit durchgeführt. Zur Vorbereitung der Zellysate wurden zunächst 2 ml einer transformierten Bakterienkultur bei 6000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und der bakterielle Zentrifugationsniederschlag in 250 µl RNase A haltigem Resuspensionspuffer (R3) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer (L7) und vorsichtigem invertieren der Zellslösungen für 5 Minuten. Zu beachten war, dass die Zellen nicht mit einem Vortexer aufgemischt wurden. Die Lysate wurden im Anschluss für 5 Minuten bei RT inkubiert, wobei 5 Minuten nicht überschritten wurden, und im nächsten Schritt durch vorsichtiges Invertieren der Reaktionsgefäße mit 350 µl Präzipitationspuffer (N4) gemischt bis die Lösung homogenisiert war. Auch hier wurde kein Vortexer verwendet. Um die Lysate von Lysetrümmern zu reinigen wurden die Lösungen bei 12000 g und RT für 10 Minuten abzentrifugiert.

Die Überstände wurden nach erfolgter Zentrifugation für die Bindung der DNA an die Silikamembran der Zentrifugationsröhrchen auf eben jene gegeben und zusammen mit diesen in ein 2 ml Waschgefäß gestellt. Es folgten mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte. Zunächst wurden die Überstände mit den Silikaröhrchen bei 12000 g für 1 Minute abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Darauffolgend wurden 500 µl ethanolhaltiger Waschpuffer (W10) auf die Säulen gegeben, diese bei RT für eine Minute inkubiert und anschließend bei 12000 g für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ebenfalls verworfen und die Säulen erneut mit 700 µl ethanolhaltigem Waschpuffer (W9) durch einminütige Zentrifugation bei 12000 g gewaschen. Zur Entfernung residualen Waschpuffers wurden die Säulen wieder bei 12000 g für 1 Minute zentrifugiert und waren nach Entsorgung des Durchflusses für die Eluation der DNA bereit.

Für die Elution der DNA von der Silikamembran wurde die Säulchen in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und mit 75 µl bei 60 °C erhitztem TE-Puffer (TE) versehen. Die Säulen wurde bei RT für 1 Minute inkubiert und danach bei 12000 g für 2 Minuten abzentrifugiert. Die Elution wurde erneut mit dem Durchfluss wiederholt. Die gewonnene DNA konnte anschließend für eine Analyse mittels Agarosegelelektrophorese genutzt oder bei -20 °C eingefroren werden.

4.3.6.2 Midi-Plasmid-Präparation

Die Midi-Plasmid-Präparation wurde mit dem NucleoBond Xtra EF plasmid purification Kit durchgeführt. Hierzu wurden 400 ml einer zuvor in LB-Medium angesetzten Bakterienkultur bei 6000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und der bakterielle Zentrifugationsniederschlag in 8 ml RNase haltigem Resuspensionspuffer (RES-EF) resuspendiert. Für die Lyse der Zellen wurde die Suspension vorsichtig durch 5-minütiges Invertieren mit 8 ml Lysepuffer (Lys-EF) gemischt und die Mischung bei RT für 5 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden NucleoBond Xtra Säulen mit eingesetztem Filter mit 15 ml Equilibrationspuffer (EQU-EF) equilibriert während die Suspensionen mit 8 ml Neutralisationspuffer (NEU-EF) gemischt und bis zu Entfärbung der Proben invertiert wurden. Es folgte eine 5-minütige Inkubation der Suspensionen auf Eis. Für die Bindung der DNA an die Silikamembranen wurden die Lysate auf die mit einem Filter bestückten NucleoBond Xtra Säulen gegeben und über Gravitation durch die Säulen laufen gelassen. Die Filter dienten zur Zurückhaltung von Lysetrümmern und anderen Präzipitaten, um die Silikamembranen nicht zu verstopfen. Im Anschluss wurden die Säulen inklusive Filter mit 5 ml Filterwaschpuffer (Buffer FIL-EF) gewaschen indem der Puffer vorsichtig auf den trichterförmigen Rand der Filter gegeben wurde. Auch hier erfolgte der Durchfluss über den Zug der Schwerkraft. Nach beendetem Waschschrift wurden die Filter entfernt und die Silikasäule mit 35 ml Waschpuffer mittels Gravitationszug gewaschen (Buffer ENDO-EF). Es folgte ein erneuter Waschschrift mit 15 ml Waschpuffer (Buffer WASH-EF) und im Anschluss die Elution in 5 ml auf 50 °C vorgeheiztem Eluationspuffer (Buffer ELU-EF).

Zur Aufreinigung der Plasmide aus dem Eluat wurde die DNA mit Isopropanol gefällt. Hierzu wurden die Eluate mit 3,5 ml Isopropanol via Vortexer gemischt und bei 15000 g und 4 °C für 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zentrifugationsniederschlag in 2 ml Endotoxin freiem, 70 %igem Ethanol resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde die Suspension bei 15000 g und RT für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Zentrifugationsniederschlag bei RT für 10-15 Minuten getrocknet. Zum Abschluss der

Aufreinigung wurde die isolierte DNA in ddH₂O durch auf und ab pipettieren rekonstituiert und die Konzentration mittels NanoDrop 1000 bestimmt. Gelagert wurden die isolierten Plasmide bei -20 °C.

4.3.7 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Untersuchung auf das Vorhandensein bestimmter Proteine in Gelbanden wurden zunächst SDS-PAGE Gele angefertigt (vgl. 4.2.3). Aus einem Teil eines Gels wurden nach einer Kollodidalcomassie-Färbung die zu untersuchenden Gelbanden ausgeschnitten. Hierzu wurde der zweite Teil eines Gels per Westernblot auf eine Membran übertragen (vgl. Westernblot) und aus der entstehenden Membran, auf der sowohl ein vorgefärbter als auch ein nicht gefärbter Proteingrößenmarker aufgetragen wurde, eine Schablone hergestellt, die bei der Lokalisierung der richtigen Bandengröße im Comassie gefärbten Gel half. Für die Herstellung der Schablone wurde die Membran in Höhe des ungefärbten Markers zerschnitten und in diesem Experiment je eine Hälfte mit einem N-terminalen und einem C-terminalen BAG3-Antikörper entwickelt. Die entwickelten Hälften wurden im Anschluss für die Schablone über den ungefärbten Marker wieder zusammengefügt.

Die massenspektrometrische Analyse der Gelbanden erfolgte durch: das Labor von Petra Beli aus dem IMB in Mainz durchgeführt.

4.3.8 Sequenzierung

Anfallende Sequenzierungen wurden von Eurofins Genomics Germany GmbH durchgeführt.

4.4 Statistik

Die statistische Beurteilung der Signifikanz der Ergebnisse wurde mit IBM SPSS Statistics Version 23 durchgeführt. Hierzu wurden die Mittelwerte der Messungen der wiederholten Experimente über eine One-Way-Anova analysiert. Das Signifikanzniveau einer einfachen Signifikanz (*) gegenüber der Kontrolle lag bei einem p-Wert von ≥ 0.05 , das einer hohen Signifikanz (**) bei ≥ 0.01 und das einer höchsten Signifikanz (***) bei einem p-Wert von ≥ 0.001 . In allen Abbildungen wurde zusätzlich zu den dargestellten Mittelwerten die Standardabweichung als Fehlerbalken eingetragen.

Ergebnisse

5.1 Untersuchung des autophagischen Fluxes unter Glukose- und Aminosäureentzug

Der Prozess der Autophagie stellt ein Mittel bereit, Zellen auch unter Nährstoffmangel mit Energie und Stoffwechselbausteinen zu versorgen und spielt damit eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus. Besonders Neurone sind anfällig für Glukose- und Aminosäureentzug, denn sie besitzen einen hohen Nährstoffbedarf und verbrauchen dementsprechend einen Großteil der Energie innerhalb eines Organismus. Da es aufgrund von Krankheiten oder Verletzungen, wie bspw. im Falle eines Schlaganfalls, immer wieder zu einer Mangelversorgung kommen kann und Neurone hauptsächlich auf Glukose als Energielieferant angewiesen sind, sollte in einem zellulären Modell untersucht werden, ob neuronale Zellen in gleicher Weise wie andere somatische Zellen auf den Entzug von Glukose oder Aminosäuren mit einer Erhöhung der autophagischen Aktivität reagieren.

5.1.1 Aminosäureentzug führt in HeLa-Zellen zu einem erhöhten autophagischen Flux

Für die Bestimmung des autophagischen Fluxes unter Glukose- und Aminosäureentzug wurden nicht neuronale HeLa-Zellen zwei Stunden lang in einem der Entzugs- oder Kontrollmedien inkubiert und gleichzeitig entweder mit DMSO oder 2 μM Bafilomycin A1 behandelt. Die Behandlung mit Bafilomycin A1 hat durch die Blockierung der lysosomalen vATPase eine fehlende Ansäuerung der Autolysosomen zur Folge und blockiert damit die Degradation von Autophagosomen (Mauvezin and Neufeld, 2015). Dies führt zu einer Akkumulation LC3B-II-positiver Autophagosomen und ermöglicht durch die Bestimmung der LC3B-II-Spiegel unter DMSO- und Bafilomycinbehandlung die Evaluation des autophagischen Fluxes. Der autophagische Flux kann als Maß der autophagischen Aktivität betrachtet werden und ermöglicht damit Aussagen zur Induktion oder Hemmung der Autophagie. Die Auswertung des autophagischen Fluxes erfolgte über die densitometrische Bestimmung der im Westernblot dargestellten LC3B-II-Signale durch die Differenzbildung zwischen Bafilomycin- und DMSO-Behandlung mit zuvor durchgeführter Normierung auf Tubulin. Die Darstellung des autophagischen Fluxes erfolgte im relativen Vergleich zu einer Kontrollgruppe (vgl. (Klionsky et al., 2016)).

Wie erwartet konnte für jede untersuchte Mediumsbehandlung in HeLa-Zellen ein Anstieg der LC3B-II-Spiegel unter Bafilomycinbehandlung im Vergleich zu den jeweiligen DMSO-Behandlungen beobachtet werden. Auch der Anstieg der p62-Spiegel unter Bafilomycin A1 bestätigte die fehlende Degradation autophagosomaler Substrate (Abbildung 19 A). Der Vergleich des autophagischen Fluxes zwischen den mit verschiedenen Inkubationsmedien behandelten HeLa-Zellen zeigte nach densitometrischer und statistischer Analyse folgende Unterschiede. Der autophagische Flux unter Aminosäureentzug war mit $150,18 \% \pm 25 \%$ um ca. 50 % im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant erhöht. Der Unterschied im autophagischen Flux zwischen Glukoseentzug und Kontrolle betrug ca. 19 %. Damit zeigte sich zwar ein Trend für einen erhöhten autophagischen Flux unter Glukoseentzug mit einer Erhöhung auf $118,67 \% \pm 12 \%$, aber kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Für die mit Vollringer behandelte Gruppe ließ sich ein um ca. 5 % erniedrigter autophagischer Flux in Höhe von $94,62 \% \pm 5,84 \%$ im Vergleich zur Kontrolle ermitteln, wobei auch hier keine statistische Signifikanz zur Kontrolle entstand (vgl. Abbildung 19 B).

Zusammenfassend zeigte ausschließlich der Entzug von Aminosäuren einen Einfluss auf den autophagischen Flux von nicht neuronalen HeLa-Zellen, indem dieser den Flux bzw. damit die autophagische Aktivität erhöhte.

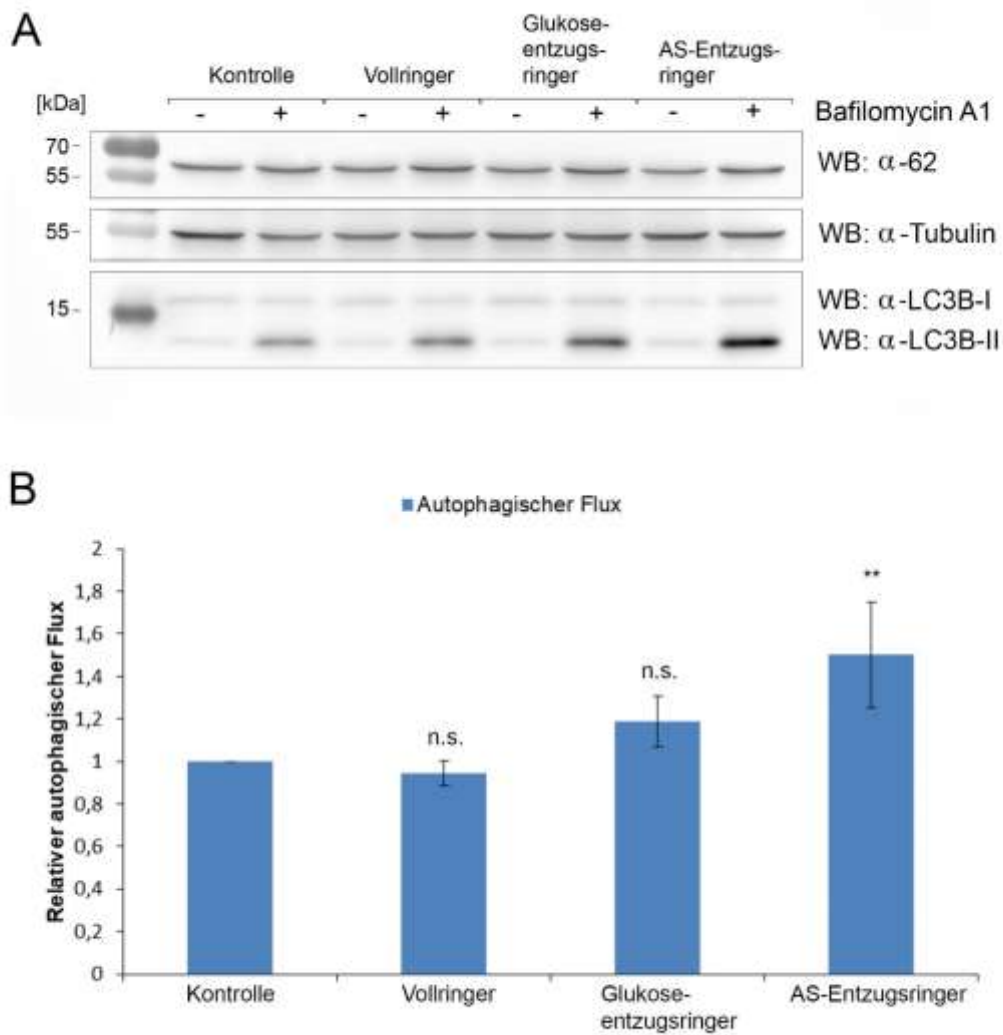


Abbildung 19: Der Entzug von Aminosäuren erhöht den autophagischen Flux in HeLa-Zellen. A) Nicht neuronale HeLa-Zellen wurden zwei Stunden entweder mit 2 μ M Bafilomycin A1 oder DMSO und gleichzeitig mit Kulturmedium, Vollringer, Glukoseentzugsringer oder Aminosäureentzugsringer (AS-Entzugsringer) behandelt. Die Zelllysate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionsspiegel der Proteine p62, LC3B und Tubulin mittels Immunoblot analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. B) Densitometrisch und statistische Auswertung des in A) gezeigten Immunoblots für den aus den LC3B-II-Spiegeln ermittelten autophagischen Flux. Die Signifikanz wurde über eine One-Way-Anova mit anschließendem Dunnett-T Post-Hoc-Test ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. n.s.: nicht signifikant; **: $p \leq 0,01$. $n = 4$

5.1.2 Weder Aminosäureentzug noch Glukoseentzug zeigen einen signifikanten Unterschied des autophagischen Flux von SH-SY5Y-Zellen.

Ähnlich wie die HeLa-Zellen wurden neuronale SH-SY5Y-Zellen im folgenden Ansatz für die Bestimmung des autophagischen Fluxes zwei Stunden lang in einem der Entzugs- oder Kontrollmedien inkubiert und gleichzeitig entweder mit DMSO oder 2 μ M Bafilomycin A1 behandelt. Die Auswertung des autophagischen Fluxes erfolgte ebenso über die densitometrische Bestimmung der im Westernblot dargestellten LC3B-II-Banden durch die Differenzbildung zwischen Bafilomycin- und DMSO-Behandlung mit zuvor durchgeführter Normierung auf Tubulin. Die Darstellung des autophagischen Fluxes erfolgte im relativen Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Für SH-SY5Y-Zellen zeigte sich unter Bafilomycinbehandlung ein mit HeLa-Zellen vergleichbarer Effekt für den Anstieg der LC3B-II-Spiegel unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen. Als autophagisches Rezeptorprotein wurde hier NBR-1 untersucht (vgl. Abbildung 20 A). Der Vergleich des autophagischen Fluxes zwischen den mit verschiedenen Inkubationsmedien behandelten SH-SY5Y-Zellen zeigte im Gegensatz zu entsprechend behandelten HeLa-Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der autophagischen Flux für Zellen unter Aminosäure- und Glukoseentzug lag im Vergleich zur Kontrolle bei 155,81 % bzw. 99,05 % mit je einer Standardabweichung von 74,36 % bzw. 55,6 %. Damit zeigte der Aminosäureentzug einen Trend in Richtung eines erhöhten autophagischen Fluxes, während der Glukoseentzug keine Auswirkungen andeutete. Der autophagische Flux unter Vollringerbehandlung war im Vergleich zur Kontrolle mit 114,9 % \pm 22,5 % erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant (vgl. Abbildung 20 B).

Im Gegensatz zu HeLa-Zellen, als Modell für somatische Zellen, verursacht weder der Entzug von Aminosäuren noch der Entzug von Glukose einen statistisch signifikanten Anstieg des autophagischen Fluxes in neuronale SH-SY5Y-Zellen.

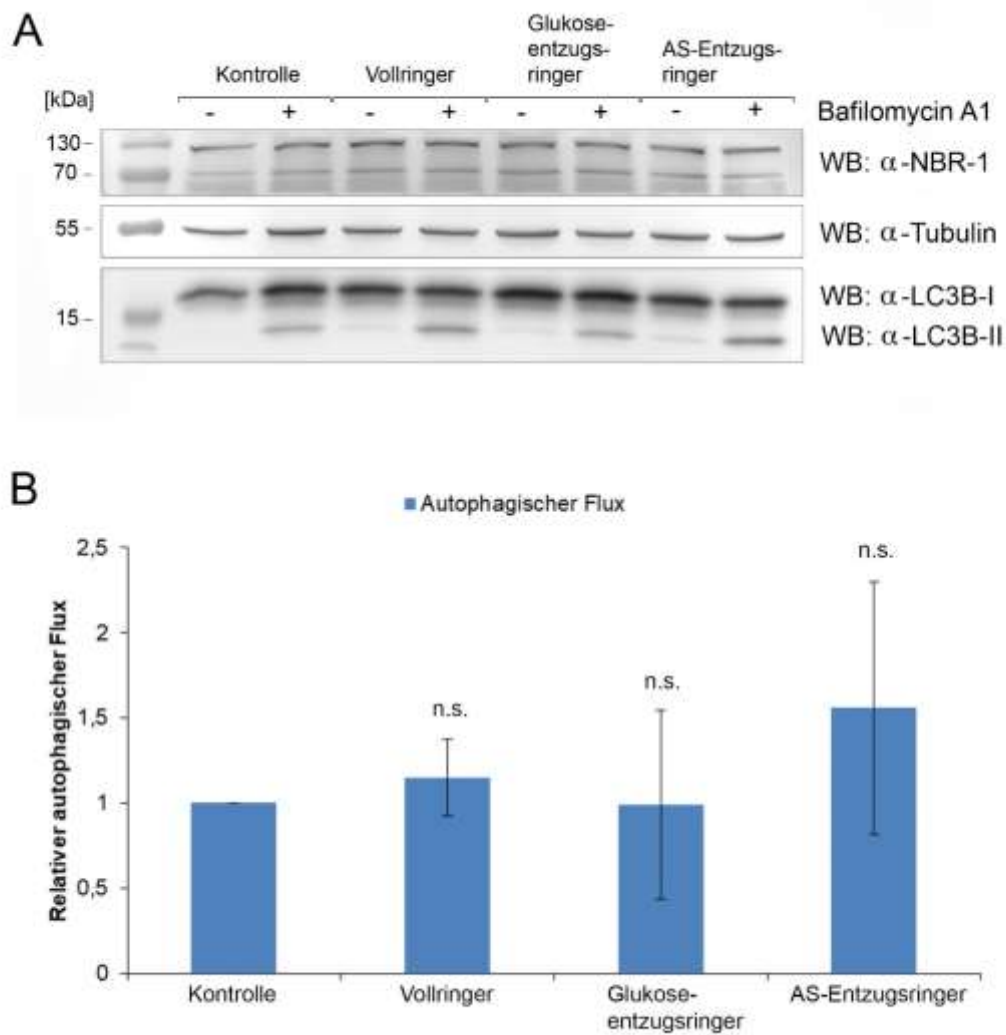


Abbildung 20: Aminosäure- und Glukoseentzug zeigen keinen Einfluss auf den autophagischen Flux in SH-SY5Y-Zellen. A) Neuronale SH-SY5Y-Zellen wurden zwei Stunden entweder mit 2 μ M Bafilomycin A1 oder DMSO und gleichzeitig mit Kulturmedium, Vollringer, Glukoseentzugsringer oder Aminosäureentzugsringer (AS-Entzugsringer) behandelt. Die Zelllysate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionsspiegel der Proteine p62, LC3B und Tubulin mittels Immunoblot analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. B) Densitometrische und statistische Auswertung des in A) gezeigten Immunoblots für den aus den LC3B-II-Spiegeln ermittelten autophagischen Flux. Die Signifikanz wurde über eine One-Way-Anova mit anschließendem Dunnett-T Post-Hoc-Test ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. n.s.: nicht signifikant. n = 4

5.2 Untersuchung des Co-Chaperons BAG3 in synaptosomalen Präparationen aus adultem Rattengehirn

Das HSP70 Co-Chaperone BAG3 ist ein wichtiger Knotenpunkt für autophagische Prozesse in der Zelle. Allerdings besitzt es neben seiner Rolle in der Autophagie noch weitere Funktionen im zellulären System. *Iorio et al.* konnten zeigen, dass BAG3 durch die Interaktion mit den SNARE-Proteinen Syntaxin-1 und SNAP25 wichtig für die Insulinsekretion im Pankreas ist. In diesem Abschnitt soll nun untersucht werden, ob BAG3 in ähnlicher Weise mit mit den beiden SNARE-Proteinen in neuronalen Zellen interagiert, indem die Interaktion zwischen BAG3 und SNAP25 bzw. Syntaxin-1 in synaptosomalen Präparationen aus Rattengehirn untersucht wird. Für diese Untersuchungen musste zunächst ein Isolationsprotokoll für Synaptosomen entwickelt werden. Die Ergebnisse sind weiter unten dargestellt.

5.2.1 Etablierung eines Isolationsprotokolls für Synaptosomen aus adultem Rattenhirngewebe

Bei Synaptosomen handelt es sich um intrazelluläre Kompartimente aus prä- und postsynaptischem Neuronen, die durch die Fusion der abgetrennten Nervenenden entstehen und über die Synapse verbunden sind (Hebb and Whittaker, 1958, Whittaker et al., 1964, Whittaker and Sheridan, 1965). Für die Isolation der Synaptosomen zwecks späterer Nutzung in Immunopräzipitationen wurden Cortices und Hippocampi der Ratten homogenisiert und über verschiedene Zentrifugationsschritte aufgereinigt (vgl. 4.2.1.6). Die Synaptosomen enthaltenden Fraktionen S1 und P1 wurden im Anschluss über eine Saccharose-dichtegradientenultrazentrifugation aufgetrennt. Zur Analyse der Synaptosomenisolation wurden anschließend festgelegte Volumina aus dem Gradienten entnommen und mittels Immunoblot analysiert. Die Synaptosomen sollten sich dabei in der Interphase zwischen den Saccharoseschichten gesammelt haben. Aufgetragen wurden jeweils 24 µl der jeweils abgehobenen Fraktionen des Saccharosegradienten 1-9 in Abbildung 21 bzw. 1-6 in Abbildung 22, (vgl. 4.2.1.6). Untersucht wurde die Verteilung synaptischer (PSD95), mitochondrialer (TOM20) und nicht synaptischer Marker (CNPase, GM130), wie auch von SNAP25, sowie BAG3 innerhalb der unterschiedlichen Schichten. Abbildung 21 zeigt dabei synaptosomale Präparationen der S1 und P2 Fraktionen der Homogenatsaufreinigung während Abbildung 22 eine weiterentwickelte Isolation der S1 Fraktion zeigt.

Wie die Ergebnisse zeigten, befand sich die höchste Konzentration an synaptischen und mitochondrialen Markern, sowie an SNAP25 und BAG3 in der Synaptosomen tragenden

Interphase zwischen beiden Saccharoselösungen, während die nicht synaptischen Marker wie GM130, einem Golgimarker, so gut wie nicht in dieser Phase vorkamen. Die Interphase beinhaltenden Fraktionen sind in den Abbildungen mit einem * gekennzeichnet. Zwar wurde CNPase, ein Myelin-Marker, auch in der Synaptosomen enthaltenden Interphase erkannt, allerdings war es in einer der früheren Fraktionen, die sich in der 0,8 M Saccharoselösung befand, stärker angereichert (vgl. Abbildung 21). Grund für das Vorhandensein von CNPase in der Interphasenfraktion waren Myelin-/Membranreste, die nicht vollständig von den Synaptosomen abgetrennt werden konnten, was laut Literatur eine häufige Verunreinigung von synaptosomalen Präparationen ist (Blitz and Fine, 1974).

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen daher eine erfolgreiche Etablierung eines Protokolls für die Isolation von Synaptosomen aus Hirngewebe.

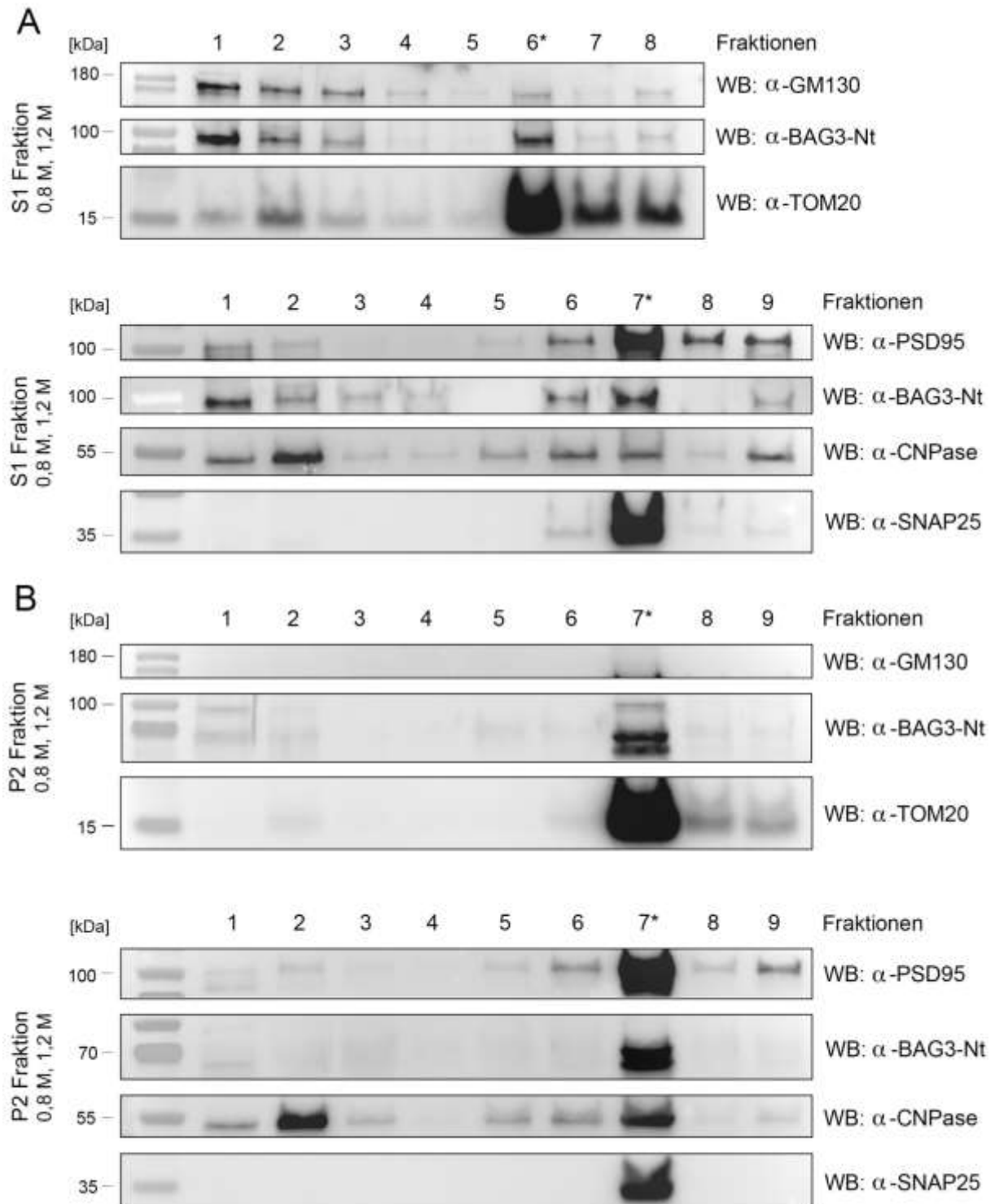


Abbildung 21: Proteingehaltsanalyse der abgenommenen Fraktionen der Saccharosegradienten-Ultrazentrifugation aus S1 und P2 einer Rattengirnhomogenatsaufreinigung zur Isolation von Synaptosomen. Homogenate aus Rattencortices und -hippocampi wurden in mehreren Zentrifugationschritten aufgereinigt und S1- und P2-Fraktion über eine Ultrazentrifugation in einem Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. A) Immunoblotanalyse der Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation der S1-Fraktion einer Aufreinigung von Rattencortex- und -hippocampus-homogenat. B) Immunoblotanalyse der Saccharose-

dichtegradientenultrazentrifugation der P2-Fraktion einer Aufreinigung von Rattencortex- und -hippocampus-homogenat. Untersucht wurden das synaptische Protein PSD95, das mitochondriale Protein TOM20, das Myelin assoziierte Protein CNPase, das Golgi-protein GM130, sowie das Co-Chaperon BAG3 und das SNARE-Protein SNAP25. Die mit einem * versehene Fraktion bezeichnet die synaptosomentragende Interphasefraktion während die Zahlen 1-9 die abgehobenen Fraktionen der Gradienten bezeichnen. BAG3-Nt = N-terminaler BAG3 Antikörper. BAG3-Ct = C-terminaler BAG3 Antikörper. n = 3

Für die Weiterentwicklung der erfolgreich etablierten Synaptosomenpräparation wurden die Fraktionen 1 und 2, 3 und 4, sowie 5 und 6 der Gradientenfraktionen des bereits zuvor erarbeiteten Protokolls zusammengelegt und es wurden Isolationen aus der S1-Fraktion der Homogenatsaufreinigung genutzt (vgl. Abbildung 16).

Auch hier zeigte sich, wie erwartet, ein dem vorherigen Protokoll ähnelndes Bild in der Analyse der Immunoblots. Synaptosomale und mitochondriale Marker, sowie SNAP25, BAG3 und das BAG3 assoziierte Protein HSC70 konnten angereichert in der synaptosomentragenden Interphasefraktion vorgefunden werden, während der Golgimarker GM130 und der Myelinmarker CNPase hauptsächlich in anderen Fraktionen zu finden waren (vgl. Abbildung 22). Die auch hier vorkommende Verunreinigung der Interphase mit CNPase d.h. Myelin- und Membranresten, wurde bereits weiter oben erläutert.

Für eine erfolgreiche Synaptosomenisolation ist folglich die Nutzung der S1-Fraktion in der Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation ausreichend.

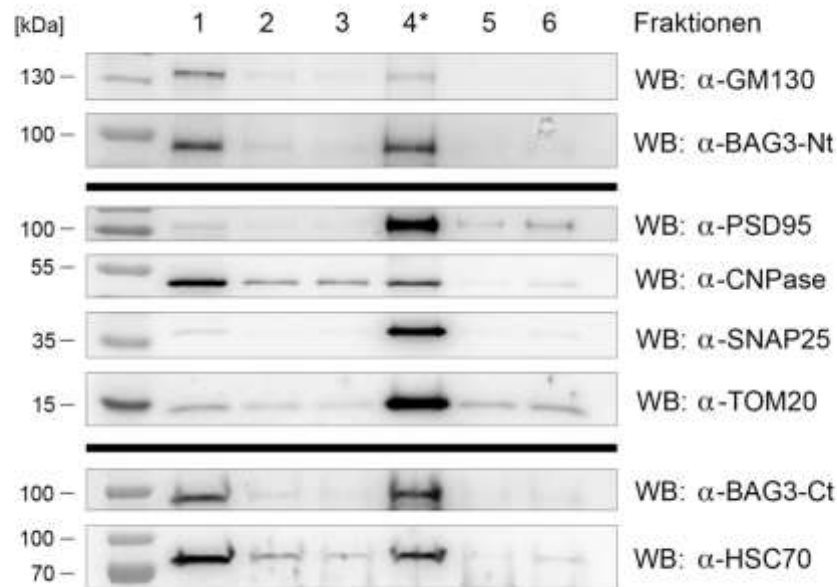


Abbildung 22: Proteingehaltsanalyse der abgenommenen Fraktionen der Saccharosegradienten-ultrazentrifugation aus der S1-Fraktion einer Rattengehirnhomogenatsaufreinigung zur Isolation von Synaptosomen. Homogenate aus Rattencortices und -hippocampi wurden in mehreren Zentrifugationschritten aufgereinigt und die S1-Fraktion über eine Ultrazentrifugation in einem Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Immunoblotanalyse der über eine SDS-PAGE aufgetrennten Fraktionen einer Saccharosedichtegradienten-ultrazentrifugation der S1-Fraktion einer Aufreinigung von Rattencortex- und -hippocampus-homogenat. Untersucht wurden das synaptische Protein PSD95, das mitochondriale Protein TOM20, das Myelin assoziierte Protein CNPase, das Golgiprotein GM130, sowie das Chaperon HSC70, dessen Co-Chaperon BAG3 und das SNARE-Protein SNAP25. Die mit einem * versehene Fraktion bezeichnet die synaptosomentragende Interphasefraktion während die Zahlen 1-6 die abgehobenen Fraktionen der Gradienten bezeichnen. BAG3-Nt = N-terminaler BAG3 Antikörper. BAG3-Ct = C-terminaler BAG3 Antikörper. n = 3

5.2.2 BAG3 interagiert mit synaptosomalem Syntaxin-1

Für die Untersuchung der Interaktion von BAG3 und den beiden SNARE-Proteinen Syntaxin-1 und SNAP25 in synaptosomalen Präparationen wurden Immunopräzipitationen mit zwei verschiedenen BAG3 Antikörpern durchgeführt. Die Nutzung eines zweiten, N-terminalen Antikörpers erfolgte auf der Grundlage einer Publikation von *Bruno et al.* (Bruno et al., 2008), die eine kleinere BAG3 Isoform mit einem N-terminalen Antikörper nachweisen konnten.

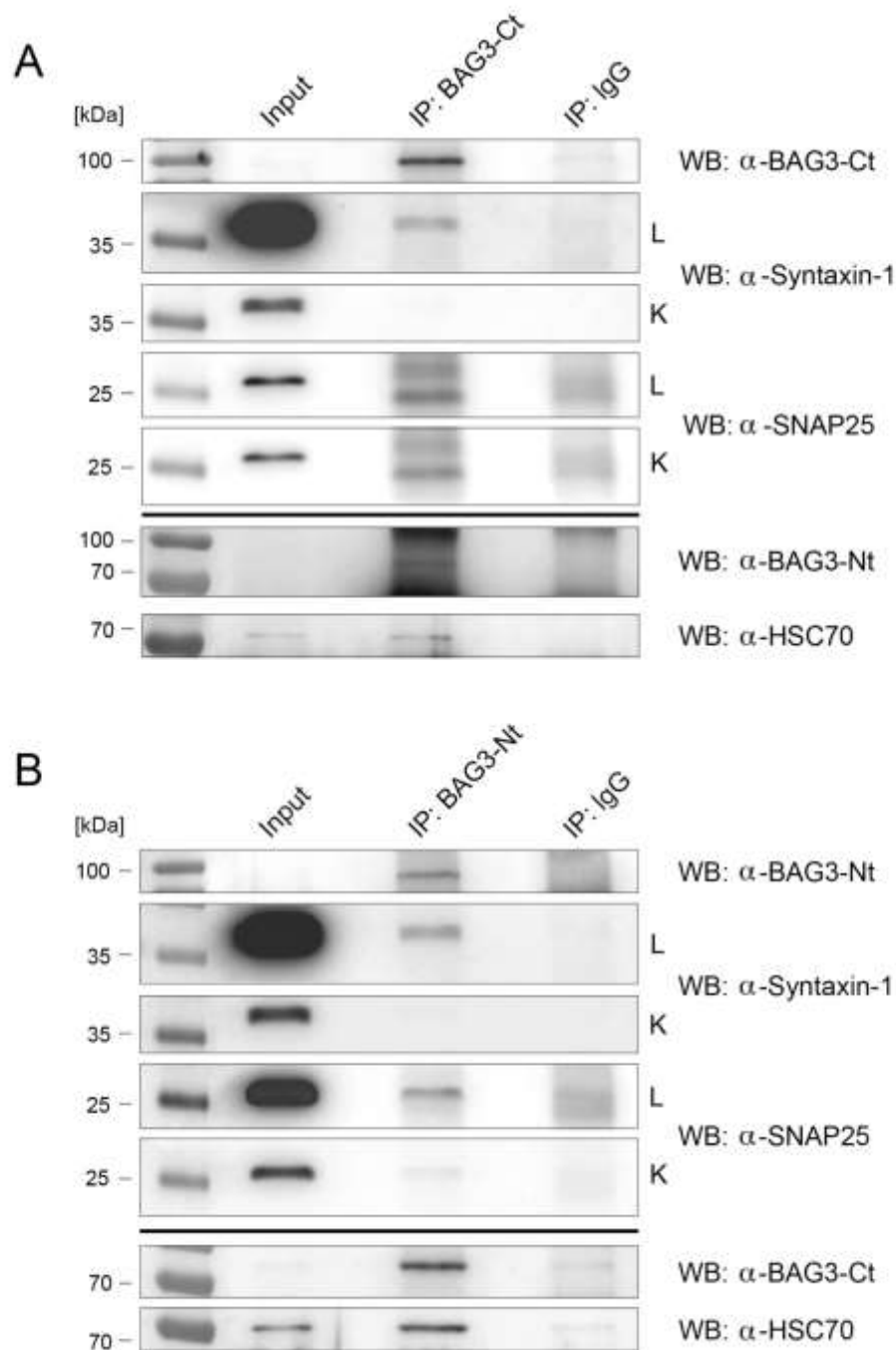


Abbildung 23: BAG3 interagiert mit Syntaxin-1 in Synaptosomen. Zuvor aufgereinigte Synaptosomen wurden in IP-Lysepuffer gewaschen, aufgenommen und in einer mit Protein A/G gekoppelten Magnetkugeln durchgeführten BAG3-Immunopräzipitation genutzt. Die Präzipitationen wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Detektiert wurden das Chaperon HSC70, als Positivkontrolle, das Co-Chaperon BAG3, und die SNARE-Proteine SNAP25 und Syntaxin-1. Cuniculäres IgG diente als IgG-Kontrolle A) Immunoblotanalyse der Co-Immunopräzipitation mit einem C-terminalen BAG3-Antikörper. B) Immunoblotanalyse der Co-Immunopräzipitation mit einem N-terminalen BAG3-Antikörper. $n = 3$; L: lange Belichtung, K: kurze Belichtung. BAG3-Nt = N-terminaler BAG3 Antikörper. BAG3-Ct = C-terminaler BAG3 Antikörper

Für die Durchführung der Immunopräzipitationen wurden die zuvor isolierten Synaptosomen in IP-Lysepuffer gewaschen und aufgenommen. Anschließend folgte die Präzipitation durch die beiden BAG3-Antikörper mittels magnetischer, Protein A/G-gekoppelter Kügelchen (vgl.4.2.1.4). Als Eingangsmaterialkontrolle wurde 1 µg Protein der jeweiligen Synaptosomen verwendet, um eventuelle Überbelichtungen zu vermeiden.

Die Ergebnisse der mittels C-terminalem BAG3-Antikörper durchgeführten Immunopräzipitationen zeigten eindeutige Signale für Syntaxin-1, BAG3-Ct, BAG3-Nt, und HSC70, wobei die HSC70- und BAG3-Nt-Banden relativ schwach waren. Die IgG-Kontrollen für alle genannten Proteine waren frei von spezifischen Signalen. SNAP25 hingegen zeigte in der Präzipitation sowohl bei kurzer als auch langer Belichtung zwei Signale in der Nähe der Höhe des SNAP25-Signals der Eingangskontrolle, die sich nicht eindeutig zuordnen ließ (vgl. Abbildung 23 A).

Ähnliche Beobachtungen ließen sich für die mit dem N-terminalen BAG3-Antikörper durchgeführte Immunopräzipitation tätigen (Abbildung 23 B). Auch hier waren distinkte Signale für Syntaxin-1, beide BAG3 Varianten und HSC70 in der Präzipitation zu erkennen, während die IgG-Kontrollen frei von Signal waren. Für HSC70 und beide Varianten des BAG3-Antikörpers sah man eine deutliche Anreicherung des Proteins in den Präzipitationen gegenüber dem Eingangsmaterial und im Vergleich zum C-terminalen BAG3-Antikörper waren die Signale für HSC70 und BAG3-Nt in der Präzipitation deutlich stärker ausgeprägt. In der Präzipitation des N-terminalen BAG3-Antikörpers waren außerdem deutliche Signale für SNAP25 unter langer Belichtung zu erkennen, die allerdings im Vergleich zum Eingangsmaterial erheblich schwächer waren. Auch hier zeigten die IgG-Kontrollen kein spezifisches Signal. Die Interaktion mit SNAP25 blieb allerdings fraglich, da die IgG-Kontrollen der hier nicht dargestellten Westernblots der Immunopräzipitationen von SNAP25 mit BAG3 nicht immer frei von Signal waren.

Die Ergebnisse der Immunopräzipitationen beider BAG3-Antikörper aus einer Synaptosomenisolation zeigen somit deutlich die erfolgreiche Co-Präzipitation von sowohl Syntaxin-1 und BAG3, als auch HSC70 und BAG3 in synaptosomalen Isolationen aus Rattenhirngewebe. Eine erfolgreiche und eindeutige Co-Präzipitation von SNAP25 und BAG3 konnte nur für den N-terminalen BAG3-Antikörper gefunden werden.

5.2.3 Mögliche kleinere, synaptosomale BAG3-Isoform

Bruno et al. veröffentlichen 2008 (Bruno et al., 2008) eine Publikation in der sie eine kleinere, 43 kDa große, Synaptosomen-assoziierte Form von BAG3 beschreiben, die sie mit einem N-terminalen BAG3 Antikörper detektieren konnten. Da allerdings wenig Aufschluss darüber gegeben wird wie diese verkürzte BAG3-Isoform zustande kommt, sollte in dieser Arbeit überprüft werden inwiefern eine kleinere BAG3-Isoform zustande kommen könnte.

5.2.3.1 Ein N-terminaler BAG3-Antikörper zeigt eine etwa 43 kDa große Bande in den Fraktionen einer Synaptosomenpräparation

Bruno et al. nutzten für die Detektion einen N-terminalen BAG3-Antikörper, der zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht kommerziell erhältlich war. Entsprechend musste ein N-terminaler BAG3-Antikörper gefunden werden, der in der Lage war, diese kleiner BAG3-Isoform im Immunoblot zu erkennen. Für den Vergleich verschiedener BAG3-Antikörper wurden neben zwei verschiedenen, unbehandelten SH-SY5Y-Lysaten auch Proben aus P1- und P2-Fraktion der Homogenatsaufreinigung (vgl. Abbildung 16) aus Rattenhippocampus und -cortex über eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die BAG3-Antikörper im Immunoblot an diesen Lysaten getestet. Bei den SH-SY5Y-Zellen handelt es sich um undifferenzierte Zellen neuronalen Ursprungs und sie sollten aufgrund fehlender synaptischer Verbindungen als Kontrolle dienen.

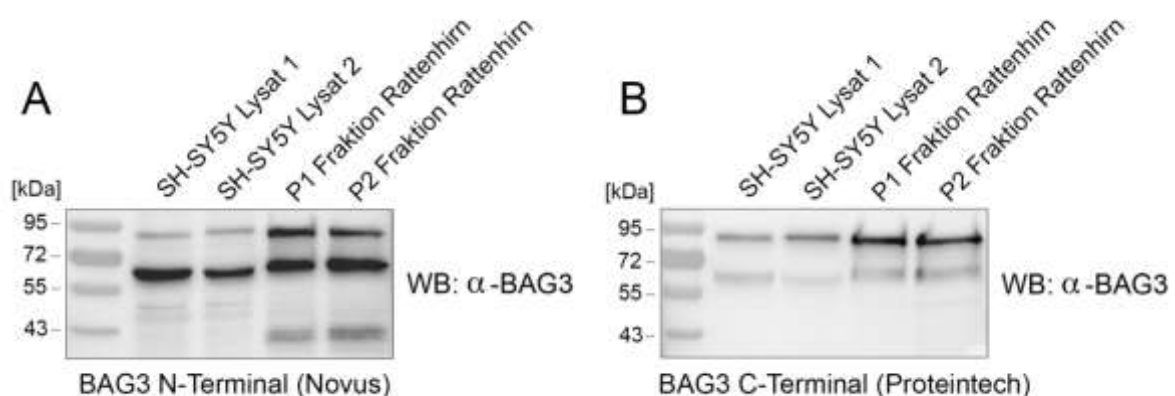


Abbildung 24: Ein N-terminaler BAG3-Antikörper detektiert eine mögliche kleinere Isoform von BAG3. SH-SY5Y-Zellen wurden lysiert und zusammen mit Proben aus P1- und P2-Fraktion der Hirnhomogenatsaufreinigung der Synaptosomenpräparation (vgl. Abbildung 16) über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Immunoblot. A) Immunoblot der untersuchten Proben nach der

Detektion mit einem N-terminalen BAG3-Antikörper von Novus Biologicals. B) Immunoblot der untersuchten Proben nach der Detektion mit einem C-terminalen BAG3-Antikörper von Proteintech. n = 1

Sowohl der C- als auch der N-terminaler BAG3-Antikörper zeigten für beide SH-SY5Y-Lysate keine Signale bei 43 kDa. Das erwartete Signal für reguläres bzw. vollständiges BAG3 zwischen 70 und 100 kDa wurde sowohl für beide SH-SY5Y-Lysate, als auch für beide Fraktionen der Homogenatsaufreinigung detektiert. Des Weiteren erkannten beide Antikörper in allen Proben ein Signal zwischen 55 und 70 kDa. Ein Signal, welches mit der von *Bruno et al.* beschriebene, kleinere, synaptosomenassoziierte Isoform von BAG3 übereinstimmen könnte, wurde ausschließlich vom N-terminalen BAG3-Antikörper in der P1- und P2-Fraktion der Homogenatsaufreinigung detektiert (vgl. Abbildung 24).

