

Regulation der Protein-Homöostase durch das Co-Chaperon Tpr2

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Annemarie Christina Ulitzsch

(geb. Vogel)

aus Warendorf

Bonn 2017

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höhfeld
2. Gutachter: PD. Dr. Gregor Kirfel

Tag der Promotion: 29.03.2017

Erscheinungsjahr: 2017

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Molekulare Chaperone	3
2.2 Regulatoren der Hsc/Hsp70-Aktivität	6
2.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System	9
2.4 Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP	10
2.5 Abbau von Substratproteinen	12
2.6 Das Co-Chaperon Tpr2	14
2.6.1 <i>Drosophila</i> TPR2	15
2.7 Insulin-Signalweg	16
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	20
3.1.2 Geräte	21
3.1.3 Antikörper	23
3.1.4 Bakterienstämme	24
3.1.5 Plasmide	24
3.1.6 Säugerzelllinien	25
3.1.7 siRNA.....	25
3.1.8 <i>Drosophila melanogaster</i> -Linien.....	25
3.2 Methoden im Umgang mit <i>Escherichia coli</i>	26
3.2.1 Kultivierung von Bakterien	26
3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	26
3.2.3 Transformation von Bakterien	27
3.2.4 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien	27
3.3 Methoden im Umgang mit eukaryotischen Zellen	27
3.3.1 Kultivierung von Säugerzelllinien	27
3.3.2 Transfektion mit Calciumphosphat	28
3.3.3 Transfektion mit JetPRIME – Reagenz	29

3.3.4 Behandlung von Hek293 mit Inhibitoren	30
3.4 Methoden im Umgang mit <i>Drosophila melanogaster</i>	30
3.4.1 Fliegenhaltung	30
3.4.2 Selektive Kreuzung verschiedener Genotypen	31
3.4.3 Spezifische Genmanipulation	31
3.4.4 Verhaltensstudien	32
3.4.5 Statistik der Überlebensexperimente	33
3.4.6 Analyse von <i>Drosophila</i> -Larven	34
3.5 Molekularbiologische Methoden	34
3.5.1 Plasmid-Präparation	34
3.5.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	35
3.5.3 PCR	35
3.5.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen	36
3.5.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	37
3.5.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
3.5.7 Ligation von DNA	37
3.5.8 DNA-Sequenzanalyse	38
3.6 Proteinbiochemische Methoden	38
3.6.1 Herstellung von Proteinextrakten	38
3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.6.3 Proteinfällung	40
3.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.6.5 Färbung von Polyacrylamidgelen	42
3.6.6 Western-Blot	43
3.6.7 <i>Strippen</i> von Nitrocellulosemembranen	43
3.6.8 Reinigung von Proteinen	44
3.6.9 Proteinbindeassay	46
3.6.10 Luziferase-Aggregations-Assay	48
3.6.11 Immunpräzipitation	49
3.7 Zellbiologische Techniken	50
3.7.1 Insulinrezeptor-Abbau	50

4 Ergebnisse	51
4.1 Funktion von Tpr2 <i>in vivo</i>	51
4.1.1 Tpr2 verhindert die Bindung von CHIP an Hsc70	51
4.2 Tpr2 beeinflusst die Stabilität des Insulinrezeptors	53
4.2.1 Tpr2 bindet den Insulinrezeptor <i>in vivo</i>	53
4.2.2 Tpr2-Depletion führt zum Abbau des Insulinrezeptors	53
4.2.3 Erhöhte Tpr2-Expression beeinflusst die Stabilität des Insulinrezeptors nicht	54
4.3 Biochemische Analyse des Co-Chaperons dTPR2.....	55
4.3.1 dTPR2 bindet an den C-Terminus von Hsc70.....	55
4.3.2 dTPR2 verstärkt die Chaperon-Aktivität von Hsc70.....	57
4.4 Analyse von <i>Drosophila</i> TPR2 <i>in vivo</i>	58
4.4.1 Endogene Expression von dTPR2	58
4.4.2 dTPR2 ist essentiell für die Entwicklung von <i>Drosophila</i>	59
4.4.3 Funktion von dTPR2 in der Muskulatur	60
4.4.4 Gewebespezifische Depletion von dTPR2 in Stoffwechselorganen	65
5 Diskussion	68
5.1 Tpr2 verhindert eine Bindung von CHIP an Hsc/Hsp70 und reguliert damit verbundene Abbauprozesse.....	68
5.2 dTPR2 ist essentiell für die Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> und den Erhalt der Protein-Homöostase.....	71
6 Verzeichnisse.....	78
6.1 Literaturverzeichnis	78
6.2 Internetverweise	85
6.3 Abkürzungsverzeichnis.....	86

1 Zusammenfassung

Die Erhaltung der Protein-Homöostase ist essentiell für die Funktion einer jeden Zelle. Molekulare Chaperone regulieren dabei ein sensibles Gleichgewicht aus Proteinabbau und -faltung. Neusynthetisierte oder fehlgefaltete Proteine werden in ihre native Konformation gefaltet, wodurch sie ihre Funktion ausüben können und die Entstehung von Proteinaggregaten verhindert wird. Irreversibel beschädigte Proteine oder Proteinkomplexe werden, durch Interaktion des molekularen Chaperons Hsc/Hsp70 mit der Chaperon-assoziierten Ubiquitinligase CHIP, mit einer Ubiquitinkette als Abbausignal markiert. Während der Faltung und des Abbaus von Proteinen interagiert Hsc/Hsp70 mit unterschiedlichen Co-Chaperonen. Diese konkurrieren um die Bindung an Hsc/Hsp70 und regulieren so unterschiedliche Funktionen des Chaperons.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion des Co-Chaperons Tpr2 analysiert werden. Tpr2 besitzt zwei TPR-Domänen, durch die es die molekularen Chaperone Hsc/Hsp70 und Hsp90 gleichzeitig binden kann. Zusätzlich besitzt Tpr2 eine J-Domäne, welche signifikant homolog zur J-Domäne des Co-Chaperons Hsp40 ist. Während des normalen Faltungsprozesses werden Substrate von Hsc/Hsp70 auf Hsp90 übertragen. Tpr2 reguliert die Hsc/Hsp70-Funktion und induziert die Substratbindung durch Hsc/Hsp70. Dadurch können Substrate entgegen des normalen Faltungsweges von Hsp90 auf Hsc/Hsp70 zurück übertragen werden. Biochemische Analysen mit *Drosophila* TPR2 (dTPR2) konnten zeigen, dass dTPR2 die Chaperon-Funktion von Hsc70 verstärkt. Dabei führte die C-terminale Bindung von dTPR2 an Hsc70 zu einer signifikanten Verstärkung der Bindung denaturierter Luziferase durch Hsc70. dTPR2 weist keine intrinsische Chaperon-Aktivität auf, wie es für eine Reihe anderer Co-Chaperone gezeigt wurde. Daher reguliert dTPR2 die Hsc/Hsp70-Funktion nicht substratspezifisch, sondern nimmt eine allgemeine, konservierte Funktion als Retro-Faktor in der Hsc/Hsp70-Hsp90-Maschinerie ein. *In-vivo*-Experimente konnten weiter zeigen, dass Tpr2 mit der Ubiquitinligase CHIP um die C-terminale Bindestelle von Hsc70 konkurriert und so CHIP-vermittelte Abbauvorgänge reguliert. Dies wirkt sich z.B. auf den Abbau des Insulinrezeptors aus. Verringerte Tpr2-Mengen führten zur Destabilisierung des Insulinrezeptors in Hek293-Zellen.

Funktionsanalysen in *Drosophila melanogaster* konnten zeigen, dass dTPR2 essentiell für den Erhalt der Proteostase ist. Ubiquitäre Expressionsveränderungen von dTPR2 führten zur Letalität in frühen Entwicklungsstadien. Insbesondere die Überexpression von dTPR2, welche zur Letalität im zweiten Larvenstadium führte, macht deutlich, wie wichtig ein fein definiertes Expressionslevel für die Entwicklung des Organismus ist. Durch erhöhte dTPR2-Mengen könnte die Aktivierung zahlreicher Rezeptoren und Kinasen inhibiert worden sein. Die muskuläre Überexpression von dTPR2 führte zu einem Funktionsverlust der Muskulatur. Die bereits beschriebene Funktion von Tpr2 lässt darauf schließen, dass Chaperon-vermittelte Abbauwege inhibiert wurden, welche für den Erhalt der Muskulatur essentiell sind. Die Depletion von dTPR2 in der Muskulatur hatte keinen Einfluss auf die Muskelfunktion. Darüber hinaus konnte jedoch gezeigt werden, dass dTPR2 die Lebensspanne der Fliegen reguliert. Muskuläre Expressionsveränderungen von dTPR2 führten zu einer Verlängerung der Lebensspanne.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten konnten zeigen, wie wichtig das Co-Chaperon dTPR2 für die Entwicklung und Regulation der Lebensspanne von *Drosophila melanogaster* ist. Ein definiertes Expressionslevel scheint dabei von besonderer Bedeutung für den Erhalt der Proteostase und die Funktion der Muskulatur zu sein. Tpr2 reguliert als konservierter Retro-Faktor die Funktion des molekularen Chaperons Hsc/Hsp70. Dabei induziert Tpr2 die räumliche Kopplung von Hsc/Hsp70 und Hsp90 und stabilisiert eine Substratbindung durch Hsc/Hsp70. Zusätzlich konkurriert Tpr2 mit CHIP um die C-terminale Bindestelle von Hsc/Hsp70, wodurch CHIP-vermittelte Abbauprozesse reguliert werden können.

2 Einleitung

Jede Zelle eines Organismus ist auf die Funktion und Organisation vieler verschiedener Proteine angewiesen. Proteine sind also lebenswichtige Bestandteile der Zelle, welche ein komplexes Netzwerk bilden und so zelluläre Prozesse, wie z.B. Metabolismus, Motilität und intra- oder interzelluläre Kommunikation steuern. Des Weiteren können Proteine als Stützelemente dienen, den Transport und die Speicherung von Molekülen steuern oder bei der Abwehr von Fremdstoffen aktiv sein. Damit all diese lebenswichtigen Prozesse innerhalb einer Zelle ablaufen können, bedarf es der richtigen Funktion und Aktivität von Proteinen. Jedes Protein besitzt eine native Konformation, welche Voraussetzung für seine Funktion ist. Nach der Synthese wird das zunächst linear vorliegende Protein, der Faltungsinformation entsprechend, dreidimensional gefaltet und so aktiviert. Die Faltungsinformation wird von den Aminosäuren, welche die Polypeptidkette eines jeden Proteins bilden, kodiert. Bei kurzen Polypeptidketten kann die Faltung spontan erfolgen. Je länger eine Polypeptidkette jedoch ist, desto eher muss die Faltung durch molekulare Chaperone unterstützt werden. Molekulare Chaperone verhindern vor allem die Fehlfaltung oder Aggregation von Polypeptidketten. Hydrophobe Reste, welche bei nicht-nativen Proteinen freiliegen, können miteinander interagieren, wodurch Proteine aggregieren können. Molekulare Chaperone erkennen und binden diese hydrophoben Reste und unterstützen so den Faltungsprozess. Diese Funktion von molekularen Chaperonen ist essentiell für die Erhaltung der Protein-Homöostase. Bei einer Vielzahl von Erkrankungen liegt deren Ursprung in der Fehlfaltung und Aggregatbildung von Proteinen. Alzheimer und Mukoviszidose sind nur zwei Beispiele für Krankheiten, bei denen die Fehlfaltung von Proteinen zum Funktionsverlust dieser oder zur Bildung von toxischen Aggregaten führt (Bukau und Horwich, 1998; Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Thomas et al., 1995).

2.1 Molekulare Chaperone

Es gibt verschiedene molekulare Chaperon-Familien, deren Mitglieder auf unterschiedliche Art und Weise mit nicht-nativen Proteinen interagieren. Chaperone werden sowohl konstitutiv exprimiert als auch durch Stress, wie z.B. durch Hitze, induziert, weshalb sie auch als Hitzeschockproteine bezeichnet werden. Hitzeschockproteine der Hsp60-, Hsp70- und Hsp90-Familien sind sowohl an der *de-novo* Faltung als auch an der Faltung Stress-denaturierter Proteine beteiligt (Hartl et al., 2011).

Chaperonine der Hsp60-Proteinfamilie (*60 kDa heat shock protein*) binden fehlgefaltete oder neu synthetisierte Proteine und schließen diese in einen Hohlraum ein. Dieser Hohlraum besteht aus zwei Ringstrukturen, die übereinander angeordnet sind und im Inneren hydrophobe Bereiche präsentieren. Fehlgefaltete Proteine können an diese hydrophoben Bereiche binden. Durch die Bindung von ATP erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch ein Deckel-ähnliches Co-Chaperonin gebunden und der

Hohlraum geschlossen wird. So kann das Substrat in isolierter Umgebung gefaltet werden, ohne zu aggregieren oder mit anderen Proteinen ungewollt zu interagieren. Die anschließende Dissoziation des Co-Chaperonins und Freisetzung des gefalteten Substrats erfolgt ebenfalls ATP-abhängig (Bukau und Horwich, 1998; Hartl et al., 2011).

Molekulare Chaperone der Hsp70-Proteinfamilie (*70 kDa heat shock protein*) von Eukaryoten sind hoch konserviert und zu 60-78 % identisch (Kiang und Tsokos, 1998). Zelluläre Vorgänge, wie die Faltung von neu synthetisierten Proteinen, die Rückfaltung fehlgefalteter oder aggregierter Proteine, die Assemblierung von Proteinkomplexen oder auch die Regulation von Signalwegen, werden von dieser Proteinfamilie kontrolliert. Das konstitutiv exprimierte Hsc70 (*70 kDa heat shock cognate*) und das stressinduzierte Hsp70 (*70 kDa heat shock protein*) werden beide im Zytosol und Nukleus exprimiert. Darüber hinaus wird Hsp70 in weiteren eukaryotischen Organellen, z.B. den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum, exprimiert. Hsc70 und Hsp70 interagieren mit Co-Chaperonen der Hsp40-Proteinfamilie und können so Substrate ATP-abhängig binden (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Kiang und Tsokos, 1998).

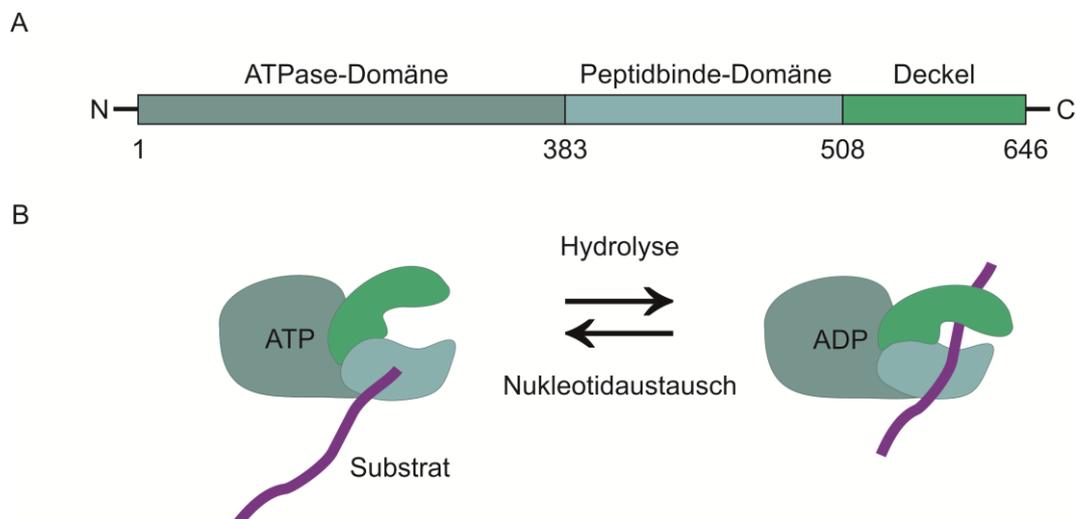


Abbildung 2.1: Hsc/Hsp70-Proteinfamilie. (A) **Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Hsc/Hsp70.** Hsc/Hsp70 besteht aus 646 Aminosäuren. N-terminal befindet sich eine ATPase-Domäne, welche ATP bindet und hydrolysiert. Dieser Zyklus ermöglicht die Bindung und Freisetzung von Substraten. Die Peptidbinde-Domäne erkennt und bindet kleine Abschnitte von entfaltenen Proteinen, die durch hydrophobe Bereiche charakterisiert sind. Der C-Terminus bildet eine Art Deckel, welcher durch Faltung gebundene Substrate einschließt. Des Weiteren besitzt Hsc/Hsp70 C-terminal eine konservierte EEVD-Sequenz, die Interaktionen mit TPR-Proteinen vermittelt. (B) **ATPase-Zyklus von Hsc/Hsp70.** Im ATP-gebundenen Zustand ist die Peptidbinde-Domäne zugänglich, sodass Substrate binden können. Um diese Bindung zu verstärken, interagiert Hsc/Hsp70 mit dem Co-Chaperon Hsp40. Hsp40 induziert die ATP-Hydrolyse zu ADP, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt. Die α -Helices des C-terminalen Deckels von Hsc/Hsp70 falten sich über die Peptidbinde-Domäne. Die Peptidbinde-Domäne wird dadurch unzugänglich für neue Substrate. Nachdem die Faltung abgeschlossen ist erfolgt ein Nukleotid-Austausch. ADP wird abgespalten und neues ATP gebunden. Der C-terminale Deckel von Hsc/Hsp70 öffnet sich und das gebundene Substrat wird freigelassen. (Vogel A., Diplomarbeit 2012, Institut für Zellbiologie der Universität Bonn)

Einleitung

Vertreter der Hsc/Hsp70-Proteinfamilie sind aus drei verschiedenen Domänen aufgebaut. Abbildung 2.1 A zeigt die schematische Darstellung der Domänenstruktur. Der N-Terminus ist 45 kDa groß und umfasst die ATPase-Domäne, welche ATP binden und hydrolysieren kann. Auf den Aminoterminus folgt eine 18 kDa große Peptidbinde-Domäne, welche aus zwei antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix besteht. Die Peptidbinde-Domäne erkennt und bindet hydrophobe Polypeptidsequenzen, die bei fehlgefalteten Proteinen freiliegen, wodurch diese stabilisiert werden. Der α -helikale C-Terminus ist 10 kDa groß und stellt eine Art Deckel dar, welcher sich über die Peptidbinde-Domäne zurückfalten kann. Darüber hinaus besitzt der C-Terminus eine konservierte EEVD-Sequenz, welche die Interaktion von Hsc/Hsp70 mit TPR-Proteinen vermittelt (Kap. 2.2) (Demand et al., 1998; Freeman et al., 1995; Kiang und Tsokos, 1998; Rüdiger et al., 1997).

Im ATP-gebundenen Zustand von Hsc/Hsp70 können Substrate dissoziieren und binden. Die Peptidbinde-Domäne ist in diesem Konformationszustand frei zugänglich. Das Co-Chaperon Hsp40 stimuliert die ATP-Hydrolyse, sodass ATP in ADP gespalten wird (Abb. 2.1 B). Dieser ADP-gebundene Zustand geht mit einer Konformationsänderung von Hsc/Hsp70 einher, bei der die C-terminalen α -Helices über die Peptidbinde-Domäne gefaltet werden. So wird die Bindung des Substrats verstärkt. Um das korrekt gefaltete Protein anschließend freizulassen, findet ein Nukleotidaustausch statt. Hsc/Hsp70 interagiert mit Nukleotidaustauschfaktoren, z.B. mit BAG-1 (*BCL2-associated athanogene 1*). BAG-1 stimuliert die Dissoziation von ADP, sodass neues ATP gebunden werden kann (Abb. 2.1 B). Es erfolgt eine erneute Konformationsänderung. Der C-terminale Deckel öffnet sich und das Substrat wird freigesetzt (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Mayer und Bukau, 2005; McCarty et al., 1995).

Das molekulare Chaperon Hsp90 (*90 kDa heat shock protein*) wird sowohl im Zytosol exprimiert als auch in homologer Form im endoplasmatischen Retikulum (Grp94) und Mitochondrium (TRAP-1). Hsp90 liegt als Dimer vor und bindet z.B. Proteinkinasen und Steroidhormonrezeptoren, welche eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und Regulation des Zellzyklus spielen. Diese Substrate werden durch Bindung und Faltung von Hsp90 aktiviert. Des Weiteren ist Hsp90, wie Hsp60 und Hsp70, an der Stressantwort der Zelle beteiligt, indem es die Aggregation denaturierter, nicht-nativer Proteine durch erneute Faltung verhindert (Richter und Buchner, 2001).

Abbildung 2.2 A zeigt eine schematische Darstellung der Domänenstruktur von Hsp90. Hsp90 besitzt eine 25 kDa große N-terminale Domäne, welche als Bindestelle für ATP fungiert. Die C-terminale Domäne ist 12 kDa groß und zuständig für die Dimerisierung, die Substrat-Bindung und die Bindung von Co-Faktoren, welche TPR-Motive besitzen (Kap. 2.2). Auch hier erfolgt die Interaktion mit TPR-Proteinen über eine konservierte EEVD-Sequenz. Die mittlere Domäne ist zum Teil ebenfalls an der Dimerisierung beteiligt. Im ATP-gebundenen Zustand findet eine Assoziation der N-terminalen Domänen des Hsp90-Dimers statt, wodurch sich eine Art Deckel über der Nukleotidbindestelle formt (Abb. 2.2 B) (Brychzy et al., 2003; Obermann et al., 1998; Prodromou et al., 2000; Young et al., 1998).

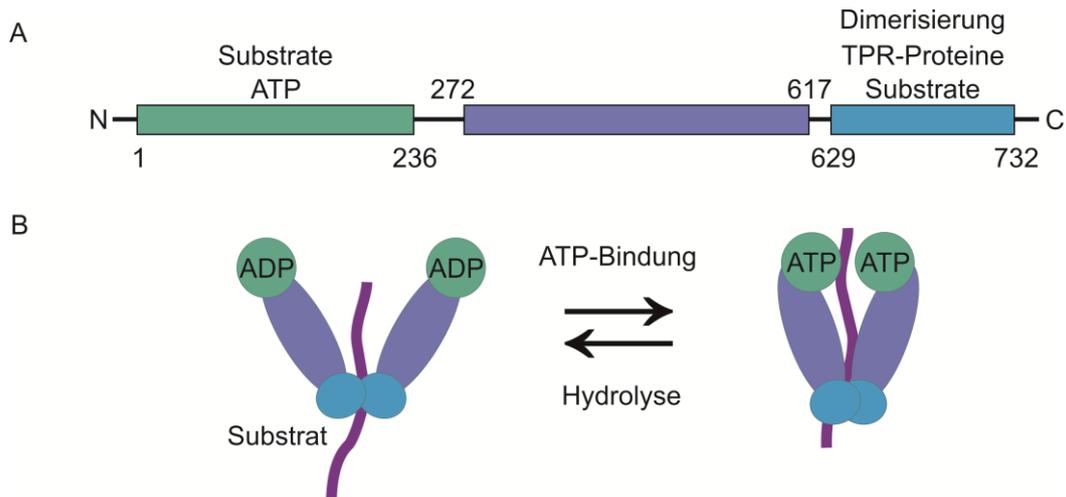


Abbildung 2.2: Hsp90-Proteinfamilie. (A) **Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Hsp90.** Hsp90 besteht aus 732 Aminosäuren. N-terminal befinden sich eine ATP-Bindestelle und eine Bindestelle für Substrate. Die mittlere Domäne ist zum Teil an der Dimerisierung der Hsp90-Moleküle beteiligt. Der C-Terminus ist hauptsächlich für die Dimerisierung zuständig und enthält Bindestellen für Substrate und TPR-Proteine, welche mit Hsp90 interagieren. (B) **ATPase-Zyklus von Hsp90.** Im ADP-gebundenen Zustand ist die Bindestelle für Substrate zugänglich. Durch Dissoziation von ADP und die Bindung von ATP an den N-Terminus von Hsp90, kommt es zu einer Konformationsänderung. Die N-Termini des Dimers assoziieren miteinander und formen eine Art Deckel, welcher die Nukleotidbindestelle einschließt. Im ATP-gebundenen Zustand erfolgt anschließend die Faltung und Aktivierung von Substraten. Die Hydrolyse von ATP zu ADP führt zur Dissoziation der N-terminalen Domänen voneinander, sodass das gebundene Substrat freigegeben werden kann.

Während der Reifung von Rezeptoren interagiert Hsp90 mit Hsc/Hsp70, wodurch die neu gefalteten Rezeptoren von Hsc/Hsp70 auf Hsp90 übertragen werden, dort weiter gefaltet und für entsprechende Signalwege aktiviert werden (Frydman und Höfeld, 1997). Bei der Bindung, Faltung und Aktivierung von Substraten interagiert Hsp90 mit Co-Faktoren, wie p23 (*Prostaglandin E synthase 3*) und Cyp40 (*Cyclophilin 40*), und Co-Chaperonen, wie Hop und Hip. Die Bindung von p23 ist ATP-abhängig und essentiell für die Funktion von Hsp90. Die ATP-Hydrolyse führt zur Dissoziation von p23 und gebundenen, aktivierten Substraten (Abb. 2.2 B) (Obermann et al., 1998; Prodromou et al., 2000).

2.2 Regulatoren der Hsc/Hsp70-Aktivität

Die Interaktion von Hsc/Hsp70 mit anderen molekularen Chaperonen oder Proteinkomplexen wird durch verschiedene Co-Chaperone reguliert. Co-Chaperone konkurrieren um die Bindestellen an Hsc/Hsp70 und beeinflussen so dessen Funktion. Durch Interaktion mit verschiedenen Co-Chaperonen werden Proteine *de-novo* gefaltet und denaturierte Proteine rückgefaltet oder abgebaut. Diese Qualitätskontrolle ist essentiell für den Erhalt der Proteostase innerhalb der Zelle (Hartl et al., 2011).

Einleitung

In eukaryotischen Zellen kommen 44 Mitglieder der Hsp40-Proteinfamilie vor, welche die Funktion von Hsc/Hsp70 regulieren. Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben regulieren Hsp40-Proteine die ATP-abhängige Substrat-Bindung von Hsc/Hsp70. Hierbei ist es unter anderem möglich, dass Hsp40 über seine eigene Polypeptidbinde-Domäne Substrate bindet und auf Hsc/Hsp70 überträgt. Des Weiteren kann Hsp40 Hsc/Hsp70-Substrat-Komplexe stabilisieren, indem es die ATPase-Aktivität des molekularen Chaperons reguliert. Diese Regulation erfolgt über die J-Domäne des Co-Chaperons Hsp40, bestehend aus 75 Aminosäuren und einem konservierten HPD-Tripeptid. Das Tripeptid wird durch die Loop-Bildung von vier α -Helices freigelegt und ist essentiell für die Interaktion von Hsp40 mit Hsc/Hsp70 (Fan et al., 2003).

