

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Die Rolle von Bag3 bei der Mechanosensation und Mechanoprotektion in Podozyten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Karim Heinlein
aus Köln

promoviert am 23.11.2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. B. Schermer
2. Gutachterin: Universitätsprofessor PhD C. M. Niessen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.¹

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten

Prof. Dr. Bernhard Schermer

Dr. Ingo Plagmann

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herr Prof Dr. Schermer und Herr Dr. Ingo Plagmann von mir selbst ausgeführt worden.

Die verwendete Mauslinie wurde im Labor Prof. Höhfeld in Bonn generiert. Die untersuchten Nieren wurden uns dankenswerter Weise von dort zur Verfügung gestellt. Die damit durchgeführten Experimente wurden von mir selbst ausgeführt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden massenspektrometrischen Datensätze wurde von mir generiert und durch Dr. Ingo Plagmann mittels MaxQuant und Perseus Software analysiert.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 14.04.2022

Unterschrift: *K. Heinlein*

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Thomas Benzing und Herrn Prof. Bernhard Schermer dafür, dass ich meine Doktorarbeit in ihrem Labor schreiben durfte. Ich habe während meiner einjährigen Zeit im *Nephrolab* viele neue, spannende Erkenntnisse und Erfahrungen gesammelt und war sehr glücklich, Teil dieses engagierten Teams gewesen zu sein.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. Ingo Plagmann für die Betreuung während meiner Zeit im Labor und auch für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt den vielen netten Biologen, Medizinerinnen und TAs, ohne deren Hilfe ich wahrscheinlich kein Experiment hätte fertig stellen können. Vielen Dank an Dr. Lena Ebert für die unendliche Geduld, die großartige Hilfe in technischen Fragen und für die vielen fachlichen Erklärungen. Sehr dankbar bin ich auch für die Hilfe von Dr. Julia Binz: Vielen Dank für deine Korrekturen und natürlich für die vielen guten Ratschläge, die du mir während der Entstehungsphase dieser Arbeit gegeben hast. Zudem möchte ich mich bei Dr. Martin Höhne, Dr. Claudia Dafinger, Lisa Seufert und Dr. Reza Esmailie für eure engagierte Hilfe bei technischen und biologischen Fragen bedanken. Eine große Hilfe bei der Beschreibung und Bewertung der Massenspektroskopie-Daten war zudem Dr. Katrin Bohl. Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Martyna Brütting aussprechen, für die technische Hilfe aber auch für die gemeinsam Kaffeepausen. Wo ich gerade bei Kaffeepause bin, möchte ich natürlich auch meinen Mitdoktoranden Jana, Robert, Alina und Bijan danken. Neben der Erfahrung wissenschaftlich zu arbeiten, war es auch auf freundschaftlicher Ebene ein sehr bereicherndes Jahr, das ich im *Nephrolab* verbringen durfte.

Zu guter Letzt geht ein sehr großer Dank noch an meine Familie. An meine Eltern, Geschwister und Großeltern sowie natürlich an Hannah. Ohne euch hätte ich nicht die Motivation gefunden, diese Arbeit durchzuführen und zu Ende zu bringen.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 ZUSAMMENFASSUNG	11
2 EINLEITUNG	12
2.1 Der Podozyt – eine mechanisch beanspruchte Zelle	12
2.2 Proteostase und die Rolle von (Co-) Chaperonen	15
2.3 Funktionen des Co-Chaperons BAG3	16
2.4 Aufbau und Expression von BAG3	18
2.5 Bekannte Interaktoren von BAG3	19
2.6 Funktion von BAG3 in der Niere	20
2.7 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	21
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Material	23
3.1.1 Antikörper	23
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	25
3.1.3 Puffer und Lösungen	27
3.1.4 Zelllinien	30
3.1.5 Plasmide	30
3.1.6 Primer	31
3.1.7 Kits und Assays	31
3.1.8 Verbrauchsmaterialien	32
3.1.9 Geräte	33
3.1.10 Software	35
3.1.11 Internetseiten	35
Methoden	36
3.1.12 Zellkultur	36
3.1.13 Transfektion mittels Kalziumphosphat Kopräzipitation	36
3.1.14 Ernten und Lysieren von Zellen	36

3.1.15	Immunpräzipitation	37
3.1.16	SDS-Page und Western-Blotting	38
3.1.17	Massenspektrometrie	39
3.1.18	Immunfluoreszenz	40
3.1.19	Agarose Gelelektrophorese	42
3.1.20	Klonierung	42
4	ERGEBNISSE	46
4.1	Etablierung der BAG3 Antikörper	46
4.1.1	Etablierung einer BAG3 IF <i>in vitro</i>	46
4.1.2	Etablierung eines BAG3 Immunoblots <i>in vitro</i>	47
4.2	Etablierung der BAG3 Co-IP	48
4.3	Kultivierte humane Podozyten exprimieren BAG3	51
4.4	Etablierung der BAG3 - IP in undifferenzierten humanen Podozyten	52
4.5	Das BAG3 Interaktom in differenzierten humanen Podozyten	53
4.6	BAG3 lokalisiert in podozytären und nicht-podozytären Zellen des Glomerulums	59
4.7	BAG3 Lokalisation in einem BAG3 ^{P209L} Überexpressionsmausmodell	62
5	DISKUSSION	64
5.1	Etablierung der BAG3-Antikörper	64
5.2	BAG3 Expression	66
5.3	Die BAG3 ^{P209L} Mutation: Eine potenzielle Ursache podozytärer Schädigungen	66
5.4	Das BAG3 Interaktom in differenzierten humanen Podozyten	68
5.4.1	Bewertung der Datenqualität	68
5.4.2	Diskussion bekannter und neuer Interaktoren	69
5.4.3	Fazit und Ausblick	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	ANHANG	76
7.1	Tabellen	76

7.2	Tabellenverzeichnis	82
7.3	Abbildungsverzeichnis	82
8	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	84
8.1	Kongressbeiträge	84

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
>/<	größer/kleiner
A.	Arteria
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
APS	Ammoniumpersulfat
BAG1	Bcl2-associated athanogen 1
	Massenspektrometrie
BAG3	Bcl2-associated athanogen 3
BAG3 Fusionsprotein	Humanes BAG3-6*His Fusionsprotein
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CASA	<i>chaperone assisted selective autophagy</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DIA	<i>Data-independent acquisition</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNM2	Dynamamin 2
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemo Luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales Bovines Serum
FBS	Fetal Bovine Serum
FDR	<i>False detection rate</i>
FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	glomeruläre Basalmembran
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HEBS	Hepes-gepufferte Salzlösung
HEK 293T	human embryonic kidney cells; menschliche embryonale Nierenzellen
HKA	Hauptkomponentenanalyse
Hsp70	Heat shock protein 70
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
KCl	Kaliumchlorid
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	lysogeny broth
LFQ	<i>label free quantitation</i>
mA	Milliampere
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgSO₄	Magnesiumsulfat Heptahydrat
MgSO₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Mililiter
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDS	Normal Donkey Serum
NUP35	Nucleoporin 35
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RhoA	Ras homolog family member A
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.h.	siehe
s.u.	siehe unten
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Sek	Sekunden

SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
sog.	sogenannt
SP3	Single-Pot Solid Phase enhanced Sample Preperation
SYNPO	Synaptopodin
SYNPO2	Synaptopodin 2
TAE Puffer	Tris-acetate-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
u.a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
V	Volt
WB	Western Blot
wt	wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Podozyten sind terminal differenzierte, postmitotische Zellen, deren Funktion und Überleben für die Aufrechterhaltung der renalen Filtrationsbarriere essentiell sind. Als postmitotische Zellen sind sie nur begrenzt regenerationsfähig, sehen sich aber – selbst unter physiologischen Bedingungen – durch den pulsatilem Blutdruck und die Filtration einer andauernden mechanischen Belastung ausgesetzt. Bislang unvollständig geklärt ist, wie es Podozyten gelingt, dieser mechanischen Belastung ein Leben lang stand zu halten und welche Adaptions-/ Reparaturmechanismen ihnen bei erhöhter Belastung zur Verfügung stehen. Ein potenzielles Schlüsselprotein für das Verständnis der podozytären Mechanobiologie ist das Co-Chaperon BCL2-associated athanogen 3 (BAG3). BAG3 und seine interagierenden Proteine konnten bereits in anderen Zellarten (z.B. Muskelzellen und Neuronen) als zentrale Bausteine der Mechanoprotektion gestresster postmitotischer Zellen identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Rolle des mechanoprotektiven Co-Chaperons BAG3 im Podozyten beleuchtet.

Zunächst wurden zwei unterschiedliche α -BAG3 Antikörper erfolgreich für Immunfluoreszenz, Immunoblot, Immunpräzipitation und Massenspektrometrie validiert. Dabei handelte es sich um ein polyklonales Antiserum aus Kaninchen und einen monoklonalen Maus Antikörper. Im Anschluss konnte die Expression von BAG3, sowohl in kultivierten Podozyten als auch in Podozyten *in vivo* nachgewiesen werden. BAG3 ist dabei vornehmlich im Zytosol, aber auch im Zellkern der Zellen zu finden. Im Glomerulum, der mikrovaskulären Filtrationseinheit der Niere, exprimieren neben Podozyten auch weitere Zellarten BAG3. BAG3 ist also nicht spezifisch im Podozyten vorhanden. Massenspektrometrische Untersuchungen in einer humanen Podozytenzelllinie gaben zudem Aufschluss über interagierende Proteine von BAG3 unter basalen Stressbedingungen. Unter den bereits bekannten Interaktoren waren insbesondere Hsc70 und HSPB8 interessant. Diese sind gemeinsam mit BAG3 über den Weg der *chaperone assisted selective autophagy* (CASA) an der Mechanoprotektion gestresster Zellen beteiligt. Zudem konnten weitere, bislang unbekannte Interaktoren von BAG3, wie die Enzyme RhoA und DNM2, identifiziert werden. Von diesen Enzymen ist bereits bekannt, dass sie wichtige Rollen bei der Aufrechterhaltung des Aktinzytoskeletts spielen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch Untersuchungen der Mutation BAG^{P209L} zudem erste Hinweise für eine Rolle von BAG3 in der Entstehung podozytärer Erkrankungen gefunden werden. Die gesammelten Daten deuten darauf hin, dass BAG3 eine Rolle in der Regulation des podozytären Aktinzytoskeletts spielen könnte. Die genauen Aufgaben des BAG3-Proteinkomplexes, sowie die Folgen einer BAG3 Mutation für die glomeruläre Physiologie und die Rolle von BAG3 als therapeutischem Target sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

2 Einleitung

2.1 Der Podozyt – eine mechanisch beanspruchte Zelle

Mehr als 200 Millionen Menschen weltweit leiden an chronischer Niereninsuffizienz. Insbesondere in Industrieländern ist die Prävalenz dieser im Alter gehäuft auftretenden Erkrankung hoch ¹. Dabei zählen Erkrankungen der mikrovaskulären Filtrationseinheiten, der sog. Glomeruli, zu den Hauptursachen für die Entstehung einer chronischen Niereninsuffizienz. Die Filtrationsbarriere im Glomerulus ist aus drei Schichten aufgebaut: einem fenestriertem Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten (Abbildung 1). Innerhalb des Nierenfilters spielen vor allem Podozyten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Krankheiten. Da Podozyten auf Grund ihrer postmitotischen Natur nur in geringem Maße in der Lage sind, sich selbst zu erneuern, ergibt sich eine begrenzte Regenerationskapazität des Nierenfilters ².

Podozyten haben eine hochkomplexe Zellstruktur, mit der sie die Kapillarschlingen von außen vollständig mit primären und interdigitierenden sekundären Fußfortsätzen umschließen. Zwischen den einzelnen sekundären Fußfortsätzen befindet sich ein ca. 40 nm breiter Filtrationsschlitz, über den hinweg die Zellen miteinander durch einen hoch-spezialisierten Zell-Zellkontakt, die Schlitzmembran, verbunden sind. Über Fokalkontakte haften die Fußfortsätze an der glomerulären Basalmembran (GBM). Eine weitere Besonderheit des Nierenfilters ist die Glykokalyx des Endothels. Diese ist negativ geladen, wodurch negativ geladene Moleküle abgestoßen werden und somit ihre Filtration verhindert wird. Die komplexe Architektur und die Ladung machen aus dem Nierenfilter ein hochselektives Sieb, welches Plasma und kleine Moleküle passieren lässt, Makromoleküle jedoch in der Blutbahn hält ³⁻⁷.

In physiologischem Zustand sorgt der Nierenfilter für die tägliche Filtration von 180 Litern eines nahezu proteinfreien Primärharns. Kommt es jedoch zu einer Schädigung des Nierenfilters – insbesondere der Podozyten – tritt vermehrt Eiweiß in den Urin über. Dieser Zustand wird Proteinurie genannt ⁸. Eine Ursache hierfür könnte eine zu hohe mechanische Belastung des Podozyten sein. Aufgrund seiner exponierten Lage an der Außenseite des Nierenfilters ist der Podozyt durch pulsatile Perfusion und Filtration besonders starken mechanischen Kräften ausgesetzt. Schon unter physiologischen Bedingungen besteht ein hydrostatischer Druckgradient von 40 mmHg über die GBM, welcher sich bei glomerulären Erkrankungen noch erhöhen kann. Diesem stehen der über die Länge der Kapillare ansteigende onkotische Druckgradient entgegen ⁹.

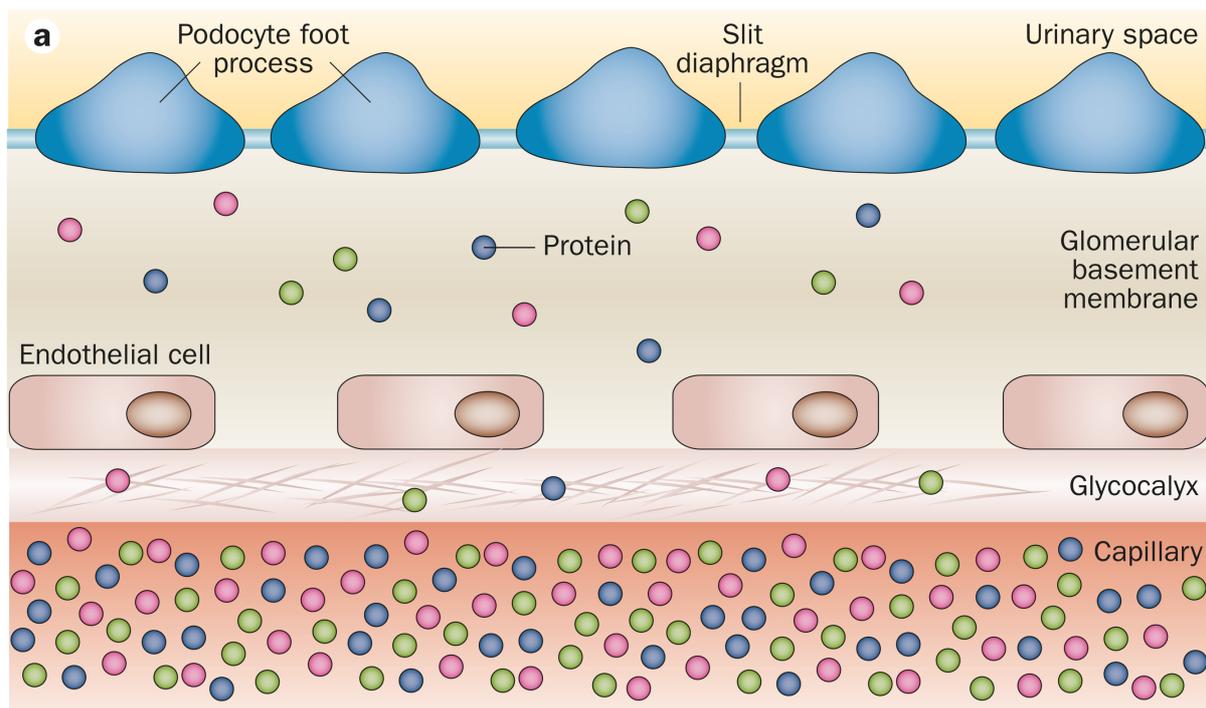


Abbildung 1: Aufbau des Nierenfilters

Schematische Darstellung des dreischichtigen Nierenfilters. Die Fußfortsätze der Podozyten (Podocyte foot process) befinden sich im Harnraum (Urinary space). Diese sind über die 40nm breite Schlitzmembran (Slit diaphragm) untereinander verbunden. In der Mitte befindet sich die GBM (Glomerular basement membrane). Die Endothelzellen (Endothelial cell) mit der negativ geladenen Glykocalyx bilden die Grenze zu den Kapillaren (Capillary). *Reprinted by permission from Springer Nature: [Nature Reviews Nephrology](#), Brinkkoetter, P. T., C. Ising and T. Benzing (2013). "The role of the podocyte in albumin filtration." (2013) ²*

Um diesem hohen mechanischen Druck ein Leben lang standhalten zu können, ist das Aktin-Myosin basierte Zytoskelett der Fußfortsätze fest mit seinen benachbarten Strukturen verankert ^{10,11}. Fokalkontakte und Schlitzmembran stellen dabei keine statischen, passiven, mechanischen Strukturen, sondern dynamische, anpassungsfähige Signalknotenpunkte dar ⁴. Vor allem die Schlitzmembran hat großen Einfluss auf die Adaptionenmechanismen des Podozyten bei mechanischem Stress. Sie vermittelt beispielsweise die Instandhaltung des Aktinzytoskeletts und ist an der Steuerung von Prozessen wie der Endozytose, der Transkription oder der Zellpolarität beteiligt ¹². Aufgrund dieser vielfältigen Aufgaben wird die Schlitzmembran auch als zentraler Signalknotenpunkt in der Mechanobiologie des Podozyten betrachtet ⁴. Sie besteht unter anderem aus dem Transmembranprotein Nephrin, welches den Abstand zwischen zwei Podozytenfortsätzen überbrückt, und einem mechanosensitiven Ionenkanal-Protein-Lipid Superkomplex. Dieser besteht u.a. aus Podocin, dem

mechanosensitiven Ca^{2+} -Kanal TRPC6 und Signal- Adaptor-Proteinen wie PI3-Kinase, Nck1/2 und Crk. Dieser Komplex ist über CD2AP und Filamin A am Zytoskelett der Fußfortsätze verankert. Wie wichtig die Schlitzmembran für die Integrität des Nierenfilters und der Podozyten ist, wird im Krankheitsfall deutlich. Mutationen in den oben genannten Proteinen führen nachweislich zu podozytärer Schädigung und stellen eine der Hauptursachen für genetische Formen der Proteinurie dar ^{4,12-14}.

Zwar konnten in den vergangenen Jahren Fortschritte im Bereich der Mechanobiologie des Podozyten erzielt werden, doch wie genau die Zelle auf mechanische Belastung reagiert, ist weiterhin nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist, dass es im Verlauf von glomerulären Erkrankungen zu einer Überbeanspruchung der podozytären Adaptionsmechanismen kommt. Die mechanische Belastung des Nierenfilters nimmt in Form von glomerulärer Hypertension, Hyperperfusion und Hyperfiltration zu. Die damit einhergehende weitere Erhöhung des mechanischen Stresses verursacht u.a. Schädigungen des podozytären Zytoskeletts.

Bei dem bislang unvollständig verstandenen sog. „*podocyte effacement*“ verändern die Podozyten ihre Struktur. Die Fußfortsätze werden breiter und die Filtrationsschlitze gehen verloren. Dabei kommt es zum Podozytenverlust. Dieser kann zunächst durch Hypertrophie der verbleibenden Zellen kompensiert werden, jedoch ist diese Reserve nicht sehr groß. Aufgrund der sehr begrenzten Regenerationsfähigkeit der Podozyten kann es daraufhin zu einer Vernarbung an einigen Stellen der Glomeruli kommen. Solche Veränderungen werden wegen des typischen, histologisch auftretenden, Musters als fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) bezeichnet. FSGS bedingt eine progrediente Nierenerkrankung, welche bis zur terminalen Niereninsuffizienz fortschreiten kann ¹⁵. Typischerweise treten Hyperperfusion und Hyperfiltration bei diabetischen und nicht-diabetischen Nephropathien spätestens als kompensatorischer Mechanismus bei reduzierter Nephronmasse auf ^{16,17}.

Für die Behandlung glomerulärer Erkrankungen wurden lange Zeit vornehmlich zwei Medikamentengruppen eingesetzt: ACE-Hemmer und Angiotensin-1-Rezeptorblocker. Diese Medikamente können das Fortschreiten der Nierenerkrankung verhindern oder zumindest verlangsamen. Beide hemmen die Angiotensin II bedingte Konstriktion des *Vas efferens* und entlasten damit das Glomerulum durch Senkung des intraglomerulären Drucks ^{18,19}. Dies ist besonders bei proteinurischen Patienten wichtig – also bei bereits vorgeschädigten Glomeruli/Podozyten ²⁰. Auf Grund der sehr guten Datenlage werden neuerdings zudem vermehrt Antidiabetika der Gruppe der SGLT2 Inhibitoren eingesetzt ²¹. Neben der antidiabetischen Wirkung zeigten diese Medikamente auch deutliche nephroprotektive Effekte ²². SGLT2 Inhibitoren bewirken über den juxtaglomerulären Feedbackmechanismus eine Reduktion der renalen Hyperfiltration und wirken dadurch mechanoprotektiv ²³.

Um glomeruläre Erkrankungen zukünftig noch zielgerichteter und frühzeitiger therapieren zu können, ist es jedoch notwendig, die Adaptionsprozesse des Podozyten bei mechanischer

Belastung besser zu verstehen. Dabei gibt es grundsätzliche Fragen zu klären: Wie nimmt der Podozyt beispielsweise mechanischen Stress wahr (Mechanosensation), welche Signalkaskaden löst der Stress aus (Mechanotransduktion) und letztlich: wie schützt sich die Zelle vor dieser Belastung (Mechanoprotektion)? Ebenfalls nicht ausreichend geklärt ist die Frage, wie die Erhöhung des mechanischen Stresses und der Verlust der Integrität der Schlitzmembran miteinander in Verbindung stehen.

Ein potenzielles Schlüsselprotein für das Verständnis der podozytären Mechanobiologie ist das Co-Chaperon BCL2-associated athanogen 3 (BAG3). BAG3 und seine interagierenden Proteine konnten bereits in anderen Zellarten (z.B. Muskelzellen und Neuronen) als zentrale Bausteine der Mechanoprotektion gestresster (postmitotischer) Zellen identifiziert werden^{24,25}. Jedoch ist über die Rolle von BAG3 in der Niere und insbesondere in Podozyten bislang wenig bekannt. Hinweise aus der Literatur und bislang unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe geben jedoch Anhaltspunkte für eine Rolle von BAG3 in der Mechanobiologie der Podozyten. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die Funktion von BAG3 im Podozyten eingehender untersucht werden.

2.2 Proteostase und die Rolle von (Co-) Chaperonen

Proteostase (Homöostase + Proteom) beschreibt die Balance zwischen Bildung, Nutzung, Aggregation und Abbau von Proteinen²⁶. Das richtige Gleichgewicht zwischen diesen Komponenten ist dabei entscheidend für die Funktionsfähigkeit einer Zelle. Kommt es zu Beeinträchtigungen dieses Gleichgewichts, z.B. durch internen oder externen Stress, kann dies fatale Auswirkungen haben. So kann es bei fehlerhafter Proteinfaltung zu einer Ablagerung/Aggregation funktionsloser oder toxischer Proteine kommen²⁷. Diese Aggregate stören die Zelle in der Ausführung ihrer physiologischen Abläufe, wie etwa bei Morbus Alzheimer, Chorea Huntington oder Diabetes Mellitus Typ 2²⁸.

Allerdings führt nicht jedes fehlgefaltete Protein automatisch zum Auftreten von Krankheiten. Im Gegenteil: Zellen sehen sich ständig mit fehlgefalteten Proteinen konfrontiert und nicht selten müssen sie auch erhöhten Stress, beispielsweise in Form von erhöhter mechanischer Belastung, aushalten. Dass es dabei nicht sofort zum Auftreten schwerwiegender Erkrankungen kommt, liegt an einer physiologischen Regulationsmaschinerie. Diese besteht u.a. aus Systemen der proteasomalen und lysosomalen Degradation, aus Chaperonen oder Co-Chaperonen, wie BAG3^{29,30}. Innerhalb dieser Proteostasemaschinerie übernehmen die Chaperone eine Schlüsselrolle.

Als Chaperone werden Proteine und andere Faktoren bezeichnet, welche unterstützend an der Faltung von Proteine beteiligt sind, ohne selbst Teil der finalen Proteinstruktur zu werden³¹. Diese Funktion ist überaus wichtig, da es insbesondere großen Proteine und Proteinen mit komplexen Strukturen nicht selbständig gelingt, ihre vorgesehene sekundäre oder tertiäre

Struktur einzunehmen. Zudem unterstützen Chaperone neusynthetisierte Proteinkomplexe bei der Zusammenlagerung und übernehmen Aufgaben in der Proteinsortierung ³². Aber auch nach Abschluss der Proteinsynthese bleiben Chaperone von Bedeutung, da Proteine weiterhin die Tendenz haben, sich zu „entfalten“ und zu aggregieren. Dies ist insbesondere bei erhöhtem zellulärem Stress der Fall, welcher beispielsweise beim Auftreten von Mutationen oder auch bei erhöhten Temperaturen auftritt. Unter diesen Bedingungen wird die Expression der sog. Hitzeschockproteine hochreguliert, wie z.B. das *heat shock protein 70* (Hsp70) ³³.

Erkennen Chaperone ein fehlgefaltetes oder beschädigtes Protein, gibt es zwei mögliche Prozesse, die in Gang gesetzt werden können. Wenn möglich erhalten Chaperone die vorgesehene Proteinstruktur aufrecht, indem sie die Fehlfaltung korrigieren. Ist dies jedoch nicht möglich, können sie den Abbau der Proteine (Proteolyse) einleiten. Dabei werden zwei Hauptwege der Proteolyse unterschieden: Das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) und das Autophagie-Lysosomen-System. Über das UPS werden vornehmlich einzelne Proteine degradiert, wohingegen über das Autophagie-Lysosomen-System große Proteinaggregate bis hin zu ganzen Organellen abgebaut werden können ^{34,35}.

Aber wie entscheiden Chaperone, ob ein Protein gefaltet, erhalten oder degradiert werden soll? Bei der Regulation von Chaperonen spielen Co-Chaperone wie BAG3 eine entscheidende Rolle. Sie erleichtern die Bindung eines Zielsubstrats an die Chaperone, rekrutieren Ubiquitinligasen und initiieren damit das UPS oder bewegen Substratproteine zu den Autophagosomen. Zusätzlich erfüllen Co-Chaperone für ihre jeweiligen Signalwege spezifische Aufgaben ^{36,37}.

2.3 Funktionen des Co-Chaperons BAG3

Das Co-Chaperon BCL2-associated athanogen 3 (BAG3) wurde im Jahre 1999 in einem yeast *two-hybrid* Screen in Hefezellen entdeckt ³⁸. Seine mechanoprotektiven Eigenschaften wurden seither insbesondere in der Muskulatur untersucht und lassen sich daher gut am Beispiel der quergestreiften Muskulatur illustrieren.