Die Analyse der Immunoblots zeigte deutlich, dass beide BAG3-Antikörper in der Lage waren die bereits bekannte Isoform von BAG3 und zusätzlich eine nicht weiter definierte Bande zu detektieren. Eine mögliche kleinere Isoform von BAG3 konnte nur vom N-terminalen BAG3-Antikörper und ausschließlich in Proben, die ausdifferenzierte, neuronale Zellen enthalten, detektiert werden

5.2.3.2 Eine Untersuchung der BAG3-mRNA aus Hirngewebe zeigt keine trunkierte BAG3 mRNA

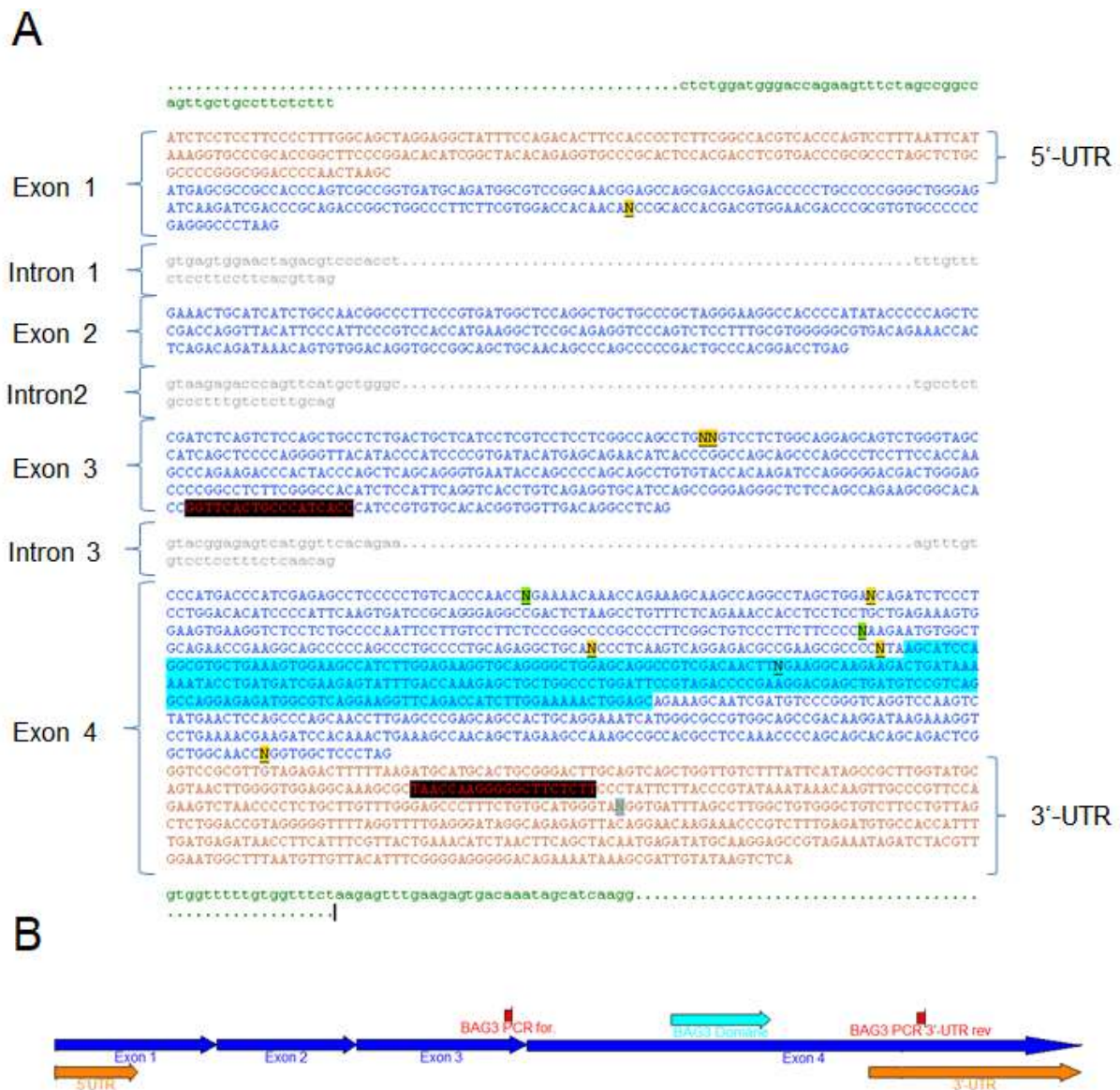


Abbildung 25: Vereinfachte Übersicht der BAG3-Genstruktur. Darstellung der Lage der PCR-Primer im BAG3-Gen und mRNA. A) Nukleotidsequenz des BAG3-Gens mit gekennzeichneten Exons (blau) und Introns (grau) sowie BAG-Domäne (cyan), UTRs (orange) und genutzten PCR-Primern (schwarz mit roter Schrift). B) Schematische Abbildung der BAG3-Exons (blau) und der Lage der PCR-Primern (rot), der BAG-Domäne (cyan) und der UTRs (orange). Die Sequenzen der hier genutzten Darstellung stammen von ensembl.org. Transkript: BAG3-201 ENTS00000369085.7; Exon1: ENSE00001448780; Exon2: ENSE00001002489; Exon3: ENSE00001002492; EXON4: ENSE00001448778

Zur Untersuchung, ob die von *Bruno et al.* beschriebene, aus Hirnmaterial isolierte, kleinere Form von BAG3 und die hier gefundenen 43 kDa großen Banden des N-terminalen BAG3 Antikörpers auf einer C-terminal trunkierten BAG3-mRNA basieren, wie es die Ergebnisse aus 5.2.3.1 vermuten lassen, wurde eine Amplikonanalyse von BAG3-cDNA mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde RNA aus verschiedenen Gehirnarealen der Ratte isoliert und anschließend über eine reverse Transkription in BAG3-cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde im nächsten Schritt mit Hilfe zweier Primer (vgl. 3.4.2) via PCR amplifiziert und mit Hilfe eines ethidiumbromidhaltigen Agarosegels aufgetrennt und analysiert. Die Lage der Primer ist in Abbildung 25 dargestellt. Der Vorwärtsprimer befand sich im Exon 3 des BAG3-Gens, während der Rückwärtsprimer im 3'-UTR lag. So konnte bei der Annahme gleicher 3'-UTRs für beide BAG3-Isoformen, gewährleistet werden, dass sowohl eine trunkierte als auch die normal große Isoform in einer Agarosegelelektrophorese sichtbar wird.

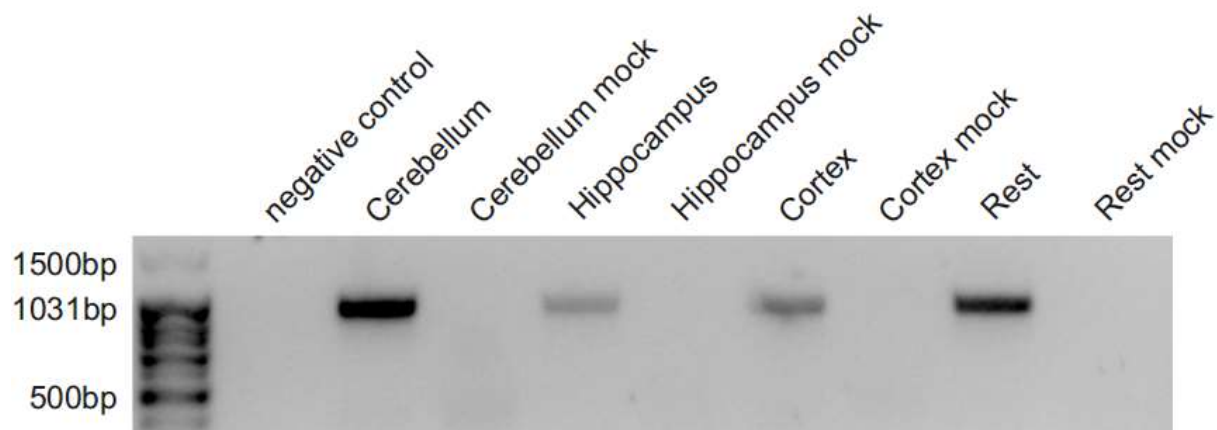


Abbildung 26: Keine kleinere BAG3 Isoform über die Herstellung von cDNA in verschiedenen Rattenhirnregionen nachweisbar. Aus Cerebellum, Hippocampus, Cortex und restlichen Hirnarealen der Ratte isolierte RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese im Anschluss mittels BAG3 spezifischer Primer über eine PCR amplifiziert. Die Amplikons wurden über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und über die Interkalation mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Für die negative Kontrolle wurde keine cDNA zum PCR-Ansatz gegeben, während die Mock-PCR-Proben in der reversen Transkription keine reverse Transkriptase enthielten. $n = 1$

Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese zeigten, dass in allen vier Geweben nur ein BAG3 spezifisches Amplikon detektiert werden kann. Verunreinigungen können aufgrund der negativ Kontrolle und der bandenlosen Mockkontrollen ausgeschlossen werden. Des Weiteren sind die observierten Banden für Hippocampus und Cortex schwächer als die restlichen beiden (vgl. Abbildung 26).

Eine Entstehung einer kleineren BAG3- Isoform über eine trunkierte BAG3-mRNA ist laut dieser Ergebnisse eher unwahrscheinlich.

5.2.3.3 Sequenzierung der BAG3 cDNA und Alignment der resultierenden Aminosäuresequenz zeigen keinen Hinweis auf RNA- Editing

Aufgrund der unauffälligen PCR-Ergebnisse wurden die entsprechenden Banden aus dem Agarosegel extrahiert und die gewonnene cDNA sequenziert. Grund hierfür ist die Möglichkeit der Entstehung einer kleineren Isoform durch APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) vermitteltes RNA-Editing, bei dem Cytosine über eine Deaminierung in Uracil umgewandelt werden und entsprechend Stoppcodons entstehen können.

Repräsentative Ausschnitte aus den Sequenzierungen und ein entsprechender Abgleich der resultierenden Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 27 dargestellt. Die Sequenzierung zeigte ausschließlich distinkte, einzelne Signale und deutete aufgrund fehlender Doppelsignale nicht auf eine Umwandlung von Cytosin in Uracil hin. Der Abgleich der resultierenden Aminosäuresequenzen der cDNAs aus den verschiedenen Hirnregionen mit der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Aminosäuresequenz der codierenden Sequenz von BAG3 zeigte keinen Austausch von Glutaminen mit einem Stoppcodon und auch sonst keine weiteren Austausche (vgl. Abbildung 27).

5.2.3.4 Massenspektrometrische Analysen zeigen keinen Hinweis auf eine kleinere BAG3-Isoform

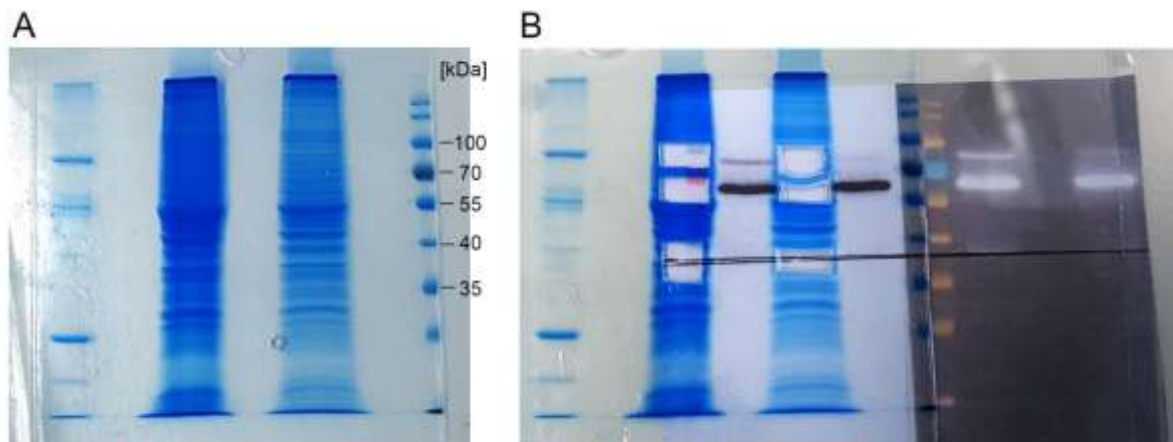


Abbildung 28: Exzision der vermeintlichen BAG3-Banden aus einem mit Comassie gefärbten Laemli-Gel. Interphasefraktionen einer Synaptosomenisolierung wurden über eine SDS-Page aufgetrennt, die Gele mit Comassie gefärbt und potentielle BAG3-haltige Banden für die massenspektrometrische Untersuchung ausgeschnitten. A) Mit 40 μg (links) und 20 μg (rechts) Protein einer Synaptosomenpräparation beladenes SDS-PAGE Gel gefärbt mit Comassie. Am linken Rand des Gels befindet sich zum einen ein ungefärbter Marker während am rechten Rand ein vorgefärbter Marker genutzt wurde. B) Unter zur Hilfenahme einer geblotteten und untergelegten Schablone ausgeschnittene, vermeintliche BAG3-Banden die zur massenspektrometrischen Analyse geschickt wurden. Die Schablone wurde aus einem zweiten Teil des in A) dargestellten Gels gefertigt (vgl. Methoden) und mit einem N-terminalen BAG3-Antikörper entwickelt. n = 3

Tabelle 16: BAG3 kann nur bei 74 kDa detektiert werden. Tabellarische Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der im Westernblot detektierten BAG3-Signale. Dargestellt sind die verschiedenen Versuchsdurchläufe mit der jeweils gefundenen Anzahl Peptide und der Signalintensität für die verschiedenen großen, möglichen BAG3-Isoformen.

n	Protein-name	Gefundene Peptide, 74 kDa	Gefundene Peptide, 64 kDa	Gefundene Peptide, 43 kDa	Signal-intensität 74 kDa	Signal-intensität 64 kDa	Signal-intensität 43 kDa
1	Bag3	1	0	0	476220	0	0
2	Bag3	4	1	0	20051000	915080	0
3	Bag3	2	0	0	2352400	0	0

Da weder die Größenanalyse der cDNA im Agarosegel, noch die Sequenzierung der cDNA Aufschluss über ein Zustandekommen der kleineren BAG3-Isoform geben konnten, wurden die verschiedenen, mit einem N-terminalen BAG3 Antikörper gefundenen Signale nach der Exzision aus dem Laemmli-Gel (vgl. Abbildung 28) einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden dabei in Kooperation mit der Proteomicsplattform Frankfurt und dem SFB1177 durchgeführt.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie zeigten deutlich, dass Peptidsignale für BAG3 mit je 1, 4 und 2 gefundenen Peptiden nur für die 74 kDa große Form gefunden werden konnten. Für die 64 kDa große Form konnte nur einmal ein Peptid für BAG3 und für die 43 kDa Isoform in keinem Fall ein einziges Peptid für BAG3 nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 16).

Entsprechend der massenspektrometrischen Untersuchungen enthält ausschließlich die zwischen 72 und 100 kDa detektierte BAG3-Signale nachweislich BAG3.

5.3 Untersuchung der Interaktion von BAG3 und NMII-C (MYH14)

Im Labor konnte in den vorläufigen Ergebnissen einer massen-spektrometrisch erschlossenen Interaktomstudie zeigen, dass MYH14/NMII-C ein potentieller Interaktor von BAG3 ist (Hiebel et al., noch nicht veröffentlicht). In den folgenden Versuchen sollen die Interaktion zwischen beiden Proteinen über endogene Immunopräzipitationen und immunocytochemische Färbungen bestätigt, sowie das Zusammenspiel beider Proteine untersucht werden.

5.3.1 Verifizierung der Interaktion zwischen BAG3 und NMII-C in endogenen Immunopräzipitationen aus Hep-G2-Lysaten

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen BAG3 und MYH14/NMII-C wurden Co-Immunopräzipitationen mit aus unbehandelten, wildtypischen Hep-G2-Zellen gewonnenen Lysaten durchgeführt. Für die endogene Co-Immunopräzipitation beider Proteine wurde zunächst ein cuniculärer, C-terminaler BAG3-Antikörper an Protein A/G-gekoppelte Magnetkügelchen gebunden und diese im Anschluss zur Präzipitation von BAG3 und seiner Interaktoren genutzt. Die Nutzung der Hep-G2-Zellen anstatt der sonst verwendeten HEK293-T-Zellen erfolgte aufgrund höherer MYH14-Basisexpressionsspiegel, die eine endogene Co-Präzipitation von MYH14/NMII-C erleichtern sollten.

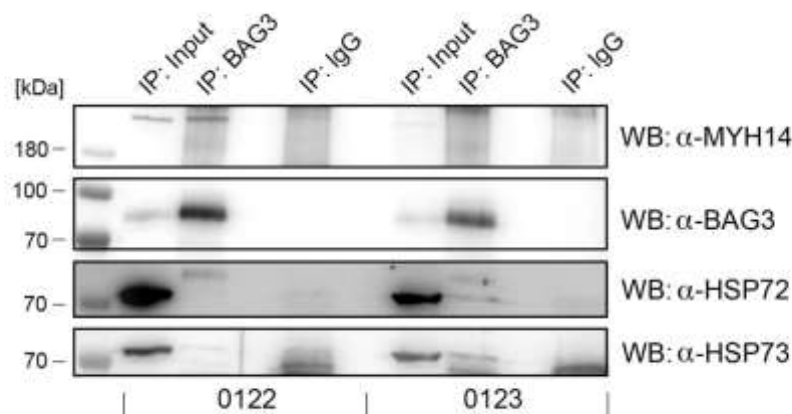


Abbildung 29: BAG3 interagiert mit MYH14 in endogenen Immunopräzipitationen aus Hep-G2-Lysaten. Unbehandelte und wildtypische Hep-G2-Zellen wurden lysiert und für eine Co-Immunopräzipitation von BAG3 und MYH14 mit Protein A/G gekoppelten Magnetkügelchen genutzt. Die Präzipitate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Für die IgG-Kontrollen wurde Kaninchen-IgG genutzt, da es sich um einen cuniculären BAG3-Antikörper handelt. Dargestellt ist der Immunoblot zweier Co-Präzipitationen. Detektiert wurden das Co-Chaperon BAG3, die konstitutive (HSP73) und die induzierte (HSP72) Isoform von HSP70 und das nicht muskuläre Myosin II-C (MYH14). n = 3

Die Ergebnisse der Immunoblotanalyse zeigten eine erfolgreiche Co-Präzipitation von BAG3 und MYH14 und entsprechend signalfreien Kontrollpräzipitationen mit cuniculärem IgG. Die erfolgreiche Präzipitation von BAG3 wurde hierbei sowohl durch die Detektion von HSP72 und HSP73, als auch durch die verstärkte Detektion von BAG3 in der BAG3-Antikörper vermittelten Präzipitation bestätigt. Die im Vergleich zum Eingangsmaterial deutlich höheren Proteinspiegel von MYH14 und BAG3 in der Präzipitation belegen ebenfalls die erfolgreiche Co-Präzipitation beider Proteine (vgl. Abbildung 29).

Die Co-Immunopräzipitationen deuten damit stark auf eine molekulare Interaktion zwischen BAG3 und MYH14 hin.

5.3.2 Immunocytochemische und proteinbiochemische Untersuchung der Lokalisation von BAG3 und MYH14

Für die Untersuchung der in der Immunopräzipitation gefundenen Interaktion von BAG3 und MYH14 wurden immunocytochemische Fluoreszenzfärbungen von MYH14 und BAG3 durchgeführt, um eine eventuelle Co-Lokalisation zu zeigen. Hierzu erfolgten zunächst Einzelfärbungen der beiden Proteine und proteinbiochemische Untersuchungen zur Ermittlung

der zellulären Lokalisation und anschließend eine Co-Färbungen beider Proteine zur Bestätigung einer eventuellen Co-Lokalisation. Für die Co-Lokalisationsuntersuchungen wurden sowohl endogenes MYH14 und BAG3 als auch überexprimiertes und markiertes MYH14/NMII-C und BAG3 detektiert.

5.3.2.1 BAG3 und MYH14 zeigen sowohl ein cytosolisches als auch eine starkes nukleäres Signal in verschiedenen Zelllinien

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von BAG3 und MYH14 wurden verschiedene, unbehandelte, wildtypische Zelllinien nach erfolgter Fixierung in 4 % Formaldehyd und Permeabilisation in 100 % Methanol über Nacht mit Antikörpern gegen BAG3 bzw. MYH14 behandelt. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden die verwendeten Zellen über zwei Stunden mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern gegen die Ursprungsorganismen beider Primärantikörper inkubiert. Die Auswertung der Färbungen erfolgte im Anschluss über die Bildaufnahme mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

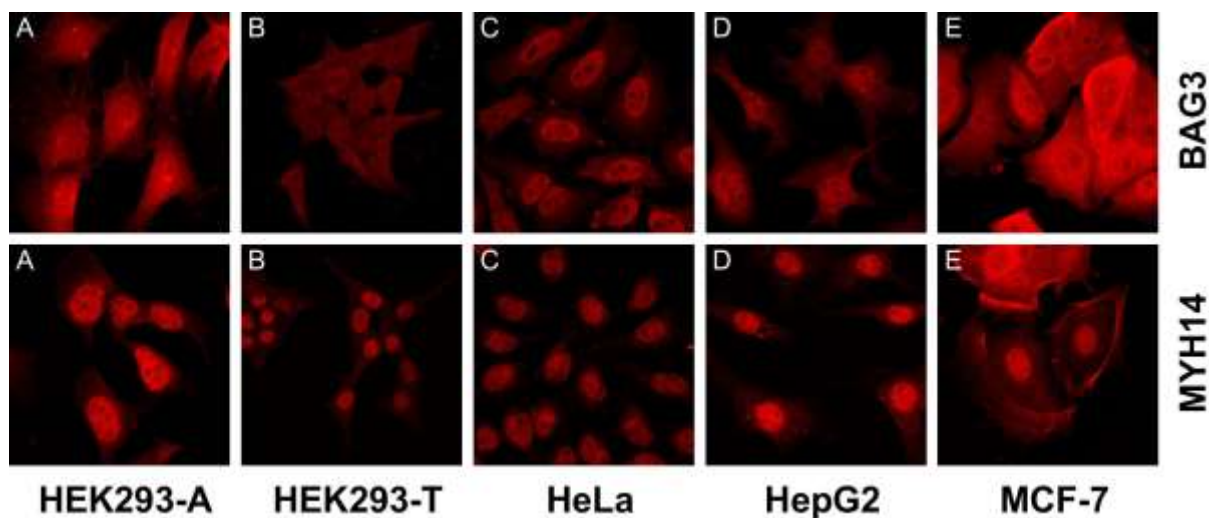


Abbildung 30: Endogene, immunocytochemische Fluoreszenzfärbungen von BAG3 und MYH14 in verschiedenen Zelllinien. Immunocytochemische Färbungen von HEK293-A-, HEK293-T-, HeLa-, Hep-G2- und MCF-7-Zellen (A-E). Die Zellen wurden nach der Fixierung mit Formaldehyd durch Methanol permeabilisiert und für eine Stunde mit einem BAG3- bzw. MYH14-Antikörper behandelt, der anschließend von einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt wurde. Die Aufnahmen wurden an einem *TCS-SP5 Confocal microscope* bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Die hier dargestellten Aufnahmen zeigen Maximalprojektionen von Z-Stapeln.

In den immunocytochemischen Färbungen der Zellen war deutlich zu erkennen, dass sowohl BAG3 als auch MYH14 eine cytosolische und eine nukleäre Lokalisation besitzen, wobei es zellspezifische Unterschiede in der Signalintensität der verschiedenen Zelllinien gab. So zeigten HeLa-Zellen ein sehr viel schwächeres MYH14-Signal im Cytoplasma als die anderen Zelllinien. Sieht man von den MCF-7-Zellen ab, zeigte MYH14 im Allgemeinen in allen gefärbten Zelllinien ein starkes nukleäres Signal und ein eher schwaches cytosolisches Signal. Auffällig in den HeLa-Zellen war das, im Vergleich zum cytosolischen Signal, starke nukleäre BAG3-Signal. Dies war auch in den Hep-G2-Zellen zu beobachten, während die anderen Zelllinien ein eher homogenes BAG3-Zellsignal zeigten (vgl. Abbildung 30).

BAG3 scheint in den hier untersuchten Zellen im Gegensatz zu MYH14 in der gesamten Zelle verbreitet zu sein, während MYH14 zunächst eine vor allem nukleäre Lokalisation zeigt.

5.3.2.2 Überexprimiertes FLAG-markiertes BAG3 und MYH14 zeigen keine Co-Lokalisation in verschiedenen Zelllinien

Da es sich bei den für die Immunofluoreszenzfärbungen genutzten BAG3 und MYH14 Antikörper um jeweils cuniculäre Primärantikörper handelte, war eine Co-Färbung unter der Nutzung beider Antikörper nicht möglich. Für die Lösung dieses Problem wurden verschiedene Zelllinien mit FLAG-markiertem BAG3 transfiziert. Die Transfektion der Zellen erfolgte zwei Tage nach dem Aussäen chemisch über die Nutzung von Kalziumphosphat. Im ersten Schritt wurden ausschließlich Färbungen mit einem Anti-FLAG-Antikörper durchgeführt, um eine übereinstimmende Lokalisation des FLAG-BAG3-Konstrukts mit der bereits zuvor endogen durchgeführten BAG3-Färbung zu verifizieren. Im zweiten Schritt erfolgten immunocytochemische Färbungen FLAG-BAG3 transfizierter Zellen mit MYH14- und Anti-FLAG-Antikörpern zur Untersuchung einer möglichen Co-Lokalisation.

Die Ergebnisse der FLAG-BAG3-Einzelfärbungen unterschieden sich deutlich von denen der endogenen BAG3-Färbungen. Mit Ausnahme der HeLa-Zellen zeigten alle gefärbten Zelllinien eine cytosolische Lokalisation der transfizierten Konstrukte mit entsprechender Aussparung des Nukleus. Die Lokalisation der FLAG-BAG3-Konstrukte in den HeLa-Zellen schien mit der sowohl cytosolischen als auch nukleären Lokalisation den Ergebnissen der endogenen Färbung zu entsprechen, wobei sich der Signalunterschied zwischen Nukleus und Cytosol der endogenen Färbung für die überexprimierten Konstrukte anzugleichen schien (vgl. Abbildung 31).

Entsprechend fand sich nach Transfektion der FLAG-BAG3 Konstrukte und Färbung gegen FLAG und MYH14 keine Co-Lokalisation zwischen beiden Proteinen in HEK293-A-, HEK293-T- und Hep-G2-Zellen, da laut endogener Färbung MYH14 vor allem im Nukleus lokalisiert ist. Eine cytosolische Co-Lokalisation beider Proteine konnte für diese Zelllinien ebenfalls nicht beobachtet werden. Für HeLa-Zellen, die auch für das FLAG-BAG3-Konstrukt eine nukleäre Lokalisation zeigten, konnte ebenfalls weder im Cytosol noch im Nukleus eine Co-Lokalisation beider Proteine gefunden werden (vgl. Abbildung 32).

Die Immunofluoreszenzfärbung von MYH14 und der FLAG markierten BAG3-Konstrukte mit den hier genutzten Antikörpern zeigen in keiner der untersuchten Zelllinien eine Co-Lokalisation von BAG3 und MYH14 in Cytosol oder Nukleus.

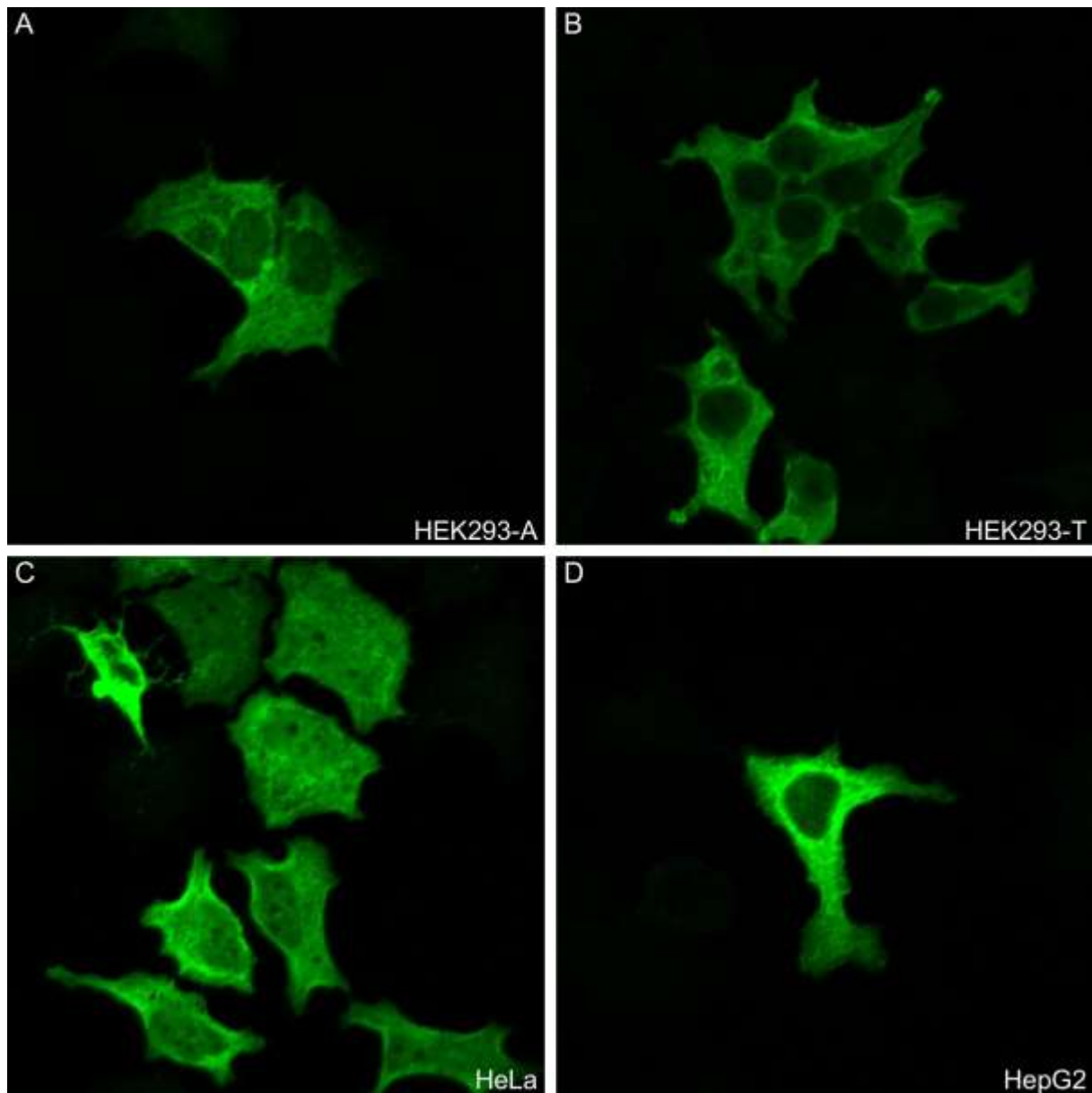


Abbildung 31: Überexpression von FLAG-BAG3 in verschiedenen Zelltypen und anschließender Färbung mit Anti-FLAG-Antikörper. HEK293-A-, HEK293-T, HeLa- und Hep-G2-Zellen (A-D) wurden zwei Tage nach der Aussaat chemisch über Kalziumphosphat mit FLAG markiertem BAG3 transfiziert, mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit 100 % Methanol permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit einem Anti-FLAG-Primärantikörper über Nacht und zwei stündiger Inkubation mit Cy3 gekoppeltem Sekundärantikörper. Aufgenommen wurden die Bilder an einem *TCS-SP5 Confocal microscope* bei 63-facher Vergrößerung. Zu sehen sind Maximalprojektionen der aufgenommenen Z-Stapel.

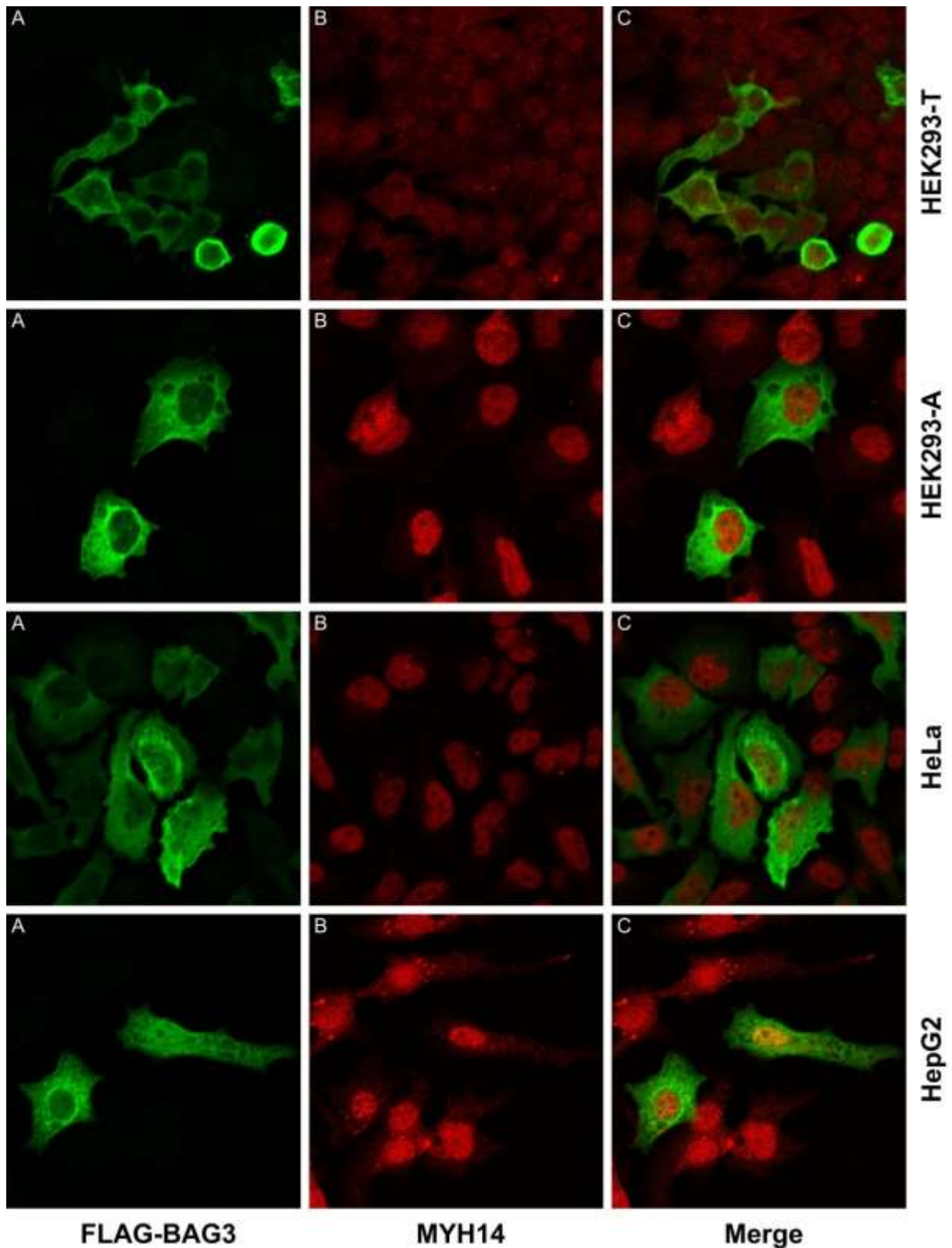


Abbildung 32 Überexprimiertes FLAG-BAG3 und endogen gefärbtes MYH14 zeigen keine Co-Lokalisation in verschiedenen Zelllinien. HEK293-A-, HEK293-T, HeLa- und Hep-G2-Zellen (A-D) wurden zwei Tage nach der Aussaat chemisch über Kalziumphosphat mit FLAG markiertem BAG3 transfiziert, mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit 100 % Methanol permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit einem Anti-FLAG- und einem Anti-MYH14-Primärantikörper über Nacht und zwei stündiger Inkubation mit Cy3 bzw. Cy5 gekoppeltem Sekundärantikörper.

Aufgenommen wurden die Bilder an einem *TCS-SP5 Confocal microscope* bei 63-facher Vergrößerung. Zu sehen sind Maximalprojektionen der aufgenommenen Z-Stapel. A) FLAG-BAG3 Färbungen, B) MYH14 Färbungen, C) Überlagerung der FLAG- und MYH14-Färbung

5.3.2.3 Westernblot-Analysen nukleärer Fraktionierungen von transfizierten HEK293-T-Zellen zeigen eine ausschließliche Lokalisation von MYH14 im Cytosol.

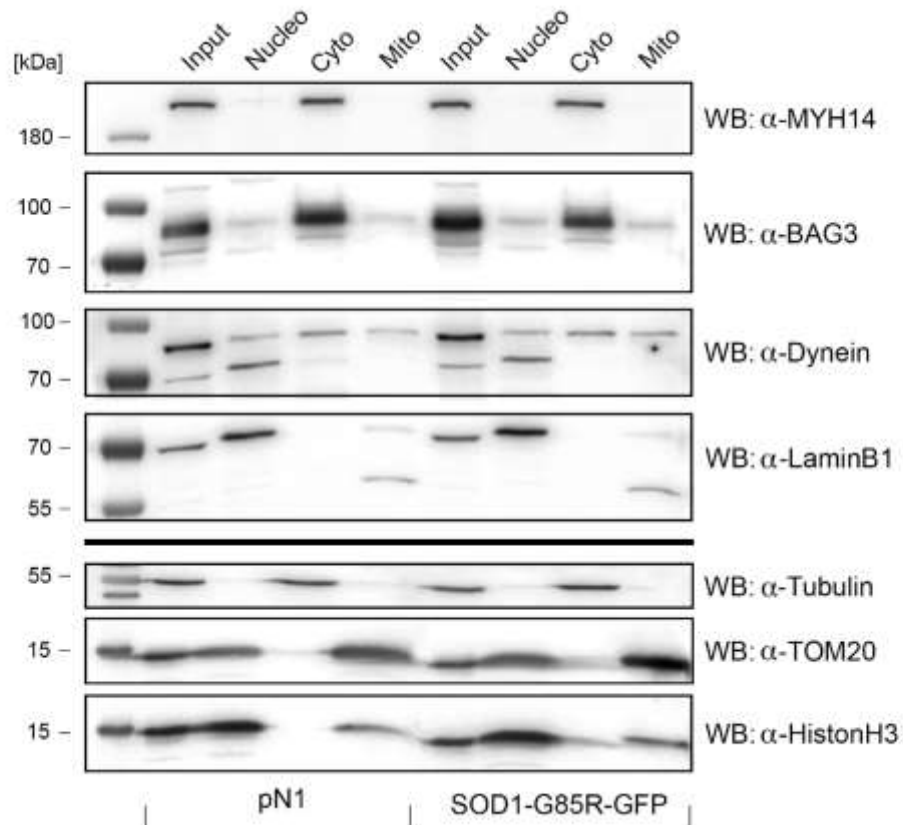


Abbildung 33: Biochemische Analysen zeigen eine cytosolische Lokalisation von MYH14. HEK293-T-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion mit SOD1-G85r-GFP oder dem Kontrollplasmid pN1 einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Die erhaltene cytosolische, nukleäre und die Membrankomponenten enthaltende, mitochondriale Fraktion wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Detektiert wurden das nicht muskuläre Myosin II-C (MYH14) und das Co-Chaperon BAG3. Als Kontrollen fungierten das cytosolische Protein Tubulin, die nukleären Proteine Histon H3 und LaminB1, sowie das mitochondriale Protein Tom20. n = 3

Zur weiteren Untersuchung der zellulären Lokalisation und der in der IP gefundenen Interaktion von BAG3 und MYH14 wurden subzelluläre Fraktionierungen von HEK293-T-Zellen durchgeführt. Diese Versuche sollten zeigen, in welchen Zellkompartimenten BAG3 und MYH14 vorkommen, um einen möglichen Ort der Interaktion zu ermitteln und die Ergebnisse

der Immunocytochemie zu ergänzen. Vor der Fraktionierung wurden die Zellen mit SOD1-G85R-GFP oder einem Kontrollplasmid (pN1) transfiziert, um eine der Stressbedingungen der massenspektrometrischen Interaktomanalysen, in der erstmals eine vorläufige Interaktion von BAG3 und MYH14 gefunden wurde, nachzustellen. HEK293-T-Zellen wurden an dem auf die Aussaat folgenden Tag chemisch mittels Kalziumphosphat transfiziert und zwei Tage nach der Transfektion einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Die erhaltenen Fraktionen - cytosolische, nukleäre und mitochondriale Fraktion^o- wurden anschließend mittels Immunoblot analysiert. Hier war eine hauptsächliche Lokalisation von MYH14 in der cytosolischen Fraktion und der Eingangskontrolle zu beobachten. Es zeigte sich zwar ein äußerst schwaches Signal in der nukleären Fraktion pN1 transfizierter Zellen, die aber in keinem Verhältnis zu den in der Immunfluoreszenz gefundenen, deutlichen, nukleären Färbung steht. BAG3 mit einer Größe von ca. 78 kDa konnte in allen Fraktionen gefunden werden, wobei die höchsten Proteinspiegel in der cytosolischen Fraktion detektiert wurden. Den Erfolg der subzellulären Fraktionierung verifizierten die Kontrollproteine Tubulin, TOM20, Histon H3 und LaminB1. Tubulin als 55 kDa großes cytosolisches Protein wurde ausschließlich in der cytosolischen Fraktion beobachtet. Das ca. 16 kDa große, mitochondriale Protein TOM20 zeigte die höchsten Proteinspiegel in der mitochondrialen Fraktion auch wenn sich dieses Protein zusätzlich in der nukleären Fraktion finden ließ. Histon H3 mit einer Größe von ca. 15 kDa zeigte eine ähnliche, aber entgegengesetzte Lokalisation wie TOM20. Die höchsten Spiegel konnten, wie für ein nukleäres Protein erwartet, in der nukleären Fraktion gefunden werden, wobei sich auch ein für Histon H3 positives Signal in der mitochondrialen Fraktion befand. Eine interessante Beobachtung ließ sich bei der Detektion von LaminB1 machen. LaminB1 zeigte zwei Signale im Westernblot, eines bei ca. 55 kDa und ein weiteres bei ca. 70 kDa. Vergleich man nun die Intensitäten dieser Signale in den verschiedenen Fraktionen fiel auf, dass die Intensitäten zwischen nukleärer und mitochondrialer Fraktion genau umgekehrt sind. In der nukleären Fraktion war das Signal bei 78 kDa gut zu erkennen, während jenes bei 55 kDa nur schwach detektierbar war. In der mitochondrialen Fraktion hingegen war das untere Signal bei 55 kDa stärker ausgeprägt als das bei 70 kDa. Die cytosolische Fraktion zeigte, wie bei einem Protein der nukleären Lamina zu erwarten, kein Signal für LaminB1 (vgl. Abbildung 33).

Für die subzelluläre Lokalisation von BAG3 und MYH14 in mit pN1 und SOD1-G85R-GFP transfizierten HEK293-T-Zellen zeigten die biochemischen Immunoblotanalysen die cytosolische Lokalisation beider Proteine und eine zusätzliche nukleäre und mitochondriale Lokalisation für BAG3.

5.3.2.4 Westernblot-Analysen nukleärer Fraktionierungen untransfizierter HEK293-T-Zellen zeigen eine hauptsächliche Lokalisierung von MYH14 im Cytosol.

Die ersten immunocytochemischen Untersuchungen der Co-Lokalisation von BAG3 und MYH14, sowie die Co-Immunopräzipitationen wurden in untransfizierten Zellen durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass es sich bei den Ergebnissen der subzellulären Fraktionierung aus Abbildung 33 nicht um ein durch die Transfektion verfälschtes Ergebnis handelt, wurde erneut eine Fraktionierung mit untransfizierten HEK293-T-Zellen durchgeführt.

Die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung ähnelten denen der bereits in Abbildung 33 dargestellten Ergebnisse in transfizierten HEK293-T-Zellen. Die höchsten Proteinspiegel für MYH14 waren in der cytosolischen Fraktion zu finden, was den Befund der bereits vorausgegangenen Fraktionierung in transfizierten Zellen mit Blick auf die Lokalisation von MYH14 bestätigte. Ein Unterschied war jedoch, dass sich in beiden Versuchen schwache Banden für MYH14 in der nukleären Fraktion feststellen ließen. Für BAG3 konnte sowohl die hauptsächlich cytosolische, als auch die nukleäre Lokalisation bestätigt werden, wobei die in Abbildung 33 gefunden BAG3-Signale der mitochondrialen Fraktion nicht detektiert werden konnten. Die genutzten Kontrollproteine Tubulin, Histon H3, TOM20 und LaminB1 zeigten ebenfalls eine mit der in Abbildung 33 beobachteten Verteilung der Proteine. Tubulin zeigte fast ausschließlich eine cytosolische Lokalisation, während TOM20 die höchsten Proteinspiegel in der mitochondrialen Fraktion zeigt, mit zusätzlich detektierten Proteinspiegeln in der nukleären Fraktion. Histon H3 kam am stärksten in der nukleären Fraktion vor und konnte ebenso zu einem Teil in der mitochondrialen Fraktion detektiert werden. Einzige Unterschiede waren leichte Verunreinigungen der nukleären Fraktion durch Tubulin, sowie der cytosolischen Fraktion durch Histon H3. LaminB1 zeigte die gleiche Verteilung wie auch schon zuvor in Abbildung 33 beobachtet (vgl. Abbildung 34).

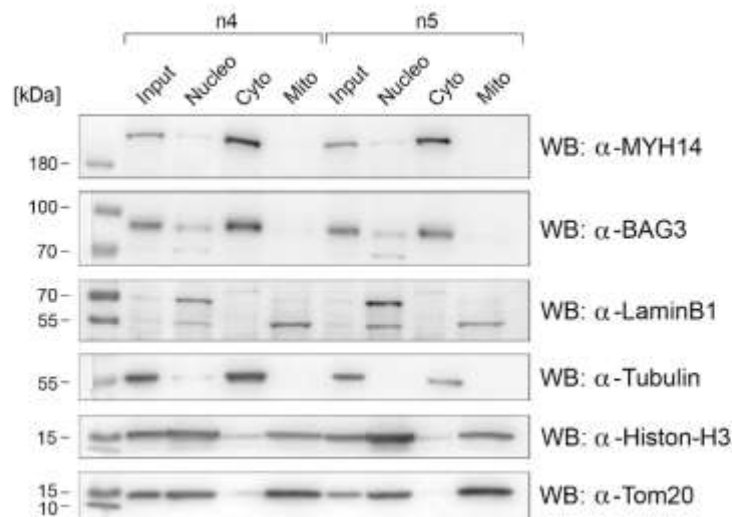


Abbildung 34: MYH14 ist hauptsächlich im Cytosol untransfizierter Zellen zu finden, wobei sich ein geringer Anteil im Nucleus zu befinden scheint. HEK293-T-Zellen wurden zwei Tage nach der Aussaat fraktioniert und nukleäre, cytosolische und die membranhaltige, mitochondriale Fraktion über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse der aufgetrennten Fraktionen erfolgte über einen Immunoblot. Detektiert wurden das nicht muskuläre Myosin II-C (MYH14) und das Co-Chaperon BAG3. Als Kontrollen fungierten das cytosolische Protein Tubulin, die nukleären Proteine Histon H3 und LaminB1, sowie das mitochondriale Protein.TOM20 n = 3

Die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung in untransfizierten HEK293-T-Zellen decken sich damit, bis auf einige mögliche Verunreinigungen, mit den Ergebnissen der subzellulären Fraktionierung in mit pN1 oder SOD1-G85R-GFP transfizierten Zellen. Sie bestätigen die cytosolische Lokalisation von MYH14/NMII-C und BAG3, sowie die nukleäre Lokalisation von BAG3. Die mitochondriale BAG3-Lokalisation konnte hier nicht nachgewiesen werden.

5.3.3.5 Überexprimierte, GFP-markierte, murine MYH14-Spleißvarianten zeigen eine cytosolische Lokalisation

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der Immunocytochemie und der subzellulären Fraktionierung wurde die Spezifität des MYH14-Antikörper in Frage gestellt. Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wurden GFP markierte murine Spleißvarianten von MH14 in HEK293-T-Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend mit DAPI gefärbt. Hierzu wurden die Zellen zwei Tage nach der Transfektion in 4 % Formaldehyd fixiert, mit reinem Methanol permeabilisiert und für 15 Minuten mit DAPI gefärbt. Für die Auswertung der Färbungen würden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskopes z-Stapel der Zellen aufgenommen. Die verschiedenen Spleißvarianten von MYH14 unterschieden sich durch die An- oder

Abwesenheit einer, oder zweier Insertionen, die maßgeblich die Aktivität dieses Myosins beeinflussen (vgl. Abbildung 14 und 1.4.1) (Golomb et al., 2004, Heissler and Manstein, 2011, Heissler and Manstein, 2013, Jana et al., 2009, Pato et al., 1996, Wang et al., 2000).