Bei der Aktivierung von Signalproteinen interagiert Hsc/Hsp70 mit dem molekularen Chaperon Hsp90. Diese Interaktion wird durch weitere Co-Chaperone reguliert. Das Co-Chaperon Hip (*Hsc70-interacting protein*) verhindert die ADP-Dissoziation von Hsc/Hsp70, wodurch der Chaperon-Substrat-Komplex stabilisiert wird. Hip ist 42 kDa groß und bindet an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 (Abb. 2.3). Das Co-Chaperon Hop (*Hsp70/Hsp90-organizing protein*) ist 60 kDa groß und rekrutiert Hsp90 zu dem bestehenden Hsc/Hsp70-Hsp40-Hip-Substrat-Komplex. Hop ist in der Lage die C-Termini beider Chaperone gleichzeitig zu binden (Abb. 2.3) und fungiert als Nukleotidaustauschfaktor, sodass ADP von Hsc/Hsp70 abgespalten wird und das Substrat auf Hsp90 übertragen werden kann. Des Weiteren inhibiert es die ATPase-Funktion von Hsp90, wodurch das Hsp90-Dimer für weitere Substrate blockiert wird. So kann das von Hsc/Hsp70 übertragene Substrat gefaltet und für entsprechende Signalwege aktiviert werden (Frydman und Höhfeld, 1997; Perdew und Whitelaw, 1991; Prodromou et al., 1999; Richter und Buchner, 2001).

Hip und Hop besitzen TPR-Domänen (*tetratricopeptide repeats*), welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und vor allem in Proteinen auftreten, die an der Zellzykluskontrolle, der Transkription, Splicing-Events, dem Proteintransport und der Proteinfaltung beteiligt sind. TPR-Domänen bestehen aus unterschiedlich vielen TPR-Motiven, welche wiederum aus Wiederholungen von 34 Aminosäuren bestehen. Diese Wiederholungen von 34 Aminosäuren liegen oft in Tandemanordnung vor. Die Sekundärstruktur der TPR-Motive ist aus zwei antiparallel verlaufenden α -Helices aufgebaut, welche einen amphipathischen Tunnel bilden (Blatch und Lässle, 1999; Frydman und Höhfeld, 1997; Lamb et al., 1995). Hip besitzt eine TPR-Domäne, welche die Interaktion mit der ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 vermittelt. Hop besitzt drei TPR-Domänen, welche die Interaktion mit Hsc/Hsp70 und Hsp90 vermitteln. Die N-terminale TPR1-Domäne besteht aus drei TPR-Motiven und vermittelt die Interaktion mit dem C-Terminus von Hsc/Hsp70. Die mittlere und C-terminale TPR2A- und TPR2B-Domäne besteht aus jeweils drei TPR-Motiven. Beide vermitteln die Interaktion mit dem C-Terminus von Hsp90 (Brinker et al., 2002; Höhfeld et al., 1995; Scheufler et al., 2000).

Ein weiteres TPR-Protein, welches Hsc/Hsp70 reguliert, ist die Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP (*carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein*). Das Co-Chaperon interagiert über eine TPR-Domäne sowohl mit der C-terminalen Domäne von Hsc/Hsp70 (Abb. 2.3) als auch mit dem C-Terminus von Hsp90 (Ballinger et al., 1999; Connell et al., 2001). Die Interaktion mit Ubiquitin-konjugierenden Enzymen, wie z.B. Ubc4/5, induziert den Abbau von Hsc/Hsp70-Substraten (Abb. 2.3) (Demand et al., 2001). In Kapitel 2.4 und Kapitel 2.5 wird das Co-Chaperon CHIP und der CHIP-vermittelte Abbau von Substraten näher beschrieben.

Wie bereits in Kapitel 2.1 erwähnt wird Hsc/Hsp70 auch durch das Co-Chaperon BAG-1 reguliert. BAG-1 interagiert über eine BAG-Domäne mit Hsc/Hsp70 und besitzt eine ubiquitinähnliche Domäne, die eine Interaktion mit dem Proteasom ermöglicht (Abb. 2.3). So kann BAG-1 den proteasomalen Abbau von Hsc/Hsp70-Substraten regulieren, welcher in Kapitel 2.5 näher beschrieben wird (Höhfeld und Jentsch, 1997).

BAG-3 ist ein weiteres Co-Chaperon, welches mit Hsc/Hsp70 interagieren kann. BAG-3 bindet über eine BAG-Domäne an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 (Abb. 2.3). Im Gegensatz zu BAG-1 vermittelt BAG-3 den autophagischen Abbau von Substraten, welcher ebenfalls in Kapitel 2.5 näher beschrieben wird (Arndt et al., 2010).

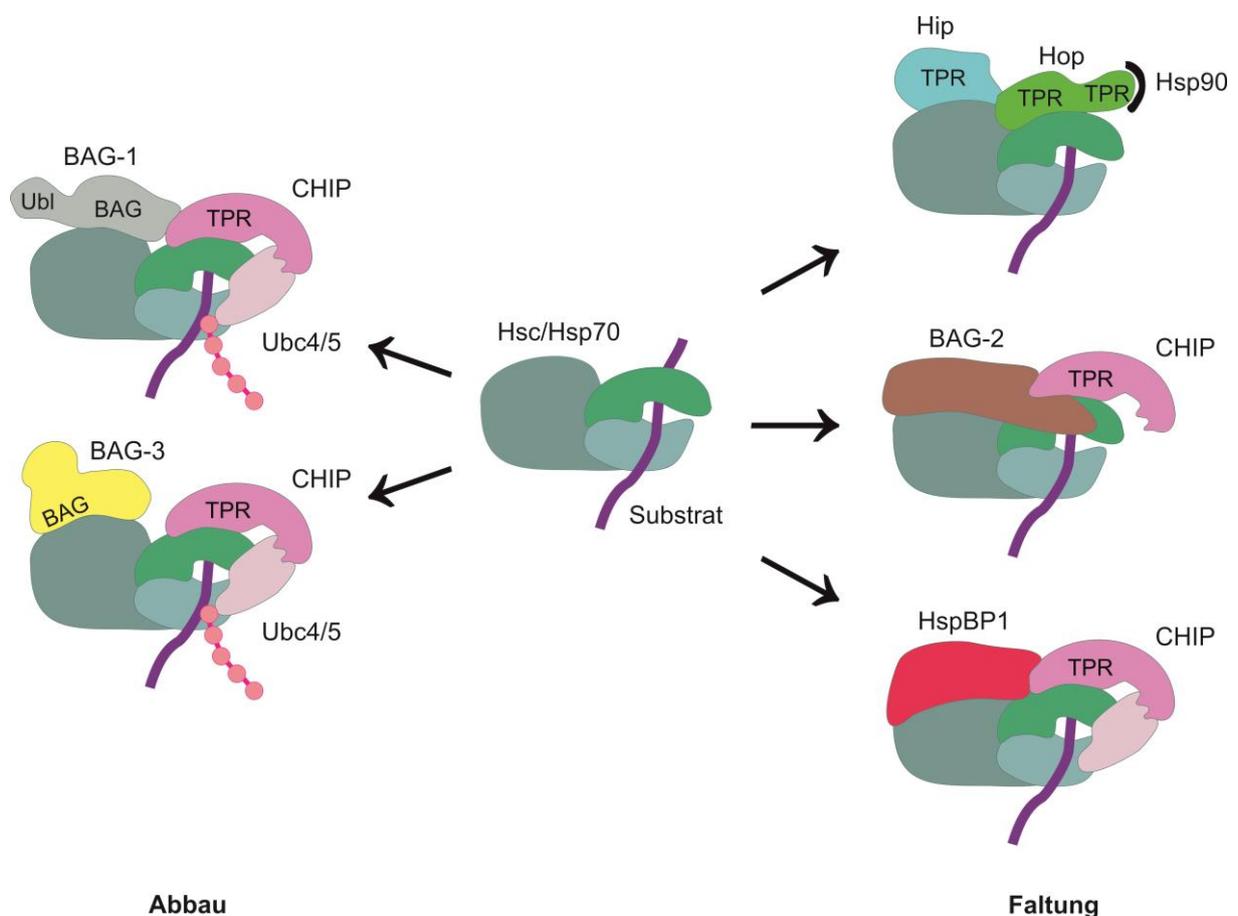


Abbildung 2.3: Regulatoren der Hsc/Hsp70-Aktivität. Hsc/Hsp70 wird durch verschiedene Co-Chaperone reguliert. Während der Faltung eines Substrats interagiert Hsc/Hsp70 mit Hsp40 und anderen Chaperonen, wie z.B. Hsp90. Diese Interaktion wird durch die Co-Chaperone Hip und Hop reguliert. Hip bindet an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 und inhibiert die Dissoziation von ADP, wodurch der Chaperon-Substrat-Komplex stabilisiert wird. Hop rekrutiert Hsp90 zum Hsc/Hsp70-Substrat-Komplex und fungiert als Nukleotidaustauschfaktor, wodurch das Substrat auf Hsp90 übertragen werden kann. Die Co-Chaperone BAG-2 und HspB1 inhibieren die Funktion der Ubiquitinligase CHIP, wodurch die Ubiquitinierung und der Abbau von Substraten verhindert wird. CHIP vermittelt den Abbau von Substraten, in Kooperation mit BAG-1 und BAG3 (Kap. 2.5). Dabei bindet CHIP an den C-Terminus von Hsc/Hsp70 und ubiquitiniert abzubauenende Proteine durch Interaktion mit Ubiquitin-konjugierenden Enzymen, wie z.B. Ubc4/5. (TPR: TPR-Domäne, BAG: BAG-Domäne, Ubl: ubiquitinähnliche Domäne)

Die Co-Chaperone BAG-2 (*BCL2-associated athanogene 2*) und HspBP1 (*Hsp70-binding protein 1*) regulieren den Abbau von Hsc/Hsp70-Substraten, indem sie die Funktion der Ubiquitinligase CHIP inhibieren. BAG-2 bindet an die ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70, wodurch die Kooperation zwischen CHIP und Ubiquitin-konjugierenden Enzymen aufgehoben wird (Abb. 2.3). HspBP1 interagiert ebenfalls mit der ATPase-Domäne von Hsc/Hsp70 und verhindert die Ubiquitinierung von Substraten durch Konformationsänderung des Chaperon-Komplexes (Abb. 2.3) (Alberti et al., 2004; Arndt et al., 2005). Auf diese Weise kontrollieren BAG-2 und HspBP1 die Abbau-Funktion molekularer Chaperone. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen Abbau und Faltung bewahrt (Arndt et al., 2007).

2.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Der Abbau beschädigter, fehlgefalteter oder aggregierter Proteine ist essentiell für den Erhalt der Proteostase innerhalb der Zelle. Ein wichtiger Abbauweg, an dem molekulare Chaperone und Co-Chaperone beteiligt sind, ist der über das Proteasom. Hierbei werden abzubauen Substrate mit einer Polyubiquitinkette markiert und im 26S-Proteasom proteolytisch gespalten (Wilkinson, 1999).

Im ersten Schritt des proteasomalen Abbauweges wird Ubiquitin, ein hoch konserviertes Protein aus 76 Aminosäuren, von einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) C-terminal gebunden und aktiviert (Abb. 2.4 A). Die Entstehung dieser kovalenten Thioesterbindung erfordert ATP. Aktiviertes Ubiquitin wird dann auf Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) übertragen, welche wiederum von Ubiquitinligasen (E3) gebunden werden (Abb. 2.4 B). Ubiquitinligasen katalysieren die Ubiquitinierung von Substratproteinen. Sie übertragen das E2-gebundene Ubiquitin auf eine ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Substrats. Dieser Prozess wird mehrfach wiederholt, sodass sich eine Polyubiquitinkette formt (Pickart, 2004; Thrower et al., 2000; Wilkinson, 2000). Die Verknüpfung der einzelnen Ubiquitinmoleküle erfolgt dabei über die ϵ -Aminogruppe eines Lysins (Lys) innerhalb des konjugierten Ubiquitins. Findet diese Verknüpfung über Lys-48 oder Lys-29 statt, so entsteht ein Signal für den proteasomalen Abbauweg. Eine Verknüpfung über Lys-63 oder Lys-11 hingegen stellt vorwiegend ein Signal für DNA-Reparaturmechanismen, Endozytose oder lysosomale Abbauwege dar (Hartmann-Petersen et al., 2003; Nandi et al., 2006; Welchman et al., 2005).

Das 26S-Proteasom erkennt das Ubiquitin-Signal und bindet das abzubauen Substrat. Es besteht aus einem proteolytisch aktiven 20S-Kernkomplex und zwei regulatorischen 19S-Komplexen, die auf beiden Seiten des Kerns binden. Der 20S-Kernkomplex ist zylinderförmig aufgebaut und besteht aus vier heptameren Ringen. Die inneren Ringe weisen eine katalytische Seite auf, welche einen inneren Hohlraum auskleidet, der nur von oben oder unten durch verengte Poren zugänglich ist. Diese Poren werden durch einen 19S-Komplex verschlossen, welcher aus zwei Subkomplexen aufgebaut ist. Das Unterteil ist zuständig für die Entfaltung von Substraten und besitzt sechs ATPase-Untereinheiten. Die Deckel-Domäne verschließt das Unterteil und ist an der Erkennung von Polyubiquitinketten und der Prozessierung von Substraten beteiligt. Abzubauen Substrate werden in den Innenraum transportiert und dort proteolytisch abgebaut (Abb. 2.4 C) (Hartmann-Petersen et al., 2003).

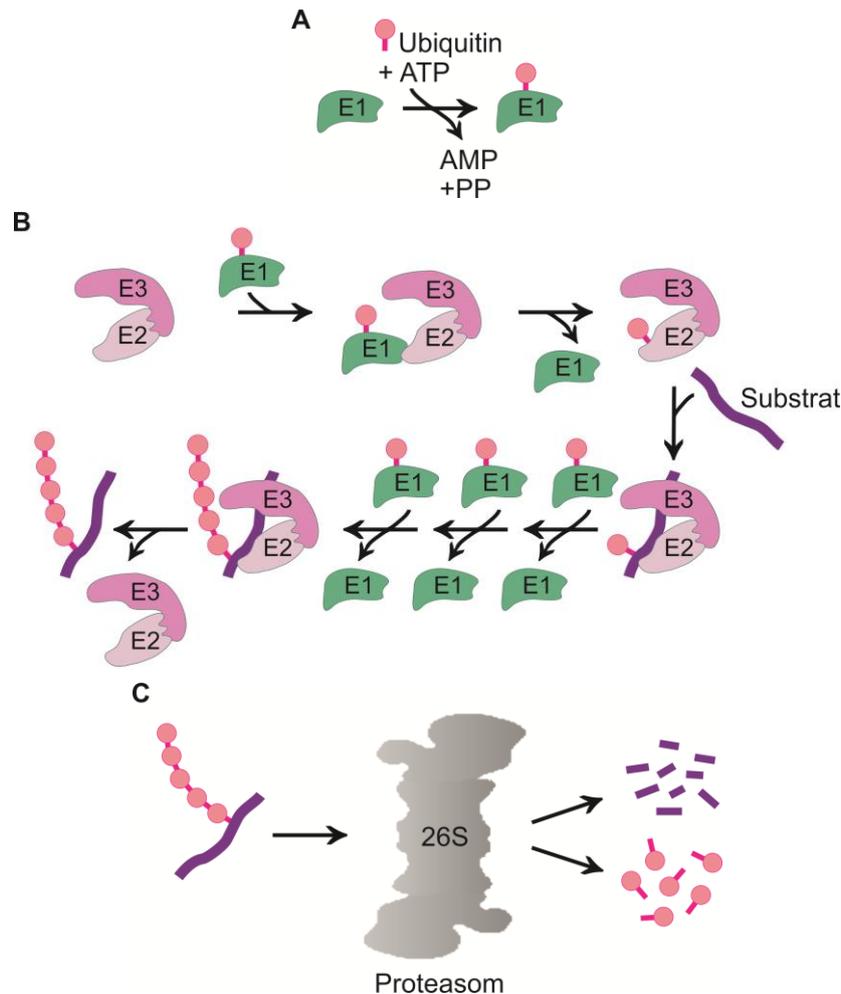


Abbildung 2.4: **Das Ubiquitin-Proteasom-System.** (A) **Aktivierung von Ubiquitin.** Für den proteasomalen Abbau von Substraten wird Ubiquitin C-terminal von einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) gebunden. Die Ausbildung dieser Thioesterbindung erfordert ATP. (B) **Substratmarkierung durch eine Ubiquitinkette.** Aktiviertes Ubiquitin wird von E1 auf Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) übertragen. Diese Enzyme werden wiederum von Ubiquitinligasen (E3) erkannt und gebunden. Ubiquitinligasen vermitteln die Übertragung von Ubiquitinmolekülen auf Lysinreste von abzubauenen Substraten. Durch Wiederholung dieses Prozesses entsteht eine Polyubiquitinkette. (C) **Proteasomaler Abbau.** Die Polyubiquitinkette wird vom 26S-Proteasom erkannt. Gebundene Substrate werden im Proteasom entfaltet und proteolytisch abgebaut. (Vogel A., Diplomarbeit 2012, Institut für Zellbiologie der Universität Bonn)

2.4 Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP

Die Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP ist ein 35 kDa großes, zytosolisches Protein, welches aus 303 Aminosäuren besteht. 1999 konnten CHIP erstmals bei der Suche nach TPR-Proteinen im menschlichen Herzen identifiziert werden. Das Protein ist hoch konserviert und hauptsächlich in adulter, gestreifter Muskulatur (Skelett- und Herzmuskulatur) und im Gehirn exprimiert. N-terminal ist eine TPR-Domäne lokalisiert, die aus drei TPR-Motiven besteht (Abb. 2.5). Wie bereits in Kapitel 2.2

Einleitung

beschrieben interagiert CHIP über die TPR-Domäne mit dem C-Terminus von Hsc/Hsp70 und Hsp90 (Ballinger et al., 1999).

Connell et al. konnten 2000 zeigen, dass die Bindung von CHIP an Hsp90-Substrat-Komplexe zur verringerten Hsp90-Hop-Interaktion und Dissoziation von p23 führte. Dadurch wurde die Aktivierung von Hsp90-Substraten negativ beeinflusst. Durch *in-vitro*-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Steroid-Bindeaktivität des Glukokortikoidrezeptors (GR), durch CHIP-Bindung an Hsp90, herabgesetzt wurde. Dieser Effekt beruhte auf verringerter Hsp90-GR-Bindung und verstärkter Ubiquitinierung des GR durch CHIP.

CHIP besitzt eine C-terminale U-Box-Domäne (Abb. 2.5), wodurch das Co-Chaperon in der Lage ist als E3-Ligase nicht-native Proteine zu ubiquitinieren. Hierbei interagiert CHIP mit der E2-Proteinfamilie Ubc4/5 und markiert so abzubauenende Substrate mit Ubiquitinresten (Demand et al., 2001). U-Box-Domänen weisen Ähnlichkeiten mit der Struktur von RING-Finger-Domänen auf (Jiang et al., 2001). Im Unterschied zu RING-Finger-Domänen, welche durch Zinkionen stabilisiert werden, wird das Gerüst von U-Box-Domänen durch ein System aus Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Aravind und Koonin, 2000). U-Box-Domänen sind ca. 70 Aminosäuren lang und katalysieren Polyubiquitinierungen durch gezielte Verknüpfung von Lys-48- und Lys-63-Resten von Ubiquitin (Hatakeyama et al., 2001).

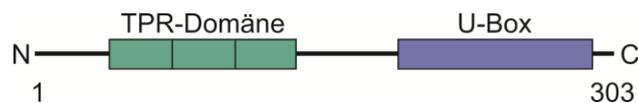


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CHIP. Die Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP ist aus 303 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa. N-terminal befindet sich eine TPR-Domäne, die aus drei TPR-Motiven aufgebaut ist. Über diese TPR-Domäne interagiert CHIP sowohl mit dem C-Terminus von Hsc/Hsp70 als auch mit dem C-Terminus von Hsp90. Zusätzlich besitzt CHIP eine C-terminale U-Box-Domäne, durch welche die Ubiquitinierung von Substraten induziert wird. CHIP fungiert als E3-Ligase, indem es die Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen induziert und so Hsc/Hsp70- und Hsp90-Substrate für den proteasomalen und lysosomalen Abbau markiert.

Der CHIP-induzierte Abbau von Hsc/Hsp70-Substraten konnte anhand des CFTR (*cystic-fibrosis transmembrane-conductance regulator*) gezeigt werden. CHIP interagiert am endoplasmatischen Retikulum mit Hsc/Hsp70 und reguliert so den Abbau von fehlgefaltetem CFTR. Hierbei wird fehlgefaltetes CFTR zu E2-Enzymen transportiert und ubiquitiniert. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass erhöhte Expressionslevel von CHIP dazu führten, dass das Gleichgewicht zwischen Faltung und Abbau von CFTR in Richtung Abbau verschoben wurde. Die Depletion der U-Box hingegen führte zur Inhibition von Ubiquitinierung und Abbau des CFTR. Durch dieses Experiment konnte die essentielle Rolle der U-Box-Domäne verdeutlicht werden (Meacham et al., 2001).

Bei der Ubiquitinierung von Chaperonsubstraten interagiert CHIP unter anderem mit dem Co-Chaperon BAG-1. Sobald CHIP durch Interaktion mit Ubc4/5-Proteinen Substrate ubiquitiniert hat, interagiert BAG-1 mit dem Proteasom und induziert die Substratabgabe von Hsc/Hsp70. Des Weiteren ist BAG-1 in der Lage, Substrate, wie den GR, zu binden und eine Interaktion mit dem CHIP-E2-Komplex zu vermitteln. Durch Interaktion mit BAG-1 wird die Abbaufunktion der E3-Ligase CHIP im Hinblick auf Hsc/Hsp70- und Hsp90-Substrate erweitert und der Faltungsprozess der molekularen Chaperone unterbrochen (Demand et al., 2001).

Ein weiteres CHIP-Substrat ist der Transkriptionsfaktor p53, der die Transkription von Genen steuert, die z.B. am Zellwachstumsarrest und an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Unter Stressbedingungen induziert p53 als Tumorsuppressorprotein Apoptose (King et al., 2001). Wildtyp-p53 ist ein relativ instabiles Protein, welches bei erhöhter Temperatur seine Konformation ändert. Mutiertes p53 ist in über 50 % der Fälle Auslöser für humane Krebserkrankungen. CHIP reguliert die Konformation und Aktivität von p53 unter physiologischer und erhöhter Temperatur. Unter ATP-Verbrauch verhindert CHIP die irreversible Hitzeinaktivierung von p53 und erhält die DNA-Bindeaktivität von hitzedenaturiertem p53. CHIP bindet Wildtyp-p53 und mutiertes p53 und erhält bei erhöhter Temperatur Wildtyp-p53 (Tripathi et al., 2007; Vogelstein et al., 2000). 2005 konnte gezeigt werden, dass CHIP als E3-Ligase den proteasomalen Abbau von p53 induziert. Durch Interaktion von CHIP mit der Ubc4/5-Proteinfamilie wird Chaperon-gebundenes p53 ubiquitiniert und für den proteasomalen Abbau markiert. In H1299-Zellen führten erhöhte CHIP-Mengen zum verstärkten Abbau von Wildtyp-p53. Die Depletion von CHIP in U2OS-Zellen hingegen führte zur Stabilisierung von Wildtyp-p53 (Esser et al., 2005). CHIP interagiert bei der Regulation von p53 mit der Ubiquitinligase Mdm2. Diese Interaktion findet dann statt, wenn sich ein Heterokomplex aus Mdm2, Hsp90 und p53 formiert. Hsp90 und Mdm2 induzieren die Entfaltung von p53. Gleichzeitig inhibiert Hsp90 jedoch die Ubiquitinierungsaktivität von Mdm2. CHIP ist in der Lage den Hsp90-Mdm2-p53-Komplex zu binden und die weitere Entfaltung und Ubiquitinierung von p53 zu induzieren (Burch et al., 2004).

2.5 Abbau von Substratproteinen

Der Chaperon-vermittelte Abbau von Proteinen oder Proteinkomplexen kann auf verschiedenen Wegen stattfinden. Der Chaperon-assistierte proteasomale Abbauweg CAP (*chaperone-assisted proteasomal degradation*) wird von der Ubiquitinligase CHIP und dem Co-Chaperon BAG-1 vermittelt. CHIP fungiert dabei als E3-Ligase, während BAG-1 N-terminal an Hsc/Hsp70 bindet und den gesamten Chaperonkomplex zum Proteasom rekrutiert (Abb. 2.6 A). BAG-1 vermittelt den Nucleotidaustausch von ADP zu ATP, sodass das Substrat auf das Proteasom übertragen und durch dieses abgebaut werden kann (Alberti et al., 2003). CHIP vermittelt ebenfalls den proteasomalen Abbau von Hsp90-Substraten, sodass eine Vielzahl von Proteinen, wie z.B. Signalproteine, Apoptoseregulatoren oder aggregationsanfällige Proteine, wie CFTR oder Tau, über CAP abgebaut werden können. CAP spielt daher eine wichtige Rolle bei Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson (Kettern et al., 2010).