Unter mechanischem Stress leitet BAG3 eine selektive Form der Autophagie ein, die sog. *chaperone assisted selective autophagie* (CASA) ³⁶. BAG3 erkennt und bindet dabei durch mechanischen Stress entfaltetes Filamin. Filamin verleiht der Muskulatur durch Quervernetzung von Aktinfilamenten Stabilität. Physiologisch folgt nach Ende der mechanischen Belastung eine Rückfaltung von Filamin. Kommt es jedoch zur Schädigung des Substrats, greift der BAG3 Komplex ein und induziert den Abbau von Filamin über CASA. Dazu rekrutiert BAG3 einen Komplex, bestehend u.a. aus der Ubiquitin-Ligase CHIP und den Hitzeschockproteinen Hsp70 und HSPB8. Dieser Komplex induziert über Ubiquitinierung von Filamin und Interaktion mit Synaptopodin 2 (SYNPO2) die Bildung von Autophagosomen. Diese fusionieren schließlich mit Lysosomen, wodurch der gesamte Komplex, einschließlich

BAG3, degradiert wird ^{25,36}. Neben dem Abbau induziert BAG3 über die Beeinflussung verschiedener Signalwege (u.a. durch die Hippo-Signaling Effektoren YAP/TAZ und den mTOR Signalweg) auch die Neubildung von Filamin und der BAG3-Komplex-Komponenten ^{25,39}. BAG3 spielt auf diese Weise eine zentrale Rolle in der Proteostase von Filamin und damit der zellulären Integrität von Muskelzellen unter mechanischem Stress. 2015 konnten Ulbricht et. al. zeigen, dass CASA und BAG3 auch als physiologischer Adaptionsmechanismus bei erhöhter mechanischer Aktivität im Menschen fungiert ⁴⁰. BAG3 als zentraler Regulator der CASA spielt also eine wichtige Rolle in der Mechanoprotektion gesunder und gestresster postmitotischer Muskelzellen.

Wie wichtig BAG3 für den Erhalt der Proteostase von Muskelzellen ist, zeigt sich eindrücklich im Krankheitsfall. BAG3-Mutationen sind bekannte Auslöser einer myofibrillären Myopathie in der Adoleszenz. Bei dieser Erkrankung kommt es zu myofibrillärer Desintegration und Ausfällung von Protein-Aggregaten ⁴¹. Eine schwere Form der sog. „BAG3opathien“ wird durch eine Missense-Mutation an Position 209 (BAG3^{P209L}) im Exon 3 ausgelöst, wodurch die Base Prolin durch Leucin ersetzt wird. Diese Substitution erfolgt in einem der IPV Motive, an dem beispielsweise HSPB8 bindet (s.u.). Die dominant-negative Mutation BAG3^{P209L} führt zur Aggregation von dysfunktionalen BAG3-Komplexen und verursacht dadurch Muskeldystrophie und Kardiomyopathie im Jugendalter. BAG3^{P209L} bedingt eine früh beginnende Form der myofibrillären Myopathien mit progressivem Verlauf ⁴².

BAG3 und CASA konnten auch in anderen Zellarten als Mechanoprotektoren identifiziert werden. So konnte ihre Bedeutung bereits für glatte Muskelzellen und Immunzellen gezeigt werden ²⁵. Bemerkenswerterweise spielt BAG3 insbesondere in postmitotischen Zellen eine große Rolle. Dabei rückten, neben der Muskulatur, vermehrt differenzierte Neuronen in den Fokus der Forschung ²⁴. In Neuronen spielt BAG3 vor allem bei der Degradation der Proteine eine Rolle, die zu Aggregation tendieren und unter pathologischen Bedingungen neurodegenerative Erkrankungen auslösen können ^{43,44}. So ist BAG3 beispielsweise an der Degradation von endogenen Tau Proteinen bei erhöhtem Stress beteiligt. Auf diese Weise spielt BAG3 bei gesunden Menschen eine neuroprotektive Rolle, da eine Aggregation von Tau unter pathologischen Bedingungen v.a. bei der Alzheimer Demenz beobachtet wird. ^{45,46}. Zudem spielt BAG3 eine Rolle in der Biologie einiger Krebsarten, u.a in myeloischen und lymphatischen Leukämien, Neuroblastomen und dem Mammakarzinom. Dort wirkt es u.a. anti-apoptotisch, ist mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika assoziiert und geht häufig mit einer schlechteren Prognose einher ⁴⁷⁻⁴⁹.

Gemessen an der bereits bekannten Bedeutung für mechanisch beanspruchte und postmitotische Zellen ist es also durchaus vorstellbar, dass der BAG3-Komplex und CASA auch in anderen terminal differenzierten Zellen - wie Podozyten - eine Rolle im Erhalt der zellulären Proteostase spielen könnten.

2.4 Aufbau und Expression von BAG3

Bislang wurden zwei Isoformen von BAG3 beschrieben, eine ca. 80 kDa schwere Form, sowie eine bislang weniger gut charakterisierte, 40 kDa schwere Form^{50,51}. BAG3 verfügt über eine Vielzahl konservierter molekularer Bindungsdomänen (Abbildung 2). Über die C-terminale BAG3 Bindungsdomäne interagiert BAG3 mit Hsp/Hsc70, sowie mit dem Hitzeschockfaktor1 (HSF1)^{38,52}. N-terminal verfügt BAG3 über eine WW (Tryptophan – Tryptophan)- Domäne, über die es u.a. mit SYNPO2 und LATS1/2, der zentralen Kinase des Hippo Signalwegs, interagieren kann²⁵. Außerdem besitzt BAG3 zwei IPV (Isoleucin, Prolin, Valin) Regionen, welche sich N-terminal und in der Mitte des Proteins befinden. Über diese bindet es sich an kleine Hitzeschockproteine, wie HSPB8 (Hsp22) und HSPB6 (Hsp20)^{53,54}. Neben vielen weiteren Bindungsstellen ist noch die PxxP (Prolinreiche) - Domäne hervorzuheben, über welche BAG3 mit dem Motorprotein Dynein interagieren kann⁴⁴. Durch die zahlreichen Bindungsstellen und damit durch seine Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst BAG3 Apoptose, Zellproliferation, Zellentwicklung, Zellmotilität sowie die Proteinfaltung und Degradierung^{36,44,47,50,55}.

Unter physiologischen Bedingungen ist BAG3 größtenteils im Zytosol lokalisiert. Bei akutem Stress verändert es jedoch seine Lokalisation und BAG3 kann im Nukleus oder perinukleär in sogenannten Aggresomen gefunden werden. Aggresomen beschreiben (peri-)nukleäre Sammelpunkte für fehlgefaltete, aggregierte Proteine, die bei hohem zellulären Stress und Überlastung des UPS gebildet werden^{44,52,56}. Auch auf das Expressionslevel von BAG3 hat zellulärer Stress einen großen Einfluss. BAG3 wird insbesondere in Muskel- und Tumorzellen konstitutiv gebildet, findet sich auf niedrigerem Level aber auch in anderen Geweben wie der Niere⁵⁷. In mechanisch wenig beanspruchten Zellen ist die Konzentration des BAG3-Kompetitors *Bcl2-associated athanogen 1* (BAG1) allerdings deutlich höher. Die Proteolyse wird in diesen Zellen dementsprechend BAG1 vermittelt gesteuert, also über das UPS. Bei akutem Stress hingegen wird die Expression von BAG3 hochreguliert und BAG1 ist nur noch in niedrigeren Konzentrationen nachweisbar. Die Proteolyse wird unter pathologischen Bedingungen überwiegend über die BAG3 vermittelte selektive Autophagie (CASA) geregelt³⁶. Der sog. *BAG1 to BAG3 switch* ermöglicht es, die Proteolyse je nach Beanspruchung der Zelle zu modulieren und stellt einen Adaptionsmechanismus auf erhöhten Stress dar^{25,43}.

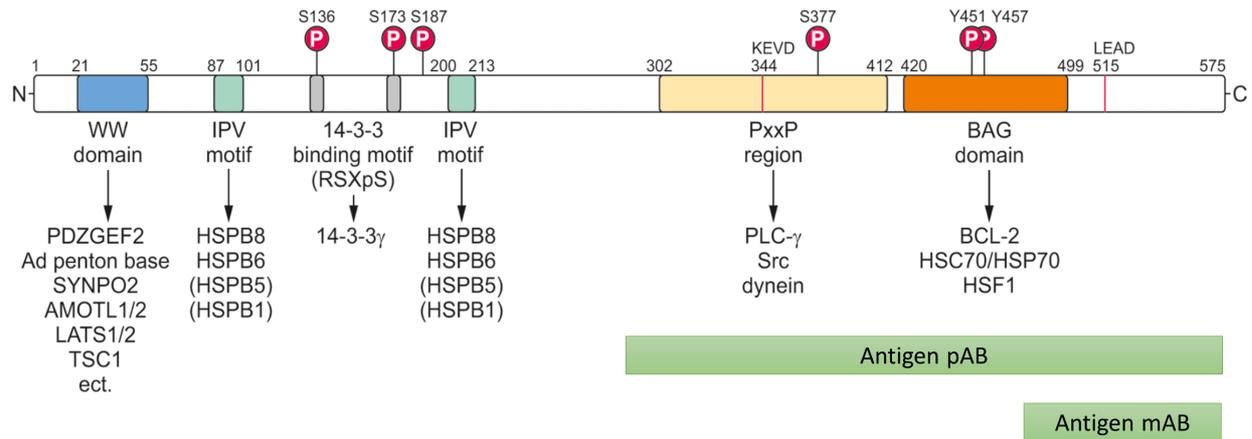


Abbildung 2: BAG3 Protein Aufbau

Domänenstruktur des BAG3 Proteins mit wichtigen bekannten Interaktoren und Bindungsstellen. Über die C-terminale Bindungsdomäne interagiert BAG3 mit Hsp/Hsc70 und HSF1. N-terminal verfügt BAG3 über eine WW (Tryptophan – Tryptophan) - Domäne, über die es u.a. mit SYNPO2 und LATS1/2 interagieren kann. Außerdem besitzt BAG3 zwei IPV (Isoleucin, Prolin, Valin) Regionen, über die BAG3 an kleine Hitzeschockproteine, wie HSPB8 (Hsp22) und HSPB6 (Hsp20) binden kann. Über die PxxP (Prolinreiche) - Domäne kann BAG3 u.a. mit dem Motorprotein Dynein interagieren.

Die grünen Boxen zeigen die Proteinbereiche, die zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten α BAG3 Antikörper verwendet wurden: ein polyklonales Kaninchen-Antiserum (Proteintech) und ein monoklonaler Maus-Antikörper (Santa Cruz).

Quelle: Stürmer, E. and C. Behl, *The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease*. *Front Mol Neurosci*, 2017. 10: p. 177. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00177 (CC BY 4.0)⁴⁷ bearbeitet von Karim Heinlein.

2.5 Bekannte Interaktoren von BAG3

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Interaktionspartner von BAG3 in Podozyten untersucht. Bereits bekannt ist, dass BAG3 in der *chaperone assisted selective autophagy* (CASA) mit einem Komplex bestehend aus dem Chaperon Hsp/Hsc70, dem Co-Chaperon CHIP und dem kleinen Hitzeschockprotein HSPB8 interagiert (Abbildung 3). Zusätzlich finden sich, je nach Zelle und Funktion, weitere Interaktoren⁵⁵.

Das Hauptchaperon des BAG3 Komplexes ist das Hitzeschockprotein 70. Es existieren zwei Isoformen dieses Chaperons. Dabei handelte es sich um eine 73 kDa schwere, konstitutiv exprimierte Form (Hsc70) und eine 72 kDa schwere, stress-induzierbare Form (Hsp70)⁵⁸. N-terminalen tragen diese Chaperone eine ATPase Domäne, die sog. *nucleotide binding domain* (NBD). C-terminal befindet sich die sog. *substrate binding domain* (SBD), über welche

ungefaltete Proteine gebunden werden können. Die Substratbindung wird über einen ATP Zyklus reguliert. Ist ATP an der NBD gebunden, kann Hsp70 entfaltete Proteine aufnehmen. Durch die anschließende Hydrolyse von ATP zu ADP wird eine stabile Bindung zwischen Substrat und Chaperon hergestellt. Nach Abschluss der Interaktion zwischen Substrat und Chaperon wird die Bindung wieder aufgelöst. Dazu werden sog. *nucleotide exchange factors* (NEF) benötigt. Diese Faktoren tauschen ADP wieder in ATP aus, wodurch das Substrat das Chaperon verlassen und das Chaperon wiederum neue Proteine binden kann. In dem hier beschriebenen Komplex wirkt BAG3 u.a. als NEF ⁴⁷.

Eine Schlüsselrolle im BAG3 Komplex übernimmt das Co-Chaperon *carboxy terminus of Hsc70- interacting protein* (CHIP). CHIP ist eine Hsp/Hsc70 assoziierte E3-Ubiquitinligase. CHIP bindet C-terminal an Hsc70/72 und initiiert dadurch die Degradation eines Substratproteins. Dieser Prozess wird über die Anheftung einer Ubiquitinkette an das Substratprotein vermittelt, welches so für die Proteolyse markiert wird ^{37,59}. Durch gleichzeitige Bindung an Hsc70 induziert BAG3 schließlich die CASA ³⁶.

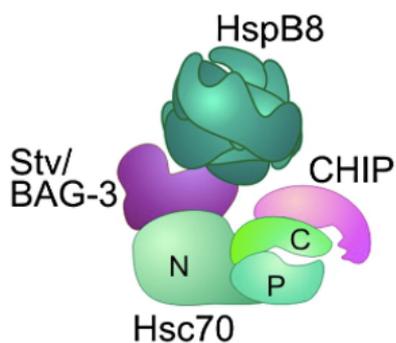


Abbildung 3: Aufbau des BAG3 Komplexes

Schematische Darstellung des BAG3 Komplexes in CASA. Das Co-Chaperon CHIP bindet an das C-terminale Ende (C) von Hsc/Hsp70. Gleichzeitig interagiert BAG3 über die BAG Domäne mit der N terminalen ATPase Region von Hsc/Hsp70 (N) und wirkt zudem als Verbindung zwischen HSPB8 und Hsc70. *Reprinted from Current Biology, 20, Arndt, V. et al, Chaperone-Assisted Selective Autophagy is essential for Muscle Maintenance, p. 143-148, 2010, with permission from Elsevier* ³⁶.

2.6 Funktion von BAG3 in der Niere

Die Funktion von BAG3 in der Niere ist bislang wenig untersucht worden. Erste Ergebnisse, die eine Rolle von BAG3 in der Niere nahelegen, wurden 2014 von Lim et al. publiziert. Dafür induzierten die Forscher eine diabetische Nephropathie in Mäusen. BAG3 haploinsuffiziente Mäuse zeigten eine höhere Albuminurie und eine raschere Progredienz der Nierenschädigung. Zudem konnte ein erhöhtes Level an oxidativem Stress beobachtet werden. BAG3 spielt also - in noch ungeklärter Form - eine Rolle in der Aufrechterhaltung der glomerulären

Filtrationsbarriere im Mausmodell ⁶⁰. Es wurde jedoch nicht eingehender untersucht, ob die erhöhte Krankheitsanfälligkeit direkt auf Podozyten oder auf andere glomeruläre Zellen, die Mikrozirkulation oder systemische Effekte zurückzuführen ist.

Bislang unveröffentlichte Daten unseres Labors gaben erstmals Hinweise für eine wichtige Rolle von BAG3 im Podozyten. Mittels Massenspektrometrie aus nativen Glomeruli konnte gezeigt werden, dass BAG3 sowie die BAG3-Komplex-Bestandteile CHIP und HSPB8 im Podozyten im Vergleich zu nicht podozytären Zellen mindestens zweifach angereichert sind. Passend dazu zeigten Venkatarreddy et. al. bereits 2011, dass Filamin A, als zentraler Bestandteil des BAG3-Komplexes, mit Nephrin interagiert ⁶¹. Über die Interaktion mit Nephrin könnte BAG3 mit der Schlitzmembran, dem zentralen Signalknotenpunkt des Nierenfilters, verbunden sein. Darüber hinaus ist das zweite Schlüsselprotein der Schlitzmembran, Podocin, mit C1QBP/p31 assoziiert und rekrutiert es in sog. „lipid rafts“ ⁶². C1QBP/p31 ist ein multifunktionelles Protein, welches ULK1, einen zentralen Autophagie Stimulator, stabilisiert ⁶³. Die Anwesenheit von C1QBP/ULK1 deutet darauf hin, dass Autophagie eine wichtige Rolle für die Proteostase des Podozyten spielen könnte.

Zusätzlich ergaben vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe erste Anhaltspunkte für eine Rolle von BAG3 in podozytären Erkrankungen. So konnten erste Hinweise auf einen spontanen glomerulären Phänotyp in transgenen Mäusen für die humane BAG3^{P209L}-Mutation gesammelt werden. Im Alter von 8 Wochen zeigten die Tiere eine leichte Proteinurie und glomeruläre Hypertrophie (unveröffentlichte Daten). Die genaue subzelluläre Lokalisation, Zusammensetzung und die Funktion des BAG3-Komplexes im Podozyten sind bisher jedoch nicht geklärt.

2.7 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die Filtration in der Niere erfolgt über die glomeruläre Filtrationsbarriere, die maßgeblich von Podozyten ausgebildet und erhalten wird. Über die Hälfte aller Nierenerkrankungen hat ihren Ausgangspunkt in Defekten dieses glomerulären Filters. Podozyten sind terminal differenzierte, postmitotische Zellen. Als solche sind sie nur begrenzt regenerationsfähig, sie sind aber einer andauernden mechanischen Belastung ausgesetzt ². Bislang unvollständig geklärt ist, wie es den Zellen gelingt, diesem Druck stand zu halten und welche Adaptions-/Reparaturmechanismen ihnen bei erhöhter mechanischer Belastung zur Verfügung stehen. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Rolle des mechanoprotektiven Co-Chaperons BAG3 im Podozyten besser zu verstehen. Im ersten Schritt wurden dazu zwei verschiedene α BAG3 Antikörper validiert. Im zweiten Schritt wurde die Expression von BAG3 im Podozyten *in vitro* und *in vivo* mittels Immunfluoreszenz und Immunoblot bestätigt. Im Anschluss sollte der Aufbau des BAG3 Proteinkomplexes in Podozyten *in vitro* erarbeitet werden. Dadurch sollte ein besseres Verständnis der Homeostase und der Schädigungsmechanismen der renalen

Filtrationsbarriere erzielt werden, welches im Hinblick auf künftige präventive und therapeutische Strategien von großer Bedeutung ist. Zudem sollte damit begonnen werden, die Folgen der Mutation BAG^{P2309L} in der Niere zu untersuchen, um die Auswirkungen einer Schädigung von BAG3 besser verstehen zu lernen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

3.1.1.1 Primäre Antikörper

Antigen	Wirt	Klonalität	Katalog-nummer	Hersteller	Verwendung / Verdünnung
β Tubulin	Kaninchen	Polyklonal	sc-9104	Santa Cruz	WB (1:1000)
BAG3	Kaninchen	Polyklonal	10599-1-AP	Proteintech	IF (1:300) WB (1:10.000) IP (3-5μg)
BAG3	Maus	Monoklonal	sc-136467	Santa Cruz	IF (1:50) WB (1:1000) IP(3-5μg)
CHIP	Kaninchen	Monoklonal	2080	Cell Signaling	WB (1:1000)
Flag	Kaninchen	Polyklonal	F7425	Sigma	IF (1:1000)
Flag	Maus	Monoklonal	F3165	Sigma	IF (1:1000) WB (1:10.000) IP (20-30μl M2 beads)
Hsc70	Maus	Monoklonal	sc-7298	Santa Cruz	WB (1:5000)
Hsp70/Hsp72	Maus	Monoklonal	ADI-SPA-810-D	Enzo Lifesciences	WB (1:1000) IP (1-5μg)
HSPB8	Kaninchen	Polyklonal	STJ24102	St. Johns Lab	WB (1:2000)
Nephrin	Meerschwein	Polyklonal	20R-NP002	Fitzgerald	IF (1:500)
Panactin	Kaninchen	Monoklonal	8456	Cell Signaling	WB (1:1000)
Podocin (H-130)	Kaninchen	Polyklonal	sc-21009	Santa Cruz	IP (3μg)
Wt1	Maus	Monoklonal	sc-7385	Santa Cruz	IF (1:200)

Tabelle 1: Primäre Antikörper

3.1.1.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirt	Klonalität	Markierung	Verdünnung	Prod. Nr.	Hersteller	Verwendung
---------	------	------------	------------	------------	-----------	------------	------------

Kaninchen-IgG	Ziege	Polyklo-nal	HRP	1:30.000	P044-8	Dako	WB
Maus-IgG	Ziege	Polyklo-nal	HRP	1:30.000	P044-7	Dako	WB
Maus-IgG Leichtketten	Ziege	Polyklo-nal	HRP	1:30.000	115-035-174	Jackson ImmunoRe-search	WB
Kaninchen-IgG Leichtketten spezifisch	Maus	Monoklo-nal	HRP	1:30.000	211-032-171	Jackson ImmunoRe-search	WB
Maus-IgG (H+L)	Esel	Polyklo-nal	Alexa Fluor® 488	1:500	715-545-150	Jackson ImmunoRe-search	IF
Kaninchen-IgG (H+L)	Esel	Polyklo-nal	DyLight-488	1:500	711-485-152	Jackson ImmunoRe-search	IF
Maus-IgG (H+L)	Esel	Polyklo-nal	Cy™3	1:500	715-165-150	Jackson ImmunoRe-search	IF
Kaninchen-IgG (H+L)	Esel	Polyklo-nal	Cy™3	1:500	711-165-152	Jackson ImmunoRe-search	IF
Maus-IgG (H+L)	Esel	Polyklo-nal	Cy™5	1:500	715-175-150	Jackson ImmunoRe-search	IF
Meer-schwein-IgG (H+L)	Ziege	Polyklo-nal	Alexa Fluor® 488	1:500	A-11073	Invitrogen	IF

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Katalognummer	Hersteller
Agarose	A9539	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	A1142	Applichem
Ampicillin (Amp)	K029.2	Roth
Bovines serum Albumin (BSA)	A9418-500G	Sigma
Bromphenolblau	A512	Roth
Complete Protease inhibitor cocktail tablets (PIM) + EDTA	11836145001	Roche
Coumarinsäure	C9008	Sigma
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) 100 mM	R0182	Thermo Fisher
DH10 B T1 Phage-Resistant E. coli	12331013	Thermo Fisher
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A3672,0100	Applichem
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	S9390	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	R0862	Thermo Fisher
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) plus Glutamax	31966-021	Gibco
Dynabeads Protein G 30 mg/ml	10003D	LifeTech
Eindeckmedium (Prolong Diamond Antifade +DAPI)	P36971	Invitrogen
Essigsäure	49199	Sigma
Ethanol ≥99.9 %	9065	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8.5	60-00-4	Sigma
Fetal Bovine Serum (FBS)	10270-106	Gibco
Formaldehyd 37 %	4979.1	Th. Geyer
GeneRuler 0,5kb DNA ladder	SM0372	Thermo Fisher
GeneRuler 1kb DNA ladder	SM0311	Thermo Fisher
Glycerol	2039.1000	Chemsolute
H ₂ O ₂ 30%	8070.2	Roth

Hefeextrakt	212750	Becton Dickinson
HEPES 1M	H0887	Sigma
Histomount	HS-103	National Diagnostics
IGEPAL	I8896	Sigma
Incuwater-Clean	A5219,0100	AppliChem
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	25-800-CR	Corning
Isopropanol	5752.3	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	P5655	Sigma
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	10035048	Merck
LB Medium	X964.1	Roth
Luminol 250 mM	09253	Sigma
Lysogeny Broth (LB) Agar	X965.1	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1058330250	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	P027	Roth
Methanol ≥99.9 %	4627	Roth
Mlul, 10 000 units/ml	R0198S	New England Biolabs
N,N,N',N'- tetramethylethylenediamin (TEMED)	2367.3	Roth
Natrium Acetat	6268	Merck
Natrium Pyruvat	S8636	Sigma
Natriumazid	K305.1	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma
Natriumdeoxycholat	D6750	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	T135	Roth
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	S6508	Sigma
NEB3.1 10x	B7203S	New England Biolabs
Normal Donkey Serum (NDS)	017-000-121	Jackson Immunoresearch
NotI, 10 000 units/ml	R0189S	New England Biolabs
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	26620	Thermo Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	A0999	AppliChem
Polyacrylamid	T802.1	Roth
RPMI-1640 Medium	R8758	Sigma
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	A2263,0500	AppliChem
T4 DNA Ligase, 400 000 units/ml	M0202S	New England Biolabs
T4-Ligase-Puffer	B0202S	New England Biolabs
Tissue-Tek optimum-cutting-temperature (O.C.T).	4583	Sakura
Tris (Base)	T1503	Sigma
Tris-HCl	9090.3	Roth
Triton X 100	A4975,1000	Appllichem
Trypsin-EDTA 0,05 %	25300096	Gibco
Trypton	1010817	MP Biomedicals
Tween -20	3472	Caesar und Lorentz
Xylol $\geq 98\%$	0371	Geyer
Zitronensäure	1818.1	Roth

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

3.1.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
1x Laemmli-Puffer	50 mM Tris 10 % (v/v) Glycerol 2 % (w/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 50 mM DTT
2x HEBS	50 mM HEPES 280 mM NaCl 10 mM KCl 5 mM Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 12 mM Dextrose 10xPBS In Aqua dest. pH 7,09

2x Laemmli-Puffer	100 mM Tris 20 % (v/v) Glycerol 4 % (w/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 100 mM DTT
5x Laemmli-Puffer	250 mM Tris 50% (v/v) Glycerol 10% (w/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 100 mM DTT
Blocking-Puffer	5% (v/v) NDS 0,1% (v/v) Triton X100 in 1 x PBS
ECL - Lösung A	100 mM TRIS, pH 8,5 2,5 mM Luminol 0,4 mM p-Cumarsäure
ECL - Lösung B	100 mM TRIS, pH 8,5 1,5 % (v/v) H ₂ O ₂
Färbung-Wasch-Puffer (PBS+)	1 mM CaCl 0.5 mM MgCl ₂ in 1 x PBS
Färbungs-Puffer (PBS-T)	0,1% (v/v) Triton X 100 In 1x PBS
Laufpuffer	192 mM (v/v) Glycin 0,1% (w/v) SDS 25 mM Tris Base
LB-Amp-Medium	20 g/l LB-Medium 0,1 g/l Ampizillin
LB-Amp-Platten	32 g/l LB-Agar 0,1 g/l Ampizillin
PBS-Tween	0,1% (v/v) Tween-20 In 1xPBS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10mM Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 2mM KH ₂ PO ₄
Protein- Waschpuffer	300 mM NaCl

