Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Funktion des BAG1-Proteins ist abhängig von seiner subzellulären Verteilung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Lena Faida
aus
Hannover

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatter: Prof. Dr.med. P. Kermer
- II. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. R. Kehlenbach
- III. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Reichardt
- IV. Berichterstatter: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. T. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2011

Abkürzungen und Anglizismen

α -Helix	Die α -Helix ist ein häufig auftretendes Motiv der Sekundärstruktur eines Proteins
Apoptose	genetisch geregelter, programmierter Zelluntergang
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Axon	Nervenzellfortsatz
BAG-Domäne	C-terminale Region der BAG-Proteine
BAG-NUC	BAG1-Mutante, die den Zellkern nicht mehr verlassen kann
BAG1-Protein	<i>Bcl-2-assoziierte athanogene</i> : Proteingruppe
BCA	Bicinchonin-Säure
<i>blunt ends</i>	am Ende der Schnittstellen der DNA stehen gepaarte Basen, doppelsträngige DNA
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
Ca^{2+}	Kalzium
CaCl_2	Calciumchlorid
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , durch reverse Transkription von mRNA
<i>Chaperone</i>	<i>engl. Anstandsdame</i> , wichtige Katalysatoren der Proteinfaltung in einer Zelle
CMV	Zytomegalievirus
Colonkarzinom	Darmkrebs
CSM14.1-Zellen	nigro-striatale Rattenzellen
Cytochrom c	kleines Protein mit etwa 100 Aminosäuren aus der Familie der Cytochrome, das in den Mitochondrien zur Energiegewinnung eine entscheidende Rolle als <i>Elektronencarrier</i> (Elektronentransporter) spielt.
CY3	<i>Cyanine 3</i>
DAPI	<i>4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
dATP/ddATP	Desoxy-Adenosintriphosphat/didesoxy-Adenosintriphosphat
dCTP/ddCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat/didesoxy-Cytidintriphosphat

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's <i>modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Ligasen	Enzyme zur Reparatur und Replikation von DNA
DTT	<u>Dithiothreitol</u>
dTTP/ddTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat/didesoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
<i>EcoRI</i>	Restriktionsstelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	<i>ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'tetraacetic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk1/2	Protein
FBS gold	fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
293-HEK-Zellen	<i>293-human embryonic kidney</i> -Zellen
h	Stunde (<i>hour</i>)
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp70	Hitzeschockprotein
ICC	Immunzytochemie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Leukämie	Blutkrebs
μl	Mikroliter

Malignität	Bösartigkeit
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Metamorphose	Durchlaufen verschiedener Entwicklungsstadien
MG132	<i>N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-leucinal</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Mitose	Zellkernteilung bei Zellen eines eukaryotischen Lebewesens
ml	Milli-Liter
mM	Milli-Mol
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Morphogenese	Entwicklung von Organismen, Organen und Organellen
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NeuN	<i>neuronal nuclei</i>
Ng	Nanogramm
NGS	Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
NLS	<i>nuklear localization signal</i>
NSE	Neuronen-spezifischer Promotor
Nukleotid	Molekül, das als Grundbaustein von Nukleinsäuren (DNA und RNA) fungiert
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>pellets</i>	Zellüberstände
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	<i>Piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)</i>

pmol	Picomol
pluripotente Zellen	Stammzellen
Prostata	Vorsteherdrüse
Proteasom	Proteinkomplex von 1.700 kDa, der im Zytoplasma und im Zellkern (bei Eukaryoten) Proteine zu Fragmenten abbaut und daher zu den Peptidasen zählt.
Raf-1-Kinase	<i>serine-threonine-specific protein kinase Raf-1</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Siah	<i>Drosophila seven in absentia gen</i>
STS	Staurosporin
<i>sticky ends</i>	am Ende der Schnittstellen der DNA stehen ungepaarte Basen, einsträngige DNA
SV40	<i>Simian vacuolating virus 40</i>
<i>tag</i>	Kurze, einem Protein angefügte Aminosäuresequenz
Taq	thermostabiles Bakterium "Thermus aquaticus"
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>Templates</i>	Engl., Vorlagen
TH	Thapsigargin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trizma®Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
UBL	<i>Ubiquitin-like-Domäne</i>
u.s.w.	Und so weiter
UV	Ultraviolett
vitro	<u>lateinisch</u> : „im Glas“, Versuche im Reagenzglas
vivo	Versuche am lebenden Wesen
<i>well</i>	Kammer, Vertiefung

WT	Wildtyp
<i>XhoI</i>	Restriktionsstelle
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zytosol	flüssige Bestandteile des Zytoplasmas einer eukaryotischen Zelle

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die BAG-Proteinfamilie	1
1.1.1. Grundlagen	1
1.1.2. BAG1	2
1.1.3. Lokalisation von BAG1 in der Zelle	3
1.2. Bindungspartner des BAG1	4
1.2.1. Hitzeschockproteine (Hsp70/Hsc70)	4
1.2.2. Raf-Kinase	5
1.3. Aufgaben und Erkrankungen	6
1.3.1. Die Apoptose	6
1.3.2. Zelldifferenzierung	9
1.4. Ziel der Arbeit	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Zellen und Zellkultur	11
2.1.1. Zellen	11
2.1.2. Zellkultur	12
2.2. Plasmide/Zellklonierung	14
2.2.1. Plasmide	14
2.2.2. DNA-Amplifikation	15
2.2.3. Restriktionsenzymverdau	16
2.2.4. Agarosegelelektrophorese	16
2.2.5. Sequenzierung der BAG-NUC-DNA	17
2.2.6. Mini-Präparation und Maxi-Präparation	20
2.3. Transfektion	21
2.3.1. Transiente Transfektion	21
2.3.2. Stabile Transfektion	22
2.4. Zelllyse	22

2.5. BCA-Assay: Proteinkonzentrationsbestimmung.....	23
2.6. Western Blot.....	24
2.7. Kompartiment-spezifische Fluoreszenz- und Immunfärbungen.....	27
2.8. Generationszeit der Zellen	28
2.9. Zelltodassays	28
2.9.1. Staurosporinassay.....	29
2.9.2. Thapsigarginassay	29
2.9.3. Auswertung der Zelltodassays	29
2.10. Neuritenwachstum.....	30
2.11. NeuN	31
2.12. ERK.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Klonierung von BAG1-NUC	33
3.2. Expression von BAG1-NUC.....	34
3.3. Nukleäre BAG1-Expression vermindert Neuroprotektion.....	36
3.4. Nukleäre BAG1-Expression vermindert die neuronale Differenzierung.....	37
4. Diskussion	42
5. Zusammenfassung und Ausblick	46
5.1. Deutsch.....	46
5.2. Englisch.....	47
6. Literaturverzeichnis.....	48

1. Einleitung

1.1. Die BAG-Proteinfamilie

1.1.1. Grundlagen

Das erste *Bcl-2-assoziierte athanogene* (= BAG1-Protein) wurde 1995 entdeckt (Takayama et al. 1995). Bis heute zählt diese Proteinfamilie im Säugetierorganismus mindestens sechs Mitglieder (Doong et al. 2002). Allerdings kommen BAG-Proteine auch in Hefen, Invertebraten, Amphibien, Säugetieren und Pflanzen vor (Takayama und Reed 2001), was nahe legt, dass sie, als in der Natur weitverbreitete Eiweißmoleküle, essenzielle zelluläre Funktionen ausführen.

Man weiß, dass die Proteine der BAG-Familie an vielen verschiedenen zellulären Prozessen, wie z. B. dem Zellüberleben, der Stressantwort, der Proliferation, Migration und Apoptose beteiligt sind und dies über die Interaktion mit anderen Proteinen erreichen (Doong et al. 2002). BAG-Proteine scheinen zudem, in Abhängigkeit von ihrer subzellulären Lokalisation, eine unterschiedliche Rolle zu spielen. Es wird angenommen, dass dies nicht zuletzt auch vom Entwicklungsstadium der Zelle abhängig ist (Kermer et al. 2002).

Die BAG-Proteine enthalten mit Ausnahme von BAG5, alle eine einzelne *BAG-Domäne* (Doong et al. 2002), die der Proteinfamilie ihren Namen gab. Als *BAG-Domäne* wird eine C-terminale Region bezeichnet (Takayama et al. 1997), die aus 110-124 Aminosäuren besteht und in drei anti-parallelen α -*Helices* angeordnet ist. Die erste und zweite α -*Helix* ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) vermittelt dabei die Interaktion mit der Raf-1-Kinase (siehe auch unter 1.2.2.), die zweite und dritte α -*Helix* ($\alpha 2$ und $\alpha 3$) dagegen die mit der ATPase-Domäne von Hsc70/Hsp70 (siehe auch unter 1.2.1.) (Sondermann et al. 2001; Takayama und Reed 2001) und dem TNF-Rezeptor-1 (Antoku et al. 2001).

Die Bindung zwischen BAG1 und Hsc70/Hsp70 basiert auf energieabhängigen elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen (Doong et al. 2002). Diese werden über vier Aminosäuren erreicht, die sich in allen bekannten BAG-Proteinen konserviert finden. Mutationen in diesem Bereich gehen mit einer signifikanten Verschlechterung der Bindung einher (Sondermann et al. 2001). Die Proteine der BAG-Familie unterscheiden sich hingegen maßgeblich untereinander in ihren N-terminalen Domänen, über die die Diversität der Interaktionspartner vermittelt wird. Zum Beispiel besitzen BAG1 und BAG6 eine

Ubiquitin-like-Domäne (UBL) (Doong et al. 2002), über die eine Bindung an das Proteasom ermöglicht wird. Somit ist eine regulierende Funktion dieser Proteine bei der Proteinfaltung (Chaperone, Hsp70) und der Proteindegradation (Proteasom) wahrscheinlich (Luders et al. 2000).

1.1.2. BAG1

BAG1 wurde als erstes Mitglied der BAG-Proteinfamilie in einer Screening-Untersuchung auf Bcl-2-Interaktionsproteine gefunden (Doong et al. 2002; Takayama et al. 1995).

Das BAG1-Gen codiert über verschiedene Startpunkte auf der DNA für vier Protein-Isoformen (vgl. Tab. 1): BAG1L (52 kDa), BAG1M (46 kDa), BAG1S (29 kDa) und BAG1 (34 kDa) (Doong et al. 2002).

	Hauptsächliche Lokalisation	Domänen	Bindungspartner	Größe in kDa	NLS
BAG1	Zytoplasmatisch/ gelegentlich auch nukleär	BAG- Domänen, UBL- Domänen	Androgenrezeptor, Hsp70, CHIP, Raf-1- Kinase, PDGF, HGF, Vit.-D-Rezeptor	34	Zweiteilige NLS an der C- terminalen BAG- Domäne
BAG1S	zytoplasmatisch	BAG- Domänen, UBL- Domänen		29	
BAG1M (RAP46/HAP46)	Zytoplasmatisch/ gelegentlich auch nukleär	BAG- Domänen, UBL- Domänen	Androgenrezeptor, Glukokortikoidrezeptor, GFP	46	
BAG1L	nukleär	BAG- Domänen, UBL- Domänen, NLS	Androgenrezeptor und Erhöhung der Transkription des Androgenrezeptors	52	Zusätzlich zur zweiteiligen NLS C- terminal noch eine einteilige NLS am N- Terminus

Tab. 1: Zusammengestellt aus: Knee et al. (2001)

Der entscheidende Unterschied zwischen den BAG1-Isoformen besteht in ihrer N-terminalen Länge, welche die Interaktion mit verschiedenen zellulären Bindungspartnern erlaubt (Takayama und Reed 2001). Auch unterscheiden sich die BAG1-Isoformen hinsichtlich ihrer bevorzugten subzellulären Verteilung. BAG1L kommt primär im Zellkern vor, BAG1M, BAG1S und BAG1 dagegen werden hauptsächlich im Zytoplasma exprimiert (Doong et al. 2002). Allerdings kann man BAG1 und BAG1M in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp, der Stressbelastung und dem Entwicklungsstadium der Zelle, gelegentlich auch im Zellkern finden, (Kermer et al. 2002; Liu et al. 1998; Takayama et al. 1998).

BAG1 scheint dabei essenziell für die neuronale Entwicklung zu sein, da beobachtet wurde, dass Mäuse, denen das BAG1-Gen fehlt (BAG 1 $-/-$), schon als Embryonen versterben und deutliche Störungen in der neuronalen Schichtung im Gehirn zeigen (Götz et al. 2005). Bei einer Überexpression *in vitro* und *in vivo* fördert BAG1 hingegen die neuronale Differenzierung und erhöht die Resistenz der Zellen gegenüber verschiedenen Todesstimuli (Kermer et al. 2002).

1.1.3. Lokalisation von BAG1 in der Zelle

Die verschiedenen BAG1 Unterformen haben eine bevorzugte subzelluläre Lokalisation. Es ist bekannt, dass BAG1 ein NLS (*nuklear localization signal*) besitzt (Doong et al. 2002) und sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch gefunden werden kann. Ein NLS führt normalerweise dazu, dass ein Protein in den Zellkern gelangt und dort verbleibt. BAG1 besitzt eine zweiteilige NLS die sich am C-terminalen Ende, der BAG-Domäne vorgelagert, befindet. Zusätzlich besitzt BAG1L eine einteilige NLS am N-Terminus (Packham et al. 1997; Zeiner und Gehring 1995).

Die Lokalisation der BAG1 Isoformen in einer Zelle wird durch verschiedene Umstände beeinflusst und reguliert, und scheint so ein weiterer wichtiger Mechanismus zu sein, die Aktivität und Eigenschaften von BAG1 zu steuern (Townsend et al. 2003). Gelangt BAG1 beispielsweise in den Zellkern, kann es die Glukokortikoidrezeptorkonzentration oder auch die Transkription von Genen beeinflussen (Zeiner et al. 1999).

BAG1 findet sich sowohl im sich entwickelnden als auch im reifen Nervensystem von Säugetieren (Crocoll et al. 2000; Takayama et al. 1997), wobei es während der neuronalen Entwicklung/Differenzierung seine Lokalisation in der Zelle ändert. *In vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass BAG1 während der Proliferation bzw. zu Anfang der Differenzierung hauptsächlich im Zellkern vorkommt und nach Abschluss der Migration und der Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen ausschließlich im Zytoplasma gefunden wird (Kermer et al. 2002). Die Lokalisation von BAG1 in einer Zelle scheint also erheblichen

Einfluss auf dessen Funktionen und Eigenschaften zu nehmen. Eine genauere Untersuchung einer BAG1-Mutante, die den Zellkern nicht mehr verlassen kann (BAG-NUC, eine BAG1-Mutante kloniert von P. Kermer), erscheint deshalb sinnvoll und kann weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung der Lokalisation des BAG1 in einer Zelle ermöglichen.

1.2. Bindungspartner des BAG1

Nicht nur die Lokalisation von BAG1 in einer Zelle scheint Einfluss auf seine Funktionen zu nehmen, sondern auch die verschiedenen Bindungspartner sind wichtige Regulatoren der Proteineigenschaften (Townsend et al. 2003).

Die Bindungspartner, deren Interaktion mit BAG1 in dieser Arbeit behandelt wird, sollen im Folgenden eingehender beschrieben werden.

1.2.1. Hitzeschockproteine (Hsp70/Hsc70)

Allgemeines:

Hitzeschockproteine gehören zur Familie der *molekularen Chaperone* (engl. Anstandsdame), die die wichtigsten Katalysatoren der Proteinfaltung in einer Zelle sind (Löffler 1998).