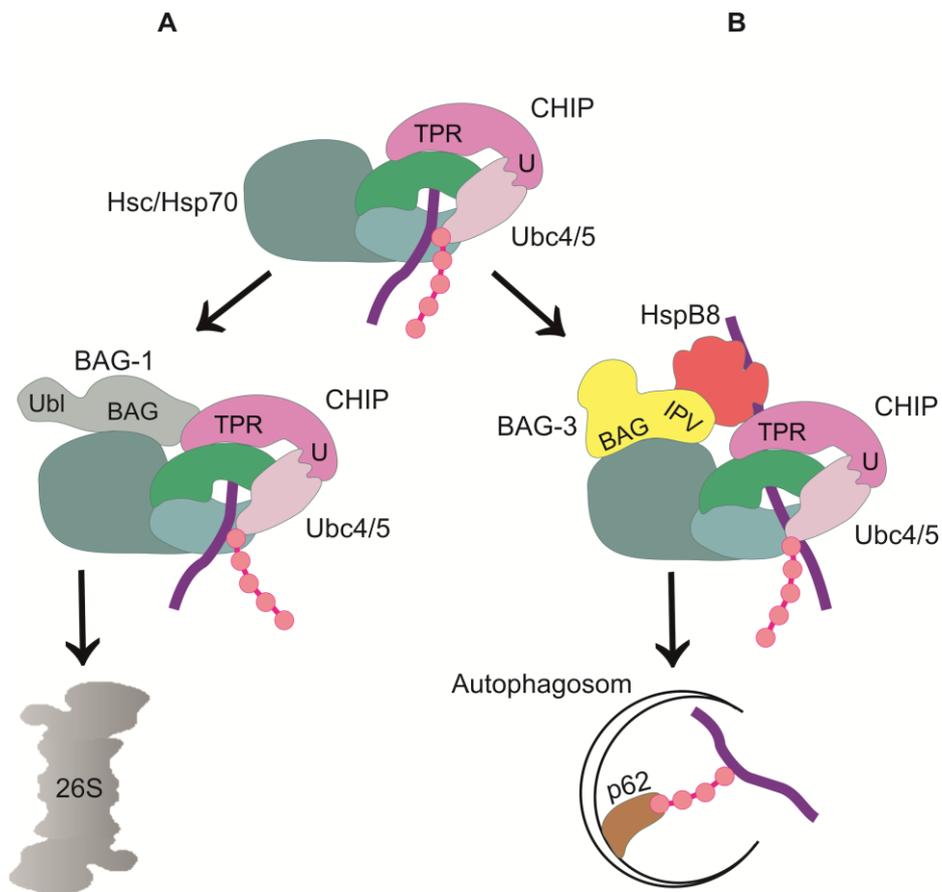


Abbildung 2.6: Chaperon-vermittelter Abbau von Proteinen. (A) **Chaperon-assistierter proteasomaler Abbauweg (CAP).** Der Abbau von Proteinen über das Proteasom wird durch das Co-Chaperon BAG-1 induziert. BAG-1 besitzt eine BAG-Domäne (BAG) und eine Ubiquitinähnliche Domäne (Ubl). Es interagiert mit der Ubiquitinligase CHIP, wodurch Hsc/Hsp70 zum Proteasom rekrutiert wird. CHIP markiert das Hsc/Hsp70-Substrat mit einer Polyubiquitinkette für den proteasomalen Abbau. Über die BAG-Domäne bindet BAG-1 an den N-Terminus von Hsc/Hsp70. Die Ubiquitinähnliche Domäne vermittelt die Interaktion des Chaperon-Substrat-Komplexes mit dem Proteasom. BAG-1 stimuliert die ATPase-Funktion von Hsc/Hsp70, sodass das Substrat vom Proteasom gebunden werden kann. (B) **Chaperon-vermittelte selektive Autophagie (CASA).** Bei der Chaperon-vermittelten selektiven Autophagie interagiert der Hsc/Hsp70-CHIP-Komplex mit dem Co-Chaperon BAG-3. BAG-3 vermittelt die Interaktion des Chaperon-Substrat-Komplexes mit HspB8, welches die Substraterkennung vermittelt und an das IPV-Motiv von BAG-3 bindet. CHIP markiert das abzubauenende Substrat mit einer Polyubiquitinkette für den lysosomalen Abbau und vermittelt die Interaktion zwischen BAG-3 und dem Ubiquitin-Adapterprotein p62, wodurch die Formierung eines Autophagosoms induziert wird. Das Substrat und der Chaperonkomplex werden von der Autophagosomenmembran eingeschlossen und lysosomal abgebaut. (Vogel A., Diplomarbeit 2012, Institut für Zellbiologie der Universität Bonn)

Neben CAP werden viele Proteine über Chaperon-vermittelte selektive Autophagie (CASA) abgebaut. Hierbei wird das abzubauenende Protein durch CHIP ubiquitiniert und anschließend von einer autophagischen Membran eingeschlossen und lysosomal abgebaut (Kettern et al., 2010). Abbildung 2.6 B zeigt, dass CHIP dabei mit dem Co-Chaperon BAG-3 interagiert, welches über die BAG-Domäne an den N-Terminus von Hsc/Hsp70 bindet. BAG-3 fungiert als Kopplungsfaktor zwischen

Hsc/Hsp70 und dem kleinen Hitzeschockprotein HspB8, welches an das IPV-Motiv von BAG-3 bindet (Arndt et al., 2010). HspB8 vermittelt die Substraterkennung und bindet denaturierte Proteine, während BAG-3 die Interaktion zwischen dem Chaperon-Substrat-Komplex und Proteinen vermittelt, die an der Formierung des Autophagosoms beteiligt sind (Carra et al., 2008). Hierfür rekrutiert CHIP das Ubiquitin-Adapterprotein p62 zum Chaperon-Substrat-Komplex (Arndt et al., 2010). p62 besitzt eine C-terminale Ubiquitinbinde-Domäne, über die es sowohl Lys-48, als auch Lys-63 verknüpfte Ubiquitinketten binden kann. Es initiiert die Formierung eines Autophagosoms (Abb. 2.6 B) (Kirkin et al., 2009).

2.6 Das Co-Chaperon Tpr2

2003 wurde das humane, zytosolische Protein Tpr2 von Brychzy et al. beschrieben. Es fungiert als Co-Chaperon von Hsc/Hsp70 und Hsp90 und besitzt zwei TPR-Domänen und eine J-Domäne (Abb. 2.7). Die C-terminalen EEVD-Sequenzen der molekularen Chaperone Hsc/Hsp70 und Hsp90 vermitteln, wie bereits für Hip, Hop und CHIP beschrieben, eine Interaktion mit TPR-Domänen (Kap. 2.2). Anhand eines Hefe-*two-hybrid-screens* wurde die Theorie aufgestellt, dass Tpr2 Hsp70 und Hsp90 über die TPR-Domänen C-terminal bindet (Brychzy et al., 2003).

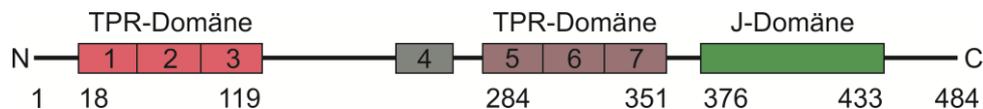


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Tpr2. Tpr2 ist aus 484 Aminosäuren aufgebaut und besteht aus zwei TPR-Domänen und einer C-terminalen J-Domäne. Das Co-Chaperon besitzt sieben TPR-Motive, wovon jeweils drei eine TPR-Domäne bilden. Tpr2 interagiert über die TPR-Domänen mit den molekularen Chaperonen Hsc/Hsp70 und Hsp90. Über die J-Domäne ist Tpr2 in der Lage die ATPase-Funktion von Hsc/Hsp70 zu regulieren und die Substratbindung durch Hsc/Hsp70 zu stimulieren (Brychzy et al., 2003).

Viele Jahre zuvor wurde das Tpr2-Gen in einem *two-hybrid-screen* als Bindepartner einer GAP-ähnlichen Domäne von Neurofibromin identifiziert. Damals konnte festgestellt werden, dass das Gen auf Chromosom 17q11.2-23 lokalisiert ist (Murthy et al., 1996). Das Protein Tpr2 ist aus insgesamt 484 Aminosäuren aufgebaut. In Abbildung 2.7 ist schematisch dargestellt, dass jeweils drei der sieben TPR-Motive eine TPR-Domäne bilden. Die C-terminale J-Domäne ist signifikant homolog zur J-Domäne des Co-Chaperons Hsp40. Das funktionelle HPD-Motiv der J-Domäne ist hoch konserviert (Brychzy et al., 2003).

In einem weiteren *two-hybrid-screen* wurde Tpr2 2001 als Bindepartner von Rad9 identifiziert. Rad9 ist ein Schlüsselprotein der Zellzyklus-Kontrollpunkte und besitzt ein BH3-Motiv, wodurch es mit Proteinen der Bcl-2-Familie der Apoptoseregulatoren interagieren kann. Tpr2 bindet Rad9 und Rad9-Bindepartner, wie Rad1 oder Hus1, über die N-terminalen TPR-Domänen. Eine Deletion der J-Domäne oder Punktmutation im HPD-Motiv führte zur verstärkten Interaktion zwischen Tpr2 und

Rad9. Es wurde geschlussfolgert, dass die J-Domäne von Tpr2 diese Interaktion reguliert. *In-vitro*-Experimente konnten weiter zeigen, dass ATP die Bindung hemmt. Da die J-Domäne von Mitgliedern der Hsp40-Familie die Chaperonaktivität von Hsc/Hsp70, durch Stimulation der ATPase-Aktivität, reguliert, wurde hier vermutet, dass Tpr2 als Co-Chaperon von Hsc/Hsp70 agiert. Des Weiteren konnte *in vivo* gezeigt werden, dass unter Stressbedingungen eine vorübergehende Dissoziation von Rad9 von Tpr2 stattfindet, welche wiederum durch Mutation im HPD-Motiv aufgehoben werden konnte. Zellen, die Tpr2 überexprimierten, waren resistenter gegenüber stressinduzierter Apoptose. Auch hierbei führte eine Punktmutation im HPD-Motiv zu erhöhter spontaner Apoptose und vermehrter stressinduzierter Apoptose. Hierdurch wurde eine mögliche Co-Chaperon-Funktion von Tpr2 während der Apoptoseregulation durch Hsc/Hsp70 weiter verstärkt (Xiang et al., 2001).

Brychzy *et al.* konnten 2003 zeigen, dass Tpr2 mit der Hsp70-Hsp90-Chaperonmaschinerie interagiert. Über die TPR-Domänen kann Tpr2 Hsp70 und Hsp90 gleichzeitig binden. Zusätzlich stimuliert das Co-Chaperon mit Hilfe seiner J-Domäne die ATPase-Aktivität und Substratbindung von Hsp70. Tpr2 induziert die ATP-unabhängige Dissoziation von Substraten von Hsp90 und konnte den retrograden Transfer von Hsp90-Substraten auf Hsp70 vermitteln.

In einer weiteren Studie konnten Moffatt *et al.* 2008 zeigen, dass Tpr2 eine Rolle bei der Hsp90-vermittelten Faltung des Progesteronrezeptors (PR) und der Proteinkinase Chk1 spielt. Tpr2 konnte dabei, wie das Co-Chaperon Hop auch, Hsp70 und Hsp90 unter ATP-Verbrauch simultan binden. Veränderte Tpr2-Mengen hatten jedoch keinen direkten Einfluss auf die Faltung oder Aktivierung des PR. Die Anwesenheit von Tpr2 erhöhte die Anzahl früher PR-Hsp70-Komplexe und verringerte die Anzahl an PR-Hsp90-Komplexen.

2.6.1 *Drosophila* TPR2

Das *Drosophila melanogaster* Co-Chaperon dTPR2 ist ein Ortholog des humanen Co-Chaperons Tpr2 und ebenfalls aus einer C-terminalen J-Domäne und sieben TPR-Motiven aufgebaut, die insgesamt zwei TPR-Domänen bilden (Abb. 2.8). Das dTPR2-Gen ist auf dem zweiten Chromosom von *Drosophila melanogaster* lokalisiert und kodiert fünf unterschiedliche Isoformen (FlyBase ID FBgn0032586). Die vorhergesagten Transkripte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenz. Die Polypeptide dTPR2-PA und -PD (58 kDa), sowie dTPR2-PB und -PE (53,2 kDa) teilen jedoch jeweils identische Aminosäuresequenzen, sodass im Western-Blot lediglich drei Isoformen anhand des Molekulargewichts unterschieden werden können. Die Isoform dTPR2-PC besitzt ein Molekulargewicht von 54,9 kDa. Das Gesamtlängen-Polypeptid ist 508 Aminosäuren lang (Abb. 2.8). Alle Isoformen enthalten sowohl die J-Domäne als auch die zwei TPR-Domänen. *Drosophila* TPR2 wird ebenso wie dem humanen Co-Chaperon Tpr2 eine Funktion bei Proteinfaltungsprozessen zugeschrieben.

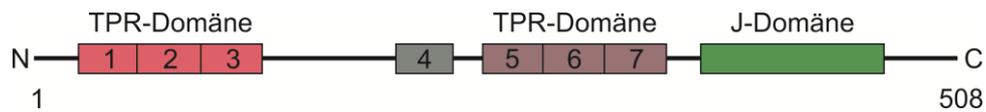


Abbildung 2.8: **Schematische Darstellung der Domänenstruktur von dTPR2.** Das dTPR2-Gen ist auf dem zweiten Chromosom von *Drosophila melanogaster* lokalisiert und kodiert fünf verschiedene Isoformen. Das vollständige Protein besteht aus 508 Aminosäuren und ist 58 kDa groß. Alle Isoformen besitzen sieben TPR-Motive, die zusammen zwei TPR-Domänen bilden, und je eine C-terminale J-Domäne.

Im Jahr 2000 wurde dTPR2 in einer Studie über Polyglutamin-Toxizität in *Drosophila melanogaster* identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von dTPR2 im Auge, durch Insertion eines Suppressor-P-Elements, zur Inhibition der Zerstörung der Augenstruktur und Verbesserung der retinalen Struktur führte. J-Proteine, wie auch dTPR2, sind aufgrund ihrer J-Domäne in der Lage andere Proteine zu binden. Es wurde vermutet, dass dTPR2 PolyQ-Proteine binden kann und so das gesunde Milieu in der Zelle gefördert und die Bildung von PolyQ-Aggregaten verhindert wurde (Kazemi-Esfarjani und Benzer, 2000). Sieben Jahre später wurde dTPR2 erneut in einem genetischen Screen zur Untersuchung der Ataxin-3-Neurodegeneration identifiziert. Diese neurodegenerative Erkrankung wird durch PolyQ-Bildung im ATXN3-Gen ausgelöst, welches das Protein Ataxin-3 kodiert und in der pathogenen Form zur Entstehung von toxischen Aggregaten führt. Eine Reduktion der dTPR2-Expression führte zur erhöhten Neurodegeneration im Auge und im inneren Netzhautabschnitt von einem Tag alten Fliegen. Erhöhte Expressionslevel von dTPR2 hingegen führten zur Abschwächung der pathogenen Ataxin-3-Toxizität. Des Weiteren führte eine erhöhte Expression von dTPR2 zur Unterdrückung der pathogenen Toxizität von mutiertem Tau-Protein. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass dTPR2 einen Einfluss auf Abbauprozesse von PolyQ-Aggregaten haben könnte (Bilen und Bonini, 2007). In einer darauf folgenden Studie konnte gezeigt werden, dass dTPR2 nicht nur den toxischen Effekt des Ataxin-3-PolyQ-Proteins vermindern kann, sondern auch einen Einfluss auf die Toxizität von CAG-Wiederholungen (Glutamin-Wiederholungen) in der RNA hat. Die Toxizität pathogener PolyQ-Ataxin-3-Proteine in *Drosophila melanogaster* konnte signifikant reduziert werden, indem CAG-Wiederholungen durch CAA-Wiederholungen (Glutamin-Wiederholungen) unterbrochen wurden. Diese Unterbrechung zerstört die toxische Haarnadelstruktur der RNA. dTPR2 konnte hierbei als Suppressor fungieren und die Entstehung der RNA-Wiederholungssequenzen regulieren. Anhand dieser Daten wurde vermutet, dass überschneidende Mechanismen von Protein- und RNA-basierender Toxizität für die Entstehung von PolyQ-Erkrankungen verantwortlich sein könnten. dTPR2 und andere Chaperone könnten auch hierbei eine Rolle spielen (Shieh und Bonini, 2011).

2.7 Insulin-Signalweg

Erst kürzlich konnte im Zuge einer Dissertation gezeigt werden, dass die Ubiquitinligase CHIP die Stabilität des Insulinrezeptors (INSR) beeinflussen kann. Dabei wurde eine Funktion von CHIP

Einleitung

während der Alterung von *Drosophila melanogaster* (DCHIP) nachgewiesen. Die Depletion von DCHIP im Mitteldarm führte zu einer Kurzlebigkeit der Fliegen und einer verstärkten Aktivierung des Insulinsignalweges (Tawo R., Dissertation 2016, Universität Bonn).

Insulin ist ein Hormon, das in den β -Zellen des Pankreas synthetisiert und sekretiert wird. Durch die Ausschüttung des Hormons wird die Glukosekonzentration im Blut reguliert, wodurch der Metabolismus von Glukose, Lipiden und Proteinen kontrolliert wird (Olivares-Reyes et al., 2009; Saltiel und Kahn, 2001). Insulin fördert die Speicherung von Nährstoffen im Fettgewebe, in der Leber und in der Muskulatur, wodurch wichtige Prozesse in der Zelle gesteuert werden. Durch die Aufnahme von Insulin werden Stoffwechselprozesse wie Lipogenese, Protein- und Glykogensynthese stimuliert und Prozesse wie Lipolyse, Glykogenolyse und Proteolyse gehemmt. Insulin fördert die Aufnahme von Glukose in die Zelle, indem es die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 von der intrazellulären Seite zur Zelloberfläche induziert. Insulin selber bindet auf der Zelloberfläche an den INSR. Der humane INSR gehört zur Familie der Tyrosinkinase und wird auf der Zelloberfläche als Heterotetramer, bestehend aus identischen α/β -Monomeren, präsentiert. Durch Bindung von Insulin an die α -Untereinheit kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors und Derepression der Kinaseaktivität der β -Untereinheit. Die β -Untereinheit wird an mehreren Tyrosinresten transphosphoryliert, wodurch es zur Konformationsänderung kommt und die Kinaseaktivität gesteigert wird. So kann die Phosphorylierung bestimmter Zielproteine induziert werden (Kitamura et al., 2003; Saltiel und Kahn, 2001). Zu diesen Zielproteinen gehören z.B. Mitglieder der Familie der INSR-Substrate (IRS) und Shc (Olivares-Reyes et al., 2009). Shc ist ein Adapterprotein, welches an vielen zellulären Signalwegen beteiligt ist. Es bindet viele Zelloberflächenrezeptoren, wie z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren, Antigenrezeptoren, Cytokinrezeptoren und Hormonrezeptoren (Ravichandran, 2001). Diese intrazellulären Substrate sind dann in der Lage Signalmoleküle zu binden und so unterschiedliche Signalwege zu aktivieren. Bedeutende Signalwege, die auf diese Weise aktiviert werden, sind der MAPK-Signalweg (*mitogen-activated protein kinase* - Signalweg) und der PI3K/AKT-Signalweg (*phosphatidylinositol-3-kinase*-Signalweg), welche in Abbildung 2.9 schematisch dargestellt werden. Der MAPK-Signalweg reguliert die Expression von Genen und das Zellwachstum, wohingegen der PI3K/AKT-Signalweg für die metabolische Aktivität von Insulin verantwortlich ist (Olivares-Reyes et al., 2009).

Die Stimulation von MAPK durch Insulin erfolgt durch Phosphorylierung von Shc-Tyrosinresten (Abb. 2.9). Shc interagiert daraufhin mit dem Adapterprotein Grb2, wodurch das Austauschprotein SOS (*Son-of-sevenless*) rekrutiert wird. SOS bindet und aktiviert Ras, ein zytosolisches Protein, das Guanin-Nukleotide binden, austauschen und hydrolysieren kann. Diese GTPase-Funktion ermöglicht Ras eine Serin-Kinase-Kaskade zu stimulieren. Im Verlaufe dieser Kaskade werden Raf-1, MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) und MAPK aktiviert. MAPK katalysiert die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Nukleus, wodurch zelluläre Proliferation und Differenzierung initiiert werden (Saltiel und Kahn, 2001; Santos und Nebreda, 1989).

Die Stimulation des PI3K/AKT-Signalweges durch Insulin führt zur Phosphorylierung von mehreren Tyrosinresten der IRS, durch den INSR (Abb. 2.9). Dies führt zur Interaktion von IRS mit PI3K, ausgeführt durch die regulatorische Untereinheit p85 von PI3K, und zur erhöhten Aktivität der katalytischen Untereinheit p110 von PI3K. PI3K phosphoryliert Phosphoinositide, wodurch

Phosphoinositol-3-Phosphatasen entstehen, die eine Vielfalt von Signalmolekülen binden. Der PI3K/AKT-Signalweg ist essentiell für viele metabolische Prozesse, wie Glukosetransport, Glykogen- und Proteinsynthese. PI3K aktiviert die Serin/Threonin-Kinase AKT, welche das Insulinsignal, durch Phosphorylierung weiterer Proteine, weitergibt (Saltiel und Kahn, 2001).

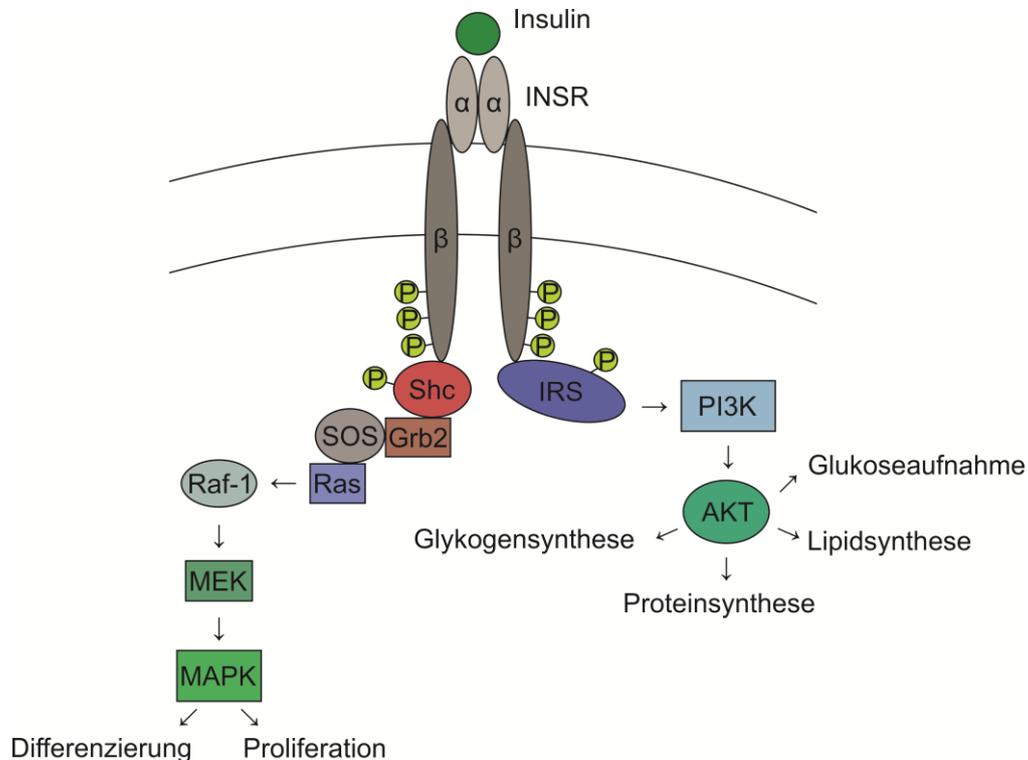


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Insulinsignalweges. Das Hormon Insulin bindet auf der Zelloberfläche an die α -Untereinheit des INSR. Dadurch wird die Kinaseaktivität der β -Untereinheit stimuliert und die Phosphorylierung bestimmter Zielproteine induziert. Insulin reguliert wichtige Signalwege, wie z.B. den MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg. Der INSR phosphoryliert IRS, wodurch die Interaktion mit PI3K stimuliert wird. PI3K aktiviert anschließend die Serin/Threonin-Kinase AKT, wodurch die Synthese von Glykogen, Proteinen und Lipiden und die Aufnahme von Glukose gesteuert wird. Die Phosphorylierung von Shc, durch den INSR, führt zur Interaktion von Shc mit dem Adapterprotein Grb2. Dadurch wird das Austauschprotein SOS rekrutiert und die kleine GTPase Ras aktiviert. Ras stimuliert eine Serin-Kinase-Kaskade, bei der Raf-1, MEK und MAPK aktiviert werden. MAPK kann dann die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Nukleus katalysieren. Über diesen Signalweg werden zelluläre Proliferation und Differenzierung gesteuert.

Der INSR und die IRS-Proteine können ebenfalls an Serin-Resten phosphoryliert werden, wodurch die Insulin-stimulierte Phosphorylierung von Tyrosinresten geschwächt wird und das Insulinsignal negativ reguliert werden kann. Diese Regulation ermöglicht eine Interaktion mit Signalwegen, die eine Insulinresistenz stimulieren. Darüber hinaus wird das Insulinsignal durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen) reguliert. PTPasen katalysieren die Dephosphorylierung des INSR und die der IRS (Saltiel und Kahn, 2001).

Einleitung

Die Bindung von Insulin an den INSR führt zur Endozytose des gesamten Komplexes (Geiger et al., 1989; Gorden et al., 1982). Dadurch wird der Rezeptor in Endosomen angereichert, wodurch Substrate, die nicht an der Plasmamembran lokalisiert sind, phosphoryliert werden können (Bevan et al., 2000). Im Endosom wird Insulin abgespalten und der Rezeptor dephosphoryliert. Der INSR wird anschließend an die Plasmamembran recycelt oder abgebaut (Knutson, 1991).

Das *Drosophila* Ortholog des INSR dInR (*Drosophila insulin receptor*) ist ebenfalls ein Tetramer, bestehend aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten (Chen et al., 1996). dInR weist eine konservierte Insulinbindestelle und Tyrosin-Kinase-Domäne auf und unterscheidet sich zum humanen INSR darin, dass das C-terminale Ende deutlich länger ist. Auf diesem Abschnitt sind mehrere Tyrosinreste lokalisiert, welche als Autophosphorylierungs-Domäne fungieren. In humanen Zellen rekrutiert und aktiviert Insulin PI3-K durch Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1. Der verlängerte C-Terminus von dInR könnte diesen Prozess direkt ausführen. Auf die Bindung von Insulin würde die Autophosphorylierung des Rezeptors und eine direkte Bindung und Aktivierung der *Drosophila* PI3-Kinase folgen. dInR ist auch in *Drosophila melanogaster* essentiell für die normale Entwicklung und notwendig für die Ausbildung der Epidermis und des Nervensystems während der Embryogenese (Fernandez et al., 1995). Veränderungen in der Aktivität des dInR führten zur veränderten Zellgröße und -anzahl in Organen. Der Insulinsignalweg ist daher hoch konserviert und spielt auch in *Drosophila* eine Rolle bei der Wachstumskontrolle. Insulin-ähnliche Proteine DILP (*Drosophila insulin-like peptides*) werden im zentralen Nervensystem sehr gewebespezifisch und auch in Vorläuferorganen umfassend exprimiert, sodass ein Nährstoff-regulierter Mechanismus vermutet wird, bei dem DIL-Peptide das Wachstum koordinieren (Brogiolo et al., 2001). Die Produktion und Sekretion von Insulin und DIL-Peptiden findet in insulinproduzierenden Zellen IPCs (*insulin producing cells*) statt. Signale aus dem Fettkörper scheinen diese Zellen zu regulieren, was bedeutet, dass der Fettkörper eine Rolle bei der Regulierung des Insulinspiegels spielt (Park et al., 2014).

Wie bereits beschrieben wird das humane Co-Chaperon Tpr2 mit der Faltung von Proteinen in Zusammenhang gebracht (Kap. 2.6). 2003 wurde Tpr2 eine Funktion im Recyclingprozess nicht vollständig gefalteter Proteine zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Tpr2 den Transfer von Proteinen von Hsp90 auf Hsp70 induziert, wodurch das Aggregationsrisiko fehlgefalteter Proteine im Zytosol minimiert wurde. Experimente mit dem GR konnten zeigen, dass Tpr2 eine Rolle bei der Hsp70/Hsp90-vermittelten Faltung spielt. Dabei wurde die Interaktion zwischen Hsp90 und dem GR durch Tpr2 verhindert und die Bindung zwischen Hsp70 und dem GR induziert. Veränderte Expressionslevel von Tpr2 in der Zelle hatten einen Einfluss auf die Aktivierung des Rezeptors (Brychzy et al., 2003). Der GR ist ein Substrat der Ubiquitinligase CHIP (Kap. 2.4), genau wie der INSR (Tawo R., Dissertation 2016, Universität Bonn). In der vorliegenden Arbeit wurde der INSR daher als Substrat verwendet, um den Einfluss von Tpr2 auf die Stabilität eines CHIP-Substrats zu untersuchen und die biochemische Funktion von dTPR2 in *Drosophila melanogaster*, unter anderem im Zusammenhang mit Alterungsprozessen, zu charakterisieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammen alle, bis auf die unten aufgeführten, von den folgenden Firmen: Fischer scientific, Merck Eurolab, Sigma-Aldrich und Roth.