	30 mM Tris 0,3% (v/v) Tween-20 pH 7,5
RIPA Minus Puffer	25mM Tris pH8 2mM EDTA 0,5% (v/v) Na-Deoxycholate 150mM NaCl 1% (v/v) IGEPAL 10% (v/v) Glycerol 2 mM Na ₃ VO ₄ 44 ug/ul PMSF 1Tbl/50ml Puffer PIM + EDTA
Sammelgel Western	5% (w/v) Polyacrylamid 0,2% (w/v) APS 0,2% (w/v) SDS 0,3% (v/v) TEMED 250 mM Tris pH 6,8
Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) -Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O
TAE-Puffer	10mM Essigsäure 0,0005% Ethidiumbromid 1mM EDTA 22mM Tris
Transferpuffer	188 mM Glycin 15,2% (v/v) Methanol 0,1% (w/v) SDS 25 mM Tris Base
Trenngel	10%/15% (v/v) Polyacrylamid 0,1% (w/v) APS 0,2% (w/v) SDS 0,15% (v/v) TEMED 750 mM Tris pH 8,8

Tris-acetate-EDTA	40 mM Tris (Base) 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8.5
Tris-EDTA Puffer	10 mM Tris Base 1 mM EDTA 0,0025%(v/v) Tween-20 pH 9,0
Zellkulturmedium HEK 293T	DMEM(1X) plus Glutamax FBS 10 % (v/v)
Zellkulturmedium humane Podozyten	RPMI-1640 Medium 10% (v/v) FBS 5% (v/v) ITS

Tabelle 4 Puffer und Lösungen

3.1.4 Zelllinien

Bezeichnung	Spezies	Ursprungsgewebe	Hersteller
HEK293T	Human	Embryonale Niere	Prof. Dr. B. Seed, Boston
humane Podozyten	Human	Niere	Prof. Dr. Moin Saleem, Bristol

Tabelle 5 Zelllinien

3.1.5 Plasmide

Name	Insert	Tag	Vektor	Herkunft
3xFLAG	GFP	3xFlag	pcDNA6	Nephrolab
F.BAG3	hBAG3	Flag	pcDNA6	Kloniert für diese Arbeit
F.BAG3 P209L	hBAG3 P209L	Flag	pcDNA6	Kloniert für diese Arbeit
F.Podocin	hPodocin	Flag	pcDNA6	Nephrolab
F9 GFP	GFP	F9	pcDNA6	Nephrolab
pcDNA3.1:BAG3	hBAG3	-	pcDNA3.1(+)	Prof. Höfeld (Bonn)
pcDNA3.1:BAG3 P209L	hBAG3 P209L	-	pcDNA3.1(+)	Prof. Höfeld (Bonn)
pCMV:BAG3	hBAG3	Flag	pCMV- Tag2B	Prof. Höfeld (Bonn)

pCMV:BAG3P209L	hBAG3 P209L	Flag	pCMV- Tag2B	Prof. Höfeld (Bonn)
----------------	----------------	------	----------------	---------------------

Tabelle 6 Plasmide

3.1.6 Primer

Zielsequenz	Bezeichnung	Primersequenz (5' -> 3') (Hersteller
hBAG3	hBAG3_mlu_fp	CCC GCG ACG ATG AGC GCC ACC CAC TC	IDT
hBAG3	hBAG3_not_rp	CGC GGG GCG GCC GCC TAC GGT GCT GCT GGG TTA C	IDT

Tabelle 7 Primer

3.1.7 Kits und Assays

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Anti-Flag Affinity Gel (M2 Beads)	B23102	Bimake
Humanes BAG3-6*His Fusionsprotein (BAG3 Fusionsprotein)	Ag17608	Proteintech
Bichinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA-Assay)	23227	Pierce TM
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4337455	Thermo Fisher
ECL Femto	34095	Thermo Fisher
GeneJET Gel Extraction Kit	K0691	Thermo Fisher
GeneJET PCR Purification Kit	K0702	Thermo Fisher
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	K0503	Thermo Fisher
Go Taq Flexi DNA Polymerase 5U/μl	M7808	Promega
NucleoBond® Xtra MidiPrep Kit	740410.10	Macherey-Nagel
Q5® High GC Enhancer	B9028A	New England Biolabs
Q5® Reaction Buffer Pack	B9027S	New England Biolabs
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaktions Mix	R2523	Sigma
Zenon Tricolor Rabbit IgG Labeling Kit	Z25360	Thermo Fisher

Tabelle 8: Kits und Assays

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Katalognummer	Hersteller
96-well Platte mit durchsichtigem Boden (BCA Assay)	655180	Greiner
Adhäsionsobjekträger	7695019	Geyer
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter 1000 µl, steril	70762211	Sarstedt
Blotting Papier	FT-2-521-580600 G	Sartorius
Deckgläser (rund, 18 mm Durchmesser) Nr. 1,5	CB00180RAC	Menzel
Deckgläser (rund, 18 mm, Nr. 1,5)	CB00180RAC	Menzel
Eppendorfreagenzgefäß (1,5ml)	224739	Sarstedt
Falcon 15ml	227261	Greiner
Falcon 50 ml	188271	Greiner
Gelkassetten 1mm	NC2010	Thermo Flsher
Hamilton Pipette 50 µl	705	Hamilton
Histosette (Paraffineinbettung)	M499/11	Simport
Nitril Einmalhandschuhe, Gr. L	3926	Abena
Objekträger	K123	Engelbrecht
PAP-Pen	L4197	Plano
Parafilm	163-9170002	Brand
PCR-Deckelkette, 8er Reihe	65989002	Sarstedt
PCR-Gefäß, 0,2ml, 8er Reihe	72985002	Sarstedt
Pipetboy	1550	Integra
Pipetten	P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson
PVDF-Membranen	IPVH00010	Millipore
Safe Lock Reagenzgefäß (1,5ml)	0030 123.328	Eppendorf
Stripetten 10ml	4101	Corning

Stripetten 25ml	4251	Corning
Stripetten 50ml	4501	Corning
Stripetten 5ml	4051	Corning
TipOne sterile Pipettenspitzen 10 µl	S1110-3810	Starlab
TipOne sterile Pipettenspitzen 1000 µl	S1111-6811	Starlab
TipOne sterile Pipettenspitzen 200 µl	S1111-1816	Starlab
TipOne Unsterile Pipettenspitzen 1000 µl	S1111-6700	Starlab
TipOne Unsterile Pipettenspitzen 200 µl	S1111-1700	Starlab
TipOne unsterile Pipettenspitzen 10 µl	S1110-3700	Starlab
Westernkamm (10 Laufschalen, 1mm)	NC3010	Thermo Fisher
Westernkamm (12 Laufschalen, 1 mm)	NC3012	Thermo Fisher
Zellkulturplatten 12 well	3513	Corning
Zellkulturplatten 6 well	3516	Corning
Zellkulturschalen 10 cm	430167	Corning
Zellschaber	3008	Corning

Tabelle 9 Verbrauchsmaterialien

3.1.9 Geräte

Gerätename	Katalognummer	Hersteller
Autoklave	V-150	Systec
Axiovert Mikroskop	200M	Zeiss
Block Thermostat	460-0350P	VWR
Confokales Mikroskop	LSM 710	Zeiss
DynaMag-2	12321D	Life Technologies
Elektrophorese-Netzteil	Z337447	Consort
Fusion Solo Chemiluminometer	60-FU-Solo	PeqLab
Hamilton Pipette (50 µl)	549-1155	VWR

Heraeus Megafuge	4 KR	Heraeus
Horizontales Gelelektrophoresesystem Größe L	40-1214	PeqLab
Horizontales Gelelektrophoresesystem Größe S	40-0708	PeqLab
Inkubator (Zellkultur)	MCO-20AIC	Sanyo
Kryostat	CM1850 UV	Leica
Mikrotom	RM2235	Leica
Minizentrifuge	521-2844	VWR
Mithras Multimode Plate Reader EnSpire (BCA)	2300-0000	Perkin Elmer
Multichannelpipette (8 Kanäle) 30 – 300 µl	613-0887	VWR
Nanodrop Spectrophotometer	1000	PeqLab
Optima MAX-XP Ultrazentrifuge	CTZ13G02	Beckman Coulter
PCR-Thermocycler	S1000	Bio-Rad
	PTC-1148	Bio-Rad
	PTC-200	MJ
Semi-Dry Elektroblotting System		PeqLab
Sterile Hood	Class 2 Mars B2	Scanlaf
Thermoschüttler	444-0823	Grant
Tischzentrifuge Mini Star Silverline	521-2844	VWR
Transfer PowerPac HC Netzteil	1645052	Bio-Rad
Überkopfschüttler	ELME10030	Elmi
Ultraschall Homogenisator Sonoplus	HD2070	Bandelin
Vakuumpumpe	181-0067DE	VWR
Vakuumpumpe (Zellkultur)	HETTBE_29004B	Hettich Benelux
Vertikales Gelelektrophoresesystem (XCell SureLock)	100601-1408	Invitrogen
Vortex Mixer	444-1372	VWR
Wasserbad	WNB 22	Memmert
Wasserbad (Paraffinschnittherstellung)	HI1210	Leica
XCell SureLock Elektrophoresesystem	100601-1408	Invitrogen
Zellkulturinkubator	Binder	BD115
Zentrifuge 5415 R	2262140-8	Eppendorf
Zentrifuge 5417R, Temperierbar	2262180-7	Eppendorf

Tabelle 10: Geräte

3.1.10 Software

Name	Hersteller
Benchling	Benchling Inc.
FusionCapt Advance	Vilber
MaxQuant	Max-Planck-Institut für Biochemie
Office 2016 for Mac	Microsoft
Perseus 1.6.7.0.	Max-Planck-Institut für Biochemie
ZEN Software 2009	Zeiss

Tabelle 11: Software

3.1.11 Internetseiten

Internetadresse	Verwendung
https://thebiogrid.org/	BAG3 Interaktomdatenset
http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/	Erstellung der Venn Diagramme

Methoden

3.1.12 Zellkultur

Für *in vitro* Experimente in dieser Arbeit wurden HEK 293T (humane embryonale Nierenzellen) und humane podozytäre Zellen (humane Podozyten) verwendet (Tabelle 5).

Proliferierende humane Podozyten wurden bei 33°C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Inkubator in 10cm Zellkulturschalen in RPMI-Medium mit 10% FBS und 1% ITS kultiviert. Zur Differenzierung wurden humane Podozyten bei einer Konfluenz von ~ 60% für 14 Tage (d) bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. HEK 293T Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ in DMEM-Medium mit 10% FBS kultiviert.

Zur Passagierung der Zelllinien wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 0,05% Trypsin für 2-3 Minuten (min) (HEK 293T) bzw. 5 min (humane Podozyten) im Brutschrank inkubiert, um die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschalen zu lösen. Nach Zugabe des vorgewärmten zellspezifischen Mediums wurden die Zellen vereinzelt und anschließend auf die benötigte Anzahl Zellkulturschalen im Verhältnis verteilt. Alternativ wurden die Zellen auf 6/12 well Platten mit Glasplättchen verteilt.

3.1.13 Transfektion mittels Kalziumphosphat Kopräzipitation

Mit Hilfe der Kalziumphosphat Kopräzipitation kann Plasmid-DNA vorübergehend in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Auf diese Weise wurden Zellen mit transienter Überexpression von BAG3 generiert. Diese wurden als Ausgangsmaterial für IP, Co-IP und IF verwendet. Hierzu wurde DNA an Kalziumphosphatkristalle gebunden und über Phagozytose in der eukaryotischen Zelle aufgenommen⁶⁴. Für die Transfektion wurden HEK293T-Zellen mit einer Konfluenz von ~70% verwendet. Für die Transfektion in Zellkulturschalen wurden zunächst 500 µl 0,25 M CaCl₂ mit 10 µg Plasmid-DNA in einem Eppendorfreagenzgefäß vermischt. Im Anschluss wurde unter vortexen tröpfchenweise 500 µl 2xHEBS hinzugegeben. Nach einmaligem resuspendieren wurde die Lösung auf der Zellkulturschale verteilt. Bei Transfektionen in 12 well Zellkulturschalen wurden 50 µl CaCl₂ und 50 µl 2xHEBS pro well verwendet. Als Transfektionskontrolle wurde jeweils ein GFP exprimierendes Plasmid verwendet (3.1.5). Nach 6-8 h im Inkubator wurde die Transfektion durch Wechsel des Zellmediums gestoppt. Am Folgetag wurde die Fluoreszenz der Kontrollschale überprüft.

3.1.14 Ernten und Lysieren von Zellen

Alle Schritte beim Ernten der Zellen erfolgten auf Eis und in vorgekühlten Zentrifugen. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit kaltem 1XPBS gewaschen. Anschließend

wurden die Zellen durch Resuspendieren oder unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Schale abgelöst, in Lösung gebracht und in einen Flacon übertragen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1000 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute, rpm*) für 5 min wurde das PBS abgesaugt, das Zellpellet erneut in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen. Das Eppendorf-Gefäß wurde für 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert der Überstand abgenommen und anschließend getrocknet. Das so entstandene Zellpellet wurde entweder zur längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C/-80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurde das Zellpellet für 10 min in Lämmli-Puffer bei 95°C aufgeköcht. Zur Lyse der Zellen, z.B. im Vorfeld einer Immunpräzipitation (IP), wurde das Zellpellet in 1 ml finalem Lysepuffer (RIPA Minus Puffer + 2 mM Na₃VO₄ +44 ug/ul PMSF +1Tbl/50 ml Puffer + *Complete Protease inhibitor cocktail tablets* (PIM) + EDTA) resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Im Anschluss daran wurden die Zellen bei einer Amplitude von 30% für 9 Sekunden (Sek) in einem Ultraschall Homogenisator (Bandelin) behandelt. Die Homogenisation diente dem Aufschluss der Zellmembranen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei 14000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und das Pellet (nicht verdaute Zellbestandteile) entweder in Lämmli-Puffer aufgeköcht oder verworfen. In einem Ultrazentrifugationsschritt (Optima MAX-XP Ultrazentrifuge, Beckman Coulter) von 45.000 rpm für 30-45 min wurden auch kleine, ungelöste Teilchen aus dem Lysat entfernt.

3.1.15 Immunpräzipitation

Bei einer Immunpräzipitation wird über einen spezifischen Antikörper ein Antigen aufkonzentriert. Auch interagierende Proteine des Zielproteins können mit Hilfe dieser Methode kopräzipitiert werden (Co-IP)⁶⁵.

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden bei 4°C und in vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt, um Proteaseaktivitäten zu reduzieren. Um die Proteinkonzentration zu erhöhen, wurden für die Etablierung der BAG3 Co-IP in HEK293T Zellen zunächst jeweils 4 Zellschalen, in undifferenzierten humanen Podozyten 5-8 Zellschalen miteinander vereinigt. Nach den oben beschriebenen Zentrifugationsschritten wurde daraufhin 950 µl des überstehenden Lysates abgenommen und für die IP verwendet. Es wurden zwei verschiedene Varianten der IP durchgeführt, welche sich in der Kopplung zwischen AB und Beads unterschieden.

In der ersten Variante wurden die Antikörper konsekutiv an Protein G Beads gebunden. Um möglichst viele unspezifische Bindungen an den Protein G Beads zu verhindern, wurde das Lysat im ersten Schritt für 1 Stunde (h) mit 30 µl Beads auf einem Überkopf-Schüttler vorbehandelt. Im Anschluss wurde das Lysat bei 14000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Beads verworfen. Von dem Überstand wurden 50-100 µl Lysat abgenommen und mit 2xLämmli+Dtt für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Dieses Lysat

diente (bei SDS-Page) als Ausgangslösung für die IP. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat wurde gegebenenfalls Material für ein BCA-Assay (Pierce TM) abgenommen.

Im zweiten Schritt wurden nun 750 µl des übrigen Lysates mit den jeweiligen Antikörpern für 1 h bis über Nacht (ü.N.) bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Für die Etablierung der BAG3 (Co-) IPs in HEK293T Zellen wurden dafür 3 µg der jeweiligen AB verwendet, für IPs mit undifferenzierten humanen Podozyten 5 µg. Nach der Bindung des AB an das Protein erfolgte im dritten Schritt die Kopplung zwischen AB und Beads. Dafür wurden 30 µl Protein G Beads zu der Lösung gegeben und für 1-2 h auf einem Überkopfschüttler inkubiert.

Als zweite Variante wurde eine FLAG-M2-IP durchgeführt. Hierbei wurden kommerziell erwerbliche M2 Beads verwendet, bei denen ein FLAG Antikörper bereits an Agarose Beads gebunden war. Dem Lysat wurden 20-30 µl M2-Beads hinzugefügt und für 1 h - ü.N. bei 4°C auf einen Überkopfschüttler inkubiert.

Beide IP-Varianten wurden im Anschluss identisch weiterbehandelt. Die Proben wurden bei 2000-4000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Protein-Bead-Komplexe in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads getrocknet. Anschließend wurde die Bindung von Beads und Antikörper durch Denaturierung gelöst. Wenn nicht anders angegeben, wurden die IPs durch konsequente Bindung an Protein G Beads durchgeführt.

3.1.16 SDS-Page und Western-Blotting

3.1.16.1 SDS Page

Ziel der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) ist es, Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Hierfür wurden die Lysate und die immunpräzipitierten Protein-Bead-Komplexe zunächst 1:1 mit 2x / 5x Lämmli-Puffer + DTT für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Das Detergens Natriumduodecylsulfat (SDS) im Lämmli-Puffer bedingt durch Auflösung der Tertiärstruktur eine bessere Löslichkeit der Proteine und gibt diesen eine negative Ladung. Durch die Zugabe des Reduktionsmittels Dithiotretiol (DTT, 50 mM finale Konzentration) wird die Auffaltung der Disulfidbrücken zwischen den Proteinen ermöglicht ⁶⁶. Während der Gelelektrophorese werden die nun denaturierten und negativ geladenen Proteine durch den angelegten Strom in Richtung der Anode gezogen. Auf Grund der Beschaffenheit des Gels werden die Proteine währenddessen nach ihrer Größe aufgeteilt ⁶⁷.

Abhängig von der erwarteten Größe des Proteins wurden 10% polyacrylamidhaltige Laufgele in eine Gelkassette gefüllt. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde die Sammelphase in die Kassette gefüllt. Nun wurden 10-30 µl der denaturierten Proteinproben in die Geltaschen geladen. Zunächst durchwanderten die Proteine das Sammelgel bei einer Spannung von 70 Volt (V) für 30 min. Im Anschluss folgte die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe bei

25 Milliampere (mA) für 1.30 – 2 h im Trenngel. Als Größenmarker wurden 3 μ l PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder geladen.

3.1.16.2 Western Blot und Immundetektion

Beim Western Blot (WB) / Immunoblot (IB) wurden im Anschluss an die Gelelektrophorese die Proteine dauerhaft vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Trägermembran im *Semidry* Transfervorgang übertragen⁶⁸. Nach Abtrennen des Sammelgels wurde das Trenngel für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Trägermembran wurde für eine Minute in Methanol aktiviert und nach einem Waschschrift in Transferpuffer auf ein befeuchtetes Trägerpapier gelegt. Nun wurde das Trenngel auf die PVDF-Trägermembran gelegt und mit einem zweiten Trägerpapier bedeckt. In einer Transferkammer wurde eine konstante Spannung von 12 V für 1 h angelegt und so die Proteine vom Gel dauerhaft auf die PVDF-Trägermembran übertragen. Im Anschluss wurden die freien Bindungsstellen der Trägermembran durch einstündiges Schwenken in 5% Bovinem Serum Albumin (BSA) blockiert. Nach drei Waschschriften in Protein-Wasch-Puffer wurden die Membranen für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C in Primärantikörpern inkubiert (Verdünnungen: Tabelle 1).

Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen und anschließend für 1 h in sekundärem Antikörper mit der Verdünnung 1:30.000 inkubiert (Tabelle 2). Nach einem letzten dreimaligen Waschschrift wurden die Membranen mit *Enhanced Chemo Luminescence* (ECL) Lösung benetzt und in einer Dunkelkammer (Fusion) entwickelt. Hiernach wurden die Membranen entweder direkt mit einem zweiten primären Antikörper inkubiert oder getrocknet und zu einem späteren Zeitpunkt erneut gefärbt. Die Antikörper wurden mit ihren entsprechenden Verdünnungen in Protein-Wasch-Puffer angesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für jeden IB ein eigenes Gel geladen. Die färbenden ABs der IBs wurden jeweils unter den Membranen in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

3.1.17 Massenspektrometrie

Um die Ergebnisse des IBs zu verifizieren und neue Interaktionspartner von BAG3 herauszuarbeiten, wurden massenspektrometrische Untersuchungen mit beiden α -BAG3 Antikörpern durchgeführt. Die Experimente wurden jeweils viermal wiederholt und mit beiden α -BAG3 Antikörpern durchgeführt. Als Negativkontrollen fungierten α -FLAG Antikörper, die hinsichtlich des Wirts und der Klonalität dem jeweiligen BAG3 AB entsprachen.

In der Massenspektrometrie (MS) werden Proteine zunächst ionisiert und ihrer Größe und Ladung entsprechend aufgeteilt. Danach kann die Häufigkeit und Masse der Teilchen bestimmt werden. Da alle Proteine der Probe analysiert werden, können so u.a. Funktionen und Interaktionspartner des untersuchten Proteins herausgearbeitet werden⁶⁹. Die Proben wurden entsprechend der *Single-Pot Solid Phase enhanced Sample Preparation* (SP3) Methode vorbereitet⁷⁰. Für die MS-Experimente wurden differenzierte humane Podozyten

verwendet. Für jede Probe wurden zu Beginn 8 Zellschalen vereinigt. Um die Vergleichbarkeit der BAG3 IPs und der Kontrollen zu gewährleisten, wurden diese parallel bearbeitet.

Die Proben wurden zunächst entsprechend Kapitel 3.1.15 behandelt. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurden die Protein-Bead-Komplexe in 70-100 μ l 5% SDS bei 95°C für 5 min erhitzt. Dadurch wurden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Beads und Antikörper gelöst und die Proteine denaturiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 14000 rpm für 3 min wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und die Beads verworfen. Zu den Proben wurden nun 5 mM Dithiothreitol (DTT) hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss daran wurde den Proben 20 mM Iodacetamid (IAA) hinzugefügt und für 45 min im Dunkeln alkyliert. Nach Zentrifugation mit 14000 rpm für 3 min wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurden die Proben im Anschluss an die *Proteomics Facility* des CECAD gegeben. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung wurden mit MaxQuant und Perseus ausgewertet. Die mittels MaxQuant errechneten *label free quantitation* (LFQ) -Intensitäten wurden weiter mit Hilfe von Perseus Version 1.6.7.0 ausgewertet^{71,72}. Dafür wurden die LFQ-Intensitäten zunächst logarithmiert (Zweierlogarithmus). Anschließend wurden die Ergebnisse für α -Bag3 (mAB) und α -FLAG mAB sowie α -BAG3 (pAB) und α -FLAG pAB getrennt ausgewertet. Dafür wurde jeweils für Gene gefiltert, die in mindestens einer der Bedingungen in allen vier Replikaten gemessen wurden. Anschließend wurden zur statistischen Auswertbarkeit fehlende Werte imputiert (Breite 0,3 Standardabweichung; *down shift* 1,8 Standardabweichung)⁷³. Das Ergebnis wurde in *Volcano Plots* mit einer *false detection rate* (FDR) von <0,01 und einer S0 von 0,3 visualisiert. Dabei wurden Gene, welche ausschließlich mit den BAG3-Antikörpern nachgewiesen wurden, blau hervorgehoben. Eine detaillierte Ergebnisliste mit allen Genen ist im Anhang zu finden (Tabelle 16 und Tabelle 17). Das Venn-Diagramm wurde mit Hilfe der Internetseite <https://bioinformatics.psb.ugent.be/> generiert.

3.1.18 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz (IF) binden Primärantikörper spezifisch an die Epitope von Proteinen. Durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wird das Protein sichtbar gemacht. Es wurden drei verschiedene Varianten der IF angewandt (s.u.). Diese unterscheiden sich anhand des Gewebes und der Vorbehandlung. Die Durchführung der IF im Anschluss an die Fixierung wurde jedoch bei allen Verfahren identisch durchgeführt.

Um unspezifische Bindungen der primären Antikörper zu minimieren, wurden die Proben für 1-2 h mit Blocking-Puffer (PBS mit 5% *Normal Donkey Serum* (NDS) und 0,1% Triton X100/0,1% Tween-20) benetzt. Nach einem Waschschrift wurde der Primärantikörper für 1-2 h bei RT oder bei 4°C ü.N. auf die Probe gegeben (Verdünnungen s.h. Tabelle 1: Primäre

Antikörper). Gegebenenfalls wurde eine Co-Färbung mit einem weiteren Primären Antikörper durchgeführt. Für die Negativkontrolle der Färbungen wurde der Primärantikörper ausgelassen. Auf diese Weise konnten unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers aufgezeigt werden. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben für 1-2 h mit sekundärem Antikörper inkubiert (Verdünnungen s.h. Tabelle 2). Im Anschluss wurden die Proben zunächst gewaschen und schließlich mit 10 µl Eindeckmedium (*Prolong Diamond Antifade*) beschichtet und so auf einem Deckglas bzw. auf einem Objektträger fixiert. Zur Darstellung der Zellkerne enthält das Eindeckmedium 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die Antikörper wurden mit ihren entsprechenden Verdünnungen in PBS-Tween bzw. PBS-Triton angesetzt. Die Proben wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert Mikroskop, Zeiss) angeschaut und ausgewertet. Einzelne Kanäle wurden in den Abbildungen in Graustufen gezeigt, Signalüberlagerungen hingegen wurden farbig dargestellt. Der Maßstab beträgt, wenn nicht anders angegeben, 20µm. Die Fotos wurden unter einem 63x Objektiv geschossen.

3.1.18.1 IF auf Kryoschnitten

Die Mäuse wurden durch kardiale Perfusion mit 1xPBS unter tiefer Narkose getötet. Daraufhin wurden die Nieren aus der Maus entnommen, zur Fixierung in O.C.T Lösung eingebettet und bei -80° gelagert. Am Kryostaten (Leica) wurden die Blöcke bei -20°C auf eine Dicke von 5-8 µm geschnitten und auf einen adhäsiven Objektträger gelegt. Die Schnitte wurden für 1 h bei RT getrocknet. Um die Schnitte zu fixieren, wurden sie für 15 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA) benetzt und anschließend dreimal für 5 min mit PBS+ (PBS mit 1 mM MgCl₂ und 0,1 mM CaCl₂) gewaschen. Zur Verdünnung der Antikörper und des Normal Donkey Serums (NDS) wurde PBS-Triton (PBS+ mit 0,1% Triton X-100) verwendet.