Zu ihrem Namen sind die Hitzeschockproteine gekommen, da man sie erstmals in Zellen der Fruchtfliege *Drosophila* fand, nachdem sie besonders hohen Temperaturen ausgesetzt waren (Tissieres et al. 1974). Später zeigte sich, dass die Hitzeschockproteine nicht nur bei Hitze, sondern auch bei anderen Formen des Zellstress exprimiert werden. Allerdings gehören einige Hitzeschockproteine zu Proteingruppen, die physiologisch in einer Zelle vorhanden und für deren Funktion unerlässlich sind (Schlesinger 1990). Wichtig sind sie zum Beispiel, um Steroidhormonrezeptoren in einem inaktiven Zustand zu halten, solange diese nicht benötigt werden (Knee et al. 2001).

Man kann mehrere verschiedene Hitzeschockprotein-Gruppen nach ihrem jeweiligen molekularen Gewicht unterscheiden, zum Beispiel Hsp70, Hsp60 und Hsp90 (Schlesinger 1990). BAG1 interagiert mit Hsp70. Hitzeschockproteine kommen bei Pflanzen, Tieren und in Mikroorganismen vor (Campbell 1997). Sie sind nicht nur sehr weit in der Natur verbreitet, sondern auch in ihrem Aufbau sehr ähnlich. Als Beispiel sei hier Hsp70 angeführt, dessen Gensequenz bei *E.coli* und dem Menschen zu ca. 50% übereinstimmt (Schlesinger 1990).

Hsp70/Hsc70:

Hsp70 und Hsc70 gehören zur Gruppe der Hitzeschockproteine mit einem Molekulargewicht von 70-kDa (Townsend et al. 2003), die eine der am besten charakterisierten *Chaperonegruppen* repräsentiert (Lindquist und Craig 1988).

Das Hsp70-Gen wird in einem bestimmten Stadium der Zellteilung (der frühen S-Phase) und bei diversen Arten von Zellstress aktiviert (Schlesinger 1990). Außerdem zeigte sich, dass Hsp70 am Transport von Proteinen zwischen Zellorganellen, wie z. B. Mitochondrien, Lysosomen und dem Chloroplast beteiligt ist (Cheng et al. 1989; Chiang et al. 1989; Deshaies et al. 1988). Hierfür entfaltet Hsp70 die Proteine, so dass diese durch Membranporen passen, die sie in gefaltetem Zustand nicht passieren können (Schlesinger 1990). Nach der Membranpassage wird das Protein dann wieder in seine Tertiärstruktur zurückgeführt.

Bis jetzt sind vier verschiedene Hauptproteine der 70-kDa Hitzeschockproteinfamilie bei Säugetieren bekannt, die in verschiedenen Zellorganellen vorkommen (Townsend et al. 2003). Eine Übersicht hierzu bietet Tabelle 2:

Protein:	Lokalisation:	Expressionsmuster:	Aufgaben:
Hsc70	Zytoplasma/Zellkern	Konstitutiv	-verhindern die Proteinaggregation
Hsp70	Zytoplasma/Zellkern	Bei Zellstress	-Konformationshilfe -Entfalten und Abbau
mHsp70	Mitochondrien	Konstitutiv	„falscher“ Proteine -Funktionskontrolle
BiP/GRP78	Endoplasmatisches Retikulum (ER)	Konstitutiv	von z. B. Transkriptionsfaktoren

Tab. 2: Die wichtigsten Vertreter der 70-kDa Hitzeschockproteine

Zusammengestellt aus: Townsend et al. (2003)

1.2.2. Raf-Kinase

Die Raf-Kinase gehört zu Proteinen, die den Zellzyklus regulierende Signale von extrazellulär an die Zelle weiterleiten. Sie spielt eine wichtige Rolle im Signaltransduktionsweg der mitogenen Wachstumsfaktoren (Löffler 1998). Für die Induktion spezifischer Gene über die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren ist die „Mitogen-aktivierte-Proteinkinase“ (MAPK) besonders wichtig, die durch Raf-Kinase aktiviert wird. Zu Beginn dieser Proteinkinase-Kaskade steht die Bindung eines Liganden an einen Tyrosinkinaserzeptor, was zum Andocken von Adapterproteinen führt, die wiederum dann ein als Ras bezeichnetes G-Protein aktivieren. Ras aktiviert dann die Raf-Kinase und diese dann die MAPK (Löffler 1998).

Zur Übersicht die „*Ras-Raf-mitogen-activated protein kinases (MAPK) cascade*“:

Tyrosinrezeptor mit Ligand → Adapterproteine → Ras → Raf-Kinase → MAPK → Transkriptionsfaktoren → Steigerung der Transkription verschiedener Gene.

Verstärkt werden z. B. Gene abgelesen, die für einen gesteigerten Stoffwechsel, die Biosynthese extrazellulärer Matrix, die Nukleotid- und DNA-Biosynthese, für Transkriptionsfaktoren und für die Signaltransduktion verantwortlich sind (Löffler 1998).

BAG1 ist eines der Proteine, das an die *serine-threonine-specific protein kinase Raf-1* (Raf-1-Kinase) bindet und diese beeinflussen kann, indem es die Aktivität der Raf-1 steigert (Wang et al. 1996). Die Raf-1-Kinase aktiviert das Protein Erk, welches dann in der phosphorylierten Form vorliegt und die Zelldifferenzierung stimuliert (Doong et al. 2002). BAG1 interagiert mit Raf-1 über seine BAG-Domäne und hier über die anti-parallelen α -Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ (Doong et al. 2002). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass diese Interaktion über die N-terminalen Domänen vermittelt wird (Sondermann et al. 2001; Townsend et al. 2003). Dabei ist überraschend, dass BAG1 mit anderen Proteinen (z. B. Ras und die 14-3-3 Proteine), welche Raf-1 aktivieren können, keine größeren Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz aufweist (Wang et al. 1996; Xiao et al. 1995).

Es wird angenommen, dass in der Zelle unter normalen Umständen ein Gleichgewicht der Bindung zwischen BAG1 und Hsp70 einerseits und zwischen BAG1 und Raf-1 andererseits besteht. Bei vermehrtem Zellstress erhöht sich die Hsp70-Konzentration in der Zelle. Diese Konzentrationserhöhung konkurriert mit der Raf-1-Kinase und verringert deren Bindung an BAG1, wodurch die Differenzierungsfähigkeit der Zellen zu Gunsten der Resistenz gegenüber Zellstress vermindert wird (Doong et al. 2002). BAG1 scheint also als molekularer Schalter zu dienen, der unter normalen Umständen die Zelldifferenzierung fördert, aber unter Stressbedingungen eine schützende Funktion wahrnimmt (Song et al. 2001).

1.3. Aufgaben und Erkrankungen

Die durch BAG1 regulierten Zellfunktionen sind im Rahmen physiologischer und pathologischer Vorgänge von großer Bedeutung. So ist BAG1 an Regelmechanismen der Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Transkription, Zellbeweglichkeit und verschiedenen Signalwegen beteiligt (Townsend et al. 2003), was eine Relevanz von BAG1 auch bei der Entstehung einiger Krankheiten nahe legt.

1.3.1. Die Apoptose

Das Wort Apoptose kommt aus dem Griechischen und bedeutet in etwa Abfallen/Niedergang. Es dient heute als Beschreibung für den genetisch geregelten, programmierten Zelltod. Die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus, mit dem sich der Organismus vor kranken, mutierten Zellen schützt. Dadurch, dass funktionsuntüchtige Zellen ein Signal zur

Apoptoseinduktion bekommen, wird ein intakter Organismus mit gesunden Zellen gewährleistet.

Außerdem ist die Apoptose während der embryonalen Entwicklung (Embryogenese, Morphogenese und Metamorphose) wichtig. Dabei ist es bedeutsam, dass immer ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelluntergang besteht. Gerät dieses Gleichgewicht aus der Balance, können verschiedene Krankheiten die Folge sein. Zum Beispiel kann eine übermäßige Zellproliferation, etwa wenn die Zellen die Fähigkeit zur Apoptose verlieren, eine Tumorerkrankung zur Folge haben. Ein vermehrter Zelluntergang kann dagegen Ursache einer neurodegenerativen Erkrankung sein. BAG1 scheint eine große Bedeutung bei der Regulierung des Zellwachstums und der Blockierung der Apoptose zu haben (Kudoh et al. 2002; Takayama et al. 1998), da es in hohen Konzentrationen in verschiedenen humanen Tumorzelllinien, wie zum Beispiel in Leukämiezellen, Brustkrebszellen, Prostata-Tumorzellen und in Zellen des Colonkarzinoms (Darmkrebs) gefunden wurde. Hierbei fiel insbesondere eine hohe Konzentration des BAG1L in den Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe auf (Takayama et al. 1998).

Da die Apoptose ein sehr wichtiger Vorgang für die Zelle ist, wird sie auch durch eine Vielzahl verschiedener Proteine beeinflusst und reguliert.

Es gibt Proteine, die die Apoptose fördern/begünstigen, und solche, die die Apoptose hemmen/verhindern. Diese sensiblen Regelmechanismen sind aufgrund ihrer Komplexität und ihrer feinen Abstimmung auf vielen Ebenen störanfällig und beeinflussbar.

Beispiele für pro-apoptotische Proteine:	Wirkung:
1. BAX-Protein	-Förderung der Freisetzung von Cytochrom c
2. P53	- erhöht die Genexpression von vielen Genen wie z. B. dem von BAX -Direkte Apoptoseeinleitung bei DNA-Schäden („Wächter des Genoms“)
3. RB-Protein (von Retinoblastom)	-Bindung und Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren (wie E2 F) -kontrolliert den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus

*Tab. 3: Beispiele für pro-apoptotische Proteine und ihr Wirkmechanismus
zusammengestellt aus: Horn et al. (2002)*

Beispiele für anti-apoptotische Proteine:	Wirkung:
1. Bcl-2	-verhindert das Freisetzen von Cytochrom c aus den Mitochondrien
2. RAS	-geben Signale von Wachstumsfaktoren an den Zellkern weiter
3. MDM-2	-fördert den Abbau von P53

Tab. 4: Beispiele für anti-apoptotische Proteine (Protoonkogen) und ihr Wirkmechanismus zusammengestellt aus: Horn et al. (2002)

BAG1 nimmt in der Zelle über verschieden Bindungspartner Einfluss auf die Apoptosekaskade.

Es wirkt dabei anti-apoptotisch, indem es zum Beispiel das Bcl-2 aktiviert (siehe auch Abbildung 1/1), welches den mitochondrialen Apoptoseweg bremsen kann, oder indem es über die Aktivierung der Raf-1-Kinase das Zellwachstum und die Mitose fördert (siehe auch unter 1.2.2.) (Wang et al. 1996).

Dem Protoonkogen c-Bcl-2 (= *Bcl-2* von engl. *b-cell lymphoma*, da *Bcl-2* zuerst in einem *B-Zelllymphom* entdeckt worden war) kommt eine herausragende Bedeutung als Inhibitorprotein der Apoptose zu. Das Bcl-2-Protein befindet sich an den Mitochondrien und stabilisiert diese, verhindert also, dass zum Beispiel Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird und hemmt damit die Apoptose.

Auch die Interaktion von BAG1 und Hsp70 hat anti-apoptotische Effekte in der Zelle zur Folge und ist insbesondere für die Neuroprotektion bedeutsam (Doong et al. 2002; Liman et al. 2005).

Daneben reguliert BAG1 als Co-Chaperone von Hsc70/Hsp70 indirekt die Proteinfaltung und den Proteinabbau in der Zelle, was z. B. Auswirkungen auf die Konzentration von onkogenen Proteinen haben kann (Doong et al. 2002).

Abb. 1/1: Beteiligung der BAG-Proteine an der Apoptoseregulation durch Aktivierung des Bcl-2, welches den mitochondrialen Apoptoseweg bremsen kann.

Diese Abb. wurde freundlicherweise von Dr. J.Liman zur Verfügung gestellt und ist modifiziert nach Kermer und Bähr 2005, *Der Ophthalmologe* 102:674-78.

1.3.2. Zelldifferenzierung

Zelldifferenzierung bedeutet, dass sich aus einer pluripotenten Vorläuferzelle ein spezialisierter Zelltyp, wie z. B. Hautzellen, Muskelzellen, Nervenzellen u.v.a., entwickelt. Diese Zellen unterscheiden sich am Ende der Differenzierung nicht nur in ihrem Aussehen und Funktion, sondern auch in der Bedeutung ihrer Zellorganellen und -kompartimenten.

Aus in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen kann geschlossen werden, dass BAG1 die Differenzierung von Nervenzellen über Raf-1-Kinase modulieren kann (Kermer et al. 2002). So lassen sich in BAG1 überexprimierenden Zellen früh neuronale Differenzierungsmarker nachweisen. Darüber hinaus zeigen diese Zellen in-vitro ein vermehrtes Auswachsen „axon-ähnlicher Fortsätze“.

1.4. Ziel der Arbeit

Die BAG1 Proteine scheinen möglicherweise an der Entwicklung von Tumoren beteiligt zu sein und können die Apoptose über verschiedene Mechanismen, welche meistens einer intakten BAG-Domäne bedürfen, hemmen.

Allerdings nimmt BAG1 auch Einfluss auf die Differenzierung von Zellen, sodass es bei Tumoren eine vermehrte Ausdifferenzierung derselben bewirkt, was einen positiven Einfluss auf deren Malignität (Bösartigkeit) haben könnte. Es könnten sich hier also neue Möglichkeiten für molekulare Therapiestrategien vieler Krankheiten eröffnen (Doong et al. 2002).

Die Apoptoseregulation spielt auch hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle, da ein vermehrter Zelluntergang ein Charakteristikum neurodegenerativer Erkrankungen ist. Da BAG1 anti-apoptotische Effekte besitzt und hier insbesondere die Interaktion von BAG1 und Hsp70 in der Zelle für die Neuroprotektion bedeutsam ist, scheinen weiterführende Studien und Funktionsanalysen der BAG-Proteine auch mit Blick auf neurodegenerative Erkrankungen folgerichtig.

Ziel dieser Arbeit ist eine Funktionsanalyse des BAG1 vor allem im Hinblick auf die Bindungsproteine und die Lokalisation von BAG1 in der Zelle. Da bekanntermaßen BAG1 während der neuronalen Differenzierung vom Zellkern in das Zytosol der Zelle wechselt, liegt die Annahme nahe, dass die Funktion des BAG1 von seiner zellulären Lokalisation abhängig ist.

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass eine verstärkte BAG1-Expression im Zellkern mit dem Verlust der neuroprotektiven und ausdifferenzierenden Eigenschaften des BAG1 einhergeht. Somit ist die zytosolische BAG1-Expression für den anti-apoptotischen Effekt und die Induktion der neuronalen Differenzierung von Bedeutung.

2.Material und Methoden

2.1. Zellen und Zellkultur

2.1.1. Zellen

Für die Versuche dieser Dissertationsarbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

293-HEK-Zellen:

293-HEK-Zellen stammen von primären humanen embryonalen Nierenzellen ab. Sie wurden durch Transformation mit Adenovirus Typ 5-Fragmenten immortalisiert (Graham et al. 1977). Die Zellen wachsen fibroblastenartig als *Monolayer* und exprimieren neben Zytokeratinen und Vimentin auch Neurofilamente. Die Zellen werden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) mit einem Zusatz an 10% FBS (fetales Rinderserum), 1mM L-glutamine, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycinsulfat kultiviert.