Bezeichnung	Hersteller
Amylose-Agarose	New England Biolabs
Bafilomycin A1	Peptanova, LC-labs
Chloroquin	Sigma
DNA-Probenpuffer	Fermentas
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Dynamamin Inhibitor V.34-2	Calbiochem, Merck-Millipore
ECL-Lösungen "West Pico" und "West Femto"	Pierce
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Jazz-Mix AS153 <i>Drosophila</i> Food	Fisher Scientific
JetPRIME Transfektions-Kit	peqlab
KOD-Hot-Start-Polymerase	Novagen
Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker	Fermentas
MG132	Peptanova
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Oligonukleotide	Biomers

Penicillin-Streptomycin-Mix	Gibco
PAGERuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Protein-G-Sepharose	Amersham Pharmacia
Protease-Inhibitor-Mix "Complete"	Roche Diagnostics GmbH
Restriktionsenzyme	Fermentas
Trypsin/EDTA	Gibco

3.1.2 Geräte

Es wurden folgende Geräte verwendet:

Name	Bezeichnung und Hersteller
Absaugsystem	AA12, HLC Biotech
Binokular Mikroskop M3C	Wild-Heerbrugg
Entwicklermaschine	CURIX 60, AGFA
Eismaschine	MF22 Scotsman
Elektrophorese-Apparatur	HE33, Hoefer
Feinwaage	SI-234, Denver Instruments
Gefrierschrank (-80°C)	Forma Scientific
Gel-Dokumentationssystem	Gel Doc, Biorad
Infrarot-Scanner	Odyssey, LI-COR
Inkubator	Biotron, Binder
Kaltlichtquelle KL 1500	SCHOTT
Kühl- und Brutschrank	RUMED, Rubarth Apparate GmbH

Kühlzentrifuge	Centrifuge 5415R, Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf
Magnetrührer	MR2002, Heidolph
Mikropipetten	Research, Eppendorf
Nassblot-Apparatur	Mighty Small Transphor, Amersham
Netzgeräte	Elektrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham
PCR-Cycler	Mastercycler personal, Eppendorf
pH-Meter	PB-11, Sartorius
Photometer	Eppendorf
SDS-PAGE-Apparatur	Mighty Small II, Amersham
Schüttler	KS 250 basic, IKA Labortechnik
Sterilbank	Microflow Biological safety cabinet, NNI
Thermo-Block	HLC, Biotech QBT, Grant Industries
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus
Ultrazentrifuge	Optima L-80 XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter
Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Waage	KB, Kern
Wasserbad	A100, Lauda
Zentrifuge	Avanti J-25 Centrifuge, Beckman Coulter

3.1.3 Antikörper

Es wurden folgende primäre Antikörper verwendet:

Antigen	Spezies	Quelle
β-Aktin	Maus	Abcam
γ-Tubulin	Maus	Sigma
γ-Tubulin	Ziege	Santa Cruz
GST	Kaninchen	Santa Cruz
Hsc70	Kaninchen	Biogenes
Hsp90	Maus	Santa Cruz
INSR	Kaninchen	Santa Cruz
Luziferase	Kaninchen	Sigma
dTPR2	Kaninchen	Biogenes
Tpr2/DNAJC7	Kaninchen	Abcam
STUB1/CHIP	Kaninchen	Abcam

Es wurden folgende polyklonale, Peroxidase-gekoppelte, sekundäre Antikörper für Western-Blots verwendet:

Antigen	Spezies	Quelle
Maus-IgG	Ziege	Sigma
Kaninchen-IgG	Ziege	Sigma
Ziege-IgG	Kaninchen	Sigma
Clean-Blot	diverse	Thermo Scientific
TrueBlot	Maus	Rockland

3.1.4 Bakterienstämme

Die Klonierung und Amplifikation von Plasmiden wurde in einem kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*) TG1 Stamm durchgeführt. Für die Expression rekombinanter Proteine unter Kontrolle des T7-Promotors wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet.

3.1.5 Plasmide

Es wurden folgende Plasmide verwendet:

Plasmid	Bemerkung
pcDNA3.1(+)	Expression von Proteinen in Säugerzellen, unter Kontrolle eines viralen Promotors (Invitrogen).
pcDNA3.1(+)-CHIP	(AG Höhfeld)
pcDNA3.1(+)-Tpr2	Zur Verfügung gestellt von Jason Young (Brychzy et al., 2003).
pCMV-Tag 2B	Expression von Proteinen in Säugerzellen mit N-terminalem FLAG-Tag, unter Kontrolle eines CMV-Promotors (Clontech).
pCMV-Tag 2B-CHIP	(AG Höhfeld)
pETM11	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> mit einem N-terminalen, durch TEV-Protease abspaltbaren, His-Tag (EMBL)
pETM11-dTPR2	(AG Höhfeld)
pGEX-4T-1	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> (Pharmacia Biotech)
pGEX-4T-1-Hcs70-C110	(AG Höhfeld)
pGEX-4T-1-Hsc70-C139	(AG Höhfeld)
pGEX-4T-1-Hsc70-N383	(AG Höhfeld)
pPROEX HTa	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> mit N-terminalem His-Tag, unter Kontrolle eines Trc-Promotors.
pPROEX HTa-Tpr2	Zur Verfügung gestellt von Jason Young (Brychzy et al., 2003).

3.1.6 Säugerzelllinien

Es wurden folgende eukaryotische Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Beschreibung
Hek293	Adenovirus 5-transformierte humane Nierenzellen

3.1.7 siRNA

Es wurde folgende siRNA zur spezifischen Depletion von Genprodukten verwendet:

Genprodukt	siRNA-Name	Spezies	Hersteller
Tpr2	SI05166189	Human	Qiagen
Tpr2	SI00371266	Human	Qiagen

3.1.8 *Drosophila melanogaster*-Linien

Es wurden folgende Linien von *Drosophila melanogaster* verwendet:

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>Act5C-Gal4</i>	P {w[+mC]=Act5C-GAL4} {Abella, 2009 #28} 17bFO1/CyO	Bloomington, Indiana
<i>MHC-Gal4</i>	w[*]; P {w[+mC]=GAL4-MHC} 3	M. Winberg
<i>Ppl-Gal4</i>	w[*]; P {w[+mC]=ppl-GAL4.P} 2	Bloomington, Indiana
<i>PSwitch106</i>	P {w[mW.hs]=Switch1} 106	Bloomington, Indiana
RNAi- <i>dTPR2</i> (KK)	w ¹¹¹⁸ ; P{KK101629}VIE260-B	VDRC, Wien
<i>TIGS-2</i>	P{Switch-unk}TIGS-2	Scott Pletcher

UAS- <i>dTPR2</i>	w ⁻ ; P{w[+mC]=UAS-Tpr2.K}2	Bloomington, Indiana
Wildtyp ⁻	w ¹¹¹⁸ (als Wildtyp verwendet)	Bloomington, Indiana

3.2 Methoden im Umgang mit *Escherichia coli*

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium:	1 % Trypton/Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl pH 7,5
LB-Agar:	LB-Medium + 1,5 % Agar
Antibiotika-Stocklösung:	200 mg/ml Ampicillin bzw. 50 mg/ml Kanamycin Sterilfiltration
Sektionsmedien:	LB-Medium + LB-Agar 1:1000 Antibiotika-Stocklösung

Die Kultivierung von *E.coli* Bakterien erfolgte sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkulturen über Nacht bei 37 °C. Die Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 200 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden, falls notwendig, für kurze Zeit bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Für die Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 100 ml einer LB-Flüssigkultur mit einer 2 ml Übernachtskultur beimpft. Diese Kultur wurde bei 37 °C inkubiert bis eine OD600 von 0,3 gemessen werden konnte. Anschließend wurde die Kultur 10 Min. auf Eis gekühlt und für 10 Min. bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden nochmals sedimentiert und dann in 20 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ aufgenommen. Anschließend folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, bevor die Zellen erneut pelletiert wurden. Abschließend wurden die Bakterienzellen in 1 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂/15 % Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Transformation von Bakterien

Die Transformation von kompetenten Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock. Hierzu wurde ein 25 µl der Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA vermischt. Es wurden 0,5 µg DNA einer Plasmidpräparation oder 2 µg DNA eines Ligationsansatzes verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 42 Sek. bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium zur phänotypischen Expression der Antibiotikaresistenz 30 Min. bei 37 °C geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Zellen in einem Zehntel Volumen des Überstandes resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurden, und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Falls notwendig, wurden die Ausstriche auf den Agarplatten bei 4 °C gelagert.

3.2.4 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Nach Wachstum der transformierten Bakterienkolonien wurden mit einer Pipettenspitze Kolonien von der Agarplatte gestrichen und für das Animpfen einer Flüssigkultur (350 ml-1 l LB-Medium) verwendet. Das LB-Medium wurde vorher mit entsprechendem Antibiotikum versetzt. Im Falle einer Expression von MBP-Fusionsproteinen wurden dem LB-Medium zusätzlich 0,2 % Glukose hinzugefügt. Anschließend wurde die Flüssigkultur bei 37 °C und 200 rpm inkubiert bis eine OD600 von 0,3 - 0,7 erreicht wurde. Durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) wurde die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Die Flüssigkultur wurde erneut bei 25-30°C und 200 rpm für mindestens 3 Std. geschüttelt. Abschließend wurde die Flüssigkultur zentrifugiert und das Bakterienpellet mit PBS gewaschen und gegebenenfalls bei -80 °C gelagert.

3.3 Methoden im Umgang mit eukaryotischen Zellen

3.3.1 Kultivierung von Säugerzelllinien

Zellkulturmedium: Hek293-Zellen:

- DMEM
- 10 % FCS
- 2 mM Glutamin
- 100 IU/ml Penicillin
- 100 IU/ml Streptomycin

PBS:	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	1,4 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,4
	autoklaviert
Trypsinlösung:	0,05 % Trypsin/EDTA

Die Hek293-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im entsprechenden Medium kultiviert. Zur Passage der Zellen wurde bei einer Konfluenz von 80-90 % das Medium abgesaugt und die adhären Zellen mit PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen wurde durch das Hinzufügen von 1 ml Trypsinlösung pro 10 cm-Schale und Inkubation bei 37 °C für 5 Min. erreicht. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Ein Aliquot der so erhaltenen Zellsuspension wurde dann 1:6 verdünnt und in eine neue Zellkulturschale überführt.

3.3.2 Transfektion mit Calciumphosphat

2 x HBS:	1,6 g NaCl
	0,074 g KCl
	0,027 g Na ₂ HPO ₄
	0,2 g Glukose
	1,19 g HEPES
	pH auf genau 7,05 mit 0,5 M NaOH einstellen
	mit A.bidest auf 100 ml Endvolumen auffüllen
	Lagerung bei -20 °C
CaCl ₂ -Lösung:	2,5 M CaCl ₂
	sterilfiltriert
	Lagerung bei -20 °C

Für die Transfektion von Zellen mit Calciumphosphat wurden die oben aufgelisteten, selbst angesetzten, Lösungen verwendet. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion so gesplittet, dass am folgenden Tag eine Konfluenz von 40-60 % erreicht wurde. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Anschließend wurde für pro 10 cm-Schale folgender Transfektionsansatz pipettiert:

20-28 µg Plasmid-DNA

86,8 µl CaCl₂-Lösung

→ mit autoklaviertem H₂O auf 700 µl Endvolumen auffüllen

Die Plasmid-DNA wurde zuerst in sterilem H₂O aufgenommen und nach Zugabe der CaCl₂-Lösung kurz gevortext. Unter gleichzeitigem Vortexen wurden 700 µl der 2 x HBS-Lösung tropfenweise hinzugegeben. Der Ansatz wurde wenige Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, damit die Bildung der Calciumpräzipitate stattfinden konnte. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die vorbereiteten Zellen pipettiert und diese 8-16 Std. bei 37 °C inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit PBS und die erneute Zugabe von frischem Medium. Die Zellen wurden abschließend erneut für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Für die Transfektionen in kleineren Kulturschalen wurde das Volumen des Ansatzes entsprechend der Wachstumsfläche verringert.

3.3.3 Transfektion mit JetPRIME – Reagenz

Mit Hilfe des JetPRIME-Transfektionsreagenzes wurden eukaryotische Zellen sowohl mit Plasmid-DNA als auch mit siRNA transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so gesplittet, dass am folgenden Tag eine Konfluenz von 40-60 % erreicht wurde. Für die Transfektion einer 10 cm-Schale wurde folgender Ansatz pipettiert:

500 µl JetPRIME Puffer

10 µg Plasmid-DNA oder 105 pmol siRNA (10 nM)

20 µl JetPRIME Reagenz

Die Plasmid-DNA wurde zunächst in JetPRIME Puffer aufgenommen. Dann wurde das JetPRIME Reagenz hinzugefügt und der Ansatz für 10 Sek. gevortext. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 10 Min. bei RT. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die vorbereiteten Zellen pipettiert und diese für 16 Std. bei 37 °C inkubiert. Nach 16 Std. erfolgten ein Waschschrift mit PBS und die erneute Zugabe von Medium. Die Zellen wurden erneut für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Für die Transfektion von Zellen in kleineren Kulturschalen wurde das Volumen des Ansatzes entsprechend der Wachstumsfläche verringert.

3.3.4 Behandlung von Hek293 mit Inhibitoren

Hek293-Zellen wurden wie folgt mit verschiedenen Inhibitoren behandelt:

Inhibitor	Konzentration/Dauer
Bafilomycin A1	7,3 mM, 16 Std.
Chloroquin	50 μ M, 16 Std.
Dynamamin Inhibitor V.34-2	20 μ M, 16 Std.
MG132	25 μ M, 16 Std.

3.4 Methoden im Umgang mit *Drosophila melanogaster*

3.4.1 Fliegenhaltung

Fliegenfutter: 190 g Jazz-Food *Drosophila* Mix
 10 % Nipagin in 25 ml EtOH (100 %) p.a.
 mit autoklaviertem H₂O auf 100 ml Endvolumen auffüllen

Der Jazz-Food *Drosophila* Mix wurde in kochendes Wasser eingerührt und für 10 Min. aufgekocht. Bei einer Temperatur von 60 °C wurde die Nipagin-Lösung hinzugefügt und Plastikröhrchen zu einem Viertel mit dem Fliegenfutter befüllt. Das Futter wurde für zwei Tage bei RT zum Trocknen stehen gelassen.

Um wichtige *Drosophila*-Linien erhalten und vermehren zu können, wurden diese in den mit Futter befüllten Plastikröhrchen gehalten. Die Fliegen wurden bei 25 °C gehalten. Die Fliegen-Stocks (Kap. 3.1.8) der unterschiedlichen Linien wurden zur Erhaltung alle zwei Wochen in neue Futterröhrchen umgesetzt. Solche Fliegen, welche an laufenden Experimenten beteiligt waren, wurden einmal pro Woche in neue Futterröhrchen umgesetzt.

3.4.2 Selektive Kreuzung verschiedener Genotypen

Für die Kreuzung von Fliegen mit unterschiedlichem Genotyp wurden mit Hilfe eines Binokulars weibliche Jungfrauen der gewünschten Genotypen identifiziert und gesammelt. Hierfür wurden die Fliegen für kurze Zeit auf einer CO₂-Gasfritte betäubt und anhand phänotypischer Marker selektiert. Die Jungfrauen eines Genotyps wurden mit Männchen des zweiten gewünschten Genotyps zusammengesetzt und gekreuzt. Die Kreuzungen wurden bei 25 °C gehalten und einmal pro Woche in ein neues Futterröhrchen umgesetzt.

3.4.3 Spezifische Genmanipulation

Mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems und des *GeneSwitch*-Systems wurden Gene gezielt in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Durch Kreuzung von Effektorlinien des dTPR2-Gens mit unterschiedlichen Treiberlinien konnte dTPR2 gezielt depletiert oder induziert werden. Als Kontrollen wurden die gewebespezifischen Treiberlinien mit Wildtypfliegen *w¹¹¹⁸* gekreuzt.

Die Expression von Zielgenen mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems findet bereits im Embryonalstadium statt, sobald die unterschiedlichen Linien miteinander gekreuzt wurden (Brand und Perrimon, 1993). Im Gegensatz hierzu muss die Expression eines Zielgens, welches mit Hilfe des *GeneSwitch*-Systems erzeugt wird, zunächst durch Zugabe eines Liganden (RU486) induziert werden (Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001). Hierfür wurden Männchen der F1-Generation gesammelt und auf 20 ml Hefefutter gehalten, welches mit 2 ml 70 %iger EtOH-Lösung getränkt wurde, in der 80 mg/ml RU486 enthalten waren. Die Männchen der Kontrollgruppe wurden auf 20 ml Hefefutter gehalten, welches mit 2 ml 70 %iger EtOH-Lösung getränkt wurde.

a) Gendepletion

Für die Depletion des dTPR2-Gens wurde eine RNA-Interferenz-Effektorlinie (RNAi-Effektorlinie) verwendet. Die RNAi-*dTPR2*(KK)-Linie stammte aus der transgenen RNAi-Bibliothek des *Vienna Drosophila RNAi Centers* (VDRC, Austria) und enthielt ein induzierbares UAS-RNAi-Konstrukt für das dTPR2-codierende Gen. Die Effektorlinie stammte von 2009. RNAi-*dTPR2*(KK) ist eine heterozygote Linie und trägt das RNAi-*dTPR2*-Konstrukt auf dem zweiten Chromosom. Auf einem anderen Chromosom trägt diese Effektorlinie ein Balancer-Chromosom mit dem dominanten Marker *CyO* (*Curly of Oyster*). Balancer-Chromosomen verhindern allgemein die homologe Rekombination mit dem entsprechenden Schwester-Chromosom. So können rezessiv letale Mutationen als stabile *Stocks* gehalten werden. Heterozygote *CyO*-Fliegen weisen gebogene Flügel auf. Dadurch können die gewünschten F1-Nachkommen einer Kreuzung anhand der Flügelstellung selektiert werden.

b) Geninduktion

Die induzierte Expression des dTPR2-Gens wurde durch Verwendung einer UAS-Effektorlinie (*upstream-activation-sequence*-Effektorlinie) des *Bloomington Drosophila Stock Centers* (BDSC, *Indiana University*, USA) erzeugt. Das UAS-Konstrukt wurde auf dem zweiten Chromosom inseriert. UAS-*dTPR2*(2) ist eine homozygote Linie.

c) Treiberlinien

Für die ubiquitäre Depletion oder Induktion des dTPR2-Gens wurde eine *Aktin-Gal4*-Treiberlinie verwendet. Das Strukturprotein Aktin ist in jeder eukaryotischen Zelle vorhanden. In der ersten F1-Generation findet daher in jeder Zelle eine Gal4-induzierte Genexpression der RNAi-*dTPR2*- oder UAS-*dTPR2*-Linie statt. Um eine muskuläre Depletion oder Induktion des dTPR2-Gens hervorzurufen, wurde die *MHC-Gal4*-Treiberlinie (*myosin heavy chain*-Treiberlinie) verwendet. *MHC-Gal4* ist ein muskelspezifischer Treiber, der auf dem dritten Chromosom inseriert wurde (Davis et al., 1997). In der Muskulatur befindet sich ein *MHC*-Promotor, der mit dem ORF (*open reading frame*) des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert wurde (Dutta et al., 2002). Die Depletion des dTPR2-Gens im *fatbody* wurde mit Hilfe der *pumpless-Gal4*-Treiberlinie (*ppl-Gal4*) durchgeführt. Der Locus des *ppl*-Gens befindet sich auf dem dritten Chromosom. Die Expression des Gal4-Transkriptionsfaktors findet unter der Kontrolle des *fatbody*-spezifischen *pumpless* Promotors statt (Zinke et al., 1999). Die Depletion von dTPR2 in *fatbody* und *midgut* wurde mit Hilfe der P{Switch1} Linie S₁106 Treiberlinie durchgeführt. S₁106 ist ein P-Element, dessen *Gene-Switch*-Kassette *downstream* des P-Transposase-Promotors und des transkriptionellen Startcodons inseriert wurde. Das DNA-Transposon führt zur Expression des Reporter-Gens sowohl im *fatbody* als auch im *midgut* (Roman et al., 2001). Für die Depletion von dTPR2 im *midgut* wurde der *TIGS-2* Treiber verwendet. Für diesen Treiber konnte eine RU486-abhängige Expression von Reportergen im Verdauungssystem nachgewiesen werden (Poirier et al., 2008).

3.4.4 Verhaltensstudien

a) Analyse der Lebensspanne

Um die Lebensspanne von Mutanten und Kontrollfliegen untersuchen zu können, wurden Männchen der entsprechenden Genotypen bei 25 °C in Futterröhrchen gehalten und mindestens alle fünf Tage beobachtet. Hierbei war es wichtig die Anzahl der noch lebenden Tiere zu dokumentieren und das Verhalten der Fliegen zu beobachten. Charakteristische Merkmale, wie z.B. die Stellung der Flügel oder die Bewegungsaktivität der Fliegen wurden untersucht. Die Futterröhrchen wurden wöchentlich gewechselt, sodass schlechtes Futter als Grund für verfrühte Sterblichkeit ausgeschlossen werden konnte. Um biochemische Analysen durchzuführen, wurden mindestens zehn Männchen pro Genotyp

zu einem bestimmten Zeitpunkt gesammelt und für die Herstellung von Proteinextrakten (Kap. 3.6.1) verwendet.

b) Mobilitäts-Assay

Wurde während der Analyse der Lebensspanne eine Auffälligkeit in der Mobilität von Fliegen festgestellt, so wurde ein Mobilitäts-Assay durchgeführt. Für diese Analyse wurde die Kletterfähigkeit der Fliegen im Vergleich zu Kontrollfliegen getestet. Als Zeitpunkt der Analyse wurde Tag 5, Tag 15 und Tag 30 der adulten Fliegen festgelegt. Die Fliegen wurden vor jedem Test in ein frisches Futterröhrchen umgesetzt und mussten in diesem eine Höhe von 6 cm hoch klettern bzw. fliegen. Die Testphase war 16 Sek. lang. Zu Beginn wurden die Fliegen, durch leichtes Klopfen des Röhrchens auf den Tisch, auf den Boden des Röhrchens befördert. So wurde gewährleistet, dass alle Fliegen vom Boden aus starten. Pro Zeitpunkt gab es fünf Testphasen. Zwischen den Testphasen lag eine Ruhephase von 30 Sekunden. Es wurden die Fliegen gezählt, welche die 6 cm Markierung überwinden konnten. Während der gesamten Versuchsreihe wurden die Fliegen bei 25 °C gehalten.

3.4.5 Statistik der Überlebensexperimente

Abb.	Genotyp	Mittlere Lebensspanne in Tagen \pm S.E.M.	Anzahl n	P-Wert im Vergleich zur Kontrolle
4.12 C	<i>MHC-GAL4/ w¹¹¹⁸</i>	62.43 \pm 0.73	212	
	<i>MHC-GAL4/ RNAi-dTPR2</i>	73.92 \pm 0.9	203	< 0.0001 (***)
4.13	<i>PSwitch106/ RNAi-dTPR2</i> EtOH	65.30 \pm 1.63	85	
	<i>PSwitch106/ RNAi-dTPR2</i> 80 μ g/ml RU486	62.63 \pm 2.08	97	n. s.
4.14	<i>ppl-GAL4/ w¹¹¹⁸</i>	61.70 \pm 1.12	112	
	<i>ppl-GAL4/ RNAi-dTPR2</i>	60.31 \pm 0.74	341	n. s.
4.15	<i>TIGS-2/ RNAi-dTPR2</i> EtOH	68.16 \pm 1.15	136	
	<i>TIGS-2/ RNAi-dTPR2</i> 80 μ g/ml RU486	69.41 \pm 1.23	119	n. s.

3.4.6 Analyse von *Drosophila*-Larven

Apfelsaft-Agar:	85 g Agar
	1 l Apfelsaft
	100 g Zucker
	40 ml Nipagin-Lösung
Hefe:	Bäckerhefe mit etwas Wasser vermischen

Um *Drosophila*-Larven besser untersuchen zu können, wurden die Elterngenerationen in etwas größere Käfige überführt, welche dann auf Apfelsaft-Agarplatten gesetzt wurden. Auf die Agarplatten wurde zuvor etwas Bäckerhefe gestreut, welche mit Wasser befeuchtet wurde. Durch das Fressen dieser konzentrierten Hefe wird der Stoffwechsel angeregt und die Weibchen legen vermehrt Embryonen ab. Die Fliegen wurden weiterhin bei 25 °C gehalten. Nach einigen Tagen konnten die ersten Larven gesammelt werden. Die Elterngeneration wurde hierfür zuvor nur für 1-4 Std. auf eine Agarplatte gesetzt. So war es möglich alle Entwicklungsstadien zu untersuchen. Im gewünschten Stadium wurden die Larven mit Wasser von der Platte gespült und in einem Sieb gesammelt. Anschließend wurden Proteinextrakte (Kap. 3.6.1) hergestellt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Plasmid-Präparation

a) Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Für die saubere Isolierung von Plasmid-DNA wurde das QIAprep Mini-prep-Kit von Qiagen oder das Mini-prep-Kit von Biomol verwendet. Dabei wurde die DNA über eine Silikatsäule gereinigt und konnte anschließend für die Sequenzierung oder für zellbiologische Methoden verwendet werden. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

b) Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

Für die Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien, wurde eine 300 ml Übernacht-Kultur angesetzt. Hierfür wurden *E.coli* TG1 Bakterien mit entsprechender Plasmid-DNA transformiert (Kap.3.2.3) und über Nacht bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. Die präparative Isolierung erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe des QIAprep Maxi-prep-Kits gemäß den Angaben des Herstellers.

3.5.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260-280 nm. Die Messung wurde mittels Nano-Drop (Peqlab) durchgeführt. Die Extinktion von 1-260 nm entspricht dabei einer Konzentration von:

50 µg/ml für doppelsträngige DNA

20 µg/ml für Oligonukleotide

40 µg/ml für RNA

Nach der Messung wurde die Reinheit der Probe bestimmt, indem mit Hilfe des Nano-Drops die Quotienten aus OD260/OD280 und OD260/OD230 berechnet wurden. Bei doppelsträngiger DNA wurde bei einem Wert von 1,8 von einer sauberen Präparation ausgegangen. Bei der Messung von RNA sollte der Wert bei 2,0 liegen.

3.5.3 PCR

Mit Hilfe der Standard-PCR wurden spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. Dabei wurde die Amplifikation durch die KOD-Hot-Start-DNA-Polymerase ausgeführt. Die Durchführung mit entsprechenden Puffern und Salzen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Novagen).