3.1.18.2 IF auf Paraffinschnitten

Die Mäuse wurden durch kardiale Perfusion mit 1xPBS unter tiefer Narkose getötet, die Nieren entnommen, im Anschluss ü.N. in Formalin eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die anschließende Entwässerung der Blöcke erfolgte in der Pathologie der Uniklinik Köln. Die Paraffinblöcke wurden am Microtom (Leica) auf eine Dicke von 2 µm geschnitten, auf Objektträger gelegt und anschließend bei 60°C für 1 h in einem Brutschrank getrocknet. Zur Weiterverarbeitung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Hierfür wurden die Schnitte nacheinander je dreimal für 5 min in Xylol, 100%, 96% Ethanol und einmal für 2 min in 70% Ethanol gestellt. Nach einem 7,5 min Waschriff in PBS-Tween wurde mit der Antigen-Demaskierung fortgefahren. Die Schnitte wurden zu diesem Zweck für 10 min in Tris-EDTA pH9 bei 110°C in einem Kochtopf erhitzt. Daraufhin wurden die Schnitte erst für 5 min in ddH₂O und anschließend für 10 min in PBS-Tween gewaschen. Bei Paraffinschnitten wurde PBS-Tween (PBS mit 0,1% Tween-20) als Wasch- und Färbungs-Puffer genutzt.

Eine leichte Abwandlung des Färbeprotokolls wurde für die Negativkontrolle des α -BAG3 (pAB) vorgenommen. Der AB wurde mit dem BAG3 *Fusions Protein* vor Beginn der IF in einem molaren Verhältnis von 1:160 für 2 h bei RT in einem Thermoschüttler (300 rpm) präinkubiert. Der weitere Ablauf erfolgte wie oben beschrieben.

3.1.18.3 IF in Zellkultur

Für die *in vitro* Untersuchung durch IF wurden Zellen in 12 well Zellkulturschalen unter sterilen Bedingungen auf Deckgläsern ausgesät. Je nach Zellart wurden sie für 1-14 d in einem Brutschrank kultiviert. Das Zellmedium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 15 min in 4% PFA fixiert und dreimal für 5 min in PBS+ gewaschen.

3.1.19 Agarose Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend getrennt. Da DNA negativ geladen ist, bewegen sich die Fragmente in Richtung der Anode. Je nach erwarteter Länge der DNA-Abschnitte wurden die Proben auf 1% bzw. 2% Agarosegele geladen. Als Marker wurde 0,5 kb bzw. 1 kb *GeneRuler DNA Ladder* geladen. Spannung und Laufzeit der Gele variierte je nach Gelgröße. Im Anschluss wurden die Gele unter UV-Licht entwickelt. Das UV-Licht reagiert mit Ethidiumbromid, welches sowohl in den Gelen als auch im Laufpuffer enthalten ist und so an die DNA binden kann. Auf diese Weise werden die DNA Abschnitte sichtbar gemacht.

3.1.20 Klonierung

3.1.20.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird verwendet, um spezifische Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNS) zu amplifizieren⁷⁴. Im ersten Schritt der Klonierung wurde die PCR genutzt, um die proteinkodierende cDNA des Plasmids zu vervielfältigen. Diese wird im Folgenden als *insert* bezeichnet.

Die PCR wurde entsprechend des Standardprotokolls des *Q5® Polymerase Kits* (New England Biolabs) durchgeführt. Das PCR Produkt wurde mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt. Die aufgetrennte cDNA wurde im nächsten Schritt entsprechend des Standardprotokolls des *GenJet Purifikation Kits* (Thermo Fisher) aufgereinigt.

3.1.20.2 Restriktionsverdau

Die aufgereinigte cDNA des *inserts* und der ausgewählte Vektor wurden nun einer Restriktionsverdau unterzogen. Durch den Restriktionsverdau ist es möglich, *insert* und Vektor eines Plasmids zu trennen und so eine Klonierung des *inserts* in einen neuen Vektor zu ermöglichen. Dabei war es von entscheidender Bedeutung, dass sowohl das *insert* als auch der Vektor mit denselben Restriktionsenzymen aus ihren ursprünglichen Plasmiden

herausgeschnitten wurden. Die so entstandenen komplementären „*stick ends*“ konnten in der anschließende Ligation miteinander verbunden werden (3.1.20.3).

Die Proben wurden im Anschluss an den Verdau auf ein Agarosegel geladen. Entsprachen die Banden den erwarteten Größen, wurde die DNA unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des *GenJet Gel Extraction Kits* (ThermoFisher) aufgereinigt.

Erfolgte ein Restriktionsverdau eines gesamten Plasmids, wurde dieser nach dem Schema „Analytischer Verdau“ durchgeführt. Bei Restriktionsverdau eines bereits durch PCR amplifizierten *inserts* wurde nach dem Schema „PCR-Verdau“ pipetiert.

Inhalte	Analytischer Verdau	PCR-Verdau
DNA	500 ng	52µl PCR Produkt
Puffer (NEB 3.1)	3 µl	6 µl
Enzym1 (MluI)	0,3 -0,5 µl	1µl
Enzym2 (NotI)	0,3 µl – 0,5 µl	1µl
+ ddH ₂ O	Ad 30 µl	-

Tabelle 12 Pipettiertabelle Restriktionsverdau

3.1.20.3 Ligation

In der anschließenden Ligation wurden die beiden „*sticky ends*“ des Vektors und des *inserts* miteinander verbunden. Diese Reaktion wurde durch die T4 DNA Ligase katalysiert ⁷⁵. Die Ansätze wurden für 2h bei RT inkubiert und anschließend beide transformiert. Um die Reaktion zu überprüfen, wurde zeitgleich eine Kontrolle ohne *insert* durchgeführt.

Inhalte	Volumen (Ligation)	Volume (Kontrolle)
Vektor	2 µl	2 µl
T4 Ligase Puffer	4,2 µl	4,2 µl
T4 DNA Ligase	0,8 µl	0,8 µl
Insert	6µl	-
ddH ₂ O	7 µl	13 µl

Tabelle 13 Pipettiertabelle Ligation

3.1.20.4 Transformation und Amplifikation

Mit Hilfe der Transformation wurden Plasmide in Bakterien (re-)amplifiziert. Unter einer Transformation versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in prokaryotische Zellen. Als Bakterien wurden chemokompetente Escheria Coli Bakterien des Stamms DH-10 (DH-10) verwendet. Um die Plasmide in die DH-10 Bakterien einzubringen, wurde eine sog.

Hitzereaktion durchgeführt. Dafür wurden 50 µl der Bakterien mit 5 µl der Ligation vermischt, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 42°C für 45 sek in ein Wasserbad inkubiert. Daraufhin wurden 350 µl eines bakteriellen Nährmediums (SOC Medium) hinzupipettiert und für 1 h bei 37°C und 800 rpm auf einem Thermoschüttler (Grant) inkubiert. Nun wurden 100 µl des Gesamtvolumens auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C in einem Brutschrank kultiviert.

Da in den verwendeten Vektoren eine Antibiotikaresistenz eingebaut war, kam es bei der Kultivierung auf LB-Amp-Platten zu einer Selektion der Bakterien. Es konnten nur diejenigen Bakterien überleben, welche während der Transformation das Plasmid aufgenommen hatten und dadurch resistent gegenüber dem Antibiotikum waren. Am Folgetag wurden 4 Kolonien pro Plasmid mit einer Pipettenspitze von der Platte geerntet und jeweils in 3 ml LB-Amp-Medium (20 g/l LB-Medium, 0,1 g/l Ampizillin) ü.N. bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA aus den DH-10 Bakterien wurde nun eine *Miniprep* entsprechend des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (Thermo Fisher) durchgeführt. Im Anschluss wurden positive Klone durch Restriktionsverdau identifiziert. Als weitere Qualitätskontrolle wurde die Zielsequenz des daraufhin ausgewählten Klons mittels *Sanger-Sequenzierung* auf mögliche Mutationen untersucht. Um eine größere Menge an DNA dieses Klons zu extrahieren, wurde nach Anleitung des *NucleoBond® Xtra Midi Kits* (Macherey-Nagel) eine *Midiprep* durchgeführt.

3.1.20.5 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde die sog. Kettenabbruch Synthese nach Sanger genutzt⁷⁶. Für die Durchführung der Sequenzierung wurde nach dem folgenden Schema pipettiert und eine PCR nach Tabelle 15 durchgeführt.

BigDye® Terminator v3.1	0,25µl
5x BigDye Sequenzierungs Puffer	2,25 µl
Primer 10 (µM)	0,25µl
Plasmid-DNA	150-200ng
+ ddH ₂ O	Ad 10 µl

Tabelle 14 Pipettierprotokoll DNA-Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	96°C	1min

2.Denaturierung	96°C	10 s
3.Hybridisierung	55°C	5 s
4.Elongation (39 Zyklen von Schritt 2-4)	60°C	4 min
Kühlung	15°C	∞

Tabelle 15 PCR Programm DNA-Sequenzierung

Die Auswertung wurde durch das Institut für Genetik der Universität Köln durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Software von Benchling (Benchling Inc).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der BAG3 Antikörper

Um den BAG3 Komplex in der Niere untersuchen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass die verwendeten Antikörper (AB) BAG3 hinreichend detektieren. Zu diesem Zweck wurden die Antikörper in IF und IB ausgetestet. Um eine größere Bandbreite der Untersuchungsmöglichkeiten zu haben, wurde in dieser Arbeit mit zwei verschiedenen BAG3 ABs gearbeitet. Zum einen wurde ein polyklonales Kaninchen Antiserum verwendet, welches im Folgenden mit α -BAG3 (pAB) abgekürzt wird. Dieser wurde gegen ein Immunogen vom C-Terminus des BAG3 Proteins bis über die PxxP Domäne immunisiert (nach Informationen des Herstellers Proteintech). Zum anderen wurde ein monoklonaler Maus Antikörper genutzt, welcher im Folgenden mit α -BAG3 (mAB) abgekürzt wird. Das Immunogen des α -BAG3 (mAB) erstreckt sich vom C-Terminus des BAG3 Proteins bis zum Beginn der BAG-Domäne (nach Informationen des Herstellers Santa Cruz) (Abbildung 2).

4.1.1 Etablierung einer BAG3 IF *in vitro*

Mit dem Ziel BAG3 *in vitro* hinsichtlich seiner endogenen Expression und seiner subzellulären Lokalisation untersuchen zu können, wurde eine BAG3 IF-Färbung durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass sich die ABs tatsächlich an BAG3 und nicht unspezifisch binden, wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) mit einem Plasmid kodierend für die humane Sequenz von BAG3 transient transfiziert. N-Terminal des BAG3-Proteins wurde ein 3xFlag-Tag angefügt (F.BAG3). Es zeigt sich eine gute Signalüberlagerung beider α -BAG3 ABs mit der anti-FLAG-Färbung (Abbildung 4, A und B). Auch die Signale der beiden α -BAG3 AB zeigen in einer gemeinsamen Co-Färbung eine hinreichende Überlagerung (Abbildung 4 C). Beide Antikörper erkennen also das humane BAG3 Protein.

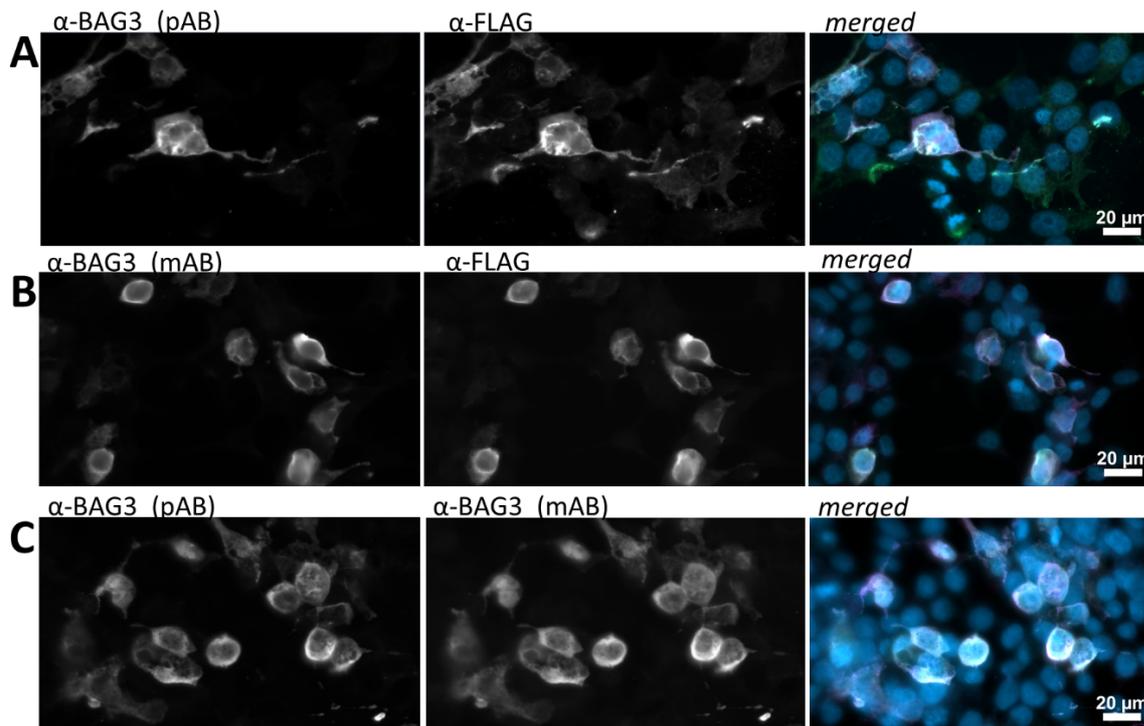


Abbildung 4: Etablierung einer BAG3 IF in HEK293T Zellen

Immunfluoreszenzbilder fixierter F.BAG3 transfizierter HEK293T Zellen. **(A)** Der α -BAG3 (pAB) Antikörper zeigt eine gute Signalüberlappung mit dem Flag Tag (magenta: α -BAG3 (pAB); grün: α -FLAG (Maus; mAB); n=2). **(B)** Auch der α -BAG3 (mAB) Antikörper zeigt eine gute Signalüberlappung mit dem Flag Tag (magenta: α -BAG3 (mAB), grün: α -FLAG Kaninchen (pAB); n=2). **(C)** Beide BAG3 Antikörper zeigen untereinander eine zufriedenstellende Signalüberlagerung (magenta: α -BAG3 (pAB); grün: α -BAG3 (mAB); n=1).

4.1.2 Etablierung eines BAG3 Immunoblots *in vitro*

Für die spätere Beurteilung der endogenen BAG3 Expression *in vitro* sowie der Herausarbeitung bekannter/neuer Interaktoren von BAG3 war es wichtig, die beiden α -BAG3 ABs zunächst im Immunoblot (IB) zu validieren. Dafür wurden sowohl unbehandelte „wildtyp“ HEK293T Zellen als auch mit F.BAG3 und F.BAG3^{P209L} transient transfizierte Zellen verwendet. F.BAG3^{P209L} kodiert für die humane Myopathien auslösende Mutation BAG3^{P209L}. Neben den Proteinlysaten wurde jeweils auch das Pellet nach der Lyse der Zellen in IP Puffer mit Lämmli-puffer versetzt und im IB aufgetragen. Wie in Abbildung 5 B zu sehen ist, erkennen beide BAG3 ABs sowohl überexprimiertes (Abbildung 5, A und B, oben), als auch von HEK293T Zellen endogen exprimiertes BAG3 (Abbildung 5, A und B, Mitte). Dabei ist eine Veränderung der Molekülmasse von BAG3 zu beobachten. Das endogene BAG3 Protein läuft ungefähr auf Höhe von 85 kDa. Das überexprimierte F.BAG3 läuft auf Grund seines FLAG-Tags ein wenig höher bei etwa 90 kDa. Einschränkend sei erwähnt, dass der α -BAG3 (mAB) auch in den Lysaten der „wildtyp“ HEK293T Zellen bei längerer Belichtung eine Bande auf der

Höhe von ca. 100 kDa erkennt (Abbildung 5 B, Mitte). Diese befinden sich allerdings nicht in den erwarteten Bereichen von BAG3. Bei beiden Antikörper-Färbungen ist zusätzlich ein stärkeres Signal von F.BAG3^{P209L} im Vergleich zu F.BAG3 zu beobachten. Trotz geringeren Gesamtproteins (Abbildung 5, A und B, unten) ist sowohl die Proteinbande des Pellets als auch des Lysats bei F.BAG3^{P209L} stärker. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden keine weiteren Experimente mit F.BAG3^{P209L} durchgeführt.

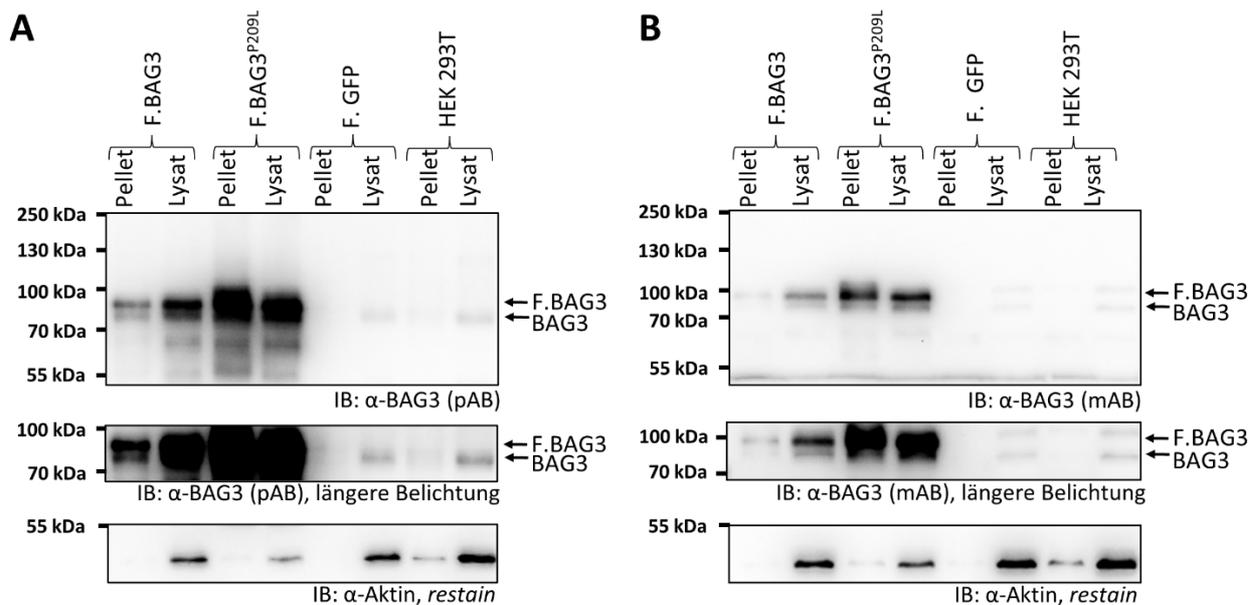


Abbildung 5: Etablierung eines BAG3 Immunoblots *in vitro*

Färbung von Zelllysaten mit **A.** α -BAG3 (pAB) und **B.** α -BAG3 (mAB). Beide α -BAG3 Antikörper erkennen überexprimiertes und endogenes BAG3 in HEK293T Zellen. Die endogene BAG3 Bande verläuft auf einer Höhe von \sim 85 kDa, F.BAG3 auf einer Höhe knapp unterhalb von 100 kDa (Vgl. Pfeil F.BAG3). In beiden Färbungen imponieren zudem die Banden von F.BAG3^{P209L} stärker als die F.BAG3 Banden. α -BAG3 (pAB) zeigt unspezifische Färbungen auf Höhe von 70 und 55 kDa (Panel A), die Degradationsprodukte von F.BAG3 sein könnten. α -BAG3 (mAB; Panel B) zeigt schwache unspezifische Bindung auf Höhe von 100kDa. Der α -Aktin IB wurde bei beiden Antikörpern als Ladungskontrolle hinzugezogen.

4.2 Etablierung der BAG3 Co-IP

Für die Etablierung der Co-IP wurden zunächst HEK 293T Zellen verwendet. Im ersten Schritt wurde BAG3 mittels F.BAG3 überexprimiert. Als Negativkontrollen der IPs wurden Antikörper ausgewählt, die hinsichtlich des Wirts und der Klonalität dem jeweiligen BAG3 AB entsprachen. Als Positivkontrolle diente eine IP mit α -FLAG-Antikörper. Zur Überprüfung der

Co-IP wurden einige bereits bekannte Interaktoren von BAG3 durch IB angefärbt (CHIP, Hsp70, Hsc70) ³⁶.

Abbildung 6 A zeigt das repräsentative Ergebnis einer Co-IP mit dem polyklonalen Kaninchen Antikörper α -BAG3 (pAB). Spur 2 zeigt eine erfolgreiche BAG3 IP. Auch die Interaktoren Hsp70 und Hsc70 konnten im IB dokumentiert werden. Eine Interaktion zwischen BAG3 und CHIP konnte jedoch mit dem α -BAG3 (pAB) nicht nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen in Spur 3 (α -FLAG AB) und 4 (α -FLAG M2 Beads) stützen die Ergebnisse. Dabei zeigen die M2 Beads aufgrund der kovalenten Bindung an den α -FLAG AB deutlichere Ergebnisse. Zusätzlich zu Hsp70 und Hsc70 konnte die IP mit α -FLAG M2 Beads auch CHIP co-immunpräzipitieren (Spur 4). Die Negativkontrolle (α -Podocin) in Spur 5 bestätigt die Spezifität des α -BAG3 (pAB). Ein α -FLAG Immunoblot zeigt die F.BAG3 Bande auf derselben Höhe (~100 kDa) wie die α -BAG3 (pAB) Färbung und bestätigt damit die Ergebnisse des α -BAG3 IBs.

Die BAG3 Co-IP konnte auch mit dem α -BAG3 (mAB) etabliert werden (Abbildung 6 B). In Spur 2 ist die funktionierende IP von BAG3 zu sehen. Auch die Interaktoren Hsc70 und Hsp70 konnten nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte mit Hilfe des α -BAG3 (mAB) auch CHIP Co-immunpräzipitiert werden. Die Negativkontrolle α -Wt1 in Spur3, sowie die Positivkontrolle (α -FLAG M2) in Spur 4 stützen die Ergebnisse der α -BAG3 (mAB) Co-IP.

Um die α -BAG3 (mAB) IP im IB sichtbar zu machen, wurden die Membranen mit α -BAG3 (pAB) und (mAB) gefärbt. Der α -BAG3 (pAB) erkennt sowohl seine eigene IP (Abbildung 6 A), als auch die IP des α -BAG3 (mAB) (Abbildung 6 B). Der α -BAG3 (mAB) hingegen erkennt im IB weder die IP-Proben der BAG3 ABs noch die Positivkontrolle. Ein *re-stain* der Membranen mit α -BAG3 (pAB) zeigte jedoch Proteinbanden (Abbildung 6 B). Auf Grund dieses Ergebnisses muss davon ausgegangen werden, dass der α -BAG3 (mAB) im IB nicht zur Detektion von BAG3 IPs geeignet ist.

Nach Etablierung der BAG3 Co-IP in F.BAG3 überexprimierenden HEK293T Zellen wurde im nächsten Schritt eine Co-IP mit unbehandelten „wildtyp“ HEK293T Zellen etabliert (Abbildung 6 C). Dies ist notwendig, da unphysiologische Expressionslevel von transgenen Proteinen eine unnatürliche Zusammensetzung/Interaktion von Proteinkomplexen hervorrufen können. Auch in unbehandelten HEK293T Zellen erkennt der α -BAG3 (pAB) BAG3 sowohl im Lysat als auch in der IP. Zudem zeigt sich eine (schwache) Bande der beiden Interaktoren Hsp70 und Hsc70. Der α -BAG3 (mAB) erkennt im IB analog zu Abbildung 6 B nur das Lysat (Abbildung 6 C). Aus diesem Grund wurde der α -BAG3 (mAB) im Folgenden nicht mehr zur Färbung von IP-Proben genutzt.

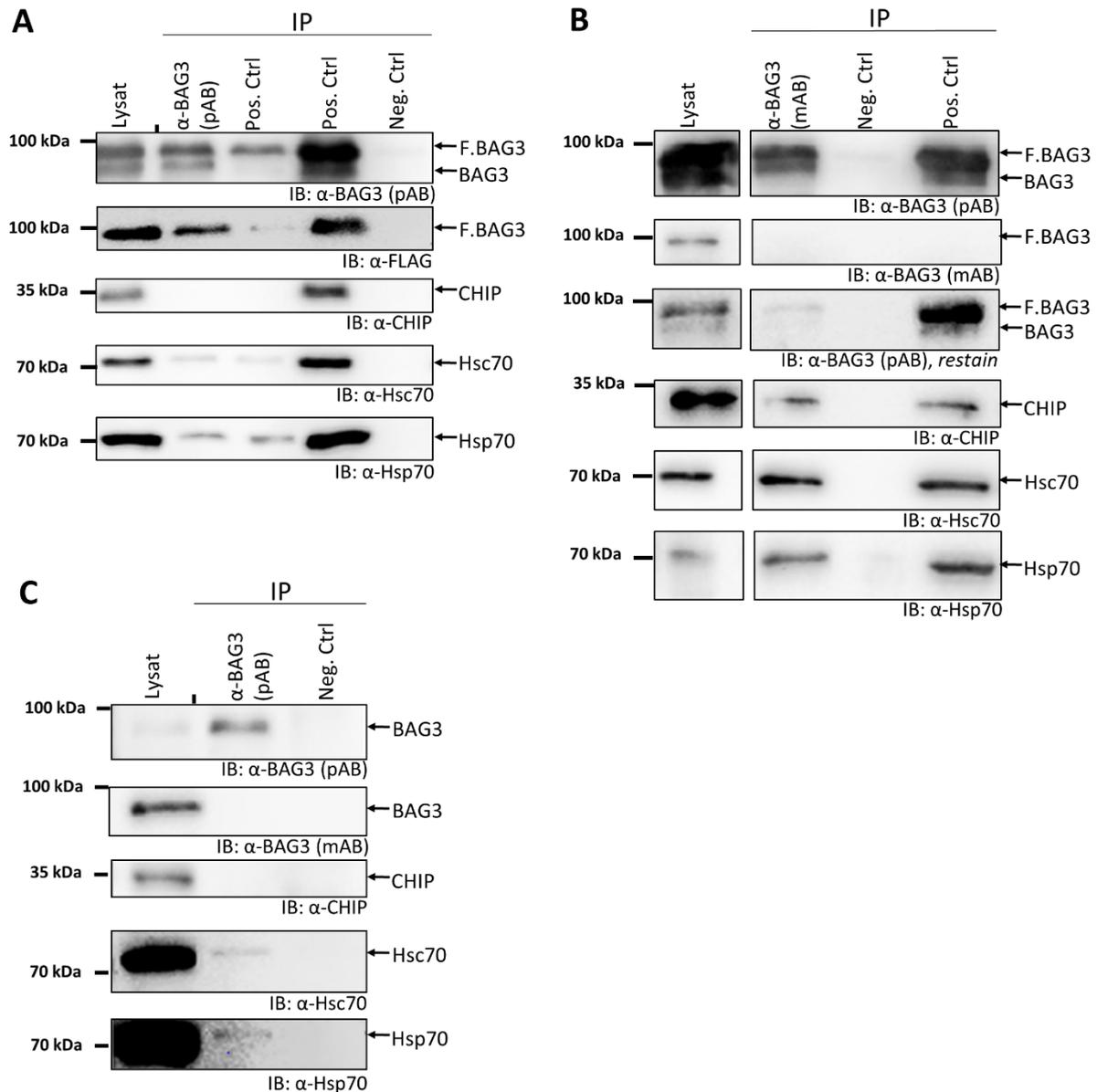


Abbildung 6: Etablierung der BAG3 Co-IP

(A) Der α -Bag3 (pAB) Antikörper (co-) immunpräzipitiert BAG3, Hsc70 und Hsp70 in BAG3 überexprimierenden HEK293T Zellen. Spur 2 zeigt einen erfolgreichen BAG3 *pull down*. Auch die Interaktoren Hsp70 und Hsc70 konnten co- immunpräzipitiert werden, CHIP hingegen nicht. Positivkontrollen: Spur 3: α -FLAG AB mit Protein G Beads; Spur 4: kovalent α -FLAG gebundene M2 Beads; Spur 5 Negativkontrolle (Neg. Ctrl): α -Podocin pAB (n=2 für Co-IP, n=6 für BAG3 IP, n=5 für Co-IP mit M2-Beads). **(B)** Der α -Bag3 (mAB) Antikörper (co-) immunpräzipitiert BAG3, Hsc70, Hsp70 und CHIP in BAG3 überexprimierenden HEK293T Zellen. Spur 2 zeigt eine funktionierende BAG3 (Co-) IP. BAG3 und die Interaktoren Hsp70, Hsc70 sowie CHIP konnten (co-) immunpräzipitiert werden. Die Färbung mit α -BAG3 (mAB) erkennt zwar das Lysat, die IPs jedoch nicht. Der Restain mit α -BAG3 (pAB) hingegen bestätigt die IPs; Spur 3: Negativkontrolle: α -Wt1; Spur 4: Positivkontrolle: α -FLAG M2 Beads (n=2). **(C)** Der α -Bag3 (pAB) Antikörper (co-)immunpräzipitiert BAG3, Hsc70 und Hsp70 in

unbehandelten HEK293T Zellen. Die α -Bag3 (pAB) IP zeigte Ergebnisse analog zu (A). Auch in unbehandelten HEK293T Zellen erkennt α -BAG3 (mAB) die IP nicht. Spur 3: Negativkontrolle α -Podocin (n=4 für BAG3 IP, n=1 für Co-IP).