Die Analyse der transfizierten HEK293-T-Zellen zeigte, dass die überexprimierten Spleißvarianten von MYH14 nicht mit DAPI co-lokalisieren und dass das MYH14-EGFP-Signal ausschließlich im Cytosol zu finden war. Diese Beobachtung stützen die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung. Weiterhin waren für alle Spleißvarianten Zellen mit aggregiertem MYH14 zu erkennen, welches teils sehr große Aggregate bildete. Die Aggregate befanden sich im Cytosol und in den meisten Fällen in Kernnähe. In der Überlagerung des MYH14-GFP- und DAPI-Signals (C, Abbildung 35) der Spleißvarianten C2 und C1C2 waren schwach filamentöse Strukturen zu erkennen (mit einem gelben Pfeil markiert), die in dieser Form bei den Spleißvarianten C0 und C1 nicht zu beobachten waren (vgl. Abbildung 35). Das scheinbare Auftreten von Aggregaten im Zellkern ist möglicherweise in der 2-dimensionalen Projektion der Zellen begründet.

Durch die Überexpression der GFP-markierten, murinen MYH14-Spleißvarianten konnten die Beobachtungen der subzellulären Fraktionierungen bestätigt werden. MYH14 scheint eine cytosolische Lokalisation zu besitzen und unter Überexpression zur Aggregatbildung zu neigen.

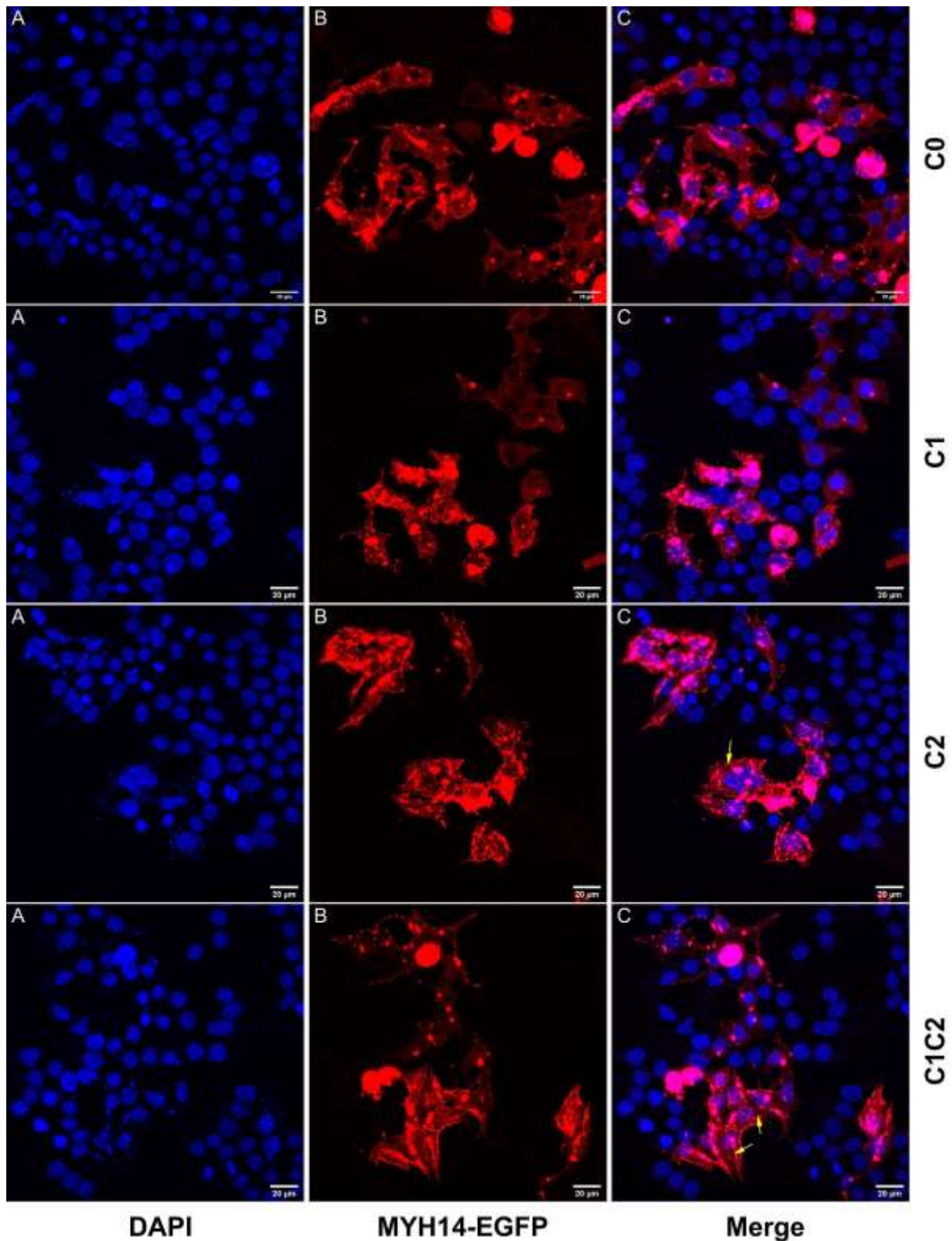


Abbildung 35: Immunocytochemische Färbungen zeigen eine cytosolische Lokalisation von MYH14. HEK293-T-Zellen wurden mit GFP-markierten, murinen MYH14-Spleißvarianten chemisch über Kalziumphosphat transfiziert. Für die immunocytochemische Analyse wurden die Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert, in reinem Methanol permeabilisiert und 15 Minuten mit 1:1000 verdünntem DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt und zeigen Maximalprojektionen von Z-Stapeln. C0, C1, C2, C1C2 sind die verschiedenen MYH14-Spleißvarianten, die sich durch das Fehlen oder Vorhandensein eines oder zweier

verschieden langer Aminosäureeinsätze in der Nähe des N-Terminus voneinander unterscheiden (vgl. Abbildung 14). A) Kernfärbung mit DAPI; B) EGFP-Signal der transfizierten Konstrukte; C) Überlagerung von DAPI-Färbung und EGFP-Signal.

5.3.3.6 Überexprimierte, GFP-markierte, murine MYH14-Spleißvarianten zeigen eine Co-Lokalisation mit BAG3 in MYH14 Aggregaten.

Aufgrund der durch die subzellulären Fraktionierungen und die erneuten Färbungen gewonnen Erkenntnisse der subzellulären Lokalisation von MYH14, wurde eine BAG3-Färbung der mit den murinen MYH14-EGFP-Spleißvarianten transfizierten HEK293-T-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die transfizierten Zellen zwei Tage nach der Transfektion fixiert, permeabilisiert und über Nacht mit einem BAG3-Primärantikörper inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung von BAG3 durch zweistündige Inkubation mit einem Cy5 gekoppeltem Sekundärantikörper und die Kernfärbung durch 15-minütige Inkubation in 1:1000 verdünntem DAPI. Die Analyse der Färbungen erfolgte bei 100-facher und 40-facher Vergrößerung unter Aufnahme von z-Stapeln an einem konfokalen Laserscanmikroskop.

Die Ergebnisse der immunocytochemischen Co-Lokalisationsuntersuchung zeigten für die jeweiligen Einzelaufnahmen die erwartete Lokalisation von DAPI im Nukleus, der GFP-markierten MYH14-Spleißvarianten im Cytosol und von BAG3 sowohl im Cytosol, als auch im Nukleus. Die cytosolische Lokalisation der MYH14-Konstrukte wurde dabei in der 40-fach Vergrößerung etwas deutlicher als in der 100-fach Vergrößerung. In beiden sind allerdings deutlich die durch die Überexpression erzeugten MYH14-Aggregate zu erkennen. Von Interesse waren auch die zirkulären, perinukleären MYH14 Strukturen die in Abbildung 37 B durch gelbe Pfeile gekennzeichnet sind (vgl. Abbildungen 36 und 37). Die Überlagerung aller drei Einzelsignale konnte eine Co-Lokalisation von BAG3 und allen MYH14-Spleißvarianten zeigen. Die Co-Lokalisation betraf dabei vor allem die MYH14-Aggregate (vgl. Abbildung 36), aber auch cytosolische Bereiche, die keine Aggregate zeigten (vgl. Abbildung 37). Die perinukleären MYH14-Strukturen zeigten ebenfalls eine leichte Überlagerung der GFP und BAG3 Signale, auch wenn entsprechende zirkuläre, perinukleäre BAG3 Signale in der BAG3-Färbung nicht ausgemacht werden konnten. Zur Verdeutlichung der Co-Lokalisationen wurden entsprechende Bereichsvergrößerungen in den Überlagerungen der Signale eingefügt (Abbildung 36 D und Abbildung 37 D)

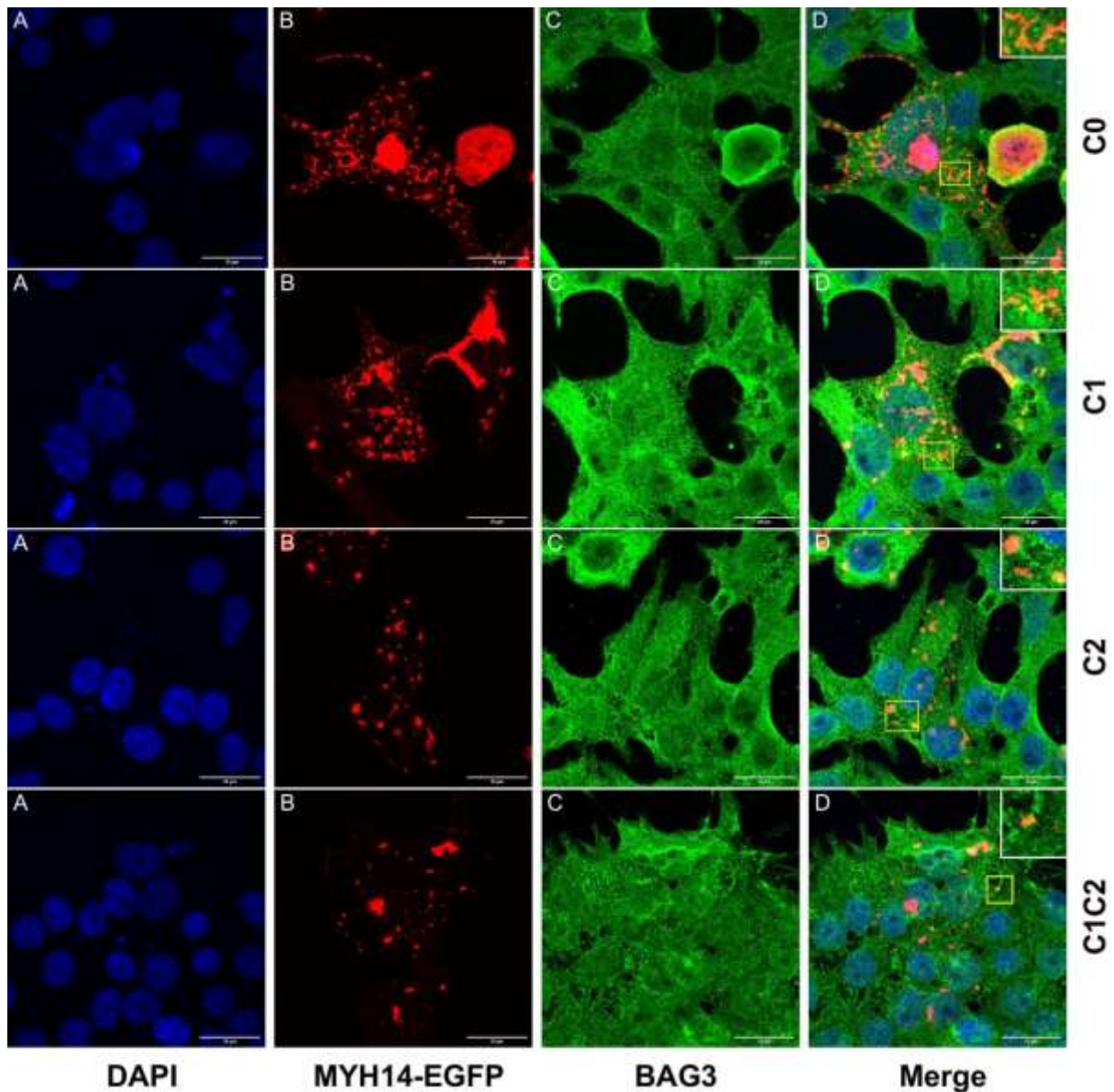


Abbildung 36: MYH14 und BAG3 co-lokalisieren in MYH14-Aggregaten. HEK293-T-Zellen wurden mit GFP-markierten, murinen MYH14--Spleißvarianten chemisch über Kalziumphosphat transfiziert. Für die immunocytochemische Analyse wurden die Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert und in reinem Methanol permeabilisiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem BAG3-Antikörper über Nacht inkubiert, am nächsten Tag zwei Stunden mit einem Cy-5 gekoppeltem Sekundärantikörper behandelt und für 15 Minuten mit 1:1000 verdünntem DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung durchgeführt und zeigen Maximalprojektionen von Z-Stapeln. C0, C1, C2, C1C2 sind die verschiedenen MYH14-Spleißvarianten, die sich durch das Fehlen oder Vorhandensein eines oder zweier verschiedenen langer Aminosäureeinsätze in der Nähe des N-Terminus voneinander unterscheiden (vgl. Abbildung 14). A) Kernfärbung mit DAPI; B) EGFP-Signal der transfizierten Konstrukte; C) BAG3-Färbung D) Überlagerung von DAPI-, BAG3-Färbung und EGFP-Signal.

Die Co-Lokalisationsuntersuchungen durch die immunocytochemische Analyse mit murinen, GFP-markierten MYH14-Spleißvarianten transfizierten HEK293-T-Zellen zeigen die Co-Lokalisation von BAG3 und den verschiedenen MYH14-Spleißvarianten. Die Co-Lokalisation scheint sich dabei nicht nur auf die MYH14-Aggregate zu beschränken, sondern auch in aggregatfreien Bereichen des Cytosols stattzufinden.

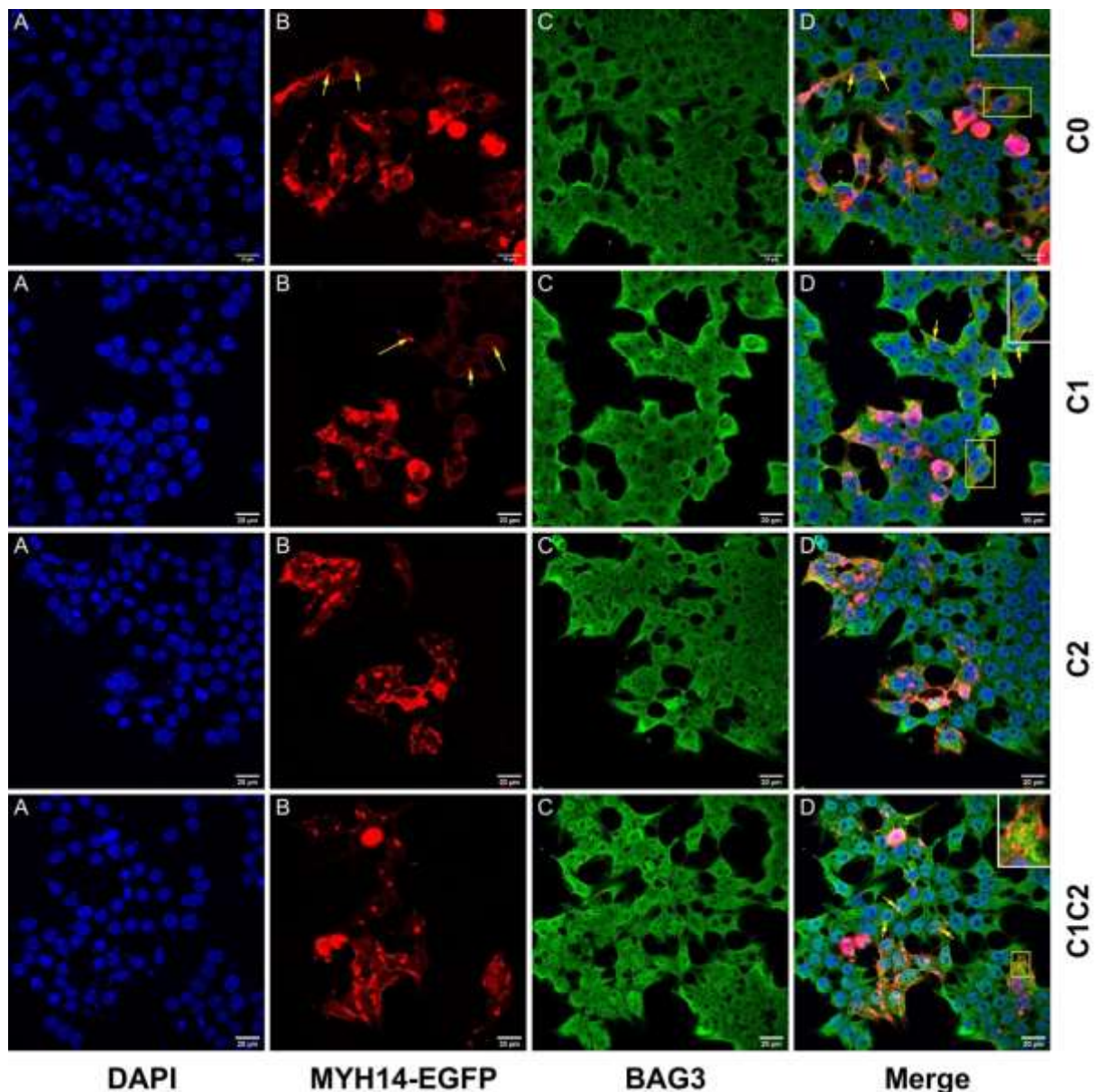


Abbildung 37: BAG3 und MYH14 co-lokalisieren außerhalb der MYH14-Aggregate. HEK293-T-Zellen wurden mit GFP-markierten, murinen MYH14-Spleißvarianten chemisch über Kalziumphosphat transfiziert. Für die immunocytochemische Analyse wurden die Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert und in reinem Methanol permeabilisiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem BAG3-Antikörper über Nacht inkubiert, am nächsten Tag zwei Stunden mit einem Cy-5 gekoppeltem Sekundärantikörper behandelt und für 15 Minuten mit 1:1000 verdünntem DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt und zeigen

Maximalprojektionen von Z-Stapeln. C0, C1, C2, C1C2 sind die verschiedenen MYH14-Spleißvarianten, die sich durch das Fehlen oder Vorhandensein eines oder zweier verschiedenen langer Aminosäureinsätze in der Nähe des N-Terminus voneinander unterscheiden (vgl. Abbildung 14). A) Kernfärbung mit DAPI; B) EGFP-Signal der transfizierten Konstrukte; C) BAG3-Färbung D) Überlagerung von DAPI-, BAG3-Färbung und EGFP-Signal.

5.4 Untersuchung von MYH14 unter SOD1-G85R-GFP-Transfektion und MG132 Behandlung

Für die weitere Charakterisierung einer möglichen Interaktion von BAG3 und MYH14 wurde das Verhalten von MYH14 in beiden Stressparadigmen, die für die massenspektrometrische Interaktomanalyse von C. Hiebel und E. Stürner verwendet wurden, untersucht. Hierzu wurden Zellen entweder mit SOD1-G85R-GFP transfiziert und ein Knockdown für MYH14 und BAG3 mittels siRNA herbeigeführt, oder wildtypische Zellen sechs Stunden lang mit 10 µM MG132 behandelt. Bei MG132 handelt es sich um einen reversiblen Peptid-Aldehyd-Inhibitor, der in Form eines Substratanalogons die chymotrypsinähnliche Aktivität des Proteasoms und damit den Abbau ubiquitiniertes Substrate blockiert (Rock et al., 1994, Lee and Goldberg, 1996).

5.4.1 Untersuchung des Einflusses von MYH14 auf den BAG3-vermittelten Abbau von SOD1

Da BAG3 zusammen mit HSP70 und weiteren Proteinen, wie HSPB8, CHIP und 14-3-3, eine wichtige Funktion beim Abbau aggregierter Proteine und dem aggresomalen Transport mutanter Formen von SOD1 übernimmt, soll untersucht werden, inwiefern der BAG3 vermittelte Transport mutanten SOD1s durch MYH14 beeinflusst wird.

5.4.1.1 Der Knockdown von MYH14 in SOD1-G85R-GFP transfizierten HEK293-T-Zellen führt zu erhöhten GFP-Spiegeln

Für die Untersuchung des Einflusses von MYH14 auf den BAG3-vermittelten aggresomalen Transport von SOD1-G85R-GFP wurden mit verschiedenen siRNAs transfizierte, transient SOD1-G85R-GFP exprimierende Zellen lysiert und die Lysate über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse der Zellysate erfolgte über einen Immunoblot mit anschließender,

densitometrischer Auswertung. Gemessen wurden die Gesamt-GFP-Spiegel unter den verschiedenen Knockdownbedingungen.

Die Ergebnisse der densitometrischen und statistischen Auswertung der Immunoblots zeigten einen Anstieg der GFP- und BAG3-Spiegel unter MYH14-Knockdown. Die GFP-Spiegel unter MYH14-Knockdown stiegen auf ca. 165 % \pm 9 % der Kontrolle und waren damit um mehr als die Hälfte erhöht. Des Weiteren waren die GFP-Spiegel unter MYH14-Knockdown um ca. 46 % höher als unter BAG3-Knockdown mit einem Wert von ca. 119 % \pm 9 % im Vergleich zur Kontrolle. Die um ca. 19 % erhöhten GFP-Spiegel unter BAG3-Knockdown besaßen allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle (vgl. Abbildung 38 B). Der erfolgreiche MYH14-Knockdown konnte durch das schwache MYH14-Signal im Immunoblot verifiziert werden (vgl. Abbildung 38 A)

Der Knockdown von MYH14 scheint dabei nicht nur einen Einfluss auf die Gesamt-GFP-Spiegel zu haben, sondern auch auf die BAG3-Spiegel. So sind die BAG3-Spiegel unter MYH14-Knockdown mit 138 % \pm 17 % der Kontrolle signifikant erhöht. Der Knockdown von BAG3 durch die korrespondierende siRNA zeigt mit ca. 31 % \pm 4 % der Kontrolle wie erwartet höchst signifikant erniedrigte BAG3-Spiegel. (vgl. Abbildung 38 B)

Der Knockdown von MYH14 besitzt einen signifikanten Einfluss auf die SOD1-G85R-GFP- und BAG3-Spiegel transient transfizierter HEK293-T-Zellen. Der Knockdown von BAG3 scheint keinen signifikanten Einfluss auf die ProteinSpiegel mutanten SOD1s zu haben.

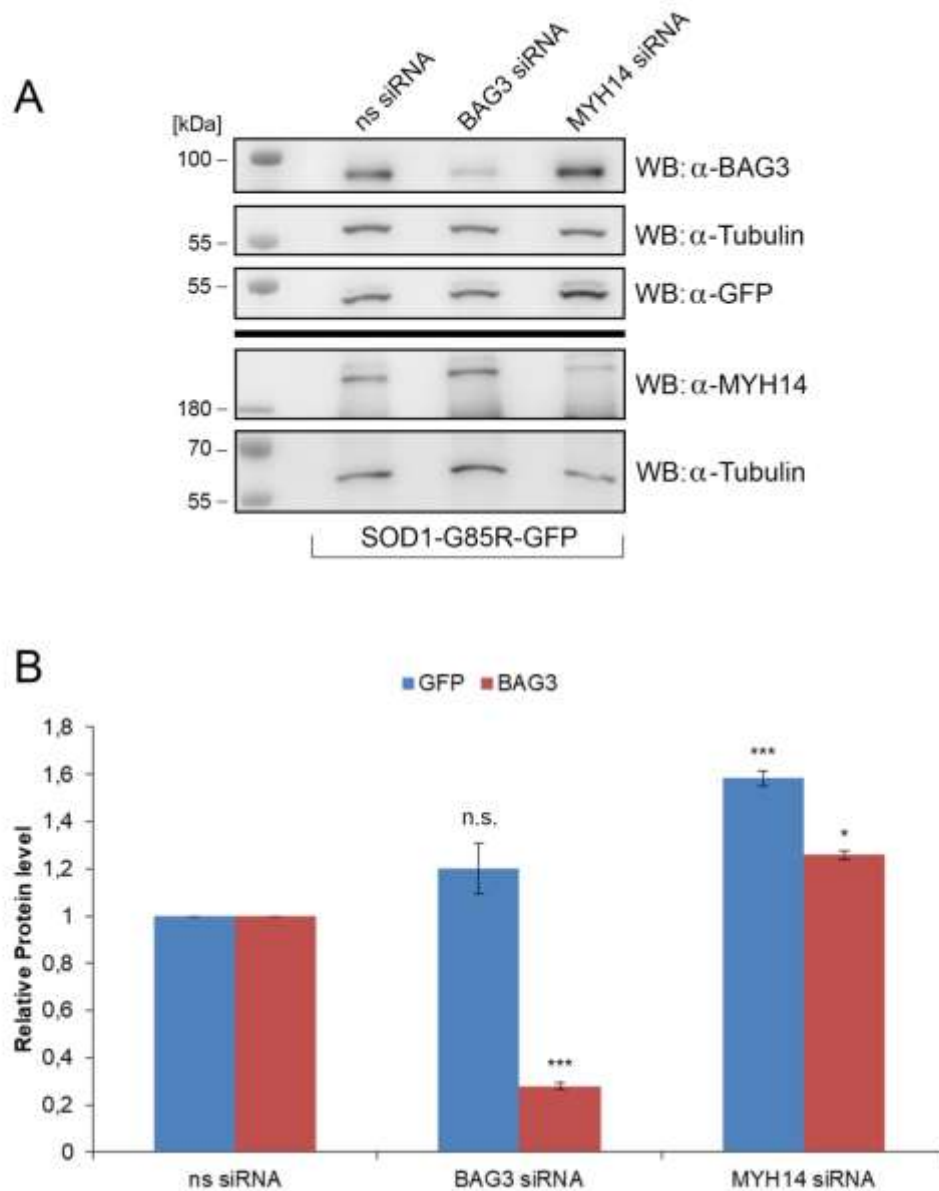


Abbildung 38: Der Knockdown von MYH14 in mit SOD1-G85R-GFP transfizierten HEK293-T-Zellen erhöht die GFP- und BAG3-Spiegel. A) HEK293-T-Zellen wurden mittels chemischer Kalziumphosphattransfektion mit SOD1-G85R-GFP und entweder mit ns siRNA, BAG3 siRNA oder MYH14 siRNA transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und die Auftrennung der Lysate mittels SDS-PAGE. Die Evaluation der Proteinspiegel erfolgte durch die densitometrische Analyse der Immunoblots. Detektiert wurden BAG3, GFP und MYH14. Tubulin diente als Ladekontrolle. B) Densitometrische und statistische Auswertung der in A) dargestellten Immunoblots für die Proteine BAG3 und SOD1-G85R-GFP. Die statistische Auswertung erfolgte über eine One-Way-Anova mit anschließendem Dunnett-T Post-Hoc-Test. Gezeigt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. n.s.: nicht signifikant; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. $n = 3$

5.4.1.2 Die Aggregationseigenschaften von SOD1-G85R-GFP werden durch einen Knockdown von MYH14 nicht verändert

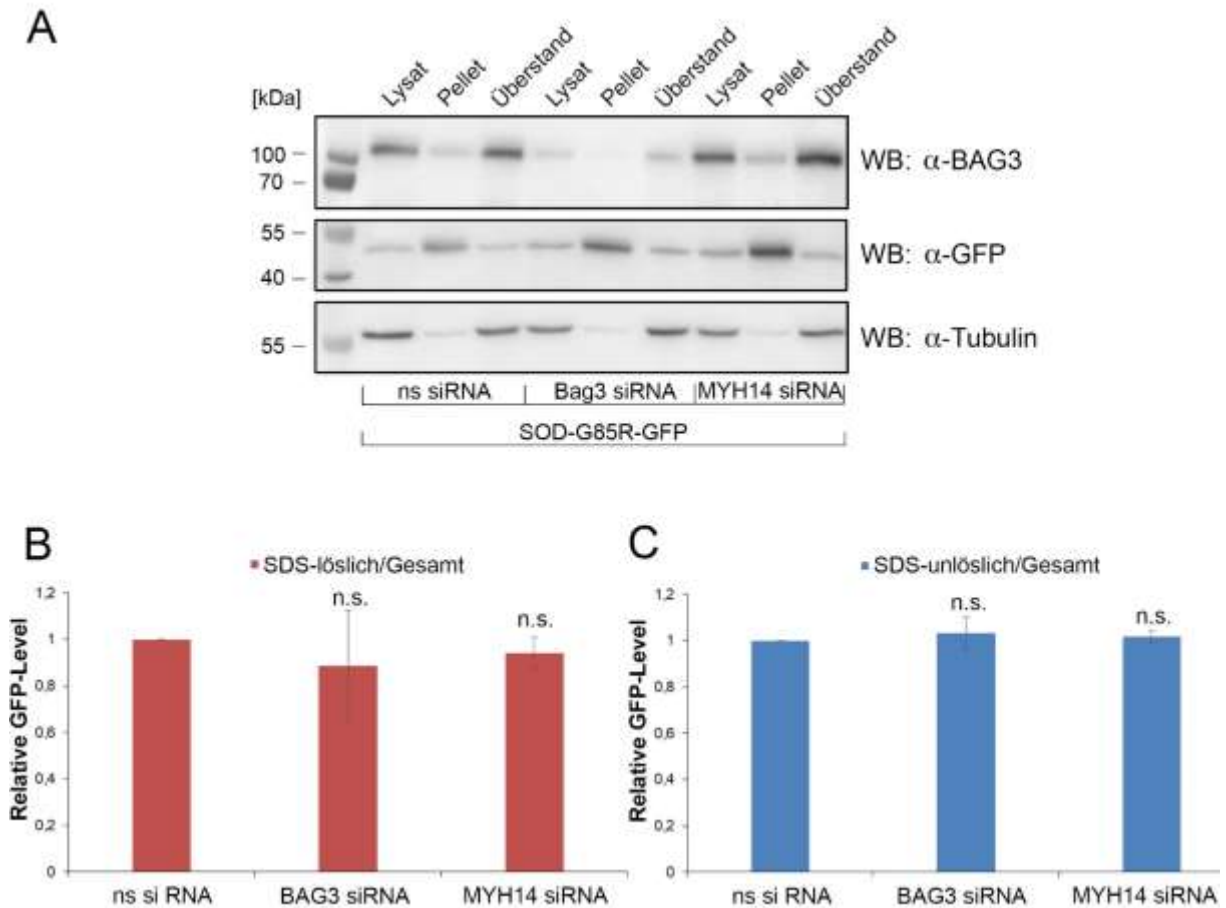


Abbildung 39: Die aggregativen Eigenschaften von SOD1-G85R-GFP ändern sich unter MYH14 Knockdown nicht. A) HEK293-T-Zellen wurden mittels chemischer Kalziumphosphattransfektion mit SOD1-G85R-GFP und entweder mit ns siRNA, BAG3 siRNA oder MYH14 siRNA transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Ernte und Fraktionierung der Zellen. Die Auftrennung der erhaltenen Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Evaluation der Proteinspiegel wurde über die densitometrische Analyse der Immunoblots durchgeführt. Detektiert wurden BAG3, GFP und MYH14. Tubulin diente als Ladekontrolle der Lysate. B) Densitometrische und statistische Auswertung der in A) dargestellten Immunoblots für die GFP-Spiegel der SDS-löslichen Fraktion. C) Densitometrische und statistische Auswertung der in A) dargestellten Immunoblots für die GFP-Spiegel der SDS-unlöslichen Fraktion. Die statistische Auswertung erfolgte über eine One-Way-Anova mit anschließendem Dunnett-T Post-Hoc-Test. Gezeigt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. n.s.: nicht signifikant; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. $n = 3$

Um zu klären, ob die beobachteten, erhöhten GFP-Spiegel unter MYH14-Knockdown in SOD1-G85R-GFP transfizierten HEK293-T-Zellen durch eine erhöhte Akkumulation des mutanten SOD1 zustande kommen, wurde eine grobe Fraktionierung in SDS-lösliche und

SDS-unlösliche Fraktionen durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden über eine SDS-Page aufgetrennt und mittels Immunoblot densitometrisch analysiert. Anschließend wurden die für die beiden Fraktionen bestimmten GFP-Spiegel auf die im Ausgangslysat gemessenen GFP-Spiegel normiert.

Die densitometrische und statistische Analyse der Immunoblots der SDS-unlöslichen oder SDS-löslichen Fraktion zeigte für keine der genutzten siRNAs einen statistisch signifikanten Unterschied in den GFP-Spiegeln. Die auf das Gesamtslysat normierten GFP-Spiegel der SDS-unlöslichen Fraktion betragen unter BAG3 Knockdown ca. $103 \% \pm 7 \%$ der Kontrolle und unter MYH14-Knockdown ca. $102 \% \pm 3 \%$ der Kontrolle. Für die SDS-lösliche Fraktion wurden entsprechend unter BAG3-Knockdown ca. $89 \% \pm 24 \%$ der Kontrolle und unter MYH14-Knockdown ca. $94 \% \pm 7 \%$ der Kontrolle für die GFP-Spiegel ermittelt (vgl. Abbildung 39 B). Die Westernblot-Analysen zeigen zwar einen Anstieg des GFP-Signals im Zentrifugationsniederschlag, jedoch steigt auch die Signalintensität im Gesamtslysat (vgl. Abbildung 39 A).

Der in Abbildung 38 beobachtete Anstieg der SOD1-G85R-GFP-Spiegel unter MYH14-Knockdown ist der Fraktionierungsanalyse folgend nicht auf ein verändertes Aggregationsverhalten des mutanten SOD1s zurückzuführen.

5.4.2 Untersuchung des Einflusses von MYH14 auf HEK293-T-Zellen unter MG132 Behandlung

Das zweite Stressparadigma der Interaktomanalyse in dem MYH14 als potentieller BAG3-Interaktor gefunden wurde, war der Aufbau proteasomalen Stresses durch die inhibitorische Wirkung von MG132. Um zu überprüfen, ob MG132 Auswirkungen auf den Abbau von MYH14 bzw. die MYH14-Spiegel, oder Einfluss auf die Interaktion zwischen BAG3 und MYH14 hat, wurden zunächst die MYH14-Proteinspiegel unter MG132-Behandlung ausgewertet. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Fähigkeit der vermehrten Aggresombildung durch BAG3 unter MG132 abhängig von MYH14 ist.

5.4.2.1 Die MG132 Behandlung von HEK293-T-Zellen hat keinen Einfluss auf die MYH14-Expressionsspiegel

Für die Untersuchung des Einflusses von MG132 auf die Proteinspiegel von MYH14/NMII-C wurden HEK293-T-Zellen zwei Tage nach der Aussaat sechs Stunden lang mit 10 μ M MG132 behandelt. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinspiegel von MYH14 und BAG3 über die densitometrische Analyse von Immunoblots bestimmt. Die Bestimmung der BAG3-Spiegel sollte hierbei neben der Detektion von Ubiquitin als Kontrolle für die erfolgreiche Behandlung mit MG132 dienen.

Nach densitometrischer und statistischer Analyse der BAG3-Spiegel unter DMSO- und MG132-Behandlung, konnte der statistisch signifikante Anstieg der BAG3-Spiegel verifiziert werden. Der Anstieg der BAG3-Spiegel um ca. 66 % auf 166 % \pm 30 % der Kontrolle zusätzlich zu den im Immunoblot beobachteten, erhöhten Ubiquitinspiegeln zeigten die erfolgreiche, proteasomale Inhibition durch MG132. MYH14 zeigte unter MG132 zwar einen Anstieg der Proteinspiegel um ca. 23 % auf einen Wert von 123 % \pm 34 % der Kontrolle, im Gegensatz zum Anstieg der BAG3-Spiegel war dieser aber nicht statistisch signifikant, sondern zeigte maximal eine Tendenz (vgl. Abbildung 40).

MG132 besitzt entsprechend der dargestellten Ergebnisse keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinspiegel von MYH14/NMII-C.

aggregierte und nicht-native Proteine in Aggresomen zu akkumulieren. Aggresome sind perinukleäre Strukturen, die durch die Akkumulation defekter Proteine entstehen und positiv für Färbungen gegen BAG3 und Vimentin sind (Gamerding et al., 2011b). Funktion dieser Strukturen ist es potentiell toxische Proteinaggregate an einem zentralen Ort zu sammeln und die potentielle Toxizität der Aggregate zu vermindern, bevor sie anschließend über autophagische Prozesse Abgebaut werden (Behl, 2016, Kim et al., 2016, Kopito, 2000, Ramdzan et al., 2017). Die Behandlung von Zellen mit MG132 führt zur proteasomalen Inhibition und somit für ein verstärktes Aufkommen fehlerhafter Proteine, die über autophagische Prozesse abgebaut werden müssen. Dieser erhöhte Bedarf macht sich durch die vermehrte Bildung von Aggresomen bemerkbar. Für die Untersuchung des Einflusses von MYH14, als potentieller Interaktionspartner von BAG3, auf die BAG3-vermittelte Bildung von Aggresomen wurden HEK293-A-Zellen zwei Tage nach der Transfektion mit ns-, BAG3- oder MYH14-siRNA sechs Stunden lang mit 10 μ M MG132 behandelt und anschließend immunocytochemisch gefärbt. Für die Auswertung wurde der Anteil aggresomtragender Zellen an der Gesamtzellzahl unter DMSO- und MG132-Behandlung ermittelt. Zur Überprüfung der siRNA-vermittelten Knockdowns wurden zusätzlich zu den Immunofluoreszenzfärbungen Immunoblotanalysen der über eine SDS-PAGE aufgetrennten Lysate der transfizierten HEK293-A-Zellen durchgeführt.

Die statistische Auswertung des relativen Anteils aggresomtragender Zellen an der ermittelten Gesamtzellzahl ergab folgende Ergebnisse: Die MG132-Behandlung verursachte im direkten Vergleich mit der DMSO-Behandlung einen deutlichen Unterschied in der relativen Anzahl aggresomtragender Zellen, der über alle Transfektionen hinweg statistisch höchst signifikant ist (vgl. Abbildung 41B, #). Für den Einfluss der transfizierten siRNAs auf die Bildung von Aggresomen ergab sich ebenfalls ein höchst signifikanter Unterschied. Dieser Unterschied beruht hierbei auf einem signifikanten Unterschied der mit ns siRNA und der mit BAG3 siRNA transfizierten Zellen gegenüber der Mockkontrolle (vgl. Abbildung 41B, *).

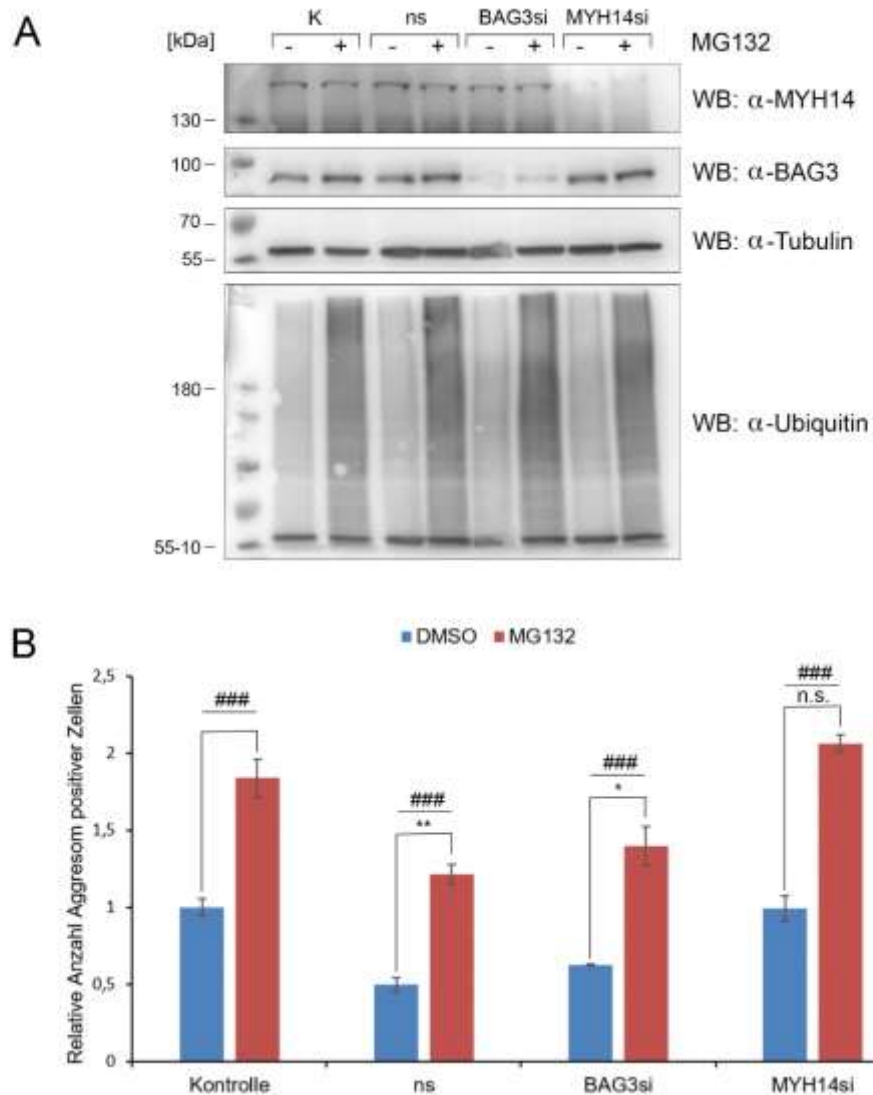


Abbildung 41: Der Knockdown von MYH14 beeinflusst im Gegensatz zum BAG3-Knockdown nicht die Anzahl Aggregat positiver Zellen. HEK293-A-Zellen wurden zwei Tage nach der Kalziumphosphattransfektion mit ns-, BAG3- oder MYH14-siRNA für sechs Stunden mit 10 μ M MG132 oder DMSO behandelt. Zur Transfektionskontrolle wurden die Zellen lysiert, über eine SDS-Page aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Der relative Anteil aggresomtragender Zellen wurde durch Auszählen aggresomtragender Zellen und Normierung auf die Gesamtzellzahl erreicht. A) Immunoblotanalyse der transfizierten HEK293-A-Zellen. Detektiert wurden die Proteine MYH14/NMII-C, BAG3 und Ubiquitin. Tubulin diente als Ladekontrolle. B) Statistische Auswertung des Anteils aggresomtragender Zellen an der Gesamtzellzahl unter verschiedenen, siRNA vermittelten Knockdowns. Die übergreifenden Klammern Gruppieren die jeweils für DMSO und MG132 dargestellten Balkendiagramme, um die statistischen Unterschiede zwischen den Transfektionen zu zeigen. Die statistische Auswertung des relativen Anteils aggregattragender Zellen erfolgte über eine Two-Way-Anova, wobei eine weitere Analyse der Unterschiede zwischen den Transfektionen über den Dunnett-T Post- Hoc-Test erfolgte. Gezeigt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. n.s.: nicht signifikant; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ###: $p \leq 0,001$. $n = 3$; # = Signifikanz zwischen DMOS- und MG132-Behandlung

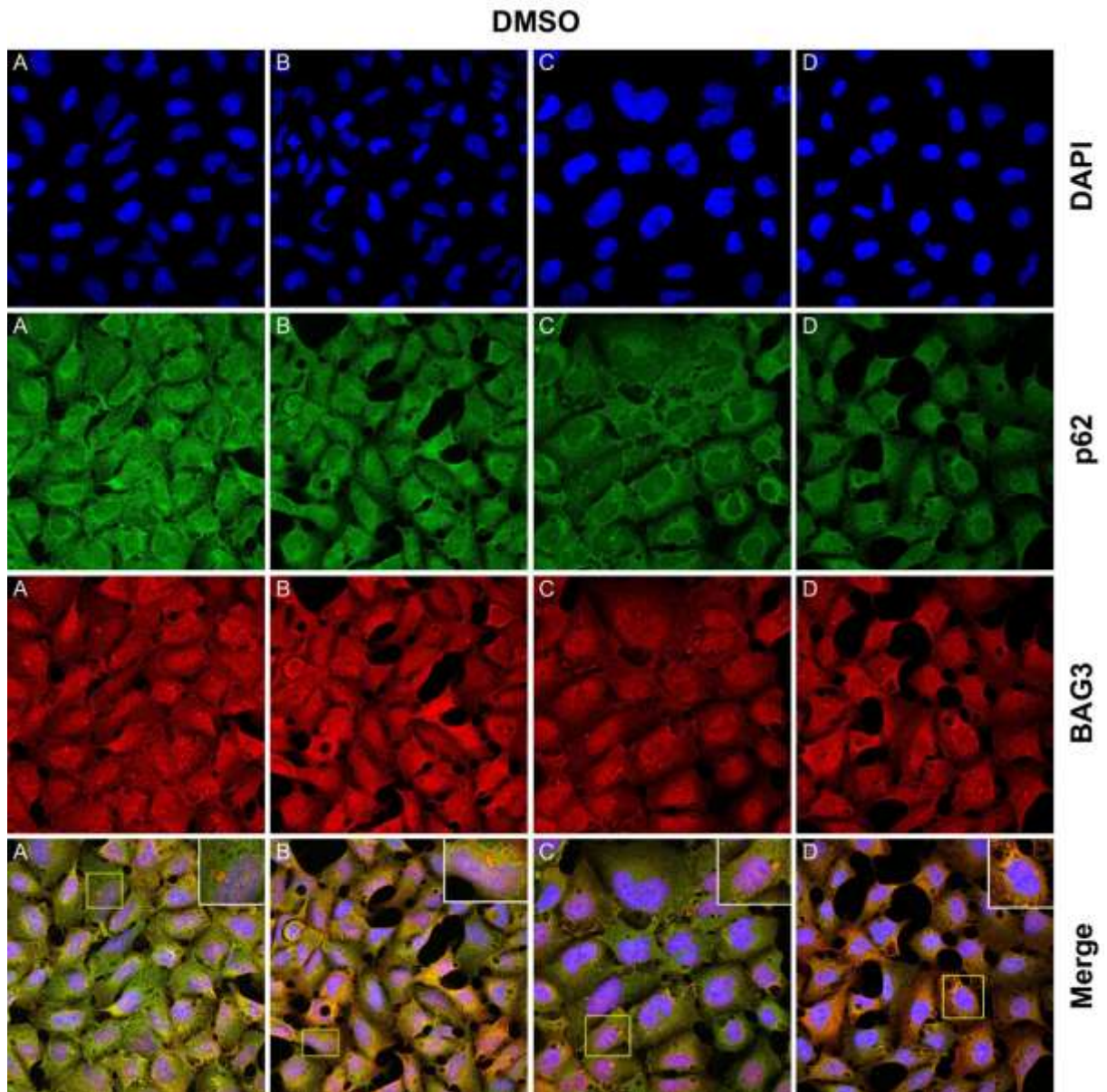


Abbildung 42: Teil 1 der Untersuchung eines MYH14-Knockdowns auf die MG132 induzierte Aggresombildung in HEK293-A-Zellen. HEK293-A-Zellen wurden zwei Tage nach der Kalziumphosphattransfektion mit ns-, BAG3- oder MYH14-siRNA für sechs Stunden mit DMSO behandelt. Die Zellen wurden in 4% Formaldehyd fixiert, in reinem Methanol permeabilisiert und mit p62- und BAG3-Primärantikörpern behandelt. Die Färbung erfolgte durch die zweistündige Inkubation mit Cy2- bzw. Cy5-gekoppelten Sekundärantikörpern und 15-minütiger Inkubation mit 1:1000 DAPI. Die Aufnahmen wurden bei einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen und zeigen die Maximalprojektionen aufgenommener z-Stapel. In den rechten, oberen Bildecken im Merge sind perinukleäre Aggregate zeigende Bildvergrößerungen dargestellt. A) Kontrollzellen behandelt mit Calciumphosphat, B) Mit ns siRNA transfizierte Zellen, C) mit BAG3 siRNA transfizierte Zellen, D) mit MYH14 transfizierte Zellen

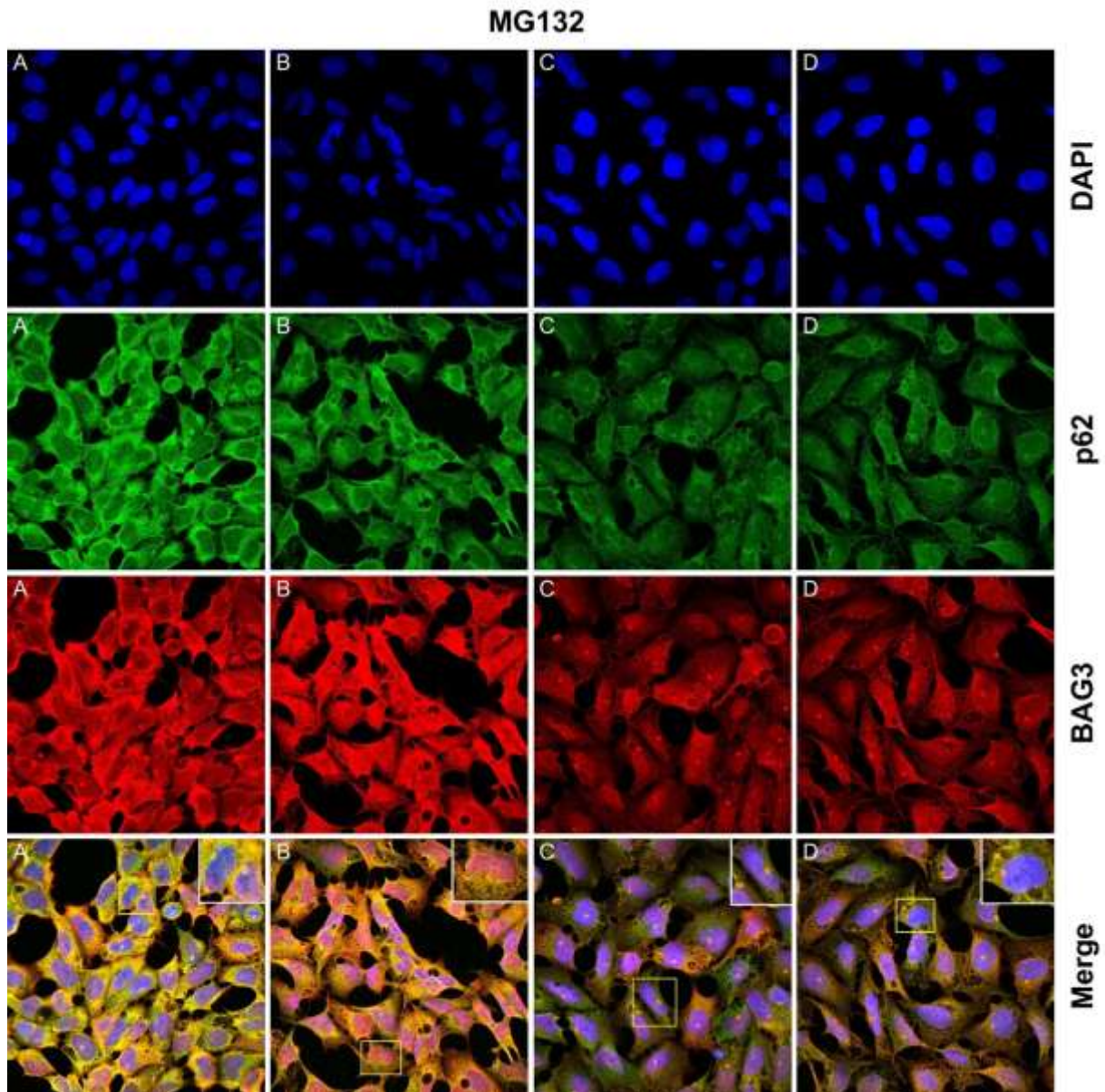


Abbildung 43: Teil 2 der Untersuchung eines MYH14-Knockdowns auf die MG132 induzierte Aggresombildung in HEK293-A-Zellen. HEK293-A-Zellen wurden zwei Tage nach der Kalziumphosphattransfektion mit ns-, BAG3- oder MYH14-siRNA für sechs Stunden mit 10 μ M MG132 behandelt. Die Zellen wurden in 4 % Formaldehyd fixiert, in reinem Methanol permeabilisiert und mit p62- und BAG3-Primärantikörpern behandelt. Die Färbung erfolgte durch die zweistündige Inkubation mit Cy2- bzw. Cy5-gekoppelten Sekundärantikörpern und 15-minütiger Inkubation mit 1:1000 DAPI. Die Aufnahmen wurden bei einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen und zeigen die Maximalprojektionen aufgenommener z-Stapel. In den rechten, oberen Bildecken im Merge sind perinukleäre Aggregate zeigende Bildvergrößerungen dargestellt. A) Kontrollzellen behandelt mit Calciumphosphat, B) Mit ns siRNA transfizierte Zellen, C) mit BAG3 siRNA transfizierte Zellen, D) mit MYH14 transfizierte Zellen

Die mittlere Anzahl aggresompositiver Zellen an der Gesamtzellzahl war für ns siRNA transfizierter Zellen unter DMSO Behandlung um ca. 49,27 % im Vergleich zur Kontrolle

reduziert. Unter MG132-Behandlung betrug sie ca. $44,43 \% \pm 6,4 \%$, was eine Reduktion von ca. $34,1 \%$ zu MG132 behandelten Mock-Kontrollen und einen Anstieg von ca. $138,8 \%$ gegenüber DMSO behandelten, mit ns siRNA transfizierten Zellen darstellte. Für die mit BAG3 siRNA transfizierten Zellen ergab sich unter DMSO-Behandlung eine mittlere Anzahl aggresompositiver Zellen von ca. $22,88 \% \pm 0,5 \%$ und unter MG132-Behandlung von ca. $51,32 \% \pm 12,62 \%$, was einem Anstieg von ca. $124,32 \%$ entsprach. Im Vergleich zu den jeweiligen Mock-Kontrollen ergab sich eine Reduktion von ca. $37,62 \%$ unter DMSO-Behandlung und von ca. $23,9 \%$ unter MG132-Behandlung.