CSM14.1-Zellen:

CSM14.1-Zellen sind nigro-striatale Rattenzellen, die durch Einführung eines temperatursensitiven SV40 T Antigens immortalisiert wurden. Die Zellen sind resistent auf Neomycin, sie proliferieren bei 32°C und können bei 39°C differenziert werden, da bei dieser Temperatur das SV40 *large T Antigen* aktiviert wird (Zhong et al. 1993). Die Zellen werden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) mit einem Zusatz an 10% FBS (fetales Rinderserum), 1mM L-glutamine, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycinsulfat kultiviert.

Kulturmedium:

DMEM (4,5 g/l Glukose)	PAA (Pasching, Österreich)
10 % FBS gold	PAA (Pasching, Österreich)
L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich)
Natrium Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
100 U/ml Penicillin	PAA (Pasching, Österreich)
100 µg/ml Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich)

2.1.2. Zellkultur

Kultivierung und Differenzierung:

293-HEK-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in *Cellstar*[®] 10-cm-Rundschalen (60 cm²) der Firma „Greiner Bio-One“ (Kremsmünster, Österreich) in Kulturmedium bei 37°C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Wärmeschrank kultiviert.

Die CSM14.1-Zellen wurden ebenfalls in 10-cm-Rundschalen in Kulturmedium kultiviert, allerdings bei 32°C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Für weiterführende Versuche wurden Platten der Firma „Becton Dickinson“ (Franklin Lakes, NJ, USA) mit unterschiedlicher Größe der Vertiefungen (*wells*) in den Platten verwendet.

Differenziert wurden die CSM14.1-Zellen durch Inkubation bei 39°C unter sonst gleichen Bedingungen wie bei 32°C.

Passagierung:

Um die Zellen in Kultur zu halten, zu passagieren und zu vermehren, wurden konfluente (dichte) Zellen unter sterilen Bedingungen mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin mit der doppelten Menge des jeweiligen Kulturmediums verdünnt und die Zellen bei Raumtemperatur und bei 1.500 Umdrehungen/min. für 5 min. abzentrifugiert. Nach Verwerfen des „Trypsinmediumgemisches“ (Überstand) konnten die Zellen in 1 ml des jeweiligen Kulturmediums wieder aufgenommen und dünn auf eine neue Kulturplatte aufgetragen werden, und so erneut in Kultur genommen werden.

<u>1 x Trypsin</u>	10 x Trypsin 1:10 in PBS verdünnt	PAA (Pasching, Österreich)
--------------------	--------------------------------------	----------------------------

Fixierung:

Um Zellen zu fixieren, wurde 4% PFA (Paraformaldehyd) verdünnt in PBS (*phosphate-buffered saline*) verwendet. Die Zellen wurden für 15 min bei Raumtemperatur in PFA inkubiert, danach mit PBS gewaschen.

<u>PBS (pH 7,4)</u>	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄
---------------------	--

<u>CSM-Fixans (pH 7,5)</u>	4 % PFA in PBS	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
----------------------------	----------------	------------------------------------

Zählen der Zellen:

Zum Zählen der Zellen wurden die Zellen mit Trypsin von den Kultivierungsplatten gelöst und nach dem Herunterzentrifugieren (bei 1.500 Umdrehungen/min für 5min) in 1ml Kulturmedium resuspendiert.

25µl dieses Gemisches in 225µl einer Trypanblaulösung (=125µl Trypanblau und 100µl PBS) waren die Voraussetzung zur mikroskopischen Quantifizierung in einer Neubauerzählkammer. Da diese nur ein Volumen von 0,4µl fasst, muss die absolute Zellzahl in 1ml =1000µl (s.o. Resuspensionsmedium) gemäß folgendem Beispiel berechnet werden: Auszählung von 180 Zellen in 0,4µl, folgt $180 \times 1000 / 0,4 = 450.000$. Da aber das Verhältnis 1:10 betragen hat (25µl Zellen in Medium und 225µl Trypanblaulösung), war das Ergebnis noch mit 10 zu multiplizieren. In 1ml sind in diesem Beispiel folglich 4.500.000 Zellen enthalten.

<u>Zählmedium</u>	60 % Trypanblau-Lösung (0,4 %) in PBS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
-------------------	--	---------------------------

Einfrieren der Zellen:

Zum Einfrieren der Zellen löste man die Zellen, wie beim Passagieren, mit Trypsin von den 10-cm-Rundschalen ab. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen allerdings nicht in Kulturmedium, sondern in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und, nach langsamer Abkühlung auf Eis, bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

<u>Einfriermedium</u>	10 % DMSO in FBS gold	Fisher Scientific (Loughborough, Leics, UK) PAA (Pasching, Österreich)
-----------------------	--------------------------	---

Auftauen der Zellen:

Alle Zelllinien wurden rasch bei 37°C aufgetaut und bei 1.500 Umdrehungen/min. für 5 min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands und einmaligem Waschen mit PBS wurde der Zellüberstand in 1 ml Medium resuspendiert, in jeweiligem Kulturmedium auf 10-cm-Rundschalen ausplattiert und erneut in Kultur genommen.

2.2. Plasmide/Zellklonierung

2.2.1. Plasmide

Eine Zelle stellt aus ihrer genetischen Information (= DNA) Proteine her, indem sie von der DNA die genetische Information abliest (Transkription) und diese dann in Proteine umwandelt (Translation). Damit kann eine Zelle nur die Proteine herstellen (exprimieren), deren genetische Informationen auch auf ihrer DNA vorhanden sind. Soll eine Zelle nun ein spezielles Protein herstellen, welches natürlicherweise nicht in ihrem Erbgut vorhanden ist, muss dieses Gen in die Zielzelle eingebracht werden; erst dann kann die Zelle auch das gewünschte Protein exprimieren. Dies erfolgt mit Hilfe von Vektoren. In den meisten Fällen sind Vektoren so genannte Plasmide, die aus Bakterien gewonnen werden. Plasmide sind kleine, zirkuläre und doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich in einer Bakterienzelle autonom, d. h. unabhängig vom eigentlichen Zellzyklus, replizieren können (Campbell 1997). In diese Plasmide lässt sich ein Teil einer gewünschten Fremd-DNA (Insert) einbauen, wodurch eine rekombinante DNA entsteht. Die so veränderten und in die Bakterienzelle zurückgegebenen Plasmide können nun von diesen vervielfältigt (kloniert) werden. Die Inserts werden mit Hilfe von Restriktionsenzymen in das Plasmid eingefügt. Dabei handelt es sich um bakterielle Enzyme, die die Bakterien gegen die DNA anderer Organismen schützen, wie z. B. vor Viren oder anderen Bakterienzellen. Die Bakterien schützen ihre eigene DNA vor dem Zerschneiden durch die Restriktionsendonuclease mit Hilfe angehängter Methylgruppen an den Basen ihrer DNA, so können die Restriktionsenzyme diese nicht mehr erkennen und die eigene DNA nicht zerschneiden (Campbell 1997). Restriktionsenzyme zerschneiden fremde DNA an spezifischen, von der Nukleotidsequenz abhängigen Stellen (Restriktionsstellen). Die so entstehenden Restriktionsfragmente bestehen aus doppelsträngiger DNA, bei der am Ende der Schnittstellen entweder gepaarte Basen, also auch doppelsträngige DNA (*blunt ends*) oder ungepaarte Basen, überstehende einsträngige DNA (*sticky ends*) stehen. In die so erreichte „Öffnung“ des Plasmidrings ist es möglich die spezifischen Inserts einzufügen und über die Restriktionsschnittstellen diese mit dem Plasmid zu verknüpfen. Die Verknüpfung (Ligation) erfolgt kovalent mit Hilfe von DNA-Ligasen (Enzyme zur Reparatur und Replikation von DNA).

Um Zellen mit einer stabilen Expression von BAG1 herzustellen, wurden die CSM14.1-Zellen mit der *flag-markierten p29 BAG1-Isoform* aus der Maus unter Kontrolle eines neuronenspezifischen Promotors (NSE) transfiziert (Kermer et al. 2002; Takayama et al. 1997). Diese dienten als Positivkontrolle für unsere Experimente. Als Negativkontrolle

verwendeten wir mit einem leeren Vektor transfizierte CSM14.1-LUC-Zellen sowie nicht transfizierte CSM14.1-Zellen (Wildtyp, WT). Um ein BAG1-Protein zu generieren, das nur im Zellkern exprimiert wird (BAG-NUC), wurde die p29BAG1 cDNA über die Restriktionsstellen *EcoRI* und *XhoI* C-terminal mit einer NLS (*nuclear localization signal*) in ein pcDNA3-Plasmid (Knee et al., 2001; Kermer, persönliche Klonierung) kloniert. Bei dem NLS handelt es sich um eine SV40-largeT-like NLS-Sequenz, die zuvor über die Restriktionsstellen *HindIII* und *EcoRI* in das pcDNA3-Plasmid kloniert wurde (Knee et al., 2001).

2.2.2. DNA-Amplifikation

Um die DNA zu vermehren (Amplifikation) wird das Plasmid mit der rekombinanten DNA wieder in das Bakterium eingebracht, dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet (Aufnahme nackter DNA aus der Umgebung in eine Zelle). In unseren Experimenten wurden die Plasmide vermittelt über Kalziumchlorid mit Hilfe von plötzlichen Temperaturänderungen in die Bakterien eingeschleust. Als kompetente Bakterien wurden, bei -80°C in steriler Kalziumchlorid-Lösung gelagerte, *E. coli* DH5 α -Bakterien (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet.

Für die Transformation wurden jeweils 100 μl kompetente *E. coli*-Bakterien mit je 5 μl Plasmid-DNA versetzt. Nach Inkubation für 30 min. auf Eis wurden beide Transformationsansätze im Wasserbad für 45 sek. auf 42°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Zur Vermehrung der Bakterien wurden die Proben in je 250 μl sterilem SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt.

Für ein selektives Wachstum von einzelnen Bakterienkolonien wurden die transformierten Bakterien auf einem antibiotikahaltigen Nährboden ausplattiert. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37°C konnten auf diesen Selektionsnährböden aufgrund der plasmidvermittelten Antibiotikaresistenz nur erfolgreich transformierte Bakterien wachsen.

<u>Kalziumchlorid-Lösung</u>	60 mM CaCl_2 ; 15 % Glycerol; 10 mM PIPES (pH 7,0)
------------------------------	---

<u>SOC-Medium</u>	0,5 % Hefeextrakt	2 % Tryptone	10 mM NaCl	2,5 mM KCl	10 mM MgCl_2	10 mM MgSO_4	20 mM Glukose
-------------------	----------------------	-----------------	---------------	---------------	--------------------------	--------------------------	---------------

2.2.3. Restriktionsenzymverdau

Über einen Restriktionsenzymverdau kann die Anwesenheit eines Inserts in der Klonierungsstelle eines Plasmids überprüft werden. Dazu wird amplifiziertes Plasmid erneut mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, über welche das Insert in den Vektor kloniert worden ist. Nach Auftragung des Verdaus auf ein Agarosegel, über welches DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden, kann ein Insert über seine Größe identifiziert werden.

Die Inserts wurden nach einer Mini- und Maxi-Präparation (s.u.) mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *Xho I* aus ihren Plasmidvektoren heraus geschnitten.

Die verschiedenen Restriktionsenzymverdau-Ansätze wurden für jeweils 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzyme wurden die Proben nach dem Verdau für 20 min. auf 65°C (*EcoR I*, *Xho I*) erhitzt und bis zur Agarosegelelektrophorese bei 4°C gelagert. Alle verwendeten Restriktionsenzyme, Enzympuffer und BSA (*bovine serum albumin*) stammen von der Firma „New England BioLabs® Inc.“ (NEB, Frankfurt am Main) und wurden unter vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen kombiniert.

<u>EcoR I/Xho I-Verdau</u> (20 µl-Ansatz)	1 □ µg Plasmid-DNA 0,5 µl EcoR I; 0,5 µl Xho I 2 □ µl 10 x EcoR I-Puffer in purifiziertem H ₂ O
---	--

1 x EcoR I-Puffer (pH 7,5 bei 25°C)	50 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 0,025 % Triton X-100
-------------------------------------	---

2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach auftrennen. Die DNA wandert dabei aufgrund von negativ geladenen DNA-Bestandteilen (Phosphatgruppen) zur Anode. Die Agarosegelelektrophorese wurde mit Hilfe von dem Material des Agarosegelelektrophorese-Systems „Mini-Sub® Cell GT-Systems“ der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Nach dem Restriktionsenzymverdau wurden dazu 8 µl von jeder Probe mit im Verhältnis 4:1 mit Ladepuffer (*Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5 x*, Bio-Rad) versetzt und in die Taschen eines ethidiumbromidhaltigen 1% Agarosegels (Volumen 40 ml) aufgetragen. Als DNA-Marker wurden jeweils 2 µl GIBCO® 1 kb plus-Marker der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden in TBE-Puffer bei Raumtemperatur für

etwa eine Stunde bei 100 Volt aufgetrennt (Trennstrecke ca. 7 cm). Über die Fluoreszenzaktivität des interkalierenden Ethidiumbromids konnte die DNA anschließend, nach Anregung durch UV-Licht, in einem *Gel-doc-Imager* (Bio-Rad) mit Hilfe des Computerprogramms *Quantity One 4.2.1* sichtbar gemacht werden.

Agarosegel	1 % Agarose 0,006 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) in TBE-Puffer	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) Sigma-Aldrich (Steinheim)
TBE-Puffer	84 mM/l Tris-Base; 89 mM/l Borsäure; 2 mM/l Na ₂ -EDTA	

2.2.5. Sequenzierung der BAG-NUC-DNA

Da sich über einen Restriktionsenzymverdau nur Lage und Anwesenheit, nicht aber die korrekte Basenfolge eines Inserts in einem Plasmid überprüfen lassen, wurde zusätzlich eine Sequenzierung durchgeführt. Über eine Sequenzierung kann die genaue Nukleotidsequenz eines DNA-Fragments ermittelt und, zum Ausschluss von Mutationen, mit der in Gendatenbanken verzeichneten bekannten Basenfolge verglichen werden.

Die Sequenzierungsmethode beruht auf einem von Fred Sanger und Alan Coulson entwickelten PCR-ähnlichen Prinzip (Sanger et al. 1977).

Eine PCR dient der selektiven Vervielfachung eines *DNA-Templates* und wird durch eine temperaturabhängige Trennung (Denaturierung) beider Stränge der doppelsträngigen *Template-DNA* initiiert. Nach Zugabe der Desoxynukleotide dATP, dTTP, dCTP und dGTP (dNTPs), den vier Grundbausteinen der DNA, und temperaturabhängiger Anlagerung (*Annealing*) von Oligonukleotid-Primern, werden an den Einzelsträngen der *Template-DNA*, mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase, die aus thermostabilen Bakterien wie *Thermus aquaticus* (Taq) oder *Thermus flavus* (Tfl) isoliert werden kann, neue komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Die Primer werden dabei so lange verlängert (elongiert), bis eine vollständige doppelsträngige Kopie der *Template-DNA* vorliegt. Die einzelnen Schritte einer PCR werden durch spezifische Temperaturänderungen eingeleitet und in mehreren Zyklen wiederholt.