PCR-Ansatz (50 µl):

- 5 µl 10x-PCR-Puffer
- 0,1 µg „*template*“ DNA
- 5 µl dNTP-Mix (2 mM)
- 3 µl MgSO₄ (25 mM)
- 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl KOD-Hot-Start-DNA-Polymerase (1 U/µl)
- mit sterilem H₂O auf 50 µl Endvolumen auffüllen

Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe eines automatischen, programmierbaren Thermocyclers (Eppendorf) durchgeführt.

PCR-Protokoll				
	Zeit	Phase	Temp.	Zyklen
1.	10 Min.	Initiale Denaturierung	95 °C	
2.	30 Sek.	Denaturierung	95 °C	
3.	30 Sek.	Annealing	T _m	
4.	1 Sek./100 bp	Elongation	70 °C	2.-4. fünf Mal wiederholen
5.	30 Sek.	Denaturierung	95 °C	
6.	30 Sek.	Annealing	T _m	
7.	1 Sek./100 bp	Elongation	70 °C	5.-7. dreißig Mal wiederholen
8.	10 Min.	Finale Elongation	70 °C	
9.	∞	Ende	4 °C	

Die Hybridisierungstemperatur (T_m) und die Dauer der Elongation wurden entsprechend der thermodynamischen Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments eingestellt.

Anschließend erfolgte die Analyse der PCR-Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.5.5). Die PCR-Fragmente konnten im Anschluss an eine Gelextraktion (Kap.3.5.6) direkt für Klonierungen eingesetzt werden.

3.5.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Für die Restriktion von DNA wurden *FastDigest* Enzyme von Fermentas verwendet. Mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme wurden Plasmide und PCR-Produkte nach Angaben des Herstellers verdaut. Dabei war zu beachten, dass Plasmid-DNA schneller verdaut wird, als PCR-Produkte. Dementsprechend wurden die Restriktionsansätze unterschiedlich lang inkubiert. Wurden Plasmid-Leervektoren für Klonierungen verdaut, so war zu beachten, dass dem Restriktionsansatz 1 µl *FastAP* (thermosensitive Alkaline Phosphatase) hinzugefügt wurde. Die Phosphatase dephosphoryliert Vektor-DNA und verhindert so eine spontane Religation der freien DNA-Enden des Vektors ohne Insert-DNA. Die Restriktionsansätze wurden 30-60 Min. bei 37 °C inkubiert.

Restriktions-Ansatz (20 µl): 2 µl 10x*FastDigest*-Puffer
 1 µg „*template*“ DNA
 je 1 µl Restriktionsenzym
 mit sterilem H₂O auf 20 µl Endvolumen auffüllen

3.5.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris
 20 mM Essigsäure
 1 mM EDTA
 pH 8,0
Gel: 1 % Agarose in TAE-Puffer

Die Auftrennung geschnittener DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Für die Analyse von DNA-Fragmenten mittels UV-Licht wurde 1 µl des Farbstoffs GelRed (Genaxxon) in die Agarose-Lösung gegeben. 1 % Agarose wurde zuvor durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Bevor die flüssige Agarose den festen Gelzustand erreicht, wurde GelRed hinzugegeben. Die DNA wurde mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Anschließend erfolgte der Gellauf für 40 Min. bei 100 V. Mittels UV-Licht konnte das Bandenmuster der DNA sichtbar gemacht werden und die Größe der Fragmente anhand des Längenstandards analysiert werden. Je nach Bedarf wurden DNA-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt.

3.5.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von präparativen Restriktions- und PCR-Ansätzen wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen extrahiert. Die Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers mit dem „*QIAEX II Gel Extraction Kit*“ von Qiagen oder dem „*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*“ von Macherey-Nagel durchgeführt.

3.5.7 Ligation von DNA

Nachdem der Zielvektor und entsprechende DNA-Fragmente durch Restriktionsenzyme verdaut wurden, wurden alle Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und anschließend daraus extrahiert und aufgereinigt. Der Vektor und das DNA-Fragment wurden für die Ligation im Verhältnis 1:3 eingesetzt.

Ligations-Ansatz (20 µl): 2 µl 10xT4-Ligase-Puffer
 X ng *Insert*-DNA
 150 ng Vektor
 1 µl T4-DNA-Ligase

Die Ligation erfolgte für 16 Std. bei 16 °C. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt, indem der Ansatz für 10 Min. bei 65 °C inkubiert wurde. Die Erhöhung der Temperatur führt dazu, dass die T4-DNA-Ligase von der DNA abgespalten und somit inaktiviert wird.

3.5.8 DNA-Sequenzanalyse

Klonierte DNA-Konstrukte wurden von der Firma GATC Biotech AG sequenziert.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Herstellung von Proteinextrakten

Lysepuffer: 25 mM MOPS, pH 7,2
 100 mM KCl
 0,5 % Tween
 5 mM EDTA
 50 x „*Complete*“

Lysepuffer RIPA (+SDS): 25 mM Tris, pH 8,0
 150 mM NaCl
 0,1 % SDS
 0,5 % Natriumdeoxycholat
 1 % Nonidet P-40
 10 % Glycerol
 2 mM EDTA
 1x „*Complete*“

a) Herstellung von Bakterienextrakten

Zur Herstellung von Bakterienextrakten wurden transformierte *E. coli* Bakterien zunächst bei 4 °C und 5.000 rpm für 10 Minuten pelletiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in Lysepuffer resuspendiert und 6x für 30 Sek. auf Eis sonifiziert. Die sonifizierten Bakterien wurden 30 Min. auf Eis inkubiert und dann in der Ultrazentrifuge für 30 Min. bei 4 °C und 16.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und konnte für eine Proteinaufreinigung verwendet werden (Kap. 3.6.8).

b) Herstellung von Zellextrakten

Transfizierte Hek293-Zellen wurden 48 Std. nach der Transfektion mit PBS gewaschen und in PBS-Lösung aus der Kulturschale geerntet. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet für 30 Min. in 20-50 µl RIPA (+SDS) auf Eis lysiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen für 30 Min. bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Mittels Bradford-Reagenz wurde die Proteinkonzentration der Überstände bestimmt (Kap. 3.6.2) und mit RIPA-Lysepuffer (+SDS) und 3-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer auf eine Konzentration von 4 µg/µl (wenn möglich) eingestellt. Die Proteinextrakte wurden anschließend für 5 Min. bei 92 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE (Kap. 3.6.4) und Western-Blot (Kap. 3.6.6) analysiert.

c) Herstellung von Fliegen- und Larvenextrakten

Für die Herstellung von Fliegenextrakten wurden männliche Fliegen eines gewünschten Genotyps mittels Binokular und CO₂-Betäubung selektiert. Je nach Bedarf wurden einzelne Körperregionen präpariert oder die gesamte Fliege gewählt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Entsprechend der Präparatgröße wurden 10-20 Fliegen selektiert und präpariert. Die Fliegen bzw. Fliegenpräparate wurden mit einem Mörser unter ständigem Schockgefrieren zerkleinert. Nach Hinzugabe von RIPA-Lysepuffer (+SDS) wurden die Lysate sonifiziert und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 30 Min. bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Mittels Bradford-Reagenz konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden (Kap. 3.6.2) und die Lysate mit RIPA-Lysepuffer (+SDS) und 3-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer auf eine Proteinkonzentration von 4 µg/µl eingestellt werden. Die Proteinextrakte wurden ebenfalls für 5 Min. bei 92 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE (Kap. 3.6.4) und Western-Blot (Kap. 3.6.6) analysiert.

Die Herstellung von Larvenextrakten erfolgte genauso wie die von Fliegenextrakten. Zuvor wurden die Larven auf Apfelsaft-Agarplatten kultiviert (Kap. 3.4.6) und im entsprechend gewünschten Larvenstadium von der Platte herunter gesammelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in einer Probe wurde photometrisch mit Hilfe des Bradford-Reagenzes bestimmt. Hierzu wurden die Proben 1:20 in 20 µl H₂O vorverdünnt und dann mit 980 µl Bradford-Reagenz vermischt. Für jede Probe wurde eine zweifache Bestimmung durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde nach 5-minütiger Inkubation der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt. Das verwendete Photometer wurde zu Beginn durch eine IgG-Standard-Verdünnungsreihe geeicht.

3.6.3 Proteinfällung

Die Fällung von Proteinen, durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA), diente der Aufkonzentrierung der Proben. Hierzu wurden die Proteinlösungen mit 50 %iger TCA-Lösung auf eine 12,5 %ige TCA-Konzentration eingestellt. Die Proteinlösungen wurden 30 Min. oder über Nacht auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die ausgefallenen Proteine 30 Min. bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Proteinpräzipitat in 30 µl 1-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden für 5 Min. bei 92 °C inkubiert. Eventuell wurden einzelne Proben durch Zugabe von 1-2 µl 1 M Tris-Base (pH 9,0) neutralisiert.

3.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer:	25 mM Tris
	190 mM Glycin
	1 % SDS
Probenpuffer (3x):	0,2 M Tris/HCl, pH 6,8
	6 % SDS
	30 % Glycerol
	0,03 % Bromphenolblau
	15 % β-Mercaptoethanol

Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Pro Gelspur wurden 40 µg Protein eingesetzt. Der Gellauf wurde anschließend bei 20-25 mA durchgeführt. Als Größenstandard diente der "PAGERuler Plus Prestained Protein Ladder" von der Firma Fermentas.

Material und Methoden

Für die Analyse unterschiedlicher Proteingrößen wurden Ansätze unterschiedlicher Konzentration für zehn Trenngele nach Laemmli hergestellt:

Gelkonzentration:	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	15,2 ml	15,2 ml	15,2 ml	15,2 ml
30 % Acrylamid (0,8 % BisAa)	15,1 ml	20 ml	25,2 ml	30,2 ml
H ₂ O	28,9 ml	24 ml	18,7 ml	13,7 ml
10 % SDS	890 µl	890 µl	890 µl	890 µl
10 % APS	390 µl	390 µl	390 µl	390 µl
TEMED	38 µl	38 µl	38 µl	38 µl

Ansatz für fünf Sammelgele nach Laemmli:

1 M Tris/HCl, pH 6,5	2 ml
30 % Acrylamid (0,8 % BisAa)	1,33 ml
H ₂ O	4,41 ml
10 % SDS	240 µl
10 % APS	80 µl
TEMED	8 µl

3.6.5 Färbung von Polyacrylamidgelen

a) Coomassie-Färbung

Coomassie-Lösung:	50 % Methanol
	10 % Essigsäure
	0,125 % Coomassie Brilliant Blue R 250
Entfärbelösung:	50 % Methanol
	10 % Essigsäure

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Gelelektrophorese in Coomassie-Lösung aufgekocht und bei RT für 15 Min. geschwenkt. Sobald die Gele vollständig gefärbt waren, wurde die Coomassie-Lösung abgekippt und die Gele mit Entfärbelösung inkubiert. Sobald die Proteinbanden sichtbar wurden und die gewünschte Färbung erreicht war, wurden die Gele in A. bidest aufbewahrt.

b) Kolloidale Coomassie-Färbung

Fixierlösung:	34 % Methanol
	2 % Phosphorsäure
	17 % Ammoniumsulfat
Färbelösung:	34 % Methanol
	2 % Phosphorsäure
	17 % Ammoniumsulfat
	0,66 g/l Coomassie Brilliant Blue G 250 (in Methanol gelöst)

Mit Hilfe einer kolloidalen Coomassie-Färbung lassen sich Proteinbanden schneller und sensitiver anfärben. Die Polyacrylamidgele wurden hierfür über Nacht in 100 ml Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele für 1-2 Tage in Färbelösung inkubiert. Je nach Bedarf wurde die Färbelösung mehrfach gewechselt. Die Entfärbung der Gele wurde durch Zugabe von A. bidest durchgeführt.

3.6.6 Western-Blot

Transferpuffer:	20 mM Tris-Base 144 mM Glycin 20 % Methanol 0,01 % SDS
TBST-Puffer:	20 mM Tris-Base 137 mM NaCl 0,006 % Triton X-100 pH 7,6
Blockpuffer:	2 % Milchpulver in TBST bzw. 3 % BSA (<i>bovine serum albumin</i>) in TBST

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur gemäß Herstellerangaben auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Proteintransfer erfolgte bei 300 mA und dauerte je nach Größe der Proteine 1-1,5 Stunden. Um den Transfer anschließend kontrollieren zu können, wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau-S-Lösung inkubiert. Der rote Azofarbstoff färbt Proteine, indem er reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen bindet. Durch Zugabe von A. bidest wurde der Hintergrund entfärbt. Im weiteren Verlauf wurden einzelne Proteine immunochemisch detektiert. Dazu wurde die Membran bei RT für 30 Min. mit Blockpuffer blockiert, und dann über Nacht mit einer Verdünnung des gewünschten primären Antikörpers bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für 10 Min. mit TBST-Puffer gewaschen, bevor die Inkubation mit einem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörper erfolgte. Abschließend wurde die Membran erneut 3x mit TBST-Puffer gewaschen und die Proteine mittels ECL-Lösung nach Angaben des Herstellers immunochemisch detektiert. Die Zugabe der ECL-Lösung erzeugt eine enzymatische Reaktion, bei der Lichtsignale auf einem Röntgenfilm (Kodak) dargestellt werden.

3.6.7 Strippen von Nitrocellulosemembranen

Stripping-Puffer:	0,76 g Tris Base 2 g SDS 700 µl β-Mercaptoethanol pH 6,8 mit HCl einstellen auf 100 ml H ₂ O auffüllen
-------------------	---

Gebundene primäre und sekundäre Antikörper können durch Strippen von einer Nitrocellulosemembran entfernt werden. Hierfür wurde die Membran für 30 Min. bei 50 °C in *Stripping*-Puffer inkubiert. Anschließend wurden 5-6 Waschschrte mit TBST-Puffer (Kap. 3.6.6) durchgeführt, bevor die Membran mit einem neuen primären Antikörper inkubiert wurde.

3.6.8 Reinigung von Proteinen

a) Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Lysepuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl 5 mM EDTA 1 mM DTT 1 x „Complete“
Waschpuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl 1 mM DTT 1 x „Complete“
ATP-Waschpuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl 1 mM ATP 1 mM MgCl ₂
Elutionspuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl 100 mM Glutathion (reduziert), pH 7,2
Säule:	Glutathion-Sepharose

Das GST-Fusionsprotein wurde rekombinant in *E.coli BL21 (DE3)* Bakterien exprimiert (Kap. 3.2.4). Aus den verwendeten *E.coli* Bakterien wurden Extrakte hergestellt (Kap. 3.6.1). Pro 1 g Bakterienpellet wurden 5 ml Lysepuffer eingesetzt. Die Bakterien wurden mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden für 30 Min. bei 16.000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge sedimentiert und der Überstand mit den gelösten Proteinen auf das zuvor mehrfach gewaschene und mit Lysepuffer äquilibrierte Säulenmaterial gegeben. Die Bindung der Proteine erfolgte bei 4 °C für 2 Std. auf dem Drehrad. Anschließend wurde das Säulenmaterial für 1 Min. bei 1.000 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde 5x mit Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundene Proteine zu entfernen. Zwischen jedem Waschschr

wurde die Säule für 1 Min. bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als nächstes wurde ein ATP-Waschschritt durchgeführt, um ATP-abhängige Bindungen von Proteinen an das Fusionsprotein zu entfernen. Zur Elution, der an die Säule gebundenen Proteine, wurde das Säulenmaterial in eine Chromatographiesäule überführt. Es wurden mehrere Elutionsschritte durchgeführt, bei denen die Glutathion-Sepharose mit je 1 ml Elutionspuffer inkubiert wurde. Der Elutionspuffer sickert dabei durch die Chromatographiesäule, löst gebundene Proteine von der Matrix und kann anschließend in einem Eppendorfgefäß aufgefangen werden. Unmittelbar nach der Elution wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Eluate bestimmt (Kap. 3.6.2) und solche Eluate mit hoher Proteinkonzentration zusammengeführt. Das Gesamteluat konnte dann in einer Vivaspin-Säule gewaschen, umgepuffert und aufkonzentriert werden. Hierdurch wurde das Glutathion aus dem Elutionspuffer entfernt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Eluats erneut bestimmt und dieses dann aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Um die Aufreinigung des Proteins zu kontrollieren, wurden vor und während der Aufreinigung Proben von der Expression des rekombinanten Proteins (-IPTG und +IPTG) (Kap. 3.2.4), des Gesamtlysats, des Überstandes nach der Bindung an die Säule, der Sepharose nach der Elution und des Eluats entnommen. Diese Proben wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 3.6.4) in einem Gel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung (Kap. 3.6.5) analysiert.

b) Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen

Lysepuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl 40 mM Imidazol, pH 8,0 1 x „Complete“
Waschpuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl 40 mM Imidazol, pH 8,0 1 x „Complete“
ATP-Waschpuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl 40 mM Imidazol 1 mM ATP 1 mM MgCl ₂
Elutionspuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl 200 mM Imidazol, pH 8,0
Säule:	Ni-NTA-Agarose

Nachdem das Histidin-Fusionsprotein in *E.coli BL21 (DE3)* Bakterien exprimiert wurde (Kap. 3.2.4), wurden diese in 5 ml Lysepuffer pro 1 g Bakterienpellet auf Eis lysiert und sonifiziert (Kap. 3.6.1). Durch Ultrazentrifugation für 30 Min. bei 16.000 rpm und 4 °C wurden Zelltrümmer sedimentiert und der proteinreiche Überstand konnte abgenommen und auf das mehrfach gewaschene und mit Lysepuffer äquilibrierte Säulenmaterial gegeben werden. Die Bindung der His-getaggten Proteine erfolgte für 2 Std. bei 4 °C auf dem Drehrad. Anschließend wurde das Säulenmaterial für 1 Min. bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, sodass der Überstand abgenommen und verworfen werden konnte. Im Folgenden wurde die Ni-NTA-Agarose-Säule 5x mit Waschpuffer gewaschen, sodass nichtgebundene Proteine entfernt werden konnten. Nach jedem Waschschrift wurde das Säulenmaterial für 1 Min. bei 1.000 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand anschließend verworfen. Vor der Elution erfolgte ein ATP-Waschschrift. Dadurch wurden ATP-abhängig gebundene Proteine entfernt. Für die folgende Elution der gebundenen Proteine wurde das Säulenmaterial in eine Chromatographiesäule überführt. Die Elution wurde in mehreren Schritten durchgeführt, für die je 1 ml Elutionspuffer durch die Chromatographiesäule sickerte und dabei gebundene Proteine von der Ni-NTA-Agarose-Säule löste. Die einzelnen Eluate wurden in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Anschließend wurde die Proteinkonzentrationen der Eluate bestimmt (Kap. 3.6.2) und solche mit hoher Konzentration zusammengeführt. Mittels Zentrifugation in einer Vivaspinsäule konnte das Gesamteluat umpuffert und aufkonzentriert werden. Das Umpuffern diente hierbei der Senkung einer zu großen Imidazol-Konzentration. Nach der Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration erneut gemessen, das Eluat aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Um die Aufreinigung und Reinheit des Proteins zu überprüfen, wurden vor und während der Aufreinigung Proben der Expression (-IPTG und +IPTG), des Gesamtlysats, des Überstandes nach der Bindung an die Säule, der Ni-NTA-Agarose nach der Elution und des Eluats genommen. Mittels SDS-PAGE (Kap. 3.6.4) wurden die Proben im Gel aufgetrennt und das aufgereinigte Protein durch Coomassie-Färbung (Kap. 3.6.5) überprüft.

3.6.9 Proteinbindeassay

Bindepuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2
	100 mM KCl
	20 mM Imidazol
	0,5 % Tween
Waschpuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2
	100 mM KCl
	40 mM Imidazol
	0,5 % Tween

Material und Methoden

Elutionspuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2
	100 mM KCl
	200 mM Imidazol
Säule:	Ni-NTA-Agarose
Ansatz (300 µl):	0,5 µmol folgender Proteine:
	His-dTPR2 (diese Arbeit)
	GST-Hsc70-C110 (AG Höhfeld)
	GST-Hsc70-C139 (AG Höhfeld)
	GST-Hsc70-N383 (AG Höhfeld)

Für *in-vitro*-Bindeexperimente diente His-*getaggt*es dTPR2 als Köder. dTPR2 wurde in verschiedenen Kombinationen mit Hsc70-Domänen inkubiert. Hierzu wurden von jedem Protein 0,5 µM eingesetzt und alle Kombinationen in 300 µl Bindepuffer pipettiert. Die Bindung der Proteine erfolgte für 1 Std. bei 4 °C auf dem Drehrad. Anschließend wurde die zuvor mehrfach mit Bindepuffer gewaschene und äquilibrierte Ni-NTA-Agarose hinzugegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 1,5 Std. bei 4 °C auf dem Drehrad. Nach Bindung des His-*getaggt*en dTPR2 an die Säule, wurde diese für 1 Min. bei 1.000 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Um unspezifische Bindungen an die Säule zu entfernen, wurde die Ni-NTA-Agarose mehrfach mit Waschpuffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 Min. bei 1.000 rpm und 4 °C. Hierbei war es wichtig vor der Elution zwei Waschschriffe ohne 0,5 % Tween durchzuführen. Die Elution erfolgte 2x für 10 Min. mit 500 µl Elutionspuffer. Die beiden Eluate wurden vereint und 30 Min. auf Eis oder über Nacht bei 4 °C mit TCA-Lösung inkubiert und gefällt (Kap. 3.6.3). Nach der TCA-Fällung wurde das Eluat für 20 Min. bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Die gefällten Proteine wurden in 30 µl 1-fach konzentriertem Probenpuffer aufgenommen und für 5 Min. bei 92 °C aufgeköcht. Um die Reinheit und Konzentration der eingesetzten Proteine zu überprüfen, wurden 20 % der jeweils eingesetzten Proteinmenge in 10 µl 3-fach konzentriertem Probenpuffer aufgenommen und mit der nötigen Menge an Bindepuffer auf eine Gesamtmenge von 30 µl verdünnt. Diese Proben wurden ebenfalls für 5 Min. bei 92 °C inkubiert. Das Bindeexperiment wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 3.6.4) und Western-Blot (Kap. 3.6.6) analysiert.

3.6.10 Luziferase-Aggregations-Assay

Puffer: 20 mM MOPS, pH 7,2
 50 mM KCl
 2 mM MgCl₂
 1 mM DTT
 2 mM ATP

Ansatz (20 µl): 2 µM dTPR2 (diese Arbeit)
 3 µM Hsc70 (AG Höhfeld)
 0,06 µM Luziferase (Sigma)
 mit Puffer auf 20 µl Gesamtvolumen auffüllen

Mit Hilfe des Luziferase-Aggregations-Assays sollte die Co-Chaperonaktivität von dTPR2 untersucht werden. Hierzu wurde dTPR2 *in vitro* in verschiedenen Ansätzen mit dem Chaperon Hsc70 und dem Substrat Luziferase eingesetzt. Im folgenden Assay wurde das Substrat Luziferase durch Hitze deaktiviert. Der Einfluss von Hitze führt dazu, dass Luziferase die natürliche Faltungskonformation verliert und dadurch aggregiert. Dieser Aggregationsprozess kann durch die Bindung von Chaperonen und Co-Chaperonen verhindert werden. Um die Co-Chaperon-Aktivität von dTPR2 zu überprüfen, wurde Luziferase jeweils mit dTPR2 und Hsc70 allein und in Kombination mit dTPR2 und Hsc70 inkubiert. Als Negativkontrolle für den Aggregationsprozess diente eine Probe der Luziferase, welche auf Eis gehalten wurde. Als Positivkontrolle für den Aggregationsprozess diente ein Ansatz, indem nur Luziferase vorhanden war. Die verschiedenen Ansätze wurden für 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze, bis auf die Eis-Probe, für 15 Min. bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Zu jeder Probe wurden 5 mM EDTA hinzugefügt. EDTA stoppt ATP-abhängige Reaktionen, indem es Mg²⁺-Ionen bindet. Es folgte die Zentrifugation aller Proben für 20 Min. bei 100.000 x g und 4 °C. In diesem Schritt wurden aggregierte Proteine von löslichen getrennt. Aggregate wurden pelletiert, wohingegen lösliche Proteine im Überstand verblieben. Nach der Zentrifugation wurden Überstand und Pellet sorgfältig voneinander getrennt. Die Proteinpellets wurden in 30 µl 1-fach konzentriertem Probenpuffer aufgenommen. Die Überstände wurden mit 10 µl 3-fach konzentriertem Probenpuffer auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt. Die Analyse der SDS-Proben erfolgte mittels SDS-PAGE (Kap. 3.6.4) und Western-Blot (Kap. 3.6.6). Hierzu wurde ein primärer Antikörper gegen das Substrat Luziferase 1:1000 in Blockpuffer verdünnt eingesetzt.

3.6.11 Immunpräzipitation

Lysepuffer RIPA (ohne SDS):	25 mM Tris, pH 8 100 mM NaCl 0,5 % Natriumdeoxycholat 1 % Nonidet P-40 10 % Glycerol 2 mM EDTA
Waschpuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2 100 mM KCl
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin/HCl, pH 3,5
Säule:	Protein-G-Sepharose

Für die Analyse endogener Proteinkomplexe *in vivo* wurden Hek293-Zellen verwendet. Für jedes Experiment wurden 3 Schalen (10 cm) kultivierter Zellen verwendet. Die Zellen wurden 48 Std. vor der Lyse mit siRNA oder Plasmid-DNA transfiziert. Zu Beginn der Immunpräzipitation wurden die Zellen aus den Kulturschalen gelöst und durch Zugabe von RIPA-Puffer (ohne SDS) 20 Min. auf Eis lysiert. Um die Lyse zu verstärken wurden die Zellen zusätzlich sonifiziert. Das Lysat wurde anschließend für 30 Min. bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration im Extrakt gemessen (Kap. 3.6.2). Durch Zugabe von Waschpuffer wurde eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde der Extrakt in zwei Fraktionen aufgeteilt und mit spezifischem Substratantikörper oder Kontroll-Antikörper (IgG) inkubiert. Nachdem die Proben 1,5 Std. Inkubation bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert wurden, wurden 25 µl Protein-G-Sepharose zu den Fraktionen hinzugegeben und die Ansätze weitere 1,5 Std. bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 6x mit Waschpuffer gewaschen, wobei zwischen jedem Waschschrift ein Zentrifugationsschritt von 1 Min. bei 1.000 rpm und 4 °C stattfand. An die Säule gebundene Proteinkomplexe wurden letztlich durch Zugabe des Elutionspuffers eluiert und mittels TCA-Lösung gefällt (Kap. 3.6.3). Die Analyse der immunpräzipitierten Proteinkomplexe erfolgte durch SDS-PAGE (Kap. 3.6.4) und Western-Blot (Kap. 3.6.6)

3.7 Zellbiologische Techniken

3.7.1 Insulinrezeptor-Abbau

Um den Einfluss von Tpr2 auf den Abbau des INSR zu untersuchen, wurden Hek293-Zellen mittels JetPRIME-Reagenz mit *Tpr2*- oder Kontroll-siRNA transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1-fach PBS gewaschen und in neuem Kulturmedium aufgenommen. 16 Std. später wurden die Zellen über Nacht mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Nach weiteren 16 Std. wurden die Zellen mit 1-fach PBS gewaschen und aus der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in Lysepuffer lysiert. Die Lyse erfolgte für 30 Min. auf Eis. Um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren, wurden die Lysate für 30 Min. bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die proteinreichen Überstände wurde abgenommen und deren Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz bestimmt (Kap. 3.6.2). Anschließend wurden die einzelnen Proben mit 3-fach konzentriertem Probenpuffer und Lysepuffer auf eine Proteinkonzentration von 4 µg/µl eingestellt. Expressionsmengen von Tpr2 und dem INSR wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 3.6.4) und Western-Blot (Kap. 3.6.6) analysiert. Hierzu wurden spezifische primäre Antikörper verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Funktion von Tpr2 *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit sollte die biochemische Funktion von Tpr2 im Hinblick auf die Hsp70-Hsp90-Chaperonmaschinerie im Detail untersucht werden.