Die mit MYH14 siRNA transfizierten Zellen zeigten mit ca. $36,41 \% \pm 8,24 \%$ unter DMSO-Behandlung und $75,63 \% \pm 5,99 \%$ unter MG132 Behandlung im Vergleich zur Mock-Kontrolle keinen signifikanten Unterschied in der relativen Anzahl aggresomtragender Zellen. Allerdings zeigte sich ein Anstieg von ca. $107,69 \%$ unter MG132-Behandlung innerhalb der Transfektionsgruppe (vgl. Abbildung 41 B).

Die Immunoblotanalysen und die immunocytochemischen Färbungen der transfizierten HEK293-A-Zellen bestätigen, zum einen den erfolgreichen Knockdown von BAG3 und MYH14 (vgl. Abbildung 41 A). Zum anderen verifizieren sie auch die erfolgreiche Inhibition des Proteasoms durch das Ansteigen der Ubiquitinspiegel und die vermehrte Bildung der Aggresomen (vgl. Abbildungen 41 A, 42, 43)

Eine Ermittlung der Effektgröße über das partielle Eta-Quadrat ergab eine Effektstärke von ca. $62,1 \%$ der Transfektion und ca. $79,3 \%$ der Behandlung auf die Aggresombildung der Zellen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine MG132-Behandlung der HEK293-A-Zellen unabhängig von der Art der Transfektion ein erhöhtes Auftreten von Aggresomen zur Folge hat. Des Weiteren verursacht ein Knockdown von MYH14 keine Reduktion oder Erhöhung in der Häufigkeit aggresomtragender Zellen, während der Knockdown von BAG3 zu einer verminderten Aggresombildung führt.

5.5 Untersuchung des Einflusses von MYH14 auf den autophagischen Flux

Es konnte gezeigt werden, dass NMIIA (MYH9), Myosin-IC und Myosin VI wichtige Funktionen für die Autophagieinitiation und Reifung der Phagoophore bzw. für die Autophagosomreifung und die Fusion mit dem Lysosom besitzen (Kruppa et al., 2016). Da MYH14 genauso wie MYH9 zu den nicht muskulären Myosinen gehört und in der Lage ist, Aktinfilamente, die ebenfalls eine wichtige Aufgabe während der Autophagie übernehmen, zu binden (vgl. 1.4), soll in dieser Arbeit der Einfluss von MYH14 auf die autophagische Aktivität untersucht werden.

5.5.1 Der autophagische Flux in HEK293-T-Zellen ist unter dem Knockdown von MYH14 erhöht.

Für die Untersuchung des Einflusses von MYH14 auf die autophagische Aktivität wurden HEK293-T-Zellen mit MYH14 siRNA transfiziert und zwei Tage nach der Transfektion vier Stunden mit 1 μ M Bafilomycin A1 oder DMSO behandelt. Nach Auftrennung der Proben über eine SDS-PAGE wurde als Maß der autophagischen Aktivität der autophagische Flux mittels densitometrischer Analyse der Immunoblots bestimmt. Der autophagische Flux wurde über die Differenzbildung zwischen Bafilomycin- und DMSO-Behandlung nach der Normierung auf Tubulin berechnet.

Die Ergebnisse der Fluxberechnungen zeigten, dass der autophagische Flux sowohl in Bezug auf die LC3B-II-Spiegel mit 158 % \pm 23 % der Kontrolle, als auch in Bezug auf die p62-Spiegel mit 212 % \pm 49 % der Kontrolle unter MYH14-Knockdown statistisch signifikant erhöht waren. Des Weiteren ließ sich eine leichte Erhöhung der BAG3-Spiegel auf ca. 148 % \pm 41 % der Kontrolle unter MYH14-Knockdown feststellen, die aber nicht statistisch signifikant war. Der MYH14-Knockdown konnte ebenfalls durch eine Bestimmung der Proteinspiegel unter DMSO- und Bafilomycinbehandlung verifiziert werden. Die MYH14-Spiegel fielen im MYH14-Knockdown unter DMSO-Behandlung auf ca. 26 % \pm 7 % der Kontrolle und unter Bafilomycinbehandlung auf ca. 25 % \pm 11 % der Kontrolle (vgl. Abbildung 44).

Der Knockdown von MYH14 in HEK293-T-Zellen führt entsprechend zu einer Erhöhung der autophagischen Aktivität, die sich in der Erhöhung des autophagischen Fluxes äußert.

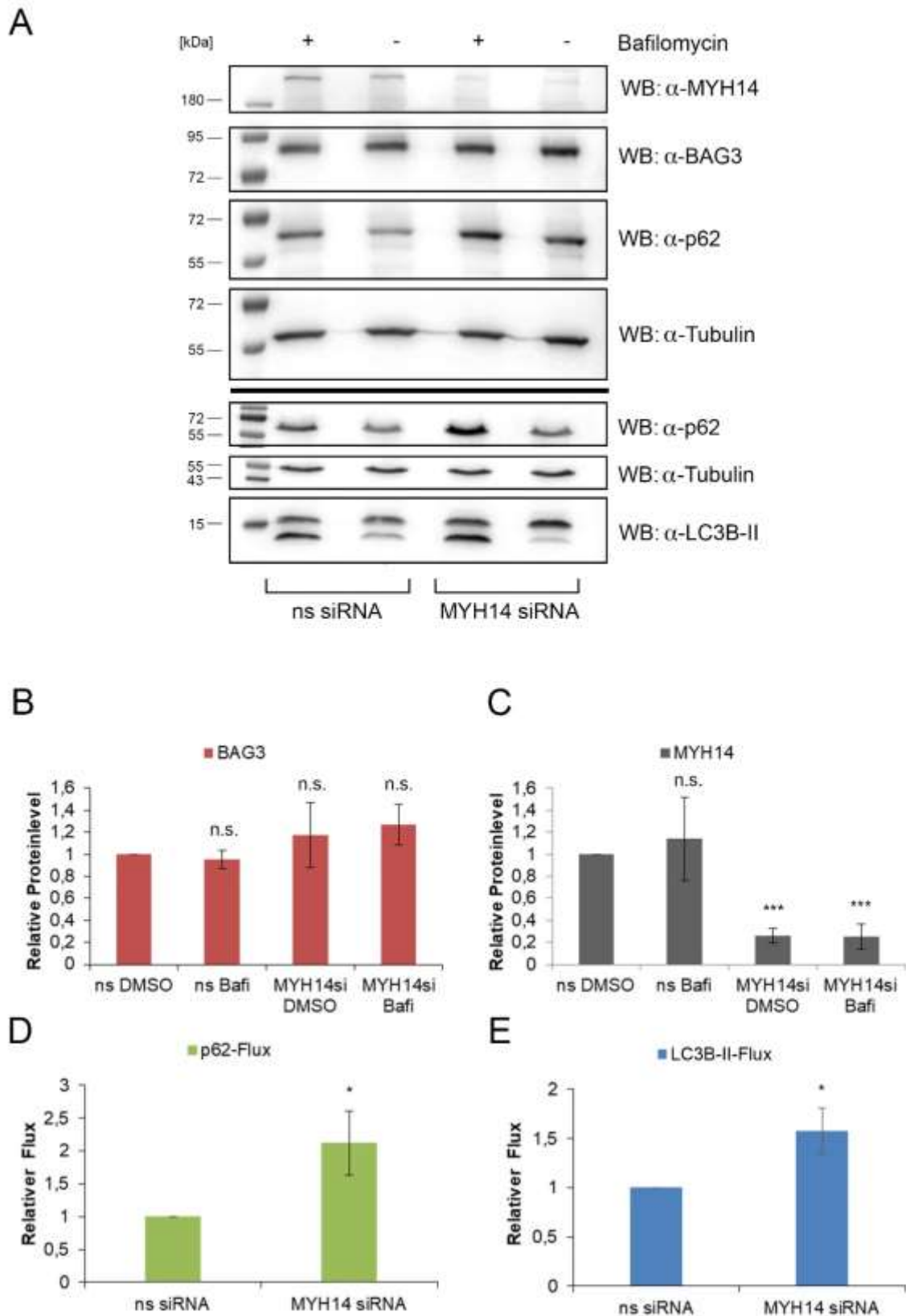


Abbildung 44: Der Knockdown von MYH14 erhöht den autophagischen Flux. A) HEK293-T-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion mit ns- oder MYH14 siRNA vier Stunden entweder mit 1 μ M Bafilomycin A1 oder

DMSO behandelt. Die Zellysate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionsspiegel der Proteine p62, LC3B und Tubulin mittels Immunoblot analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. B-E) Densitometrische und statistische Auswertung des in A) gezeigten Immunoblots. Die Signifikanz der BAG3- und MYH14-Proteinspiegel erfolgte über eine Two-Way-Anova, während für die Auswertung der Fluxe der Students-T-Test genutzt wurde. $n = 4$ für BAG3, autophagischen und p62-Flux. Gezeigt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. $n = 3$ für MYH14. n.s.: nicht signifikant; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$

5.5.2 Die Überexpression von MYH14 verringert den autophagischen Flux in HEK293-T-Zellen

Nach der Untersuchung des autophagischen Fluxes unter dem erfolgreichen Knockdown von MYH14 wurden im nächsten Schritt vier verschiedene, GFP-markierte, murine Spleißvarianten von MYH14 in HEK293-T-Zellen überexprimiert und der autophagische Flux anhand des LC3B-II- und p62-Fluxes erneut bestimmt. Hierzu wurden die Zellen wie bereits zuvor beschrieben zwei Tage nach der Transfektion für vier Stunden mit $1 \mu\text{M}$ Bafilomycin A1 oder DMSO behandelt. Die Lysate wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinspiegel densitometrisch über einen Immunoblot ermittelt. Für die Bestimmung der autophagischen Aktivität wurden ebenso der LC3II-B-Flux, wie auch der p62-Flux bestimmt.

Eine Überexpression der murinen MYH14-Spleißvarianten hatte dabei eine Reduktion beider Fluxe zur Folge. Die Spleißvarianten C0 und C2 zeigten mit ca. $75 \% \pm 14 \%$ bzw. ca. $75 \% \pm 12 \%$ der Kontrolle einen statistisch signifikant erniedrigten LC3B-II-Flux. Für die Spleißvarianten C1 und C1C2 zeigte sich eine leicht stärkere, statistisch hoch signifikante Reduktion des LC3B-II-Fluxes auf ca. $70 \% \pm 7 \%$ bzw. $66 \% \pm 10 \%$ der Kontrollen. Auswertungen des p62-Fluxes ergaben für die Spleißvarianten C1 und C2 eine statistisch signifikante Reduktion auf $58 \% \pm 14 \%$ bzw. ca. $50 \% \pm 3 \%$ der Kontrolle. Die Spleißvarianten C0 und C1C2 zeigten mit einer Reduktion auf je $46 \% \pm 18 \%$ bzw. ca. $30 \% \pm 13 \%$ der Kontrolle sowohl hoch als auch höchst signifikante Unterschiede zu Kontrollzellen (vgl. Abbildung 45 B).

Die erfolgreiche Überexpression der MYH14-Konstrukte konnte durch die deutlich höheren MYH14-Spiegel der Transfektionen im Immunoblot verifiziert werden (vgl. Abbildung 45 A).

Die mit der Überexpression der MYH14-Spleißvarianten gekoppelten Bafilomycin-Behandlungen der HEK293-T-Zellen und die anschließende Bestimmung des LC3B-II- und p62-Fluxes verdeutlichen noch einmal den Einfluss von MYH14 auf die autophagische Aktivität. So verursacht die Überexpression jeder bekannten MYH14-Spleißvariante eine

6. Diskussion

6.1 HeLa-Zellen, aber nicht SH-SY5Y-Zellen reagieren mit einem erhöhten autophagischen Flux auf den Entzug von Aminosäuren.

Neurone gelten nicht wie andere Zellen als dazu in der Lage β -Oxidation zu betreiben und damit Fette als Quelle für die Generation von ATP zu nutzen. Glukose tritt generell als ihr Hauptenergielieferant zur ATP-Synthese in Erscheinung (Dienel and Hertz, 2001, Hertz and Dienel, 2002). Neurone, als postmitotische Zellen, sind nicht dazu in der Lage, die cytotoxische Last terminaler Proteinaggregate über eine asymmetrische Verteilung während der Mitose zu reduzieren (Liu et al., 2010). Stattdessen sind sie auf ATP-abhängige, degradative Prozesse wie die Autophagie angewiesen, um ihre Aggregatlast zu vermindern (vgl. 1.1.2). Die Versorgung von Neuronen mit Nährstoffen und ATP kann jedoch durch ischämische Prozesse, wie einen Schlaganfall oder traumatische Hirnverletzungen, zum Erliegen kommen, was folglich zu einem Stillstand anaboler Prozesse führt.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen und den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist die Auswertung der autophagischen Aktivität und das genutzte Medium für den Nährstoffentzug. Die Auswertung der autophagischen Aktivität erfolgte über den relativen autophagischen Flux durch die Bestimmung und Differenzbildung der Proteinspiegel von LC3B-II unter DMSO- und Bafilomycin-Behandlung. Die in dieser Arbeit verwendeten Entzugslösungen basieren auf einer Vollringerlösung, also einer Ringerlösung supplementiert mit dialysiertem FCS, Vitaminen, Lipiden und Aminosäuren. Vollringermedium zeigte in Bezug auf den autophagischen Flux keinen Unterschied zu den von mir genutzten Kontrollkulturmedien. Durch die Verwendung des glukose- oder amino-säuredepletierendem Vollringers ist es möglich, autophagische Prozesse zu messen, die weder durch einen Entzug von Lipiden, Wachstumsfaktoren oder Vitaminen gestört werden. Ein großer Teil der Arbeitsgruppen, auch der hier aufgeführten, nutzte für ihre Entzugsversuche glukose- oder aminosäuredepletierendes Medium oder, vor allem für den Aminosäureentzug, HBSS oder EBSS. Oftmals wird EBSS und HBSS kein Serum für die Dauer der Behandlung hinzugefügt, was entsprechend auch zu einem Mangel von Lipiden und Wachstumsfaktoren führen kann. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass Serumsentzug allein autophagische Prozesse fördert (Fang et al., 2014). Allerdings zeigten auch hier wiederum andere Arbeitsgruppen, dass der Entzug von Serum nur wenig Einfluss auf autophagische Prozesse besitzt (Kuchitsu et al., 2018, Mejlvang et al., 2018). So besteht

durchaus die Möglichkeit, dass verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf Serumentzug reagieren.

Für die Untersuchung der autophagischen Aktivität konnte in dieser Arbeit ein Anstieg des autophagischen Fluxes in HeLa-Zellen nachgewiesen werden, der sich allerdings auf den Entzug von Aminosäuren beschränkte. Ein Effekt des Glukoseentzugs auf den autophagischen Flux konnte hier nicht festgestellt werden. Diese Beobachtungen widersprechen zunächst Beobachtungen von *Kim et al.*, die in ihren Ergebnissen einen erhöhten autophagischen Flux in Abhängigkeit von ULK-1 nach vierstündigem Glukoseentzug in HEK293-Zellen und MEFs postulierten. Zur Beurteilung der autophagischen Aktivität wurden von ihnen vor allem die LC3-B-II-Spiegel und die Aktivität von ULK-1 und AMPK genutzt (Kim et al., 2011). Glukoseentzugsversuchen mit glukosefreiem Medium in HESC2-CMs und H7-CMs konnten ebenso einen Anstieg der LC3-II-Spiegel, sowie der Anzahl von Autophagosomen und Autolysosomen verursachen (Lu et al., 2018). *Nwadike et al.* und *Ramírez-Peinado et al.* widersprechen jedoch diesen Ergebnissen und bestätigen meine Beobachtung einer fehlenden Induktion des autophagischen Fluxes unter Glukoseentzug. Ähnlich wie Gerónimo-Olvera in primären Rattenneuronen, beschrieben beide Arbeitsgruppen, einen Anstieg von LC3-II unter dem Entzug von Glukose, aber keine Erhöhung der LC3-II-Spiegel unter zusätzlicher Bafilomycin-Behandlung. Außerdem zeigten *Nwadike et al.*, dass die Ansäuerung der Lysosomen unter Glukoseentzug nicht induziert, sondern blockiert wird. Entsprechend zeigten beide Arbeitsgruppen, dass Glukose als Energielieferant notwendig für die Autophagie ist und der Entzug von Glukose zu einem verringerten Abbau autophagischer Vesikel führt. Der fehlende lysosomale Abbau autophagischer Vesikel erklärt die beobachtete Akkumulation von LC3-II unter Glukoseentzug. Diese Beobachtungen konnten sowohl in MEF-Zellen als auch verschiedenen Krebszelllinien, wie 4T1, SKOV3, MCF-7, A431, Rh4 oder HeLa bestätigt werden (Nwadike et al., 2018, Ramirez-Peinado et al., 2013).

Der von mir beobachtete Anstieg der autophagischen Aktivität in HeLa-Zellen unter Aminosäureentzug entspricht den Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen, die die Auswirkung eines Aminosäureentzugs auf die autophagische Aktivität untersucht haben. Die Behandlung muriner Podocyten mit aminosäuredepletiertem RPMI-1640-Medium über einen Zeitraum von sechs Stunden führte zu erhöhten LC3-II-Spiegeln und einer erhöhten Anzahl früher und später Autophagosomen in GFP-mRFP-LC3 transfizierten Zellen (Chen et al., 2018).

Ähnliche Ergebnisse wurden von *Mizushima et al.* beobachtet, die einen Anstieg der LC3-Spiegel und des Volumenanteils der autophagischen Vesikel am Gesamtvolumen des

Cytosols in GFP-LC3 transfizierten F9-Zellen nach zweistündiger Inkubation in *Hanks´ solution* zeigen konnten (Mizushima et al., 2004). Auch *Kuchitsu et al.*, *Sun et al.* und *Kim et al.* konnten eine Aktivierung der Autophagie unter Aminosäureentzug bestätigen (Sun et al., 2018, Kuchitsu et al., 2018, Kim et al., 2011). Von Interesse sind an dieser Stelle weitere Beobachtungen von *Nwadike et al.* In Versuchen, in denen sie die Ansäuerungen der Lysosomen unter Aminosäureentzug in direkte Abhängigkeit der Glukosespiegel setzen, konnte eine Ansäuerung der Lysosomen nur unter Aminosäureentzug, nicht aber unter Glukose-entzug beobachtet werden. Der gleichzeitige Entzug von Aminosäuren und Glukose verhinderte die Bildung von Autophagosomen bzw. deren lysosomale Degradation (Nwadike et al., 2018).

Während nicht neuronale Zellen, wie auch die hier verwendeten HeLa-Zellen, auf den Entzug von Glukose oder Aminosäuren mit einer erhöhten autophagischen Aktivität reagieren (Chen et al., 2018, Kim et al., 2011), zeigten neuronale SH-SY5Y-Zellen interessanterweise keine signifikante Erhöhung des autophagischen Fluxes in Reaktion auf Glukose- oder Aminosäureentzug (vgl. Abbildung 20). Der Entzug der Aminosäuren ließ jedoch einen leichten Trend zu einem erhöhten autophagischen Flux vermuten. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit Beobachtungen von *Maday et al.* und *Gerónimo-Olvera et al.*, die Versuche in primären Neuronen von Maus und Ratte durchgeführt haben. Die Vergleichbarkeit der gefundenen Beobachtungen ergibt sich dabei aus dem neuronalen Ursprung der SH-SY5Y-Zellen. Es bleibt allerdings zu beachten, dass es sich bei dieser neuronalen Zelllinie um undifferenzierte Zellen handelt. *Maday et al.* zeigten, dass der vierstündige Entzug von Aminosäuren bzw. Aminosäuren und Glukose durch die Kultivierung muriner, hippocampaler Primärneurone in ACSF bzw. Glukose depletiertem ACSF keinen Einfluss auf die Autophagie in Axon oder Zellsoma hat (Maday and Holzbaur, 2016). Ein Anstieg der LC3-II-Spiegel konnte zwar unter zweistündigem Glukoseentzug in kortikalen, primären Rattenneuronen gezeigt werden, allerdings verursachte die Behandlung mit Chloroquine, keinen weiteren Anstieg der LC3-II-Spiegel (Geronimo-Olvera et al., 2017). Chloroquine ist ähnlich wie Bafilomycin A1 ein Inhibitor der lysosomalen Funktion, fungiert aber nicht wie Bafilomycin A1 über die Inhibition der lysosomalen vATPase, sondern erhöht den lysosomalen pH-Wert (Homewood et al., 1972).

Dass der Entzug von Glukose nicht zu einer Aktivierung des autophagischen Fluxes führt, ist in Teilen nachvollziehbar, da nicht nur die für die Autophagie wichtigen Chaperone, sondern auch die Formation der ATG12-ATG5- und LC3-PE-Komplexe, sowie die Ansäuerung der Lysosomen ATP-abhängig sind (vgl. 1.2.3, 1.3, (Mindell, 2012)). Inwiefern die Menge an durch Autophagie freigesetzter Peptide und Aminosäuren für die Generation von ATP ausreichend ist oder welcher Anteil dieser Peptide und Aminosäuren für die Energiegewinnung genutzt wird, bleibt vorerst ungeklärt. Allerdings sprechen die Befunde verschiedener Arbeitsgruppen

dafür, dass ohne Glukose Autophagie nicht stattfinden kann (Nwadike et al., 2018, Ramirez-Peinado et al., 2013).

Die erhöhte Autophagie in HeLa-Zellen als Reaktion auf einen Entzug von Aminosäuren ist sicherlich als Versuch zur Aufrechterhaltung anaboler Prozesse durch die Generation von Synthesebausteinen zu verstehen. Der ausbleibende Anstieg des autophagischen Flux unter Aminosäureentzug in SH-SY5Y-Zellen muss etwas näher diskutiert werden. Zwar konnten Maday und Holzbaur ebenfalls zeigen, dass ein Aminosäureentzug keinen Einfluss auf autophagische Prozesse in neuronalen Zellen hat (Maday and Holzbaur, 2016), allerdings nutzten sie für ihre Experimente ausdifferenzierte Primärneuronen. Die im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit genutzten SH-SY5Y-Zellen sind zwar neuronalen Ursprungs, es handelt sich aber um proliferierende Neuroblastomzellen. Des Weiteren konnten *Mejlvang et al.* den Abbau autophagischer Rezeptorproteine wie NDP52 und TAX1BP1 unter vierstündigem Aminosäureentzug in SH-SY5Y und damit eine Induktion des lysosomalen Abbaus nachweisen. Sie argumentierten aber, dass dieser Abbau nicht über makroautophagische Prozesse abläuft (Mejlvang et al., 2018). Sollten sie mit ihren Beobachtungen Recht behalten, könnte dies eine Erklärung für den fehlenden Anstieg der autophagischen Aktivität in den von mir genutzten SH-SY5Y-Zellen darstellen, die nur für zwei Stunden einem Aminosäureentzug ausgesetzt waren. Dagegen spricht allerdings der Anstieg des autophagischen Fluxes in HeLa-Zellen, wenn man davon ausgeht, dass beide Zellsysteme ähnlich reagieren. Andernfalls könnten diese Beobachtungen durchaus eine unterschiedliche Reaktion neuronaler Zellen auf einen Aminosäureentzug implizieren. Eine andere Möglichkeit für die fehlende Signifikanz des autophagischen Fluxes des Aminosäureentzugs in SH-SY5Y-Zellen könnte die hohe Streuung der Werte sein, da im Mittel durchaus ein Trend für einen erhöhten Flux zu sehen ist.

Zusammenfassend entsprechen die in dieser Arbeit gefunden Ergebnisse zum Entzug von Glukose und Aminosäuren in neuronalen und nicht neuronalen Zellsystemen den Beobachtungen bereits veröffentlichter Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Der Entzug von Aminosäuren, aber nicht von Glukose führt zu einer Aktivierung der Autophagie in HeLa-Zellen, während ein Entzug von Aminosäuren oder Glukose in neuronalen SH-SY5Y-Zellen keinen signifikanten Effekt auf die Autophagie zeigt. Neuronale Zellen sind damit nicht in der Lage dem Entzug von Nährstoffen mit einer erhöhten autophagischen Aktivität zu begegnen. Die fehlende Reaktion des autophagischen Fluxes auf den Glukoseentzug unterstützt den Verdacht, dass Glukose für eine funktionale Autophagie nötig ist. Weiterführend sollten allerdings die Entzugsversuche für die SH-SY5Y-Zellen erneut durchgeführt werden, um die durch die starke Streuung der Werte verursachte mögliche Verzerrung der Mittelwerte zu überprüfen.

6.2 BAG3 interagiert mit Syntaxin-1 in synaptosomalen Präparationen aus Rattenhippocampus und -cortex

Iorio et al. konnten 2015 zeigen, dass BAG3 an der Ausschüttung insulinhaltiger Vesikel in β -Zellen des Pankreas beteiligt ist. Sie formulierten ein Modell, bei dem BAG3 unter basalen Bedingungen an die SNARE-Proteine SNAP25 und Syntaxin-1 gebunden ist und somit deren Interaktion miteinander inhibiert. Unter Glukosestimulation wird die Interaktion von BAG3 und SNAP25 über die Phosphorylierung von BAG3 unterbrochen und die Bildung des t-SNARE-Komplexes, sowie die Vesikelausschüttung ermöglicht (*Iorio et al.*, 2015).

Um die Arbeitshypothese einer BAG3-vermittelten, neuronalen Vesikelausschüttung zu überprüfen, wurden zunächst Immunopräzipitationen mit synaptosomalen Präparationen durchgeführt, um die Interaktion zwischen BAG3 und Syntaxin-1 bzw. SNAP25 im neuronalen System zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst ein Isolationsprotokoll für Synaptosomen etabliert, das sich am Isolationsprotokoll von Gray und Whittaker orientiert (*Gray and Whittaker*, 1962). Die in den Abbildungen 21 und 22 dargestellten Ergebnisse zeigen dabei deutlich den Erfolg des hier verwendeten Protokolls bei der Isolation von Synaptosomen.

So wurden, wie erwartet, die Proteine SNAP25, PSD95, und TOM20 in der synaptosomenhaltigen Interphase aufkonzentriert. SNAP25 ist als SNARE-Proteine an der vesikulären Ausschüttung von Neurotransmittern beteiligt und vor allem in der Präsynapse lokalisiert (*Giniatullin et al.*, 2006, *Osen-Sand et al.*, 1996, *Zhang et al.*, 2011a). PSD95 ist das Protein mit der größten Häufigkeit in der Postsynapse (*Cheng et al.*, 2006, *Cho et al.*, 1992). Es ist an der Stabilisierung, der Rekrutierung und dem Transport von NMDARs und AMPARs beteiligt (*Chen et al.*, 2000, *Kornau et al.*, 1995) und ist essentieller Bestandteil glutamaterger Transmission, synaptischer Plastizität und dendritischer Dornmorphogenese (*dendritic spine morphogenesis*) (*Funke et al.*, 2005, *Gilman et al.*, 2011, *Kim and Sheng*, 2004). Auch die Anwesenheit von TOM20 als mitochondriales Protein in der Interphase bestätigte den Erfolg des Protokolls. Sowohl die Anwesenheit von Mitochondrien in der Präsynapse, als auch die Möglichkeit der Isolation von Mitochondrien aus synaptosomalen Präparationen konnten bewiesen werden (*Lai and Clark*, 1976, *Misgeld and Schwarz*, 2017). Membranmarker wie GM130 oder CNPase waren nicht oder nur schwach in der Interphase zu finden, und zeigten ihr stärkstes Signal wie erwartet, in deutlich größeren Fraktionen. GM130 als golgiassoziiertes Protein und CNPase als myelinassoziiertes Protein sollten nicht in der Interphase zu finden sein (*Derby et al.*, 2007, *Gravel et al.*, 1996, *Hinman et al.*, 2008, *Kasama-Yoshida et al.*, 1997). Zum einen ist der Golgi ausschließlich auf das Zellsoma beschränkt und zum anderen sollten Synaptosomen, bestehend aus Prä- und Postsynapse, keine Myelinschicht aufweisen. Dass

trotzdem Banden für beide Proteine innerhalb der synaptosomentragenden Interphase detektiert werden konnten, liegt an Membran-/Myelinresten, die laut Blitz und Fine häufiger Verunreinigungen in solchen Präparationen bilden (Blitz and Fine, 1974).

Die Anwesenheit von BAG3 in Synaptosomen, die erstmals von *Bruno et al.* beschrieben (Bruno et al., 2014, Bruno et al., 2008) wurde, konnte wie die Abbildungen 21 und 22 zeigen bestätigt werden.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, die Dichtegradientenzentrifugation bereits mit der S1-Fraktion anstatt der P2-Fraktion durchzuführen (vgl.4.2.1.6), wie es Abbildung 22 verdeutlicht.

Die nach der erfolgreichen Etablierung des Isolationsprotokolls mit BAG3 durchgeführten Immunopräzipitationen aus synaptosomalen Präparationen (vgl. Abbildung 23) bestätigten die von Iorio et al. gefundenen Interaktion zwischen BAG3 und Syntaxin-1 (Iorio et al., 2015). Allerdings sind sie nicht in der Lage die Interaktion zwischen BAG3 und SNAP25 vollständig zu bestätigen. Es zeigte sich zwar ein SNAP25-Signal in der mit einem N-terminalen BAG3 Antikörper durchgeführten Präzipitation (Abbildung 23 B), doch die Präzipitationen mit dem C-terminalen BAG3 Antikörper zeigten kein eindeutiges SNAP25-Signal (Abbildung 23 A). Eine Interaktion von BAG3 mit HSP70, wie sie bereits beschrieben wurde, konnte in beiden Immunopräzipitationen bestätigt werden (Takayama et al., 1999).

Von Interesse ist, dass die für Syntaxin-1 und SNAP25 gefundenen Signale keine Anreicherung in der mit BAG3 durchgeführten Präzipitation zeigten. Dies galt sowohl für den N-Terminalen, als auch für den C-Terminalen Antikörper. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine recht geringe Menge an Syntaxin-1 bzw. SNAP25 sein, die mit BAG3 interagiert, und die selbst unter Anreicherung in der Präzipitation nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtmenge der SNARE-Proteine ausmacht. Eine einfachere Erklärung wäre allerdings, dass die Waschkonditionen der Magnetkügelchen nicht optimal für diese Immunopräzipitation sind. Hierfür würden unter Umständen die fehlgeschlagenen IPs mit Syntaxin-1 und SNAP25 für BAG3 sprechen (nicht in dieser Arbeit dargestellt).

Die Ergebnisse für die Detektion von SNAP25 sind erst einmal erstaunlich, da die IP unter gleichen Bedingungen nur für den N-terminalen BAG3-Antikörper ein deutlich zuordenbares SNAP25-Signal zeigte. Dies könnte darauf schließen lassen, dass eine mögliche Interaktion zwischen BAG3 und SNAP25 im C-terminalen Abschnitt von BAG3 stattfindet. Der hier genutzte, gegen ein Peptid von Aminosäure 275-575 erzeugte C-terminale Antikörper, könnte in der Lage sein, die Interaktion zu blockieren. Hiergegen würde aber zunächst einmal die erfolgreiche Detektion von HSC70 sprechen, da diese Interaktion an der im C-Terminus

befindlichen BAG3-Domäne erfolgt. Ausgenommen eine Interaktion zwischen BAG3 und SNAP25 würde weiter N-terminal, z.B. in der PxxP-Domäne stattfinden.

Eine weitere Erklärung für diesen Umstand könnten die Beobachtungen von *Bruno et al.* liefern, die eine kleinere, synaptosomenassoziierte Isoform von BAG3 beschrieben, die sie nur mit Hilfe eines N-terminalen Antikörpers detektieren konnten (Bruno et al., 2008). Sollte eine C-terminal verkürzte Isoform von BAG3 mit SNAP25 interagieren, bestände die Möglichkeit, dass sie nicht vom C-terminalen Antikörper detektiert werden kann. Wieso allerdings weiterhin Syntaxin-1 für beide Antikörpervarianten detektiert werden kann bliebe in diesem Fall unklar.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus 5.2.1 und 5.2.2, die erfolgreiche Etablierung eines Protokolls zur Isolation von Synaptosomen und die Interaktion von BAG3 mit Syntaxin-1 in Synaptosomen. Fortführend wird es von Wichtigkeit sein, die mögliche Interaktion zwischen BAG3 und SNAP25 weiter zu untersuchen, für die es hier zwar Hinweise gibt, welche allerdings schlussendlich nicht vollständig bestätigt werden konnte. Eine weitere Optimierung des IP-Protokolls und die Nutzung verschiedener N-terminaler Antikörper könnte weitere Klarheit schaffen. Immunopräzipitationen mit SNAP25 und Syntaxin-1 sollten noch einmal wiederholt werden, um die hier gefundenen Ergebnisse zu verifizieren oder zu falsifizieren.

Eine Untersuchung der Vitalität der isolierten Neurone, das Vorkommen von neurotransmitterhaltigen Vesikeln und die Möglichkeit der Vesikelausschüttung sollte ebenfalls vorgenommen werden. Zerstörte Synaptosomen oder durch die Isolation verursachte Ausschüttungen der Transmitter könnten potentiell negative Einflüsse auf die Interaktion der drei untersuchten Proteine haben. Die Überprüfung der Vitalität der Synaptosomen und die Anwesenheit von Neurotransmittervesikeln kann über eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Morphologie oder eine elektronenmikroskopische Färbung von Neurotransmittern bzw. deren Vesikel stattfinden.

6.3 Ausschließlich die 74 kDa große BAG3 Isoform ist in synaptosomalen Präparationen aus Rattenhippocampus und -cortex zu finden.

Wie bereits erörtert, konnten *Bruno et al.* 2008 eine kleinere, synaptosomenassoziierte Isoform von BAG3 beschreiben (Bruno et al., 2008), die allerdings nicht weiter charakterisiert wurde. In dieser Arbeit sollten mögliche Mechanismen des Zustandekommens der von *Bruno et al.* beschriebenen, kleineren BAG3-Isoform untersucht werden.

Die ersten Ergebnisse aus 5.2.3 sprachen zunächst für die Existenz einer kleineren Isoform von BAG3. Abbildung 24 A zeigt zusätzlich zu den erwarteten BAG3 Signalen bei ca. 75 kDa ein weiteres Signal bei ca. 43 kDa, das nicht mit einem C-terminalen Antikörper detektierbar und ausschließlich in Aufreinigungen von Hirnhomogenaten, nicht aber in SH-SY5Y-Zellen zu finden war. Die Befunde in den SH-SY5Y-Zellen sind nicht zwingend unerwartet, wenn man von einer synaptosomalen Assoziation der kleineren BAG3-Isoform ausgeht. SH-SY5Y-Zellen befinden sich als proliferierende Zellen im undifferenzierten Zustand und bilden entsprechend keine Synapsen aus. Interessant war allerdings das in der P1-Fraktion erkennbare Signal für die kleinere BAG3-Isoform, die laut Protokoll keine Synaptosomen enthalten sollte. Es besteht allerdings die Möglichkeit einer nicht vollständigen Trennung, die einen Anteil an Synaptosomen in der P1-Fraktion ermöglicht. Dagegen spricht an dieser Stelle zum Teil, dass das BAG3-Signal für die kleinere Isoform in der P2-Fraktion nur marginal stärker ist als in der P1-Fraktion. Eine entsprechende Ladekontrolle fehlt an dieser Stelle aufgrund der Fraktionierung. Vergleicht man die Ergebnisse der BAG3-Detektion für P1- und P2-Fraktion mit den Ergebnissen von *Bruno et al.* zeigen sich für beide Fraktionen Übereinstimmungen, da auch *Bruno et al.* ein entsprechendes Signal in der P1-Fraktion detektieren konnten (Bruno et al., 2008).

Eine kleinere BAG3-Isoform, die nicht mit einem C-terminalen Antikörper gegen das Peptid 275-575 von BAG3 detektiert werden kann, könnte auf eine C-terminal trunkierte mRNA von BAG3 hindeuten oder auf ein mögliches *RNA-Editing* über APOBECs. Die Deaminierung von Cytosinen durch APOBECs führt zur Bildung von Uracil, was zu frühen Stopp-Codons in der mRNA führen kann. Für die Untersuchung des Zustandekommens der kleineren BAG3-Isoform wurde zunächst BAG3-RNA aus verschiedenen Teilen des Rattengehirns isoliert und die mittels reverser Transkription erhaltene cDNA auf einem Agarosegel analysiert. Hierbei ist zu beachten, dass die *Primer* unter der Annahme eines gleichen 3'-UTRs für beide Isoformen erstellt wurden. Wie die Ergebnisse in 5.2.3 in den Abbildungen 26 und 27 zeigen, konnte weder eine durch eine Trunkierung verkürzte mRNA in der Analyse mittels Agarosegel, noch irgendwelche durch APOBECs erzeugte Stoppcodi in der Sequenzierung der cDNA und

im Aminosäurealignement gefunden werden. Ein Austausch von Cytosin mit Uracil würde sich in der Sequenzierung als doppeltes Signal bemerkbar machen, was allerdings nicht beobachtet werden konnte. Die Beobachtungen sprechen gegen eine kleinere BAG3-Isoform bzw. gegen die Entstehung der kleineren Isoform über mRNA Trunkierung oder *RNA-Editing*. Diese Interpretation kann dabei nur unter der Annahme eines gleichen 3'-UTRs für beide BAG3-Isoformen durchgeführt werden. Es ist also von Wichtigkeit, diese Annahme zu überprüfen.

Bruno et al. nutzen zur Verifizierung der von ihnen im Westernblot gefundenen kleineren BAG3-Isoform massenspektrometrische Analysen. In einem weiteren Versuch, die Existenz einer kleineren BAG3-Isoform zu verifizieren, wurden, wie in Abbildung 28 dargestellt, Gelabschnitte eines mit Coomassie gefärbten Gels in Höhe der Signale für BAG3 ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Untersuchung geschickt. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem N-terminalen BAG3-Antikörper. Tabelle 16 zeigt, dass in allen drei Durchläufen der massenspektrometrischen Analyse nur in der 74 kDa großen Exzision zuverlässig BAG3 detektiert werden kann. Eine Detektion von BAG3 in der 43 kDa großen Exzision konnte nicht bestätigt werden, was den Ergebnissen von *Bruno et al.* widerspricht.

Die Existenz einer kleineren, synaptosomenassoziierten BAG3-Isoform konnte im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht oder nur teilweise bestätigt werden. Die im Westernblot gefundenen BAG3-Signalen bei ca. 43 kDa sprachen zwar für die Existenz einer kleineren Isoform, allerdings widersprachen dem die Ergebnisse der parallel durchgeführten Massenspektrometrie. Es gab auch keinen Hinweis darauf, dass diese kleinere Isoform durch mRNA-Trunkierung oder *RNA-Editing* entstände. Allerdings bleiben die Einschränkungen bestehen, dass die Analyse der mRNA bzw. cDNA auf der Annahme beruht, dass die mRNAs beider Isoformen die gleiche 3'-UTR besitzen, was zumindest die Größenanalyse der Agarosegelbanden weniger aussagekräftig macht. Die Sequenzierung der erstellten cDNAs zeigte keinen Austausch von Cytosin mit Uracil oder weitere Hinweise für die Entstehung möglicher Stoppcodons. Für eine endgültige Aussage muss dieser Versuch jedoch noch mindestens zweimal wiederholt werden. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass der von *Bruno et al.* genutzte Antikörper nicht mehr erwerblich ist, was eine genaue Reproduktion ihrer Westernblotbeobachtungen erschwert.

6.4 NMII-C/MYH14 ist hauptsächlich im Cytosol lokalisiert und interagiert mit BAG3

Das Co-Chaperon BAG3 übernimmt in einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine wichtige Funktion. So auch in der Wartung von Filamin, in der korrekten Lokalisation von CapZ β 1 und in der Sicherstellung der richtigen Orientierung des Spindelapparates und des Abbaus des kontraktilen Aktinrings während der Cytokinese (Fuchs et al., 2015, Hishiya et al., 2010, Nakamura et al., 2011, Varlet et al., 2017). In all diesen Prozessen beeinflusst oder interagiert BAG3 mit Komponenten des Aktincytoskeletts. Entsprechend ist es nicht verwunderlich, dass in einer von der AG Behl in Kooperation mit dem SFB 1177 und der Goetheuniversität Frankfurt durchgeführten, massenspektrometrischen Interaktomanalyse auf der Suche nach potentiellen BAG3 Interaktoren viele Proteine des Aktincytoskeletts zu finden sind (Daten noch nicht veröffentlicht). Hierzu setzten sie HEK293-T-Zellen zwei verschiedenen Stressbedingungen aus; cytotoxischem Stress durch Transfektion von SOD1-G85R-GFP oder proteostatischem Stress durch MG132-Behandlung. Nach der Behandlung wurden endogene Immuno-präzipitationen mit BAG3 durchgeführt und diese via Massenspektrometrie analysiert. Einer der vorläufig gefundenen Interaktoren war das nicht muskuläre Myosin II-C (NMII-C/MYH14), dessen Interaktion mit BAG3 in dieser Arbeit untersucht wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten, endogenen Immunopräzipitationen mit BAG3 wurden in Hep-G2-Zellen realisiert. Die Begründung für den Gebrauch von Hep-G2-Zellen an Stelle von HEK293-T-Zellen liegt in der Menge des endogen vorhandenen NMII-C/MYH14 in den verschiedenen Zelltypen. Hep-G2-Zellen besitzen höhere Expressionsspiegel von MYH14 als HEK293-Zellen, was die endogene Co-Präzipitation von MYH14 und BAG3 vereinfachen sollte (vgl. Abbildung 46). Die Immunopräzipitationen bestätigten die in der massenspektrometrischen Interaktomanalyse gefundene Interaktion zwischen BAG3 und MYH14. So zeigen die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse deutlich ein MYH14-positives Signal in der BAG3-IP. Des Weiteren bestätigten sie die erfolgreiche Präzipitation von BAG3 durch die Detektion entsprechender BAG3-Signale und über die Co-Präzipitation des Chaperons HSP70. Allerdings verdeutlicht Abbildung 29 auch ein Problem der durchgeführten Immunopräzipitationen. Der Versuch 0123 zeigt im Gegensatz zum Versuch 0122 kein MYH14-Signal in der BAG3-IP und beschreibt damit die Schwierigkeit einer zuverlässigen Co-Präzipitation von MYH14 und BAG3, die sich durch die verschiedenen Versuchswiederholungen zog. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine indirekte Interaktion zwischen BAG3 und MYH14 sein, die von bisher unbekanntem Faktoren abhängt.