4.3 Kultivierte humane Podozyten exprimieren BAG3

Als leicht reproduzierbares und für Podozyten spezifisches Model wurde nun ein *in vitro* Ansatz mit einer konditional immortalisierten humanen podozytären Zelllinie gewählt (humane Podozyten) ⁷⁷. Zunächst wurde die BAG3 – Expression in den Zellen überprüft. Zu diesem Zweck wurden proliferierende Zellen (undiff.) und 14d differenzierte Zellen (diff.) betrachtet. Wie in Abbildung 7 zu sehen, ist BAG3 sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten humanen Podozyten in IB und IF nachweisbar. Im IB ist das endogene BAG3 - wie in HEK293T Zellen - auf einer Höhe von ca. 85kDa zu sehen (Abbildung 7 A).

Die in Abbildung 7 B gezeigten Bilder geben zusätzlich Aufschluss über die Lokalisation von BAG3 in der humanen Podozytenzelllinie. Es zeigen sich sowohl in differenzierten als auch in undifferenzierten Zellen Signale im Zytosol und im Zellkern. In undifferenzierten Podozyten erscheint die Färbung mit BAG3 im Zellkern ausgeprägter zu sein als im Zytosol. In differenzierten Zellen verhält es sich hingegen umgekehrt. Hier scheint die Intensität der BAG3-Färbungen im Zytosol höher zu sein.

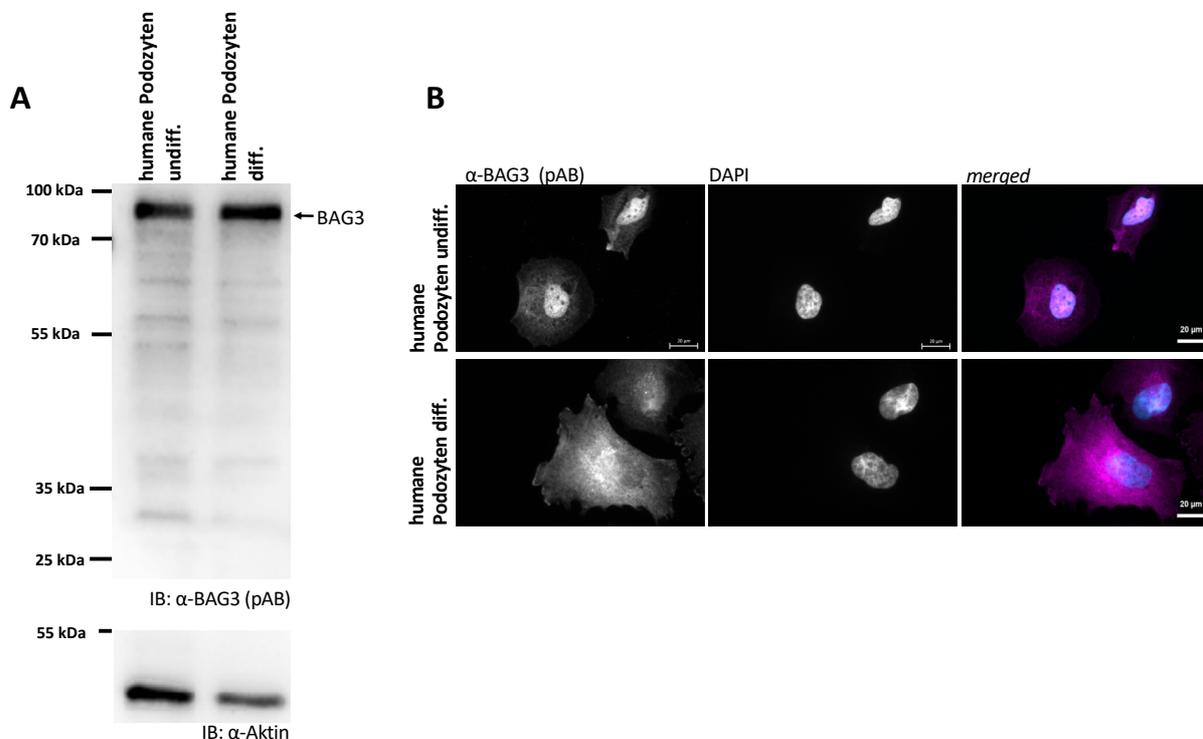


Abbildung 7: Kultivierte humane Podozyten exprimieren BAG3

(A) Humane Podozyten exprimieren BAG3 in undifferenziertem und differenziertem Stadium im IB. BAG3 ist auf einer Höhe von ca. 85 kDa zu sehen; unten: Ladekontrolle derselben Membran (α -Aktin). **(B)** BAG3 Expressionsmuster in differenzierten und undifferenzierten humanen Podozyten in IF. BAG3 Signale sind sowohl im Zellkern als auch im Zytosol erkennbar, wobei BAG3 in undifferenzierten vermehrt im Zellkern auftritt und in differenzierten Zellen vermehrt im Zytosol. (magenta: α -BAG3 (pAB); blau: DAPI; n=2). Die Negativkontrollen zeigten kein Signal (Daten nicht gezeigt).

4.4 Etablierung der BAG3 - IP in undifferenzierten humanen Podozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass humane Podozyten BAG3 exprimieren, wurde mit der Etablierung einer IP in diesen Zellen begonnen. Aufgrund der schnelleren Verfügbarkeit wurden für die Voraustestung proliferierende humane Podozyten verwendet. Der Erfolg der IP wurde mittels SDS Page und IB überprüft (

Abbildung 8 A). Die BAG3 IP funktionierte mit beiden BAG3 ABs (Spur 2 und 4). Keiner der α -BAG3 AB zeigte unspezifische Bindungen im IB (Spur 3 und 4). Diese Ergebnisse konnten auch in einer testweise durchgeführten MS/MS-Untersuchung verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

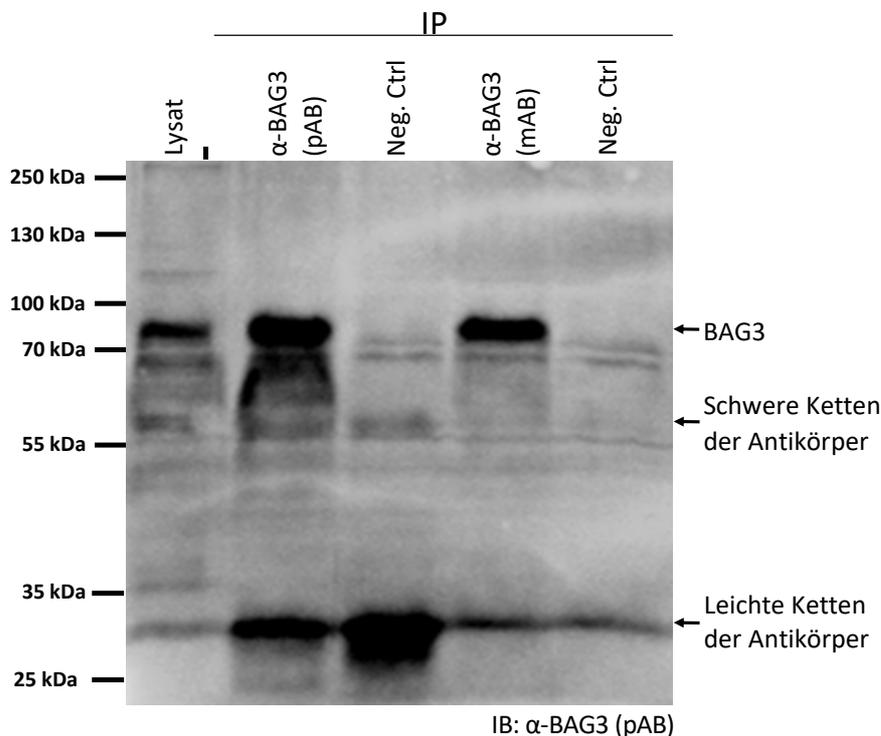


Abbildung 8: BAG3 IP in undifferenzierten humanen Podozyten

IB einer erfolgreichen α -BAG3 (pAB/mAB) IP in undifferenzierten humanen Podozyten. Die BAG3 IP funktioniert mit beiden α -BAG3 ABs (Spur 2 und 4). Es zeigten sich keine

unspezifischen Banden in den nebenstehenden Negativkontrollen (Neg. Ctrl.): Spur 3 α -FLAG (Kaninchen, pAB); Spur 5 α -FLAG (Maus, mAB); n=3.

4.5 Das BAG3 Interaktom in differenzierten humanen Podozyten

Im Anschluss an die Etablierung wurden die IPs mittels MS/MS analysiert. Mit Hilfe dieser Daten sollten bekannte Interaktoren von BAG3 überprüft und mögliche neue oder für den Podozyten spezifische Interaktoren herausgearbeitet werden.

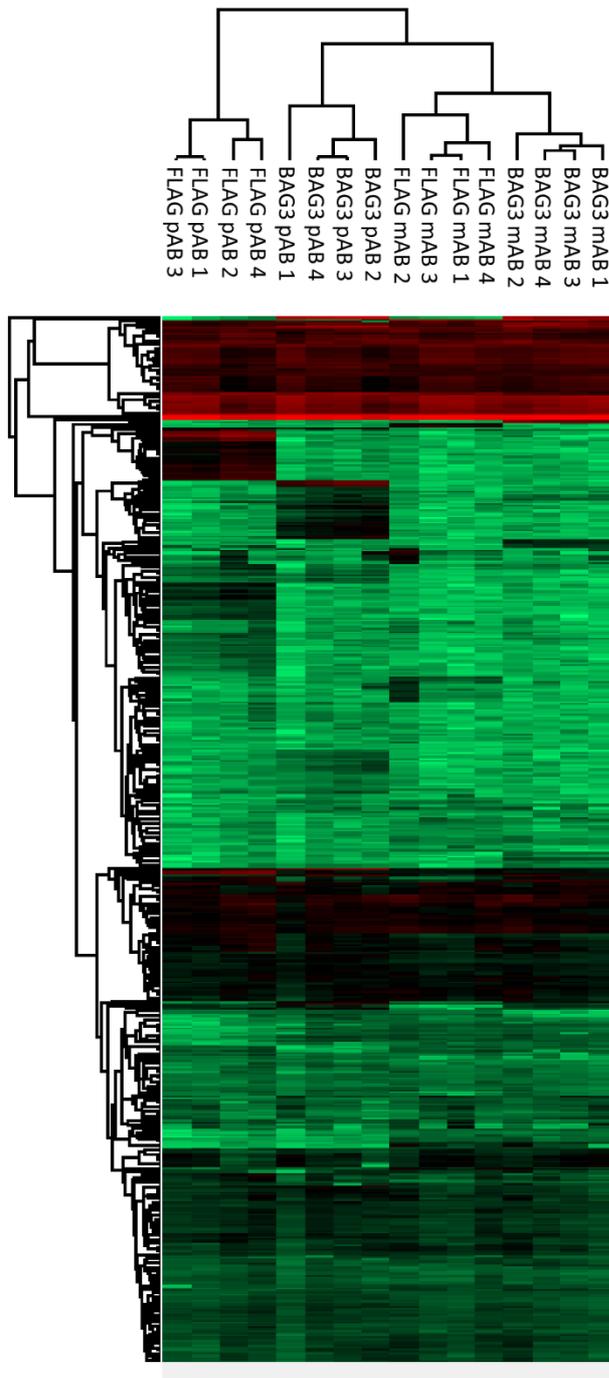


Abbildung 9: Die hierarchische Clusteranalyse trennt die Proben nach Antikörper und Negativkontrolle

Die Proben ordnen sich entsprechend der verwendeten Antikörper an. Es sind eindeutige Unterschiede zwischen Proben (BAG3) und Negativkontrollen (FLAG) erkennbar. Die Unterschiede zwischen den beiden BAG3 Antikörpern sind größer als zwischen BAG3 und den jeweiligen Kontrollen.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden zunächst IPs aus Nierenkortexlysaten und isolierten Glomeruli wildtypischer Mäuse durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass die

Untersuchung von BAG3 *in vivo* mehrere Schwierigkeiten mit sich bringt. Für eine funktionierende IP wird zum einen eine große Proteinmenge und dementsprechend viele Mäuse benötigt. Zum anderen ist BAG3 in der Niere nicht ausschließlich im Podozyten exprimiert (Abbildung 15), wodurch eine podozytenspezifisches Interaktom weiter erschwert wird. Als leichter reproduzierbares und für Podozyten spezifischeres Model wurde daher ein *in vitro* Ansatz mit differenzierten humane Podozyten verwendet. Differenzierte Zellen sind durch einen Wachstumsstopp und vermehrte Expression podozytensspezifischer Proteine wie Nephin und Podocin gekennzeichnet. Aus diesem Grund kommen diese Zellen der *in vivo* Situation näher als proliferierende Zellen⁷⁷.

Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen die Qualitätskontrollen der MS-Experimente. In Abbildung 9 ist die hierarchische Clusteranalyse aller Experimente dargestellt. Diese Analysemethode sortiert die Daten entsprechend ihren Ähnlichkeiten zueinander. Ähnliche Daten liegen in der Graphik enger beieinander, Daten mit größeren Unterschieden weiter voneinander entfernt. Am Ähnlichsten sind sich jeweils die Ergebnisse der einzelnen Antikörper, wodurch sich Antikörper abhängige Cluster zeigen. Die BAG3 IPs trennen sich zudem gut von den zugehörigen Negativkontrollen. Auch die Datensätze der BAG3 IPs trennen sich in unterschiedliche *Cluster* auf. Die Unterschiede zwischen den beiden Datensätzen sind dabei größer als die Unterschiede zu den jeweiligen Negativkontrollen. Die in Abbildung 10 gezeigten Hauptkomponentenanalysen (HKA) geben Aufschluss über die Qualität der Negativkontrollen. In Abbildung 10 A ist die HKA des α -BAG3 (pAB) zu sehen. Auf der x-Achse ist eine Varianz von 77% abzulesen. Dies bedeutet, dass sich 77% der Varianz in den Daten zwischen den BAG3 Antikörpern und den Negativkontrollen durch die erste Hauptkomponente erklären lassen. Da die erste Hauptkomponente den Unterschied zwischen der BAG3-IP und der Negativkontrolle abbildet, spricht dies für eine gute Qualität des Datensatzes. Die Kontrolle zeigt also wie erwünscht zum Großenteil andere Daten als die untersuchten Proben.

Auf der x-Achse wurde eine Varianz von 12,7% errechnet. Es lassen sich also 12,7% der Varianz durch die zweite Hauptkomponente erklären. Diese erklärt den Unterschied zwischen den einzelnen Experimenten. Die einzelnen Durchführungen der Experimente weisen folglich untereinander relativ geringe Unterschiede auf. In B ist die HKA des α -BAG3 (mAB) dargestellt. Auf der x-Achse ist eine Varianz von 56,8%, auf der y-Achse eine Varianz von 18,6% dargestellt. Beide Experimente haben also aus technischer Sicht funktioniert.

Auf Grund dieser Daten, lässt sich sagen, dass die kopräzipitierenden Proteine der α -BAG3 ABs spezifisch für die jeweiligen Antikörper sind und daher für die Beurteilung des BAG3 Interaktoms genutzt werden können.

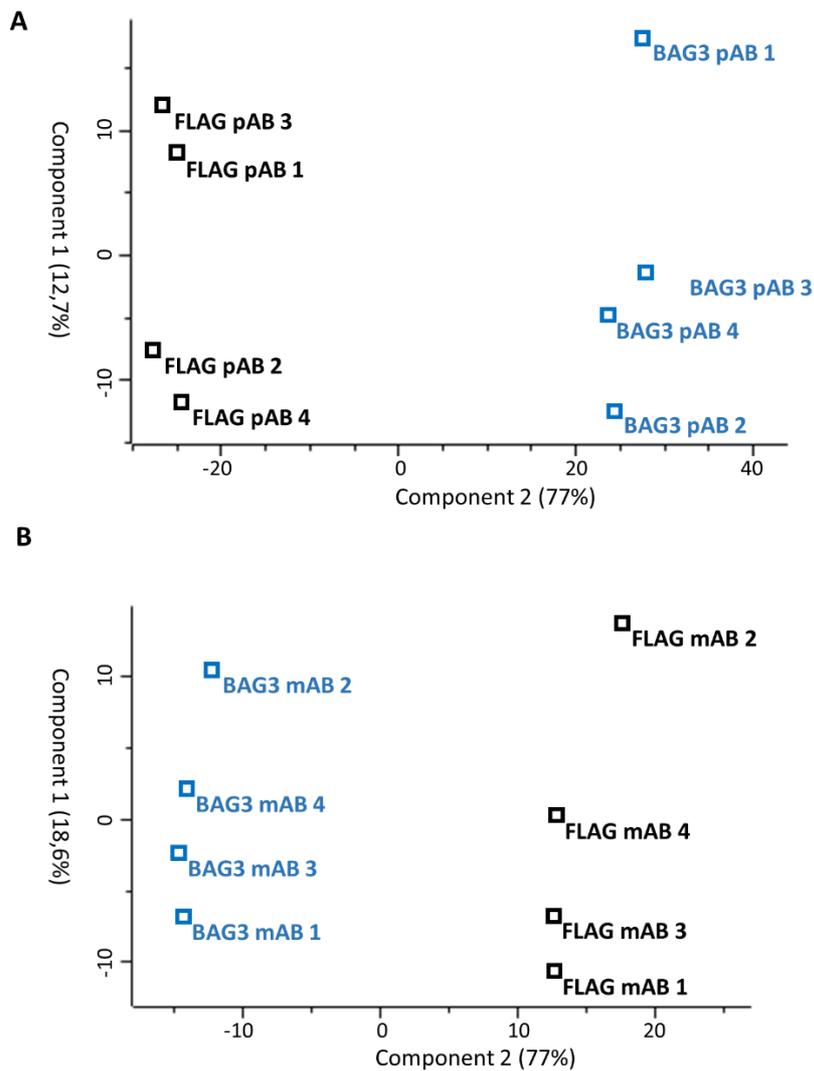


Abbildung 10: Qualitätskontrolle der MS Daten durch die Hauptkomponentenanalyse

(A) Die Ergebnisse von α -BAG3 (pAB) und der Negativkontrolle sind gut trennbar. Durch die erste Hauptkomponente (*Component 1*) lassen sich 77% der Varianz zwischen den Daten der BAG3-IP und der FLAG Negativkontrolle erklären (x-Achse). Da die erste Hauptkomponente den Unterschied zwischen der BAG3-IP und der Negativkontrolle abbildet, spricht die große Varianz für eine gute Qualität des Datensatzes. Die zweite Hauptkomponente (*Component 2*) erklärt mit einer Varianz von 12,7% den Unterschied zwischen den vier Experimenten untereinander (y-Achse). Die einzelnen Durchführungen der Experimente weisen folglich untereinander relativ geringe Unterschiede auf. Die BAG3 Experimente sind in Blau, die Negativkontrollen in Schwarz dargestellt. **(B)** Die Ergebnisse von α -BAG3 (mAB) und der Negativkontrolle sind gut trennbar. Durch die erste Hauptkomponente (*Component 1*) lassen sich 56,8% der Varianz zwischen BAG3-IP und der FLAG Negativkontrolle erklären (x-Achse). Die zweite Hauptkomponente (*Component 2*) erklärt mit einer Varianz von 18,6% den

Unterschied zwischen den vier Experimenten untereinander (y-Achse). Diese Ergebnisse weisen auf eine gute Qualität des Datensatzes hin. Die BAG3 Experimente sind in Blau, die Negativkontrollen in Schwarz dargestellt.

In Abbildung 11 wurden die Interaktoren der α -BAG3 (pAB) Experimente nun mithilfe eines *Volcano Plots* dargestellt. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine in Abhängigkeit von ihrer Signifikanz dargestellt werden⁷⁸. Proteine unterhalb der Linien sind statistisch nicht signifikant (FDR <0,01). Proteine auf der linken Seite oberhalb der FDR wurden in höherer Menge in der Negativkontrolle gefunden. Die Proteine auf der rechten Seite sind als mögliche Interaktoren biologisch relevant. Der *fold change* gibt Auskunft darüber, wie viel höher die gemessene Intensität eines Proteins in der IP im Vergleich zur Negativkontrolle ist. Je höher die Intensität eines Proteins im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde, desto weiter rechts wird es auf der x-Achse abgebildet. Je höher sich ein Protein auf der y-Achse befindet, desto geringer war die Streuung und umso signifikanter ist das Ergebnis (Log-P-Wert). BAG3 weist sowohl die höchste Signifikanz als auch den höchsten *fold change* auf. Dieses Ergebnis stellt eine interne Kontrolle für die Qualität der Daten dar. In Abbildung 12 sind analog zu der oben beschriebenen Graphik die Interaktoren des α -BAG3 (mAB) Antikörpers in einem *Volcano Plot* dargestellt. Auch in diesem Experiment bestätigen der hohe *fold change* und die Signifikanz von BAG3 die Qualität der Daten.

Die Datensätze wurden, wie in Kapitel 3.1.17 beschrieben, ausgewertet. Proteine, die ausschließlich in den α -BAG3 IPs gefunden werden konnten, wurden in blauer Farbe markiert. Um die Daten jedoch untereinander vergleichen zu können, mussten sie in ein Verhältnis zur Negativkontrolle gesetzt werden. Dafür wurde das statistische Verfahren der Imputation angewendet, bei dem fehlende Werte durch geschätzte Werte ersetzt werden⁷³. Erst auf diese Weise war es möglich BAG3 in ein Verhältnis zur Negativkontrolle zu setzen, da BAG3 und andere Proteine nicht in der Kontrolle gefunden werden konnten. Durch die Imputation erscheinen einige der präzipitierten Proteine allerdings unterhalb der FDR und sind dadurch im *Volcano Plot* nicht mehr signifikant (z.B. DNM2). In grau hinterlegt sind solche Proteine, die erst durch die Imputation signifikant werden (z.B. HSPA8 und PDLIM7). Insgesamt wurden mit der α -BAG3 (pAB) IP 75 potentielle Interaktoren gefunden. Von diesen erschienen 23 nach Imputation unterhalb der FDR, wohingegen 10 Proteine erst durch die Imputation signifikant wurden (u.a. Hsc70 und PDLIM7). Nach Imputation wurden also 63 biologisch relevante Proteine erkannt. Ein vergleichbares Bild zeigte sich bei der MS Untersuchung mit dem α -BAG3 (mAB). Dieser AB erkannte 29 potentielle Interaktoren, von denen sechs Proteine durch Imputation verloren gingen und sechs (u.a. Hsc70 und PDLIM7) hinzukamen. Eine ausführliche Auflistung aller signifikant angereicherter Proteine – vor und nach Imputation – ist

im Anhang unter Tabelle 16 und Tabelle 17 zu finden. Im Folgenden werden der Übersicht halber nur imputierte Proteine dargestellt.