4.1.1 Tpr2 verhindert die Bindung von CHIP an Hsc70

Wie bereits in Kapitel 2.7 beschrieben, konnten Experimente mit dem GR zeigen, dass Tpr2 im Zusammenhang mit der Faltung von Proteinen steht und hierbei Substrate von Hsc/Hsp70 auf Hsp90 überträgt (Brychzy et al., 2003). Es stellte sich daher die Frage, ob Tpr2 auch an Abbauprozessen von Proteinen beteiligt sein könnte. Der Fokus lag dabei auf CHIP-vermittelten Abbauprozessen, da sowohl der GR als auch der INSR CHIP-vermittelt abgebaut werden (Kap. 2.4) (Connell et al., 2001; Tawo R., Dissertation 2016, Universität Bonn).

Aus diesem Grund wurde His-getaggtetes Tpr2 in Hek293-Zellen exprimiert (Kap. 3.3) und mit Hilfe eines primären anti-His-Antikörpers durch Protein-G-Sepharose immobilisiert. Mittels Immunpräzipitation konnte Tpr2 isoliert (Kap. 3.6.11) und mögliche Bindepartner identifiziert werden.

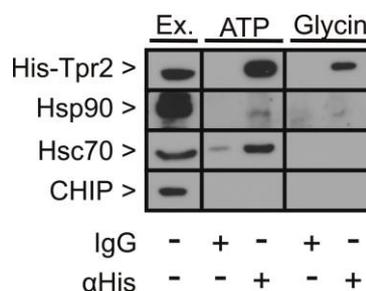


Abbildung 4.1: Tpr2 liegt im Komplex mit den molekularen Chaperonen Hsc70 und Hsp90 vor. Mit Hilfe einer Immunpräzipitation wurde überexprimiertes His-Tpr2 aus Hek293 Zellen isoliert. Anschließend wurden potentielle Bindungspartner von Tpr2 durch Immundetektion identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Tpr2 im Komplex mit Hsc70 und Hsp90 vorlag. Die Ubiquitinligase CHIP konnte in diesem Komplex nicht nachgewiesen werden. (Ex.: Extrakt)

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist interagiert Tpr2 mit den Chaperonen Hsc70 und Hsp90. Diese Interaktion war bereits bekannt und lässt sich auf die zwei TPR-Domänen von Tpr2 zurückführen (Abb. 2.7), welche Proteininteraktionen mit molekularen Chaperonen ermöglichen. Proteinmengen der Ubiquitinligase CHIP konnten nicht nachgewiesen werden.

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob Tpr2 eine Bindung von CHIP an Hsc70 möglicherweise verhindert. CHIP besitzt ebenfalls eine TPR-Domäne, über welche eine Interaktion mit dem C-Terminus von Hsc70 möglich ist (Kap. 2.4). Da Tpr2 ebenfalls über eine TPR-Domäne mit dem C-Terminus von Hsc70 interagiert (Kap. 2.6), lag die Vermutung nahe, dass die Bindung kompetitiv gegenüber der Bindung von CHIP an Hsc70 sein könnte. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden Hek293-Zellen mit *Tpr2*-siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert (Kap. 3.3). Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit einem spezifischen anti-Hsc70-Antikörper durchgeführt.

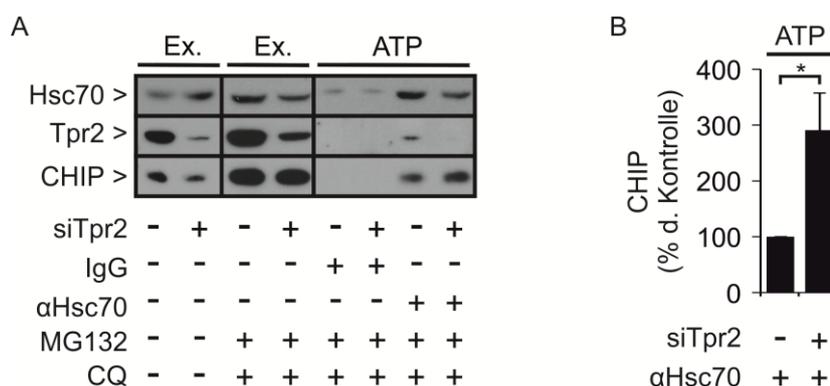


Abbildung 4.2: Tpr2-Depletion verstärkt die Assoziation von CHIP an Hsc70. (A) **Analyse der CHIP-Hsc70-Bindung unter Einfluss verschiedener Tpr2-Mengen.** Hek293-Zellen wurden mit *Tpr2*- und Kontroll-siRNA transfiziert und nach 48 Std. geerntet. Durch Immunpräzipitation wurden Hsc70-Komplexe isoliert und aufgereinigt. Die Depletion von Tpr2 führte zu einer Abnahme der CHIP-Proteinmenge. Um die CHIP-Menge im Extrakt zu stabilisieren, wurden die Zellen mit MG132 und Chloroquin (CQ) behandelt, wodurch der proteasomale und autophagische Abbauweg gehemmt wurden. Unter diesen Voraussetzungen führte die Depletion von Tpr2 zu einer verstärkten Bindung von CHIP an Hsc70. (B) **Quantifizierung der unter (A) ermittelten CHIP-Proteinmenge.** Die Depletion von Tpr2 in Hek293-Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der CHIP-Hsc70-Komplexe um nahezu das Dreifache. (Mittelwert +/- SEM, n=3, * P <0,05; Ex.: Extrakt)

Die Depletion von Tpr2 in Hek293-Zellen führte zu einer Abnahme der CHIP-Menge im Extrakt der Hek293-Zellen (Abb. 4.2 A). Durch Zugabe von MG132 (Inhibitor des Proteasoms) und Chloroquin (lysosomaler Inhibitor) wurden Proteinabbauwege gehemmt, so dass die CHIP-Proteinmenge in den Hek293-Extrakten stabilisiert werden konnte. Anschließend konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Tpr2 zu einer signifikant verstärkten CHIP-Hsc70-Bindung führte (Abb. 4.2 A). Die Anzahl der CHIP-Hsc70-Komplexe war annähernd dreimal so hoch, wenn Tpr2 zuvor depletiert wurde (Abb. 4.2 B). Dieses Ergebnis zeigt, dass Tpr2 und CHIP um die Hsc70-Bindestelle konkurrieren.

4.2 Tpr2 beeinflusst die Stabilität des Insulinrezeptors

Mit Hilfe des INSR als CHIP-Substrat sollte im Folgenden untersucht werden, ob Tpr2 neben seiner Funktion Proteinfaltung zu induzieren den CHIP-vermittelten Abbau von Substraten hemmen kann.

4.2.1 Tpr2 bindet den Insulinrezeptor *in vivo*

Zunächst wurde untersucht, ob Tpr2 mit Hsc70 und dem INSR in einem Komplex vorliegt und somit die Faltung und Aktivierung des Rezeptors, durch die Hsc/Hsp70-Hsp90-Maschinerie, beeinflussen könnte. Hierfür wurde His-getaggtetes Tpr2 in Hek293-Zellen überexprimiert und anschließend immunpräzipitiert.

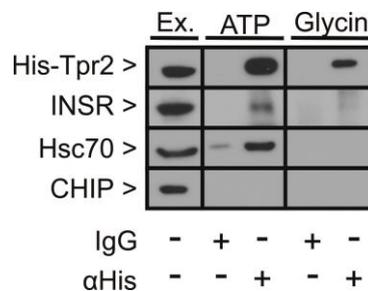


Abbildung 4.3: His-Tpr2 bindet den INSR *in vivo*. In Hek293-Zellen wurde His-getaggtetes Tpr2 überexprimiert. Die Zellen wurden nach 48 Std. für eine Immunpräzipitation geerntet und lysiert. Mittels eines spezifischen anti-His-Antikörpers wurde His-Tpr2 isoliert und potentielle Bindungspartner im Western-Blot analysiert. Hsc70 konnte ebenso wie der INSR in einem Komplex mit Tpr2 detektiert werden. Die Ubiquitinligase CHIP hingegen wurde in diesem Komplex nicht detektiert. (Ex.: Extrakt)

Es konnten gezeigt werden, dass Hsc70 und der INSR in einem Komplex mit Tpr2 vorlagen (Abb. 4.3). Die Interaktion zwischen Tpr2 und dem INSR hat dabei vermutlich indirekt im Komplex mit Hsc70 stattgefunden. Die Ubiquitinligase CHIP konnte in dem Tpr2-Komplex nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der bislang gezeigten Ergebnisse wurde im nächsten Schritt eine mögliche Regulation der Stabilität des INSR durch Tpr2 untersucht.

4.2.2 Tpr2-Depletion führt zum Abbau des Insulinrezeptors

Für die Analyse der INSR-Stabilität wurden Hek293-Zellen mit *Tpr2*-siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Tpr2 zu einer Abnahme der INSR-Menge führte (Abb. 4.4). Um zu testen, ob dies einem verstärkten Abbau entspricht, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt. Die Behandlung der Tpr2-depletierten Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 führte nicht dazu, dass der INSR auf Proteinebene stabilisiert wurde.

Der lysosomale Abbauweg wurde durch Zugabe von Bafilomycin A1 inhibiert. Bafilomycin A1 inhibiert die V-ATPase und verhindert so die Ansäuerung der Vesikel und die Autophagosom-Lysosom Fusion. Dadurch konnte eine signifikante Stabilisierung des INSR erreicht werden (Abb. 4.4). Ebenso führte die Behandlung der Zellen mit dem Dynamin Inhibitor V.34-2, welcher den Prozess der Endozytose inhibiert, zu einer Stabilisierung des INSR, welche jedoch basierend auf sechs Experimenten nicht signifikant war (Abb. 4.4).

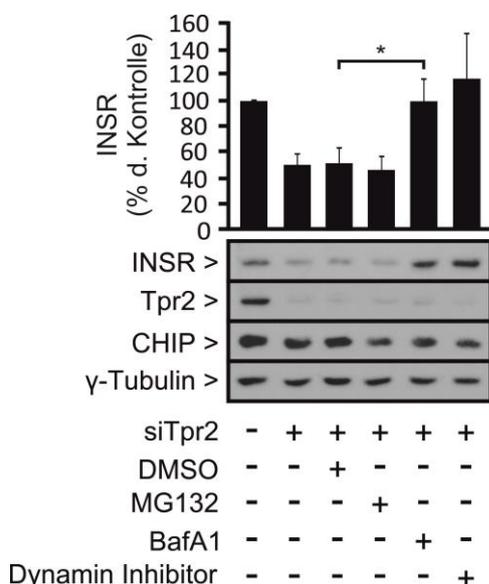


Abbildung 4.4: Tpr2-Depletion führt zum Abbau des INSR. Hek293-Zellen wurden mit *Tpr2*-siRNA und Kontroll-siRNA transfiziert. Die Depletion von Tpr2 führte zu einer Abnahme der INSR-Menge. Um einen möglichen Abbau des INSR zu untersuchen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt. Durch Inhibition des proteasomalen Abbauweges (Zugabe von MG132) konnte die INSR-Menge nicht erhöht werden. Eine Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A1 hingegen, wodurch der lysosomale Abbauweg inhibiert wird, führte zu einer signifikanten Stabilisierung des INSR. Eine Behandlung der Zellen mit dem Dynamin Inhibitor V.34-2, welcher den Prozess der Endozytose und damit ebenfalls den lysosomale Abbauweg inhibiert, führte erneut zu einer Stabilisierung des INSR. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch eine verminderte Expression von Tpr2 der CHIP-vermittelte lysosomale Abbau des INSR induziert werden konnte. (Mittelwert +/- SEM, n=6, *P<0,05)

Das in Abbildung 4.4 dargestellte Ergebnis zeigt, dass die Depletion von Tpr2 zu einem verstärkten CHIP-vermittelten lysosomalen Abbau des INSR führte.

4.2.3 Erhöhte Tpr2-Expression beeinflusst die Stabilität des Insulinrezeptors nicht

Aufgrund des Ergebnisses im vorangegangenen Kapitel (Abb. 4.2.2), sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, ob eine erhöhte Expression von Tpr2 möglicherweise einen gegenteiligen Effekt haben könnte und zu einer Stabilisierung des INSR führt. Hierfür wurden Hek293-

Ergebnisse

Zellen mit His-getagtem Tpr2 transfiziert und nach 48 Std. geerntet und analysiert. Mittels Western-Blot wurde die endogene Expression des INSR überprüft.



Abbildung 4.5: Eine verstärkte Tpr2-Expression hat keinen Einfluss auf die Stabilität des INSR. Hek293-Zellen wurden mit His-getagtem Tpr2 transfiziert und anschließend analysiert. Mittels Western-Blot konnte die Expression des INSR analysiert und quantifiziert werden. Eine erhöhte Expression von Tpr2 hatte keinerlei Einfluss auf die endogene Expression des Insulinrezeptors. Die Proteinmenge der Ubiquitinligase CHIP blieb ebenfalls unverändert. (Mittelwert +/- SEM, n=3, * $P < 0,05$)

In Abbildung 4.5 ist deutlich zu sehen, dass eine verstärkte Expression von Tpr2 keinen Effekt auf die endogene Expression des INSR hatte. Sowohl die Proteinmenge des INSR, als auch die der Ubiquitinligase CHIP blieben unverändert.

4.3 Biochemische Analyse des Co-Chaperons dTPR2

Das Co-Chaperon dTPR2 aus *Drosophila melanogaster* ist ortholog zum humanen Co-Chaperon Tpr2 und wird ebenfalls mit der Faltung von Proteinen in Verbindung gebracht (Kap. 2.6.1). Zur Untersuchung der biochemischen Funktion von dTPR2 im Hinblick auf die Hsc/Hsp70-Hsp90-Maschinerie wurden unterschiedliche *in-vitro*-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde der cDNA-Klon RE69804 (*Drosophila Genomics Research Center*), welcher das *full length* Protein kodiert, mit Hilfe des Vektors pETM11 in Bakterien exprimiert und dTPR2 mittels His-Tag aufgereinigt (Kap. 3.5 und Kap. 3.6).

4.3.1 dTPR2 bindet an den C-Terminus von Hsc70

Aufgrund der ähnlichen Domänenstruktur von dTPR2 und Tpr2 (Kap. 2.6) wurden Interaktionsanalysen mit dem humanen Chaperon Hsc70 und dTPR2 durchgeführt. Im Zuge einer Diplomarbeit konnte die Bindung von dTPR2 an humanes Hsc70 bereits nachgewiesen werden. Zunächst sollte untersucht werden an welche Domäne von Hsc70 das Co-Chaperon dTPR2 bindet.

Hierfür wurde aufgereinigtes His-getaggtetes dTPR2 mit unterschiedlichen Domänen des humanen Hsc70-Proteins inkubiert, welche als GST-Fusionsproteine exprimiert wurden. Die zwei C-terminalen Fragmente besaßen das EEVD-Motiv und das N-terminale Fragment die ATPase-Domäne (Demand et al., 1998). Entstandene His-dTPR2-Komplexe wurden mittels Ni-NTA-Matrix gebunden und präzipitiert. Mittels Western-Blot und spezifischer Antikörper wurden entstandene Bindungen nachgewiesen.

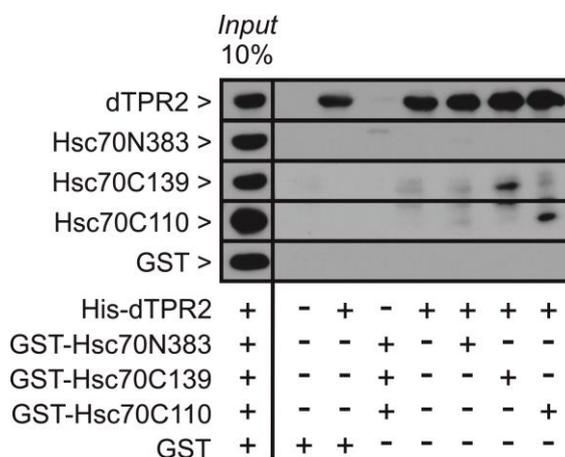


Abbildung 4.6: dTPR2 bindet an den C-Terminus von Hsc70. His-getaggtetes dTPR2 wurde mit unterschiedlichen Hsc70-Domänen inkubiert (Kap. 3.6.9). Dabei wurden die Proteine mit einer Konzentration von 0,5 μmol eingesetzt und als GST-Fusionsproteine exprimiert. Das N-terminale Fusionsprotein bestand dabei aus den Aminosäuren 1-383 des humanen Hsc70-Proteins (Hsc70N383) und umfasste die ATPase-Domäne des Chaperons. Die beiden C-terminalen Fusionsproteine umfassten die α -helikale Untereinheit, welche den Deckel über der Peptidbinde-Domäne bildet, und eine regulatorische EEVD-Sequenz. Hsc70C139 umfasste die Aminosäuren 508-646 und Hsc70C110 die Aminosäuren 537-646 des humanen Hsc70-Proteins. Die beiden Reste 508 und 537 sind an der Verbindungsstelle zwischen C-Terminus und Peptidbinde-Domäne lokalisiert (Demand et al., 1998). Das Bindeexperiment konnte zeigen, dass dTPR2 an die C-terminalen Fragmente von Hsc70 bindet. Eine Bindung an den N-Terminus von Hsc70 konnte nicht nachgewiesen werden.

In Abbildung 4.6 konnte gezeigt werden, dass die beiden C-terminalen Fragmente Hsc70C139 und Hsc70C110 mit dTPR2 interagieren. Eine Bindung von dTPR2 an das N-terminale Fragment Hsc70N383 konnte nicht nachgewiesen werden. Da dTPR2 beide C-terminalen Fragmente von Hsc70 binden konnte, findet die Bindung nicht zwischen den Aminosäuren 508 und 537 statt. Dies lässt vermuten, dass dTPR2 ebenso wie Hop, Hip und CHIP über eine TPR-Domäne an die C-terminale EEVD-Sequenz von Hsc70 bindet (Kap. 2.2).

4.3.2 dTPR2 verstärkt die Chaperon-Aktivität von Hsc70

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob und in wie weit dTPR2 ähnlich dem humanen Tpr2 als Co-Chaperon von Hsc/Hsp70 fungiert. Hierfür wurde ein Luziferase-Aggregations-Assay durchgeführt (Levy et al., 1995). Das Enzym Luziferase diente dabei als Substrat und wurde in unterschiedlichen Ansätzen mit dem humanen Chaperon Hsc70 und dTPR2 inkubiert. Die unterschiedlichen Proben wurden auf 42 °C erhitzt, so dass das Enzym *in vitro* denaturiert wurde. Es wurde analysiert, ob durch Zugabe von Hsc70 und/oder dTPR2 eine Bindung des Enzyms ermöglicht und die Bildung von Aggregaten verhindert werden konnte. Entstandene Aggregate wurden durch Zentrifugation von löslichen Bestandteilen getrennt und die, durch Hsc70 oder dTPR2, gebundenen Anteile der Luziferase im löslichen Überstand quantifiziert.

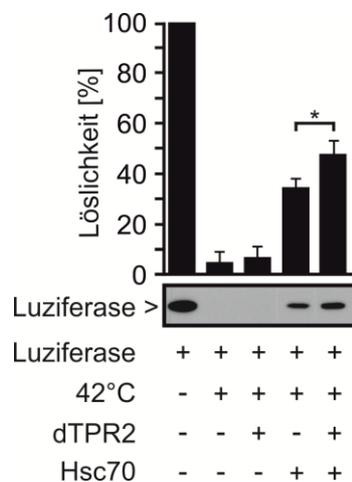


Abbildung 4.7: Verstärkte Chaperon-Aktivität von Hsc70 durch dTPR2. Mit Hilfe des Luziferase-Aggregations-Assays konnte gezeigt werden, dass dTPR2 das molekulare Chaperon Hsc70 während der Substratbindung unterstützt. Hitze-denaturierte Luziferase aggregierte überwiegend wenn keine molekularen Chaperone vorhanden waren, so dass der Löslichkeitsanteil nur 5 % betrug. Durch Zugabe von Hsc70 wurde die Luziferase gebunden und so der Löslichkeitsanteil auf 35 % erhöht. Diese Bindung wurde durch dTPR2 signifikant verstärkt, sodass der prozentuale Löslichkeitsanteil der Luziferase auf 48 % anstieg. (Mittelwert +/- SEM, n=3, $P < 0,05$)

Abbildung 4.7 zeigt, dass das Enzym Luziferase durch Hitzebehandlung denaturierte und aggregierte. Der Löslichkeitsanteil der Luziferase betrug ohne Zugabe von Hsc70 oder dTPR2 lediglich 5 %. Dieser geringe Löslichkeitsanteil konnte durch alleinige Zugabe von dTPR2 nicht signifikant erhöht werden. Durch Zugabe von Hsc70 wurde die Löslichkeit auf 35 % erhöht. Das Hinzufügen von Hsc70 und dTPR2 führte zu einem signifikanten Anstieg der Löslichkeit von Luziferase auf 48 %. dTPR2 fungiert daher als Co-Chaperon von Hsc70 und fördert dessen Chaperon-Aktivität. Weiterhin zeigt das Ergebnis, dass dTPR2 selbst keine Chaperon-Aktivität besitzt und Luziferase alleine nicht stabilisieren konnte.

4.4 Analyse von *Drosophila* TPR2 *in vivo*

Die *in-vivo*-Analyse des Co-Chaperons dTPR2 wurde mit Hilfe des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Zunächst wurde die Expression des Proteins dTPR2 im gesamten Organismus analysiert und anschließend in spezifischen Geweben betrachtet.

4.4.1 Endogene Expression von dTPR2

Für die Expressionsanalyse wurden Proteinextrakte der gesamten Fliege und einzelner Körperteile hergestellt (Kap. 3.6.1). Die grobe Einteilung erfolgte in die Körperteile Kopf, Thorax und Abdomen. Der Kopf besteht überwiegend aus dem Gehirn und den beiden Komplexaugen und daher hauptsächlich aus dem zentralen Nervensystem. Der Thorax umfasst hauptsächlich Muskelgewebe, da dort ein Großteil der indirekten Flugmuskulatur lokalisiert ist, welche für die Flügelstellung und das Fliegen zuständig ist (Chartier et al., 2006). Im Abdomen befinden sich Organe wie der Darm, der Fettkörper und die Malphigischen Gefäße. Das Fettkörpergewebe ist analog zur Leber und zum Fettgewebe von Wirbeltieren (Liu et al., 2009). Vor allem im Mitteldarm findet ein Großteil der Verdauung und die Nährstoffaufnahme statt (Buchon et al., 2013).

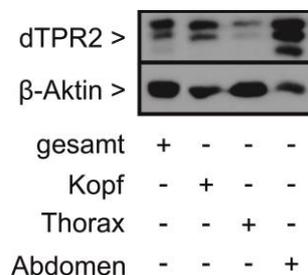


Abbildung 4.8: dTPR2 wird in allen Körperteilen von *Drosophila melanogaster* exprimiert. Um die ubiquitäre Expression von dTPR2 in *Drosophila melanogaster* zu analysieren, wurden Extrakte unterschiedlicher Körperteile hergestellt und mittels Western-Blot ausgewertet. Im Kopf und im Thorax konnten jeweils zwei Isoformen mit einem Molekulargewicht von 58 kDa und 54,9 kDa nachgewiesen werden. Im Abdomen konnte zusätzlich zu den größeren Isoformen eine kleine Isoform mit einem Molekulargewicht von 53,2 kDa detektiert werden. In diesem Gewebe war die Expression aller Isoformen besonders stark.

Die Analyse der verschiedenen Proteinextrakte ergab eine ubiquitäre Expression des Co-Chaperons dTPR2 in *Drosophila melanogaster*. dTPR2 weist fünf unterschiedliche Transkripte und Polypeptide in der Fliege auf, wovon die Polypeptide dTPR2-PA und -PD (*full length*, 58 kDa), sowie dTPR2-PB und -PE (53,2 kDa) identische Aminosäuresequenzen teilen (Kap. 2.6.1). Daher lassen sich auf Proteinebene mittels Western-Blot lediglich drei Isoformen anhand des Molekulargewichtes unterscheiden. Die fünfte Isoform dTPR2-PC hat ein Molekulargewicht von 54,9 kDa.

Abbildung 4.8 zeigt, dass in der gesamten Fliege und im Abdomen drei unterschiedliche Isoformen von dTPR2 exprimiert werden. Im Abdomen war die Expression aller Isoformen auffällig stark. Im Kopf und im Thorax wurden nur zwei Isoformen mit einem Molekulargewicht von 58 kDa und 54,9 kDa detektiert.

4.4.2 dTPR2 ist essentiell für die Entwicklung von *Drosophila*

Die physiologische Funktion von dTPR2 in *Drosophila melanogaster* wurde näher untersucht, indem dTPR2 mit Hilfe der RNAi-Linie KK107813 (VDRC) depletiert und mit Hilfe der UAS-Linie 30545 (Bloomington) überexprimiert wurde. Die beiden Fliegenlinien RNAi-*dTPR2*(KK) und UAS-*dTPR2* verändern das Expressionslevel des *full length* Proteins dTPR2. Eine ubiquitäre Depletion oder Expression wurde durch Kreuzung der RNAi- und UAS-Linien mit Fliegen der konstitutiven Treiberlinie *Aktin-Gal4* erzielt (Kap. 3.4.3). Zur biochemischen Analyse wurden Proteinextrakte von L2-Larven hergestellt und mittels Western-Blot analysiert (Kap. 3.6.1).

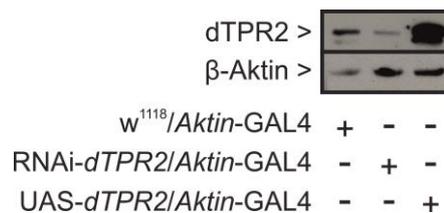


Abbildung 4.9: **Ubiquitäre Expressionsveränderungen von dTPR2.** Mittels *Aktin-Gal4*-Treiberlinie, RNAi-*dTPR2*- und UAS-*dTPR2*-Linie wurde die dTPR2-Menge ubiquitär verändert. Es wurden Proteinextrakte von Larven im zweiten Larvenstadium hergestellt und die dTPR2-Expression mittels Western-Blot und spezifischem Antikörper analysiert. Sowohl die Depletion (RNAi-*dTPR2*) als auch die Überexpression (UAS-*dTPR2*) von dTPR2 konnten eindeutig nachgewiesen werden.