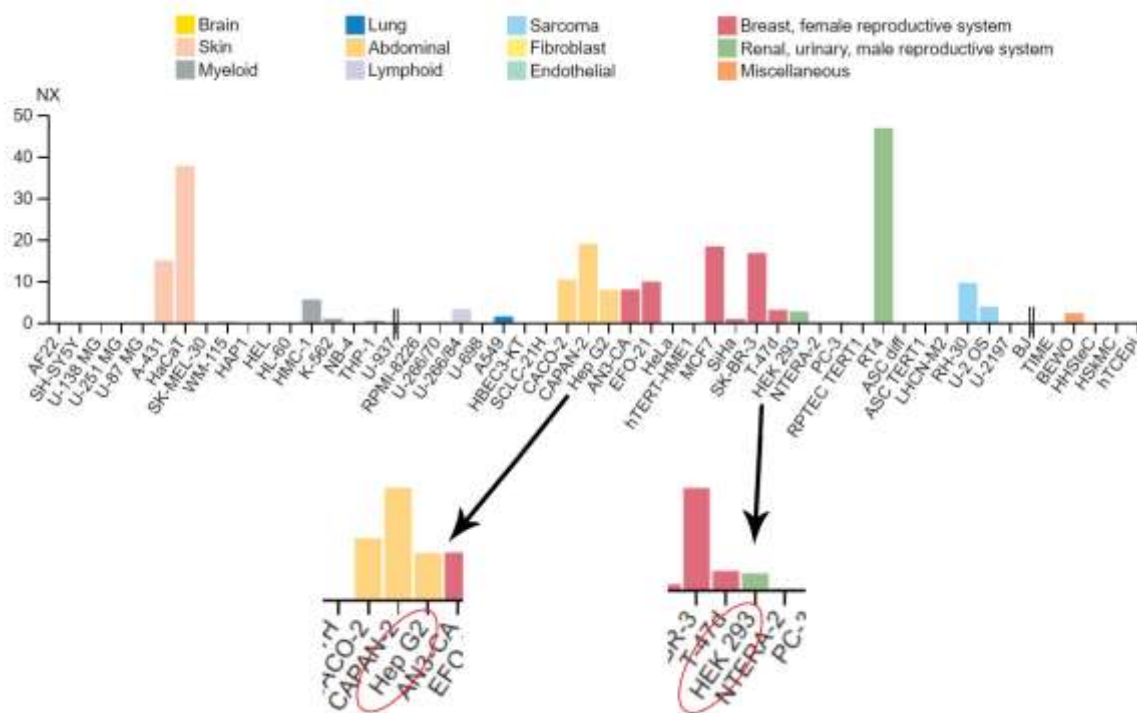


Abbildung 46: Schematische Darstellung der relativen MYH14-Expressionsspiegel in verschiedenen Zelllinien. Aus dem *Human Protein Atlas* übernommene und abgeänderte, bildliche Darstellung der relativen Expressionsspiegel von MYH14 in verschiedenen Zelllinien. Vergrößert dargestellt sind die in dieser Arbeit genutzten Hep-G2- und HEK293-Zellen.

Die Befunde der Immunpräzipitationen sollten im nächsten Schritt immunocytochemisch über die Co-Lokalisation von BAG3 und MYH14 in entsprechend gefärbten Zellen erweitert werden. Hierzu wurden zunächst Einzelfärbungen für BAG3 und MYH14 durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation beider Proteine zu untersuchen. BAG3 zeigte eine cytosolische Lokalisation mit einem, vor allem in HeLa-Zellen starken, nukleären Signal in allen getesteten Zellen. Diese Beobachtungen stehen zum Teil im Einklang mit Ergebnissen von *Jin et al.* die eine nukleäre Lokalisation von BAG3 unter Hitzestress zeigen konnten (Jin et al., 2015) und mit den Ergebnissen der von der AG Behl durchgeführten, massenspektrometrischen Interaktomanalyse, welche mehrere nukleäre Proteine als mögliche BAG3 Interaktoren aufführt (Daten noch nicht veröffentlicht). Die gewonnenen Daten zur Lokalisation von BAG3 stimmten zusätzlich mit den Daten aus *Genecards* (Stand 26.04.2020) und dem *Human protein atlas* (Stand 26.04.2020) und mit den Ergebnissen der hier durchgeführten subzellulären Fraktionierung in transfizierten und untransfizierten HEK293-T-Zellen überein (vgl. Abbildungen 33 und 37).

Die nukleäre Färbung von BAG3 und die damit potentiell einhergehende nukleäre Lokalisation bedarf weiterer Klärung. Die von *Jin et al.* berichteten Beobachtungen für die Lokalisation von

BAG3 beziehen sich auf hitzestressierte Zellen, was bei den hier vorliegenden Ergebnissen nicht der Fall ist. Eine Überexpression FLAG-markierter BAG3-Konstrukte zeigte ebenfalls kein nukleäres Signal in HEK293-A-, HEK293-T- und Hep-G2-Zellen (vgl. Abbildung 31). Allerdings bestünde die Möglichkeit in diesem Fall, dass die Markierung von BAG3 mit FLAG, eine nukleäre Lokalisation verhindert. So konnte für GFP gezeigt werden, dass eine N- oder C-terminale Markierung einen unterschiedlichen Effekt auf die Lokalisation von Proteinen besitzt (Weill et al., 2019). Verifizierte Färbungen von BAG3 in A-431-, U-2 OS- und U-251 MG-Zellen, wie sie der *Human Protein Atlas* darstellt, zeigen auch eine eher cytosolische Lokalisation von BAG3. Die hier in Fraktionierungen gefundenen nukleäre Lokalisation von BAG3, zusammen mit den Erkenntnissen von *Ammirante et al.* (Ammirante et al., 2011) und *Gupta et al.* (Gupta et al., 2019) sprechen für eine mögliche nukleäre Lokalisation von BAG3. Zusammengefasst ist eine nukleäre Lokalisation von BAG3 wahrscheinlich, bedarf aber weiterer Untersuchungen.

Eine weitere Beobachtung im Zusammenhang mit BAG3 ist das mitochondriale BAG3-Signal in den Fraktionierungen transfizierter Zellen, welches nicht in den Fraktionierungen untransfizierter, als Kontrolle genutzter HEK293-T-Zellen beobachtet werden konnte. Hierbei kann es sich zunächst um eine Verunreinigung handeln. Eine andere Hypothese, die auf der BAG3 vermittelten Qualitätskontrolle von Mitochondrien in Kardiomyocyten aufbaut, ist, dass der durch die Kalziumphosphattransfektion erzeugte zelluläre Stress zu einem erhöhten Bedarf mitochondrialer Qualitätskontrolle durch BAG3 führt. Hierfür würde sprechen, dass die Calciumkonzentration einen wichtigen Einfluss auf die mitochondriale Funktion ausübt (Duchen et al., 2008) und eben jene durch eine Transfektion mit Kalziumphosphat erhöht wird.

Ähnlich wie für BAG3 zeigten Färbungen von endogenem NMII-C/MYH14 ein cytosolisches und ein nukleäres Signal, wobei das nukleäre Signal deutlich stärker war als das cytosolische. Damit entsprechen die Färbungen des hier genutzten C-terminalen Antikörpers den Daten des *Human Protein Atlas*, die bei der Nutzung eines N-terminalen MYH14-Antikörpers nukleäre Signale in MCF-7-, RT4- und U-2 OS-Zellen zeigen. Eine Untersuchung der Co-Lokalisation zwischen MYH14 in FLAG-BAG3 transfizierten Zellen fällt, wie in Abbildung 32 dargestellt, entsprechend negativ aus. In einem Vergleich der in den Immunofärbungen gefundenen Lokalisation von MYH14 (vgl. Abbildung 30, 32) mit den Ergebnissen der subzellulären Fraktionierung (vgl. Abbildung 33, 34), zeigte sich ein Widerspruch für die Lokalisation von MYH14. Die Fraktionierung zeigten eine deutliche Lokalisation von MYH14 im Cytosol. Es konnte zwar äußerst schwache Signale für MYH14 in der nukleären Fraktion beobachtet werden, allerdings handelte es sich hierbei vermutlich um Verunreinigungen, wie die leichte Tubulin-Bande für n4 in Abbildung 37 vermuten lässt. Die Immunfärbungen anderer Arbeitsgruppen mit sowohl N- als auch C-terminalen MYH14-Antikörpern sprechen ebenfalls

für eine eher cytosolische Lokalisation von MYH14 (Surcel et al., 2019, Takaoka et al., 2014, Wylie and Chantler, 2008). Die Überexpressionen verschiedener GFP-markierter MYH14-Konstrukte in immunocytochemischen Analysen zeigen ebenfalls fast ausschließlich cytosolische Signale (vgl. Abbildungen 34, 35, 36) (Almutawa et al., 2019, Jana et al., 2009). Allerdings bleibt auch hier der Einwand bestehen, dass die angehängte GFP-Markierung die zelluläre Lokalisation beeinflussen könnte (Weill et al., 2019). Betrachtet man zusätzlich die Funktionen von MYH14, wie z.B. in Cytokinese (Jana et al., 2006, Takaoka et al., 2014) und mitochondrialer Fragmentierung (Almutawa et al., 2019) wird eine cytosolische Lokalisierung von MYH14 wahrscheinlicher. Wie die nukleären Färbungen für MYH14 in den Abbildungen 29 und 31 und den Daten des *Human Protein Atlas* zustande kommen, bleibt ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Da BAG3 und NMII-C/MYH14 hauptsächlich im Cytosol lokalisiert sind, der hier genutzte MYH14-Antikörper aber ein hauptsächlich nukleäres Signal zeigt, wurden erneute Färbungen durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene, murine, GFP-markierte Spleißvarianten von MYH14 in HEK293-T-Zellen überexprimiert und mit einem C-terminalen BAG3-Antikörper gefärbt. Die Abbildungen 34 und 35 präsentieren die Ergebnisse dieser Färbungen und zeigen, dass BAG3 mit MYH14 co-lokalisiert. Ein Problem dieser Versuche bestand darin, dass sich durch die Überexpression von MYH14 teils relative große Aggregate in den Zellen zu bilden schienen (vgl. Abbildungen, 34-36) und dass sich MYH14 in aggresomähnlichen Strukturen in der Nähe der Nuclei anlagerte (gelbe Pfeile Abbildung 37). BAG3 co-lokalisierte dabei nicht nur mit den aggregierten MYH14-Strukturen (gelbe Pfeile in Abbildung 37, Bildvergrößerungen in Abbildung 36), sondern auch mit unaggregiertem MYH14 (Bildvergrößerungen in Abbildung 37). Die Co-Lokalisation von BAG3 mit MYH14-Aggregaten könnte auf einen BAG3 vermittelten Abbau von MYH14 deuten. Das Fehlen aggregatförmiger Signale von BAG3 könnte auf eine Eigenheit der HEK293-T-Zellen zurück zu führen sein. Beobachtungen unter MG132-Behandlung zeigen in HEK293-T-Zellen keine Entstehung perinukleärer Aggresomen, obwohl dies für HEK293-A- oder COS-7-Zellen beobachtet werden konnte (Beobachtungen hier nicht dargestellt).

Zusammenfassend implizieren die hier dargestellten und diskutierten Ergebnisse eine Interaktion zwischen BAG3 und MYH14, die höchst wahrscheinlich im Cytosol stattfindet. Ob es sich um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt, kann hier nicht geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Gemeinsame Interaktionspartner beider Proteine könnten hierbei Proteine des Aktincytoskeletts sein. Eine potentielle Verbindung zwischen BAG3 und MYH14 könnte über die 14-3-3 Proteine zustande kommen. Für diese Proteine konnte zum einen gezeigt werden, dass sie mit BAG3 interagieren und zusammen mit BAG3 an der Aggresombildung beteiligt sind (Ge et al., 2010, Xu et al., 2013) und zum anderen, dass sie

nicht nur wie Myosine ein wichtiger Faktor für die Cytokinese sind, sondern auch über die Interaktion mit der NMHC isoformspezifisch die Filamentformation aller nicht muskulären Myosine regulieren (West-Foyle et al., 2018, Zhou et al., 2010).

6.5 Der Knockdown von MYH14 in mit SOD1-G85R-GFP transfizierten Zellen erhöht die gemessenen GFP- und BAG3-Spiegel, verändert aber nicht die aggregativen Eigenschaften von SOD1-G85R-GFP

Da ich in dieser Arbeit MYH14 als möglichen BAG3-Interaktor bestätigen konnte, wurden im nächsten Schritt mögliche mit BAG3 assoziierte Funktionen von MYH14 untersucht. Arbeiten aus unserem Labor unter *Gamerding et al.* konnten eine Schlüsselfunktion von BAG3 im Abbau, bzw. der Akkumulation von mutanem SOD1 in Aggresomen nachweisen (Gamerding et al., 2011b). Eine darauf basierende Frage, mit der sich die hier vorliegende Arbeit beschäftigt hat, ist, ob MYH14 als potentieller BAG3-Interaktor einen Einfluss auf die BAG3 vermittelte Aggregation oder den Abbau von SOD1-G85R-GFP besitzt. Wie die Ergebnisse aus 5.4 zeigten, bewirkte der Knockdown von MYH14 einen Anstieg der GFP-Spiegel in mit SOD1-G85R-GFP transfizierten HEK293-T-Zellen (vgl. Abbildung 38), der nicht mit einer Änderung der aggregativen Eigenschaften von SOD1-G85R-GFP einherging (vgl. Abbildung 39). Eine signifikante Erhöhung der BAG3-Spiegel unter MYH14-Knockdown, was für eine Interaktion zwischen beiden Proteinen oder eine gegenseitige Regulation sprechen könnte, konnte ebenfalls beobachtet werden.

Die fehlende Veränderung des Anteils von SOD1-G85R-GFP an der SDS-löslichen oder SDS-unlöslichen Fraktion deutete darauf hin, dass die Erhöhung der SOD1-G85R-GFP-Spiegel unter MYH14 Knockdown kein Ergebnis einer verstärkten, aggresomalen Ansammlung war. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass entweder eine erhöhte SOD1-G85R-GFP-Produktion, oder möglicherweise eine gestörte Degradation für die Erhöhung der GFP-Spiegel verantwortlich ist. Die Induktion der Translation von SOD1-G85R-GFP durch einen MYH14-Knockdown ist eher unwahrscheinlich, da das entsprechende Plasmid nur transient und konstant über einen CMV-Promotor exprimiert werden sollte. Eine Langzeitanpassung der Zellen auf die Überexpression kann ausgeschlossen werden. Interaktionen des CMV-Promotors mit MYH14 bzw. MYH14-vermittelte Interaktionen mit einem CMV-Promotor oder entsprechend regulatorischen Elementen sind derzeit weitestgehend nicht bekannt. Allerdings besteht die Gefahr, dass es sich bei dem erhöhten GFP-Spiegel um ein Transfektionsartefakt handelt, d.h. es kam zu unterschiedlich starken

Transfektionen mit dem SOD1-G85R-GFP tragenden Plasmid. Eine dreimalige Wiederholung der gleichen Ergebnisse schließt ein Transfektionsartefakt zunächst aus, allerdings fehlt an dieser Stelle ein Abgleich der Expressionsspiegel zwischen den Versuchsgruppen. Beobachtungen von *Surcel et al.*, die durch eine pharmakologische Aktivierung der NMII-C-Filamentformation eine Erhöhung der Zellrigidität zeigen konnten, wären allerdings in der Lage eine erhöhte Transfektionsrate in MYH14-siRNA transfizierten Zellen zu erklären (Surcel et al., 2019). In diesem Fall würde eine Auflockerung des Aktinnetzwerks durch das Fehlen von MYH14 eine erleichterte Aufnahme der siRNA-tragenden Kalziumphosphatkristalle ermöglichen. Eine mögliche Kontrolle der Plasmid-aufnahme durch die Zellen kann annäherungsweise durch die einzelne Transfektion von EGFP tragenden Plasmiden, GFP-markiertem, wildtypischen SOD1 und unmarkiertem SOD1 erreicht werden. Transfektionen mit wildtypischem, GFP-gekoppeltem SOD1 wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt und zeigten keine signifikanten Unterschiede in den GFP-Spiegeln zwischen den verschiedenen siRNA-Transfektionen (nicht in dieser Arbeit dargestellt). Allerdings besaßen diese Kontrolltransfektionen aufgrund ihrer hohen Standardabweichung nur eine geringe Aussagekraft. Eine weitere Möglichkeit für die Ermittlung der Transfektions-effizienz ist die Bestimmung des Anteils plasmidtragender Zellen an der Gesamtzellzahl.

Für eine gestörte Degradation könnten die Beobachtungen von *Gamerdinger et al.* und *Crippa et al.* sprechen. Nach den Beobachtungen beider Arbeitsgruppen wird mutantes SOD1, wie für zwei verschiedene SOD1-Mutanten gezeigt werden konnten, über das autophagisch-lysosomale System abgebaut (Crippa et al., 2013, Crippa et al., 2010a, Crippa et al., 2010b, Gamerdinger et al., 2011b). Ein entsprechend gestörter Abbau würde zu einer Erhöhung der mutanten SOD1-Spiegel führen, die allerdings mit einer erhöhten Aggregationsneigung und Aggresom-bildung einhergehen sollte.

6.6 Die MYH14/NMII-C-Spiegel zeigen keine Beeinflussung durch MG132 und NMII-C beeinflusst nicht die BAG3 vermittelte Aggresombildung unter MG132-Behandlung

Neben der Beobachtung, dass BAG3 maßgeblich an der aggresomalen Lokalisierung von SOD1-G85R-GFP beteiligt ist, konnte eine Induktion von BAG3 unter proteasomaler Inhibition durch MG132 gezeigt werden (Gamerdinger et al., 2009, Gamerdinger et al., 2011b). Durch die Transfektion von HEK293-T-Zellen mit MYH14 siRNA und anschließender sechsständiger

Behandlung mit 10 μ M MG132 sollte ein Einfluss von MG132 auf NMII-C bzw. der Einfluss von NMII-C auf die BAG3 vermittelte Aggresombildung untersucht werden.

Wie die Ergebnisse aus 5.4.2 zeigen, konnte die erfolgreiche BAG3-Induktion durch MG132, wie sie auch schon von *Gamerding et al.* gezeigt wurde, bestätigt werden (Gamerding et al., 2009, Gamerding et al., 2011b). Die Verifizierung der Ergebnisse erfolgte hierbei über einen Anstieg der BAG3-Spiegel unter MG132-Behandlung (vgl. Abbildung 40) und über eine deutliche Abnahme aggresompositiven Zellen unter BAG3-Knockdown nach erfolgter MG132-Behandlung (vgl. 5.4.2.2). Bezüglich des Einflusses von MG132 auf die ProteinSpiegel von MYH14 konnte keinerlei Effekt beobachtet werden (vgl. Abbildung 40). Ein proteasomaler Abbau von NMII-C kann entsprechend ausgeschlossen werden.

Im Zusammenhang mit den Immunfluoreszenzfärbungen (vgl. Abbildung 36, 37) und der nachgewiesenen Interaktion zwischen BAG3 und MYH14 (vgl. Abbildung 29) könnte ein nicht proteasomaler Abbau für eine BAG3-vermittelte Degradation oder Aggregation von MYH14 sprechen. Auch die BAG3-vermittelte Bildung von Aggresomen wird nicht durch einen MYH14-Kockdown beeinflusst, wie die statistische Auswertung des Anteils aggresompositiver Zellen an der Gesamtzellzahl zeigen konnten (vgl. Abbildung 41). Eine ungewöhnliche Beobachtung war, dass die Anzahl der aggresompositiven Zellen in nonsense siRNA, ähnlich wie in mit BAG3 siRNA transfizierten Zellen, im Vergleich zu Mock transfizierten Zellen reduziert ist und sich keine Unterschiede zwischen ns und BAG3 siRNA-Transfektion zeigten. Entsprechend war ein Unterschied zwischen MYH14-Knockdown und ns siRNA Transfektion ebenso unerwartet. Eine mögliche Erklärung wäre eine Kontamination der ns siRNA mit BAG3 siRNA, die allerdings durch Lysatanalysen mittels Westernblot ausgeschlossen werden konnte. Warum eine Transfektion mit ns siRNA im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen zur Reduktion der aggregatpositiven Zellen führt, bleibt vorerst ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Von Interesse wäre in diesem Zusammenhang zusätzlich zur Anzahl der aggresompositiven Zellen, die exakte Größe der gebildeten Aggresome zu vergleichen.

Zusammenfassend deuten die hier gefundenen Ergebnisse aus 5.4 daraufhin, dass MYH14/NMII-C nicht an der BAG3-vermittelten Aggresombildung beteiligt ist und die gefundenen Interaktion beider Proteine nicht in diesem Prozess stattfindet. MYH14 scheint des Weiteren nicht proteasomal, sondern möglicherweise BAG3-vermittelt degradiert zu werden.

6.7 MYH14/NMII-C besitzt einen signifikanten Einfluss auf den autophagischen Flux

Autophagische Prozesse sind komplexe Vorgänge, die nicht nur einer genauen und komplexen Regulation durch verschiedenste Signalwege unterliegen, sondern auch auf Elemente des Cytoskeletts wie Mikrotubuli oder das Aktinnetzwerk zur korrekten Funktion angewiesen sind (vgl. 1.2). So konnten Versuche zeigen, dass, noch vor der Rekrutierung von LC3, Aktinfilamente mit dem Omegasom co-lokalisieren. Entsprechend wird die Funktion von Aktin in frühen Phasen der Autophagie mit der Generierung von PI3P verknüpft (Aguilera et al., 2012). WHAMM, ein Aktinnukleator, ist an Omegasomen lokalisiert, wo er, durch die Rekrutierung des ARP2/3-Komplexes, unter Nährstoffentzug die Entstehung komplexer Aktinnetzwerke in der expandierenden Phagophore fördert, was möglicherweise, als Rahmenwerk, die Fusion der beiden Phagophorenden begünstigt (Holland and Simonsen, 2015, Kast and Dominguez, 2015, Mi et al., 2015). Beim ARP2/3-Komplex handelt es sich um einen sieben Untereinheiten großen, aktinassozierten Proteinkomplex und einem von drei Aktinnukleatoren, der ATP-abhängig dazu in der Lage ist einzelne Aktinfilamente in verzweigte Aktinnetzwerke umzubauen (Goley and Welch, 2006). Die Depletion von CapZ, einem für die Aktinfilamentstabilität wichtigen Protein, führt zum Verlust von verzweigten Aktinnetzwerken und damit zum Zusammenbruch der schalenförmigen Phagophore. Es entstehen verlängerte, tubuläre Strukturen, die sowohl positiv für DFCP1, als auch LC3 sind (Edwards et al., 2014, Holland and Simonsen, 2015). Es ist also nicht verwunderlich, dass aktinassozierte Proteine ebenfalls einen Einfluss auf autophagische Prozesse ausüben können oder wichtig für deren korrekte Funktion sind.

Für verschiedene Myosine konnte gezeigt werden, dass sie wichtige Funktionen während der Makroautophagie übernehmen. Myosin VI (MYO6) ist an dem Transport endosomaler Membranen zum Autophagosom während der autophagosomalen Reifung beteiligt und Myosin 1C (MYO1C) scheint mit seiner Funktion in der Cholesterollhomöostase in der Lage zu sein, Makroautophagie direkt zu beeinflussen (Brandstaetter et al., 2012, Tumbarello et al., 2013, Tumbarello et al., 2012). Eine Depletion von MYO1C führt zur Akkumulation von autophagischen Organellen, die auf eine blockierte Fusion von Autophagosomen bzw. Amphisomen mit Lysosomen zurückzuführen sind (Koga et al., 2010, Kruppa et al., 2016). Das nicht muskuläre Myosin II-A ist ebenfalls in autophagischen Prozessen impliziert. NMII-A ist mit Membranen des TGN assoziiert und es wird ULK1 abhängig durch ZIPK, einer RLCK, aktiviert. Entsprechend besteht, wie Versuche von *Tang et al.* zeigen konnten, die Möglichkeit, dass NMII-A entweder an der Formation ATG9-positiver Vesikel oder an deren Transport

beteiligt ist (Miserey-Lenkei et al., 2010, Tang et al., 2011). In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob NMII-C als nicht muskuläres Myosin und als Teil des Aktomyosinnetzwerks einen Einfluss auf die Makroautophagie besitzt.

Wie die Ergebnisse in 5.5 deutlich zeigen besitzt MYH14/NMII-C einen signifikanten Einfluss auf den autophagischen Flux unter normalen Kultivierungsbedingungen. Der Knockdown von MYH14 führte zu einer Induktion des LC3B-II- und des p62-Fluxes und damit zu einer Induktion makroautophagischer Prozesse (vgl. Abbildung 44), während eine Überexpression eine Reduktion beider Fluxe und damit der autophagischen Aktivität verursachte (vgl. Abbildung 45). Die NMII-C Spleißvarianten schienen sich dabei in ihrer Funktion nicht voneinander zu unterscheiden, was an dieser Stelle für die Überexpression und die damit einhergehende Reduktion der Fluxe deutlich gemacht werden konnte. Allerdings scheint die NMII-C1C2 Spleißvariante einen etwas stärkeren Effekt auf den p62-Flux zu zeigen, der im Vergleich zu den anderen Spleißvarianten allerdings nicht signifikant ist.

Ein möglicher Ansatzpunkt für eine Hypothese zur Erklärung der hier beobachteten Ergebnisse können aus den Versuchen und Ergebnissen von *Mleczack et al.* abgeleitet werden. In ihrer Arbeit von 2013 beschäftigten sie sich mit der Funktion von ROCK1 (Rho-Kinase 1), einer MRLC assoziierten Kinase, in makroautophagischen Prozessen. Durch Versuche in HEKT293-A- und HeLa-Zellen konnten sie zeigen, dass eine pharmakologische Inhibition von ROCK1, sowohl unter nährstoffreichen Kulturbedingungen als auch unter Aminosäureentzug die Lipidierung von GFP-LC3 erhöht und diese unter Bafilomycin A1-Behandlung weiter ansteigt. Zusätzlich beschrieben sie eine vermehrte Degradation von p62 unter ROCK1-Inhibition und die Entstehung vergrößerter Autophagosomen und Lysosomen. Die Induktion makroautophagischer Prozesse durch ROCK1-Inhibition schien dabei nicht durch die Beeinflussung des ATG9-Transports oder die Anreicherung von WIPI am Ort der entstehenden Autophagosomen verursacht worden zu sein. Allerdings beobachteten sie eine Anreicherung von ULK1 an den vergrößerten Autophagosomen, was sie zur Annahme einer verlängerten Elongation während der Formation der Autophagosomen veranlasste (Mleczak et al., 2013).

Die abgeleitete Hypothese, mit der die Ergebnisse des MYH14-Knockdowns erklärt werden könnten, ist wie folgt begründet: Aktives ROCK1, als eine Kinase der regulatorischen Ketten der nicht muskulären Myosine (vgl. 1.4.1) phosphoryliert und aktiviert MYH14/NMII-C. NMII-C wiederum ist in der Lage, im aktivierten Zustand Aktin zu binden und kraftausübende Filamente zu bilden, die entweder an der Formgebung bzw. der Größe der Autophagosomen über das Aktingerüst oder an der Abschnürung der Autophagosomen über mechanischen Zug am Aktinskelett beteiligt sind. Im ersten Fall würde eine Depletion von MYH14 zu einer Lockerung

des Aktinnetzwerks und einer Aufweitung des Aktingerüst innerhalb der Phagophoren führen, wodurch sich der Umfang der Autophagosomen vergrößert. Im zweiten Fall würde das Fehlen von MYH14 zu einer verlängerten Dauer der Autophagosomabschnürung führen, was möglicherweise zu einer verlängerten Expansion führt.

Eine ähnliche Funktion wie für NMII-A/MYH9 kann dabei zunächst ausgeschlossen werden, da der ATG9-Transport unter ROCK1-Inhibition unverändert bleibt.

Die Ergebnisse von *Mieczack et al.* sind allerdings nicht ganz unumstritten, wie Versuche von *Gurkar et al.* zeigen, die in ihrer Arbeit die genau gegenteilige Funktion von ROCK1 für die Autophagie beschreiben. In Glukose- und Aminosäureentzugsexperimenten in HeLa, HEK293-T- und IMR90-Zellen beschreiben sie, dass die Aktivierung von ROCK1 die Autophagie durch die phosphorylierungsbedingte Dissoziation Beclin1s von Bcl2 fördert und eine entsprechende Inhibition von ROCK1 die Beclin1-Bcl2-Interaktion erhöht (Gurkar et al., 2013).

Es bleibt also unklar, inwiefern ROCK1 die Autophagie beeinflusst. Zur Überprüfung der oben aufgestellten Hypothesen unter der Annahme das ROCK1 MYH14 aktiviert, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Hierzu zählen Experimente, die den Phosphorylierungsstatus von NMI-C/MYH14 unter ROCK1-Inhibition oder -Überexpression kontrollieren und Immunopräzipitationen, um eine Interaktion beider Proteine zu überprüfen, wobei dies bei transienten Interaktionen nicht ganz unproblematisch ist. Zusätzlich wäre es wichtig, die Interaktion oder Co-Lokalisation von MY14 mit Aktinfilamenten am Autophagosom, bzw. die Co-Lokalisation von MYH14 mit Autophagosomen entweder über elektronenmikroskopische oder Immunofluoreszenzfärbungen zu verifizieren oder falsifizieren.

6.8 Zusammenfassung

Die Ergebnisse und Erkenntnisse dieser Arbeit lassen sich in vier Punkten zusammenfassen.

Erstens konnte ich entsprechend der bereits vorhandenen Literatur zeigen, dass im Gegensatz zum Entzug von Aminosäuren Glukoseentzug keinen Einfluss auf den autophagischen Flux in nicht neuronalen Zellen besitzt. Des Weiteren reagieren neuronale Zellen auf Nährstoffentzug nicht mit einer Induktion der Autophagie, auch wenn sich eine leichte Tendenz unter Aminosäureentzug bemerkbar macht.

Zweitens wurde eine Interaktion zwischen BAG3 und Syntaxin-1, sowie SNAP25 in synaptosomalen Isolationen bestätigt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im Zusammenhang mit einer kleineren BAG3-Isoform steht. Eine kleinere BAG3-Isoform wurde zwar in der Literatur beschrieben, doch ihre Existenz konnte von mir nicht bestätigt werden. Die Interaktion zwischen BAG3 und SNAP25 bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

Drittens zeigte sich MYH14 als möglicher Interaktor von BAG3 über Immunopräzipitationen und immunocytochemische Färbungen, wobei es noch unklar ist, ob es sich um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt. Zusätzlich ist MYH14 nach den hier dargestellten Ergebnissen cytosolisch lokalisiert und nicht an der BAG3-vermittelten Aggresombildung beteiligt. Es besteht allerdings die Möglichkeit des BAG3-vermittelten Abbaus.

Viertens beeinflusst MYH14/NMII-C autophagische Prozesse über eine Funktion in der Regulation des autophagischen Fluxes, die unabhängig von der Spleißvariante zu sein scheint.

7. Literaturverzeichnis

- AGOSTA, F., WEILER, M. & FILIPPI, M. 2015. Propagation of pathology through brain networks in neurodegenerative diseases: from molecules to clinical phenotypes. *CNS Neurosci Ther*, 21, 754-67.
- AGUILERA, M. O., BERON, W. & COLOMBO, M. I. 2012. The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy*, 8, 1590-603.
- AKERFELT, M., MORIMOTO, R. I. & SISTONEN, L. 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 545-55.
- ALBERTI, S., ESSER, C. & HOHFELD, J. 2003. BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones*, 8, 225-31.
- ALMUTAWA, W., SMITH, C., SABOUNY, R., SMIT, R. B., ZHAO, T., WONG, R., LEE-GLOVER, L., DESROCHERS-GOYETTE, J., ILAMATHI, H. S., CARE4RARE CANADA, C., SUCHOWERSKY, O., GERMAIN, M., MAINS, P. E., PARBOOSINGH, J. S., PFEFFER, G., INNES, A. M. & SHUTT, T. E. 2019. The R941L mutation in MYH14 disrupts mitochondrial fission and associates with peripheral neuropathy. *EBioMedicine*, 45, 379-392.
- AMMIRANTE, M., DE LAURENZI, V., GRAZIANO, V., TURCO, M. C. & ROSATI, A. 2011. BAG3 is required for IKK α nuclear translocation and emergence of castration resistant prostate cancer. *Cell Death Dis*, 2, e139.
- AMMIRANTE, M., ROSATI, A., ARRA, C., BASILE, A., FALCO, A., FESTA, M., PASCALE, M., D'AVENIA, M., MARZULLO, L., BELISARIO, M. A., DE MARCO, M., BARBIERI, A., GIUDICE, A., CHIAPPETTA, G., VUTTARIELLO, E., MONACO, M., BONELLI, P., SALVATORE, G., DI BENEDETTO, M., DESHMANE, S. L., KHALILI, K., TURCO, M. C. & LEONE, A. 2010. IKK γ protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 7497-502.
- ANCKAR, J. & SISTONEN, L. 2011. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem*, 80, 1089-115.
- ANDERSON, T. W., VAUGHAN, A. N. & CRAMER, L. P. 2008. Retrograde flow and myosin II activity within the leading cell edge deliver F-actin to the lamella to seed the formation of graded polarity actomyosin II filament bundles in migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 19, 5006-18.
- ANDZELM, M. M., CHEN, X., KRZEWSKI, K., ORANGE, J. S. & STROMINGER, J. L. 2007. Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J Exp Med*, 204, 2285-91.
- ANFINSEN, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223-30.
- ANGUIANO, M., NOWAK, R. J. & LANSBURY, P. T., JR. 2002. Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry*, 41, 11338-43.
- ANTONIETTI, P., LINDER, B., HEHLGANS, S., MILDENBERGER, I. C., BURGER, M. C., FULDA, S., STEINBACH, J. P., GESSLER, F., RODEL, F., MITTELBRONN, M. & KOGEL, D. 2017. Interference with the HSF1/HSP70/BAG3 Pathway Primes Glioma Cells to Matrix Detachment and BH3 Mimetic-Induced Apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 16, 156-168.
- AOKI, R., KITAGUCHI, T., OYA, M., YANAGIHARA, Y., SATO, M., MIYAWAKI, A. & TSUBOI, T. 2010. Duration of fusion pore opening and the amount of hormone released are regulated by myosin II during kiss-and-run exocytosis. *Biochem J*, 429, 497-504.
- ARAKI, N. 2006. Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Front Biosci*, 11, 1479-90.
- ARIMURA, T., ISHIKAWA, T., NUNODA, S., KAWAI, S. & KIMURA, A. 2011. Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. *Hum Mutat*, 32, 1481-91.

- ARNDT, V., DICK, N., TAWO, R., DREISEIDLER, M., WENZEL, D., HESSE, M., FURST, D. O., SAFTIG, P., SAINT, R., FLEISCHMANN, B. K., HOCH, M. & HOHFELD, J. 2010. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol*, 20, 143-8.
- ARRASATE, M., MITRA, S., SCHWEITZER, E. S., SEGAL, M. R. & FINKBEINER, S. 2004. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431, 805-10.
- ASHFORD, T. P. & PORTER, K. R. 1962. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol*, 12, 198-202.
- ASTANINA, K., KOCH, M., JUNGST, C., ZUMBUSCH, A. & KIEMER, A. K. 2015. Lipid droplets as a novel cargo of tunnelling nanotubes in endothelial cells. *Sci Rep*, 5, 11453.
- ATKINSON, S. J. & STEWART, M. 1992. Molecular interactions in myosin assembly. Role of the 28-residue charge repeat in the rod. *J Mol Biol*, 226, 7-13.
- AXE, E. L., WALKER, S. A., MANIFAVA, M., CHANDRA, P., RODERICK, H. L., HABERMANN, A., GRIFFITHS, G. & KTISTAKIS, N. T. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 182, 685-701.
- BADYAL, S. K., BASRAN, J., BHANJI, N., KIM, J. H., CHAVDA, A. P., JUNG, H. S., CRAIG, R., ELLIOTT, P. R., IRVINE, A. F., BARSUKOV, I. L., KRIAJEVSKA, M. & BAGSHAW, C. R. 2011. Mechanism of the Ca²⁺-dependent interaction between S100A4 and tail fragments of nonmuscle myosin heavy chain IIA. *J Mol Biol*, 405, 1004-26.
- BALCH, W. E., MORIMOTO, R. I., DILLIN, A. & KELLY, J. W. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319, 916-9.
- BALCHIN, D., HAYER-HARTL, M. & HARTL, F. U. 2016. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, 353, aac4354.
- BAO, J., JANA, S. S. & ADELSTEIN, R. S. 2005. Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. *J Biol Chem*, 280, 19594-9.
- BARTH, S., GLICK, D. & MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol*, 221, 117-24.
- BARTLETT, A. I. & RADFORD, S. E. 2009. An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 582-8.
- BAUERLEIN, F. J. B., SAHA, I., MISHRA, A., KALEMANOV, M., MARTINEZ-SANCHEZ, A., KLEIN, R., DUDANOVA, I., HIPPEL, M. S., HARTL, F. U., BAUMEISTER, W. & FERNANDEZ-BUSNADIEGO, R. 2017. In Situ Architecture and Cellular Interactions of PolyQ Inclusions. *Cell*, 171, 179-187 e10.
- BAUMKETNER, A., JEWETT, A. & SHEA, J. E. 2003. Effects of confinement in chaperonin assisted protein folding: rate enhancement by decreasing the roughness of the folding energy landscape. *J Mol Biol*, 332, 701-13.
- BEACH, J. R., LICATE, L. S., CRISH, J. F. & EGELHOFF, T. T. 2011. Analysis of the role of Ser1/Ser2/Thr9 phosphorylation on myosin II assembly and function in live cells. *BMC Cell Biol*, 12, 52.
- BEACH, J. R., SHAO, L., REMMERT, K., LI, D., BETZIG, E. & HAMMER, J. A., 3RD 2014. Nonmuscle myosin II isoforms coassemble in living cells. *Curr Biol*, 24, 1160-6.
- BEADLE, C., ASSANAH, M. C., MONZO, P., VALLEE, R., ROSENFELD, S. S. & CANOLL, P. 2008. The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol Biol Cell*, 19, 3357-68.
- BEHIN, A., SALORT-CAMPANA, E., WAHBI, K., RICHARD, P., CARLIER, R. Y., CARLIER, P., LAFORET, P., STOJKOVIC, T., MAISONOBE, T., VERSCHUEREN, A., FRANQUES, J., ATTARIAN, S., MAUES DE PAULA, A., FIGARELLA-BRANGER, D., BECANE, H. M., NELSON, I., DUBOC, D., BONNE, G., VICART, P., UDD, B., ROMERO, N., POUGET, J. & EYMARD, B. 2015. Myofibrillar myopathies: State of the art, present and future challenges. *Rev Neurol (Paris)*, 171, 715-29.
- BEHL, C. 2011. BAG3 and friends: co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy*, 7, 795-8.
- BEHL, C. 2016. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol Sci*, 37, 672-688.

- BEHRENDTS, C., LANGER, C. A., BOTEVA, R., BOTTCHE, U. M., STEMP, M. J., SCHAFFAR, G., RAO, B. V., GIESE, A., KRETZSCHMAR, H., SIEGERS, K. & HARTL, F. U. 2006. Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. *Mol Cell*, 23, 887-97.
- BEN-ZVI, A., DE LOS RIOS, P., DIETLER, G. & GOLOUBINOFF, P. 2004. Active solubilization and refolding of stable protein aggregates by cooperative unfolding action of individual hsp70 chaperones. *J Biol Chem*, 279, 37298-303.
- BEN AICHA, S., LESSARD, J., PELLETIER, M., FOURNIER, A., CALVO, E. & LABRIE, C. 2007. Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells. *Physiol Genomics*, 31, 295-305.
- BENCE, N. F., SAMPAT, R. M. & KOPITO, R. R. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, 292, 1552-5.
- BENINGO, K. A., HAMAOKA, K., DEMBO, M., WANG, Y. L. & HOSOYA, H. 2006. Traction forces of fibroblasts are regulated by the Rho-dependent kinase but not by the myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys*, 456, 224-31.
- BENNETT, E. J., BENCE, N. F., JAYAKUMAR, R. & KOPITO, R. R. 2005. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell*, 17, 351-65.
- BERG, J. S., POWELL, B. C. & CHENEY, R. E. 2001. A millennial myosin census. *Mol Biol Cell*, 12, 780-94.
- BETAPUDI, V., GOKULRANGAN, G., CHANCE, M. R. & EGELHOFF, T. T. 2011. A proteomic study of myosin II motor proteins during tumor cell migration. *J Mol Biol*, 407, 673-86.
- BETAPUDI, V., LICATE, L. S. & EGELHOFF, T. T. 2006. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Res*, 66, 4725-33.
- BHAT, P. & THORN, P. 2009. Myosin 2 maintains an open exocytic fusion pore in secretory epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 20, 1795-803.
- BILLINGTON, N., WANG, A., MAO, J., ADELSTEIN, R. S. & SELLERS, J. R. 2013. Characterization of three full-length human nonmuscle myosin II paralogs. *J Biol Chem*, 288, 33398-410.
- BLITZ, A. L. & FINE, R. E. 1974. Muscle-like contractile proteins and tubulin in synaptosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 4472-6.
- BONELLI, P., PETRELLA, A., ROSATI, A., ROMANO, M. F., LEROSE, R., PAGLIUCA, M. G., AMELIO, T., FESTA, M., MARTIRE, G., VENUTA, S., TURCO, M. C. & LEONE, A. 2004. BAG3 protein regulates stress-induced apoptosis in normal and neoplastic leukocytes. *Leukemia*, 18, 358-60.
- BOYA, P., REGGIORI, F. & CODOGNO, P. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*, 15, 713-20.
- BRACHER, A. & VERGHESE, J. 2015. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Front Mol Biosci*, 2, 10.
- BRANDSTAETTER, H., KENDRICK-JONES, J. & BUSS, F. 2012. Myo1c regulates lipid raft recycling to control cell spreading, migration and Salmonella invasion. *J Cell Sci*, 125, 1991-2003.
- BRECKENRIDGE, M. T., DULYANINOVA, N. G. & EGELHOFF, T. T. 2009. Multiple regulatory steps control mammalian nonmuscle myosin II assembly in live cells. *Mol Biol Cell*, 20, 338-47.
- BREHMER, D., RUDIGER, S., GASSLER, C. S., KLOSTERMEIER, D., PACKSCHIES, L., REINSTEIN, J., MAYER, M. P. & BUKAU, B. 2001. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol*, 8, 427-32.
- BRIKNAROVA, K., TAKAYAMA, S., HOMMA, S., BAKER, K., CABEZAS, E., HOYT, D. W., LI, Z., SATTERTHWAIT, A. C. & ELY, K. R. 2002. BAG4/SODD protein contains a short BAG domain. *J Biol Chem*, 277, 31172-8.
- BRIVE, L., TAKAYAMA, S., BRIKNAROVA, K., HOMMA, S., ISHIDA, S. K., REED, J. C. & ELY, K. R. 2001. The carboxyl-terminal lobe of Hsc70 ATPase domain is sufficient for binding to BAG1. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 1099-105.

- BROCKWELL, D. J. & RADFORD, S. E. 2007. Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr Opin Struct Biol*, 17, 30-7.
- BRODSKY, J. L. & SCHEKMAN, R. 1993. A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol*, 123, 1355-63.
- BRUGGE, J. S. & ERIKSON, R. L. 1977. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*, 269, 346-8.
- BRUNO, A. P., CEFALIELLO, C., D'AURIA, R., CRISPINO, M., ROSATI, A., GIUDITTA, A. & NORI, S. L. 2014. BAG3 mRNA is present in synaptosomal polysomes of rat brain. *Cell Cycle*, 13, 1357.
- BRUNO, A. P., FESTA, M., DAL PIAZ, F., ROSATI, A., TURCO, M. C., GIUDITTA, A. & MARZULLO, L. 2008. Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle*, 7, 3104-5.
- BRUNS, C. K. & KOPITO, R. R. 2007. Impaired post-translational folding of familial ALS-linked Cu, Zn superoxide dismutase mutants. *EMBO J*, 26, 855-66.
- BUKAU, B. & HORWICH, A. L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92, 351-66.
- BURT, R. A., JOSEPH, J. E., MILLIKEN, S., COLLINGE, J. E. & KILE, B. T. 2008. Description of a novel mutation leading to MYH9-related disease. *Thromb Res*, 122, 861-3.
- BURTEY, A., WAGNER, M., HODNELAND, E., SKAFTNESMO, K. O., SCHOELERMANN, J., MONDRAGON, I. R., ESPEDAL, H., GOLEBIEWSKA, A., NICLOU, S. P., BJERKVIG, R., KOGEL, T. & GERDES, H. H. 2015. Intercellular transfer of transferrin receptor by a contact-, Rab8-dependent mechanism involving tunneling nanotubes. *FASEB J*, 29, 4695-712.
- CAI, D., CHEN, S. C., PRASAD, M., HE, L., WANG, X., CHOESMEL-CADAMURO, V., SAWYER, J. K., DANUSER, G. & MONTELL, D. J. 2014. Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell*, 157, 1146-59.
- CAI, Y., BIAIS, N., GIANNONE, G., TANASE, M., JIANG, G., HOFMAN, J. M., WIGGINS, C. H., SILBERZAN, P., BUGUIN, A., LADOUX, B. & SHEETZ, M. P. 2006. Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys J*, 91, 3907-20.
- CALVO, F., EGE, N., GRANDE-GARCIA, A., HOOPER, S., JENKINS, R. P., CHAUDHRY, S. I., HARRINGTON, K., WILLIAMSON, P., MOEENDARBARY, E., CHARRAS, G. & SAHAI, E. 2013. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 15, 637-46.
- CANE, S., PONNAPPAN, S. & PONNAPPAN, U. 2012. Impairment of non-muscle myosin IIA in human CD4+ T cells contributes to functional deficits in the elderly. *Cell Mol Immunol*, 9, 86-96.
- CARMONA-FONTAINE, C., MATTHEWS, H. K., KURIYAMA, S., MORENO, M., DUNN, G. A., PARSONS, M., STERN, C. D. & MAYOR, R. 2008. Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*, 456, 957-61.
- CARON, E. & HALL, A. 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, 282, 1717-21.
- CARRA, S., ALBERTI, S., ARRIGO, P. A., BENESCH, J. L., BENJAMIN, I. J., BOELEN, W., BARTELT-KIRBACH, B., BRUNDEL, B., BUCHNER, J., BUKAU, B., CARVER, J. A., ECROYD, H., EMANUELSSON, C., FINET, S., GOLENHOFEN, N., GOLOUBINOFF, P., GUSEV, N., HASLBECK, M., HIGHTOWER, L. E., KAMPINGA, H. H., KLEVIT, R. E., LIBEREK, K., MCHAOURAB, H. S., MCMENIMEN, K. A., POLETTI, A., QUINLAN, R., STRELKOV, S. V., TOTH, M. E., VIERLING, E. & TANGUAY, R. M. 2017. The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. *Cell Stress Chaperones*, 22, 601-611.
- CARRA, S., SEGUIN, S. J., LAMBERT, H. & LANDRY, J. 2008a. HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem*, 283, 1437-44.
- CARRA, S., SEGUIN, S. J. & LANDRY, J. 2008b. HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy*, 4, 237-9.
- CARRA, S., SIVILOTTI, M., CHAVEZ ZOBEL, A. T., LAMBERT, H. & LANDRY, J. 2005. HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Hum Mol Genet*, 14, 1659-69.