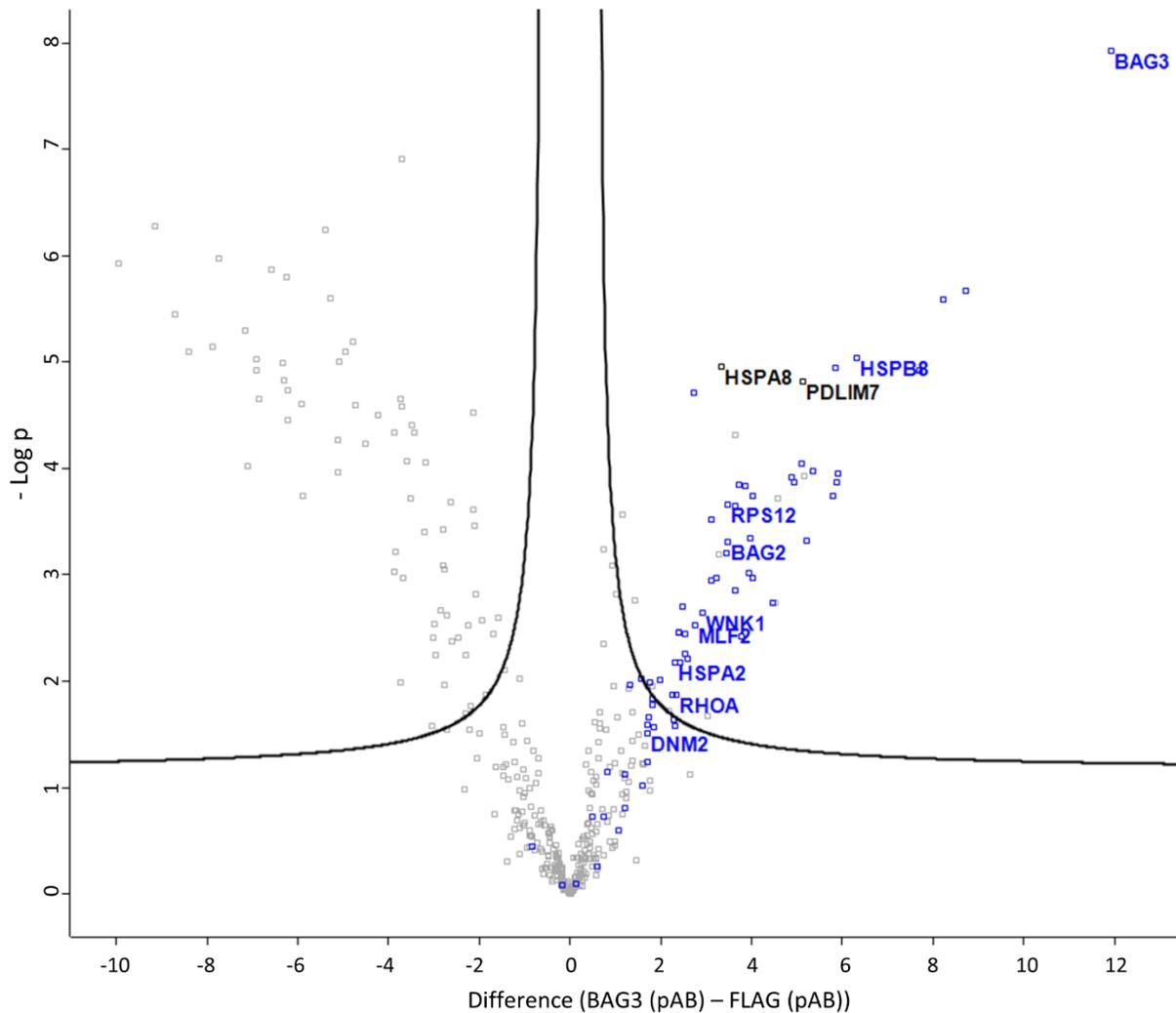


Abbildung 11: Der α -BAG3 pAB erkennt bereits bekannte und potenziell neue Interaktoren

Darstellung signifikanter Proteine mit Hilfe eines *Volcano Plots*. Es werden ausschließlich imputierte Daten gezeigt. In blau hervorgehoben sind Proteine, die ausschließlich mit den BAG3 Antikörpern nachgewiesen wurden, also nicht in der Negativkontrolle vorhanden sind. Grau hinterlegt sind solche, die erst durch die Imputation signifikant werden (z.B. PDLIM7 und HSPA8). Durch die Imputation gelangt ein Teil der Proteine (u.a. DN2) unterhalb der FDR und erscheint dadurch nicht mehr signifikant. BAG3 zeigt jeweils den größten *fold change*. Zudem konnten 9 bereits bekannte Interaktoren von BAG3 gefunden werden (HSPB8, RPS12, HSPA2/ Hsp70-2, WNK1, YWHAЕ, MLF2, PDLIM7, BAG2 und HSPA8). Unter den 62 potenziell Interaktoren befinden sich u.a. RhoA und DN2.

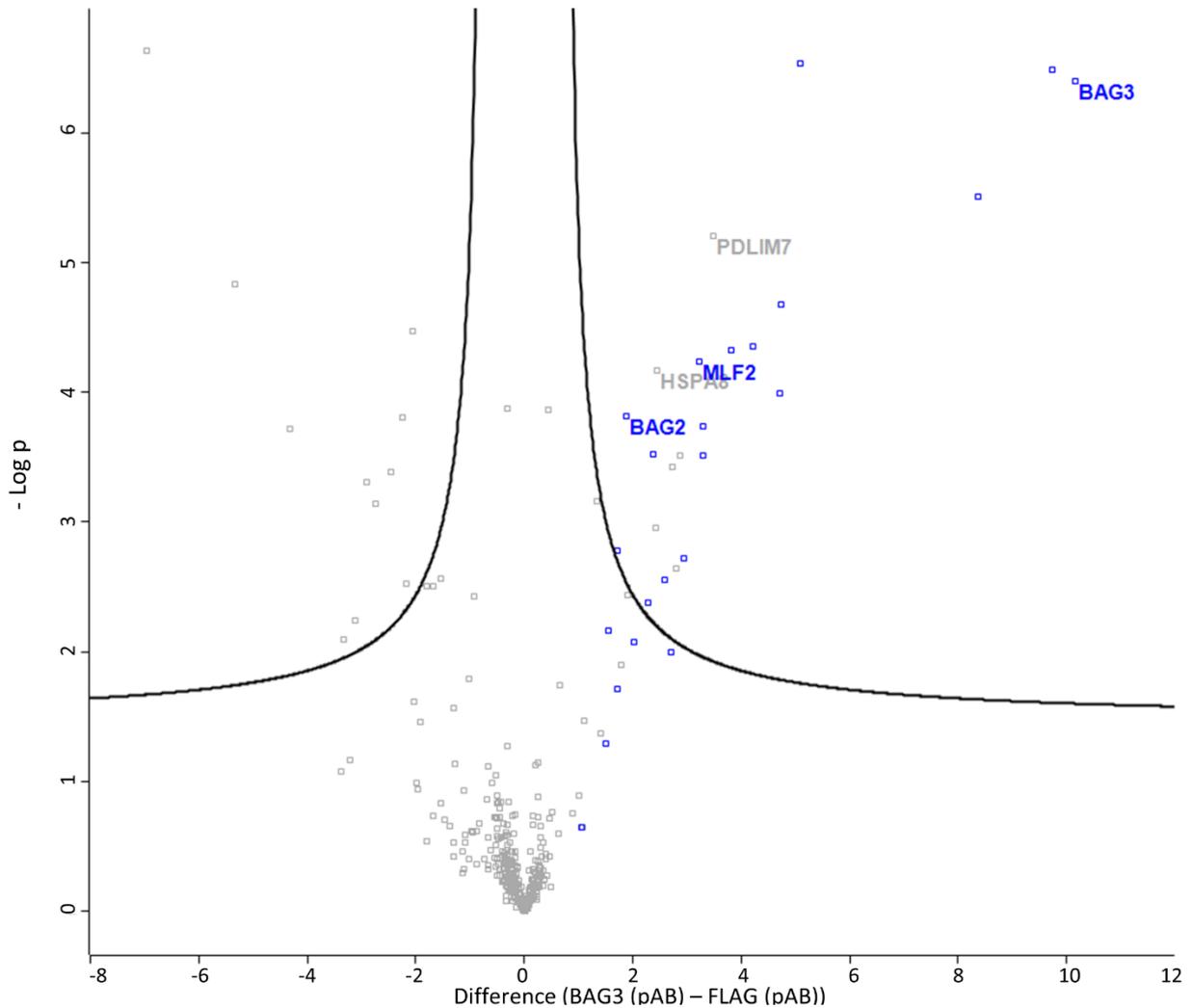


Abbildung 12: Der α -BAG3 mAB erkennt bereits bekannte und potenziell neue Interaktoren

Darstellung signifikanter Proteine mit Hilfe eines *Volcano Plots*. Es werden ausschließlich imputierte Daten gezeigt. Analog zu Abbildung 11 sind die in blau hervorgehobenen Proteine ausschließlich durch den α -BAG3 mAB präzipitiert worden. In grau hinterlegt sind Proteine, die erst durch die Imputation signifikant werden. Auch mit Hilfe des monoklonalen BAG3 Antikörpers zeigt BAG3 den größten *fold change*. Zudem konnten die bekannten Interaktoren HSPA8 (Hsc70), BAG2, MLF2, PDLIM7 und HNRNPK präzipitiert werden.

Die präzipitierten Proteine der beiden BAG3 Antikörper wurden nun untereinander sowie mit einer Liste bekannter BAG3-Interaktoren verglichen ⁷⁹. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 13 als Venn-Diagramm dargestellt. Die beiden BAG3 Antikörper überschneiden sich in acht Proteinen. Davon sind vier bereits als Interaktoren bekannt: MLF2, PDLIM7, BAG2, und HSPA8, welches das Protein Hsc70 kodiert. Bislang nicht bekannte Interaktoren sind FAM120A, AP2B1 und HSPA1B/HSPA1A. Beide Antikörper präzipitieren zudem BAG3. Ein

bekannter Interaktor (HNRNPK) taucht nur bei der IP mit α -BAG3 (mAB) auf. Fünf Proteine erscheinen nur bei α -BAG3 (pAB): HSPB8, RPS12, HSPA2/ Hsp70-2, WNK1 und YWHAE. Zusätzlich präzipitiert der α -BAG3 (mAB) 19 bislang unbekannte mögliche Interaktoren. Der α -BAG3 (pAB) erkennt 61 bislang nicht beschriebene Proteine. Von diesen wurden *Dynamin 2* (DNM2) und *Ras homolog family member A* (RhoA) im *Volcano Plot* exemplarisch hervorgehoben, da diese im Anschluss genauer betrachtet werden. In beiden *Volcano Plots* wurden zudem jeweils die bekannten Interaktoren hervorgehoben.

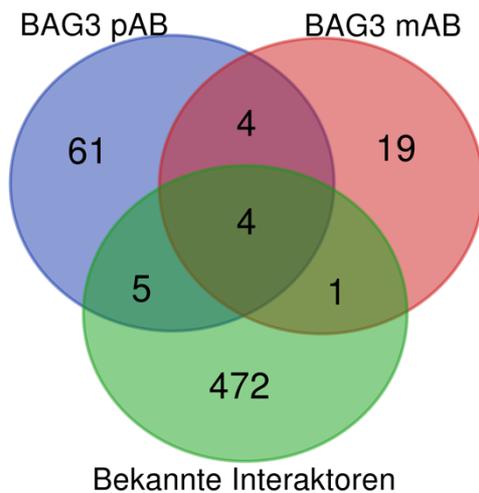


Abbildung 13: Vergleich der Präzipitate beider BAG3 Antikörper mittels Venn-Diagramm

Es werden die Daten der beiden BAG3 Antikörper zusammen mit bereits bekannten Interaktoren von BAG3 in einem Venn Diagramm verglichen. Die beiden ABs überschneiden sich in 8 Proteinen. Davon sind vier bereits als Interaktoren bekannt (MLF2, PDLIM7, BAG2, HSPA8), drei Proteine wurden noch nicht beschrieben (FAM120A, AP2B1 und HSPA1B; HSPA1A). Beide Antikörper präzipitieren zudem BAG3. Ein bekannter Interaktor (HNRNPK) taucht nur bei der IP mit α -BAG3 (mAB) auf. Fünf Proteine nur bei α -BAG3 (pAB) (HSPB8, RPS12, HSPA2/ Hsp70-2, WNK1 und YWHAE). Zusätzlich präzipitiert der α -BAG3 (pAB) 61 bislang nicht beschriebene Proteine, der α -BAG3 (mAB) erkennt 19 bislang unbekannte mögliche Interaktor.

4.6 BAG3 lokalisiert in podozytären und nicht-podozytären Zellen des Glomerulums

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob und in welcher subzellulären Lokalisation BAG3 im Glomerulum *in vivo* vorkommt. Da hierzu Schnitte von Mausnieren in IF untersucht wurden, wurde insbesondere das polyklonale Kaninchen Antiserums (α -BAG3 (pAB)) für Färbungen eingesetzt. Auf den Einsatz von α -BAG3 (mAB) wurde nach testweiser durchgeführter Färbung verzichtet, da dieser AB ein hohes Maß an unspezifischen Färbungen

aufwies (Daten nicht gezeigt). Um den α -BAG3 (pAB) auf Nierengewebe zu verifizieren, wurde zunächst die Spezifität des ABs überprüft. Dabei war insbesondere die Färbung in Podozyten von Interesse. Zu diesem Zweck wurde der α -BAG3 (pAB) mit dem humanen BAG3-6*His Fusionsprotein (BAG3 Fusionsprotein) präinkubiert (3.1.18.2). Dieses Fusionsprotein beinhaltet die gleiche BAG3 Proteinsequenz wie das zur Antikörperherstellung genutzte rekombinante Protein (Humanes BAG3 GST Fusionsprotein, *Proteintech*). Durch die Präinkubation mit einem Überschuss an Antigen wird der α -BAG3 (pAB) kompetitiv gebunden. Da der α -BAG3 (pAB) auf diese Weise in der anschließenden IF weniger endogenes BAG3 erkennen kann, sollte das Färbungssignal reduziert sein. Damit nicht ebenfalls die unspezifischen anti-GST-Tag Antikörper des α -BAG3 (pAB) gebunden werden, wurde ein Immunisierungspeptid mit einem His-Tag verwendet.

In Abbildung 14 A ist eine α -BAG3 (pAB) Färbung zu sehen, diese wurde als Referenzwert zur Beurteilung der Negativkontrolle hinzugezogen. Abbildung 14 B zeigt eine Co - Färbung mit α -BAG3 (pAB) + BAG3 Fusionsprotein und Nephtrin. Im Vergleich zu Abbildung 14 A ist eine deutliche Abnahme des Signals bei gleicher Belichtungszeit zu erkennen, auch im Bereich der Podozyten (Abbildung 14 B; iii). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die in den Referenzbildern in Abbildung 14 A gezeigten Signale überwiegend BAG3 entsprechen und keine unspezifischen Färbungen des GST-Tags des AB sind. Die gewählte Negativkontrolle konnte jedoch keine vollständige Verminderung des Signals bewirken. Auch im Bereich vermuteter Podozyten konnte weiterhin ein – wenn auch schwaches – Signal erkannt werden (Abbildung 14 B; iv). Der α -BAG3 (pAB) wurde wegen der insgesamt guten Daten trotzdem als vertrauenswürdig eingestuft und für weitere Experimente verwendet.

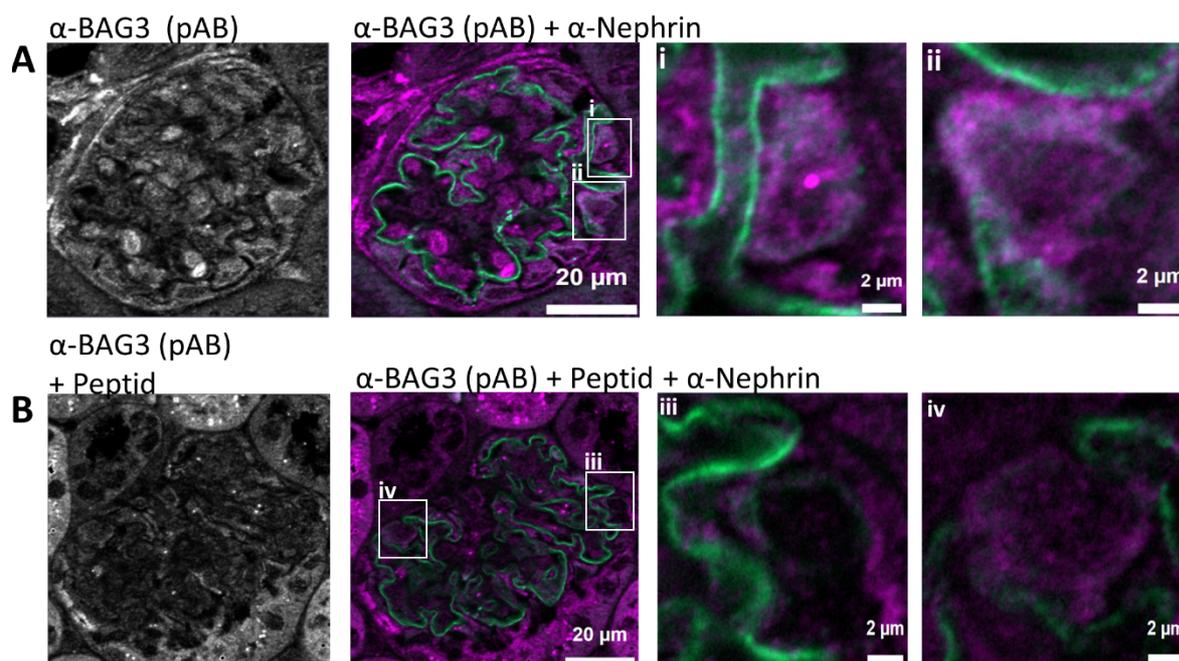


Abbildung 14: Überprüfung der Bindungsspezifität des α -BAG3 (pAB) auf Nierengewebe

Immunfluoreszenzbilder wildtyper Mausschnitte auf Paraffin. **(A)** Referenzbild der Färbung des α -BAG3 (pAB); i und ii: Vergrößerungsaufnahmen mutmaßlicher Podozyten; (magenta: α -BAG3 (pAB), grün: α -Nephrin). **(B)** Negativkontrolle mit BAG3 Fusionsprotein. Das BAG3 Signal zeigt sich im gesamten Bild abgeschwächt im Vergleich zu A. Es sind jedoch weiterhin Signale im vermuteten Bereich der Podozyten erkennbar (iv); iii und iv: Vergrößerungsaufnahmen mutmaßlicher Podozyten; (magenta: α -BAG3 (pAB) + BAG3 Fusionsprotein, grün: α -Nephrin).

Im nächsten Schritt wurde BAG3 hinsichtlich der subzellulären Lokalisation im Glomerulum betrachtet. In Abbildung 15 A wurde die Schlitzmembran durch Markierung des Transmembranproteins Nephrin sichtbar gemacht. Die Co-Färbung mit BAG3 zeigte BAG3 positive Zellen mit und ohne direkten Bezug zur Schlitzmembran. In Abbildung 15 A (i) könnte es sich bspw. um einen Podozyten handeln. Die Expression von BAG3 in Podozyten konnte durch Co-Färbung mit dem nukleären Podozytenmarker Wt1 bestätigt werden⁸⁰ (Abb. 14 B). Diese zeigt eine schwache, aber eindeutige Färbung von BAG3 im Zytosol des Podozyten. Der Zellkern wird dabei weitestgehend ausgespart (Abbildung 15 B iii). BAG3 wird also im Podozyten exprimiert. Das Protein kommt jedoch nicht ausschließlich in Podozyten vor. Eine repräsentative nicht-podozytäre Zelle ist in Abbildung 15 A ii dargestellt.

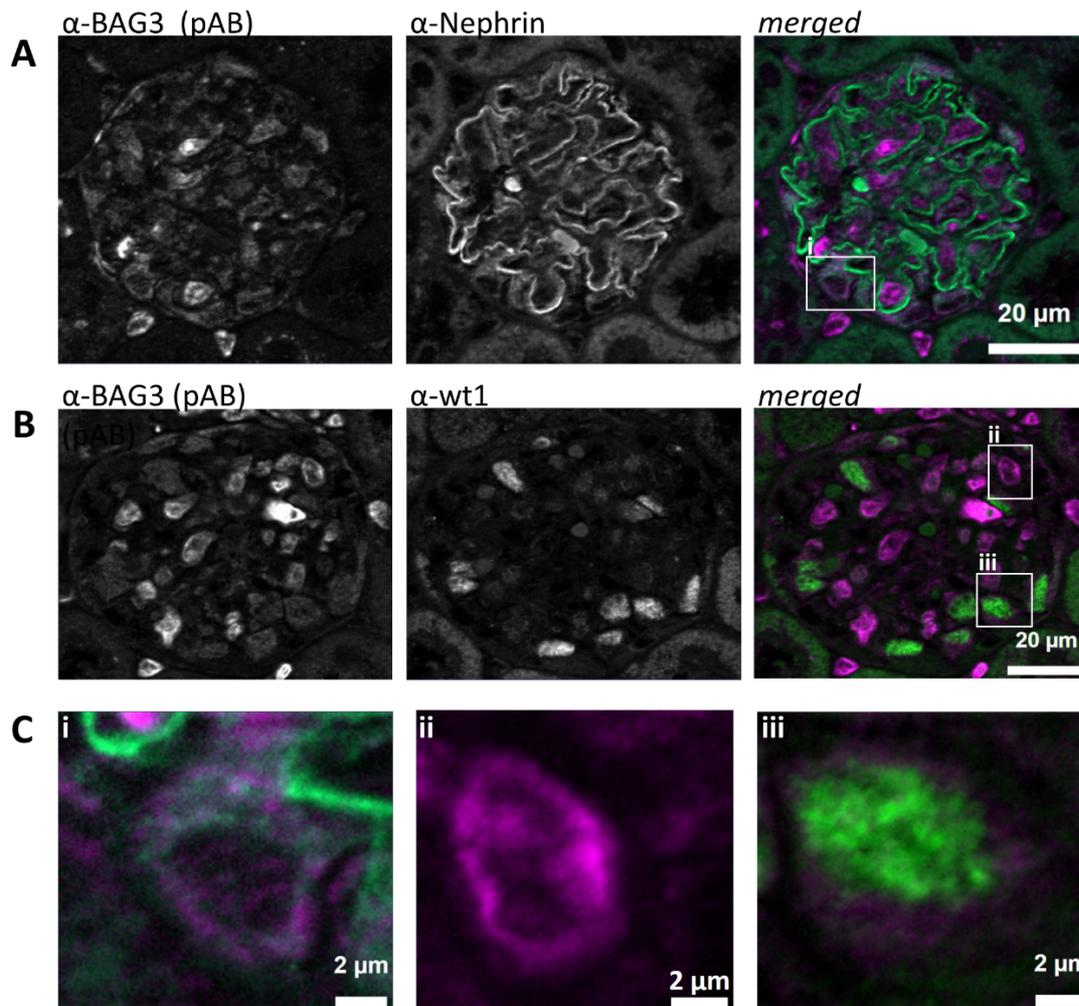


Abbildung 15: BAG3 lokalisiert in podozytären und nicht-podozytären Zellen des Glomerulus

Immunfluoreszenzbilder von paraffineingebetteten Nieren der Maus. **(A)** BAG3 wird im Podozyten exprimiert. BAG3-Signale sind bei Co-Färbung mit dem Schlitzmembranprotein Nephrin nahe der Schlitzmembran erkennbar (magenta: α -BAG3 (pAB); grün: α -Nephrin). **(B)** BAG3 lokalisiert im Zytoplasma der Podozyten. Durch Co-Färbung des podozytenspezifischen Proteins Wt1 konnte die Expression von BAG3 im Podozyten verifiziert werden (magenta: α -BAG3 (pAB); grün: Wt1 Färbung mit Zenon Kit; n=2). **(C)** Vergrößerte Darstellung aus A und B i) Vergrößerung eines Podozyten; ii) Vergrößerung einer nicht-podozytären Zelle; iii) Vergrößerung eines Podozyten; Maßstab: 2 μ m

4.7 BAG3 Lokalisation in einem BAG3^{P209L} Überexpressionsmausmodell

Zum Abschluss dieser Arbeit wurden mögliche Einflüsse der Mutation BAG3^{P209L} auf die Struktur der Schlitzmembran und die Lokalisation von BAG3 im Glomerulum untersucht. Dafür wurden die Glomeruli homozygoter BAG3^{P209L} Mäuse untersucht. Bei diesen Mäusen handelt es sich um eine mit PGK-Cre Mäusen verpaarte transgene BAG3^{P209L} Linie (LSL-hBAG3-P209L-eGFP). Diese Mauslinie wurde von Kimura et al. eingeführt und weist eine gute

Überlappung mit den menschlichen Folgen der Mutation auf. Schon kurz nach der Geburt konnte ein vermindertes Größenwachstum, eine verminderte Gewichtszunahme, muskuloskelettale Schwächen und eine ausgeprägte restriktive Kardiomyopathie beobachtet werden. Aufgrund der schwerwiegenden Symptome erreichten die Tiere nur ein Alter von 5 Wochen⁸¹. BAG3^{P209L} wird im gesamten Körper dieser Mäuse exprimiert, weshalb sich diese auch zur Untersuchung der Folgen einer BAG3^{P209L} Mutation in der Niere eignet. Paraffinschnitte dieser Linie wurden für IF mit BAG3 und Nephrin angefärbt. BAG3 Signale sind dabei auch „außerhalb“ der Schlitzmembran zu sehen, also in dem Bereich, in dem Podozyten erwartet werden. Zudem erscheint das Färbemuster von Nephrin teilweise inhomogen und granulär. Dieses Muster steht im Kontrast zu dem physiologischen, eher girlandenförmigen Nephrinsignal (Abbildung 15). Das Färbemuster könnte möglicherweise ein Hinweis für eine Schädigung der Schlitzmembran sein (Abbildung 16).

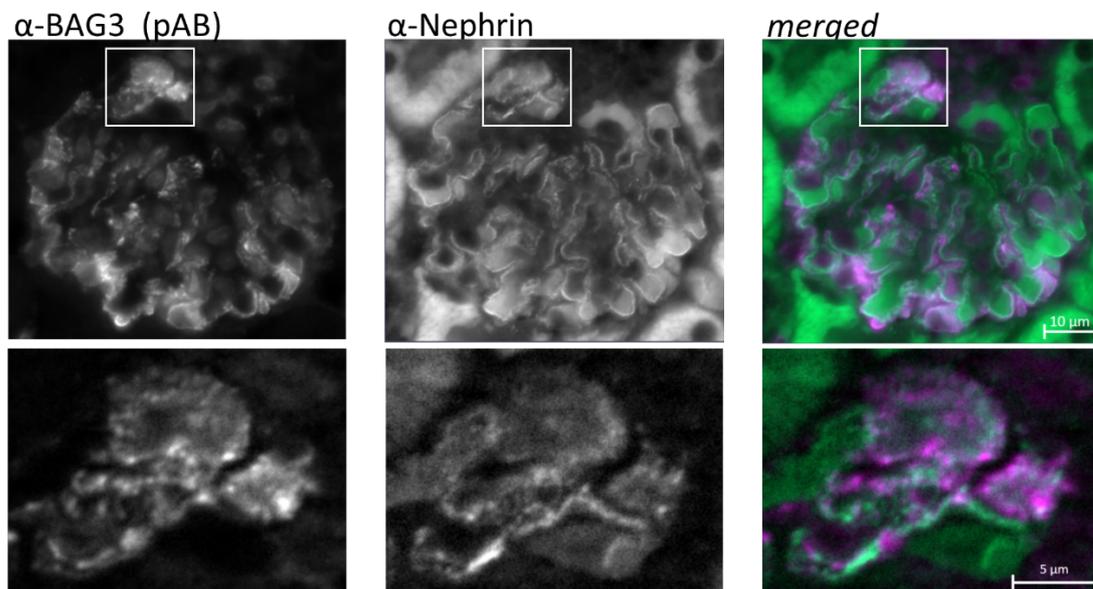


Abbildung 16 BAG3 Lokalisation in einem BAG3^{P209L} Überexpressionsmodell

Immunfluoreszenzbilder von BAG3^{P209L} Überexpressionsmäusen auf Paraffin. BAG3^{P209L} ist im Podozyten lokalisiert. Zudem erscheint das Färbemuster von Nephrin inhomogen und granulär (magenta: α-BAG3 (pAB), grün: α-Nephrin; n=4).

5 Diskussion

5.1 Etablierung der BAG3-Antikörper

Um den BAG3 Komplex im Podozyten untersuchen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass die beiden verwendeten Antikörper BAG3 hinreichend erkennen.