Abbildung 4.9 bestätigt die Expressionsveränderungen auf Proteinebene. Die ubiquitäre dTPR2-Depletion und -Überexpression konnte in der Larve eindeutig nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu dTPR2-depletierten Larven, welche sich wildtypisch verhielten, zeigten die Larven, welche dTPR2 ubiquitär überexprimierten, eine larvale Letalität von 100 % zum Zeitpunkt des zweiten Larvenstadiums (Abb. 4.10). Die toten Larven wiesen jedoch eine Größe auf, die vergleichbar war mit der von Wildtyp-Larven im ersten Larvenstadium. Die dTPR2-Depletion führte zu einer Letalität von 93 % im Puppenstadium (Abb. 4.10). 6 % der dTPR2-depletierten Larven starb bereits im Larvenstadium und 1 % der analysierten Larven erreichte das adulte Stadium. Im Vergleich hierzu zeigte die Kontrolle (*w¹¹¹⁸/Aktin-Gal4*) eine larvale Letalität von 5 %, eine Letalität von 7 % im Puppenstadium und von 88 % im adulten Stadium (Abb. 4.10). Trotz der unterschiedlichen Zeitpunkte, zu denen die Letalität in Abhängigkeit von dTPR2 eintraf, zeigt dieses Ergebnis, dass ubiquitär veränderte Proteinmengen von dTPR2 generell die normale Entwicklung von *Drosophila melanogaster*

verhindern konnten und daher den Erhalt der Proteostase im gesamten Organismus negativ beeinflusst haben.

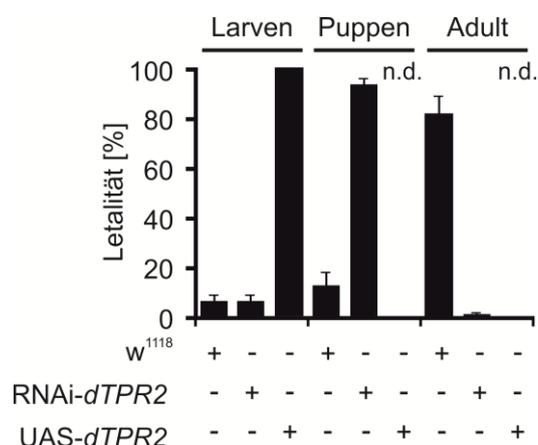


Abbildung 4.10: Ubiquitäre Expressionsveränderungen von dTPR2 führen zur Letalität. Mit Hilfe der *Aktin-Gal4* Treiberlinie wurde dTPR2 in *Drosophila melanogaster* ubiquitär depletiert und überexprimiert. Die ubiquitäre Depletion von dTPR2 (RNAi-dTPR2/*Aktin-Gal4*, n=243) führte zu einer Letalität von 93 % im Puppenstadium. 6 % der dTPR2-depletierten Larven starben im zweiten Larvenstadium. 1 % aller analysierten Larven erreichte das adulte Stadium. Die ubiquitäre Überexpression von dTPR2 (UAS-dTPR2/*Aktin-Gal4*, n=193) hingegen führte bereits am dritten Tag, zum Zeitpunkt des zweiten Larvenstadiums, zu einer Letalität von 100 %. Die Larven waren jedoch augenscheinlich nur so groß wie Wildtyp-Larven im ersten Larvenstadium. Von denen als Kontrolle betrachteten Wildtypfliegen (w¹¹¹⁸/*Aktin-Gal4*, n=328) erreichten 88 % das adulte Stadium. 5 % aller Wildtyp-Larven starben vor der Verpuppung und 7 % aller Larven erreichten das Puppenstadium und starben vor Erreichen des adulten Stadiums. (n.d.: nicht detektierbar)

4.4.3 Funktion von dTPR2 in der Muskulatur

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die funktionelle Analyse von dTPR2 auf einzelne Gewebe der Fliege ausgeweitet. Chartier et al. diskutierten bereits 2006 die muskuläre Überexpression von dTPR2 im Zusammenhang mit einer Suppressor-Analyse zur okulopharyngealen Muskeldystrophie (OPMD). OPMD wird durch Aggregation des Proteins PABPN1 (*nuclear poly(A)-binding protein1*) in der Muskulatur ausgelöst. Dadurch wird eine Flügelfehlstellung hervorgerufen, die mit dem Abbau der Muskulatur im Thorax einhergeht, welcher dort einen Defekt der indirekten Flugmuskulatur (IFM) hervorruft. Chartier et al. konnten zeigen, dass die alleinige Überexpression von dTPR2 in der Muskulatur bereits zu der beschriebenen phänotypischen Flügelfehlstellung führte, weshalb das Transgen gar nicht erst als Suppressor getestet wurde. Aus diesem Grund war eine muskuläre Analyse der dTPR2-Funktion im Zusammenhang mit dieser Arbeit von großem Interesse.

a) Induzierte Expression von dTPR2

Im folgenden Experiment wurde die Funktion von dTPR2 in der Muskulatur mit Hilfe der muskelspezifischen Treiberlinie *MHC-Gal4* (*myosin heavy chain*) näher untersucht (Kap. 3.4.3). Zunächst wurde dTPR2 muskulär überexprimiert und Proteinextrakte aus dem Thorax von Kontrollfliegen und Mutanten hergestellt, sodass die Expression des dTPR2-Proteins mittels Western-Blot überprüft werden konnte. Abbildung 4.11 (A) zeigt, dass die Proteinmenge von dTPR2 im Thorax der Fliegen, welche dTPR2 überexprimierten (*UAS-dTPR2/MHC-Gal4*), im Vergleich zu den Extrakten der Kontrollfliegen (*w¹¹¹⁸/MHC-Gal4*, *w¹¹¹⁸/UAS-dTPR2*) deutlich erhöht wurde. Darüber hinaus zeigten die Fliegen, die dTPR2 verstärkt exprimierten, die charakteristische Fehlstellung der Flügel, welche bei PABPN1-Mutanten mit einer Schwäche der Muskelfunktion einherging (Chartier et al., 2006).

Im nächsten Schritt sollte daher die Muskelfunktion der Fliegen, welche dTPR2 verstärkt exprimierten, untersucht werden. Hierfür wurde ein Mobilitäts-Assay durchgeführt (Kap. 3.4.4), bei dem an verschiedenen Zeitpunkten die Kletterfähigkeit der Fliegen getestet wurde. Darüber hinaus wurde die Lebensspanne der Fliegen, die dTPR2 überexprimierten, mit der von Kontrollfliegen verglichen und quantifiziert.

Abbildung 4.11 B zeigt die Auswertung des Mobilitäts-Assays mit dem Ergebnis einer signifikanten Abnahme der Kletterfähigkeit von Fliegen, die dTPR2 in der Muskulatur verstärkt exprimierten (*UAS-dTPR2/MHC-Gal4*). Es wird deutlich, dass bereits nach 5 Tagen nur noch 59 % der Fliegen, die dTPR2 muskulär überexprimierten, in der Lage waren zu klettern. Nach 15 Tagen lag die Kletterfähigkeit der Fliegen, die dTPR2 verstärkt exprimierten, nur noch bei 23 % und nach 30 Tagen nur noch bei 7 %. Die Kontrollfliegen (*w¹¹¹⁸/MHC-Gal4*) hingegen zeigten erst an Tag 30 eine geringe Mobilitätsabnahme auf 73 %.

Die Analyse der Lebensspanne nach Kaplan-Meier wird in Abbildung 4.11 C dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Fliegen, welche dTPR2 muskulär überexprimierten (*UAS-dTPR2/MHC-Gal4*), deutlich länger lebten, als die Kontrollfliegen (*w¹¹¹⁸/MHC-Gal4*). Nach 60 Tagen waren 50 % der Kontrollfliegen tot, jedoch erst nach knapp 80 Tagen 50 % der Fliegen, die dTPR2 überexprimierten. 100 % aller Kontrollfliegen waren an Tag 90 tot und erst an Tag 115 100 % alle Fliegen, die dTPR2 überexprimierten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine muskuläre Überexpression von dTPR2 in *Drosophila melanogaster* die Funktion der Muskulatur gravierend beeinflussen und inhibieren konnte. Des Weiteren führte die Überexpression von dTPR2 in der Muskulatur zu einer Verlängerung der Lebensspanne der Fliegen im Vergleich zu der von Kontrollfliegen.

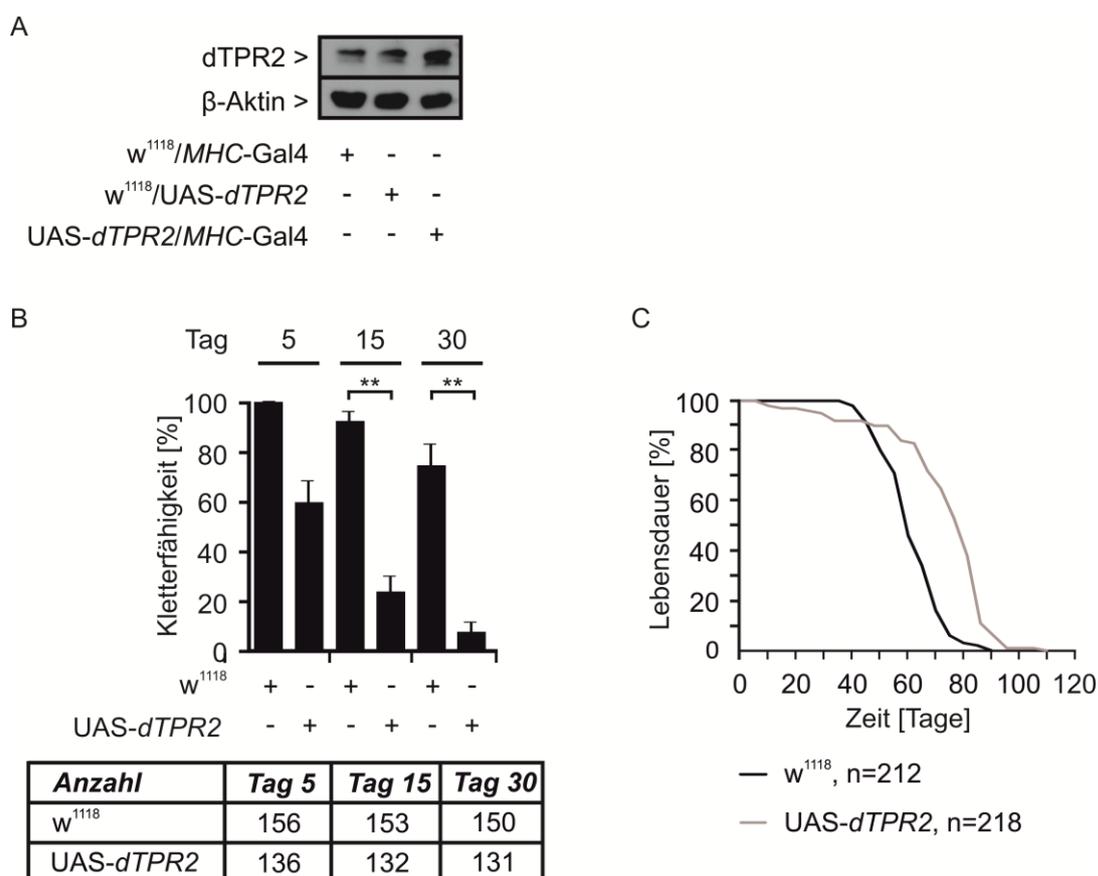


Abbildung 4.11: Muskuläre Überexpression von dTPR2 führt zur Muskelschwäche und verlängerter Lebensspanne (A) **Induzierte Expression von dTPR2 in der Muskulatur.** Die Expression von dTPR2 im Thorax wurde durch Herstellung von Proteinextrakten und Auswertung mittels Western-Blot überprüft. Im Vergleich zu den Kontrollfliegen ($w^{1118}/MHC-Gal4$, $w^{1118}/UAS-dTPR2$) konnte eine deutlich verstärkte Expression detektiert werden, wenn dTPR2 mit Hilfe der *MHC-Gal4*-Treiberlinie muskulär überexprimiert wurde ($UAS-dTPR2/MHC-Gal4$). (B) **Quantitative Auswertung der Muskelfunktion.** Mit Hilfe des Mobilitäts-Assays wurde die Muskelfunktion von Fliegen mit erhöhter dTPR2-Expression und Kontrollfliegen verglichen. Bereits nach 5 Tagen sank die Anzahl der Fliegen mit intakter Muskelfunktion auf 59 %, wenn dTPR2 verstärkt exprimiert wurde ($UAS-dTPR2/MHC-Gal4$). Nach 15 Tagen zeigte sich eine signifikante Abnahme der Kletterfähigkeit auf 23 %. An Tag 30 konnten nur noch 7 % der Fliegen, die dTPR2 muskulär überexprimierten, klettern. Die Kontrollfliegen ($w^{1118}/MHC-Gal4$) hingegen zeigten erst an Tag 30 eine geringe Abnahme der Kletterfähigkeit auf 73 %. (Mittelwert \pm SEM, $n=3$, $**P<0,005$) (C) **Graphische Darstellung der Lebensspanne nach Kaplan-Meier.** Die Lebensdauer der Fliegen, die dTPR2 muskulär überexprimierten ($UAS-dTPR2/MHC-Gal4$), wurde prozentual mit der von Kontrollfliegen ($w^{1118}/MHC-Gal4$) verglichen. Nach ca. 60 Tagen waren bereits 50 % aller Kontrollfliegen tot. 100 % aller Kontrollfliegen waren an Tag 90 tot. Die Fliegen, die dTPR2 verstärkt exprimierten, lebten deutlich länger. Erst an Tag 80 waren 50 % aller Fliegen, die dTPR2 überexprimierten tot und erst an Tag 115 100 % aller Fliegen, die dTPR2 überexprimierten.

b) Muskuläre Depletion von dTPR2

Aufgrund des pathogenen Phänotyps, den Fliegen zeigten, wenn dTPR2 in der Muskultur überexprimiert wurde, stellte sich die Frage, welchen Einfluss die muskuläre Depletion von dTPR2 auf das Verhalten von *Drosophila* hat. Hierfür wurden Fliegen der Linie RNAi-*dTPR2* mit Fliegen der Treiberlinie *MHC-Gal4* gekreuzt.

Die Expressionsveränderung wurde durch Herstellung von Thoraxextrakten und Analyse mittels Western-Blot kontrolliert. Abbildung 4.12 A zeigt eine deutliche Abnahme der dTPR2-Menge in Extrakten der dTPR2-depletierten Fliegen (RNAi-*dTPR2*/*MHC-Gal4*) verglichen mit Extrakten der Kontrollfliegen (*w¹¹¹⁸*/*MHC-Gal4*, *w¹¹¹⁸*/RNAi-*dTPR2*).

Die Muskelfunktion der dTPR2-depletierten Fliegen wurde auch in diesem Fall mit Hilfe des Mobilitäts-Assays untersucht. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dTPR2-depletierten Fliegen und Kontrollfliegen (Abb. 4.12 B). Nach 5 Tagen konnten 99% der Kontrollfliegen und 97% der dTPR2-depletierten Fliegen klettern und fliegen. Nach 15 Tagen konnten 91% der Kontrollfliegen und 89% der dTPR2-depletierten Fliegen weiterhin klettern bzw. fliegen. Nach 30 Tagen konnten immer noch 73% der Kontrollfliegen und 69% der dTPR2-depletierten Fliegen klettern und fliegen. Die dTPR2-depletierten Fliegen zeigten daher keinerlei Phänotyp und verhielten sich wildtypisch.

In Abbildung 4.12 C wird deutlich gezeigt, dass die muskuläre Depletion von dTPR2 zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne führte (Kap. 3.4.5). Im Vergleich zu den Kontrollfliegen, von denen an Tag 60 50 % tot waren, waren erst an Tag 73 50 % der dTPR2-depletierten Fliegen tot. An Tag 90 waren 100 % aller Kontrollfliegen und an Tag 95 100 % aller dTPR2-depletierten Fliegen gestorben.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass im Gegensatz zur Überexpression von dTPR2 eine muskuläre Depletion von dTPR2 keinerlei Einfluss auf die Funktion der Muskulatur hatte. Die Lebensspanne von *Drosophila melanogaster* hingegen konnte sowohl durch Überexpression von dTPR2 als auch durch Depletion von dTPR2 verlängert werden.

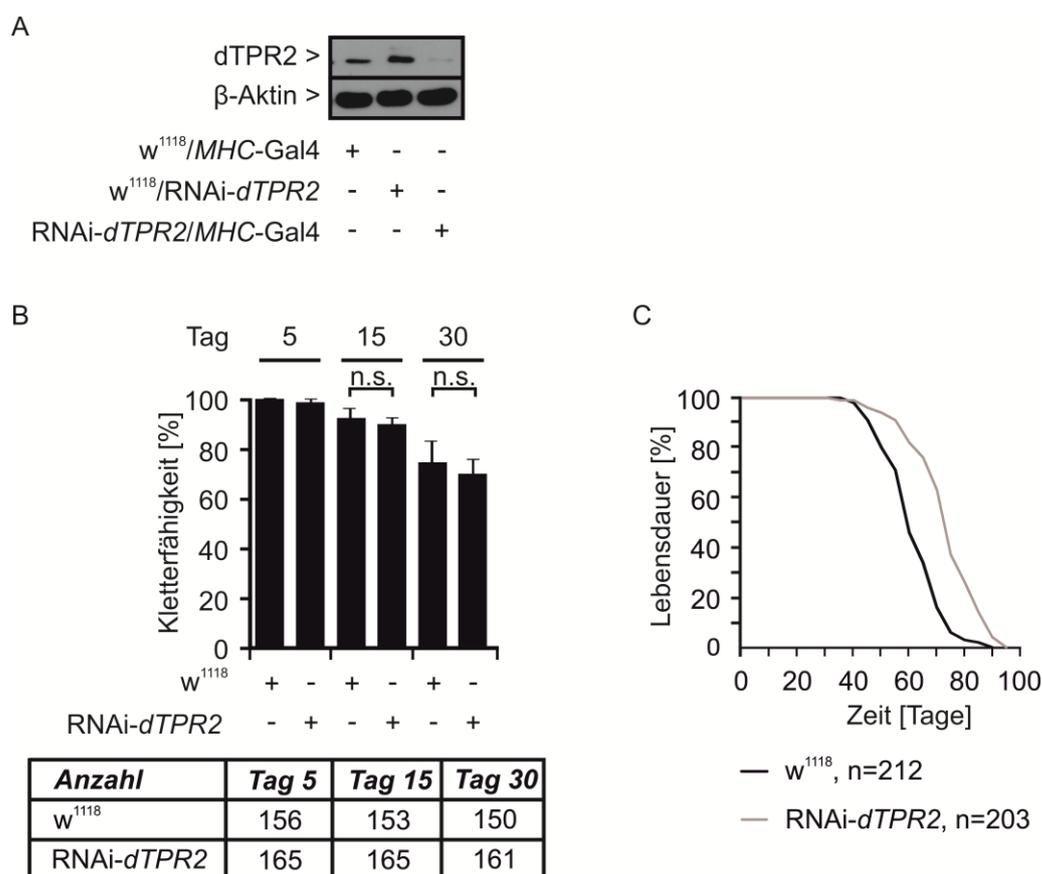


Abbildung 4.12: Muskuläre Depletion von dTPR2 verlängert die Lebensspanne von *Drosophila melanogaster*. (A) **Proteinexpression von dTPR2 in der Muskulatur.** Die Expression von dTPR2 im Muskelgewebe des Thorax wurde durch Herstellung von Proteinextrakten und Analyse mittels Western-Blot überprüft. Im Vergleich zu den Kontrollfliegen ($w^{1118}/MHC-Gal4$, $w^{1118}/RNAi-dTPR2$) war die Proteinmenge von dTPR2 deutlich verringert und kaum noch detektierbar, wenn die Expression zuvor mit Hilfe der Treiberlinie *MHC-Gal4* depletiert wurde. (B) **Quantitative Auswertung der Muskelfunktion.** Mit Hilfe des Mobilitäts-Assays wurde die Muskelfunktion der Fliegen mit dTPR2-Depletion überprüft. Die Fliegen zeigten keinerlei Phänotyp und verhielten sich wildtypisch. An Tag 5 konnten 99% der Kontrollfliegen ($w^{1118}/MHC-Gal4$) und 97% der dTPR2-depletierten Fliegen (RNAi-dTPR2/MHC-Gal4) klettern. Nach 15 Tagen konnten 91% der Kontrollfliegen und 89% der dTPR2-depletierten Fliegen klettern. An Tag 30 konnten 73% der Kontrollfliegen und 69% der dTPR2-depletierten Fliegen klettern. Eine muskuläre Beeinträchtigung durch dTPR2-Depletion konnte daher nicht festgestellt werden. (C) **Graphische Darstellung der Lebensspanne nach Kaplan-Meier.** Die Analyse der Lebensspanne zeigte eine signifikant verlängerte Lebensspanne bei Fliegen, denen dTPR2 muskulär depletiert wurde. 50% aller Kontrollfliegen ($w^{1118}/MHC-Gal4$) waren an Tag 60 tot. Von den dTPR2-depletierten Fliegen (RNAi-dTPR2/MHC-Gal4) hingegen waren erst an Tag 73 50% tot. Nach 90 Tagen waren alle Kontrollfliegen tot, nach 95 Tagen alle dTPR2-depletierten Fliegen. (n.s.: nicht signifikant)

4.4.4 Gewebespezifische Depletion von dTPR2 in Stoffwechselorganen

Aufgrund der starken Expression von dTPR2 im Abdomen von Wildtypfliegen (Abb. 4.8) wurde eine Funktion von dTPR2 im Mitteldarm und Fettkörper untersucht. In diesen Geweben finden wichtige Prozesse, wie z.B. die Regulation des Insulinsignalweges, statt. Ein Einfluss auf die Stabilität des INSR wurde in Kapitel 4.2.2 für das humane Tpr2 beschrieben. Der Mitteldarm ist ein Teil des Darms, der für die Verdauung und Nährstoffaufnahme zuständig ist (Buchon et al., 2013). Der Fettkörper von Insekten ist bei vielen metabolischen Funktionen, wie Energiespeicherung und -nutzung, involviert. Darüber hinaus koordiniert der Fettkörper das Wachstum der Insekten durch Metamorphose und Fortpflanzung (Arrese und Soulages, 2010). dTPR2 wird während der larvalen und adulten Entwicklung sowohl im Fettkörper, als auch im Mitteldarm stark exprimiert.

a) dTPR2-Depletion im Fettkörper und im Mitteldarm

Mit Hilfe der Treiberlinie *PSwitch106* wurde dTPR2 sowohl im Fettkörper, als auch im Mitteldarm, depletiert (Kap. 3.4.3). In der ersten Tochtergeneration wurde die Funktion der RNAi-*dTPR2*-Linie durch Zugabe des Liganden RU486 induziert.

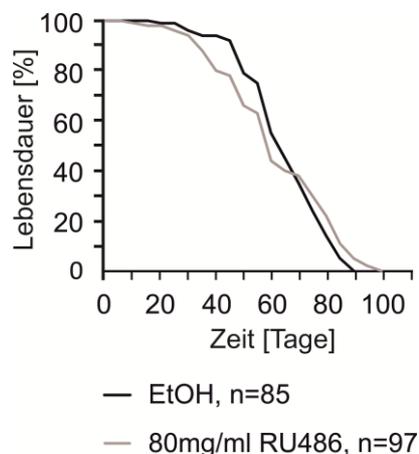


Abbildung 4.13: dTPR2-Depletion in Fettkörper und Mitteldarm zeigt keinen Einfluss auf die Lebensspanne. dTPR2 wurde mit Hilfe der *PSwitch106*-Treiberlinie in Fettkörper und Mitteldarm depletiert. Durch Zugabe des Liganden RU486 wurde die Depletion von dTPR2 aktiviert. Nach 63 Tagen waren 50 % der Kontrollfliegen (RNAi-*dTPR2/PSwitch106*, - RU486) tot. Nach 58 Tagen waren 50 % der dTPR2-depletierten Fliegen (RNAi-*dTPR2/PSwitch106*, + RU486) tot. Nach 90 Tagen waren alle Kontrollfliegen tot. Nach 100 Tagen waren alle dTPR2-depletierten Fliegen tot. Die Depletion von dTPR2 hatte daher keine Auswirkung auf die Lebensspanne von *Drosophila*.

Die dTPR2-depletierten Fliegen (RNAi-*dTPR2/PSwitch106*, + RU486) zeigten keinerlei Phänotyp im Vergleich zu den Kontrollfliegen (RNAi-*dTPR2/PSwitch106*, - RU486). Die Analyse der Lebensspanne von dTPR2-depletierten Fliegen und Kontrollfliegen erfolgte nach Kaplan-Meier.

In Abbildung 4.13 konnte gezeigt werden, dass die Depletion von dTPR2 in Fettkörper und Mitteldarm keinen Effekt auf die Lebensspanne der Fliegen hatte (Kap. 3.4.5). Dabei betrug die mittlere Lebensspanne 63 Tage bei den Kontrollfliegen und 58 Tage bei den dTPR2-depletierten Fliegen. Die letzten Fliegen der Kontrollgruppe starben an Tag 90, die der dTPR2-depletierten Fliegen an Tag 100.

b) dTPR2-Depletion im Fettkörper

Durch Verwendung der Treiberlinie *ppl-Gal4* (*pumpless*) wurde dTPR2 gezielt im Fettkörpergewebe depletiert (Kap. 3.4.3). Es stellte sich die Frage, ob dies einen anderen Effekt auf den Organismus haben könnte als die Depletion mit Hilfe der *PSwitch106*-Treiberlinie. Hierbei findet die Expressionsveränderung bereits im Embryonalstadium statt, so dass auch ein Effekt auf die larvale Entwicklung untersucht werden konnte.

Die dTPR2-depletierten Fliegen (*RNAi-dTPR2/ppl-Gal4*) zeigten keinen Phänotyp und entwickelten sich wildtypisch. Auch hier wurde eine Analyse der Lebensspanne nach Kaplan-Meier durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Lebensspanne von dTPR2-depletierten Fliegen zeigte keine Veränderung im Vergleich zu den Kontrollfliegen (*w¹¹¹⁸/ppl-Gal4*) (Abb. 4.14). Die mittlere Lebensspanne der dTPR2-depletierten Fliegen lag bei 60 Tagen, ebenso die der Kontrollfliegen (Kap. 3.4.5). An Tag 90 waren 100 % aller Kontrollfliegen tot und an Tag 105 alle dTPR2-depletierten Fliegen.