- CESARO, E., MONTANO, G., ROSATI, A., CRESCITELLI, R., IZZO, P., TURCO, M. C. & COSTANZO, P. 2010. WT1 protein is a transcriptional activator of the antiapoptotic bag3 gene. *Leukemia*, 24, 1204-6.
- CHAFEKAR, S. M. & DUENNWALD, M. L. 2012. Impaired heat shock response in cells expressing full-length polyglutamine-expanded huntingtin. *PLoS One*, 7, e37929.
- CHAKRABORTY, K., CHATILA, M., SINHA, J., SHI, Q., POSCHNER, B. C., SIKOR, M., JIANG, G., LAMB, D. C., HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. 2010. Chaperonin-catalyzed rescue of kinetically trapped states in protein folding. *Cell*, 142, 112-22.
- CHEETHAM, M. E. & CAPLAN, A. J. 1998. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones*, 3, 28-36.
- CHEN, L., CHETKOVICH, D. M., PETRALIA, R. S., SWEENEY, N. T., KAWASAKI, Y., WENTHOLD, R. J., BREDDT, D. S. & NICOLL, R. A. 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*, 408, 936-43.
- CHEN, Y., AZAD, M. B. & GIBSON, S. B. 2010. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. *Can J Physiol Pharmacol*, 88, 285-95.
- CHEN, Y. & KLIONSKY, D. J. 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*, 124, 161-70.
- CHEN, Y., YANG, L. N., CHENG, L., TU, S., GUO, S. J., LE, H. Y., XIONG, Q., MO, R., LI, C. Y., JEONG, J. S., JIANG, L., BLACKSHAW, S., BI, L. J., ZHU, H., TAO, S. C. & GE, F. 2013. Bcl2-associated athanogene 3 interactome analysis reveals a new role in modulating proteasome activity. *Mol Cell Proteomics*, 12, 2804-19.
- CHEN, Y., ZHAO, X., LI, J., ZHANG, L., LI, R., ZHANG, H., LIAO, R., LIU, S., SHI, W. & LIANG, X. 2018. Amino acid starvation promotes podocyte autophagy through mammalian target of rapamycin inhibition and transcription factor EB activation. *Mol Med Rep*, 18, 4342-4348.
- CHENG, D., HOOGENRAAD, C. C., RUSH, J., RAMM, E., SCHLAGER, M. A., DUONG, D. M., XU, P., WIJAYAWARDANA, S. R., HANFELT, J., NAKAGAWA, T., SHENG, M. & PENG, J. 2006. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics*, 5, 1158-70.
- CHEON, M., CHANG, I., MOHANTY, S., LUHESHI, L. M., DOBSON, C. M., VENDRUSCOLO, M. & FAVRIN, G. 2007. Structural reorganisation and potential toxicity of oligomeric species formed during the assembly of amyloid fibrils. *PLoS Comput Biol*, 3, 1727-38.
- CHERRA, S. J., 3RD, KULICH, S. M., UECHI, G., BALASUBRAMANI, M., MOUNTZOURIS, J., DAY, B. W. & CHU, C. T. 2010. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol*, 190, 533-9.
- CHIAPPETTA, G., AMMIRANTE, M., BASILE, A., ROSATI, A., FESTA, M., MONACO, M., VUTTARIELLO, E., PASQUINELLI, R., ARRA, C., ZERILLI, M., TODARO, M., STASSI, G., PEZZULLO, L., GENTILELLA, A., TOSCO, A., PASCALE, M., MARZULLO, L., BELISARIO, M. A., TURCO, M. C. & LEONE, A. 2007. The antiapoptotic protein BAG3 is expressed in thyroid carcinomas and modulates apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 1159-63.
- CHO, K. O., HUNT, C. A. & KENNEDY, M. B. 1992. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, 9, 929-42.
- CHOI, B. O., KANG, S. H., HYUN, Y. S., KANWAL, S., PARK, S. W., KOO, H., KIM, S. B., CHOI, Y. C., YOO, J. H., KIM, J. W., PARK, K. D., CHOI, K. G., KIM, S. J., ZUCHNER, S. & CHUNG, K. W. 2011. A complex phenotype of peripheral neuropathy, myopathy, hoarseness, and hearing loss is linked to an autosomal dominant mutation in MYH14. *Hum Mutat*, 32, 669-77.
- CHOI, J. S., LEE, J. H., KIM, H. Y., CHUN, M. H., CHUNG, J. W. & LEE, M. Y. 2006. Developmental expression of Bis protein in the cerebral cortex and hippocampus of rats. *Brain Res*, 1092, 69-78.

- CHOI, J. S., LEE, J. H., SHIN, Y. J., LEE, J. Y., YUN, H., CHUN, M. H. & LEE, M. Y. 2009. Transient expression of Bis protein in midline radial glia in developing rat brainstem and spinal cord. *Cell Tissue Res*, 337, 27-36.
- CIECHANOVER, A. 2017. Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Best Pract Res Clin Haematol*, 30, 341-355.
- CLARK, K., LANGESLAG, M., FIGDOR, C. G. & VAN LEEUWEN, F. N. 2007. Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends Cell Biol*, 17, 178-86.
- CLARK, K., LANGESLAG, M., VAN LEEUWEN, B., RAN, L., RYAZANOV, A. G., FIGDOR, C. G., MOOLENAAR, W. H., JALINK, K. & VAN LEEUWEN, F. N. 2006. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO J*, 25, 290-301.
- CLARK, K., MIDDELBEK, J., DOROVKOV, M. V., FIGDOR, C. G., RYAZANOV, A. G., LASONDER, E. & VAN LEEUWEN, F. N. 2008a. The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase, phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC. *FEBS Lett*, 582, 2993-7.
- CLARK, K., MIDDELBEK, J., LASONDER, E., DULYANINOVA, N. G., MORRICE, N. A., RYAZANOV, A. G., BRESNICK, A. R., FIGDOR, C. G. & VAN LEEUWEN, F. N. 2008b. TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation. *J Mol Biol*, 378, 790-803.
- CLERICO, E. M., TILITSKY, J. M., MENG, W. & GIERASCH, L. M. 2015. How hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *J Mol Biol*, 427, 1575-88.
- COLINET, H. & HOFFMANN, A. 2010. Gene and protein expression of *Drosophila* Starvin during cold stress and recovery from chill coma. *Insect Biochem Mol Biol*, 40, 425-8.
- COLVIN, T. A., GABAI, V. L., GONG, J., CALDERWOOD, S. K., LI, H., GUMMULURU, S., MATCHUK, O. N., SMIRNOVA, S. G., ORLOVA, N. V., ZAMULAEVA, I. A., GARCIA-MARCOS, M., LI, X., YOUNG, Z. T., RAUCH, J. N., GESTWICKI, J. E., TAKAYAMA, S. & SHERMAN, M. Y. 2014. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res*, 74, 4731-40.
- CONG, Y., BAKER, M. L., JAKANA, J., WOOLFORD, D., MILLER, E. J., REISSMANN, S., KUMAR, R. N., REDDING-JOHANSON, A. M., BATTH, T. S., MUKHOPADHYAY, A., LUDTKE, S. J., FRYDMAN, J. & CHIU, W. 2010. 4.0-Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4967-72.
- CONG, Y., SCHRODER, G. F., MEYER, A. S., JAKANA, J., MA, B., DOUGHERTY, M. T., SCHMID, M. F., REISSMANN, S., LEVITT, M., LUDTKE, S. L., FRYDMAN, J. & CHIU, W. 2012. Symmetry-free cryo-EM structures of the chaperonin TRiC along its ATPase-driven conformational cycle. *EMBO J*, 31, 720-30.
- CONTI, M., KAWAMOTO, S. & ADELSTEIN, R. S. 2007. *Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*.
- CONTI, M. A. & ADELSTEIN, R. S. 2008. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci*, 121, 11-8.
- CONTI, M. A., EVEN-RAM, S., LIU, C., YAMADA, K. M. & ADELSTEIN, R. S. 2004. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem*, 279, 41263-6.
- CONTI, M. A., SELLERS, J. R., ADELSTEIN, R. S. & ELZINGA, M. 1991. Identification of the serine residue phosphorylated by protein kinase C in vertebrate nonmuscle myosin heavy chains. *Biochemistry*, 30, 966-70.
- CONWAY, D. E., BRECKENRIDGE, M. T., HINDE, E., GRATTON, E., CHEN, C. S. & SCHWARTZ, M. A. 2013. Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Curr Biol*, 23, 1024-30.
- COULSON, M., ROBERT, S. & SAINT, R. 2005. *Drosophila* starvin encodes a tissue-specific BAG-domain protein required for larval food uptake. *Genetics*, 171, 1799-812.

- CRAIG, R., SMITH, R. & KENDRICK-JONES, J. 1983. Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature*, 302, 436-9.
- CREMO, C. R. & HARTSHORNE, D. J. 2007. *Smooth-muscle myosin II*, Watertown, Springer.
- CRIPPA, V., BONCORAGLIO, A., GALBIATI, M., AGGARWAL, T., RUSMINI, P., GIORGETTI, E., CRISTOFANI, R., CARRA, S., PENNUTO, M. & POLETTI, A. 2013. Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Front Cell Neurosci*, 7, 234.
- CRIPPA, V., CARRA, S., RUSMINI, P., SAU, D., BOLZONI, E., BENDOTTI, C., DE BIASI, S. & POLETTI, A. 2010a. A role of small heat shock protein B8 (HspB8) in the autophagic removal of misfolded proteins responsible for neurodegenerative diseases. *Autophagy*, 6, 958-60.
- CRIPPA, V., SAU, D., RUSMINI, P., BONCORAGLIO, A., ONESTO, E., BOLZONI, E., GALBIATI, M., FONTANA, E., MARINO, M., CARRA, S., BENDOTTI, C., DE BIASI, S. & POLETTI, A. 2010b. The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum Mol Genet*, 19, 3440-56.
- CRISTANCHO, A. G. & LAZAR, M. A. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 722-34.
- CUERVO, A. M. & WONG, E. 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*, 24, 92-104.
- CYR, D. M., LANGER, T. & DOUGLAS, M. G. 1994. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci*, 19, 176-81.
- CYR, D. M., LU, X. & DOUGLAS, M. G. 1992. Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homolog. *J Biol Chem*, 267, 20927-31.
- CYR, D. M. & NEUPERT, W. 1996. Roles for hsp70 in protein translocation across membranes of organelles. *EXS*, 77, 25-40.
- DANIELS, M. J., WANG, Y., LEE, M. & VENKITARAMAN, A. R. 2004. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science*, 306, 876-9.
- DE DUVE, C. 1983. Lysosomes revisited. *Eur J Biochem*, 137, 391-7.
- DE JONG, W. W., LEUNISSEN, J. A. & VOORTER, C. E. 1993. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol Biol Evol*, 10, 103-26.
- DE LA CUESTA, F., ALVAREZ-LLAMAS, G., MAROTO, A. S., DONADO, A., ZUBIRI, I., POSADA, M., PADIAL, L. R., PINTO, A. G., BARDERAS, M. G. & VIVANCO, F. 2011. A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima. *Mol Cell Proteomics*, 10, M110 003517.
- DE MARCO, M., TURCO, M. C. & ROSATI, A. 2011. BAG3 protein is induced during cardiomyoblast differentiation and modulates myogenin expression. *Cell Cycle*, 10, 850-2.
- DEAN, S. O. & SPUDICH, J. A. 2006. Rho kinase's role in myosin recruitment to the equatorial cortex of mitotic *Drosophila* S2 cells is for myosin regulatory light chain phosphorylation. *PLoS One*, 1, e131.
- DEKKER, C., ROE, S. M., MCCORMACK, E. A., BEURON, F., PEARL, L. H. & WILLISON, K. R. 2011. The crystal structure of yeast CCT reveals intrinsic asymmetry of eukaryotic cytosolic chaperonins. *EMBO J*, 30, 3078-90.
- DELORME-WALKER, V. D., PETERSON, J. R., CHERNOFF, J., WATERMAN, C. M., DANUSER, G., DERMARDIROSIAN, C. & BOKOCH, G. M. 2011. Pak1 regulates focal adhesion strength, myosin IIA distribution, and actin dynamics to optimize cell migration. *J Cell Biol*, 193, 1289-303.
- DEMAND, J., ALBERTI, S., PATTERSON, C. & HOHFELD, J. 2001. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol*, 11, 1569-77.
- DEPINA, A. S., WOLLERT, T. & LANGFORD, G. M. 2007. Membrane associated nonmuscle myosin II functions as a motor for actin-based vesicle transport in clam oocyte extracts. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64, 739-55.

- DERBY, M. C., LIEU, Z. Z., BROWN, D., STOW, J. L., GOUD, B. & GLEESON, P. A. 2007. The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure. *Traffic*, 8, 758-73.
- DERETIC, V. & LEVINE, B. 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*, 5, 527-49.
- DERIZIOTIS, P., ANDRE, R., SMITH, D. M., GOOLD, R., KINGHORN, K. J., KRISTIANSEN, M., NATHAN, J. A., ROSENZWEIG, R., KRUTAUZ, D., GLICKMAN, M. H., COLLINGE, J., GOLDBERG, A. L. & TABRIZI, S. J. 2011. Misfolded PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry. *EMBO J*, 30, 3065-77.
- DI BARTOLOMEO, S., CORAZZARI, M., NAZIO, F., OLIVERIO, S., LISI, G., ANTONIOLI, M., PAGLIARINI, V., MATTEONI, S., FUOCO, C., GIUNTA, L., D'AMELIO, M., NARDACCI, R., ROMAGNOLI, A., PIACENTINI, M., CECCONI, F. & FIMIA, G. M. 2010. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol*, 191, 155-68.
- DIAMANT, S., BEN-ZVI, A. P., BUKAU, B. & GOLOUBINOFF, P. 2000. Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J Biol Chem*, 275, 21107-13.
- DIENEL, G. A. & HERTZ, L. 2001. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res*, 66, 824-38.
- DIKIC, I. 2017. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*, 86, 193-224.
- DINNER, A. R., SALI, A., SMITH, L. J., DOBSON, C. M. & KARPLUS, M. 2000. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci*, 25, 331-9.
- DJOUDER, N., TUERK, R. D., SUTER, M., SALVIONI, P., THALI, R. F., SCHOLZ, R., VAAHTOMERI, K., AUCHLI, Y., RECHSTEINER, H., BRUNISHOLZ, R. A., VIOLLET, B., MAKELA, T. P., WALLIMANN, T., NEUMANN, D. & KREK, W. 2010. PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis. *EMBO J*, 29, 469-81.
- DOBSON, C. M., SALI, A. & KARPLUS, M. 1998. Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment. *Angew Chem Int Ed Engl*, 37, 868-893.
- DONAUDY, F., SNOECKX, R., PFISTER, M., ZENNER, H. P., BLIN, N., DI STAZIO, M., FERRARA, A., LANZARA, C., FICARELLA, R., DECLAU, F., PUSCH, C. M., NURNBERG, P., MELCHIONDA, S., ZELANTE, L., BALLANA, E., ESTIVILL, X., VAN CAMP, G., GASPARINI, P. & SAVOIA, A. 2004. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*, 74, 770-6.
- DOONG, H., PRICE, J., KIM, Y. S., GASBARRE, C., PROBST, J., LIOTTA, L. A., BLANCHETTE, J., RIZZO, K. & KOHN, E. 2000. CAIR-1/BAG-3 forms an EGF-regulated ternary complex with phospholipase C- γ and Hsp70/Hsc70. *Oncogene*, 19, 4385-95.
- DOONG, H., RIZZO, K., FANG, S., KULPA, V., WEISSMAN, A. M. & KOHN, E. C. 2003. CAIR-1/BAG-3 abrogates heat shock protein-70 chaperone complex-mediated protein degradation: accumulation of poly-ubiquitinated Hsp90 client proteins. *J Biol Chem*, 278, 28490-500.
- DOONG, H., VRAILAS, A. & KOHN, E. C. 2002. What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett*, 188, 25-32.
- DOUGLAS, N. R., REISSMANN, S., ZHANG, J., CHEN, B., JAKANA, J., KUMAR, R., CHIU, W. & FRYDMAN, J. 2011. Dual action of ATP hydrolysis couples lid closure to substrate release into the group II chaperonin chamber. *Cell*, 144, 240-52.
- DOUKHANINA, E. V., CHEN, S., VAN DER ZALM, E., GODZIK, A., REED, J. & DICKMAN, M. B. 2006. Identification and functional characterization of the BAG protein family in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem*, 281, 18793-801.
- DUCHEN, M. R., VERKHRATSKY, A. & MUALLEM, S. 2008. Mitochondria and calcium in health and disease. *Cell Calcium*, 44, 1-5.
- DULYANINOVA, N. G. & BRESNICK, A. R. 2013. The heavy chain has its day: regulation of myosin-II assembly. *Bioarchitecture*, 3, 77-85.

- DULYANINOVA, N. G., HOUSE, R. P., BETAPUDI, V. & BRESNICK, A. R. 2007. Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. *Mol Biol Cell*, 18, 3144-55.
- DULYANINOVA, N. G., MALASHKEVICH, V. N., ALMO, S. C. & BRESNICK, A. R. 2005. Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry*, 44, 6867-76.
- DUPONT, S., MORSUT, L., ARAGONA, M., ENZO, E., GIULITTI, S., CORDENONSI, M., ZANCONATO, F., LE DIGABEL, J., FORCATO, M., BICCIATO, S., ELVASSORE, N. & PICCOLO, S. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474, 179-83.
- DURAN, A., LINARES, J. F., GALVEZ, A. S., WIKENHEISER, K., FLORES, J. M., DIAZ-MECO, M. T. & MOSCAT, J. 2008. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 13, 343-54.
- DURAN, J. M., VALDERRAMA, F., CASTEL, S., MAGDALENA, J., TOMAS, M., HOSOYA, H., RENAUPQUERAS, J., MALHOTRA, V. & EGEA, G. 2003. Myosin motors and not actin comets are mediators of the actin-based Golgi-to-endoplasmic reticulum protein transport. *Mol Biol Cell*, 14, 445-59.
- DUTTLE, S., PECHMANN, S. & FRYDMAN, J. 2013. Principles of cotranslational ubiquitination and quality control at the ribosome. *Mol Cell*, 50, 379-93.
- EDWARDS, M., ZWOLAK, A., SCHAFFER, D. A., SEPT, D., DOMINGUEZ, R. & COOPER, J. A. 2014. Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 677-89.
- EGAN, D. F., SHACKELFORD, D. B., MIHAYLOVA, M. M., GELINO, S., KOHNZ, R. A., MAIR, W., VASQUEZ, D. S., JOSHI, A., GWINN, D. M., TAYLOR, R., ASARA, J. M., FITZPATRICK, J., DILLIN, A., VIOLLET, B., KUNDU, M., HANSEN, M. & SHAW, R. J. 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331, 456-61.
- EHRLICHER, A. J., NAKAMURA, F., HARTWIG, J. H., WEITZ, D. A. & STOSSEL, T. P. 2011. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature*, 478, 260-3.
- ELLIOTT, P. R., IRVINE, A. F., JUNG, H. S., TOZAWA, K., PASTOK, M. W., PICONE, R., BADYAL, S. K., BASRAN, J., RUDLAND, P. S., BARRACLOUGH, R., LIAN, L. Y., BAGSHAW, C. R., KRIAJEVSKA, M. & BARSUKOV, I. L. 2012. Asymmetric mode of Ca(2+)-S100A4 interaction with nonmuscle myosin IIA generates nanomolar affinity required for filament remodeling. *Structure*, 20, 654-66.
- ELLIS, J. 1987. Proteins as Molecular Chaperones. *Nature*, 328, 378-379.
- ELLIS, R. J. & MINTON, A. P. 2006. Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem*, 387, 485-97.
- ENGELHARDT, W. & LYUBIMOVA, M. 1939. Myosin and adenosine triphosphatase. *Nature*, 144, 668-669.
- ENGLAND, J., LUCENT, D. & PANDE, V. 2008. Rattling the cage: computational models of chaperonin-mediated protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 163-9.
- ESCUSA-TORET, S., VONK, W. I. & FRYDMAN, J. 2013. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nat Cell Biol*, 15, 1231-43.
- ESSLER, M., RETZER, M., BAUER, M., HEEMSKERK, J. W., AEPFELBACHER, M. & SIESS, W. 1999. Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, 274, 30361-4.
- EVEN-RAM, S., DOYLE, A. D., CONTI, M. A., MATSUMOTO, K., ADELSTEIN, R. S. & YAMADA, K. M. 2007. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol*, 9, 299-309.
- FAN, C. Y., LEE, S. & CYR, D. M. 2003. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*, 8, 309-16.

- FANG, L., LI, X., LUO, Y., HE, W., DAI, C. & YANG, J. 2014. Autophagy inhibition induces podocyte apoptosis by activating the pro-apoptotic pathway of endoplasmic reticulum stress. *Exp Cell Res*, 322, 290-301.
- FATH, K. R. 2005. Characterization of myosin-II binding to Golgi stacks in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton*, 60, 222-35.
- FELZEN, V., HIEBEL, C., KOZIOLLEK-DRECHSLER, I., REISSIG, S., WOLFRUM, U., KOGEL, D., BRANDTS, C., BEHL, C. & MORAWE, T. 2015. Estrogen receptor alpha regulates non-canonical autophagy that provides stress resistance to neuroblastoma and breast cancer cells and involves BAG3 function. *Cell Death Dis*, 6, e1812.
- FENG, Y., HE, D., YAO, Z. & KLIONSKY, D. J. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24, 24-41.
- FENIX, A. M., NEININGER, A. C., TANEJA, N., HYDE, K., VISETSOUK, M. R., GARDE, R. J., LIU, B., NIXON, B. R., MANALO, A. E., BECKER, J. R., CRAWLEY, S. W., BADER, D. M., TYSKA, M. J., LIU, Q., GUTZMAN, J. H. & BURNETTE, D. T. 2018. Muscle-specific stress fibers give rise to sarcomeres in cardiomyocytes. *Elife*, 7.
- FESTA, M., DEL VALLE, L., KHALILI, K., FRANCO, R., SCOGNAMIGLIO, G., GRAZIANO, V., DE LAURENZI, V., TURCO, M. C. & ROSATI, A. 2011. BAG3 protein is overexpressed in human glioblastoma and is a potential target for therapy. *Am J Pathol*, 178, 2504-12.
- FIALA, J. C., SPACEK, J. & HARRIS, K. M. 2002. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, 39, 29-54.
- FINLEY, D. 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*, 78, 477-513.
- FORD, H. L., SILVER, D. L., KACHAR, B., SELLERS, J. R. & ZAIN, S. B. 1997. Effect of Mts1 on the structure and activity of nonmuscle myosin II. *Biochemistry*, 36, 16321-7.
- FRAKES, A. E. & DILLIN, A. 2017. The UPR(ER): Sensor and Coordinator of Organismal Homeostasis. *Mol Cell*, 66, 761-771.
- FRANASZCZYK, M., BILINSKA, Z. T., SOBIESZCZANSKA-MALEK, M., MICHALAK, E., SLESZYCKA, J., SIOMA, A., MALEK, L. A., KACZMARSKA, D., WALCZAK, E., WLODARSKI, P., HUTNIK, L., MILANOWSKA, B., DZIELINSKA, Z., RELIGA, G., GRZYBOWSKI, J., ZIELINSKI, T. & PLOSKI, R. 2014. The BAG3 gene variants in Polish patients with dilated cardiomyopathy: four novel mutations and a genotype-phenotype correlation. *J Transl Med*, 12, 192.
- FRANCESCHELLI, S., ROSATI, A., LEROSE, R., DE NICOLA, S., TURCO, M. C. & PASCALE, M. 2008. Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1. *J Cell Physiol*, 215, 575-7.
- FRIEDLAND, J. C., LEE, M. H. & BOETTIGER, D. 2009. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science*, 323, 642-4.
- FRYDMAN, J. 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 70, 603-47.
- FU, X., ZHANG, L., JIN, Y., SUN, X., ZHANG, A., WEN, Z., ZHOU, Y., XIA, M. & GAO, J. 2016. Loss of Myh14 Increases Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss in CBA/CaJ Mice. *Neural Plast*, 2016, 6720420.
- FUCHS, M., LUTHOLD, C., GUILBERT, S. M., VARLET, A. A., LAMBERT, H., JETTE, A., ELOWE, S., LANDRY, J. & LAVOIE, J. N. 2015. A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis. *PLoS Genet*, 11, e1005582.
- FUCHS, M., POIRIER, D. J., SEGUIN, S. J., LAMBERT, H., CARRA, S., CHARETTE, S. J. & LANDRY, J. 2009. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J*, 425, 245-55.
- FUJIOKA, Y., NODA, N. N., MATSUSHITA, M., OHSUMI, Y. & INAGAKI, F. 2008. Crystallization of the coiled-coil domain of Atg16 essential for autophagy. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 64, 1046-8.

- FUJITA, N., ITOH, T., OMORI, H., FUKUDA, M., NODA, T. & YOSHIMORI, T. 2008. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*, 19, 2092-100.
- FULCHER, F. K., SMITH, B. T., RUSS, M. & PATEL, Y. M. 2008. Dual role for myosin II in GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Exp Cell Res*, 314, 3264-74.
- FUNDERBURK, S. F., WANG, Q. J. & YUE, Z. 2010. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol*, 20, 355-62.
- FUNKE, L., DAKOJI, S. & BREDT, D. S. 2005. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem*, 74, 219-45.
- GAGGIOLI, C., HOOPER, S., HIDALGO-CARCEDO, C., GROSSE, R., MARSHALL, J. F., HARRINGTON, K. & SAHAI, E. 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*, 9, 1392-400.
- GAMERDINGER, M., CARRA, S. & BEHL, C. 2011a. Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: focus on BAG proteins. *J Mol Med (Berl)*, 89, 1175-82.
- GAMERDINGER, M., HAJIEVA, P., KAYA, A. M., WOLFRUM, U., HARTL, F. U. & BEHL, C. 2009. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J*, 28, 889-901.
- GAMERDINGER, M., KAYA, A. M., WOLFRUM, U., CLEMENT, A. M. & BEHL, C. 2011b. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep*, 12, 149-56.
- GARCIA-MATA, R., BEBOK, Z., SORSCHER, E. J. & SZTUL, E. S. 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol*, 146, 1239-54.
- GE, F., LI, W. L., BI, L. J., TAO, S. C., ZHANG, Z. P. & ZHANG, X. E. 2010. Identification of novel 14-3-3zeta interacting proteins by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). *J Proteome Res*, 9, 5848-58.
- GE, L., BASKARAN, S., SCHEKMAN, R. & HURLEY, J. H. 2014. The protein-vesicle network of autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 29, 18-24.
- GE, L., MELVILLE, D., ZHANG, M. & SCHEKMAN, R. 2013. The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife*, 2, e00947.
- GEIGER, B., SPATZ, J. P. & BERSHADSKY, A. D. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 21-33.
- GENG, J. & KLIONSKY, D. J. 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*, 9, 859-64.
- GENG, J., NAIR, U., YASUMURA-YORIMITSU, K. & KLIONSKY, D. J. 2010. Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 21, 2257-69.
- GENTILELLA, A. & KHALILI, K. 2009. Autoregulation of co-chaperone BAG3 gene transcription. *J Cell Biochem*, 108, 1117-24.
- GENTILELLA, A. & KHALILI, K. 2010. BAG3 expression is sustained by FGF2 in neural progenitor cells and impacts cell proliferation. *Cell Cycle*, 9, 4245-7.
- GENTILELLA, A. & KHALILI, K. 2011. BAG3 expression in glioblastoma cells promotes accumulation of ubiquitinated clients in an Hsp70-dependent manner. *J Biol Chem*, 286, 9205-15.
- GENTILELLA, A., PASSIATORE, G., DESHMANE, S., TURCO, M. C. & KHALILI, K. 2008. Activation of BAG3 by Egr-1 in response to FGF-2 in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 27, 5011-8.
- GERONIMO-OLVERA, C., MONTIEL, T., RINCON-HEREDIA, R., CASTRO-OBREGON, S. & MASSIEU, L. 2017. Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death Dis*, 8, e2911.

- GIANNONE, G., DUBIN-THALER, B. J., ROSSIER, O., CAI, Y., CHAGA, O., JIANG, G., BEAVER, W., DOBEREINER, H. G., FREUND, Y., BORISY, G. & SHEETZ, M. P. 2007. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*, 128, 561-75.
- GILMAN, S. R., IOSSIFOV, I., LEVY, D., RONEMUS, M., WIGLER, M. & VITKUP, D. 2011. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron*, 70, 898-907.
- GINIATULLIN, A. R., DARIOS, F., SHAKIRZYANOVA, A., DAVLETOV, B. & GINIATULLIN, R. 2006. SNAP25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release. *J Neurochem*, 98, 1789-97.
- GLICK, D., BARTH, S. & MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221, 3-12.
- GLOTZER, M. 2001. Animal cell cytokinesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 351-86.
- GLOVER, J. R. & LINDQUIST, S. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, 94, 73-82.
- GOLEY, E. D. & WELCH, M. D. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 713-26.
- GOLOMB, E., MA, X., JANA, S. S., PRESTON, Y. A., KAWAMOTO, S., SHOHAM, N. G., GOLDIN, E., CONTI, M. A., SELLERS, J. R. & ADELSTEIN, R. S. 2004. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem*, 279, 2800-8.
- GOMEZ-PASTOR, R., BURCHFIEL, E. T., NEEF, D. W., JAEGER, A. M., CABISCOL, E., MCKINSTRY, S. U., DOSS, A., ABALLAY, A., LO, D. C., AKIMOV, S. S., ROSS, C. A., EROGLU, C. & THIELE, D. J. 2017. Abnormal degradation of the neuronal stress-protective transcription factor HSF1 in Huntington's disease. *Nat Commun*, 8, 14405.
- GOMEZ-PASTOR, R., BURCHFIEL, E. T. & THIELE, D. J. 2018. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 4-19.
- GOUSSET, K., SCHIFF, E., LANGEVIN, C., MARIJANOVIC, Z., CAPUTO, A., BROWMAN, D. T., CHENOUIARD, N., DE CHAUMONT, F., MARTINO, A., ENNINGA, J., OLIVO-MARIN, J. C., MANNEL, D. & ZURZOLO, C. 2009. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol*, 11, 328-36.
- GOUT, E., GUTKOWSKA, M., TAKAYAMA, S., REED, J. C. & CHROBOCZEK, J. 2010. Co-chaperone BAG3 and adenovirus penton base protein partnership. *J Cell Biochem*, 111, 699-708.
- GOVEK, E. E., NEWWEY, S. E., AKERMAN, C. J., CROSS, J. R., VAN DER VEKEN, L. & VAN AELST, L. 2004. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci*, 7, 364-72.
- GRAVEL, M., PETERSON, J., YONG, V. W., KOTTIS, V., TRAPP, B. & BRAUN, P. E. 1996. Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci*, 7, 453-66.
- GRAY, E. G. & WHITTAKER, V. P. 1962. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat*, 96, 79-88.
- GUHA, M., ZHOU, M. & WANG, Y. L. 2005. Cortical actin turnover during cytokinesis requires myosin II. *Curr Biol*, 15, 732-6.
- GUO, J. Y., CHEN, H. Y., MATHEW, R., FAN, J., STROHECKER, A. M., KARSLI-UZUNBAS, G., KAMPHORST, J. J., CHEN, G., LEMONS, J. M., KARANTZA, V., COLLIER, H. A., DIPAOLO, R. S., GELINAS, C., RABINOWITZ, J. D. & WHITE, E. 2011. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*, 25, 460-70.
- GUO, Q., LEHMER, C., MARTINEZ-SANCHEZ, A., RUDACK, T., BECK, F., HARTMANN, H., PEREZ-BERLANGA, M., FROTTIN, F., HIPPEL, M. S., HARTL, F. U., EDLBAUER, D., BAUMEISTER, W. & FERNANDEZ-BUSNADIEGO, R. 2018. In Situ Structure of Neuronal C9orf72 Poly-GA Aggregates Reveals Proteasome Recruitment. *Cell*, 172, 696-705 e12.

- GUPTA, M. K., GORDON, J., GLAUSER, G. M., MYERS, V. D., FELDMAN, A. M., CHEUNG, J. Y. & KHALILI, K. 2019. Lamin B is a target for selective nuclear PQC by BAG3: implication for nuclear envelopopathies. *Cell Death Dis*, 10, 23.
- GUPTON, S. L. & WATERMAN-STORER, C. M. 2006. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell*, 125, 1361-74.
- GURKAR, A. U., CHU, K., RAJ, L., BOULEY, R., LEE, S. H., KIM, Y. B., DUNN, S. E., MANDINOVA, A. & LEE, S. W. 2013. Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nat Commun*, 4, 2189.
- GWINN, D. M., SHACKELFORD, D. B., EGAN, D. F., MIHAYLOVA, M. M., MERY, A., VASQUEZ, D. S., TURK, B. E. & SHAW, R. J. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30, 214-26.
- HAHN, C. & SCHWARTZ, M. A. 2009. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 53-62.
- HAIDARI, M., ZHANG, W., CHEN, Z., GANJEHEI, L., WARIER, N., VANDERSLICE, P. & DIXON, R. 2011. Myosin light chain phosphorylation facilitates monocyte transendothelial migration by dissociating endothelial adherens junctions. *Cardiovasc Res*, 92, 456-65.
- HAILEY, D. W., RAMBOLD, A. S., SATPUTE-KRISHNAN, P., MITRA, K., SOUGRAT, R., KIM, P. K. & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141, 656-67.
- HANADA, T., NODA, N. N., SATOMI, Y., ICHIMURA, Y., FUJIOKA, Y., TAKAO, T., INAGAKI, F. & OHSUMI, Y. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*, 282, 37298-302.
- HARA, T., TAKAMURA, A., KISHI, C., IEMURA, S., NATSUME, T., GUAN, J. L. & MIZUSHIMA, N. 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol*, 181, 497-510.
- HARRISON, S. M., KNIFLEY, T., CHEN, M. & O'CONNOR, K. L. 2013. LPA, HGF, and EGF utilize distinct combinations of signaling pathways to promote migration and invasion of MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *BMC Cancer*, 13, 501.
- HARTL, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-9.
- HARTL, F. U., BRACHER, A. & HAYER-HARTL, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475, 324-32.
- HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295, 1852-8.
- HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 574-81.
- HASLBECK, M., FRANZMANN, T., WEINFURTER, D. & BUCHNER, J. 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 842-6.
- HASLBECK, M., WALKE, S., STROMER, T., EHRNSPERGER, M., WHITE, H. E., CHEN, S., SAIBIL, H. R. & BUCHNER, J. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J*, 18, 6744-51.
- HASLBECK, M., WEINKAUF, S. & BUCHNER, J. 2019. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *J Biol Chem*, 294, 2121-2132.
- HAYASHI-NISHINO, M., FUJITA, N., NODA, T., YAMAGUCHI, A., YOSHIMORI, T. & YAMAMOTO, A. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*, 11, 1433-7.
- HAYER-HARTL, M., BRACHER, A. & HARTL, F. U. 2016. The GroEL-GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends Biochem Sci*, 41, 62-76.
- HAYER-HARTL, M. & MINTON, A. P. 2006. A simple semiempirical model for the effect of molecular confinement upon the rate of protein folding. *Biochemistry*, 45, 13356-60.
- HEATH, J. P. & HOLIFIELD, B. F. 1991. Cell locomotion: new research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow. *Cell Motil Cytoskeleton*, 18, 245-57.

- HEBB, C. O. & WHITTAKER, V. P. 1958. Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *J Physiol*, 142, 187-96.
- HEISSLER, S. M. & MANSTEIN, D. J. 2011. Comparative kinetic and functional characterization of the motor domains of human nonmuscle myosin-2C isoforms. *J Biol Chem*, 286, 21191-202.
- HEISSLER, S. M. & MANSTEIN, D. J. 2013. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cell Mol Life Sci*, 70, 1-21.
- HEISSLER, S. M. & SELLERS, J. R. 2016. Kinetic Adaptations of Myosins for Their Diverse Cellular Functions. *Traffic*, 17, 839-59.
- HEMELAAR, J., LELYVELD, V. S., KESSLER, B. M. & PLOEGH, H. L. 2003. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem*, 278, 51841-50.
- HENSON, J. H., DITZLER, C. E., GERMAIN, A., IRWIN, P. M., VOGT, E. T., YANG, S., WU, X. & SHUSTER, C. B. 2017. The ultrastructural organization of actin and myosin II filaments in the contractile ring: new support for an old model of cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 28, 613-623.
- HERTZ, L. & DIENEL, G. A. 2002. Energy metabolism in the brain. *Int Rev Neurobiol*, 51, 1-102.
- HILL, S. M., HANZEN, S. & NYSTROM, T. 2017. Restricted access: spatial sequestration of damaged proteins during stress and aging. *EMBO Rep*, 18, 377-391.
- HINMAN, J. D., CHEN, C. D., OH, S. Y., HOLLANDER, W. & ABRAHAM, C. R. 2008. Age-dependent accumulation of ubiquitinated 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in myelin lipid rafts. *Glia*, 56, 118-33.
- HIPP, M. S., KASTURI, P. & HARTL, F. U. 2019. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 421-435.
- HIPP, M. S., PARK, S. H. & HARTL, F. U. 2014. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol*, 24, 506-14.
- HISHIYA, A., KITAZAWA, T. & TAKAYAMA, S. 2010. BAG3 and Hsc70 interact with actin capping protein CapZ to maintain myofibrillar integrity under mechanical stress. *Circ Res*, 107, 1220-31.
- HODGES, J. L., NEWELL-LITWA, K., ASMUSSEN, H., VICENTE-MANZANARES, M. & HORWITZ, A. R. 2011. Myosin IIb activity and phosphorylation status determines dendritic spine and post-synaptic density morphology. *PLoS One*, 6, e24149.
- HOLLAND, P. & SIMONSEN, A. 2015. Actin shapes the autophagosome. *Nat Cell Biol*, 17, 1094-6.
- HOLMBERG, C. I., STANISZEWSKI, K. E., MENSAH, K. N., MATOUSCHEK, A. & MORIMOTO, R. I. 2004. Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *EMBO J*, 23, 4307-18.
- HOMEWOOD, C. A., WARHURST, D. C., PETERS, W. & BAGGALEY, V. C. 1972. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature*, 235, 50-2.
- HOMMA, S., IWASAKI, M., SHELTON, G. D., ENGVALL, E., REED, J. C. & TAKAYAMA, S. 2006. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol*, 169, 761-73.
- HORWICH, A. L., FENTON, W. A., CHAPMAN, E. & FARR, G. W. 2007. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 115-45.
- HORWITZ, J. 1992. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10449-53.
- HOSOKAWA, N., HARA, T., KAIZUKA, T., KISHI, C., TAKAMURA, A., MIURA, Y., IEMURA, S., NATSUME, T., TAKEHANA, K., YAMADA, N., GUAN, J. L., OSHIRO, N. & MIZUSHIMA, N. 2009a. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 20, 1981-91.
- HOSOKAWA, N., SASAKI, T., IEMURA, S., NATSUME, T., HARA, T. & MIZUSHIMA, N. 2009b. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 5, 973-9.
- HOSONO, Y., USUKURA, J., YAMAGUCHI, T., YANAGISAWA, K., SUZUKI, M. & TAKAHASHI, T. 2012. MYBPH inhibits NM IIA assembly via direct interaction with NMHC IIA and reduces cell motility. *Biochem Biophys Res Commun*, 428, 173-8.

- HUMPHREY, D., DUGGAN, C., SAHA, D., SMITH, D. & KAS, J. 2002. Active fluidization of polymer networks through molecular motors. *Nature*, 416, 413-6.
- HUMPHREY, J. D., DUFRESNE, E. R. & SCHWARTZ, M. A. 2014. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 802-12.
- HUNG, C. M., GARCIA-HARO, L., SPARKS, C. A. & GUERTIN, D. A. 2012. mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- HUO, Y., HU, Z., ZHANG, K., WANG, L., ZHAI, Y., ZHOU, Q., LANDER, G., ZHU, J., HE, Y., PANG, X., XU, W., BARTLAM, M., DONG, Z. & SUN, F. 2010. Crystal structure of group II chaperonin in the open state. *Structure*, 18, 1270-9.
- HUPPERT, J., CLOSHEN, D., CROXFORD, A., WHITE, R., KULIG, P., PIETROWSKI, E., BECHMANN, I., BECHER, B., LUHMANN, H. J., WAISMAN, A. & KUHLMANN, C. R. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*, 24, 1023-34.
- HUR, E. M., YANG, I. H., KIM, D. H., BYUN, J., SAIJILAFU, XU, W. L., NICOVICH, P. R., CHEONG, R., LEVCHENKO, A., THAKOR, N. & ZHOU, F. Q. 2011. Engineering neuronal growth cones to promote axon regeneration over inhibitory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5057-62.
- HUTSLER, J. J. & ZHANG, H. 2010. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res*, 1309, 83-94.
- HUXLEY, H. E. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science*, 164, 1356-65.
- IADANZA, M. G., JACKSON, M. P., HEWITT, E. W., RANSON, N. A. & RADFORD, S. E. 2018. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 755-773.
- ICHIMURA, Y., KIRISAKO, T., TAKAO, T., SATOMI, Y., SHIMONISHI, Y., ISHIHARA, N., MIZUSHIMA, N., TANIDA, I., KOMINAMI, E., OHSUMI, M., NODA, T. & OHSUMI, Y. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408, 488-92.
- IKEBE, M., HARTSHORNE, D. J. & ELZINGA, M. 1986. Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem*, 261, 36-9.
- IKEBE, M. & REARDON, S. 1990. Phosphorylation of bovine platelet myosin by protein kinase C. *Biochemistry*, 29, 2713-20.
- IKONEN, E., DE ALMEID, J. B., FATH, K. R., BURGESS, D. R., ASHMAN, K., SIMONS, K. & STOW, J. L. 1997. Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. *J Cell Sci*, 110 (Pt 18), 2155-64.
- IMAI, Y., SODA, M., HATAKEYAMA, S., AKAGI, T., HASHIKAWA, T., NAKAYAMA, K. I. & TAKAHASHI, R. 2002. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*, 10, 55-67.
- INOKI, K., LI, Y., XU, T. & GUAN, K. L. 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17, 1829-34.
- IORIO, V., FESTA, M., ROSATI, A., HAHNE, M., TIBERTI, C., CAPUNZO, M., DE LAURENZI, V. & TURCO, M. C. 2015. BAG3 regulates formation of the SNARE complex and insulin secretion. *Cell Death Dis*, 6, e1684.
- ITO, K. & ADELSTEIN, R. S. 1995. Neuronal cell expression of inserted isoforms of vertebrate nonmuscle myosin heavy chain II-B. *J Biol Chem*, 270, 14533-40.
- IVANOV, A. I., BACHAR, M., BABBIN, B. A., ADELSTEIN, R. S., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2007. A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions. *PLoS One*, 2, e658.
- IVKOVIC, S., BEADLE, C., NOTICEWALA, S., MASSEY, S. C., SWANSON, K. R., TORO, L. N., BRESNICK, A. R., CANOLL, P. & ROSENFELD, S. S. 2012. Direct inhibition of myosin II effectively blocks glioma invasion in the presence of multiple motogens. *Mol Biol Cell*, 23, 533-42.
- IWASAKI, M., HOMMA, S., HISHIYA, A., DOLEZAL, S. J., REED, J. C. & TAKAYAMA, S. 2007. BAG3 regulates motility and adhesion of epithelial cancer cells. *Cancer Res*, 67, 10252-9.

- IWASAKI, M., TANAKA, R., HISHIYA, A., HOMMA, S., REED, J. C. & 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.
- IWATA, A., RILEY, B. E., JOHNSTON, J. A. & KOPITO, R. R. 2005. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem*, 280, 40282-92.
- JACOBS, A. T. & MARNETT, L. J. 2009. HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Biol Chem*, 284, 9176-83.
- JACOBSON, T., PRIYA, S., SHARMA, S. K., ANDERSSON, S., JAKOBSSON, S., TANGHE, R., ASHOURI, A., RAUCH, S., GOLOUBINOFF, P., CHRISTEN, P. & TAMAS, M. J. 2017. Cadmium Causes Misfolding and Aggregation of Cytosolic Proteins in Yeast. *Mol Cell Biol*, 37.
- JAFFER, F., MURPHY, S. M., SCOTO, M., HEALY, E., ROSSOR, A. M., BRANDNER, S., PHADKE, R., SELCEN, D., JUNGBLUTH, H., MUNTONI, F. & REILLY, M. M. 2012. BAG3 mutations: another cause of giant axonal neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 17, 210-6.
- JAKOB, U., GAESTEL, M., ENGEL, K. & BUCHNER, J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268, 1517-20.
- JANA, S. S., KAWAMOTO, S. & ADELSTEIN, R. S. 2006. A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *J Biol Chem*, 281, 24662-70.
- JANA, S. S., KIM, K. Y., MAO, J., KAWAMOTO, S., SELLERS, J. R. & ADELSTEIN, R. S. 2009. An alternatively spliced isoform of non-muscle myosin II-C is not regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, 284, 11563-71.
- JIANG, J., BALLINGER, C. A., WU, Y., DAI, Q., CYR, D. M., HOHFELD, J. & 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.
- JIN, M. & KLIONSKY, D. J. 2014. Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Lett*, 588, 2457-63.
- JIN, Y. H., AHN, S. G. & KIM, S. A. 2015. BAG3 affects the nucleocytoplasmic shuttling of HSF1 upon heat stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 464, 561-7.
- JOHANSEN, T. & LAMARK, T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7, 279-96.
- JOHNSTON, J. A., DALTON, M. J., GURNEY, M. E. & KOPITO, R. R. 2000. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12571-6.
- JOHNSTON, J. A., WARD, C. L. & KOPITO, R. R. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143, 1883-98.
- JOO, E., SURKA, M. C. & TRIMBLE, W. S. 2007. Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev Cell*, 13, 677-90.
- JOVAISAITE, V., MOUCHIROUD, L. & AUWERX, J. 2014. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J Exp Biol*, 217, 137-43.
- JUNG, S. E., KIM, Y. K., YOUN, D. Y., LIM, M. H., KO, J. H., AHN, Y. S. & LEE, J. H. 2010. Down-modulation of Bis sensitizes cell death in C6 glioma cells induced by oxygen-glucose deprivation. *Brain Res*, 1349, 1-10.
- KAKKAR, V., MEISTER-BROEKEMA, M., MINOIA, M., CARRA, S. & KAMPINGA, H. H. 2014. Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. *Dis Model Mech*, 7, 421-34.
- KALISMAN, N., ADAMS, C. M. & LEVITT, M. 2012. Subunit order of eukaryotic TRiC/CCT chaperonin by cross-linking, mass spectrometry, and combinatorial homology modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2884-9.
- KAMPINGA, H. H. & CRAIG, E. A. 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 579-92.