Im Immunoblot entsprechen die gezeigten molekularen Banden von endogenem BAG3 (~85 kDA) in etwa dem beschriebenen Molekulargewicht von 80 kDA⁵⁰. Die leichte Erhöhung ist möglicherweise durch posttranslationale Modifikationen des Proteins zu erklären. Auch bei der Überexpression mit F.BAG3 zeigt sich eine Zunahme des Molekulargewichts (Abbildung 5). Diese Veränderung erklärt sich teilweise durch das N-Terminus angehängte 3xFLAG-Tag, welches einem Molekulargewicht von 2,7 kDa entspricht. Die weitere Erhöhung könnte ebenfalls durch posttranslationale Modifikationen bedingt sein. Neben den Daten des IB, geben auch die Daten der Überexpressions-IF in HEK293T gute Anhaltspunkte dafür, dass die Antikörper BAG3 spezifisch erkennen (Abbildung 4). Um endgültige Sicherheit über die Spezifität der Färbungen im IB und IF zu bekommen, könnten die Experimente um Färbungen von BAG3 *knock-down* oder *knock-out* Zellen ergänzt werden. Hier könnte siRNA/shRNA oder CRISPR/Cas9 basiertes *Genome Editing* zum Einsatz kommen. Da die hier gezeigten Daten jedoch den erwarteten Ergebnissen entsprachen, wurden die Antikörper von uns als vertrauensvoll eingestuft und weitergenutzt. Ein weiteres starkes Argument für die Spezifität beider Antikörper waren in der Folge die MS Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen. Hier ist BAG3 in beiden Datensätzen höchst prominent nachweisbar.

Unterschiede zwischen den beiden α -BAG3 Antikörpern zeigten sich bei Co-IP der Ubiquitin-Ligase CHIP. Nur der α -BAG3 (mAB) konnte diesen beschriebenen Interaktor mitziehen (Abbildung 6). Eine mögliche Erklärung könnten die unterschiedlichen Epitope der ABs sein (Abbildung 2). Der α -BAG3 (pAB) wurde gegen den BAG3 Proteinabschnitt vom C-Terminus bis über die PxxP-Region hinaus immunisiert. Dazwischen liegt u.a. die BAG Domäne. An dieser Stelle interagiert BAG3 z.B. mit Hsc70 und HSF1^{47,55}. Es ist daher vorstellbar, dass ein Teil des polyklonalen α -BAG3 (pAB) Antiserums an dieser Stelle bindet und damit eine Interaktion von BAG3 mit Hsc70 erschwert. Dadurch kann weniger Hsc70 co-immunpräzipitiert werden. Nach einem Modell von Arndt et. al. bindet CHIP direkt an Hsc70 und damit nur indirekt an BAG3³⁶. Möglicherweise wurde in den gezeigten IPs zwar genug Hsc70 präzipitiert, die Menge an CHIP könnte jedoch unterhalb der Nachweisgrenze des IBs gelegen haben. Eine weitere denkbare Erklärung für das Ergebnis könnten sterische Interaktionen zwischen den α -BAG3 (pAB) Antikörpern und der Bindung von CHIP an Hsc70 sein. Das Immunogen des α -BAG3 (mAB) hingegen beginnt am C-Terminus des BAG3 Proteins und überragt nur einen kleinen Teil der BAG-Domäne (Abbildung 2). Da es sich um einen monoklonalen AB

handelt, richtet sich dieser auch nur gegen ein Epitop des Proteins und sollte dementsprechend an der Bindungsstelle mit Hsc70 weniger/keine sterischen Interaktionen aufweisen. Möglicherweise wird daher das Chaperon Hsc70 im Vergleich zum α -BAG3 (pAB) besser präzipitiert. Als Folge dessen steigt auch die Konzentration von CHIP, welches nun innerhalb der Nachweisgrenze des IB liegt (Abbildung 6 B). Bei der gemeinsamen Positivkontrolle dieser IPs (FLAG M2 Beads) sind sterische Interaktionen hingegen nahezu ausgeschlossen, da sich das FLAG Tag von F.BAG3 außerhalb der BAG3 Proteinsequenz befindet. Daher war hier die Co-IP von CHIP erfolgreich. Als weitere Bestätigung für die Funktionsfähigkeit der beiden α -BAG3 Antikörper können zudem die MS-Daten gewertet werden (s.u.).

Bei der Etablierung des α -BAG3 (pAB) für die *in vivo* IF sei noch darauf hingewiesen, dass in der Negativkontrolle weiterhin schwache BAG3 Signale erkannt wurden (Abbildung 14). Dies könnte an den Limitierungen der Negativkontrolle liegen. Bei dieser ist aus stochastischer Sicht nicht davon auszugehen, dass jeder Antikörper von einem Immunisationspeptid gebunden werden kann. Dementsprechend werden die (ungebundenen) AB auch weiterhin endogenes BAG3 auf der Probe erkennen und schwache BAG3 Signale in der IF zeigen. Zudem erlaubt diese Negativkontrolle keine Aussage darüber, welche Bindungen des ABs unspezifisch für BAG3 sind. Zwar kodiert das Fusionsprotein eine bestimmte Aminosäuresequenz, die für das humane BAG3 spezifisch ist. Allerdings ist der α -BAG3 (pAB) ein polyklonales Antiserum. Das bedeutet, dass dieser AB aus einer Mischung verschiedener Antikörper besteht, welche wiederum gegen unterschiedliche Epitope des BAG3 Immunogens gerichtet sind. Diese Epitope sind jedoch nicht ausschließlich auf dem BAG3 Protein zu finden, weshalb der Antikörper auch andere Proteine anfärben könnte. Die hier gewählte Negativkontrolle kann daher keinen Aufschluss darüber geben, welche Färbungen des α -BAG3 (pAB) möglicherweise unspezifisch sind und nicht BAG3 entsprechen. Da die gewählte Negativkontrolle schnell durchführbar war und sich zudem mit den erwarteten Ergebnissen deckte, wurden weitere Experimente mit dem α -BAG3 (pAB) *in vivo* durchgeführt.

Um in Zukunft jedoch eine verbindliche Aussage über die Vertrauenswürdigkeit des AB treffen zu können, sollten BAG3 *knock-out* Mäuse untersucht werden. Zu diesem Zweck könnte beispielsweise eine BAG3 flox Linie mit der podozytenspezifischen Pod.2a:Cre Linie verpaart werden⁸². Durch das BAG3-Defizit ist gewährleistet, dass jede weiterhin sichtbare Färbung durch unspezifische Bindungen des Antikörpers entsteht. Gleichzeitig könnte dadurch untersucht werden, welche Folgen ein BAG3-Defizit im Podozyten hat. Bekannt ist bereits, dass ein BAG3 *knock out* im gesamten Körper zu vermindertem Größenwachstum, der Entstehung einer Myopathien und einer erhöhten Letalität führt⁵⁷. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine BAG3 Haploinsuffizienz in Mäuse mit diabetischer Nephropathie eine höhere Albuminurie und eine raschere Progredienz der Nierenschädigung bedingt⁶⁰. Die

Generierung eines podozytenspezifischen BAG3 Defizits könnte daher auch Aufschluss darüber geben, ob diese erhöhte Krankheitsanfälligkeit direkt auf Podozyten oder auf andere glomeruläre Zellen, die Mikrozirkulation oder systemische Effekte zurückzuführen ist.

5.2 BAG3 Expression

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BAG3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Podozyten exprimiert wird (Abbildung 7; Abbildung 15). *In vivo* ist BAG3 sowohl in Podozyten als auch in nicht podozytären Zellen erkennbar (Abbildung 15). Diese Ergebnisse korrespondieren gut mit der Erkenntnis, dass BAG3 ubiquitär exprimiert wird. Bekannt ist jedoch auch, dass sich Unterschiede in der Quantität der BAG3 Expression zwischen den Zellarten zeigen. So finden sich u.a. in quergestreiften Muskelzellen und Kardiomyozyten konstitutiv erhöhte Mengen an BAG3^{47,57}. Erste unveröffentlichte MS Daten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits eine etwa zweifache Anreicherung von BAG3 im Vergleich zu nicht podozytären Zellen zeigen. Die Expressionsunterschiede von BAG3 im Verhältnis zwischen Podozyten und anderen Nierenzellen - insbesondere unter Stressbedingungen (s.u.) - sollte in Zukunft u.a. mittels IF, IB und MS eingehender untersucht werden.

Die gezeigte Lokalisation von BAG3 im Zytosol der Podozyten deckt sich mit den meisten anderen beschriebenen Zellarten⁴⁷. Zur weiteren Bestimmung der genauen subzellulären Lokalisation des BAG3-Komplexes in Relation zur Schlitzmembran könnte in Zukunft die hochauflösende STED-Mikroskopie verwendet werden. Dabei sollte ebenfalls auf eine Lokalisationsveränderung von BAG3 unter Stressbedingungen geachtet werden (s.u.)

In humanen Podozyten scheint die Lokalisation nämlich abhängig von der Differenzierung der Zellen zu sein (Abbildung 7). In bereits differenzierten Zellen wurde BAG3 ebenfalls überwiegend im Zytosol erkannt. In proliferierenden, undifferenzierten Zellen, wurde BAG3 jedoch vermehrt im Zellkern angefärbt. Eine solche nukleäre Lokalisation wurde bereits in anderen Zellarten (z.B. Gliazellen) beschrieben⁸³. Auch finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass BAG3 unter erhöhtem zellulären Stress vermehrt im Zellkern und perinukleär in sog. Aggresomen exprimiert wird^{44,52}. Es ist daher denkbar, dass der erhöhte Stress während der Zellteilung für die Lokalisation von BAG3 im Zellkern verantwortlich ist. Passend dazu konnte bereits gezeigt werden, dass BAG3 und HSPB8 an der Zellteilung beteiligt sind. BAG3 übernimmt dabei u.a. Aufgaben an der korrekten Ausrichtung des Spindelapparates, sowie an der Trennung der Chromosomen (Segregation) während der Mitose⁸⁴.

5.3 Die BAG3^{P209L} Mutation: Eine potenzielle Ursache podozytärer Schädigungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mögliche Hinweise für eine Rolle von BAG3 in der Entstehung podozytärer Erkrankungen gesammelt werden. Dafür wurde die Mutation

BAG3^{P209L} untersucht. Diese dominant negative Mutation führt zur Aggregation von dysfunktionalen BAG3-Komplexen und verursacht dadurch Muskeldystrophie und Kardiomyopathie im Jugendalter⁴². Über eine schädigende Rolle der Mutation in der Niere ist bislang nur wenig bekannt. In vorangegangenen Experimenten dieser Arbeitsgruppe konnte bereits eine Mikroalbuminurie und eine glomeruläre Hypertrophie in homozygoten BAG3^{P209L} dieser Mauslinie gezeigt werden (unveröffentlichte Daten). Eine mögliche Erklärung für diese Pathologien liefert Abbildung 16. Unter physiologischen Bedingungen zeigt das Schlitzmembranprotein Nephrin ein girlandenförmiges Muster (Abbildung 15). Das Nephrinmuster der homozygoten BAG3^{P209L} Mäuse erscheint hingegen inhomogen granulär (Abbildung 16). Die Mutation BAG3^{P209L} führt also möglicherweise zu einer morphologischen Veränderung der Schlitzmembran. Es ist vorstellbar, dass die BAG3^{P209L} Mutation auch im Podozyten zur Entstehung funktionslose Aggregate führt, welche die zelluläre Integrität stören. Sollte der BAG3 Komplex im Podozyten - wie in anderen Zellarten – an Filamin binden, könnte die Aggregation zu einer höheren Konzentration von Filamin führen. Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration des Subtyps Filamin B unter mechanischem Stress mit erhöhter Proteinurie korreliert⁸⁵. Die vermutete podozytäre Schädigung sollte in weiteren Experimenten beispielsweise mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden. Dadurch können Veränderungen der Ultrastruktur der Podozyten-Fußfortsätze evaluiert und mittels Fusionierung quantifiziert werden, sowie eine Interaktion von Filamin und BAG3 nachgewiesen werden. Es sei zudem darauf hingewiesen, dass die hier verwendeten Mäuse aufgrund ihres ausgeprägten Phänotyps bereits nach 5 Wochen getötet werden mussten (s.o.)⁸¹. Die beobachtete Mikroalbuminurie könnte daher im weiteren zeitlichen Verlauf der Erkrankung durchaus ausgeprägter ausfallen. Um die Entwicklung der Schädigung des Nierenfilters über einen längeren Zeitraum beurteilen zu können, könnte die Generierung einer podozytenspezifischen BAG3^{P209L} Mauslinie erfolgen. Hierfür könnte z.B. die bereits verwendete LSL-hBAG3-P209L-eGFP Linie mit der podozytenspezifischen Pod.2a:Cre Linie verpaart werden^{81,82}.

In HEK293T Zellen fiel zudem auf, dass sich die Intensität der Banden in Pellet und Lysat von F.BAG3 und F.BAG3^{P209L} unterscheiden (Abbildung 5). Es ist denkbar, dass der BAG3^{P209L}-Komplex aufgrund einer Aggregation nicht oder nur unvollständig in Lösung gebracht werden kann. Dies könnte erklären, warum der BAG3 Anteil innerhalb der nicht verdauten Zellbestandteile (Pellet) höher erscheint als im Lysat. Eine solche verminderte Lösbarkeit und Aggregation von BAG3^{P209L} im Pellet konnte in einem ähnlichen Experiment bereits im Mausmodell in Kardiomyozyten beobachtet werden⁸¹. Um jedoch eine fundierte Aussage über die Aggregationstendenz von BAG3^{P209L} in Nierenzellen treffen zu können, sind weitere Untersuchung -insbesondere eine Quantifizierung- notwendig. Um die podozytenspezifische

Aggregationstendenz der Mutation zu erörtern, sollte das Experiment zudem in humanen Podozyten wiederholt werden.

5.4 Das BAG3 Interaktom in differenzierten humanen Podozyten

Die Zusammensetzung des mechanoprotektiven BAG3-Komplexes im Muskel und anderen Zellen ist gut beschrieben³⁶. Mit welchen Proteinen BAG3 im Podozyten interagiert, war jedoch bislang unbekannt.

5.4.1 Bewertung der Datenqualität

Die gute Qualität des verwendeten BAG3 Interaktoms zeigt sich in der hierarchischen Clusteranalyse und der Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 9, Abbildung 10). Interessanterweise weist die erste Hauptkomponentenanalyse daraufhin, dass größere Unterschiede zwischen den Daten der beiden α -BAG3 ABs liegen, als zwischen ihren jeweiligen Negativkontrollen. Eine Erklärung hierfür könnten die verschiedenen Wirte (Maus / Kaninchen) und Klonalitäten (mono-/ polyklonal) der α -BAG3 Antikörper sein. Die gewählten Negativkontrollen jedoch gleichen den α -BAG3 ABs in dieser Hinsicht. Zudem unterscheiden sich die Epitope der beiden α -BAG3 Antikörper (s.u.). Diese Unterschiede sind möglicherweise größer als die Tatsache, dass beide Antikörper gegen dasselbe Protein (BAG3) gerichtet sind. Die interexperimentellen Unterschiede der zweiten Hauptkomponentenanalyse haben vermutlich technische und keine biologischen Ursachen. Beispielsweise kann es zu geringen Unterschieden in der Konfluenz der Zellen gekommen sein. Auch technische Unterschiede, wie Ungenauigkeiten beim Pipettieren, sind möglich. Zudem wurden die Experimente u.a. an unterschiedlichen Tagen und Uhrzeiten durchgeführt. Diese nicht/schwer vermeidbaren Unterschiede zwischen verschiedenen Experimenten, werden als sog. *Batch* Effekt beschrieben und stellen eine große Herausforderung in MS-Untersuchungen dar⁸⁶. Insgesamt liegt die Varianz in diesen Daten jedoch im erwarteten Rahmen.

In den MS Daten fällt zudem auf, dass der der α -BAG3 (mAB) deutlich geringere Mengen biologisch relevanter Proteine (29) präzipitiert als der α -BAG3 (pAB) (63). Dieser Unterschied erklärt sich vermutlich durch die verschiedenen Klonalitäten der Antikörper. Der α -BAG3 (mAB) ist als monoklonaler AB nur gegen ein Epitop gerichtet. Dementsprechend kann nur ein Proteinabschnitt von BAG3 erkannt werden. Der polyklonale α -BAG3 (pAB) besteht hingegen aus einer Mischung verschiedener Antikörper, welche wiederum gegen unterschiedliche Epitope des BAG3 Proteins gerichtet sind. Nun stellt jede Antikörperbindung potenziell ein sterisches Hindernis dar, welches zum Verlust von Interaktoren führen kann. Dieser Nachteil wird bei dem polyklonalen Antikörper jedoch durch die verschiedenen Epitope ausgeglichen. Zwar blockieren die unterschiedlichen Antikörper potenzielle Interaktionsstellen, jedoch nicht dieselben. Der monoklonale Antikörper hingegen bindet stets an dasselbe Epitop und verdrängt dadurch potentiell immer dieselben Interaktoren. Eine weitere Ursache für die

Mengenunterschiede könnte durch die dreidimensionale Struktur des BAG3 Proteins erklärt werden. Das Protein ist möglicherweise nicht immer identisch gefaltet, wodurch nicht immer dieselben Bindungsstellen angreifbar sind. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, eine passende Bindungsstelle zu finden, für einen der polyklonalen Antikörper höher als für den immer gleich aufgebauten monoklonalen Antikörper. Die unterschiedliche Zahl der Interaktoren liegt daher in einem erwartbaren Rahmen. Auf Grund des Einsatzes des statistischen Mittels der Imputation, könnten zudem einige Proteine falsch negativ oder falsch positiv geworden sein. Daher sollten für die Validierung interessanterer Interaktoren (s.u.) weitere Experimente wie IF, IB oder IP durchgeführt werden. Zudem stehen mittlerweile moderner MS Messmethoden wie die *data-independent acquisition* (DIA) zu Verfügung. Diese produzieren weniger fehlende Werte, weshalb in zukünftigen Experimenten ggf. auf die Imputation verzichtet werden könnte⁸⁷.

5.4.2 Diskussion bekannter und neuer Interaktoren

Im Hinblick auf bereits bekannte Interaktoren, ist die Interaktion von BAG3 mit dem Chaperon Hsc70 – auf die beide Antikörper hinweisen - besonders interessant. Zudem zeigt der α -BAG3 (pAB) eine Interaktion mit dem kleinen Hitzeschockprotein HSPB8. BAG3, Hsc70 und HSPB8 sind Bestandteile eines Komplexes, der in quergestreifter Muskulatur unter mechanischem Stress die sog. *chaperone assisted selective autophagie* (CASA) einleitet. CASA und BAG3 erkennen dabei mechanisch geschädigtes Filamin, bauen dieses ab und sind für dessen Resynthese verantwortlich. Auf diese Weise hat CASA einen entscheidenden Einfluss auf den Erhalt der zellulären Integrität der Myozyten unter mechanischem Stress^{25,36,33}. Möglicherweise spielen BAG3 und CASA in ähnlicher Weise auch im Podozyten eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Aktinzytoskeletts.

In humanen Podozyten konnte allerdings eine wichtige Komponente des Komplexes - die Ubiquitin-Ligase CHIP - nicht gefunden werden. Im Allgemeinen sind für den Verlust potenzieller Interaktoren eine Vielzahl von Gründen denkbar. So bindet CHIP nach einem Modell von Arndt et. al. direkt an Hsc70 und damit nur indirekt an BAG3³⁶. Eine sehr gut vorstellbare Ursache könnten daher erneut Bindungsprobleme mit den Antikörpern sein (s.o.). Auch ist es denkbar, dass die gewählte Zelllinie (humane Podozyten) nicht alle Proteine exprimiert, mit denen BAG3 *in vivo* interagiert. So scheint CHIP z.B. grundsätzlich in der Niere (HEK293T Zellen) mit BAG3 zu interagieren (Abbildung 6). Ein weiteres Problem könnte die gewählte Negativkontrolle darstellen. Potenzielle Interaktoren von BAG3 könnten unspezifisch an FLAG gebunden haben. Unspezifisch gebundene Proteine tauchen jedoch nicht auf der Seite der signifikanten Kandidaten im *Volcano Plot* auf. Um diese Möglichkeit in zukünftigen Experimenten zu vermeiden, könnten BAG3 *knock out* Zellen als Negativkontrolle verwendet werden.

Auch das Substratprotein der CASA – Filamin – konnte in diesem Datensatz nicht gefunden werden. Neben den oben genannten Ursachen könnte eine plausible Erklärung für den Verlust dieses Proteins auch der Versuchsaufbau sein. Die hier gezeigten Experimente wurden bewusst unter möglichst schonenden Bedingungen durchgeführt, um ein erstes grundsätzliches Verständnis über das BAG3 Interaktom im Podozyten zu erlangen. Wie oben beschrieben tritt BAG3 jedoch erst mit Filamin in Interaktion, wenn dieses beschädigt wurde^{25,36}. Es ist daher gut vorstellbar, dass Filamin unter den hier gewählten Umständen nicht oder nicht ausreichend gestresst wurde und es folglich nicht zu einer Interaktion mit BAG3 kam (s.u.). Neben Gründen des Versuchsaufbaus kommen auch biologische Ursachen als mögliche Erklärung in Betracht. Denkbar wäre beispielsweise., dass sich CASA im Podozyten hinsichtlich des Substratproteins (im Muskel Filamin) und/ oder der Ubiquitinligase (im Muskel CHIP) von der selektiven Autophagie in Muskelzellen unterscheidet.

Die Interaktionspartner von BAG3 im Podozyten könnten sich zudem in mancherlei Hinsicht von anderen bereits untersuchten Zellarten unterscheiden, wie die Vielzahl bislang nicht beschriebener Interaktoren nahelegt (Abbildung 13). Unter diesen potentiellen Interaktoren finden sich mit KIF5B, KIF5A, TUBA1B und DNM2 einige Mikrotubuli assoziierte Proteine (Tabelle 16). Über diese könnte BAG3 den Transport der Substratproteine zu den perinukleären Aggresomen vermitteln, in denen die BAG3 vermittelte Makroautophagie durchgeführt wird. Dieser Transportmechanismus konnte bereits in anderen Zellarten mit anderen mikrotubuliassoziierten Proteinen beschrieben werden^{44,52,56,88}. Unter diesen Proteinen ist DNM2 besonders bemerkenswert. DNM2 und andere Enzyme der Dynaminfamilie wurden bereits mit der Mechanobiologie von Podozyten in Verbindung gebracht. Dynamin bindet direkt an Aktin und übernimmt damit vermutlich eine aktive Rolle in der Aufrechterhaltung des Aktinzytoskeletts^{89,90}. Zudem scheint Dynamin eine Rolle in der Entstehung/ Protektion von Nierenerkrankungen zu spielen. In verschiedenen Tiermodellen mit chronischer und akuter Niereninsuffizienz führte eine erhöhte Dynamin Aktivität zu einer deutlichen Verbesserung der krankheitsbedingten Symptome. Unter anderem konnte eine Senkung der Proteinurie und einer Verlängerung der Lebenszeit der Zelle festgestellt werden. Es wurde zudem beobachtet, dass die Ultrastruktur der Podozytenfußfortsätze wiederhergestellt werden konnte. Die Autoren vermuten daher, in Proteinen der Dynaminfamilie einen vielversprechenden Ansatz für die Behandlung chronischer und akuter Nierenerkrankungen gefunden zu haben⁹¹. In Bezug auf BAG3 könnte es lohnenswert sein zu untersuchen, ob eine erhöhte BAG3 Aktivität- möglicherweise im Zusammenspiel mit DNM2 – einen ähnlichen Effekt auf die Pathophysiologie der Podozyten hat.

Ein weiterer interessanter Kandidat ist die GTPase *Ras homolog family member A* (RhoA). RhoA ist an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie der Zellbeweglichkeit,- entwicklung und -polarität beteiligt und spielt zudem eine Rolle in der Instandhaltung des Aktinzytoskeletts aller

eukaryonter Zellen, also auch im Podozyten⁹². Unter physiologischen Bedingungen hat RhoA einen protektiven Einfluss auf die Struktur der Podozytenfußfortsätze, und soll dadurch das sog. *podocyte effacement* verhindern⁹³. Der Verlust von RhoA hingegen ist mit Proteinurie und podozytären Zelltod assoziiert^{94,95}. Für diese Arbeit ist zudem die bereits beschriebene Interaktion von RhoA und Synaptopodin (SYNPO) im Podozyten bemerkenswert. SYNPO bindet an RhoA und stabilisiert es auf diese Weise. Wird die Bindung aufgelöst, kommt es hingegen zur Ubiquitinierung und proteasomaler Degradation von RhoA. Dadurch könnte SYNPO im Podozyten Einfluss auf die Stabilisierung des Aktinzytoskeletts haben⁹⁶. Wie oben beschrieben ist das verwandte SYNPO2 im Muskel gemeinsam mit dem BAG3 Komplex an der CASA beteiligt. Es hat damit entscheidenden Anteil an der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität von mechanisch beanspruchten Muskelzellen^{25,97}. In zukünftigen Experimenten könnte es daher lohnenswert sein, zu untersuchen, ob im Podozyten eine RhoA vermittelte Interaktion zwischen BAG3 und SYNPO existiert. Bemerkenswerterweise wurde zudem postuliert, dass RhoA und Dynamin im Podozyten – auf noch unbekannte Weise – miteinander interagieren und dadurch gemeinsam an der Instandhaltung des Zytoskeletts beteiligt sind⁹³. Auch auf Grund der vielfältigen Funktionen von RhoA und DNM2 – v.a. in Bezug auf die Instandhaltung des Aktinzytoskeletts – erscheint es sinnvoll, die Interaktion mit BAG3 eingehender zu untersuchen.

Ein möglicher nukleärer Interaktionspartner von BAG3 könnte Nukleoporin 35 (NUP35) sein. Nukleoporine sind essentielle Bestandteile der Kernporen und sind als solche an dem Transport von Molekülen in und aus dem Zellkern beteiligt⁹⁸. Mutationen in verwandten Nukleoporinen, wie u.a. NUP93 und NUP205 konnte bereits als Ursache für die Entstehung von primären FSGS herausgearbeitet werden⁹⁹. Eine Interaktion von BAG3 und NUP35 sollte auch deshalb genauer beleuchtet werden, da bislang noch immer davon ausgegangen wird, dass ein Großteil der FSGS hervorrufenden Mutationen unbekannt sind¹⁰⁰. Es ist zudem denkbar, dass BAG3 eine protektive Rolle in der Entstehung dieser podozytären Erkrankung spielt.