Bei einer Sequenzierungs-PCR werden einem solchen PCR-Ansatz, zusätzlich zu den dNTPs, in geringer Menge ddNTPs der A-, T-, C- und G-Form hinzugefügt. Bei ddNTPs handelt es sich um mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide, denen an der 3' -Position der Desoxyribose die Hydroxylgruppe fehlt, die für die Verlängerung des

DNA-Stranges notwendig ist. Nach Einbau eines ddNTPs kommt es zu einem Abbruch der DNA-Synthese, wodurch keine vollständigen Kopien der *Template-DNA*, sondern nur mehrere unterschiedlich lange komplementäre DNA-Fragmente synthetisiert werden können. Die Nukleotidsequenz der gesamten zu sequenzierenden DNA wird nach Auftrennung dieser DNA-Fragmente der Größe nach, mit Hilfe der spezifischen Fluoreszenzmarkierung der vier verschiedenen ddNTPs ermittelt.

Das doppelsträngige BAG-NUC-Konstrukt wurde in je zwei Ansätzen in beide Leserichtungen unter Verwendung spezifisch konstruierter Primer sequenziert, welche jeweils ihren spezifischen Ansatzpunkt an den Enden der Klonierungsstellen der Vektoren haben. Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis in autoklavierten Reaktionsgefäßen angesetzt.

PCR-Ansatz „vorwärts“ (10µl)	PCR-Ansatz „rückwärts“ (10µl)	
500 ng Plasmid-DNA 2 µl Primer (5 pmol/µl) 2 µl Sequenzier-Mix in H ₂ O+DEPC	500 ng Plasmid-DNA 2 µl Primer (5 pmol/µl) 2 µl Sequenzier-Mix in H ₂ O+DEPC	SEQLAB (Göttingen) Sigma-Aldrich (Steinheim) Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

Primer-Sequenzen	
T7-Primer	5' - TAATACGACTCACTATAGGG -3'
Sp6-Primer	5' - ATTTAGGTGACACTATAG -3'
pEGFP-Primer 1 (565 bp-591 bp)	5' - AGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCC -3'
pEGFP-Primer 2 (749 bp-728 bp)	5' - GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGG -3'

Sequenzier-Mix (ABI PRISM [®] Big Dye [™] Terminator-Sequenzier-Mix, Version 2.0)	dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dUTP) ddNTPs (ddATP [R6G], ddCTP [ROX], ddGTP [R110], ddTTP [TAMRA]) Ampli Taq-DNA-Polymerase MgCl ₂ , Tris-HCl-Puffer (pH 9,0) [...] = Fluoreszenzmarkierung
---	--

Die Sequenzierungs-PCR wurde in einer Cyclone 25-PCR-Maschine der Firma „*PEQLAB Biotechnologie GmbH*“ (Erlangen) unter Verwendung des ABI.SEQ.SEB-Sequenzierprogramms durchgeführt.

<u>ABI.SEQ.SEB-</u> <u>Sequenzierprogramm</u>	Denaturierung	1 min.	94°C	
	Schritt 1	15 sek.	96°C	30 Zyklen
	Schritt 2	45 sek.	55°C	
	Schritt 3	4 min.	60°C	

Zur Fällung und Aufreinigung der DNA wurden die PCR-Ansätze mit je 1 µl 3M Natriumacetat und 25 µl 100 % Ethanol absolut versetzt und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur für 20 min. bei 16060 x g wurde jedes *pellet* (Zellüberstand) in 1 ml 70 % Ethanol aufgenommen und erneut bei Raumtemperatur für 10 min. bei 16060 x g abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde die DNA aller PCR-Ansätze für 15 min. bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

Die Sequenzierung wurde in einem automatischen Sequenzer (ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer*) der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die so erhaltene Basenfolge wurde anschließend manuell mit der bekannten Sequenz verglichen.

Transformation

Generell wird zwischen einer chemischen und einer elektrischen Transformation unterschieden. Während man sich bei der elektrischen Transformation einer elektrischen Spannung bedient, um die Bakterienwand für Plasmide durchlässig zu machen, geschieht dies bei der chemischen Transformation mit Hilfe von Temperaturänderungen.

Bei der Transformation werden die vorher ligierten Proben in Bakterien eingebracht, um sie so zu amplifizieren. Die kompetenten Zellen sind empfindlich, es ist daher wichtig, sehr schonend mit den Zellen umzugehen, also streng auf Eis zu arbeiten, zu starke Erschütterungen und vor allem den Luftkontakt zu vermeiden. Dazu wurden die bei -80°C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und je 5 µl des Ligationsansatzes hinzupipettiert. Es wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Plasmidaufnahme für 30 Sekunden auf 42°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Als Nährmedium wurde 450 µl SOC-Medium hinzugefügt. Die Zellvermehrung fand für 60 min im Schüttelbad bei 37°C statt. So transformierte Zellen konnten für 1 bis 2 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

2.2.6. Mini-Präparation und Maxi-Präparation

Mit Hilfe von Plasmid-Präparationen können amplifizierte Plasmide wieder aus Bakterien isoliert werden. Durch die Elution von Plasmiden über eine Mini-Präparation kann Plasmid-DNA in analytischen Mengen (etwa 20 µg) gewonnen werden.

Nach erfolgreicher Transformation wurden mehrere antibiotikaselektierte Bakterienkolonien in je 2 ml antibiotikahaltiges Selektionsmedium überführt und unter Schütteln für 12 h bei 37°C selektiv ein weiteres Mal amplifiziert. Von jedem Ansatz wurde die Hälfte für eine Mini-Präparation verwendet, während die andere Hälfte bei 4°C gelagert für eine eventuelle spätere Maxi-Präparation diente.

Die Mini-Präparation wurde mit Hilfe des *QIAprep Spin Plasmid-Präparations-Kits* der Firma QIAGEN (Hilden) nach dem beigefügten Standardprotokoll durchgeführt.

Zusammengefasst wurden die Bakterien lysiert, zentrifugiert und die *pellets* in verschiedenen Puffern resuspendiert, wobei die DNA im Überstand verbleibt. Durch Zentrifugation dieses Überstandes über QIAprep-Spin-Säulen konnte die Plasmid-DNA aufgereinigt, gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert werden. Schließlich wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Zur Lysierung der Bakterien wurden, nach kurzer Zentrifugation, die *pellets* aller Mini-Präparations-Ansätze nacheinander mit je 250 µl Puffer P1, 250 µl Puffer P2 und 350 µl Puffer P3 resuspendiert. Nach Abzentrifugieren der Bakterien bei 10.000 x g für 10 min. bei Raumtemperatur, wurde der DNA-haltige Überstand in QIAprep-Spin-Säulen überführt. Durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 30-60 sec. bei Raumtemperatur wurden DNA und Überstand getrennt, wobei die DNA in den Säulen hängen blieb. Die DNA wurde in zwei Schritten mit je 0,5 ml Puffer PB (inaktivierte Nukleasen) und 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Die Waschpuffer wurden zwischenzeitlich durch kurzes Abzentrifugieren entfernt.

Durch Zugabe von je 50 µl TE-Puffer und anschließender kurzer Zentrifugation wurden die Plasmide aus den Säulen eluiert und später bei 4°C gelagert. Reinheit und Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe eines Bio-Photometers der Firma Eppendorf (Hamburg) bestimmt.

Um zu ermitteln, welche Bakterienkolonien tatsächlich das Plasmid exprimieren, erfolgte ein für das jeweilige Insert spezifischer Restriktionsenzymverdau.

Um größere DNA Mengen zu erhalten, wird eine so genannte Maxi Präparation durchgeführt. Das Prinzip entspricht dem der Mini-Präparation, der wesentliche Unterschied liegt in der größeren Bakterien- und der damit verbundenen DNA-Menge.

Puffer für Mini-Präparation:

Von Macherey-Nagel GmbH&Co.KG, Düren, Germany:

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-Cl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysepuffer)	200 mM NaOH; 1 % SDS (w/v)
Puffer N3	Zusammensetzung nicht bekannt
Puffer PB (inaktiviert Nucleasen)	Zusammensetzung nicht bekannt
Puffer PE	Zusammensetzung nicht bekannt
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-Cl (pH 8,0); 1 mM EDTA

Puffer für Maxi-Präparation:

Von Macherey-Nagel GmbH&Co.KG, Düren, Germany:

Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Puffer QBT	0,15 % Triton-X-100 (v/v); 750 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15 % Isopropanol (v/v)
Puffer QC (Waschpuffer)	1 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15 % Isopropanol (v/v)
Puffer QF (Elutionspuffer)	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl (pH 8,5); 15 % Isopropanol (v/v)

2.3. Transfektion

Um das gewünschte Gen in der eukaryotischen Zielzelle zu exprimieren, wird die zuvor aus Bakterien gewonnene Plasmid-DNA transfiziert, wobei man eine transiente von einer stabilen Transfektion unterscheidet.

2.3.1. Transiente Transfektion

Bei einer transienten Transfektion wird die DNA nicht fest in das Genom der Zielzelle integriert, sondern vom freiliegenden Plasmid abgelesen. Diese Methode ist schnell und einfach durchführbar; allerdings hat die Zielzelle keinen Nutzen von der Transkription und Translation des Plasmids, so dass sie es folglich nach kurzer Zeit entfernt. Somit ist dieser Ansatz nur für kurze Beobachtungszeiträume geeignet.

Die Zellen wurden zunächst auf einer 6-*well*-Platte (Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in antibiotikafreiem, FCS-haltigen Kulturmedium ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion mit Lipofectamine 2000® nach dem zugehörigen Protokoll (Firma Invitrogen, Karlsruhe). Hierzu kamen 4µg DNA (Plasmid) und 10µl Transfektans pro *well* zum Einsatz. Plasmid und Transfektans wurden getrennt voneinander in 250 µl Medium ohne Antibiotikum und ohne FCS für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Mischen

beider Ansätze folgte eine erneute Inkubation für 30min bei Raumtemperatur. 500µl dieser Mischung plus 1,5ml Medium ohne Antibiotikum und ohne FCS pro *well* auf zuvor mit PBS gewaschenen Zellen wurden für 12h belassen, bevor durch den Wechsel zu normalem Kulturmedium die Transfektion zum Abschluss kam.

2.3.2. Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird unter durch Antibiotika induziertem Selektionsdruck die eingebrachte DNA fest in das Genom der Zielzelle eingebaut. Eine Langzeitexpression ermöglicht somit längere Kultivierungszeiten und Untersuchungszeiträume.

In unseren Untersuchungen wurde die stabile Transfektion von CSM14.1 Zellen analog zum transienten Protokoll durchgeführt. Allerdings war aufgrund der Neomycin-Resistenz der CSM-Zellen eine Doppeltransfektion mit 3µg DNA des spezifischen Plasmids und einem Puromycinresistenz-Plasmid (pBabe-puro) im Verhältnis 5:1 notwendig. 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium durch puromycinhaltiges Selektionsmedium ersetzt.

Um Einzelzellkolonien zu generieren, wurden in der Folge durchschnittlich 0,5 Zellen/pro well auf eine 96-well Platte (Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) im jeweiligen Selektionsmedium ausplattiert. Nach ca. 3-4 Wochen ließen sich unter dem Lichtmikroskop einzelne Zellklone identifizieren und expandieren.

<u>CSM-Selektionsmedium</u>	8µg/ml Puromycin in Kulturmedium	Sigma-Aldrich (Steinheim)
-----------------------------	----------------------------------	---------------------------

2.4. Zellyse

Um Proteine aus der Zelle zu isolieren und dann spezifisch nachweisen zu können (siehe auch 2.6. Western Blot), wurden die Zielzellen lysiert. Bei allen Zelltypen wurden hierzu ca. 90% konfluente Platten nach einem Waschgang mit PBS mit einem Lysepuffer versetzt (z. B. 70µl Lysepuffer pro 6well-Platte). Zuvor waren die Zellen für 6 Stunden mit MG132 („N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-leucinal“) in einer Konzentration von 1:50 behandelt worden, wodurch bei gehemmter Proteindegradation höhere Konzentration des Proteins von Interesse erzielt werden konnten.

Die mit einem Zellschaber von der Platte geschabten Zellen wurden in einem Eppendorfbehälter für 15 min auf Eis lysiert. Die Erhitzung der Proben (2 min auf 92°C) erschloss auch Proteine im Zellkern, die anschließend durch Zentrifugation (15 min bei 4°C

und 13.000 Umdrehungen/min) vom Zelldebris (Membranen, Zellorganellen etc.) getrennt wurden. Der so gewonnene Proteinüberstand ließ sich nun für spätere Versuche bei -20°C bevorraten.

<u>Lysepuffer</u>	50 mmol Tris (1M / 7,5 pH) 150 mmol NaCl (1M / 7,4 pH) 1% Triton X 100 4 % Proteinase-Inhibitor 1% IGEPAL CA -630 (C18H30O3) In HKME	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) Sigma-Aldrich (Steinheim)
-------------------	---	--

2.5. BCA-Assay: Proteinkonzentrationsbestimmung

Mit Hilfe eines *BCA-Assays* kann die Proteinkonzentration in einem Lysat bestimmt werden. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Bradford-Methode, wonach quantitativ die Bindung eines Farbstoffs (Coomassie-Brilliantblau) an ein Protein unbekannter Menge mit der Bindung des gleichen Farbstoffs an ein Standardprotein bekannter Konzentration verglichen wird (Bradford 1976). Bei einem *BCA-Assay* wird der Farbstoff durch Chelatbildung von zwei Molekülen Bicinchonin-Säure (BCA) mit einem Kupferion gebildet. Die BAG-NUC-Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines *BCATM Protein Assay-Kits* der Firma „Pierce“ (Rockford, Illinois, USA) bestimmt. In einer 96-well Platte wurden dazu verschiedene BSA-Proteinmengen (40 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg, 0,625 µg) als Konzentrationsstandard und jeweils 1 µl Lysat in einem Doppelansatz, mit je 200 µl BCA-Farblösung versetzt und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde mit einem Rainbow-ELISA-Photometer der Firma TECAN (Crailsheim), unter Verwendung des Computerprogramms *easy WIN basic* 6.1 gemessen (Messfilter 562 nm). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe von Eichgeraden anhand der BSA-Konzentrationsstandardreihe mit dem Computerprogramm *Excel* ermittelt.

Stocklösung BSA-Standardprotein	10 µg/µl BSA in Lysepuffer	Sigma-Aldrich (Steinheim)
---------------------------------	-------------------------------	---------------------------

BCA-Farblösung	2% Reagenz B in Reagenz A
Reagenz A	beinhaltet BCA, Natriumkarbonat, Natriumbicarbonat, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid
Reagenz B	beinhaltet 4 % Kupfersulfat

2.6. Western Blot

Der Western Blot ist eine gängige Methode zum quantitativen und qualitativen Nachweis spezifischer Proteine. „Western Blot“ steht neben den Begriffen „Southern Blot“ (Methode zum DNA-Nachweis) und „Northern Blot“ (Methode zum RNA-Nachweis).

Beim Western Blot werden die Proteine erst in einem Gel der Größe nach aufgetrennt und dann auf eine Membran „geblottet“ (von engl. „*blotting paper*“ für Löschpapier) auf der sie sich dann mit einem Antikörper spezifisch nachweisen lassen.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):

Eine SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molmasse in einem elektrischen Feld, und ermöglicht eine weitere spezifische Analyse von Proteinen eines Zelllysats.

Für die SDS-PAGE wurde mit Hilfe von Material des Mini-PROTEAN®3 *cell*-Systems der Firma „Bio-Rad“ (Hercules, CA, USA) ein SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus einem 5%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel hergestellt.