- KAMPINGA, H. H., HAGEMAN, J., VOS, M. J., KUBOTA, H., TANGUAY, R. M., BRUFORD, E. A., CHEETHAM, M. E., CHEN, B. & HIGHTOWER, L. E. 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, 14, 105-11.
- KASAMA-YOSHIDA, H., TOHYAMA, Y., KURIHARA, T., SAKUMA, M., KOJIMA, H. & TAMAI, Y. 1997. A comparative study of 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase in vertebrates: cDNA cloning and amino acid sequences for chicken and bullfrog enzymes. *J Neurochem*, 69, 1335-42.
- KAST, D. J. & DOMINGUEZ, R. 2015. WHAMM links actin assembly via the Arp2/3 complex to autophagy. *Autophagy*, 11, 1702-4.
- KATHAGE, B., GEHLERT, S., ULBRICHT, A., LUDECKE, L., TAPIA, V. E., ORFANOS, Z., WENZEL, D., BLOCH, W., VOLKMER, R., FLEISCHMANN, B. K., FURST, D. O. & HOHFELD, J. 2017. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864, 62-75.
- KAUSHIK, S. & CUERVO, A. M. 2015. Proteostasis and aging. *Nat Med*, 21, 1406-15.
- KAWAMOTO, S. 1996. Neuron-specific alternative splicing of nonmuscle myosin II heavy chain-B pre-mRNA requires a cis-acting intron sequence. *J Biol Chem*, 271, 17613-6.
- KAWAMOTO, S. & ADELSTEIN, R. S. 1991. Chicken nonmuscle myosin heavy chains: differential expression of two mRNAs and evidence for two different polypeptides. *J Cell Biol*, 112, 915-24.
- KELLEY, C. A., SELLERS, J. R., GARD, D. L., BUI, D., ADELSTEIN, R. S. & BAINES, I. C. 1996. Xenopus nonmuscle myosin heavy chain isoforms have different subcellular localizations and enzymatic activities. *J Cell Biol*, 134, 675-87.
- KENDRICK-JONES, J., SMITH, R. C., CRAIG, R. & CITI, S. 1987. Polymerization of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosins. *J Mol Biol*, 198, 241-52.
- 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.
- KETTERN, N., DREISEIDLER, M., TAWO, R. & HOHFELD, J. 2010. Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem*, 391, 481-9.
- KHAMINETS, A., BEHL, C. & DIKIC, I. 2016. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol*, 26, 6-16.
- KHARAIT, S., DHIR, R., LAUFFENBURGER, D. & WELLS, A. 2006. Protein kinase Cdelta signaling downstream of the EGF receptor mediates migration and invasiveness of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 343, 848-56.
- KHUON, S., LIANG, L., DETTMAN, R. W., SPORN, P. H., WYSOLMERSKI, R. B. & CHEW, T. L. 2010. Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study. *J Cell Sci*, 123, 431-40.
- KIBOKU, T., KATO, T., NAKAMURA, A., KITAMURA, A., KINJO, M., MURAKAMI, Y. & TAKAHASHI, M. 2013. Nonmuscle myosin II folds into a 10S form via two portions of tail for dynamic subcellular localization. *Genes Cells*, 18, 90-109.
- KIM, E. & SHENG, M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*, 5, 771-81.
- KIM, J., HUANG, W. P. & KLIONSKY, D. J. 2001. Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J Cell Biol*, 152, 51-64.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KIM, K. Y., KAWAMOTO, S., BAO, J., SELLERS, J. R. & ADELSTEIN, R. S. 2008. The B2 alternatively spliced isoform of nonmuscle myosin II-B lacks actin-activated MgATPase activity and in vitro motility. *Biochem Biophys Res Commun*, 369, 124-34.
- KIM, K. Y., KOVACS, M., KAWAMOTO, S., SELLERS, J. R. & ADELSTEIN, R. S. 2005. Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C. *J Biol Chem*, 280, 22769-75.

- KIM, Y. E., HIPPEL, M. S., BRACHER, A., HAYER-HARTL, M. & HARTL, F. U. 2013. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem*, 82, 323-55.
- KIM, Y. E., HOSP, F., FROTTIN, F., GE, H., MANN, M., HAYER-HARTL, M. & HARTL, F. U. 2016. Soluble Oligomers of PolyQ-Expanded Huntingtin Target a Multiplicity of Key Cellular Factors. *Mol Cell*, 63, 951-64.
- KIRISAKO, T., ICHIMURA, Y., OKADA, H., KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T., OHSUMI, M., TAKAO, T., NODA, T. & OHSUMI, Y. 2000. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol*, 151, 263-76.
- KIRKIN, V., LAMARK, T., SOU, Y. S., BJORKKOY, G., NUNN, J. L., BRUUN, J. A., SHVETS, E., MCEWAN, D. G., CLAUSEN, T. H., WILD, P., BILUSIC, I., THEURILLAT, J. P., OVERVATN, A., ISHII, T., ELAZAR, Z., KOMATSU, M., DIKIC, I. & JOHANSEN, T. 2009. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell*, 33, 505-16.
- KISS, B., DUELLI, A., RADNAI, L., KEKESI, K. A., KATONA, G. & NYITRAY, L. 2012. Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 6048-53.
- KITAMURA, A., KUBOTA, H., PACK, C. G., MATSUMOTO, G., HIRAYAMA, S., TAKAHASHI, Y., KIMURA, H., KINJO, M., MORIMOTO, R. I. & NAGATA, K. 2006. Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat Cell Biol*, 8, 1163-70.
- KITYK, R., VOGEL, M., SCHLECHT, R., BUKAU, B. & MAYER, M. P. 2015. Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones. *Nat Commun*, 6, 8308.
- KLAIPS, C. L., JAYARAJ, G. G. & HARTL, F. U. 2018. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol*, 217, 51-63.
- KLEY, R. A., OLIVE, M. & SCHRODER, R. 2016. New aspects of myofibrillar myopathies. *Curr Opin Neurol*, 29, 628-34.
- KLIMEK, C., KATHAGE, B., WORDEHOFF, J. & HOHFELD, J. 2017. BAG3-mediated proteostasis at a glance. *J Cell Sci*, 130, 2781-2788.
- KLIONSKY, D. J. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*, 118, 7-18.
- KLIONSKY, D. J. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 931-7.
- KLIONSKY, D. J., ABDELMOHSEN, K., ABE, A., ABEDIN, M. J., ABELIOVICH, H., ACEVEDO AROZENA, A., ADACHI, H., ADAMS, C. M., ADAMS, P. D., ADELI, K., ADHIHETTY, P. J., ADLER, S. G., AGAM, G., AGARWAL, R., AGHI, M. K., AGNELLO, M., AGOSTINIS, P., AGUILAR, P. V., AGUIRRE-GHISO, J., AIROLDI, E. M., AIT-SI-ALI, S., AKEMATSU, T., AKPORIAYE, E. T., AL-RUBEAI, M., ALBAICETA, G. M., ALBANESE, C., ALBANI, D., ALBERT, M. L., ALDUDO, J., ALGUL, H., ALIREZAEI, M., ALLOZA, I., ALMASAN, A., ALMONTE-BECERIL, M., ALNEMRI, E. S., ALONSO, C., ALTAN-BONNET, N., ALTIERI, D. C., ALVAREZ, S., ALVAREZ-ERVITI, L., ALVES, S., AMADORO, G., AMANO, A., AMANTINI, C., AMBROSIO, S., AMELIO, I., AMER, A. O., AMESSOU, M., AMON, A., AN, Z., ANANIA, F. A., ANDERSEN, S. U., ANDLEY, U. P., ANDREADI, C. K., ANDRIEU-ABADIE, N., ANEL, A., ANN, D. K., ANOOPKUMAR-DUKIE, S., ANTONIOLI, M., AOKI, H., APOSTOLOVA, N., AQUILA, S., AQUILANO, K., ARAKI, K., ARAMA, E., ARANDA, A., ARAYA, J., ARCARO, A., ARIAS, E., ARIMOTO, H., ARIOSA, A. R., ARMSTRONG, J. L., ARNOULD, T., ARSOV, I., ASANUMA, K., ASKANAS, V., ASSELIN, E., ATARASHI, R., ATHERTON, S. S., ATKIN, J. D., ATTARDI, L. D., AUBERGER, P., AUBURGER, G., AURELIAN, L., AUTELLI, R., AVAGLIANO, L., AVANTAGGIATI, M. L., AVRAHAMI, L., AWALE, S., AZAD, N., BACHETTI, T., BACKER, J. M., BAE, D. H., BAE, J. S., BAE, O. N., BAE, S. H., BAEHRECKE, E. H., BAEK, S. H., BAGHDIGUIAN, S., BAGNIEWSKA-ZADWORNIA, A., et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12, 1-222.

- KLIONSKY, D. J., CREGG, J. M., DUNN, W. A., JR., EMR, S. D., SAKAI, Y., SANDOVAL, I. V., SIBIRNY, A., SUBRAMANI, S., THUMM, M., VEENHUIS, M. & OHSUMI, Y. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, 5, 539-45.
- KLIONSKY, D. J. & SCHULMAN, B. A. 2014. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 336-45.
- KNEZEVIC, T., MYERS, V. D., GORDON, J., TILLEY, D. G., SHARP, T. E., 3RD, WANG, J., KHALILI, K., CHEUNG, J. Y. & FELDMAN, A. M. 2015. BAG3: a new player in the heart failure paradigm. *Heart Fail Rev*, 20, 423-34.
- KOCATURK, N. M. & GOZUACIK, D. 2018. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Front Cell Dev Biol*, 6, 128.
- KOGA, H., KAUSHIK, S. & CUERVO, A. M. 2010. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J*, 24, 3052-65.
- KOGEL, D., LINDER, B., BRUNSCHWEIGER, A., CHINES, S. & BEHL, C. 2020. At the Crossroads of Apoptosis and Autophagy: Multiple Roles of the Co-Chaperone BAG3 in Stress and Therapy Resistance of Cancer. *Cells*, 9.
- KOLEGA, J. 2003. Asymmetric distribution of myosin IIB in migrating endothelial cells is regulated by a rho-dependent kinase and contributes to tail retraction. *Mol Biol Cell*, 14, 4745-57.
- KOMATSU, S. & IKEBE, M. 2007. The phosphorylation of myosin II at the Ser1 and Ser2 is critical for normal platelet-derived growth factor induced reorganization of myosin filaments. *Mol Biol Cell*, 18, 5081-90.
- KONERSMAN, C. G., BORDINI, B. J., SCHARER, G., LAWLOR, M. W., ZANGWILL, S., SOUTHERN, J. F., AMOS, L., GEDDES, G. C., KLIEGMAN, R. & COLLINS, M. P. 2015. BAG3 myofibrillar myopathy presenting with cardiomyopathy. *Neuromuscul Disord*, 25, 418-22.
- KOPITO, R. R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, 10, 524-30.
- KOPITZ, J., KISEN, G. O., GORDON, P. B., BOHLEY, P. & SEGLEN, P. O. 1990. Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol*, 111, 941-53.
- KORNAU, H. C., SCHENKER, L. T., KENNEDY, M. B. & SEEBURG, P. H. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 269, 1737-40.
- KOSTERA-PRUSZCZYK, A., SUSZEK, M., PLOSKI, R., FRANASZCZYK, M., POTULSKA-CHROMIK, A., PRUSZCZYK, P., SADURSKA, E., KAROLCZAK, J., KAMINSKA, A. M. & REDOWICZ, M. J. 2015. BAG3-related myopathy, polyneuropathy and cardiomyopathy with long QT syndrome. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 423-32.
- KOVACS, M., THIRUMURUGAN, K., KNIGHT, P. J. & SELLERS, J. R. 2007. Load-dependent mechanism of nonmuscle myosin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9994-9.
- KOVACS, M., WANG, F., HU, A., ZHANG, Y. & SELLERS, J. R. 2003. Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem*, 278, 38132-40.
- KRENDEL, M. & MOOSEKER, M. S. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)*, 20, 239-51.
- KREY, J. F., PASCA, S. P., SHCHEGLOVITOV, A., YAZAWA, M., SCHWEMBERGER, R., RASMUSSEN, R. & DOLMETSCH, R. E. 2013. Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci*, 16, 201-9.
- KRIAJEVSKA, M. V., CARDENAS, M. N., GRIGORIAN, M. S., AMBARTSUMIAN, N. S., GEORGIEV, G. P. & LUKANIDIN, E. M. 1994. Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem*, 269, 19679-82.
- KRUPPA, A. J., KENDRICK-JONES, J. & BUSS, F. 2016. Myosins, Actin and Autophagy. *Traffic*, 17, 878-90.
- KUCHITSU, Y., HOMMA, Y., FUJITA, N. & FUKUDA, M. 2018. Rab7 knockout unveils regulated autolysosome maturation induced by glutamine starvation. *J Cell Sci*, 131.

- KULAK, N. A., GEYER, P. E. & MANN, M. 2017. Loss-less Nano-fractionator for High Sensitivity, High Coverage Proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 16, 694-705.
- KWON, K. R., AHN, J. Y., KIM, M. S., JUNG, J. Y., LEE, J. H. & OH, I. H. 2010. Disruption of bis leads to the deterioration of the vascular niche for hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, 28, 268-78.
- KYRATSOUS, C. A. & SILVERSTEIN, S. J. 2008. The co-chaperone BAG3 regulates Herpes Simplex Virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20912-7.
- LABBADIA, J. & MORIMOTO, R. I. 2013. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem Sci*, 38, 378-85.
- LABBADIA, J. & MORIMOTO, R. I. 2015. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem*, 84, 435-64.
- LAI, J. C. & CLARK, J. B. 1976. Preparation and properties of mitochondria derived from synaptosomes. *Biochem J*, 154, 423-32.
- LAMARK, T. & JOHANSEN, T. 2012. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol*, 2012, 736905.
- LANGER, T., LU, C., ECHOLS, H., FLANAGAN, J., HAYER, M. K. & HARTL, F. U. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*, 356, 683-9.
- LASHUEL, H. A., HARTLEY, D., PETRE, B. M., WALZ, T. & LANSBURY, P. T., JR. 2002. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418, 291.
- LASHUEL, H. A. & LANSBURY, P. T., JR. 2006. Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q Rev Biophys*, 39, 167-201.
- LAUFFENBURGER, D. A. & HORWITZ, A. F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-69.
- LEE, C., KIM, H. & BARDWELL, J. C. A. 2018. Electrostatic interactions are important for chaperone-client interaction in vivo. *Microbiology*, 164, 992-997.
- LEE, D. H. & GOLDBERG, A. L. 1996. Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271, 27280-4.
- LEE, H. C., CHERK, S. W., CHAN, S. K., WONG, S., TONG, T. W., HO, W. S., CHAN, A. Y., LEE, K. C. & MAK, C. M. 2012. BAG3-related myofibrillar myopathy in a Chinese family. *Clin Genet*, 81, 394-8.
- LEE, J. H., TAKAHASHI, T., YASUHARA, N., INAZAWA, J., KAMADA, S. & TSUJIMOTO, Y. 1999. Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene*, 18, 6183-90.
- LEI, Z., BRIZZEE, C. & JOHNSON, G. V. 2015. BAG3 facilitates the clearance of endogenous tau in primary neurons. *Neurobiol Aging*, 36, 241-8.
- LEITNER, A., JOACHIMIAK, L. A., BRACHER, A., MONKEMEYER, L., WALZTHOENI, T., CHEN, B., PECHMANN, S., HOLMES, S., CONG, Y., MA, B., LUDTKE, S., CHIU, W., HARTL, F. U., AEBERSOLD, R. & FRYDMAN, J. 2012. The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Structure*, 20, 814-25.
- LEVINE, B. & KLIONSKY, D. J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6, 463-77.
- LEVINE, B. & YUAN, J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, 115, 2679-88.
- LI, F. & ZHU, Y. T. 2015. HGF-activated colonic fibroblasts mediates carcinogenesis of colonic epithelial cancer cells via PKC-cMET-ERK1/2-COX-2 signaling. *Cell Signal*, 27, 860-6.
- LI, J., CAI, T., JIANG, Y., CHEN, H., HE, X., CHEN, C., LI, X., SHAO, Q., RAN, X., LI, Z., XIA, K., LIU, C., SUN, Z. S. & WU, J. 2016. Genes with de novo mutations are shared by four neuropsychiatric disorders discovered from NPdenovo database. *Mol Psychiatry*, 21, 298.
- LI, N., DU, Z. X., ZONG, Z. H., LIU, B. Q., LI, C., ZHANG, Q. & WANG, H. Q. 2013. PKCdelta-mediated phosphorylation of BAG3 at Ser187 site induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in thyroid cancer FRO cells. *Oncogene*, 32, 4539-48.
- LI, X., COLVIN, T., RAUCH, J. N., ACOSTA-ALVEAR, D., KAMPMANN, M., DUNYAK, B., HANN, B., AFTAB, B. T., MURNANE, M., CHO, M., WALTER, P., WEISSMAN, J. S., SHERMAN, M. Y. & GESTWICKI,

- J. E. 2015a. Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer. *Mol Cancer Ther*, 14, 642-8.
- LI, Y., LALWANI, A. K. & MHATRE, A. N. 2008. Alternative splice variants of MYH9. *DNA Cell Biol*, 27, 117-25.
- LI, Z., LIU, Y. H., LIU, X. B., XUE, Y. X., WANG, P. & LIU, L. B. 2015b. Low-dose endothelial monocyte-activating polypeptide-II increases permeability of blood-tumor barrier via a PKC-zeta/PP2A-dependent signaling mechanism. *Exp Cell Res*, 331, 257-66.
- LI, Z. H., SPEKTOR, A., VARLAMOVA, O. & BRESNICK, A. R. 2003. Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry*, 42, 14258-66.
- LIAO, Q., OZAWA, F., FRIESS, H., ZIMMERMANN, A., TAKAYAMA, S., REED, J. C., KLEEFF, J. & BUCHLER, M. W. 2001. The anti-apoptotic protein BAG-3 is overexpressed in pancreatic cancer and induced by heat stress in pancreatic cancer cell lines. *FEBS Lett*, 503, 151-7.
- LIBEREK, K., SKOWYRA, D., ZYLICZ, M., JOHNSON, C. & GEORGOPOULOS, C. 1991. The Escherichia coli DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J Biol Chem*, 266, 14491-6.
- LIN, Z. & RYE, H. S. 2004. Expansion and compression of a protein folding intermediate by GroEL. *Mol Cell*, 16, 23-34.
- LIU, B., LARSSON, L., CABALLERO, A., HAO, X., OLING, D., GRANTHAM, J. & NYSTROM, T. 2010. The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. *Cell*, 140, 257-67.
- LIU, J., WENDT, T., TAYLOR, D. & TAYLOR, K. 2003. Refined model of the 10S conformation of smooth muscle myosin by cryo-electron microscopy 3D image reconstruction. *J Mol Biol*, 329, 963-72.
- LIU, P., XU, B., LI, J. & LU, H. 2009a. BAG3 gene silencing sensitizes leukemic cells to Bortezomib-induced apoptosis. *FEBS Lett*, 583, 401-6.
- LIU, S., GOLDSTEIN, R. H., SCEPANSKY, E. M. & ROSENBLATT, M. 2009b. Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. *Cancer Res*, 69, 8742-51.
- LIU, X., BILLINGTON, N., SHU, S., YU, S. H., PISZCZEK, G., SELLERS, J. R. & KORN, E. D. 2017. Effect of ATP and regulatory light-chain phosphorylation on the polymerization of mammalian nonmuscle myosin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E6516-E6525.
- LIVNEH, I., COHEN-KAPLAN, V., COHEN-ROSENZWEIG, C., AVNI, N. & CIECHANOVER, A. 2016. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res*, 26, 869-85.
- LO, C. M., BUXTON, D. B., CHUA, G. C., DEMBO, M., ADELSTEIN, R. S. & WANG, Y. L. 2004. Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol Biol Cell*, 15, 982-9.
- LONGATTI, A., LAMB, C. A., RAZI, M., YOSHIMURA, S., BARR, F. A. & TOOZE, S. A. 2012. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J Cell Biol*, 197, 659-75.
- LOPEZ, T., DALTON, K. & FRYDMAN, J. 2015. The Mechanism and Function of Group II Chaperonins. *J Mol Biol*, 427, 2919-30.
- LU, J., BOHELER, K. R., JIANG, L., CHAN, C. W., TSE, W. W., KEUNG, W., POON, E. N., LI, R. A. & YAO, X. 2018. Polycystin-2 Plays an Essential Role in Glucose Starvation-Induced Autophagy in Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells*, 36, 501-513.
- LUDOWYKE, R. I., ELGUNDI, Z., KRANENBURG, T., STEHN, J. R., SCHMITZ-PEIFFER, C., HUGHES, W. E. & BIDEN, T. J. 2006. Phosphorylation of nonmuscle myosin heavy chain IIA on Ser1917 is mediated by protein kinase C beta II and coincides with the onset of stimulated degranulation of RBL-2H3 mast cells. *J Immunol*, 177, 1492-9.
- MA, X. & ADELSTEIN, R. S. 2012. In vivo studies on nonmuscle myosin II expression and function in heart development. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17, 545-55.
- MA, X. & ADELSTEIN, R. S. 2014. The role of vertebrate nonmuscle Myosin II in development and human disease. *Bioarchitecture*, 4, 88-102.

- MA, X., JANA, S. S., CONTI, M. A., KAWAMOTO, S., CLAYCOMB, W. C. & ADELSTEIN, R. S. 2010. Ablation of nonmuscle myosin II-B and II-C reveals a role for nonmuscle myosin II in cardiac myocyte karyokinesis. *Mol Biol Cell*, 21, 3952-62.
- MA, X., KAWAMOTO, S., URIBE, J. & ADELSTEIN, R. S. 2006. Function of the neuron-specific alternatively spliced isoforms of nonmuscle myosin II-B during mouse brain development. *Mol Biol Cell*, 17, 2138-49.
- MA, X., KOVACS, M., CONTI, M. A., WANG, A., ZHANG, Y., SELLERS, J. R. & ADELSTEIN, R. S. 2012. Nonmuscle myosin II exerts tension but does not translocate actin in vertebrate cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 4509-14.
- MABUCHI, I. & OKUNO, M. 1977. The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J Cell Biol*, 74, 251-63.
- MADAY, S. & HOLZBAUR, E. L. 2016. Compartment-Specific Regulation of Autophagy in Primary Neurons. *J Neurosci*, 36, 5933-45.
- MAIURI, M. C., ZALCKVAR, E., KIMCHI, A. & KROEMER, G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 741-52.
- MALINOVSKA, L., KROSCHWALD, S., MUNDER, M. C., RICHTER, D. & ALBERTI, S. 2012. Molecular chaperones and stress-inducible protein-sorting factors coordinate the spatiotemporal distribution of protein aggregates. *Mol Biol Cell*, 23, 3041-56.
- MANI, J., ANTONIETTI, P., RAKEL, S., BLAHETA, R., BARTSCH, G., HAFERKAMP, A. & KOGEL, D. 2016. Knockdown of BAG3 sensitizes bladder cancer cells to treatment with the BH3 mimetic ABT-737. *World J Urol*, 34, 197-205.
- MARI, M., GRIFFITH, J., RIETER, E., KRISHNAPPA, L., KLIONSKY, D. J. & REGGIORI, F. 2010. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J Cell Biol*, 190, 1005-22.
- MASEDUNSKAS, A., SRAMKOVA, M., PARENTE, L., SALES, K. U., AMORNPHIMOLTHAM, P., BUGGE, T. H. & WEIGERT, R. 2011. Role for the actomyosin complex in regulated exocytosis revealed by intravital microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 13552-7.
- MASHAGHI, A., BEZRUKAVNIKOV, S., MINDE, D. P., WENTINK, A. S., KITKY, R., ZACHMANN-BRAND, B., MAYER, M. P., KRAMER, G., BUKAU, B. & TANS, S. J. 2016. Alternative modes of client binding enable functional plasticity of Hsp70. *Nature*, 539, 448-451.
- MASSEY, A., KIFFIN, R. & CUERVO, A. M. 2004. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2420-34.
- MATSUMURA, F. 2005. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol*, 15, 371-7.
- MATSUMURA, F. & HARTSHORNE, D. J. 2008. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun*, 369, 149-56.
- MATSUMURA, F., ONO, S., YAMAKITA, Y., TOTSUKAWA, G. & YAMASHIRO, S. 1998. Specific localization of serine 19 phosphorylated myosin II during cell locomotion and mitosis of cultured cells. *J Cell Biol*, 140, 119-29.
- MAUVEZIN, C. & NEUFELD, T. P. 2015. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11, 1437-8.
- MAVRAKIS, M., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., STRATAKIS, C. A. & BOSSIS, I. 2006. Depletion of type IA regulatory subunit (R1alpha) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. *Hum Mol Genet*, 15, 2962-71.
- MAYER, M. P. 2010. Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell*, 39, 321-31.
- MAYER, M. P. & BUKAU, B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62, 670-84.
- MAYER, M. P., RUDIGER, S. & BUKAU, B. 2000. Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol Chem*, 381, 877-85.

- MCBEATH, R., PIRONE, D. M., NELSON, C. M., BHADRIRAJU, K. & CHEN, C. S. 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*, 6, 483-95.
- MCCLELLAN, A. J., XIA, Y., DEUTSCHBAUER, A. M., DAVIS, R. W., GERSTEIN, M. & FRYDMAN, J. 2007. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell*, 131, 121-35.
- MCCOLLUM, A. K., CASAGRANDE, G. & KOHN, E. C. 2009. Caught in the middle: the role of Bag3 in disease. *Biochem J*, 425, e1-3.
- MCHAOURAB, H. S., DODSON, E. K. & KOTEICHE, H. A. 2002. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins. Two-mode binding of the excited states of T4 lysozyme mutants by alphaA-crystallin. *J Biol Chem*, 277, 40557-66.
- MCLACHLAN, A. D. & KARN, J. 1982. Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature*, 299, 226-31.
- MEJLVANG, J., OLSVIK, H., SVENNING, S., BRUUN, J. A., ABUDU, Y. P., LARSEN, K. B., BRECH, A., HANSEN, T. E., BRENNE, H., HANSEN, T., STENMARK, H. & JOHANSEN, T. 2018. Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy. *J Cell Biol*, 217, 3640-3655.
- MERCER, C. A., KALIAPPAN, A. & DENNIS, P. B. 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 5, 649-62.
- MERIIN, A. B., NARAYANAN, A., MENG, L., ALEXANDROV, I., VARELAS, X., CISSE, II & SHERMAN, M. Y. 2018. Hsp70-Bag3 complex is a hub for proteotoxicity-induced signaling that controls protein aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E7043-E7052.
- MESHEL, A. S., WEI, Q., ADELSTEIN, R. S. & SHEETZ, M. P. 2005. Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 7, 157-64.
- MI, N., CHEN, Y., WANG, S., CHEN, M., ZHAO, M., YANG, G., MA, M., SU, Q., LUO, S., SHI, J., XU, J., GUO, Q., GAO, N., SUN, Y., CHEN, Z. & YU, L. 2015. CapZ regulates autophagosomal membrane shaping by promoting actin assembly inside the isolation membrane. *Nat Cell Biol*, 17, 1112-23.
- MIJALJICA, D., PRESCOTT, M. & DEVENISH, R. J. 2011. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7, 673-82.
- MILANESI, L., SHEYNIS, T., XUE, W. F., ORLOVA, E. V., HELLEWELL, A. L., JELINEK, R., HEWITT, E. W., RADFORD, S. E. & SAIBIL, H. R. 2012. Direct three-dimensional visualization of membrane disruption by amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 20455-60.
- MILHOLLAND, B., SUH, Y. & VIJG, J. 2017. Mutation and catastrophe in the aging genome. *Exp Gerontol*, 94, 34-40.
- MILLER, J., ARRASATE, M., BROOKS, E., LIBEU, C. P., LEGLEITER, J., HATTERS, D., CURTIS, J., CHEUNG, K., KRISHNAN, P., MITRA, S., WIDJAJA, K., SHABY, B. A., LOTZ, G. P., NEWHOUSE, Y., MITCHELL, E. J., OSMAND, A., GRAY, M., THULASIRAMIN, V., SAUDOU, F., SEGAL, M., YANG, X. W., MASLIAH, E., THOMPSON, L. M., MUCHOWSKI, P. J., WEISGRABER, K. H. & FINKBEINER, S. 2011. Identifying polyglutamine protein species in situ that best predict neurodegeneration. *Nat Chem Biol*, 7, 925-34.
- MINDELL, J. A. 2012. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 74, 69-86.
- MINOIA, M., BONCORAGLIO, A., VINET, J., MORELLI, F. F., BRUNSTING, J. F., POLETTI, A., KROM, S., REITS, E., KAMPINGA, H. H. & CARRA, S. 2014. BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. *Autophagy*, 10, 1603-21.
- MISEREY-LENKEI, S., CHALANCON, G., BARDIN, S., FORMSTECHE, E., GOUD, B. & ECHARD, A. 2010. Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat Cell Biol*, 12, 645-54.
- MISGELD, T. & SCHWARZ, T. L. 2017. Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron*, 96, 651-666.

- MITSUHASHI, M., SAKATA, H., KINJO, M., YAZAWA, M. & TAKAHASHI, M. 2011. Dynamic assembly properties of nonmuscle myosin II isoforms revealed by combination of fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *J Biochem*, 149, 253-63.
- MIYAUCHI, K., YAMAMOTO, Y., KOSAKA, T. & HOSOYA, H. 2006. Myosin II activity is not essential for recruitment of myosin II to the furrow in dividing HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 543-8.
- MIZUSHIMA, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21, 2861-73.
- MIZUSHIMA, N. 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 132-9.
- MIZUSHIMA, N. & KOMATSU, M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147, 728-41.
- MIZUSHIMA, N., KUMA, A., KOBAYASHI, Y., YAMAMOTO, A., MATSUBAE, M., TAKAO, T., NATSUME, T., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci*, 116, 1679-88.
- MIZUSHIMA, N., LEVINE, B., CUERVO, A. M. & KLIONSKY, D. J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 1069-75.
- MIZUSHIMA, N., NODA, T., YOSHIMORI, T., TANAKA, Y., ISHII, T., GEORGE, M. D., KLIONSKY, D. J., OHSUMI, M. & OHSUMI, Y. 1998a. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-8.
- MIZUSHIMA, N., SUGITA, H., YOSHIMORI, T. & OHSUMI, Y. 1998b. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem*, 273, 33889-92.
- MIZUSHIMA, N., YAMAMOTO, A., HATANO, M., KOBAYASHI, Y., KABEYA, Y., SUZUKI, K., TOKUHISA, T., OHSUMI, Y. & YOSHIMORI, T. 2001. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 152, 657-68.
- MIZUSHIMA, N., YAMAMOTO, A., MATSUI, M., YOSHIMORI, T. & OHSUMI, Y. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*, 15, 1101-11.
- MIZUSHIMA, N., YOSHIMORI, T. & OHSUMI, Y. 2002. Mouse Apg10 as an Apg12-conjugating enzyme: analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method. *FEBS Lett*, 532, 450-4.
- MLECZAK, A., MILLAR, S., TOOZE, S. A., OLSON, M. F. & CHAN, E. Y. 2013. Regulation of autophagosome formation by Rho kinase. *Cell Signal*, 25, 1-11.
- MOCHIDA, S., KOBAYASHI, H., MATSUDA, Y., YUDA, Y., MURAMOTO, K. & NONOMURA, Y. 1994. Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron*, 13, 1131-42.
- MOGK, A., BUKAU, B. & KAMPINGA, H. H. 2018. Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Mol Cell*, 69, 214-226.
- MOGK, A., DEUERLING, E., VORDERWULBECKE, S., VIERLING, E. & BUKAU, B. 2003. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol*, 50, 585-95.
- MORANO, I., CHAI, G. X., BALTAS, L. G., LAMOUNIER-ZEPTEP, V., LUTSCH, G., KOTT, M., HAASE, H. & BADER, M. 2000. Smooth-muscle contraction without smooth-muscle myosin. *Nat Cell Biol*, 2, 371-5.
- MORAWE, T., HIEBEL, C., KERN, A. & BEHL, C. 2012. Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 46, 41-54.
- MOREAU, K., RAVIKUMAR, B., RENNA, M., PURI, C. & RUBINSZTEIN, D. C. 2011. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell*, 146, 303-17.
- MORISHIMA, Y., WANG, A. M., YU, Z., PRATT, W. B., OSAWA, Y. & LIEBERMAN, A. P. 2008. CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. *Hum Mol Genet*, 17, 3942-52.

- MUKHERJEE, A., MORALES-SCHEIHING, D., BUTLER, P. C. & SOTO, C. 2015. Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends Mol Med*, 21, 439-49.
- MULLER, W. A. 2011. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol*, 6, 323-44.
- MUNOZ, I. G., YEBENES, H., ZHOU, M., MESA, P., SERNA, M., PARK, A. Y., BRAGADO-NILSSON, E., BELOSO, A., DE CARCER, G., MALUMBRES, M., ROBINSON, C. V., VALPUESTA, J. M. & MONTOYA, G. 2011. Crystal structure of the open conformation of the mammalian chaperonin CCT in complex with tubulin. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 14-9.
- MURAKAMI, N., CHAUHAN, V. P. & ELZINGA, M. 1998. Two nonmuscle myosin II heavy chain isoforms expressed in rabbit brains: filament forming properties, the effects of phosphorylation by protein kinase C and casein kinase II, and location of the phosphorylation sites. *Biochemistry*, 37, 1989-2003.
- MURAKAMI, N., KOTULA, L. & HWANG, Y. W. 2000. Two distinct mechanisms for regulation of nonmuscle myosin assembly via the heavy chain: phosphorylation for MIIB and mts 1 binding for MIIA. *Biochemistry*, 39, 11441-51.
- MURTHY, K. & WADSWORTH, P. 2005. Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. *Curr Biol*, 15, 724-31.
- MUSCH, A., COHEN, D. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1997. Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J Cell Biol*, 138, 291-306.
- NADIF KASRI, N., NAKANO-KOBAYASHI, A., MALINOW, R., LI, B. & VAN AELST, L. 2009. The Rho-linked mental retardation protein oligophrenin-1 controls synapse maturation and plasticity by stabilizing AMPA receptors. *Genes Dev*, 23, 1289-302.
- NADIF KASRI, N. & VAN AELST, L. 2008. Rho-linked genes and neurological disorders. *Pflugers Arch*, 455, 787-97.
- NAGY, A., TAKAGI, Y., BILLINGTON, N., SUN, S. A., HONG, D. K., HOMSHER, E., WANG, A. & SELLERS, J. R. 2013. Kinetic characterization of nonmuscle myosin IIb at the single molecule level. *J Biol Chem*, 288, 709-22.
- NAIR, U., CAO, Y., XIE, Z. & KLIONSKY, D. J. 2010. Roles of the lipid-binding motifs of Atg18 and Atg21 in the cytoplasm to vacuole targeting pathway and autophagy. *J Biol Chem*, 285, 11476-88.
- NAIR, U., JOTWANI, A., GENG, J., GAMMOH, N., RICHERSON, D., YEN, W. L., GRIFFITH, J., NAG, S., WANG, K., MOSS, T., BABA, M., MCNEW, J. A., JIANG, X., REGGIORI, F., MELIA, T. J. & KLIONSKY, D. J. 2011. SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell*, 146, 290-302.
- NAKAHATA, S. & KAWAMOTO, S. 2005. Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities. *Nucleic Acids Res*, 33, 2078-89.
- NAKAMURA, F., SONG, M., HARTWIG, J. H. & STOSSEL, T. P. 2014. Documentation and localization of force-mediated filamin A domain perturbations in moving cells. *Nat Commun*, 5, 4656.
- NAKAMURA, F., STOSSEL, T. P. & HARTWIG, J. H. 2011. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr*, 5, 160-9.
- NAKASAWA, T., TAKAHASHI, M., MATSUZAWA, F., AIKAWA, S., TOGASHI, Y., SAITOH, T., YAMAGISHI, A. & YAZAWA, M. 2005. Critical regions for assembly of vertebrate nonmuscle myosin II. *Biochemistry*, 44, 174-83.
- NAKASHIMA, M., ADACHI, S., YASUDA, I., YAMAUCHI, T., KAWAGUCHI, J., HANAMATSU, T., YOSHIOKA, T., OKANO, Y., HIROSE, Y., KOZAWA, O. & MORIWAKI, H. 2011. Inhibition of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase enhances the activation of epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer*, 10, 79.
- NAKATOGAWA, H., SUZUKI, K., KAMADA, Y. & OHSUMI, Y. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 458-67.
- NECO, P., FERNANDEZ-PERUCHENA, C., NAVAS, S., GUTIERREZ, L. M., DE TOLEDO, G. A. & ALES, E. 2008. Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis. *J Biol Chem*, 283, 10949-57.

- NECO, P., GINER, D., VINIEGRA, S., BORGES, R., VILLARROEL, A. & GUTIERREZ, L. M. 2004. New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells. *J Biol Chem*, 279, 27450-7.
- NEDIALKOVA, D. D. & LEIDEL, S. A. 2015. Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity. *Cell*, 161, 1606-18.
- NEMETHOVA, M., AUINGER, S. & SMALL, J. V. 2008. Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *J Cell Biol*, 180, 1233-44.
- NEWELL-LITWA, K. A., HORWITZ, R. & LAMERS, M. L. 2015. Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Dis Model Mech*, 8, 1495-515.
- NG, M. R., BESSER, A., DANUSER, G. & BRUGGE, J. S. 2012. Substrate stiffness regulates cadherin-dependent collective migration through myosin-II contractility. *J Cell Biol*, 199, 545-63.
- NGUYEN, H. A. & KIM, S. A. 2017. 2'-Hydroxycinnamaldehyde induces apoptosis through HSF1-mediated BAG3 expression. *Int J Oncol*, 50, 283-289.
- NIKOL, S., MURAKAMI, N., PICKERING, J. G., KEARNEY, M., LECLERC, G., HOFLING, B., ISNER, J. M. & WEIR, L. 1997. Differential expression of nonmuscle myosin II isoforms in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*, 130, 71-85.
- NILLEGODA, N. B. & BUKAU, B. 2015. Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: emergence and mechanisms. *Front Mol Biosci*, 2, 57.
- NILLEGODA, N. B., KIRSTEIN, J., SZLACHCIC, A., BERYNSKY, M., STANK, A., STENGEL, F., ARNSBURG, K., GAO, X., SCIOR, A., AEBERSOLD, R., GUILBRIDE, D. L., WADE, R. C., MORIMOTO, R. I., MAYER, M. P. & BUKAU, B. 2015. Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation. *Nature*, 524, 247-51.
- NISHIKAWA, M., SELLERS, J. R., ADELSTEIN, R. S. & HIDAKA, H. 1984. Protein kinase C modulates in vitro phosphorylation of the smooth muscle heavy meromyosin by myosin light chain kinase. *J Biol Chem*, 259, 8808-14.
- NIVON, M., ABOU-SAMRA, M., RICHET, E., GUYOT, B., ARRIGO, A. P. & KRETZ-REMY, C. 2012. NF-kappaB regulates protein quality control after heat stress through modulation of the BAG3-HspB8 complex. *J Cell Sci*, 125, 1141-51.
- NIXON, R. A. 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 19, 983-97.
- NORTON, N., LI, D., RIEDER, M. J., SIEGFRIED, J. D., RAMPERSAUD, E., ZUCHNER, S., MANGOS, S., GONZALEZ-QUINTANA, J., WANG, L., MCGEE, S., REISER, J., MARTIN, E., NICKERSON, D. A. & HERSHBERGER, R. E. 2011. Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, 88, 273-82.
- NWADIKE, C., WILLIAMSON, L. E., GALLAGHER, L. E., GUAN, J. L. & CHAN, E. Y. W. 2018. AMPK Inhibits ULK1-Dependent Autophagosome Formation and Lysosomal Acidification via Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol*, 38.
- ODGEREL, Z., SARKOZY, A., LEE, H. S., MCKENNA, C., RANKIN, J., STRAUB, V., LOCHMULLER, H., PAOLA, F., D'AMICO, A., BERTINI, E., BUSHBY, K. & GOLDFARB, L. G. 2010. Inheritance patterns and phenotypic features of myofibrillar myopathy associated with a BAG3 mutation. *Neuromuscul Disord*, 20, 438-42.
- OHASHI, Y. & MUNRO, S. 2010. Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Mol Biol Cell*, 21, 3998-4008.
- OLAZABAL, I. M., CARON, E., MAY, R. C., SCHILLING, K., KNECHT, D. A. & MACHESKY, L. M. 2002. Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not Fc-gammaR phagocytosis. *Curr Biol*, 12, 1413-18.
- OLSEN, J. V., BLAGOEV, B., GNAD, F., MACEK, B., KUMAR, C., MORTENSEN, P. & MANN, M. 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127, 635-48.
- OLZSCHA, H., SCHERMANN, S. M., WOERNER, A. C., PINKERT, S., HECHT, M. H., TARTAGLIA, G. G., VENDRUSCOLO, M., HAYER-HARTL, M., HARTL, F. U. & VABULAS, R. M. 2011. Amyloid-like

- aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell*, 144, 67-78.
- ONODERA, J. & OHSUMI, Y. 2005. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem*, 280, 31582-6.
- ORENSTEIN, S. J. & CUERVO, A. M. 2010. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol*, 21, 719-26.
- ORSI, A., RAZI, M., DOOLEY, H. C., ROBINSON, D., WESTON, A. E., COLLINSON, L. M. & TOOZE, S. A. 2012. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 23, 1860-73.
- OSEN-SAND, A., STAPLE, J. K., NALDI, E., SCHIAVO, G., ROSSETTO, O., PETITPIERRE, S., MALGAROLI, A., MONTECUCCO, C. & CATSICAS, S. 1996. Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J Comp Neurol*, 367, 222-34.
- PAGLIUCA, M. G., LEROSE, R., CIGLIANO, S. & LEONE, A. 2003. Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett*, 541, 11-5.
- PALLEROS, D. R., REID, K. L., SHI, L., WELCH, W. J. & FINK, A. L. 1993. ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K⁺ but not ATP hydrolysis. *Nature*, 365, 664-6.
- PANKIV, S., CLAUSEN, T. H., LAMARK, T., BRECH, A., BRUUN, J. A., OUTZEN, H., OVERVATN, A., BJORKKOY, G. & 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.
- PARAYSON, D., SAVERI, P., SAGNELLI, A. & PISCOSQUITO, G. 2015. Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neurosci Lett*, 596, 66-77.
- PARK, S. H., BOLENDER, N., EISELE, F., KOSTOVA, Z., TAKEUCHI, J., COFFINO, P. & WOLF, D. H. 2007. The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell*, 18, 153-65.
- PARK, S. H., KUKUSHKIN, Y., GUPTA, R., CHEN, T., KONAGAI, A., HIPPEL, M. S., HAYER-HARTL, M. & HARTL, F. U. 2013. PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. *Cell*, 154, 134-45.
- PARSELL, D. A., KOWAL, A. S., SINGER, M. A. & LINDQUIST, S. 1994. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, 372, 475-8.
- PARZYCH, K. R. & KLIONSKY, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- PASILLAS, M. P., SHIELDS, S., REILLY, R., STRNADEL, J., BEHL, C., PARK, R., YATES, J. R., 3RD, KLEMKE, R., GONIAS, S. L. & COPPINGER, J. A. 2015. Proteomic analysis reveals a role for Bcl2-associated athanogene 3 and major vault protein in resistance to apoptosis in senescent cells by regulating ERK1/2 activation. *Mol Cell Proteomics*, 14, 1-14.
- PATO, M. D., SELLERS, J. R., PRESTON, Y. A., HARVEY, E. V. & ADELSTEIN, R. S. 1996. Baculovirus expression of chicken nonmuscle heavy meromyosin II-B. Characterization of alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*, 271, 2689-95.
- PATWARI, P. & LEE, R. T. 2008. Mechanical control of tissue morphogenesis. *Circ Res*, 103, 234-43.
- PECCI, A., PANZA, E., DE ROCCO, D., PUJOL-MOIX, N., GIROTTO, G., PODDA, L., PAPARO, C., BOZZI, V., PASTORE, A., BALDUINI, C. L., SERI, M. & SAVOIA, A. 2010. MYH9 related disease: four novel mutations of the tail domain of myosin-9 correlating with a mild clinical phenotype. *Eur J Haematol*, 84, 291-7.
- PECCI, A., PANZA, E., PUJOL-MOIX, N., KLERSY, C., DI BARI, F., BOZZI, V., GRESELE, P., LETHAGEN, S., FABRIS, F., DUFOUR, C., GRANATA, A., DOUBEK, M., PECORARO, C., KOIVISTO, P. A., HELLER, P. G., IOLASCON, A., ALVISI, P., SCHWABE, D., DE CANDIA, E., ROCCA, B., RUSSO, U., RAMENGI, U., NORIS, P., SERI, M., BALDUINI, C. L. & SAVOIA, A. 2008. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat*, 29, 409-17.

- PEGLION, F., LLENSE, F. & ETIENNE-MANNEVILLE, S. 2014. Adherens junction treadmilling during collective migration. *Nat Cell Biol*, 16, 639-51.
- PENZES, P., CAHILL, M. E., JONES, K. A., VANLEEUWEN, J. E. & WOOLFREY, K. M. 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 14, 285-93.
- PEREIRA, J. H., RALSTON, C. Y., DOUGLAS, N. R., MEYER, D., KNEE, K. M., GOULET, D. R., KING, J. A., FRYDMAN, J. & ADAMS, P. D. 2010. Crystal structures of a group II chaperonin reveal the open and closed states associated with the protein folding cycle. *J Biol Chem*, 285, 27958-66.
- PLATINI, F., PEREZ-TOMAS, R., AMBROSIO, S. & TESSITORE, L. 2010. Understanding autophagy in cell death control. *Curr Pharm Des*, 16, 101-13.
- PLOMP, P. J., WOLVETANG, E. J., GROEN, A. K., MEIJER, A. J., GORDON, P. B. & SEGLEN, P. O. 1987. Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 164, 197-203.
- POLSON, H. E., DE LARTIGUE, J., RIGDEN, D. J., REEDIJK, M., URBE, S., CLAGUE, M. J. & TOOZE, S. A. 2010. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, 6, 506-22.
- PONTI, A., MACHACEK, M., GUPTON, S. L., WATERMAN-STORER, C. M. & DANUSER, G. 2004. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*, 305, 1782-6.
- POPOVIC, D., AKUTSU, M., NOVAK, I., HARPER, J. W., BEHREND, C. & DIKIC, I. 2012. Rab GTPase-activating proteins in autophagy: regulation of endocytic and autophagy pathways by direct binding to human ATG8 modifiers. *Mol Cell Biol*, 32, 1733-44.
- PRATT, W. B., GEHRING, U. & TOFT, D. O. 1996. Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. *EXS*, 77, 79-95.
- PURI, C., RENNA, M., BENTO, C. F., MOREAU, K. & RUBINSZTEIN, D. C. 2013. Diverse autophagosomal membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*, 154, 1285-99.
- RAMAKERS, G. J. 2002. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci*, 25, 191-9.
- RAMDZAN, Y. M., TRUBETSKOV, M. M., ORMSBY, A. R., NEWCOMBE, E. A., SUI, X., TOBIN, M. J., BONGIOVANNI, M. N., GRAS, S. L., DEWSON, G., MILLER, J. M. L., FINKBEINER, S., MOILY, N. S., NICLIS, J., PARISH, C. L., PURCELL, A. W., BAKER, M. J., WILCE, J. A., WARIS, S., STOJANOVSKI, D., BOCKING, T., ANG, C. S., ASCHER, D. B., REID, G. E. & HATTERS, D. M. 2017. Huntingtin Inclusions Trigger Cellular Quiescence, Deactivate Apoptosis, and Lead to Delayed Necrosis. *Cell Rep*, 19, 919-927.
- RAMIREZ-PEINADO, S., LEON-ANNICCHIARICO, C. L., GALINDO-MORENO, J., IURLARO, R., CARO-MALDONADO, A., PREHN, J. H., RYAN, K. M. & MUNOZ-PINEDO, C. 2013. Glucose-starved cells do not engage in prosurvival autophagy. *J Biol Chem*, 288, 30387-98.
- RAMPELT, H., KIRSTEIN-MILES, J., NILLEGODA, N. B., CHI, K., SCHOLZ, S. R., MORIMOTO, R. I. & BUKAU, B. 2012. Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation. *EMBO J*, 31, 4221-35.
- RAPINO, F., ABHARI, B. A., JUNG, M. & FULDA, S. 2015. NIK is required for NF-kappaB-mediated induction of BAG3 upon inhibition of constitutive protein degradation pathways. *Cell Death Dis*, 6, e1692.
- RAUCH, J. N. & GESTWICKI, J. E. 2014. Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. *J Biol Chem*, 289, 1402-14.
- RAUCH, J. N., TSE, E., FREILICH, R., MOK, S. A., MAKLEY, L. N., SOUTHWORTH, D. R. & GESTWICKI, J. E. 2017. BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins. *J Mol Biol*, 429, 128-141.
- RAVIKUMAR, B., MOREAU, K., JAHREISS, L., PURI, C. & RUBINSZTEIN, D. C. 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*, 12, 747-57.
- RAVIKUMAR, B., VACHER, C., BERGER, Z., DAVIES, J. E., LUO, S., OROZ, L. G., SCARAVILLI, F., EASTON, D. F., DUDEN, R., O'KANE, C. J. & RUBINSZTEIN, D. C. 2004. Inhibition of mTOR induces

- autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 36, 585-95.
- REFFAY, M., PARRINI, M. C., COCHET-ESCARTIN, O., LADOUX, B., BUGUIN, A., COSCOY, S., AMBLARD, F., CAMONIS, J. & SILBERZAN, P. 2014. Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat Cell Biol*, 16, 217-23.
- REGGIANI, C. & BOTTINELLI, R. 2007. *Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*, Watertown, Springer.
- REGGIORI, F., TUCKER, K. A., STROMHAUG, P. E. & KLIONSKY, D. J. 2004. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell*, 6, 79-90.
- REISSMANN, S., PARNOT, C., BOOTH, C. R., CHIU, W. & FRYDMAN, J. 2007. Essential function of the built-in lid in the allosteric regulation of eukaryotic and archaeal chaperonins. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 432-40.
- REY, M., VALENZUELA-FERNANDEZ, A., URZAINQUI, A., YANEZ-MO, M., PEREZ-MARTINEZ, M., PENELA, P., MAYOR, F., JR. & SANCHEZ-MADRID, F. 2007. Myosin IIA is involved in the endocytosis of CXCR4 induced by SDF-1alpha. *J Cell Sci*, 120, 1126-33.
- RINALDI, F., TERRACCIANO, C., PISANI, V., MASSA, R., LORO, E., VERGANI, L., DI GIROLAMO, S., ANGELINI, C., GOURDON, G., NOVELLI, G. & BOTTA, A. 2012. Aberrant splicing and expression of the non muscle myosin heavy-chain gene MYH14 in DM1 muscle tissues. *Neurobiol Dis*, 45, 264-71.
- RITOSSA, F. 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*, 1, 97-8.
- ROBBERECHT, W. & PHILIPS, T. 2013. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 14, 248-64.
- ROCK, K. L., GRAMM, C., ROTHSTEIN, L., CLARK, K., STEIN, R., DICK, L., HWANG, D. & GOLDBERG, A. L. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78, 761-71.
- ROGNONI, L., STIGLER, J., PELZ, B., YLANNE, J. & RIEF, M. 2012. Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19679-84.
- ROGOV, V., DOTSCHE, V., JOHANSEN, T. & KIRKIN, V. 2014. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 53, 167-78.
- RONEN, D. & RAVID, S. 2009. Myosin II tailpiece determines its paracrystal structure, filament assembly properties, and cellular localization. *J Biol Chem*, 284, 24948-57.
- ROSATI, A., AMMIRANTE, M., GENTILELLA, A., BASILE, A., FESTA, M., PASCALE, M., MARZULLO, L., BELISARIO, M. A., TOSCO, A., FRANCESCHELLI, S., MOLTEDO, O., PAGLIUCA, G., LEROSE, R. & TURCO, M. C. 2007a. Apoptosis inhibition in cancer cells: a novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 1337-42.
- ROSATI, A., BASILE, A., D'AURIA, R., D'AVENIA, M., DE MARCO, M., FALCO, A., FESTA, M., GUERRIERO, L., IORIO, V., PARENTE, R., PASCALE, M., MARZULLO, L., FRANCO, R., ARRA, C., BARBIERI, A., REA, D., MENICHINI, G., HAHNE, M., BIJLSMA, M., BARCAROLI, D., SALA, G., DI MOLA, F. F., DI SEBASTIANO, P., TODORIC, J., ANTONUCCI, L., CORVEST, V., JAWHARI, A., FIRPO, M. A., TUVESON, D. A., CAPUNZO, M., KARIN, M., DE LAURENZI, V. & TURCO, M. C. 2015. BAG3 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma growth by activating stromal macrophages. *Nat Commun*, 6, 8695.
- ROSATI, A., GRAZIANO, V., DE LAURENZI, V., PASCALE, M. & TURCO, M. C. 2011. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death Dis*, 2, e141.
- ROSATI, A., LEONE, A., DEL VALLE, L., AMINI, S., KHALILI, K. & TURCO, M. C. 2007b. Evidence for BAG3 modulation of HIV-1 gene transcription. *J Cell Physiol*, 210, 676-83.
- ROSENBERG, M., STRAUSSMAN, R., BEN-YA'ACOV, A., RONEN, D. & RAVID, S. 2008. MHC-IIb filament assembly and cellular localization are governed by the rod net charge. *PLoS One*, 3, e1496.