5.4.3 Fazit und Ausblick

Die weitere Erforschung von BAG3 als potentiell wichtigem Mechanoprotektor im Podozyten erscheint angesichts der hier gezeigten Daten durchaus lohnenswert. Schon unter basalen Stressbedingungen konnte BAG3, sowie einer Reihe bekannter und neuer vielversprechender Interaktoren nachgewiesen werden. Es erscheint durchaus möglich, dass das Co-Chaperon über den Weg der BAG3 vermittelten selektiven Autophagie an der Mechanoprotektion der Podozyten beteiligt ist. BAG3 könnte im Podozyten für den Erhalt des Aktinzytoskeletts unter Stress verantwortlich sein, in dem es beschädigte Anteile erkennt, abbaut und resynthetisiert. Ähnlich verhält sich BAG3 in der quergestreiften Muskulatur^{25,36,33}. Dieser Reparaturmechanismus könnte eine Erklärung dafür liefern, wie es dem Podozyten gelingt die

andauernden mechanischen Belastung durch den pulsatischen Blutdruck und die Filtration auszuhalten². Auch könnte BAG3 auf diese Weise eine protektive Rolle in der Entstehung podozytären Erkrankung spielen. Um diese Hypothese zu erhärten, sollten zukünftig weitere massenspektrometrische Experimente durchgeführt werden. Zunächst sollten die hier gezeigten Experimente in gestressten, humanen Podozyten wiederholt werden. Hierfür könnte beispielsweise der Proteasom-Inhibitor MG-132 verwendet werden, der bereits in anderen Zellearten (u.a. HEK293T) zur Untersuchung von BAG3 unter zellulärem Stress verwendet wurde^{88,101}. Es ist gut möglich, dass BAG3 - analog zu anderen Zellarten - erst unter zellulärem Stress hochreguliert wird. Dies wird durch den sog. *BAG1 to BAG3 switch* beschrieben. Dieser postuliert, dass die Proteolyse unter physiologischen Bedingungen BAG1 vermittelte über das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) gesteuert wird. Erst bei zellulärem Stress überwiegt die BAG3 vermittelte selektive Autophagie^{25,43}. Auch eine Veränderung der Interaktionspartner unter zellulärem Stress ist durchaus vorstellbar und konnte bereits in HEK293T Zellen beobachtet werden⁸⁸. Auf diese Weise könnte auch in Bezug auf eine Interaktion von BAG3 mit Filamin A neue Erkenntnisse gewonnen werden. Zur besseren Vergleichbarkeit sollten dabei BAG3 *knock out* Zellen als Negativkontrollen verwendet werden. Für die weitere Annäherung an die reale Situation im Menschen sollten – wenn möglich – ungestresste und gestresste murine Zellen *in vivo* untersucht werden. Dafür können beispielsweise isolierte Glomeruli oder über FACS sortierte Podozyten untersucht werden. Dadurch könnten die Ungewissheiten aus den *in vitro* Ergebnissen reduziert werden

6 Literaturverzeichnis

1. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 2016; **11**(7): e0158765.
2. Brinkkoetter PT, Ising C, Benzing T. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nat Rev Nephrol* 2013; **9**(6): 328-36.
3. Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004; **15**: 1382-91.
4. Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; **14**(3): 211-6.
5. Ly J, Alexander M, Quaggin SE. A podocentric view of nephrology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; **13**(3): 299-305.
6. Huang TW, Langlois JC. Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *J Exp Med* 1985; **162**(1): 245-67.
7. Kerjaschki D. Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases. *Kidney Int* 1994; **45**(2): 300-13.
8. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; **88**(2): 451-87.
9. Endlich N, Endlich K. The Challenge and Response of Podocytes to Glomerular Hypertension. *Seminars in Nephrology* 2012; **32**: 327-41.
10. Endlich K, Kliewe F, Endlich N. Stressed podocytes—mechanical forces, sensors, signaling and response. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2017; **469**(7): 937-49.
11. Endlich N, Endlich K. The challenge and response of podocytes to glomerular hypertension. *Semin Nephrol* 2012; **32**(4): 327-41.
12. Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit diaphragm - From a thin grey line to a complex signalling hub. *Nature Reviews Nephrology*; 2013.
13. Grahammer F, Wigge C, Schell C, et al. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. *JCI Insight* 2016; **1**(9).
14. Huber TB, Schermer B, Benzing T. Podocin Organizes Ion Channel-Lipid Supercomplexes: Implications for Mechanosensation at the Slit Diaphragm. *Nephron Experimental Nephrology* 2007; **106**(2): e27-e31.
15. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* 2004; **43**(2): 368-82.
16. James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet (London, England)* 2010; **375**(9722): 1296-309.
17. James MT, Hemmelgarn BR, Wiebe N, et al. Glomerular filtration rate, proteinuria, and the incidence and consequences of acute kidney injury: a cohort study. *Lancet (London, England)* 2010; **376**(9758): 2096-103.
18. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 2001; **345**(12): 851-60.
19. Schrier RW. Blood pressure in early autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine* 2015; **372**(10): 976-7.
20. Mann JF, Schmieder RE, Dyal L, et al. Effect of telmisartan on renal outcomes: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 2009; **151**(1): 1-10, w1-2.
21. Li N, Lv D, Zhu X, et al. Effects of SGLT2 Inhibitors on Renal Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease: A Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)* 2021; **8**: 728089.
22. Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med* 2019; **380**(24): 2295-306.
23. Fioretto P, Zambon A, Rossato M, Busetto L, Vettor R. SGLT2 Inhibitors and the Diabetic Kidney. *Diabetes Care* 2016; **39 Suppl 2**: S165-71.
24. Behl C. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol Sci* 2016; **37**(8): 672-88.
25. Ulbricht A, Eppler Felix J, Tapia Victor E, et al. Cellular Mechanotransduction Relies on Tension-Induced and Chaperone-Assisted Autophagy. *Current Biology* 2013; **23**: 430-5.
26. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008; **319**(5865): 916-9.
27. Hipp MS, Park SH, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol* 2014; **24**(9): 506-14.
28. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004; **10 Suppl**: S10-7.
29. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 2013; **82**: 323-55.
30. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 959-91.
31. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; **381**(6583): 571-9.
32. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**(6): 574-81.

33. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; **19**(1): 4-19.
34. Ketteren N, Dreiseidler M, Tawo R, Hohfeld J. Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem* 2010; **391**(5): 481-9.
35. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem* 2017; **86**: 193-224.
36. Arndt V, Dick N, Tawo R, et al. Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance. *Current Biology* 2010; **20**: 143-8.
37. Caplan AJ. What is a co-chaperone? *Cell Stress Chaperones* 2003; **8**(2): 105-7.
38. Takayama S, Xie Z, Reed JC. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* 1999; **274**(2): 781-6.
39. Kathage B, Gehlert S, Ulbricht A, et al. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 2017.
40. Ulbricht A, Gehlert S, Leciejewski B, Schiffer T, Bloch W, Hohfeld Jr. Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy* 2015.
41. Selcen D. Myofibrillar myopathies. *Neuromuscul Disord* 2011; **21**(3): 161-71.
42. Selcen D, Muntoni F, Burton BK, et al. Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2009; **65**(1): 83-9.
43. Gamberdinger M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 2009; **28**(7): 889-901.
44. Gamberdinger M, Kaya AM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep* 2011; **12**(2): 149-56.
45. Lei Z, Brizzee C, Johnson GV. BAG3 facilitates the clearance of endogenous tau in primary neurons. *Neurobiol Aging* 2015; **36**(1): 241-8.
46. Kruger L, Mandelkow EM. Tau neurotoxicity and rescue in animal models of human Tauopathies. *Curr Opin Neurobiol* 2016; **36**: 52-8.
47. Sturner E, Behl C. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Front Mol Neurosci* 2017; **10**: 177.
48. Rosati A, Basile A, Falco A, et al. Role of BAG3 protein in leukemia cell survival and response to therapy. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1826**(2): 365-9.
49. Felzen V, Hiebel C, Koziollek-Drechsler I, et al. Estrogen receptor alpha regulates non-canonical autophagy that provides stress resistance to neuroblastoma and breast cancer cells and involves BAG3 function. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1812.
50. Lee JH, Takahashi T, Yasuhara N, Inazawa J, Kamada S, Tsujimoto Y. Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene* 1999; **18**(46): 6183-90.
51. Bruno AP, Festa M, Dal Piaz F, et al. Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle* 2008; **7**(19): 3104-5.
52. Jin YH, Ahn SG, Kim SA. BAG3 affects the nucleocytoplasmic shuttling of HSF1 upon heat stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **464**(2): 561-7.
53. Carra S, Seguin SJ, Landry J. HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy* 2008; **4**(2): 237-9.
54. Fuchs M, Poirier DJ, Seguin SJ, et al. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J* 2009; **425**(1): 245-55.
55. Klimek C, Kathage B, Wordehoff J, Hohfeld J. BAG3-mediated proteostasis at a glance. *J Cell Sci* 2017; **130**(17): 2781-8.
56. Corboy MJ, Thomas PJ, Wigley WC. Aggresome formation. *Methods Mol Biol* 2005; **301**: 305-27.
57. Homma S, Iwasaki M, Shelton GD, Engvall E, Reed JC, Takayama S. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol* 2006; **169**(3): 761-73.
58. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; **14**(1): 105-11.
59. Edkins AL. CHIP: a co-chaperone for degradation by the proteasome. *Subcell Biochem* 2015; **78**: 219-42.
60. Lim JH, Youn D-Y, Yoo HJ, et al. Aggravation of diabetic nephropathy in BCL-2 interacting cell death suppressor (BIS)-haploinsufficient mice together with impaired induction of superoxide dismutase (SOD) activity. *Diabetologia* 2014; **57**(1): 214-23.
61. Venkatarreddy M, Cook L, Abuarquob K, Verma R, Garg P. Nephin Regulates Lamellipodia Formation by Assembling a Protein Complex That Includes Ship2, Filamin and Lamellipodin. *PLOS ONE* 2011; **6**(12): e28710.
62. Rinschen MM, Bharill P, Wu X, et al. The ubiquitin ligase Ubr4 controls stability of podocin/MEC-2 supercomplexes. *Human molecular genetics* 2016; **25**(7): 1328-44.
63. Jiao H, You H. p32: A new player in autophagy. *Molecular & cellular oncology* 2016; **3**(3): e1061097.
64. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and cellular biology* 1987; **7**: 2745-52.
65. Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2008; **424**: 349-64.
66. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-5.
67. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. Proteins. New Jersey: Humana Press; 1984. p. 41-56.

68. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979; **76**: 4350-4.
69. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016; **537**(7620): 347-55.
70. Hughes CS, Moggridge S, Muller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsvelde J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc* 2019; **14**(1): 68-85.
71. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008; **26**(12): 1367-72.
72. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 2016; **13**(9): 731-40.
73. Barnard J, Meng XL. Applications of multiple imputation in medical studies: from AIDS to NHANES. *Stat Methods Med Res* 1999; **8**(1): 17-36.
74. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de biologie clinique* 1990; **48**: 579-82.
75. Lehman IR. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 1974; **186**(4166): 790-7.
76. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**(12): 5463-7.
77. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, et al. A Conditionally Immortalized Human Podocyte Cell Line Demonstrating Nephron and Podocin Expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*; 2002; 2002. p. 630-8.
78. Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* 2003; **4**(4): 210.
79. Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**(Database issue): D535-9.
80. Kann M, Ettou S, Jung YL, et al. Genome-Wide Analysis of Wilms' Tumor 1-Controlled Gene Expression in Podocytes Reveals Key Regulatory Mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**(9): 2097-104.
81. Kimura K, Ooms A, Graf-Riesen K, et al. Overexpression of human BAG3(P209L) in mice causes restrictive cardiomyopathy. *Nat Commun* 2021; **12**(1): 3575.
82. Koehler S, Braehler S, Braun F, et al. Construction of a viral T2A-peptide based knock-in mouse model for enhanced Cre recombinase activity and fluorescent labeling of podocytes. *Kidney Int* 2017; **91**(6): 1510-7.
83. Gentilella A, Khalili K. Autoregulation of co-chaperone BAG3 gene transcription. *J Cell Biochem* 2009; **108**(5): 1117-24.
84. Fuchs M, Luthold C, Guilbert SM, et al. A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis. *PLoS Genet* 2015; **11**(10): e1005582.
85. Koehler S, Kuczkowski A, Kuehne L, et al. Proteome Analysis of Isolated Podocytes Reveals Stress Responses in Glomerular Sclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2020; **31**(3): 544-59.
86. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, et al. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet* 2010; **11**(10): 733-9.
87. Doerr A. DIA mass spectrometry. *Nature Methods* 2015; **12**(1): 35-.
88. Hiebel C, Sturmer E, Hoffmeister M, et al. BAG3 Proteomic Signature under Proteostasis Stress. *Cells* 2020; **9**(11).
89. Gu C, Chang J, Shchedrina VA, et al. Regulation of dynamin oligomerization in cells: the role of dynamin-actin interactions and its GTPase activity. *Traffic* 2014; **15**(8): 819-38.
90. Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; **16**: 483-519.
91. Schiffer M, Teng B, Gu C, et al. Pharmacological targeting of actin-dependent dynamin oligomerization ameliorates chronic kidney disease in diverse animal models. *Nat Med* 2015; **21**(6): 601-9.
92. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; **420**(6916): 629-35.
93. Kistler AD, Altintas MM, Reiser J. Podocyte GTPases regulate kidney filter dynamics. *Kidney Int* 2012; **81**(11): 1053-5.
94. Wang L, Ellis MJ, Gomez JA, et al. Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases. *Kidney Int* 2012; **81**(11): 1075-85.
95. Huang Z, Zhang L, Chen Y, et al. RhoA deficiency disrupts podocyte cytoskeleton and induces podocyte apoptosis by inhibiting YAP/dendrin signal. *BMC Nephrol* 2016; **17**(1): 66.
96. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 2006; **8**(5): 485-91.
97. Weins A, Schwarz K, Faul C, Barisoni L, Linke WA, Mundel P. Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein. *J Cell Biol* 2001; **155**(3): 393-404.
98. Grossman E, Medalia O, Zwerger M. Functional architecture of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biophys* 2012; **41**: 557-84.
99. Braun DA, Sadowski CE, Kohl S, et al. Mutations in nuclear pore genes NUP93, NUP205 and XPO5 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2016; **48**(4): 457-65.
100. Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S, et al. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**(6): 1279-89.
101. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998; **8**(10): 397-403.

7 Anhang

7.1 Tabellen

Name des Gens	Name des Proteins	Log-P-Wert	Fold Change (=Zweierlogarithmus)	Nur gefunden bei BAG3 (vor Imputation)	Signifikant reguliert (nach Imputation)
IGKVA18; IGKV2D-26; IGKV2D-29		0,99097588	1,56839561	+	
SMTN	Smoothelin	1,88738527	1,37272024	+	
OAS2	2-5-oligoadenylate synthase 2	0,18678317	-0,2678146	+	
AP2B1	AP-2 complex subunit beta	0,59167417	0,80993366	+	
WAC	WW domain-containing adapter protein with coiled-coil	0,15529689	0,18594122	+	
APOBEC3B; APOBEC3A	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3B; DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3A	0,16533933	0,33732891	+	
PRRC2C	Protein PRRC2C	0,4999316	0,55418015	+	
RBMS1; RBMS3; RBMS2	RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1; RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 2; RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 3	0,87951528	1,32846642	+	
LUC7L3	Luc7-like protein 3	1,48614541	1,96773577	+	
JUP	Junction plakoglobin	0,19963058	0,49983883	+	
SON	Protein SON	1,54194051	1,7044487	+	
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	1,25169963	1,50793886	+	
U2AF2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	1,67461166	2,00205469	+	
RPS19	40S ribosomal protein S19	1,38392645	1,6457119	+	
ZNF185	Zinc finger protein 185	1,38866438	2,19262743	+	

CIR1	Corepressor interacting with RBPJ 1	0,02948678	0,04657602	+	
PFKP	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	1,16808985	1,58703613	+	
BRMS1L	Breast cancer metastasis-suppressor 1-like protein	1,79735828	1,82215977	+	
WDR83	WD repeat domain-containing protein 83	1,21525915	1,9093132	+	
DNM2	Dynamin-2	1,59606257	2,1351552	+	
NUP35	Nucleoporin NUP53	1,09925456	0,78855705	+	
CLINT1	Clathrin interactor 1	0,66836047	0,9259429	+	
YWHAE	14-3-3 protein epsilon	1,35344303	2,02937603	+	
TOR1AIP1	Torsin-1A-interacting protein 1	2,53523261	1,72170639	+	+
BAG3		3,40208975	3,63993835	+	+
RPL9	60S ribosomal protein L9	2,99863251	3,2460885	+	+
SCYL1	N-terminal kinase-like protein	4,18430734	5,32764339	+	+
WNK1	Serine/threonine-protein kinase WNK1	2,13488135	2,33123541	+	+
ATXN2L	Ataxin-2-like protein	1,99240985	2,50227976	+	+
SAP130	Histone deacetylase complex subunit SAP130	2,96133221	3,30439186	+	+
KCTD1	BTB/POZ domain-containing protein KCTD1	4,18167959	4,23783684	+	+
C17orf75	Protein Njmu-R1	3,19762844	4,94206619	+	+
WFS1	Wolframin	3,33584657	5,34139061	+	+
MTA2	Metastasis-associated protein MTA2	2,50975434	3,48083019	+	+
BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2	2,5018639	3,30421782	+	+
BAG3	BAG family molecular chaperone regulator 3	6,02047553	11,3082442	+	+
SSB	Lupus La protein	2,74540515	3,64414644	+	+
SLC25A4	ADP/ATP translocase 1	2,86196912	2,80285931	+	+
YBX3	Y-box-binding protein 3	3,92545205	2,93386316	+	+

RPS12	40S ribosomal protein S12	4,42627261	2,86210012	+	+
RPA1	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit;Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit, N-terminally processed	3,04156033	3,29302549	+	+
KIF5B;KIF5A	Kinesin-1 heavy chain;Kinesin-like protein;Kinesin heavy chain isoform 5A	2,57354797	2,02669477	+	+
ATP5C1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	3,16367967	3,47238493	+	+
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B;MAP1B heavy chain;MAP1 light chain LC1	2,21196963	3,78184891	+	+
HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	2,22207824	3,21599817	+	+
RHOA; RHOC	Transforming protein RhoA;Rho-related GTP-binding protein RhoC	2,87328209	2,37359095	+	+
RPS13	40S ribosomal protein S13	2,82860636	2,74974728	+	+
SET; SETSIP	Protein SET;Protein SETSIP	3,0974463	4,88772869	+	+
RBBP4	Histone-binding protein RBBP4	5,0755076	6,41149902	+	+
HDAC1	Histone deacetylase 1	2,99179609	4,22924805	+	+
MLF2	Myeloid leukemia factor 2	2,84570346	3,86612844	+	+
MAP7D1	MAP7 domain-containing protein 1	2,85836766	4,01803923	+	+
GNPTAB	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits alpha/beta;N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit alpha;N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit beta	2,60351553	2,58742905	+	+

MOV10	Putative helicase MOV-10	2,83046069	3,46195078	+	+
FAM91A1	Protein FAM91A1	5,00766945	7,57292032	+	+
LARP1	La-related protein 1	3,32638759	3,26852846	+	+
RAB11FIP1	Rab11 family- interacting protein 1	6,16249551	4,94500065	+	+
TMEM237	Transmembrane protein 237	3,44899381	4,59626627	+	+
SIN3A	Paired amphipathic helix protein Sin3a	5,18651188	5,95251989	+	+
MMTAG2	Multiple myeloma tumor-associated protein 2	3,16007919	2,72954702	+	+
WDR11	WD repeat-containing protein 11	5,71638387	8,18399334	+	+
TMEM245	Transmembrane protein 245	5,08656777	7,60656261	+	+
HSPB8	Heat shock protein beta-8	5,62977107	5,71539307	+	+
BAG5	BAG family molecular chaperone regulator 5	3,4184505	4,57452774	+	+
MTCL1	Microtubule cross- linking factor 1	2,67147495	2,99250793	+	+
TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	3,56031255	1,15489292		+
YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	1,95076273	1,81793594		+
FAM120A	Constitutive coactivator of PPAR- gamma-like protein 1	2,46229753	2,39831352		+
PABPC1; PABPC3	Polyadenylate-binding protein 1; Polyadenylate-binding protein;Polyadenylate- binding protein 3	3,18952342	3,27376509		+
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	4,95842044	3,32194519		+
HSPA1B; HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1B; Heat shock 70 kDa protein 1A	4,31395935	3,64899063		+
UPF1	Regulator of nonsense transcripts 1	3,24676163	4,1920867		+
HIST1H1B	Histone H1.5	3,72077309	4,58836555		+

PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	5,10028142	5,02757168		+
PABPC4	Polyadenylate-binding protein; Polyadenylate-binding protein 4	3,92820836	5,16068077		+

Tabelle 16 Signifikante Proteine der MS-Untersuchung mit α -BAG3 (pAB)

Die Tabelle bildet alle signifikanten Proteine der MS-Untersuchung mit α -BAG3 (pAB) ab. Diese unterscheiden sich allerdings vor und nach Anwendung des statistischen Verfahrens der Imputation. Daher wurden Proteine, die nur durch den BAG3 Antikörper gebunden wurden – und nicht in der Negativkontrolle erschienen – in der Spalte „Nur gefunden bei BAG3“ markiert. Proteine, die sowohl vor als auch nach Anwendung der Imputation signifikant blieben, wurden zusätzlich in der Spalte „Signifikant reguliert“ markiert. Proteine, die erst durch die Imputation signifikant wurden, wurden nur in dieser Spalte kenntlich gemacht. Insgesamt sind 75 Proteine gefunden worden. Von diesen verloren 23 durch Imputation die Signifikanz und 10 Proteine wurden signifikant. Die FDR lag bei $<0,01$. Für den *fold change* wurde ein Zweierlogarithmus verwendet.

Name des Gens	Name des Proteins	Log-P-Wert	Fold Change (=Zweierlogarithmus)	Nur gefunden bei BAG3 (vor Imputation)	Signifikant reguliert (nach Imputation)
AP2B1	AP-2 complex subunit beta	2,164684113	1,55348301	+	
FAM120A	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	1,714917981	1,72513056	+	
PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	1,291072427	1,50222826	+	
RTN3	Reticulon-3	2,070684883	2,02339029	+	
SREK1IP1	Protein SREK1IP1	1,996842045	2,69723463	+	
HSP90B1	Endoplasmic	0,644924563	1,0604043	+	
SCARF2	Scavenger receptor class F member 2	6,538340329	5,09382105	+	+
VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	2,556333508	2,57929897	+	+
BAG3		2,723538141	2,94402504	+	+
IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	2,378418783	2,29344893	+	+
BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2	3,818018555	1,8829565	+	+

BAG3	BAG family molecular chaperone regulator 3	6,398786058	10,1698112	+	+
SNRPA	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	3,522857311	2,38333321	+	+
RPL23	60S ribosomal protein L23	4,321365127	3,82390785	+	+
TCHH	Trichohyalin	4,675610374	4,74543428	+	+
KHDRBS1	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	4,350630244	4,21675396	+	+
FLII	Protein flightless-1 homolog	3,741752236	3,28687525	+	+
TRIM28	Transcription intermediary factor 1-beta	5,506785667	8,36002874	+	+
MLF2	Myeloid leukemia factor 2	4,239524395	3,2309742	+	+
TTPAL	Alpha-tocopherol transfer protein-like	2,783117765	1,72624826	+	+
ZC3H7A	Zinc finger CCCH domain-containing protein 7A	3,508325099	3,29451704	+	+
PHTF2	Putative homeodomain transcription factor 2	3,987254213	4,71553612	+	+
APPL2	DCC-interacting protein 13-beta	6,489647034	9,72966909	+	+
HSPA1B; HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1B; Heat shock 70 kDa protein 1A	2,957606458	2,41965103		+
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	4,165962638	2,43993616		+
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	3,426976478	2,73514318		+
RBMX; RBMXL1	RNA-binding motif protein, X chromosome	2,639372388	2,79946089		+
HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	3,508942096	2,86551237		+
PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	5,201608403	3,49525166		+

Tabelle 17 Signifikante Proteine der MS-Untersuchung mit α -BAG3 (mAB)

Die Tabelle bildet alle signifikanten Proteine der MS-Untersuchung mit α -BAG3 (mAB) ab. Die Beschriftung erfolgt analog zu Tabelle 16. Insgesamt wurden 29 signifikante Proteine gefunden. Davon waren 6 nur vor Anwendung der Imputation und 6 Proteine erst nach Anwendung der Imputation signifikant.

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper	23
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper	24
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	27
Tabelle 4 Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 5 Zelllinien	30
Tabelle 6 Plasmide	31
Tabelle 7 Primer	31
Tabelle 8: Kits und Assays	31
Tabelle 9 Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 10: Geräte	34
Tabelle 11: Software	35
Tabelle 12 Pipettiertabelle Restriktionsverdau	43
Tabelle 13 Pipettiertabelle Ligation.....	43
Tabelle 14 Pipettierprotokoll DNA-Sequenzierung	44
Tabelle 15 PCR Programm DNA-Sequenzierung.....	45

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Nierenfilters	13
Abbildung 2: BAG3 Protein Aufbau	19
Abbildung 3: Aufbau des BAG3 Komplexes	20
Abbildung 4: Etablierung einer BAG3 IF in HEK293T Zellen.....	47
Abbildung 5: Etablierung eines BAG3 Immunoblots <i>in vitro</i>	48
Abbildung 6: Etablierung der BAG3 Co-IP.....	50
Abbildung 7: Kultivierte humane Podozyten exprimieren BAG3.....	51
Abbildung 8: BAG3 IP in undifferenzierten humanen Podozyten	52
Abbildung 9: Die hierarchische Clusteranalyse trennt die Proben nach Antikörper und Negativkontrolle	53
Abbildung 10: Qualitätskontrolle der MS Daten durch die Hauptkomponentenanalyse	55
Abbildung 11: Der α -BAG3 pAB erkennt bereits bekannte und potenziell neue Interaktoren	57
Abbildung 12: Der α -BAG3 mAB erkennt bereits bekannte und potenziell neue Interaktoren	58
Abbildung 13: Vergleich der Präzipitate beider BAG3 Antikörper mittels Venn-Diagramm ...	59
Abbildung 14: Überprüfung der Bindungsspezifität des α -BAG3 (pAB) auf Nierengewebe ..	60
Abbildung 15: BAG3 lokalisiert in podozytären und nicht-podozytären Zellen des Glomerulus	62

Abbildung 16 BAG3 Lokalisation in einem BAG3^{P209L} Überexpressionsmodell..... 63

8 Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

8.1 Kongressbeiträge

2020

American Society of Nephrology (ASN)

Plagmann I, Rinschen M, **Heinlein K**, Degenhardt J, Unnersjö-Jess D, Kohler S, Schermer B, Benzing T. "BAG3 as a potential mechanoprotector in podocytes" (Poster)

2019

Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) in Düsseldorf:

Plagmann I, Rinschen M, **Heinlein K**, Degenhardt J, Unnersjö-Jess D, Schermer B, Benzing T. "A role of BAG3 as mechanoprotector in podocytes" (Poster)

American Society of Nephrology (ASN) in Washington D.C. (USA)

Plagmann I, Rinschen M, **Heinlein K**, Degenhardt J, Unnersjö-Jess D, Schermer B, Benzing T. "BAG3 as potential mechanoprotector in renal podocytes" (Poster)