<u>5%iges Sammelgel</u> (Angaben für 1 Gel)	<u>12%iges Trenngel</u> (Angaben für 1 Gel)	
0,68 ml purifiziertes H ₂ O	1,60 ml purifiziertes H ₂ O	Th.Geyer (Renningen) MERCK (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
0,17ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	2,0ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	
0,13 ml 1 M Tris (pH 6,8)	1,30 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)	
0,01 ml 10 % SDS	0,05 ml 10 % SDS	
0,01 ml 10 % APS	0,05 ml 10 % APS	
0,001 ml TEMED	0,002 ml TEMED	

Für die SDS-PAGE wurden 20 µg Protein von jedem zu untersuchenden Lysat im Verhältnis 5:1 mit 6 x SDS-Ladepuffer versetzt und, um die Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen, bei 50°C für 5 min. denaturiert. Durch eine Anlagerung von im Ladepuffer enthaltenem SDS wurde den Proteinen eine negative Ladung verliehen, so dass sie während einer SDS-PAGE zur Anode wandern. Als Negativ-Kontrolle wurden jeweils 20 µg Protein aus Lysaten mit einem Leervektor (pcDNA3-Plasmid) transfizierten CSM14.1-Zellen verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten Zelllysate aus transienten Transfektionen. Von allen Proben wurde ein maximales Volumen von 20 µl in die Geltaschen des Sammelgels aufgetragen. Als Marker wurden jeweils 3-4 µl *Rainbowmarker* (Kaleidoscope Prestained standard) der Firma „Bio-Rad“ (Hercules, CA, USA) verwendet. Die SDS-PAGE wurde in einer Kammer des Mini-PROTEAN® Elektrophorese-Systems der Firma „Bio-Rad“ (Hercules, CA, USA) bei

4°C in Laufpuffer bei zunächst 75 Volt und, nach Erreichen des Trenngels, bei 100 Volt durchgeführt. Der langsame Übergang der Proteine von Sammelgel zu Trenngel mit einem pH-Sprung von 6,8 zu 8,8 diente der Fokussierung der Proteine.

6 x SDS-Ladepuffer (10 ml)	7 ml 4 x Tris Cl/SDS (pH 6,8); 3 ml Glycerol; 1 g SDS; 0,93 g DTT; 1,2 mg Bromphenol-Blau
----------------------------	---

Laufpuffer	24 % 5x Tris/Glycin; 1,2 % SDS (10%)
5x Tris/Glycin	15 g/l Tris; 72 g/l Glycin

Western Blot:

Der Western Blot erfolgte in einer Transfer-Kammer des Mini-PROTEAN® Elektrophorese-Systems der Firma „Bio-Rad“ (Hercules, CA, USA) zwischen zwei 6 x 9 cm großen Gel-Blotting-Papieren der Firma „Carl Roth GmbH“ (Karlsruhe) und Schwämmen des Mini-PROTEAN® Elektrophorese-Systems, in Transferpuffer bei 100 Volt für eine Stunde bei 4°C. Die Proteine wurden dabei auf eine 6 x 9 cm große PROTAN® Nitrozellulose Transfer Membran der Firma „Schleicher & Schuell BioScience GmbH“ (Dassel) transferiert.

Transferpuffer	20 % 5x Tris/Glycin; 20 % Methanol; 0,1 % SDS (10%)
----------------	---

Immunodetektion der Proteine:

Für einen spezifischen Proteinnachweis mittels Immunodetektion wird eine Nitrozellulosemembran nach dem Western Blot mit Antikörpern inkubiert, welche eine spezifische Bindung mit bestimmten Epitopen des Zielproteins eingehen können.

Bei dem ersten Antikörper handelte es sich entweder um Anti-Human-BAG1, der sich gegen BAG-NUC richtet (Dako Cytomation, 1:1000), um anti Hsp 70 (1:100, BD Bioscience, Franklin Lakes NJ, USA), anti Erk/phospho-Erk (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:500) oder Bur1680 polyklonales anti-BAG1 (1:1000; bereitgestellt von S. Krajewski, The Burnham Institute, La Jolla, CA, USA) (Kermer et al. 2002).

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (gerichtet gegen den ersten Antikörper) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem zweiten Antikörper handelte es sich um einen Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS, je nachdem von welcher Spezies der erste Antikörper stammte. Durch das HRP war der

Antikörper indirekt in der Lage, eine ECL-Lösung umzusetzen und so ein sichtbares Signal zu erzeugen. Der zweite Antikörper war notwendig, da der erste Antikörper nicht HRP-gekoppelt vorlag.

Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran wieder in einem dreimaligen Waschvorgang mit TBS-T gewaschen.

Nach einem Waschschrift für 5 min. bei Raumtemperatur in TBS-T wurden zunächst unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation der Nitrozellulosemembran in Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

<u>Milchlösung</u>	5 % Milchpulver in TBS-T	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
--------------------	-----------------------------	----------------------------

<u>TBS-T</u>	10 mM Tris (pH 7,5); 142 mM NaCl; 0,1 % Tween-20
--------------	--

1. Antikörper	Anti-Human-BAG 1 (mouse)	DAKO Corporation, Carpinteria, CA 93013 USA
2. Antikörper	Anti-mouse HRP	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)

Nach dreimaligem Waschen der Membran für 5 min. in TBS-T, wurde der gebundene Antikörper mit Hilfe eines ECL-Detektionsreagenz nachgewiesen. Zur Herstellung des ECL-Reagenz wurden ECL-Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 vermischt und für 1 min. mit der Membran inkubiert. ECL reagiert dabei, unter Bildung von Chemolumineszenzsignalen, als Substrat der an den zweiten Antikörper gekoppelten HRP. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Exposition der Membran in einem Fluor-STM MultiImager der Firma „Bio-Rad“ (Hercules, CA, USA) mit Hilfe des Computerprogramms *Quantity One* 4.2.1 nachgewiesen. Die Banden mit dem BAG-NUC Protein konnten ca. bei 39 kDa detektiert werden. *Dalton* (Da) ist eine nach dem englischen Naturforscher John Dalton benannte, nicht SI-konforme Einheit für die atomare Masse und entspricht in etwa der Masse eines Wasserstoffatoms ($1,6605655 \cdot 10^{-27}$ kg). Gebräuchlich ist oft auch die Angabe der atomaren Masse in Kilo-Dalton (kDa).

<u>ECL-Lösung 1</u> (10 ml)	100 µl 250 mM Luminol in DMSO 44 µl 90 mM p-Coumarsäure in DMSO 1 ml 1 M Tris (pH 8,5) 8,85 ml purifiziertes H ₂ O	Sigma-Aldrich (Steinheim) Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
<u>ECL-Lösung 2</u> (10ml)	6 µl 30%ige H ₂ O ₂ -Lösung 1 ml 1 M Tris (pH 8,5) 9 ml purifiziertes H ₂ O	Merck KGaA (Darmstadt)

Um eine BAG-NUC-Überexpression in Lysaten von stabil BAG-NUC transfizierten Zellen nachzuweisen, wurde zusätzlich gezeigt, dass von Positiv-Kontrolle, Negativ-Kontrolle und allen Lysaten die gleiche Proteinmenge geladen worden ist. Dazu wurde die Membran nach der ECL-Detektion des zweiten Antikörpers, zusätzlich für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Antikörper gegen, in allen verwendeten Zelllinien ubiquitär exprimiertes Tubulin versetzt. Da der verwendete monoklonale Maus-Antikörper gegen β -Tubulin nicht HRP-konjugiert war, musste die Membran zusätzlich für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur in einem HRP-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper inkubiert werden. Nach anschließender ECL-Entwicklung zeigt sich die Tubulin-Proteinbande bei 55 kDa.

<u>Anti-β-Tubulin-Antikörper</u>	1:2000 in TBS-T	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>Anti-Maus-HRP-Antikörper</u>	1:1000 in TBS-T	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)

2.7. Kompartiment-spezifische Fluoreszenz- und Immunfärbungen

Die Fluoreszenz- und Immunfärbungen (Immunzytochemie = ICC) dienen auch, wie der Western Blot, dem Proteinnachweis.

Mit Hilfe von Fluoreszenz- und Immunfärbungen wurde die subzelluläre Lokalisation des BAG-NUC in den neuronalen CSM14.1-Zellen untersucht.

Alle Fluoreszenz- und Immunfärbungen wurden in 8-well-Objektträgern (Lab-Tek Chambered 1.0) der Firma „Nagel Nunc International“ (Rochester, NY, USA) an transient und stabil BAG-NUC-transfizierten Zellen (10^4 CSM14.1-Zellen) durchgeführt. Nach 24 Stunden Kultivierung in jeweiligem Selektionsmedium wurde mit den Färbungen begonnen.

Für die Immunfärbungen wurden die Zellen zuerst in entsprechendem Fixiermedium fixiert und für 10 min. bei Raumtemperatur in Triton X-100-Lösung permeabilisiert. Die Triton X-100-Lösung wurde in drei Waschschritten mit PBS wieder entfernt. Eine Permeabilisierung der Zellmembran ermöglichte das Eindringen eines spezifischen Antikörpers gegen BAG-NUC. Dieser Antikörper konnte über einen Fluorophor-*getaggt*en zweiten Antikörper unter Fluoreszenzlicht detektiert werden.

Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden in einer NGS-Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Danach folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Anti-BAG 1) in einer Verdünnung von 1:500 in TBS-T bei 4°C und dem zweiten Antikörper Cy3-anti-*mouse* 1:1000 in PBS für 45min, lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden für 30 sek. mit einer Dapi-Lösung zur Anfärbung des Zellkerns inkubiert. Das Expressionsmuster der Zellen mit dem

NUC-Plasmid wurde anschließend mit 200-, 400- oder 630-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Axiovert 200 M-Fluoreszenzmikroskops der Firma „Zeiss“ (Jena) mit der spezifischen Fluoreszenzfärbung der jeweiligen Färbung verglichen. Durch Fluoreszenzanregung wurde die NUC-Expression unter einem Rhodamine-Filter (MitoTracker-Red[®], Mito-RFP, CY3) detektiert. Die Zellen wurden mit Hilfe des Computerprogramms AxioVision 3.1 fotografiert. Durch die Dapi-Färbung war eine genaue Lagebeschreibung des Proteins, im Zellkern (deckungsgleich mit dem Dapi-Signal) oder im Zytoplasma (diffus um das Dapi-Signal verteilt) möglich.

<u>Triton X-100-Lösung</u>	0,2 % Triton X-100 in PBS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>NGS-Blocklösung</u>	10 % NGS In PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany
2. Antikörper	Cy3-anti- <i>mouse</i>	Dianova, Hamburg, Germany
DAPI		Merck KGaA, Darmstadt, Germany

2.8. Generationszeit der Zellen

Um die Zeit zu ermitteln, in der sich ein Zellklon verdoppelt (Generationszeit), wurden die Zellen alle 24h nach dem oben beschriebenen Prinzip gezählt.

Am Tag 0 wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen des jeweiligen Klon (für BAG-NUC 58.000/pro *well* und für CSM14.1-Zellen 25.000/pro *well*) auf eine 6-*well* Platte ausplattiert. Die gleiche Anzahl an Zellen wurde auch in 4-6 andere *wells* der 6-*well*-Platte verteilt und nach 24h wurde das erste *well* ausgezählt, nach 48h das zweite *well* und so fort. So wurde alle 24h eine Zellzahl ermittelt, eine Zellzahl die Auskunft darüber gab, wie stark die Zellen sich nach 24h, nach 48h u.s.w. vermehrt hatten. Dies wurde insgesamt 4x wiederholt.

Aus diesen Werten konnte die Generationszeit der Klone errechnet werden und diese dann graphisch mit dem Computerprogramm Excel dargestellt werden.

2.9. Zelltodassays

Zelltodassays sind Versuche bei denen Zellen mit Zellgiften exponiert werden, um so Zellsterben (Apoptose) zu induzieren. Danach wird analysiert, ob es Unterschiede zwischen den Zelllinien im Zellüberleben gibt. Benutzt wurden hier zwei verschiedene Zellgifte zur Apoptoseinduktion: Staurosporin und Thapsigargin. Verglichen wurde das Überleben von CSM14.1-Wildtyp-Zellen (= CSM-WT, Leervektor) mit den CSM-BAG-NUC-Klonen.

2.9.1. Staurosporinassay

Staurosporin ist ein, aus "Streptomyces-staurosporeus-Bakterien" isolierbarer Breitspektrum-Kinaseinhibitor, der als Induktor des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosewegs gilt (Chae et al. 2004).

Die CSM14.1-Zellen wurden jeweils für 48 Stunden bei den oben beschriebenen Kulturbedingungen in einer 96-*well*-Platte mit verschiedenen stark konzentriertem (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 und 1 μ M) Staurosporin-Medium bzw. Kulturmedium ohne Staurosporin als Kontrolle versetzt. Der Staurosporin-Assay wurde sechsmal wiederholt.

<u>Staurosporin-Stocklösung</u>	40 μ M Staurosporin in PBS mit 4 % DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>Staurosporin-Medium (CSM14.1-Zellen)</u>	0,01 μ M; 0,05 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M Staurosporin-Stocklösung in CSM14.1-Kulturmedium	

2.9.2. Thapsigarginassay

Thapsigargin, ein "*Sesquiterpen-Lakton*" aus der Pflanze "*Thapsia garganica*", ist ein Tumorpromotor, welcher Zellmembranen passieren kann und spezifisch die CA^{2+} -ATPase des Endoplasmatischen Retikulum inhibiert (Chae et al. 2004).

Die Zellen wurden in verschieden stark konzentriertem Thapsigargin-Medium für 48 Stunden bei der Kulturtemperatur für CSM14.1-Zellen inkubiert, auch hier wurde ebenfalls eine Negativkontrolle durchgeführt, ohne Thapsigarginzusatz und die Versuche wurden 6x an ausdifferenzierten Zellen wiederholt.

<u>Thapsigargin-Stocklösung</u>	1mM Thapsigargin in DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>Thapsigargin-Medium (CSM14.1-Zellen)</u>	0,3 μ M; 3 μ M Thapsigargin-Stocklösung in Kulturmedium	

2.9.3. Auswertung der Zelltodassays

Die Überlebensrate der CSM14.1-Zellen nach einem Zelltodassay wurde mit Hilfe einer Kristallviolett-färbung ausgewertet. Dies geschah indirekt über das Anfärben noch lebender Zellen.

Kristallviolett-Assay:

Über die Färbung von Zellen mit dem Vitalstoff Kristallviolett wurden CSM14.1-Zellen, nach der Zelltod-Induktion durch Staurosporin oder Thapsigargin, ausgewertet. Dazu wurden die Zellen, nach Abnahme des Mediums aus den verwendeten 96-*well* Platten, mit je 100 µl pro *well* Kristallviolett-Lösung für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Als Leerwert wurde ein *well* ohne Zellen ebenfalls mit der Kristallviolett-Lösung versetzt. Danach wurde die Kristallviolettlösung von den Zellen abgenommen und Reste von toten Zellen und unspezifischer Färbung wurden vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Nach dem Trocknen wurden die lebenden Zellen, die jetzt mit Kristallviolett angefärbt waren, mit je 100 µl Natriumcitrat-Lösung pro *well* versetzt, dadurch wurde das von den lebenden Zellen inkorporierte Kristallviolett wieder gelöst. Über eine Absorptionsbestimmung konnte auf den Anteil der noch lebenden Zellen geschlossen werden. Die Absorption wurde im *Rainbow-ELISA-Photometer* der Firma „TECAN“ (Crailsheim) unter Verwendung des Computerprogramms *easy WIN basic 6.1* bei einer Wellenlänge von 550 nm im Messfilter gemessen. Die Anzahl der überlebenden Zellen wurde prozentual anhand dieser Werte in Excel berechnet.