- ROSENBERG, M. M., RONEN, D., LAHAV, N., NAZIROV, E., RAVID, S. & FRIEDLER, A. 2013. High resolution characterization of myosin IIC protein tailpiece and its effect on filament assembly. *J Biol Chem*, 288, 9779-89.
- ROSS, C. A. & POIRIER, M. A. 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, 10 Suppl, S10-7.
- ROUSSEAU, E., DEHAY, B., BEN-HAÏEM, L., TROTTIER, Y., MORANGE, M. & BERTOLOTTI, A. 2004. Targeting expression of expanded polyglutamine proteins to the endoplasmic reticulum or mitochondria prevents their aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9648-53.
- RUAN, L., ZHOU, C., JIN, E., KUCHARAVY, A., ZHANG, Y., WEN, Z., FLORENS, L. & LI, R. 2017. Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature*, 543, 443-446.
- RUBINSZTEIN, D. C., MARINO, G. & KROEMER, G. 2011. Autophagy and aging. *Cell*, 146, 682-95.
- RUBIO, M. D., HAROUTUNIAN, V. & MEADOR-WOODRUFF, J. H. 2012. Abnormalities of the Duo/Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1/p21-activated kinase 1 pathway drive myosin light chain phosphorylation in frontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 71, 906-14.
- RUDIGER, S., BUCHBERGER, A. & BUKAU, B. 1997. Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol*, 4, 342-9.
- RUSSELL, R. C., TIAN, Y., YUAN, H., PARK, H. W., CHANG, Y. Y., KIM, J., KIM, H., NEUFELD, T. P., DILLIN, A. & GUAN, K. L. 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 15, 741-50.
- RUSSO, I., BUBACCO, L. & GREGGIO, E. 2012. Exosomes-associated neurodegeneration and progression of Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis*, 1, 217-25.
- RYU, J., LIU, L., WONG, T. P., WU, D. C., BURETTE, A., WEINBERG, R., WANG, Y. T. & SHENG, M. 2006. A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron*, 49, 175-82.
- SAEKI, Y. & TANAKA, K. 2012. Assembly and function of the proteasome. *Methods Mol Biol*, 832, 315-37.
- SAHA, S., DEY, S. K., BISWAS, A., DAS, P., DAS, M. R. & JANA, S. S. 2013. The effect of including the C2 insert of nonmuscle myosin II-C on neuritogenesis. *J Biol Chem*, 288, 7815-28.
- SAIBIL, H. 2013. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 630-42.
- SALA, A. J., BOTT, L. C. & MORIMOTO, R. I. 2017. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *J Cell Biol*, 216, 1231-1241.
- SALHIA, B., HWANG, J. H., SMITH, C. A., NAKADA, M., RUTKA, F., SYMONS, M. & RUTKA, J. T. 2008. Role of myosin II activity and the regulation of myosin light chain phosphorylation in astrocytomas. *Cell Motil Cytoskeleton*, 65, 12-24.
- SANBORN, K. B., RAK, G. D., MARU, S. Y., DEMERS, K., DIFEO, A., MARTIGNETTI, J. A., BETTS, M. R., FAVIER, R., BANERJEE, P. P. & ORANGE, J. S. 2009. Myosin IIA associates with NK cell lytic granules to enable their interaction with F-actin and function at the immunological synapse. *J Immunol*, 182, 6969-84.
- SANDQUIST, J. C. & MEANS, A. R. 2008. The C-terminal tail region of nonmuscle myosin II directs isoform-specific distribution in migrating cells. *Mol Biol Cell*, 19, 5156-67.
- SANDQUIST, J. C., SWENSON, K. I., DEMALI, K. A., BURRIDGE, K. & MEANS, A. R. 2006. Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *J Biol Chem*, 281, 35873-83.
- SANGWAN, S., ZHAO, A., ADAMS, K. L., JAYSON, C. K., SAWAYA, M. R., GUENTHER, E. L., PAN, A. C., NGO, J., MOORE, D. M., SORIAGA, A. B., DO, T. D., GOLDSCHMIDT, L., NELSON, R., BOWERS, M. T., KOEHLER, C. M., SHAW, D. E., NOVITCH, B. G. & EISENBERG, D. S. 2017. Atomic structure of a toxic, oligomeric segment of SOD1 linked to amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 8770-8775.

- SARPARANTA, J., JONSON, P. H., GOLZIO, C., SANDELL, S., LUQUE, H., SCREEN, M., MCDONALD, K., STAJICH, J. M., MAHJNEH, I., VIHOLA, A., RAHEEM, O., PENTTILA, S., LEHTINEN, S., HUOVINEN, S., PALMIO, J., TASCA, G., RICCI, E., HACKMAN, P., HAUSER, M., KATSANIS, N. & UDD, B. 2012. Mutations affecting the cytoplasmic functions of the co-chaperone DNAJB6 cause limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*, 44, 450-5, S1-2.
- SCHIFFHAUER, E. S., LUO, T., MOHAN, K., SRIVASTAVA, V., QIAN, X., GRIFFIS, E. R., IGLESIAS, P. A. & ROBINSON, D. N. 2016. Mechanoaccumulative Elements of the Mammalian Actin Cytoskeleton. *Curr Biol*, 26, 1473-1479.
- SCHOLEY, J. M., TAYLOR, K. A. & KENDRICK-JONES, J. 1980. Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase. *Nature*, 287, 233-5.
- SCHOPF, F. H., BIEBL, M. M. & BUCHNER, J. 2017. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 345-360.
- SCHUBERT, U., ANTON, L. C., GIBBS, J., NORBURY, C. C., YEWDELL, J. W. & BENNINK, J. R. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404, 770-4.
- SCHUERMANN, J. P., JIANG, J., CUELLAR, J., LLORCA, O., WANG, L., GIMENEZ, L. E., JIN, S., TAYLOR, A. B., DEMELER, B., MORANO, K. A., HART, P. J., VALPUESTA, J. M., LAFER, E. M. & SOUSA, R. 2008. Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol Cell*, 31, 232-43.
- SCHULZ, A. M. & HAYNES, C. M. 2015. UPR(mt)-mediated cytoprotection and organismal aging. *Biochim Biophys Acta*, 1847, 1448-56.
- SEKITO, T., KAWAMATA, T., ICHIKAWA, R., SUZUKI, K. & OHSUMI, Y. 2009. Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes Cells*, 14, 525-38.
- SELGEN, D., MUNTONI, F., BURTON, B. K., PEGORARO, E., SEWRY, C., BITE, A. V. & ENGEL, A. G. 2009. Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 65, 83-9.
- SELLERS, J. R. 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, 1496, 3-22.
- SHARMA, K., VABULAS, R. M., MACEK, B., PINKERT, S., COX, J., MANN, M. & HARTL, F. U. 2012. Quantitative proteomics reveals that Hsp90 inhibition preferentially targets kinases and the DNA damage response. *Mol Cell Proteomics*, 11, M111 014654.
- SHEN, Y., MEUNIER, L. & HENDERSHOT, L. M. 2002. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem*, 277, 15947-56.
- SHERMAN, M. Y. & GABAI, V. L. 2015. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene*, 34, 4153-61.
- SHEWAN, A. M., MADDUGODA, M., KRAEMER, A., STEHBENS, S. J., VERMA, S., KOVACS, E. M. & YAP, A. S. 2005. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*, 16, 4531-42.
- SHINTANI, T., MIZUSHIMA, N., OGAWA, Y., MATSUURA, A., NODA, T. & OHSUMI, Y. 1999. Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J*, 18, 5234-41.
- SHINTO, O., YASHIRO, M., KAWAJIRI, H., SHIMIZU, K., SHIMIZU, T., MIWA, A. & HIRAKAWA, K. 2010. Inhibitory effect of a TGFbeta receptor type-I inhibitor, Ki26894, on invasiveness of scirrhous gastric cancer cells. *Br J Cancer*, 102, 844-51.
- SHIRAHAMA-NODA, K., KIRA, S., YOSHIMORI, T. & NODA, T. 2013. TRAPPIII is responsible for vesicular transport from early endosomes to Golgi, facilitating Atg9 cycling in autophagy. *J Cell Sci*, 126, 4963-73.
- SHOMURA, Y., YOSHIDA, T., IIZUKA, R., MARUYAMA, T., YOHDA, M. & MIKI, K. 2004. Crystal structures of the group II chaperonin from *Thermococcus* strain KS-1: steric hindrance by the substituted amino acid, and inter-subunit rearrangement between two crystal forms. *J Mol Biol*, 335, 1265-78.
- SHUTOVA, M., YANG, C., VASILIEV, J. M. & SVITKINA, T. 2012. Functions of nonmuscle myosin II in assembly of the cellular contractile system. *PLoS One*, 7, e40814.

- SHUTOVA, M. S., ALEXANDROVA, A. Y. & VASILIEV, J. M. 2008. Regulation of polarity in cells devoid of actin bundle system after treatment with inhibitors of myosin II activity. *Cell Motil Cytoskeleton*, 65, 734-46.
- SHUTOVA, M. S., SPESSOTT, W. A., GIRAUDO, C. G. & SVITKINA, T. 2014. Endogenous species of mammalian nonmuscle myosin IIA and IIB include activated monomers and heteropolymers. *Curr Biol*, 24, 1958-68.
- SHUTOVA, M. S. & SVITKINA, T. M. 2018. Mammalian nonmuscle myosin II comes in three flavors. *Biochem Biophys Res Commun*, 506, 394-402.
- SI, J., GE, Y., ZHUANG, S. & GONG, R. 2010. Inhibiting nonmuscle myosin II impedes inflammatory infiltration and ameliorates progressive renal disease. *Lab Invest*, 90, 448-58.
- SIES, H., BERNDT, C. & JONES, D. P. 2017. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*, 86, 715-748.
- SLOBODKIN, M. R. & ELAZAR, Z. 2013. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem*, 55, 51-64.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- SOMLYO, A. P. & SOMLYO, A. V. 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 83, 1325-58.
- SONDERMANN, H., SCHEUFLER, C., SCHNEIDER, C., HOHFELD, J., HARTL, F. U. & MOAREFI, I. 2001. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*, 291, 1553-7.
- SONG, S., KOLE, S., PRECHT, P., PAZIN, M. J. & BERNIER, M. 2010. Activation of heat shock factor 1 plays a role in pyrrolidine dithiocarbamate-mediated expression of the co-chaperone BAG3. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 1856-63.
- SONTAG, E. M., SAMANT, R. S. & FRYDMAN, J. 2017. Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control. *Annu Rev Biochem*, 86, 97-122.
- SPIRA, F., CUYLEN-HAERING, S., MEHTA, S., SAMWER, M., REVERSAT, A., VERMA, A., OLDENBOURG, R., SIXT, M. & GERLICH, D. W. 2017. Cytokinesis in vertebrate cells initiates by contraction of an equatorial actomyosin network composed of randomly oriented filaments. *Elife*, 6.
- SPUDICH, J. A. 2014. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy: four decades of basic research on muscle lead to potential therapeutic approaches to these devastating genetic diseases. *Biophys J*, 106, 1236-49.
- STANKIEWICZ, M., NIKOLAY, R., RYBIN, V. & MAYER, M. P. 2010. CHIP participates in protein triage decisions by preferentially ubiquitinating Hsp70-bound substrates. *FEBS J*, 277, 3353-67.
- STOLZ, A., ERNST, A. & DIKIC, I. 2014. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol*, 16, 495-501.
- STOW, J. L., FATH, K. R. & BURGESS, D. R. 1998. Budding roles for myosin II on the Golgi. *Trends Cell Biol*, 8, 138-41.
- STRAIGHT, A. F., CHEUNG, A., LIMOUZE, J., CHEN, I., WESTWOOD, N. J., SELLERS, J. R. & MITCHISON, T. J. 2003. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science*, 299, 1743-7.
- STRAUSSMAN, R., EVEN, L. & RAVID, S. 2001. Myosin II heavy chain isoforms are phosphorylated in an EGF-dependent manner: involvement of protein kinase C. *J Cell Sci*, 114, 3047-57.
- STRICK, D. J., FENG, W. & VOLLRATH, D. 2009. MerTK drives myosin II redistribution during retinal pigment epithelial phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 2427-35.
- STURNER, E. & BEHL, C. 2017. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Front Mol Neurosci*, 10, 177.
- SUN, L., MENG, Z., ZHU, Y., LU, J., LI, Z., ZHAO, Q., HUANG, Y., JIANG, L. & YAO, X. 2018. TM9SF4 is a novel factor promoting autophagic flux under amino acid starvation. *Cell Death Differ*, 25, 368-379.

- SURCEL, A., NG, W. P., WEST-FOYLE, H., ZHU, Q., REN, Y., AVERY, L. B., KRENC, A. K., MEYERS, D. J., ROCK, R. S., ANDERS, R. A., FREEL MEYERS, C. L. & ROBINSON, D. N. 2015. Pharmacological activation of myosin II paralogs to correct cell mechanics defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 1428-33.
- SURCEL, A., SCHIFFHAUER, E. S., THOMAS, D. G., ZHU, Q., DINAPOLI, K. T., HERBIG, M., OTTO, O., WEST-FOYLE, H., JACOBI, A., KRATER, M., PLAK, K., GUCK, J., JAFFEE, E. M., IGLESIAS, P. A., ANDERS, R. A. & ROBINSON, D. N. 2019. Targeting Mechanoresponsive Proteins in Pancreatic Cancer: 4-Hydroxyacetophenone Blocks Dissemination and Invasion by Activating MYH14. *Cancer Res*, 79, 4665-4678.
- SUZUKI, S. W., ONODERA, J. & OHSUMI, Y. 2011. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One*, 6, e17412.
- SWAILES, N. T., COLEGRAVE, M., KNIGHT, P. J. & PECKHAM, M. 2006. Non-muscle myosins 2A and 2B drive changes in cell morphology that occur as myoblasts align and fuse. *J Cell Sci*, 119, 3561-70.
- SZABO, A., KORSZUN, R., HARTL, F. U. & FLANAGAN, J. 1996. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J*, 15, 408-17.
- TAHRIR, F. G., KNEZEVIC, T., GUPTA, M. K., GORDON, J., CHEUNG, J. Y., FELDMAN, A. M. & KHALILI, K. 2017. Evidence for the Role of BAG3 in Mitochondrial Quality Control in Cardiomyocytes. *J Cell Physiol*, 232, 797-805.
- TAIPALE, M., JAROSZ, D. F. & LINDQUIST, S. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 515-28.
- TAIPALE, M., KRYKBAEVA, I., KOEVA, M., KAYATEKIN, C., WESTOVER, K. D., KARRAS, G. I. & LINDQUIST, S. 2012. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell*, 150, 987-1001.
- TAKAHASHI, M., HIRANO, T., UCHIDA, K. & YAMAGISHI, A. 1999. Developmentally regulated expression of a nonmuscle myosin heavy chain IIB inserted isoform in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 259, 29-33.
- TAKAOKA, M., SAITO, H., TAKENAKA, K., MIKI, Y. & NAKANISHI, A. 2014. BRCA2 phosphorylated by PLK1 moves to the midbody to regulate cytokinesis mediated by nonmuscle myosin IIC. *Cancer Res*, 74, 1518-28.
- TAKAYAMA, S. & REED, J. C. 2001. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol*, 3, E237-41.
- TAKAYAMA, S., SATO, T., KRAJEWSKI, S., KOCHER, K., IRIE, S., MILLAN, J. A. & 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. & REED, J. C. 1999. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem*, 274, 781-6.
- TAKEUCHI, T., SUZUKI, M., FUJIKAKE, N., POPIEL, H. A., KIKUCHI, H., FUTAKI, S., WADA, K. & NAGAI, Y. 2015. Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E2497-506.
- TAM, S., GELLER, R., SPIESS, C. & FRYDMAN, J. 2006. The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat Cell Biol*, 8, 1155-62.
- TAN, I., YONG, J., DONG, J. M., LIM, L. & LEUNG, T. 2008. A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. *Cell*, 135, 123-36.
- TANAKA, K. 2013. The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles. *Keio J Med*, 62, 1-12.
- TANAKA, K. & MATSUDA, N. 2014. Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 197-204.
- TANG, H. W., WANG, Y. B., WANG, S. L., WU, M. H., LIN, S. Y. & CHEN, G. C. 2011. Atg1-mediated myosin II activation regulates autophagosome formation during starvation-induced autophagy. *EMBO J*, 30, 636-51.

- TANG, Y. C., CHANG, H. C., HAYER-HARTL, M. & HARTL, F. U. 2007. SnapShot: molecular chaperones, Part II. *Cell*, 128, 412.
- TANG, Y. C., CHANG, H. C., ROEBEN, A., WISCHNEWSKI, D., WISCHNEWSKI, N., KERNER, M. J., HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. 2006. Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein. *Cell*, 125, 903-14.
- TANIDA, I., MIZUSHIMA, N., KIYOOKA, M., OHSUMI, M., UENO, T., OHSUMI, Y. & KOMINAMI, E. 1999. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell*, 10, 1367-79.
- TANIDA, I., TANIDA-MIYAKE, E., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2001. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem*, 276, 1701-6.
- TAYLOR, R. C., BERENDZEN, K. M. & DILLIN, A. 2014. Systemic stress signalling: understanding the cell non-autonomous control of proteostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 211-7.
- TAYLOR, R. C. & DILLIN, A. 2011. Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- TIAN, J. & GARCIA, A. E. 2011. Simulation studies of protein folding/unfolding equilibrium under polar and nonpolar confinement. *J Am Chem Soc*, 133, 15157-64.
- TIPPING, K. W., VAN OOSTEN-HAWLE, P., HEWITT, E. W. & RADFORD, S. E. 2015. Amyloid Fibres: Inert End-Stage Aggregates or Key Players in Disease? *Trends Biochem Sci*, 40, 719-727.
- TOOZE, S. A., JEFFERIES, H. B., KALIE, E., LONGATTI, A., MCALPINE, F. E., MCKNIGHT, N. C., ORSI, A., POLSON, H. E., RAZI, M., ROBINSON, D. J. & WEBBER, J. L. 2010. Trafficking and signaling in mammalian autophagy. *IUBMB Life*, 62, 503-8.
- TOOZE, S. A. & YOSHIMORI, T. 2010. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol*, 12, 831-5.
- TORNAVACA, O., CHIA, M., DUFTON, N., ALMAGRO, L. O., CONWAY, D. E., RANDI, A. M., SCHWARTZ, M. A., MATTER, K. & BALDA, M. S. 2015. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol*, 208, 821-38.
- TOTSUKAWA, G., WU, Y., SASAKI, Y., HARTSHORNE, D. J., YAMAKITA, Y., YAMASHIRO, S. & MATSUMURA, F. 2004. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol*, 164, 427-39.
- TOTSUKAWA, G., YAMAKITA, Y., YAMASHIRO, S., HARTSHORNE, D. J., SASAKI, Y. & MATSUMURA, F. 2000. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, 150, 797-806.
- TRYBUS, K. M., HUIATT, T. W. & LOWEY, S. 1982. A bent monomeric conformation of myosin from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 6151-5.
- TRYBUS, K. M. & LOWEY, S. 1984. Conformational states of smooth muscle myosin. Effects of light chain phosphorylation and ionic strength. *J Biol Chem*, 259, 8564-71.
- TSAI, J. W., BREMNER, K. H. & VALLEE, R. B. 2007. Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat Neurosci*, 10, 970-9.
- TULLIO, A. N., ACCILI, D., FERRANS, V. J., YU, Z. X., TAKEDA, K., GRINBERG, A., WESTPHAL, H., PRESTON, Y. A. & ADELSTEIN, R. S. 1997. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12407-12.
- TULLIO, A. N., BRIDGMAN, P. C., TRESSER, N. J., CHAN, C. C., CONTI, M. A., ADELSTEIN, R. S. & HARA, Y. 2001. Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J Comp Neurol*, 433, 62-74.
- TUMBARELLO, D. A., KENDRICK-JONES, J. & BUSS, F. 2013. Myosin VI and its cargo adaptors - linking endocytosis and autophagy. *J Cell Sci*, 126, 2561-70.

- TUMBARELLO, D. A., WAXSE, B. J., ARDEN, S. D., BRIGHT, N. A., KENDRICK-JONES, J. & BUSS, F. 2012. Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol*, 14, 1024-35.
- TWIG, G. & SHIRIHAI, O. S. 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal*, 14, 1939-51.
- ULBRICHT, A., EPPLER, F. J., TAPIA, V. E., VAN DER VEN, P. F., HAMPE, N., HERSCH, N., VAKEEL, P., STADEL, D., HAAS, A., SAFTIG, P., BEHREND, C., FURST, D. O., VOLKMER, R., HOFFMANN, B., KOLANUS, W. & HOHFELD, J. 2013. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr Biol*, 23, 430-5.
- ULBRICHT, A., GEHLERT, S., LECIEJEWSKI, B., SCHIFFER, T., BLOCH, W. & HOHFELD, J. 2015. Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy*, 11, 538-46.
- ULRICH, T. A., DE JUAN PARDO, E. M. & KUMAR, S. 2009. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res*, 69, 4167-74.
- UMEMOTO, S., BENGUR, A. R. & SELLERS, J. R. 1989. Effect of multiple phosphorylations of smooth muscle and cytoplasmic myosins on movement in an in vitro motility assay. *J Biol Chem*, 264, 1431-6.
- UNGELENK, S., MOAYED, F., HO, C. T., GROUSL, T., SCHARF, A., MASHAGHI, A., TANS, S., MAYER, M. P., MOGK, A. & BUKAU, B. 2016. Small heat shock proteins sequester misfolding proteins in near-native conformation for cellular protection and efficient refolding. *Nat Commun*, 7, 13673.
- UTECH, M., IVANOV, A. I., SAMARIN, S. N., BRUEWER, M., TURNER, J. R., MRSNY, R. J., PARKOS, C. A. & NUSRAT, A. 2005. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 16, 5040-52.
- VABULAS, R. M. & HARTL, F. U. 2005. Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science*, 310, 1960-3.
- VAN DER VAART, A., GRIFFITH, J. & REGGIORI, F. 2010. Exit from the Golgi is required for the expansion of the autophagosomal phagophore in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 21, 2270-84.
- VAN LEEUWEN, F. N., VAN DELFT, S., KAIN, H. E., VAN DER KAMMEN, R. A. & COLLARD, J. G. 1999. Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol*, 1, 242-8.
- VARLET, A. A., FUCHS, M., LUTHOLD, C., LAMBERT, H., LANDRY, J. & LAVOIE, J. N. 2017. Fine-tuning of actin dynamics by the HSPB8-BAG3 chaperone complex facilitates cytokinesis and contributes to its impact on cell division. *Cell Stress Chaperones*, 22, 553-567.
- VARSHAVSKY, A. 2012. The ubiquitin system, an immense realm. *Annu Rev Biochem*, 81, 167-76.
- VASILIEV, J. M., OMELCHENKO, T., GELFAND, I. M., FEDER, H. H. & BONDER, E. M. 2004. Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets: a link to the mechanism of cancer dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 12526-30.
- VASIOUKHIN, V. 2006. Lethal giant puzzle of Lgl. *Dev Neurosci*, 28, 13-24.
- VELLAI, T., TAKACS-VELLAI, K., SASS, M. & KLIONSKY, D. J. 2009. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol*, 19, 487-94.
- VENKATRAMAN, P., WETZEL, R., TANAKA, M., NUKINA, N. & GOLDBERG, A. L. 2004. Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell*, 14, 95-104.
- VERHOEF, L. G., LINDSTEN, K., MASUCCI, M. G. & DANTUMA, N. P. 2002. Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet*, 11, 2689-700.
- VERKHOVSKY, A. B., SVITKINA, T. M. & BORISY, G. G. 1999. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol*, 9, 11-20.

- VICENTE-MANZANARES, M., KOACH, M. A., WHITMORE, L., LAMERS, M. L. & HORWITZ, A. F. 2008. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *J Cell Biol*, 183, 543-54.
- VICENTE-MANZANARES, M., MA, X., ADELSTEIN, R. S. & HORWITZ, A. R. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 778-90.
- VICENTE-MANZANARES, M., ZARENO, J., WHITMORE, L., CHOI, C. K. & HORWITZ, A. F. 2007. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol*, 176, 573-80.
- VILLARD, E., PERRET, C., GARY, F., PROUST, C., DILANIAN, G., HENGSTENBERG, C., RUPPERT, V., ARBUSTINI, E., WICHTER, T., GERMAIN, M., DUBOURG, O., TAVAZZI, L., AUMONT, M. C., DEGROOTE, P., FAUCHIER, L., TROCHU, J. N., GIBELIN, P., AUPETIT, J. F., STARK, K., ERDMANN, J., HETZER, R., ROBERTS, A. M., BARTON, P. J., REGITZ-ZAGROSEK, V., CARDIOGENICS, C., ASLAM, U., DUBOSCQ-BIDOT, L., MEYBORG, M., MAISCH, B., MADEIRA, H., WALDENSTROM, A., GALVE, E., CLELAND, J. G., DORENT, R., ROIZES, G., ZELLER, T., BLANKENBERG, S., GOODALL, A. H., COOK, S., TREGOUET, D. A., TIRET, L., ISNARD, R., KOMAJDA, M., CHARRON, P. & CAMBIEN, F. 2011. A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 32, 1065-76.
- VINCENZ-DONNELLY, L., HOLTHUSEN, H., KORNER, R., HANSEN, E. C., PRESTO, J., JOHANSSON, J., SAWARKAR, R., HARTL, F. U. & HIPPEL, M. S. 2018. High capacity of the endoplasmic reticulum to prevent secretion and aggregation of amyloidogenic proteins. *EMBO J*, 37, 337-350.
- VIRADOR, V. M., DAVIDSON, B., CZECHOWICZ, J., MAI, A., KASSIS, J. & KOHN, E. C. 2009. The anti-apoptotic activity of BAG3 is restricted by caspases and the proteasome. *PLoS One*, 4, e5136.
- VOGES, D., ZWICKL, P. & BAUMEISTER, W. 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, 68, 1015-68.
- WALTER, P. & RON, D. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081-6.
- WANDINGER, S. K., RICHTER, K. & BUCHNER, J. 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 283, 18473-7.
- WANG, A., MA, X., CONTI, M. A. & ADELSTEIN, R. S. 2011. Distinct and redundant roles of the non-muscle myosin II isoforms and functional domains. *Biochem Soc Trans*, 39, 1131-5.
- WANG, F., HARVEY, E. V., CONTI, M. A., WEI, D. & SELLERS, J. R. 2000. A conserved negatively charged amino acid modulates function in human nonmuscle myosin IIA. *Biochemistry*, 39, 5555-60.
- WANG, F., KOVACS, M., HU, A., LIMOUZE, J., HARVEY, E. V. & SELLERS, J. R. 2003. Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem*, 278, 27439-48.
- WANG, H. Q., LIU, B. Q., GAO, Y. Y., MENG, X., GUAN, Y., ZHANG, H. Y. & DU, Z. X. 2009. Inhibition of the JNK signalling pathway enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of kidney cancer cells by suppression of BAG3 expression. *Br J Pharmacol*, 158, 1405-12.
- WANG, H. Q., LIU, H. M., ZHANG, H. Y., GUAN, Y. & DU, Z. X. 2008. Transcriptional upregulation of BAG3 upon proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 365, 381-5.
- WANG, X. & GERDES, H. H. 2015. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ*, 22, 1181-91.
- WEBBER, J. L. & TOOZE, S. A. 2010. New insights into the function of Atg9. *FEBS Lett*, 584, 1319-26.
- WEIDERT, E., POHLER, S. E., GOMEZ, E. W. & DONG, C. 2014. Actinomyosin contraction, phosphorylation of VE-cadherin, and actin remodeling enable melanoma-induced endothelial cell-cell junction disassembly. *PLoS One*, 9, e108092.
- WEILL, U., KRIEGER, G., AVIHOUE, Z., MILO, R., SCHULDINER, M. & DAVIDI, D. 2019. Assessment of GFP Tag Position on Protein Localization and Growth Fitness in Yeast. *J Mol Biol*, 431, 636-641.
- WENDT, T., TAYLOR, D., TRYBUS, K. M. & TAYLOR, K. 2001. Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the

- interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4361-6.
- WESSELBORG, S. & STORK, B. 2015. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci*, 72, 4721-57.
- WEST-FOYLE, H., KOTHARI, P., OSBORNE, J. & ROBINSON, D. N. 2018. 14-3-3 proteins tune non-muscle myosin II assembly. *J Biol Chem*, 293, 6751-6761.
- WHITTAKER, V. P., MICHAELSON, I. A. & KIRKLAND, R. J. 1964. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem J*, 90, 293-303.
- WHITTAKER, V. P. & SHERIDAN, M. N. 1965. The Morphology and Acetylcholine Content of Isolated Cerebral Cortical Synaptic Vesicles. *J Neurochem*, 12, 363-72.
- WICKNER, S., HOSKINS, J. & MCKENNEY, K. 1991. Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. *Nature*, 350, 165-7.
- WILSON, J. R., LUDOWYKE, R. I. & BIDEN, T. J. 2001. A redistribution of actin and myosin IIA accompanies Ca(2+)-dependent insulin secretion. *FEBS Lett*, 492, 101-6.
- WOERNER, A. C., FROTTIN, F., HORNBURG, D., FENG, L. R., MEISSNER, F., PATRA, M., TATZELT, J., MANN, M., WINKLHOFER, K. F., HARTL, F. U. & HIPPEL, M. S. 2016. Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. *Science*, 351, 173-6.
- WROBEL, L., TOPF, U., BRAGOSZEWSKI, P., WIESE, S., SZTOLSZTENER, M. E., OELJEKLAUS, S., VARABYOVA, A., LIRSKI, M., CHROSCICKI, P., MROCZEK, S., JANUSZEWICZ, E., DZIEMBOWSKI, A., KOBLOWSKA, M., WARSCHIED, B. & CHACINSKA, A. 2015. Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature*, 524, 485-8.
- WU, D. J., XU, J. Z., WU, Y. J., JEAN-CHARLES, L., XIAO, B., GAO, P. J. & ZHU, D. L. 2009. Effects of fasudil on early atherosclerotic plaque formation and established lesion progression in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis*, 207, 68-73.
- WU, Q., SAHASRABUDHE, R. M., LUO, L. Z., LEWIS, D. W., GOLLIN, S. M. & SAUNDERS, W. S. 2010. Deficiency in myosin light-chain phosphorylation causes cytokinesis failure and multipolarity in cancer cells. *Oncogene*, 29, 4183-93.
- WYLIE, S. R. & CHANTLER, P. D. 2008. Myosin IIC: a third molecular motor driving neuronal dynamics. *Mol Biol Cell*, 19, 3956-68.
- XIAO, H., CHENG, S., TONG, R., LV, Z., DING, C., DU, C., XIE, H., ZHOU, L., WU, J. & ZHENG, S. 2014. BAG3 regulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*, 94, 252-61.
- XIE, Z. & KLIONSKY, D. J. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 9, 1102-9.
- XU, Z., GRAHAM, K., FOOTE, M., LIANG, F., RIZKALLAH, R., HURT, M., WANG, Y., WU, Y. & ZHOU, Y. 2013. 14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggresomes. *J Cell Sci*, 126, 4173-86.
- YAMADA, S. & NELSON, W. J. 2007. Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, 178, 517-27.
- YAMAGUCHI, H., YOSHIDA, N., TAKANASHI, M., ITO, Y., FUKAMI, K., YANAGIHARA, K., YASHIRO, M. & SAKAI, R. 2014. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PLoS One*, 9, e85485.
- YAMAMOTO, H., KAKUTA, S., WATANABE, T. M., KITAMURA, A., SEKITO, T., KONDO-KAKUTA, C., ICHIKAWA, R., KINJO, M. & OHSUMI, Y. 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol*, 198, 219-33.
- YANG, T., PFISTER, M., BLIN, N., ZENNER, H. P., PUSCH, C. M. & SMITH, R. J. 2005. Genetic heterogeneity of deafness phenotypes linked to DFNA4. *Am J Med Genet A*, 139, 9-12.
- YANG, Z. & KLIONSKY, D. J. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12, 814-22.

- YEN, W. L., SHINTANI, T., NAIR, U., CAO, Y., RICHARDSON, B. C., LI, Z., HUGHSON, F. M., BABA, M. & KLIONSKY, D. J. 2010. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J Cell Biol*, 188, 101-14.
- YLA-ANTTILA, P., VIHINEN, H., JOKITALO, E. & ESKELINEN, E. L. 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 5, 1180-5.
- YOUNG, A. R., CHAN, E. Y., HU, X. W., KOCHL, R., CRAWSHAW, S. G., HIGH, S., HAILEY, D. W., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & TOOZE, S. A. 2006. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci*, 119, 3888-900.
- YOUNG, A. R., NARITA, M., FERREIRA, M., KIRSCHNER, K., SADAIE, M., DAROT, J. F., TAVARE, S., ARAKAWA, S., SHIMIZU, S., WATT, F. M. & NARITA, M. 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*, 23, 798-803.
- YOUNG, J. C. 2010. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol*, 88, 291-300.
- YU, A., SHIBATA, Y., SHAH, B., CALAMINI, B., LO, D. C. & MORIMOTO, R. I. 2014. Protein aggregation can inhibit clathrin-mediated endocytosis by chaperone competition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E1481-90.
- YUEN, S. L., OGUT, O. & BROZOVICH, F. V. 2009. Nonmuscle myosin is regulated during smooth muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, H191-9.
- ZHANG, H., AMICK, J., CHAKRAVARTI, R., SANTARRIAGA, S., SCHLANGER, S., MCGLONE, C., DARE, M., NIX, J. C., SCAGLIONE, K. M., STUEHR, D. J., MISRA, S. & PAGE, R. C. 2015. A bipartite interaction between Hsp70 and CHIP regulates ubiquitination of chaperoned client proteins. *Structure*, 23, 472-482.
- ZHANG, H., WEBB, D. J., ASMUSSEN, H., NIU, S. & HORWITZ, A. F. 2005a. A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci*, 25, 3379-88.
- ZHANG, H., ZHU, S., ZHU, Y., CHEN, J., ZHANG, G. & CHANG, H. 2011a. An association study between SNAP-25 gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Eur J Paediatr Neurol*, 15, 48-52.
- ZHANG, J., MA, B., DIMAIO, F., DOUGLAS, N. R., JOACHIMIAK, L. A., BAKER, D., FRYDMAN, J., LEVITT, M. & CHIU, W. 2011b. Cryo-EM structure of a group II chaperonin in the prehydrolysis ATP-bound state leading to lid closure. *Structure*, 19, 633-9.
- ZHANG, M., WINDHEIM, M., ROE, S. M., PEGGIE, M., COHEN, P., PRODRIMOU, C. & PEARL, L. H. 2005b. Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol Cell*, 20, 525-38.
- ZHANG, X. & QIAN, S. B. 2011. Chaperone-mediated hierarchical control in targeting misfolded proteins to aggresomes. *Mol Biol Cell*, 22, 3277-88.
- ZHENG, X., KRAKOWIAK, J., PATEL, N., BEYZAVI, A., EZIKE, J., KHALIL, A. S. & PINCUS, D. 2016. Dynamic control of Hsf1 during heat shock by a chaperone switch and phosphorylation. *Elife*, 5.
- ZHONG, C., CHRZANOWSKA-WODNICKA, M., BROWN, J., SHAUB, A., BELKIN, A. M. & BURRIDGE, K. 1998. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J Cell Biol*, 141, 539-51.
- ZHOU, J., CHOW, H. M., LIU, Y., WU, D., SHI, M., LI, J., WEN, L., GAO, Y., CHEN, G., ZHUANG, K., LIN, H., ZHANG, G., XIE, W., LI, H., LENG, L., WANG, M., ZHENG, N., SUN, H., ZHAO, Y., ZHANG, Y., XUE, M., HUANG, T. Y., BU, G., XU, H., YUAN, Z., HERRUP, K. & ZHANG, J. 2020. Cyclin-Dependent Kinase 5-Dependent BAG3 Degradation Modulates Synaptic Protein Turnover. *Biol Psychiatry*, 87, 756-769.
- ZHOU, Q., KEE, Y. S., POIRIER, C. C., JELINEK, C., OSBORNE, J., DIVI, S., SURCEL, A., WILL, M. E., EGGERT, U. S., MULLER-TAUBENBERGER, A., IGLESIAS, P. A., COTTER, R. J. & ROBINSON, D. N. 2010. 14-3-3 coordinates microtubules, Rac, and myosin II to control cell mechanics and cytokinesis. *Curr Biol*, 20, 1881-9.

- ZHU, H., WU, W., FU, Y., SHEN, W., MIAO, K., HONG, M., XU, W., YOUNG, K. H., LIU, P. & LI, J. 2014. Overexpressed BAG3 is a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*, 93, 425-35.
- ZIMMAN, A., CHEN, S. S., KOMISOPOULOU, E., TITZ, B., MARTINEZ-PINNA, R., KAFI, A., BERLINER, J. A. & GRAEBER, T. G. 2010. Activation of aortic endothelial cells by oxidized phospholipids: a phosphoproteomic analysis. *J Proteome Res*, 9, 2812-24.
- ZOU, J., GUO, Y., GUETTOUCHE, T., SMITH, D. F. & VOELLMY, R. 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 94, 471-80.
- ZWIROWSKI, S., KLOSOWSKA, A., OBUCHOWSKI, I., NILLEGODA, N. B., PIROG, A., ZIETKIEWICZ, S., BUKAU, B., MOGK, A. & LIBEREK, K. 2017. Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *EMBO J*, 36, 783-796.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Proteostasenetzwerk verhindert die Formation toxischer Aggregate.....	3
Abbildung 2: Proteinfaltung und -aggregation.....	5
Abbildung 3: Mechanismen der Aggregattoxizität..	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Austausches von PN Komponenten und Aggregaten zwischen Zellen.....	8
Abbildung 5: Mechanismen, um der Aggregattoxizität entgegenzuwirken.....	10
Abbildung 6: Die drei Formen der Autophagie.....	15
Abbildung 7: Entstehung eines Autophagosoms.....	17
Abbildung 8: Der Prozess der Makroautophagie.....	19
Abbildung 9: Nicht selektive und selektive Makroautophagie.....	22
Abbildung 10: Das Multidomänenprotein BAG3.....	24
Abbildung 11: BAG3 vermittelte selektive Makroautophagie.....	28
Abbildung 12: CASA-vermittelte Qualitätskontrolle von Filamin.....	31
Abbildung 13: Aufbau und Struktur der NMII.....	35
Abbildung 14: Insertionen zweier verschiedener Exons führen zu Entstehung neuer NMII-B und NMII-C Spleißvarianten.....	37
Abbildung 15: Regulation der NMII-Aktivierung und -Filamentformation.....	39
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Isolation von Synaptosomen aus dem Gehirn adulter Ratten.....	82
Abbildung 17: Schematische Darstellung der abgenommenen Fraktionen nach erfolgter Ultrazentrifugation.....	83
Abbildung 18: Darstellung einer Westernblottkammer mit eingespannter Haltevorrichtung und Schwamm, Blottpapier, Gel und Nitrocellulose Blotmembran „Sandwich“.....	87
Abbildung 19: Der Entzug von Aminosäuren erhöht den autophagischen Flux in HeLa-Zellen.....	99
Abbildung 20: Aminosäure- und Glukoseentzug zeigen keinen Einfluss auf den autophagischen Flux in SH-SY5Y-Zellen.....	101
Abbildung 21: Proteingehaltsanalyse der abgenommenen Fraktionen der Saccharosegradienten-Ultrazentrifugation aus S1 und P2 einer Rattengirnhomogenatsaufreinigung zur Isolation von Synaptosomen.....	104

Abbildung 22: Proteingehaltsanalyse der abgenommenen Fraktionen der Saccharosegradienten-ultrazentrifugation aus der S1-Fraktion einer Rattengehirnhomogenatsaufreinigung zur Isolation von Synaptosomen.....	106
Abbildung 23: BAG3 interagiert mit Syntaxin-1 in Synaptosomen.....	107
Abbildung 24: Ein N-terminaler BAG3-Antikörper detektiert eine mögliche kleinere Isoform von BAG3.....	109
Abbildung 25: Vereinfachte Übersicht der BAG3-Genstruktur. Darstellung der Lage der PCR-Primer im BAG3-Gen und mRNA.....	111
Abbildung 26: Keine kleinere BAG3 Isoform über die Herstellung von cDNA in verschiedenen Rattenhirnregionen nachweisbar.....	112
Abbildung 27: Sequenzanalysen erzeugter BAG3 cDNA zeigen keinen Hinweis auf eine mögliche kleinere BAG3-Isoform.	114
Abbildung 28: Exzision der vermeintlichen BAG3-Banden aus einem mit Comassie gefärbten Laemmli-Gel.	115
Abbildung 29: BAG3 interagiert mit MYH14 in endogenen Immunopräzipitationen aus Hep-G2-Lysaten.....	117
Abbildung 30: Endogene, immunocytochemische Fluoreszenzfärbungen von BAG3 und MYH14 in verschiedenen Zelllinien.....	118
Abbildung 31: Überexpression von FLAG-BAG3 in verschiedenen Zelltypen und anschließender Färbung mit Anti-FLAG-Antikörper..	121
Abbildung 32: Überexprimiertes FLAG-BAG3 und endogen gefärbtes MYH14 zeigen keine Co-Lokalisation in verschiedenen Zelllinien.	122
Abbildung 33: Biochemische Analysen zeigen eine cytosolische Lokalisation von MYH14.	123
Abbildung 34: MYH14 ist hauptsächlich im Cytosol untransfizierter Zellen zu finden, wobei sich ein geringer Anteil im Nukleus zu befinden scheint.	126
Abbildung 35: Immunocytochemische Färbungen zeigen eine cytosolische Lokalisation von MYH14..	128
Abbildung 36: MYH14 und BAG3 co-lokalisieren in MYH14-Aggregaten..	130
Abbildung 37: BAG3 und MYH14 co-lokalisieren außerhalb der MYH14-Aggregate.....	131
Abbildung 38: Der Knockdown von MYH14 in mit SOD1-G85R-GFP transfizierten HEK293-T-Zellen erhöht die GFP- und BAG3-Spiegel.....	134
Abbildung 39: Die aggregativen Eigenschaften von SOD1-G85R-GFP ändern sich unter MYH14 Knockdown nicht.	135
Abbildung 40: Die Behandlung von HEK293-T-Zellen mit MG132 zeigt eine signifikante Erhöhung der BAG3-, aber nicht der MYH14-Spiegel.....	138
Abbildung 41: Der Knockdown von MYH14 beeinflusst im Gegensatz zum BAG3-Knockdown nicht die Anzahl Aggregat positiver Zellen.....	140
Abbildung 42: Teil 1 der Untersuchung eines MYH14-Kockdowns auf die MG132 induzierte Aggresombildung in HEK293-A-Zellen	141
Abbildung 43: Teil 2 der Untersuchung eines MYH14-Kockdowns auf die MG132 induzierte Aggresombildung in HEK293-A-Zellen.	142
Abbildung 44: Der Knockdown von MYH14 erhöht den autophagischen Flux.....	145
Abbildung 45: Die Überexpression muriner, GFP-markierter, Spleißvarianten von MYH14 verringern den autophagischen Flux.....	147
Abbildung 46: Schematische Darstellung der relativen MYH14-Expressionsspiegel in verschiedenen Zelllinien.	158

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterien.....	53
Tabelle 2: Zelllinien.....	53
Tabelle 3: Primärantikörper.....	54
Tabelle 4: Sekundärantikörper.....	55
Tabelle 5: Plasmide.....	56
Tabelle 6: Primer.....	57
Tabelle 7: siRNA.....	57
Tabelle 8: Marker.....	57
Tabelle 9: Chemikalien.....	58
Tabelle 10: Lösungen und Puffer.....	68
Tabelle 11: Laborkits.....	69
Tabelle 12: Geräte und Verbrauchsmaterial.....	69
Tabelle 13: Kulturmedien der Zelllinien.....	73
Tabelle 14: Entzugsmedien.....	76
Tabelle 15: Laemmli-Gele.....	85
Tabelle 16: BAG3 kann nur bei 74 kDa detektiert werden.....	115

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

[Redacted personal data]

Akademische Ausbildung

[Redacted academic education]

[Redacted academic education]

[Redacted academic education]

[Redacted academic education]

[Redacted academic education]