<u>Kristallviolett-Lösung</u>	1:1 verdünnt mit gereinigtem Wasser	0,5 % Kristallviolett in 20 % Methanol
<u>Natriumcitrat-Lösung</u>	0,1 M Natriumcitrat in 50 % Ethanol	

2.10. Neuritenwachstum

Um CSM-WT-Zellen mit den BAG-NUC-Zellen in Bezug auf ihr Ausdifferenzierungsverhalten vergleichen zu können, wurden axon-ähnliche Fortsätze (Nervenzellfortsätze) der Zellen ausgemessen, da diese als Indikator für eine stattfindende Differenzierung der Zellen angesehen werden können. Da keine neuronalen Primärzellen für die Versuche verwendet wurden, sondern Zellen, die den primären Neuronen ähnlich sind, kann streng genommen nicht von Axonen im eigentlichen Sinne gesprochen werden, sondern nur von axon-ähnlichen Fortsätzen (Nervenzellfortsätze).

Dafür wurden auf eine 24-*well*-Platte 20000 Zellen/*well* von BAG-NUC ausplattiert, von den CSM-WT-Zellen nur 6500 Zellen/*well*, da sich die WT-Zellen schneller teilten als die NUC-Variante und sonst die Zellen eine zu hohe Dichte zum ausmessen der Axone aufgewiesen hätten. Die ausplattierten NUC-Zellen wurden für 12h bei 32°C, danach für 12h bei 37°C und dann für 7 Tage bei 39°C zum Ausdifferenzieren inkubiert. Dieses langsame Anheben der

Temperatur war notwendig, da die NUC-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen sehr empfindlich auf einen raschen Temperaturwechsel reagierten.

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 7 Tagen bei 39°C wurden die Zellen mit Hilfe des Computerprogramms *AxioVision 3.1* unter dem Axiovert 200 M-Fluoreszenzmikroskop der Firma „Zeiss“ (Jena) mit dem 20x Objektiv bei Durchlicht fotografiert. Mit dem Computerprogramm KS 400 3.0 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) konnte dann die Länge der einzelnen Nervenzellfortsätze in μM ausgemessen und mit Excel graphisch dargestellt werden.

2.11. NeuN

Der NeuN-Versuch dient der Bestimmung des Differenzierungsgrades von neuronalen Zellen. NeuN („*neuronal nuclei*“) ist ein spezifisch in Neuronen vorkommendes Protein, welches in fast allen neuronalen Zelltypen (außer beispielsweise in Purkinjezellen) des Nervensystems verschiedener Spezies vorkommt (Mullen et al. 1992). NeuN ist ein lösliches Protein, das in vitro an die DNA binden kann, allerdings ist seine genaue Funktion in der Zelle noch unbekannt (Wolf et al. 1996). Außerdem ist die Expression des NeuN abhängig vom Entwicklungsstadium der Zelle. Die NeuN-Expression tritt verstärkt bei beendeter neuronaler Differenzierung der Zellen auf (Mullen et al. 1992). Auch wurde NeuN als ein Marker zur Identifikation von Neuronen in Transplantationsstudien mit embryonalen Krebszelllinien verwendet (Morassutti et al. 1994) oder bei neuronalen Vorläuferzellen (Gage et al. 1995). Die Markierung von NeuN in Zellen gilt als eine sensitive und spezifische Methode, neuronale Zellen (auch formalinfixierte) und ihre Differenzierung darzustellen (Wolf et al. 1996). Ein Antikörper gegen das intrazelluläre NeuN markiert folglich ausdifferenzierte Neurone. Für diesen Versuch wurden auf eine 24-*well*-Platte 500 Zellen/*well* von den CSM-WT-Zellen und auf eine separate Platte 20000 Zellen/*well* von den NUC-Zellen ausplattiert. Bei den NUC-Zellen nach vorsichtigem Temperaturanstieg und bei den WT-Zellen dagegen sofort, wurden die Zellen zum Ausdifferenzieren bei 39°C inkubiert.

Nach 50-54 Tagen bei 39°C wurden die Zellen wie bei einer ICC fixiert und behandelt, allerdings wurde als 1. Antikörper ein Antikörper gegen NeuN in einer Konzentration von 1:200 verwendet. Ansonsten erfolgte der Versuchsaufbau wie bei einer ICC (siehe unter 2.7.).

1. Antikörper: Anti-NeuN (<i>anti-mouse</i>)	Chemicon international, Temecula CA92590
--	--

2.12. ERK

Es wird angenommen, dass die neuronale Differenzierung über die Interaktion von BAG1 mit der Raf-1-Kinase vermittelt wird (Kermer et al. 2003; Liman et al. 2005). Daher untersuchten wir, ob BAG-NUC die Phosphorylierung von Erk1/2 induzieren kann.

Erk und Phospho-Erk können über einen Antikörper im Rahmen eines Western Blots dargestellt werden (siehe auch 2.6.).

<u>monoclonal antibodies gegen ERK/phospho ERK</u>	1:500	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
--	-------	----------------------------------

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung von BAG-NUC

Um ein BAG1-Protein zu generieren, das nur im Zellkern exprimiert wird (BAG-NUC), wurde die p29BAG1 cDNA über die Restriktionsstellen *EcoRI* und *XhoI* C-terminal von einer NLS (*nuclear localization signal*) in ein pcDNA3-Plasmid (Knee et al. 2001; Kermer, persönliche Klonierung) kloniert. Bei dem NLS handelt es sich um eine SV40-largeT-like NLS-Sequenz, die zuvor über die Restriktionsstellen *HindIII* und *EcoRI* in das pcDNA3-Plasmid kloniert wurde (Knee et al., 2001).

CSM14.1 Zellen, die stabil *Flag-markiertes* p29BAG1 aus der Maus unter der Kontrolle eines NSE-Promoters exprimieren (Kermer et al. 2002; Takayama et al. 1997) dienen als Positivkontrolle. Als Leerkontrolle verwendeten wir Leervektor-transfizierte CSM14.1-LUC Zellen (Kermer et al. 2002).

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass BAG1 in einer Zelle im Zellkern und im Zytoplasma vorkommt. Die Lokalisation hängt dabei von dem Entwicklungsstadium der Zelle und den jeweiligen Anforderungen der Umwelt an die Zelle ab. Während der Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen zu Neuronen wechselt BAG1 *in vivo* und *in vitro* von einer zuerst nukleären zu einer dann zytosolischen Lokalisation in der Zelle (Kermer et al. 2002). Um Aufschluss über die Bedeutung und die Konsequenzen dieses Zellkompartimentwechsels zu bekommen, wurden für die Versuche Zellen mit einem BAG1 mit einer NLS verwendet. Die Folge war, dass die Zellen, zusätzlich zu dem endogenen BAG1, ein BAG1-NUC exprimierten, welches ausschließlich im Zellkern vorkam. Mit Hilfe des BAG-NUC ist eine Beurteilung möglich, welche Auswirkungen die Lokalisation des BAG1 auf seine Funktionen in der Zelle hat.

Abb. 3/1: Plasmid-Konstrukt: der schwarzen Kasten stellt die N-terminal gelegene Ubiquitierungs-Domäne dar. Die C-terminal gelegene BAG-Domäne wird durch einen grauen Kasten dargestellt. Der gelbe Kasten bei dem BAG-NUC-Plasmid steht für die NLS. Im Gegensatz dazu steht der graue Kasten bei dem BAG-1-Plasmid für die N-terminale Markierung mit einem Flag-Epitop. Die schwarzen Zahlen stehen für die Aminosäuren.

Die Abbildung 3/1 zeigt das verwendete Plasmid-Konstrukt. Die N-terminal gelegene Ubiquitierungs-Domäne wird in dieser Abbildung durch einen schwarzen Kasten dargestellt. Die C-terminal gelegene BAG-Domäne durch einen grauen Kasten. Anders als das Plasmid des BAG-1, das mit einem Flag-Epitop markiert ist, ist das BAG-NUC-Plasmid nicht mit einem Epitop sondern mit einer NLS (gelber Kasten) versehen. Zur Selektion der BAG-1 positiven Zellen wurde zusätzlich das pBabePURO-Plasmid, welches ein Puromycinresistenzgen enthält, transfiziert (Kermer et al. 2002). Mit einem Epitop gekennzeichnete Plasmide können über einen spezifischen Antikörper gegen das betreffende Protein dargestellt werden, oder aber über einen Antikörper gegen das Epitop, wodurch dann eine Differenzierung zwischen dem endogenen und dem rekombinanten Protein möglich wird.

3.2. Expression von BAG1-NUC

Abbildung 3/1a zeigt die stabile Expression des p29BAG1-Proteins mit einer „nukleären Lokalisationssequenz“ (NLS) am N-Terminus (BAG-NUC) unter Kontrolle eines CMV-Promoters in zwei von drei ausgesuchten Klonen. Beide positiven Klone wurden für die unten dargestellten Experimente verwendet. Immunzytochemisch lässt sich die nukleäre Lokalisation von BAG-NUC in stabil transfizierten CSM-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (CSM-WT) bestätigen (Abb. 3/1b, A,B,D und E). Im Gegensatz zu dem BAG-NUC findet sich BAG1 in seiner ursprünglichen Form im Zellkern und im Zytosol (Abb. 3/1b, C; vgl. auch (Kermer et al. 2002)).

Abb. 3/1a: Western Blot: die stabile Expression des BAG-NUC wurde mit Hilfe der Western-Blot –Methode gesichert.

Spur 1: Negativkontrolle, Spuren 2-4: stabile Expression von BAG-NUC in drei verschiedenen Klonen. M: Marker, +: Positivkontrolle (normales BAG1 transient transfiziert in CSM-Zellen. Die Banden mit dem BAG-NUC Protein konnten ca. bei 39 kDa detektiert werden. Der Western Blot zeigt, bei gleicher geladener Proteinmenge (20 µg Protein von jedem zu untersuchenden Lysat), eine starke Proteinexpression in 2 und 3, diese Klone wurden für die weiteren Versuche verwendet.

Abb. 3/1b: Immunzytochemie: die nukleäre Lokalisation des BAG-NUC wurde durch diese Methode bestätigt. Diese Abb. zeigt, dass BAG-NUC nur im Zellkern exprimiert wird (A und B), im Vergleich zu den Kontrollzellen (D und E), zur Darstellung des Zellkerns wurde dieser mit einer Dapi-Färbung blau angefärbt (mikroskopische Vergrößerung: 630x). Im Gegensatz dazu zeigen die normalen BAG1-Zellen (C) eine sowohl nukleäre als auch zytosolische Expression bei 32°C (mikroskopische Vergrößerung: 200x).

3.3. Nukleäre BAG1-Expression vermindert Neuroprotektion

Um zu untersuchen, wie die stabile Expression von p29BAG1 im Zellkern (Abb.3/1b, A und B) die neuroprotektiven Eigenschaften von BAG1 beeinflusst, wurden CSM14.1-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Staurosporin (STS), einem Phospholipid-Kalzium abhängigen Breitspektrum-Kinaseinhibitor, welcher als Induktor des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosewegs gilt, behandelt (Chae et al. 2004).

Nach 24-48 Stunden überlebten 20-40% der CSM-WT-Zellen die Behandlung mit STS (Abb. 3/2a). BAG-NUC-Zellen zeigten dagegen im Vergleich kein verbessertes Zellüberleben. Die Zellen jedoch, die das normale -sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorkommende-p29BAG1 überexprimierten, zeigten eine signifikant verbesserte Neuroprotektion (Abb. 3/2a) ($p < 0,001$), ähnlich den Ergebnissen durch Serumentzug (vgl. auch Kermer et al. 2002).

Abb. 3/2a: Apoptoseinduktion mit unterschiedlichen Staurosporinkonzentrationen, BAG-NUC, BAG1 und CSM-WT-Zellen im Vergleich über 48 Stunden ($n=6$). Zellen mit einer Überexpression des normalen BAG1 zeigen eine signifikant höhere Überlebensrate, wohingegen die Kontrollzellen und die BAG-NUC-Zellen empfindlicher auf Staurosporin reagieren. Die drei Sternchen zeigen ein $p < 0,001$ an.

In einem weiteren Experiment wurden die Zellen mit Thapsigargin (TH), einem Inhibitor der CA^{2+} -ATPase des Endoplasmatischen Retikulums (Chae et al. 2004), behandelt. Nach 48 Stunden waren 30-60% der CSM-WT-Zellen apoptotisch, wohingegen p29BAG1-Zellen signifikant besser überlebten ($p < 0,001$). Die BAG-NUC-Zellen zeigten auch in diesem Fall, im Vergleich zu den CSM-WT-Zellen, keine bessere Protektion (Abb. 3/2b).

A

bb. 3/2b: Apoptoseinduktion mit unterschiedlichen Thapsigarginkonzentrationen, BAG-NUC, BAG1 und CSM-WT-Zellen im Vergleich für 48 Stunden ($n=6$; $p<0,001$). Auch hier zeigen die BAG1-Zellen deutlich bessere Überlebensraten als die Kontrollzellen und BAG-NUC. Die drei Sternchen bilden $p<0,001$ ab.

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass die BAG1-vermittelte Neuroprotektion von der subzellulären BAG1-Lokalisation abhängt. Um eine Neuroprotektion vermitteln zu können, muss BAG1 in das Zytosol übertreten, wo die Interaktion mit Hsp70 stattfinden kann (Liman et al. 2005).

3.4. Nukleäre BAG1-Expression vermindert die neuronale Differenzierung

Bei einem Temperaturwechsel von 32°C zu 39°C beginnen deutliche Veränderungen an den CSM-Zellen sichtbar zu werden (Kermer et al. 2002; Zhong et al. 1993). Sie werden größer, nehmen eine bipolare Form an und es wachsen Fortsätze aus. Im Gegensatz zu den Zellen, die das normale BAG1 überexprimieren, zeigen die BAG-NUC-Zellen weder bei einer Temperatur von 32°C noch bei 39°C morphologische Unterschiede zu den Kontrollzellen. Ähnlich der kleinen und runden Gestalt der Kontrollzellen zeigen sie vielmehr einen Phänotyp mit seltenem Ausbilden axon-ähnlicher Fortsätze, wohingegen die p29BAG1-Zellen lange Fortsätze ausbilden und sich untereinander sogar vernetzen (Abb. 3/3c2).

In Bezug auf die Proliferation und die Differenzierung der Zellen wurde die Generationszeit der Zellen ermittelt, die Länge der axon-ähnlichen Fortsätze vermessen und die NeuN-Expression untersucht.

Die p29BAG1-Zellen teilten sich im Durchschnitt alle 47 Stunden ($\pm 4,9$ Stunden) und damit deutlich langsamer als die Kontrollzellen (Abb. 3/3a; $p < 0,001$). BAG-NUC-Zellen zeigten mit einer Verdopplungszeit von 30 Stunden ($\pm 5,7$ Stunden) im Vergleich zu den Kontrollzellen bei 32°C , keinen signifikanten Unterschied (27 Stunden $\pm 3,4$ Stunden).

Abb. 3/3a: Generationszeit der Zelllinien im Vergleich. Die Generationszeit wurde bei 32°C und über einen Zeitraum von ca. einer Woche ($n=6$) ermittelt. Die durchschnittliche Generationszeit war bei den BAG1-Zellen signifikant höher als bei den BAG-NUC-Zellen und den Kontrollzellen. Die Sternchen stehen für $p < 0,001$.

Auch in der Länge der axon-ähnlichen Fortsätze ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen BAG-NUC- und CSM-WT-Zellen (BAG-NUC $80\ \mu\text{m}$ und CSM-WT $102,56\ \mu\text{m}$). Im Gegensatz dazu hatten die p29BAG1-Zellen signifikant längere Fortsätze entwickelt ($p < 0,001$) (Abb. 3/3b) und auch „axon-ähnlichen Netzwerke“ ausgebildet (siehe auch Abb. 3/3c2).

Abb. 3/3b: Messung der Axonlänge, Vergleich der verschiedenen Zelllinien (70 Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten vermessen). Hier zeigen sich signifikant längere Nervenzellfortsätze in den BAG1-Zellen als in den BAG-NUC- oder den Kontrollzellen. Die Sternchen symbolisieren $p < 0,001$.

Auch diese Ergebnisse legen nahe, dass BAG1 die neuronale Differenzierung von einer zytosolischen Lokalisation aus induziert.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die NeuN-Expression der Zellen untersucht. NeuN ist ein neuronales Protein und Marker für postmitotische Zellkerne. Es kennzeichnet daher die neuronale Differenzierung (Mullen et al. 1992; Wolf et al. 1996). Auch hier zeigte sich, dass die p29BAG1-Zellen deutlich schneller differenzieren als BAG-NUC- oder CSM-WT-Zellen. Nach 54 Tagen bei 39°C Kultivierungstemperatur war weder bei den NUC-Zellen noch bei den WT-Zellen ein Signal für NeuN zu detektieren. Im Gegensatz dazu zeigten fast alle p29BAG1-Zellen schon nach 21 Tagen ein positives Signal (Abb. 3/3c1 und 3/3c2).

Abb. 3/3c1: BAG-NUC und CSM-WT-Zellen, nach 21 Tagen ist bei beiden Zelllinien kein positives Signal für NeuN zu detektieren, mikroskopische Vergrößerung 400x.

Abb. 3/3c2: Die Morphologie der Zellen im Vergleich bei einem Temperaturwechsel von 32°C zu 39°C und Nachweis des NeuN Antigens. Nach 21 Tagen bei 39°C wird BAG1 v.a. im Zytoplasma gefunden (A und B), wie hier durch das Anfärben der Zellen mit Dapi (B) und mittels eines Antikörpers gegen BAG1 (A) gezeigt werden kann (die Pfeile zeigen auf leere Zellkerne). Im Gegensatz dazu zeigen die BAG-NUC-Zellen kein zytoplasmatisches Signal (F und G), auch hier erfolgte die Anfärbung des Zellkerns mit einer Dapi-Färbung (G). Die doppelte Anfärbung der Zellen am 8. Tag bei 39°C mit Tubulin und Dapi zeigt, dass die BAG1-Zellen deutliche „axonähnliche Nervenfortsätze“ ausgebildet haben (C), während dies bei den BAG-NUC Zellen nicht geschieht. Sie erscheinen rund und ohne die vernetzenden „axonähnliche Nervenfortsätze“ (H). Darüber hinaus wurden die Zellen auch mit einem Antikörper gegen NeuN und mit Dapi (D,E,I,J) angefärbt. Hier zeigen die BAG1-Zellen nach 21 Tagen ein deutliches Signal für NeuN in fast allen Zellen (D und E), die BAG-NUC-Zellen dagegen nicht (I und J).

Es wird angenommen, dass die neuronale Differenzierung über die Interaktion von BAG1 mit der Raf-1-Kinase vermittelt wird (Kermer et al. 2003; Liman et al. 2005). Daher untersuchten wir, ob BAG-NUC die Phosphorylierung von Erk1/2 induzieren kann.

Erk ist ein Protein, das durch die Raf-1-Kinase aktiviert wird und zur Raf-1-Kinase abhängigen Signaltransduktionskaskade gehört. Aktive Raf-1-Kinase phosphoryliert Erk, welches in seiner aktiven Form die Zelldifferenzierung stimuliert (Doong et al. 2002). Erk und Phospho-Erk können über einen Antikörper im Rahmen eines Western Blots dargestellt werden. Wie aufgrund unserer Ergebnisse zu erwarten war, zeigte sich bei 39°C eine verminderte Konzentration an phosphoryliertem Erk1/2 in den BAG-NUC-Zellen, verglichen mit den p29BAG1-Zellen (Abb.3/4). Hingegen unterschied sich die Konzentration von nicht-phosphoryliertem Erk und Hsp70 in den BAG-NUC-, p29BAG1- und WT-Zellen nicht (Abb. 3/4).

Abb. 3/4: Nachweis von phospho-Erk und Erk mit Hilfe der Western Blot Methode. In den BAG-NUC-Zellen zeigt sich bei 39°C eine Abnahme des phosphoryliertem Erk im Vergleich zu den BAG1-Zellen. Die Konzentration des Hsp70 bleibt dagegen bei allen Zelllinien unverändert. Tubulin diente als Ladekontrolle der Proteinmenge.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass die BAG1-Funktionen von seiner subzellulären Verteilung abhängig sind, wobei sowohl die neuronale Differenzierung als auch die Neuroprotektion offensichtlich über die Interaktion mit zytosolischen Bindungspartnern vermittelt wird.

Es ist bereits bekannt, dass BAG1 ein multifunktionelles Protein ist, das unter anderem neuroprotektive Eigenschaften aufweist und zudem als ein Regulator und Marker der neuronalen Differenzierung fungiert (Kermer et al. 2003; Kermer et al. 2002). Da BAG1 mit vielen anderen Proteinen interagieren kann, wird angenommen, dass seine unterschiedlichen Eigenschaften durch diese Interaktionen moduliert werden (Takayama und Reed 2001).

So konnte z.B. gezeigt werden, dass BAG1 über die Interaktion mit dem Proteasom den Abbau von mutiertem Huntingtin, dem ursächlichen Protein für die Huntington Erkrankung, beschleunigen kann. Andererseits kann es über eine Interaktion mit Siah1 („*seven in absentia homolog 1*“), einer E3-Ubiquitin-Proteinligase, auch die subzelluläre Verteilung von Huntingtin beeinflussen, welche als wichtig für die Krankheitsentstehung angesehen wird. Beides führt letztlich zu einer verminderten Toxizität und Aggregation von mutiertem Huntingtin, wobei dieser Effekt von einer intakten BAG-Domäne abhängig ist (Liman et al. 2010; Sroka et al. 2009).

In einer anderen Studie gelang der Nachweis, dass BAG1 durch seine Interaktion mit DJ-1, einem Protein, das als Mutante eine jugendliche, autosomal-rezessiv vererbte Form der Parkinson-Erkrankung verursacht, sowohl dessen Dimerisierung, seine Chaperonfunktion und protektiven Eigenschaften rekonstituiert (Deeg, et al., 2010).

Zudem ist bekannt, dass sich die intrazelluläre Verteilung von BAG1 (in Nervenzellen sich entwickelnder Säugetiere) von einer zuerst hauptsächlich nukleären, hin zu einem vorwiegend zytosolischen Expressionsmuster (mit Abschluss der neuronalen Differenzierung) verschiebt (Kermer et al. 2002). Dies wiederum legt die Annahme nahe, dass die subzelluläre Lokalisation von BAG1 die Bindung an die diversen Interaktionspartner limitiert und damit seine Funktion beeinflusst.

Um genauere Kenntnisse über die kompartiment-abhängigen Funktionen von BAG1 zu erlangen, wurde für die beschriebenen Experimente eine BAG1-Mutante (BAG-NUC) generiert, welche ausschließlich im Zellkern exprimiert wird; diese wurde mit Zellen mit dem normalen BAG1-Protein bzw. mit Kontrollzellen verglichen. Schwerpunkt der

Untersuchungen waren dabei das Zellüberleben sowie die neuronale Proliferation und Differenzierung.

Als Ausgangsmaterial dienten immortalisierte nigrostriatale Neurone der Ratte (CSM14.1-Zellen), die die jeweiligen Gene stabil überexprimierten. Die BAG-NUC-Zellen waren dabei mit einer NLS („*nuclear localization signal*“) verbunden. Damit ein Protein nukleär verbleibt wird es mit einer NLS gekoppelt. Eine NLS besteht aus einer oder zwei kurzen Aminosäure-Sequenzen, die meistens reich an den positiv geladenen Aminosäure-Resten Lys und Arg sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein strikt nukleär exprimiertes BAG1 nicht mehr neuroprotektiv wirken kann. Dies ist plausibel, da bereits bekannt ist, dass die neuroprotektiven Effekte von BAG1 durch eine verstärkte Aktivierung der *Chaperonmaschinerie* im Zytosol intakter Neurone vermittelt werden. Ist die Bindung zwischen BAG1 und Hsp70 zum Beispiel durch eine Mutation in der BAG-Domäne beeinträchtigt, geht auch der neuroprotektive Effekt verloren (Liman et al. 2005; Yenari et al. 1999). Passend dazu ist bekannt, dass hauptsächlich die kurzen BAG1-Isoformen, wie auch die hier verwendete p29BAG1-Isoform aus der Maus, die vorwiegend im Zytosol exprimiert werden, mit Hsp70 interagieren (Hohfeld und Jentsch 1997; Schmidt et al. 2003). Aktuelle Daten von Frebel et al. bestätigen, dass die Interaktion von BAG1 und Hsp70 keinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung hat (Frebel et al 2007).

Neben seinen neuroprotektiven Eigenschaften ist BAG1 auch ein Marker und ein essenzielles Protein für eine normale neuronale Differenzierung in vivo (Götz et al. 2005; Kermer et al. 2002). Wie von Kermer et al. bereits gezeigt, existiert während der neuronalen Entwicklung des ZNS in Mäusen ein stadienabhängiges BAG1-Expressionsmuster (Kermer et al. 2003). In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass BAG1 defiziente Mäuse zwischen dem Embryonaltag 12,5 und 13,5 in utero versterben und beträchtliche Alterationen in der neuronalen Schichtung im ZNS aufweisen (Götz et al. 2005).

Außerdem ist bekannt, dass BAG1 die Differenzierung von Tumorzellen erhöht, was eine generelle Rolle des BAG1 bei der zellulären Differenzierung nahe legt (Kermer et al. 2002; Kudoh et al. 2002; Matsuzawa et al. 1998; Song et al. 2001).

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die sogenannte Raf-1-Kinase eine wichtige Rolle im Rahmen der neuronalen Differenzierung und Protektion spielt (Morrison und Cutler 1997).

BAG1 interagiert mit Raf-1-Kinase und erhöht deren Aktivität über eine Region, die zum Teil mit der Hsp70-bindenden-Region überlappt (Wang et al. 1996). Raf-1-Kinase ist ein wichtiger Bestandteil der MAPK-Kaskade („*Ras-Raf-mitogen-activated protein-kinase*“), welche eine zentrale Rolle für die zelluläre Differenzierung während der Entwicklung spielt (Avruch et al. 2001). So verlangsamt sie die Proliferation und beschleunigt die Differenzierung in unterschiedlichen Zelllinien, beispielsweise neuronalen Stammzellen (Sippel und Chen 2002). Zudem kommt der MAPK-Kaskade auch im ausgereiften Nervensystem große Bedeutung zu. Hier moduliert sie die synaptische Plastizität und das Gedächtnis (Sweatt 2001). Auch Planchamp et al. zeigten, dass BAG1 die Raf-1-Kinase aktiviert und die Aktivierung von ERK eine Verbesserung der Regeneration von Neuronen und deren Wachstum bewirkt (Planchamp et al. 2008).

Die verminderte Phosphorylierung der Raf-1-Kinase und Erk1/2 als Teil des MAPK-Signaltransduktionsweges in den BAG-NUC-Zellen unterstützt die These, dass die Interaktion von BAG1 mit der Raf-1-Kinase im Zytosol stattfindet (Kermer et al. 2002). Dies wird weiter durch frühere Ergebnisse unterstützt, die zeigen, dass eine BAG1-Mutante (BAG Δ C), die durch eine Deletion des C-Terminus und damit Teilen der BAG-Domäne nicht mehr an Hsp70 binden kann, immer noch die neuronale Differenzierung induziert, auch wenn, oder gerade weil diese Mutante hauptsächlich im Zytosol zu finden ist (Liman et al. 2005). Andere Autoren vermuten, dass zusätzlich eine BAG1-Interaktion mit Raf-1 an der Oberfläche von Mitochondrien existiert (Götz et al. 2005; Wang et al. 1996).

Allerdings erfüllt BAG1 in verschiedenen Zellarten unterschiedliche Funktionen.

Eine Überexpression von BAG1 kann beispielsweise das von Wachstumsfaktoren unabhängige Wachstum von Interleukin-3-abhängigen lymphoidalen Vorläuferzellen zur Folge haben (Clevenger et al. 1997). Außerdem hemmt BAG1 epitheliale Tumorzellen in ihrem p53 vermittelten „Zellzyklus-Arrest“, indem es an das humane Homolog des „*Drosophila seven in absentia gen*“ (Siah), ein p53 induzierendes Gen, bindet (Matsuzawa et al. 1998). Interessanterweise konnte BAG1 bei einem Versuch an 293-HEK-Zellen (eine humane Nierenzelllinie), die Siah-1 überexprimierten, v.a. im Zellkern detektiert werden (Amson et al. 1996; Matsuzawa et al. 1998).

Insbesondere an Zellen aus dem ZNS gibt es übereinstimmende Daten, die eine Hemmung des Zellwachstums durch BAG1 sowohl neuronal in CSM14.1-Zellen (Kermer et al. 2002) als auch glial (Roth et al. 2000; Van Meir et al. 1994) beschreiben. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These, dass der Grund für die unterschiedlichen Effekte des BAG1 auf die

Zellproliferation durch die Lokalisation von BAG1 in der Zelle begründet ist (Kermer et al. 2002).

Weitere Einflussfaktoren sind das zelluläre Umfeld und das Stadium der Zelldifferenzierung (Nollen et al. 2000; Takayama et al. 1998). So ließ sich BAG1 in undifferenzierten CSM14.1-Zellen hauptsächlich im Zellkern finden; bei ausdifferenzierten Zellen dagegen detektiert man BAG1 vorwiegend im Zytosol. Dieser Lokalisationswechsel von BAG1 tritt in allen Teilen des Nervensystems auf (Kermer et al. 2002). Im Gegensatz dazu wird BAG1 in Epithelzellen und hämatopoetischen Zellen vornehmlich im Zytosol angetroffen (Clevenger et al. 1997; Takayama et al. 1998).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine streng nukleäre BAG1-Lokalisation sowohl die Effekte auf die Zelldifferenzierung als auch die Neuroprotektion aufhebt. Dies macht deutlich, wie bedeutsam die Veränderung des subzellulären Verteilungsmusters von BAG1 während der, bzw. für die neuronale Entwicklung ist.

Jedoch bleibt die Frage offen, welche Relevanz die nukleäre BAG1-Expression während der neuronalen Entwicklung besitzt. In diesem Zusammenhang zeigten ältere Untersuchungen eine Interaktion von BAG1 mit Steroidrezeptoren im Zellkern und legen damit nahe, dass BAG1 auch als ein Regulationsprotein der Transkription wirken kann, wenn es im Zellkern exprimiert wird (Froesch et al. 1998; Knee et al. 2001). Im Hinblick auf die nukleäre Expression in undifferenzierten Nervenzellen kann daher angenommen werden, dass BAG1 während der Entwicklung als Transkriptionsfaktor in Neuronen agiert. Verbunden mit einem Wechsel ins Zytosol im Verlauf, findet dann auch ein Wechsel seiner Funktionen hin zu einem Regulator der zellulären Differenzierung und des zellulären Überlebens im adulten zentralen Nervensystem statt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Deutsch

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte BAG1-Expression im Zellkern (BAG-NUC), verglichen zu Kontrollzellen und verglichen zu Zellen, die eine verstärkte Expression des normalen BAG1 aufweisen, zu einem Verlust der neuroprotektiven Eigenschaften des BAG1 führt. Auch zeigen die BAG-NUC-Zellen eine deutlich geringere Tendenz zur Differenzierung als die Vergleichszellen. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die zytosolische Lokalisation des BAG1 für die Interaktion mit Hsp70 und Raf-1-Kinase wichtig ist.

Damit ist die über BAG1 vermittelte Neuroprotektion und Zelldifferenzierung zum einen abhängig von der Interaktion von BAG1 mit Hsp70 bzw. Raf-1-Kinase und zum anderen abhängig von einer zytosolischen Lokalisation des BAG1. Nur so ist eine Interaktion des BAG-1 mit diesen Interaktionspartnern in der Zelle möglich.

Es ist daher von großer Bedeutung für die zellulären Abläufe, dass BAG1 während der embryonalen Entwicklung vom Zellkern in das Zytoplasma gelangen kann.

Zusammenfassend handelt es sich bei BAG1 durch seine vielen unterschiedlichen Interaktionspartner und seine damit verbundenen vielseitigen zellulären Aufgaben um ein hochinteressantes Protein für weitere Studien mit dem Ziel neuer therapeutischer Angriffspunkte auf zellulärer Ebene. Insbesondere hinsichtlich der BAG1-vermittelten Neuroprotektion und seiner Rolle bei zellulären Proliferations- und Differenzierungsvorgängen erscheinen weitere Untersuchungen vielversprechend. Auch mit Blick auf die, über BAG1 vermittelte Proteininteraktion und/oder Gentranskription, nicht nur in Neuronen, sind weitere Untersuchungen des BAG1 sicher sinnvoll. Interessante Ergebnisse könnte hier beispielsweise eine Transkriptom- und Proteomanalyse der verschiedenen BAG1-Formen liefern.

5.2. Englisch

BAG1 is a potent neuroprotectant as well as a marker of differentiation in neuronal cells. It is known that BAG1 mainly localises to the nucleus during neuronal development, whereas BAG1 shifts to the cytosol upon neuronal differentiation suggesting that distinct BAG1 functions depend on its subcellular localisation. Here, we show that forced BAG1 expression within the nucleus when compared to full-length BAG1 expression and to control cells completely abolishes the neuroprotective effects of BAG1 supporting the notion that cytosolic interaction with Hsp70 is mandatory for BAG1 mediated neuroprotection. At the same time, we observed that cells can no longer differentiate into post-mitotic neurons when BAG1 is only present in the nucleus. In addition, phospho-Erk levels are decreased in those cells indicating that BAG1 has to translocate to the cytosol for Raf-dependent MAPK activation.

6. Literaturverzeichnis

- Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, Le Gall I, Medhioub M, Linares-Cruz G, Lethrosne F, Pasturaud P, et al. (1996): "Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 3953-3957.
- Antoku K, Maser RS, Scully WJ, Jr., Delach SM Johnson DE (2001): "Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein." *Biochem Biophys Res Commun* 286(5): 1003-1010.
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D Zhang XF (2001): "Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade." *Recent Prog Horm Res* 56: 127-155.
- Bradford MM (1976): "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Campbell N. "Biologie", Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1997).
- Chae HJ, Kim HR, Xu C, Bailly-Maitre B, Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Cui J, Digicaylioglu M, Ke N, et al. (2004): "BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell* 15(3): 355-366.
- Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neupert W, Hallberg EM, Hallberg RL Horwich AL (1989): "Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria." *Nature* 337(6208): 620-625.
- Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP Dice JF (1989): "A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins." *Science* 246(4928): 382-385.
- Clevenger CV, Thickman K, Ngo W, Chang WP, Takayama S Reed JC (1997): "Role of Bag-1 in the survival and proliferation of the cytokine-dependent lymphocyte lines, Ba/F3 and Nb2." *Mol Endocrinol* 11(5): 608-618.
- Crocoll A, Blum M Cato AC (2000): "Isoform-specific expression of BAG-1 in mouse development." *Mech Dev* 91(1-2): 355-359.
- Deeg S, Gralle M, Sroka K, Bähr M, Wouters FS, Kermer P (2010): "BAG1 restores formation of functional DJ-1 L166P dimers and DJ-1 chaperone activity." *J Cell Biol.* 188(4):505-13.

- Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA Schekman R (1988): "A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides." *Nature* 332(6167): 800-805.
- Doong H, Vrailas A Kohn EC (2002): "What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins." *Cancer Lett* 188(1-2): 25-32.
- Frebel K, Wiese S, Funk N, Pühringer D, Sendtner M (2007): "Differential Modulation of Neurite Growth by the S- and the L-Forms of bag1, a Co-Chaperone of Hsp70." *Neurodegenerative Dis* 4: 261–269
- Froesch BA, Takayama S Reed JC (1998): "BAG-1L protein enhances androgen receptor function." *J Biol Chem* 273(19): 11660-11666.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST Ray J (1995): "Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25): 11879-11883.
- Götz R, Wiese S, Takayama S, Camarero GC, Rossoll W, Schweizer U, Troppmair J, Jablonka S, Holtmann B, Reed JC, et al. (2005): "Bag1 is essential for differentiation and survival of hematopoietic and neuronal cells." *Nat Neurosci* 8(9): 1169-1178.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC Nairn R (1977): "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Hohfeld J Jentsch S (1997): "GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1." *Embo J* 16(20): 6209-6216.
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N und Münster B. "Biochemie des Menschen Das Lehrbuch für das Medizinstudium", Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2002).
- Kermer P, Krajewska M, Zapata JM, Takayama S, Mai J, Krajewski S Reed JC (2002): "Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation." *Cell Death Differ* 9(4): 405-413.
- Kermer P, Digicaylioglu MH, Kaul M, Zapata JM, Krajewska M, Stenner-Liewen F, Takayama S, Krajewski S, Lipton SA Reed JC (2003): "BAG1 over-expression in brain protects against stroke." *Brain Pathol* 13(4): 495-506.
- Knee DA, Froesch BA, Nuber U, Takayama S Reed JC (2001): "Structure-function analysis of Bag1 proteins. Effects on androgen receptor transcriptional activity." *J Biol Chem* 276(16): 12718-12724.
- Kudoh M, Knee DA, Takayama S Reed JC (2002): "Bag1 proteins regulate growth and survival of ZR-75-1 human breast cancer cells." *Cancer Res* 62(6): 1904-1909.

- Liman J, Ganesan S, Dohm CP, Krajewski S, Reed JC, Bahr M, Wouters FS, Kermer P (2005): "Interaction of BAG1 and Hsp70 mediates neuroprotectivity and increases chaperone activity." *Mol Cell Biol* 25(9): 3715-3725.
- Liman J, Sroka K, Dohm CP, Deeg S, Bähr , Kermer P (2010): "Modulation of Huntingtin Toxicity by BAG1 is Dependent on an Intact BAG Domain" *Molecules* 15(10): 6678-6687.
- Lindquist S Craig EA (1988): "The heat-shock proteins." *Annu Rev Genet* 22: 631-677.
- Liu R, Takayama S, Zheng Y, Froesch B, Chen GQ, Zhang X, Reed JC Zhang XK (1998): "Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells." *J Biol Chem* 273(27): 16985-16992.
- Löffler PP. "Biochemie und Pathobiochemie", Springer-Verlag, Berlin (1998).
- Luders J, Demand J Hohfeld J (2000): "The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome." *J Biol Chem* 275(7): 4613-4617.
- Matsuzawa S, Takayama S, Froesch BA, Zapata JM Reed JC (1998): "p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1." *EMBO J* 17(10): 2736-2747.
- Morassutti DJ, Staines WA, Magnuson DS, Marshall KC McBurney MW (1994): "Murine embryonal carcinoma-derived neurons survive and mature following transplantation into adult rat striatum." *Neuroscience* 58(4): 753-763.
- Morrison DK Cutler RE (1997): "The complexity of Raf-1 regulation." *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 174-179.
- Mullen RJ, Buck CR Smith AM (1992): "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." *Development* 116(1): 201-211.
- Nollen EA, Brunsting JF, Song J, Kampinga HH Morimoto RI (2000): "Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity." *Mol Cell Biol* 20(3): 1083-1088.
- Packham G, Brimmell M Cleveland JL (1997): "Mammalian cells express two differently localized Bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation." *Biochem J* 328 (Pt 3): 807-813.
- Planchamp V, Bermel C, Tönges L, Ostendorf T, Kügler S, Reed JC, Kermer P, Bähr M, Lingor P (2008): "BAG1 promotes axonal outgrowth and regeneration in vivo via Raf-1 and reduction of ROCK activity. " *Brain*. 131(Pt 10):2606-19.

- Roth W, Grimmel C, Rieger L, Strik H, Takayama S, Krajewski S, Meyermann R, Dichgans J, Reed JC Weller M (2000): "Bag-1 and Bcl-2 gene transfer in malignant glioma: modulation of cell cycle regulation and apoptosis." *Brain Pathol* 10(2): 223-234.
- Sanger F, Nicklen S Coulson AR (1977): "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Schlesinger MJ (1990): "Heat shock proteins." *J Biol Chem* 265(21): 12111-12114.
- Schmidt U, Wozniak GM, Rosenhagen MC, Young JC, Hartl FU, Holsboer F Rein T (2003): "Essential role of the unusual DNA-binding motif of BAG-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* 278(7): 4926-4931.
- Sippel RS Chen H (2002): "Activation of the ras/raf-1 signal transduction pathway in carcinoid tumor cells results in morphologic transdifferentiation." *Surgery* 132(6): 1035-1039; discussion 1039.
- Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, Hohfeld J, Hartl FU Moarefi I (2001): "Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors." *Science* 291(5508): 1553-1557.
- Song J, Takeda M Morimoto RI (2001): "Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth." *Nat Cell Biol* 3(3): 276-282.
- Sroka K, Voigt A, Deeg S, Reed JC, Schulz JB, Bähr M, Kermer P (2009): " BAG1 modulates huntingtin toxicity, aggregation, degradation, and subcellular distribution. " *J Neurochem*. 111(3):801-7.
- Sweatt JD (2001): "The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory." *J Neurochem* 76(1): 1-10.
- Takayama S Reed JC (2001): "Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins." *Nat Cell Biol* 3(10): E237-241.
- Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA Reed JC (1995): "Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity." *Cell* 80(2): 279-284.
- Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI Reed JC (1997): "BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70." *EMBO J* 16(16): 4887-4896.
- Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, et al. (1998): "Expression and location of Hsp70/Hsc-binding

- anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines." *Cancer Res* 58(14): 3116-3131.
- Tissieres A, Mitchell HK Tracy UM (1974): "Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs." *J Mol Biol* 84(3): 389-398.
- Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, Brimmell M Packham G (2003): "BAG-1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway." *Cancer Res* 63(14): 4150-4157.
- Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, Brimmell M Packham G (2003): "BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival." *Biochim Biophys Acta* 1603(2): 83-98.
- Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, Li H, Diserens AC, Wojcik BE, Huang HJ, Friedmann T, de Tribolet N Cavenee WK (1994): "Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells." *Cancer Res* 54(3): 649-652.
- Wang HG, Takayama S, Rapp UR Reed JC (1996): "Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14): 7063-7068.
- Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD Blumcke I (1996): "NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology." *J Histochem Cytochem* 44(10): 1167-1171.
- Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, Dodson GG, Soneji Y, Aitken A Gamblin SJ (1995): "Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways." *Nature* 376(6536): 188-191.
- Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM Steinberg GK (1999): "The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70)." *Mol Med Today* 5(12): 525-531.
- Zeiner M Gehring U (1995): "A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25): 11465-11469.
- Zeiner M, Niyaz Y Gehring U (1999): "The hsp70-associating protein Hap46 binds to DNA and stimulates transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10194-10199.
- Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH Bredesen DE (1993): "bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(10): 4533-4537.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Jan Liman^{*, 1, 2}, Lena Faida^{*, 1, 2}, Christoph P. Dohm^{1, 2}, John C. Reed³, Mathias Bähr^{1, 2} and Pawel Kermer^{1, 2, **} : Subcellular distribution affects BAG1 function. Brain Research Volume 1198, 10 March 2008, Pages 21-26

¹Department of Neurology, University of Göttingen, Germany

²CMPB (DFG Research Center ‘Molecular Physiology of the Brain’)

³The Burnham Institute, La Jolla, California

* J.L. and L.F. contributed equally to this work

** Corresponding author

Poster:

L.Faida, J.Liman, CP.Dohm, M.Bähr and P.Kermer:

BAG1 function depends on its subcellular localisation. 31th Göttingen Neurobiology Conference, 7th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, den 29.03.-01.04.2007

Danksagung

Bedanken möchte ich mich gerne an dieser Stelle bei Prof. Dr. Mathias Bähr und bei Prof. Dr. Pawel Kermer für die freundliche Aufnahme in die Abteilung von Herrn Bähr und in die Arbeitsgruppe von Herrn Kermer und die Möglichkeit, Einblicke in die wissenschaftliche Forschung zu bekommen.

Insbesondere möchte ich mich herzlichst bei meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Pawel Kermer für das Bereitstellen des Themas meiner Dissertationsarbeit bedanken. Darüber hinaus aber auch ausdrücklich für die einzigartige und ausgezeichnete Betreuung, die Möglichkeiten der Publikationen und der Teilnahme an der *31th Göttingen Neurobiology Conference, 7th Meeting of the German Neuroscience Society*, in Göttingen, am 29.03.-01.04.2007.

Aber vor allem für seine Hilfestellungen bei der Bearbeitung des Themas und sein stets offenes Ohr für alle meine Fragen und Probleme und seine freundlichen und konstruktiven Gespräche.

Weiterhin danke ich auch auf das herzlichste Dr. Jan Liman für die hervorragende Betreuung und die Hilfe bei der praktischen und schriftlichen Bearbeitung des Themas. Für das unermüdliche Beantworten all meiner Fragen und die freundschaftliche Unterstützung über die gesamte Zeit hinweg.

Auch bedanken möchte ich mich nicht weniger herzlich bei Dr. Sandra Siedenbergh für die Einarbeitung in die Techniken der praktischen Laborarbeit und die stets freundliche und hilfsbereite Beratung während meiner gesamten Dissertation.

Ebenso schulde ich großen Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bähr, die mir nicht nur fachlich, sondern auch immer moralisch sehr freundlich, hilfsbereit und zuvorkommend zur Seite standen. Insbesondere zu erwähnen sind hier Dr. Christoph Dohm, Dr. Gunnar Dietz, Birgit Dietz und Beate Veith.

Darüber hinaus danke ich auch Prof. John C. Reed vom Burnham Institute in La Jolla, CA, USA.

Vielen Dank.