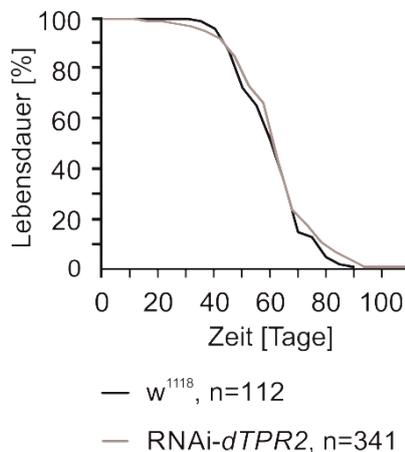


Abbildung 4.14: Die dTPR2-Depletion im Fettkörper hatte keinen Effekt auf die Lebensspanne. Mit Hilfe der *ppl-Gal4*-Treiberlinie wurde dTPR2 im Fettkörpergewebe depletiert. Die dTPR2-depletierten Fliegen (*RNAi-dTPR2/ppl-Gal4*) zeigten keinen Phänotyp und entwickelten sich wildtypisch. Die Analyse der Lebensspanne nach Kaplan-Meier zeigte, dass eine dTPR2-Depletion im Fettkörper keinerlei Auswirkung auf die Lebensspanne hatte. Dabei betrug die mittlere Lebensspanne 60 Tage bei den dTPR2-depletierten Fliegen und bei den Kontrollfliegen (*w¹¹¹⁸/ppl-Gal4*). An Tag 90 waren 100 % der Kontrollfliegen tot, an Tag 105 100% der dTPR2-depletierten Fliegen.

c) dTPR2-Depletion im Mitteldarm

Eine gezielte Depletion von dTPR2 im Mitteldarm erfolgte mit Hilfe der Treiberlinie *TIGS-2* (Kap. 3.4.3). Auch hier stellte sich die Frage, ob dadurch ein stärkerer Effekt auf den Organismus ausgeübt werden könnte. Die Funktion der RNAi-*dTPR2*-Linie wurde im adulten Stadium der ersten Tochtergeneration, durch Zugabe des Liganden RU486, induziert.

dTPR2-depletierte Fliegen (RNAi-*dTPR2/TIGS-2*) zeigten keinerlei Phänotyp und verhielten sich wildtypisch. Die Analyse der Lebensspanne nach Kaplan-Meier wird in Abbildung 4.15 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Lebensspanne der Fliegen, durch dTPR2-Depletion im Mitteldarm, nicht beeinflusst wurde. Die mittlere Lebensspanne der dTPR2-depletierten Fliegen (RNAi-*dTPR2/TIGS-2*, + RU486) betrug 70 Tage (Kap. 3.4.5). Die mittlere Lebensspanne der Kontrollfliegen (RNAi-*dTPR2/TIGS-2*, - RU486) lag bei 65 Tagen. An Tag 95 waren 100 % der dTPR2-depletierten Fliegen tot und an Tag 100 100 % der Kontrollfliegen.

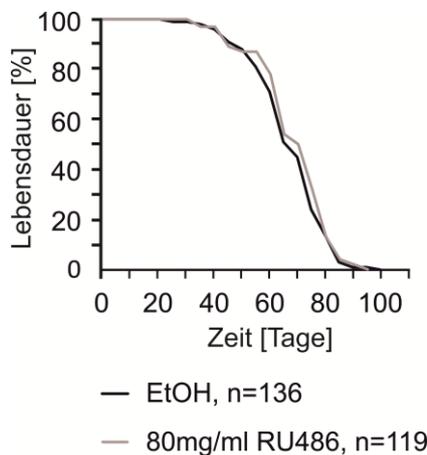


Abbildung 4.15: Die Depletion von dTPR2 im Mitteldarm hat keinen Effekt auf die Lebensspanne. Mit Hilfe der *TIGS-2*-Treiberlinie wurde dTPR2 im Mitteldarm depletiert. Die Funktion der RNAi-*dTPR2*-Linie wurde im adulten Stadium der ersten Tochtergeneration, durch Zugabe des Liganden RU486, induziert. Die Analyse der Lebensspanne nach Kaplan-Meier zeigte keinen Effekt der dTPR2-Depletion. An Tag 70 waren 50 % der dTPR2-depletierten Fliegen (RNAi-*dTPR2/TIGS-2*, + RU486) tot und an Tag 65 50 % der Kontrollfliegen (RNAi-*dTPR2/TIGS-2*, - RU486). 100 % der dTPR2-depletierten Fliegen waren an Tag 95 tot, 100 % der Kontrollfliegen an Tag 100.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktion metabolisch wichtiger Gewebe, wie Fettkörper und Mitteldarm, durch eine dTPR2-Depletion nicht beeinflusst wurden. Die Entwicklung der Fliegen konnte normal stattfinden und auch die Lebensspanne von *Drosophila melanogaster* wurde nicht beeinflusst.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Funktion des Co-Chaperons Tpr2/dTPR2 näher beschrieben werden. Entscheidend hierfür waren *in-vitro*-Experimente, die zeigen konnten, dass humanes Tpr2 Bestandteil des Hsc70/Hsp90-Chaperonkomplexes ist und in Hek293-Zellen mit CHIP um die C-terminale Bindestelle von Hsc/Hsp70 konkurriert. Die funktionelle Konsequenz dieser erstmalig gezeigten antagonistischen Bindung von Tpr2 und CHIP konnte anhand des INSR in der Zelle gezeigt werden. Des Weiteren konnten *in-vivo*-Experimente mit *Drosophila melanogaster* zeigen, dass verringerte, muskuläre dTPR2-Level während der Alterung zur Lebensverlängerung führen und dTPR2 für den Erhalt der Protein-Homöostase im Organismus entscheidend ist.

5.1 Tpr2 verhindert eine Bindung von CHIP an Hsc/Hsp70 und reguliert damit verbundene Abbauprozesse

Anhand von *in-vitro*-Experimenten in Kaninchen Retikulozyten Lysat legten Brychzy et al. 2003 die Vermutung nahe, dass Tpr2 den retrograden Transfer von Substraten von Hsp90 auf Hsc/Hsp70 vermittelt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Tpr2 über eine TPR-Domäne die Hsp90-Substrat-Interaktion stört und über die J-Domäne die Bindung des Substrats durch Hsc/Hsp70 induziert. So ermöglicht Tpr2 die erneute Faltung eines Substrats durch die Chaperon-Maschinerie.

Mittels Immunpräzipitation konnte zu Beginn dieser Arbeit gezeigt werden, dass Tpr2 einen Komplex mit den molekularen Chaperonen Hsc/Hsp70 und Hsp90 bildet (Abb. 4.1). Tpr2 besitzt zwei TPR-Domänen, wodurch eine simultane Bindung der Chaperone möglich ist (Abb. 2.7).

Das Co-Chaperon Hop besitzt ebenfalls zwei TPR-Domänen und ist in der Lage Hsc70 und Hsp90 gleichzeitig zu binden. Dabei führt die Bindung von Hop an die C-Termini der molekularen Chaperone zur räumlichen Kopplung dieser. Hop fungiert als Nukleotidaustauschfaktor, so dass Substrate wie z.B. Rezeptoren während ihrer Faltung von Hsc70 auf Hsp90 übertragen und aktiviert werden können (Frydman und Höhfeld, 1997).

Zusätzlich zu den TPR-Domänen besitzt Tpr2 eine C-terminale J-Domäne, welche signifikant homolog zur J-Domäne von Hsp40 ist (Brychzy et al., 2003). Proteine der Hsp40-Familie können aufgrund des funktionellen HPD-Motivs der J-Domänen die ATPase-Funktion von Hsp70 stimulieren, wodurch Hsp70-Substrat-Komplexe stabilisiert werden (Fan et al., 2003). Experimente mit dem GR und PR zeigten, dass Tpr2 die Bindung der Rezeptoren an Hsp90 inhibiert und die Übertragung dieser auf Hsp70 fördert (Brychzy et al., 2003; Moffatt et al., 2008). Diese Funktion unterscheidet Tpr2 maßgeblich von Hop und führt dazu, dass Tpr2 eine regulierende Funktion in der Hsc/Hsp70-Hsp90-Chaperonmaschinerie einnimmt, durch die Substrate rückwärts geleitet werden.

In-vitro-Bindeexperimente mit dem *Drosophila* Ortholog dTPR2 konnten zeigen, dass die Funktion von Tpr2 konserviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass dTPR2 an den C-Terminus des humanen Hsc70 bindet (Abb. 4.6). Die Aminosäuresequenzen der J-Domänen von dTPR2 und Tpr2 sind zu 74 % identisch und zu 93 % ähnlich (Kazemi-Esfarjani und Benzer, 2000). Daher stellte sich die Frage, ob dTPR2 die Chaperon-Funktion von Hsc70 regulieren und verstärken kann. Anhand des *in vitro* Luziferase-Aggregations-Assays konnte gezeigt werden, dass dTPR2 die Chaperon-Aktivität von Hsc70 verstärkt (Abb. 4.7). Durch Zugabe von dTPR2 wurde die Bindung von Hsc70 an denaturierte Luziferase signifikant verstärkt. dTPR2 konnte die Luziferase jedoch nicht eigenständig binden und eine Aggregation dieser verhindern. Dieses Ergebnis zeigt, dass dTPR2 selbst keine intrinsische Chaperon-Aktivität aufweist und Substrate nicht spezifisch auf Hsc70 überträgt. Dies konnte z.B. für das Co-Chaperon Hsp40 gezeigt werden. Hsp40 bindet selbst fehlgefaltete Proteine und ermöglicht durch Stimulation der ATPase-Funktion von Hsc70 eine effiziente Übertragung des Substrats auf Hsc70 (Langer et al., 1992). Dadurch gewährleistet Hsp40 einen schnellen Wechsel zwischen Hsc70-Substrat-gebundenem und Hsc70-freiem Zustand, welcher für den Großteil der Hsc70-Funktion im Zytosol ausreichend ist. Die Interaktion von Hsc70 mit den Co-Chaperonen Hip und Hop hingegen ermöglicht eine präzise Regulation der Stabilität von Hsc70-Substrat-Komplexen. Hip bindet an die ATPase-Domäne von Hsc70 und stabilisiert den ADP-gebundenen Zustand, wohingegen Hop als Nukleotidaustauschfaktor fungiert, Hsp90 zum Hsc70-Substrat-Komplex rekrutiert und die Übertragung des Substrats auf Hsp90 induziert. Insbesondere während der Aktivierung von Signaltransduktionsmolekülen spielt diese Übertragung eine wichtige Rolle (Frydman und Höfeld, 1997). Der Luziferase-Aggregations-Assay konnte deutlich machen, dass dTPR2 keine substratspezifische Funktion aufweist, sondern eine allgemeine, konservierte Funktion als Retro-Faktor in der Hsc/Hsp70-Hsp90-Chaperonmaschinerie erfüllt.

Aufgrund der bereits beschriebenen Funktion stellte sich die Frage, ob Tpr2 eine Funktion beim Chaperon-vermittelten Abbau von Substraten haben könnte. Hierfür wurde die Ubiquitinligase CHIP als wichtige Komponente der Abbauwege betrachtet, da bereits bekannt war, dass der GR ein Substrat des CHIP-vermittelten Abbaus ist und die Aktivierung des GR durch Tpr2 reguliert werden konnte (Brychzy et al., 2003; Connell et al., 2001). CHIP bindet über eine TPR-Domäne an den C-Terminus von Hsc/Hsp70 und markiert gebundene Substrate für den Proteinabbau (Kap. 2.4). Immunpräzipitationsexperimente konnten zeigen, dass CHIP und Tpr2 nicht gleichzeitig im Komplex mit Hsc70 vorlagen (Abb. 4.1). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Tpr2 und CHIP um die C-terminale Bindestelle von Hsc70 konkurrieren. Die Depletion von Tpr2 in Hek293-Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der CHIP-Hsc70-Komplexe (Abb. 4.2). Mit Blick auf den CHIP-vermittelten Abbau von Proteinen, wurde die Stabilität des INSR betrachtet, welcher durch CHIP monoubiquitiniert und anschließend im Lysosom abgebaut wird (Tawo R., Dissertation 2016, Universität Bonn). Mittels Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass der INSR in einem Komplex mit Hsc70 und Tpr2 vorliegen kann (Abb. 4.3). Ein weiteres *in-vivo*-Experiment konnte zeigen, dass durch Depletion von Tpr2 in Hek293-Zellen der Abbau des INSR induziert wurde (Abb. 4.4). Darüber hinaus konnte eine Behandlung der Hek293-Zellen mit unterschiedlichen Abbauinhibitoren zeigen, dass der INSR über den lysosomalen Weg abgebaut wurde, welcher CHIP-vermittelt stattfindet (Abb. 4.4). Dies deckt

sich mit Ergebnissen vorausgegangener Arbeiten (Green and Olefsky, 1982, Tawo R., Dissertation 2016, Universität Bonn).

Ergänzend hierzu wurde untersucht, ob der Abbau des INSR durch erhöhte Tpr2-Mengen inhibiert werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dies nicht der Fall war und der INSR nicht stabilisiert wurde (Abb. 4.5). Aufgrund der antagonistischen Bindung von Tpr2 und CHIP an den C-Terminus von Hsc70 wurde erwartet, dass erhöhte Tpr2-Mengen den CHIP-vermittelte Abbau von Hsc70-Substraten inhibieren würden. In einer anderen Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass CHIP direkt an den INSR binden und diesen ubiquitinieren kann, ohne dass eine Komplexbildung mit Hsc70 notwendig ist, auch wenn diese die Ubiquitinierung signifikant verstärken konnte (Tawo R., Dissertation 2016, Universität Bonn). Ein weiteres Substrat, welches unabhängig von einer CHIP-Hsc70-Interaktion CHIP-vermittelt abgebaut wird, ist der GR. Hierbei interagiert CHIP mit dem molekulare Chaperon Hsp90, wodurch der GR ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird (Connell et al., 2001).

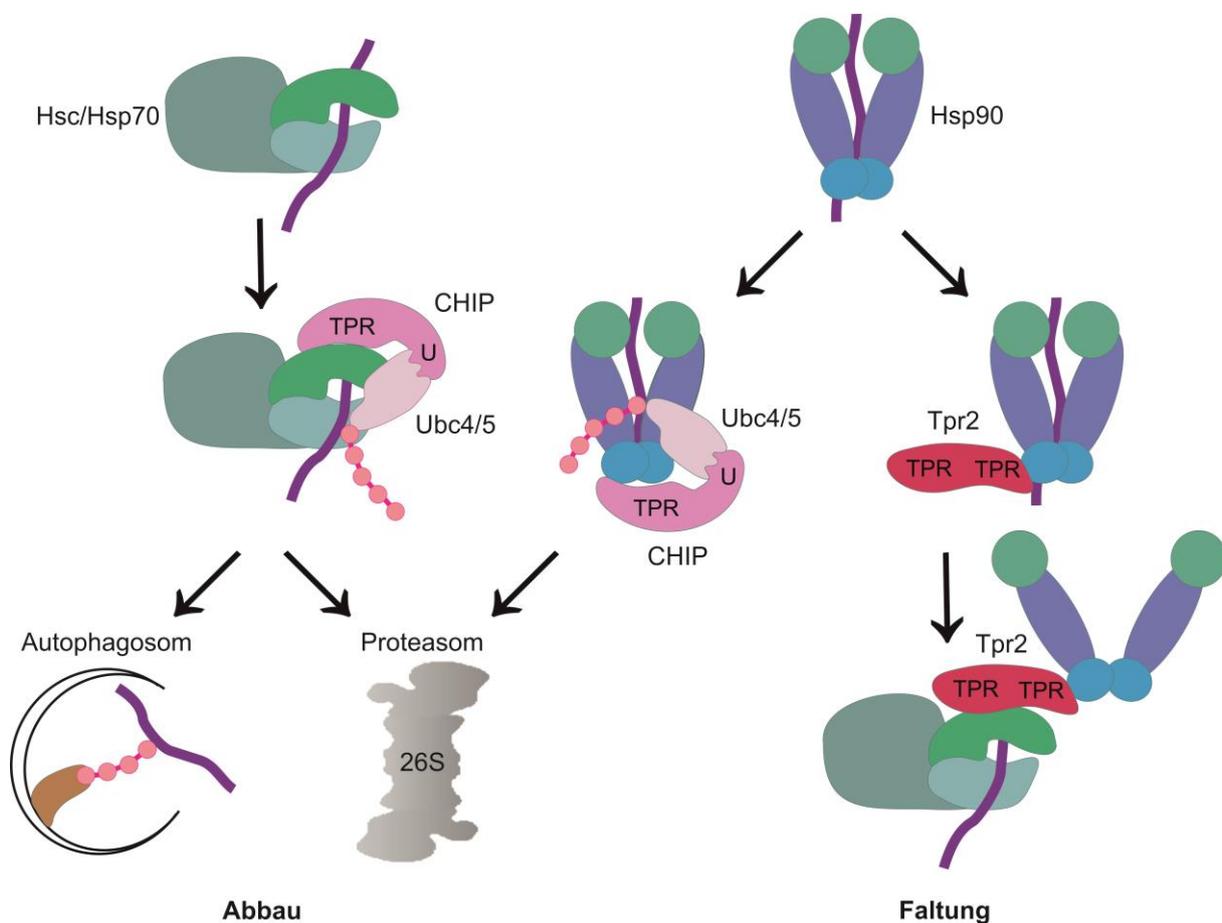


Abbildung 5.1: CHIP und Tpr2 induzieren antagonistische Funktionen von Hsc/Hsp70. CHIP kann an den C-Terminus von Hsc/Hsp70 binden und durch Interaktion mit Ubc4/5 den Abbau von Substraten induzieren. Diese Substrate können über das Autophagosom oder das Proteasom abgebaut werden (Kap. 2.4). Des Weiteren kann CHIP Hsp90-gebundene Substrate ubiquitinieren und den proteasomalen Abbau dieser induzieren (Connell et al., 2001). Im Gegensatz hierzu vermittelt Tpr2 die Faltung von Proteinen. Tpr2 bindet Hsc/Hsp70 und Hsp90 gleichzeitig und stabilisiert eine Substratbindung durch Hsc/Hsp70. So können Substrate von Hsp90 auf Hsc/Hsp70 übertragen und erneut gefaltet werden.

Zusammenfassend konnten die vorangegangenen Experimente erstmalig zeigen, dass CHIP und Tpr2 um die C-terminale Bindestelle von Hsc/Hsp70 konkurrieren und in ihrer Funktion als Co-Chaperone antagonistisch wirken. Die Depletion von Tpr2 *in vivo* führte zum verstärkten Abbau eines CHIP-Substrats. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tpr2/dTPR2 als Co-Chaperon die Chaperon-Aktivität von Hsc70 verstärkt, wodurch die Bildung von Aggregaten verhindert werden konnte. In Abbildung 5.1 werden die antagonistischen Funktionen von CHIP und Tpr2 nochmals schematisch dargestellt. Die Bindung der Ubiquitinligase CHIP an Hsc/Hsp70 führt zu proteasomalen und autophagischen Abbauprozessen wie CAP und CASA (Kap. 2.5). Darüber hinaus kann CHIP Hsp90-Substrate binden, ubiquitinieren und den proteasomalen Abbau dieser Substrate induzieren. Tpr2 hingegen reguliert als konservierter Retro-Faktor die allgemeine Übertragung von Substraten von Hsp90 auf Hsc/Hsp70 (Abb. 5.1). Durch Stabilisierung des Hsc/Hsp70-Substrat-Komplexes induziert Tpr2 eine erneute Faltung des Substrats, wodurch die Effizienz der Hsc/Hsp70-Hsp90-Chaperonmaschinerie erhöht wird (Brychzy et al., 2003). Weiterführende Experimente könnten Aufschluss darüber geben, ob Tpr2 und CHIP ebenfalls um die C-terminale Bindestelle von Hsp90 konkurrieren und, ob Tpr2 in diesem Zusammenhang den CHIP-vermittelten Abbau von Hsp90-Substraten beeinflussen könnte.

Im folgenden Kapitel sollen weitere Experimente bezüglich der Analyse der biochemischen Funktion von dTPR2 im Modelorganismus *Drosophila melanogaster* diskutiert werden. Aufgrund der bereits beschriebenen Funktion von Tpr2 stellte sich die Frage, ob dTPR2 wichtige Funktionen des INSR, wie z.B. die Regulation des Insulinsignalweges, regulieren könnte. Solch eine Regulation könnte z.B. erhöhte Lipidlevel, eine verstärkte Resistenz gegenüber oxidativem Stress oder auch eine verlängerte Lebensspanne hervorrufen (Broughton et al., 2005).

5.2 dTPR2 ist essentiell für die Entwicklung von *Drosophila melanogaster* und den Erhalt der Protein-Homöostase

Die physiologische Funktion von dTPR2 in *Drosophila melanogaster* wurde zunächst im Hinblick auf den gesamten Organismus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dTPR2 in allen Körperregionen exprimiert wird (Abb. 4.8). Dadurch stellte sich die Frage, welche Auswirkungen ubiquitäre Veränderungen der Proteinmenge auf den Organismus haben. Die ubiquitäre Überexpression von dTPR2 (*Aktin-Gal4-Treiberlinie*) führte zur Letalität der Larven am zweiten Tag des Larvenstadiums (Abb. 4.10). Die Größe der Larven entsprach jedoch in etwa der von Wildtyp-Larven im ersten Larvenstadium, wodurch es so scheint, als ob erhöhte Tpr2-Mengen einen Wachstumsarrest hervorriefen.

Während der larvalen Entwicklung finden überwiegend Wachstumsprozesse statt. Die Larven häuten sich insgesamt zweimal und müssen ein Minimalgewicht erreichen, welches sie lebensfähig macht und das Signal für den Anfang des Puppenstadiums und die Metamorphose darstellt. Die Wachstumsrate während der larvalen Entwicklung wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst.

Hierzu zählen z.B. Temperatur, Nahrung, Platzangebot und Genotyp. Ist zu wenig Nahrung vorhanden, so kommt es in den meisten Geweben zum Arrest des Zellwachstums und der DNA-Replikation. Signale des Hormons Insulin oder des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors IGF (*Insulin-like growth factor*) vermitteln die Aufnahme von Glukose in die Zelle und die Nährstoffspeicherung durch Fettkörper und Darm. Dadurch wird das Zellwachstum gesteuert (Kap. 2.7), was wiederum entscheidend für die Wachstumsrate der Larven ist (Andres und Thummel, 1992; Edgar, 2006; Gupta et al., 2013).

Da erhöhte Tpr2-Mengen in Hek293-Zellen keinen Einfluss auf die Stabilität des INSR hatten (Abb. 4.5), wodurch der Insulinsignalweg reguliert werden könnte, wird hier ebenfalls vermutet, dass die Überexpression von dTPR2 keinen direkten Einfluss auf die Stabilität des dInR hatte. Aufgrund der bereits bekannten Funktion von Tpr2 würde man an dieser Stelle vielmehr vermuten, dass erhöhte dTPR2-Mengen die Aktivierung zahlreicher Signalmoleküle durch das molekulare Chaperon Hsp90 inhibieren. Während der larvalen Entwicklung ist die Aktivierung von Steroidhormonen, Kinasen und Rezeptoren essentiell. Beispiele hierfür sind das Steroidhormon Ecdyson, adipokinetische Hormone, die *Drosophila* Phosphatidylinositol 5-Phosphat 4 Kinase (dPIP4K) und Kinasen und Rezeptoren des Insulin- und TOR-Signalweges, welche entscheidend für Häutungs- und Wachstumsprozesse der Larven sind (Andres und Thummel, 1992; Edgar, 2006; Gupta et al., 2013). Erhöhte Tpr2-Mengen könnten dazu führen, dass zahlreiche Signalmoleküle von Hsp90 zurück auf Hsc/Hsp70 übertragen werden, wodurch wichtige larvale Entwicklungsschritte inhibiert werden könnten.

Die in Abbildung 4.10 ebenfalls dargestellte ubiquitäre Depletion von dTPR2 führte zur Letalität im Puppenstadium. Verringerte dTPR2-Mengen scheinen sich negativ auf den Prozess der Metamorphose auszuwirken. Undifferenzierte Vorläuferzellen, insbesondere die Imaginalzellen, ersetzen während dieses Prozesses die alten, larvenspezifischen Zellen. Existierende Organe werden umgeformt und neue, wie Augen und Flügel, *de-novo* generiert (Edgar, 2006). Es bleibt weiter zu klären, ob eine dTPR2-Depletion z.B. CHIP-vermittelte Abbauprozesse induzieren könnte, durch die Substrate abgebaut werden könnten, die wichtig sind für die Metamorphose.

Die massiven Auswirkungen der ubiquitär veränderten dTPR2-Mengen auf die Entwicklung des Organismus führten zu der Frage, welches Gewebe in der Fliege besonders stark auf die intakte Funktion des Co-Chaperons dTPR2 angewiesen ist. In Kapitel 4.4.3 wurde bereits erwähnt, dass in einer Studie zur okulopharyngealen Muskeldystrophie die Entstehung einer Flügelstörung und einer damit einhergehenden Muskelschwäche aufgrund einer muskulären Überexpression von dTPR2 festgestellt wurde. Der Großteil der indirekten Flugmuskulatur befindet sich bei *Drosophila melanogaster* im Thorax und besteht aus dorsoventraler und dorsolongitudinaler Skelettmuskulatur, welche sowohl für das Fliegen, als auch für die Flügelhaltung zuständig sind. (Chartier et al., 2006). Daher war die Muskulatur ein Gewebe von großem Interesse. Mit Hilfe des Mobilitäts-Assays konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von dTPR2 einen signifikanten Funktionsverlust der Muskulatur hervorrief. Bereits nach 5 Tagen konnten 41 % der Fliegen nicht mehr klettern und fliegen (Abb. 4.11 B).

Die quergestreifte Skelettmuskulatur ist aus Myofibrillen aufgebaut, welche wiederum aus mehreren Sarkomeren bestehen. Ein Sarkomer ist die kleinste kontraktile Einheit des Muskels und besteht aus Myofilamenten, insbesondere aus Myosin- und Aktinfilamenten. Zu beiden Seiten hin werden die Sarkomere von Z-Scheiben begrenzt (Luther, 2009). Z-Scheiben sind aus einer Vielzahl von Proteinen aufgebaut und während der Kontraktion mechanischem, thermischem und oxidativem Stress ausgesetzt. Die Erhaltung der Z-Scheiben wird durch eine konservierte Chaperon-Maschinerie gewährleistet, welche beschädigte Komponenten über Chaperon-vermittelte selektive Autophagie (CASA) abbaut (Kap. 2.5). Hsc70 interagiert dabei mit dem Co-Chaperonen BAG-3 (Arndt et al., 2010). Mäuse, denen das Co-Chaperon BAG-3 fehlt, zeigten eine progressive Myopathie, welche mit der Zerstörung von Z-Scheiben einherging (Homma et al., 2006). In *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass Larven, denen das BAG-3 Ortholog Starvin fehlt, eine generelle Beeinträchtigung der Funktion von Muskelzellen aufwiesen. Sobald die Muskulatur beansprucht wurde, kam es auch hier zur Zerstörung der Z-Scheiben, wodurch die Larven kein Futter mehr aufnehmen konnten und in ihrer Bewegung eingeschränkt waren. Die Larven starben im ersten Larvenstadium (Arndt et al., 2010; Coulson et al., 2005).

Eine Überexpression von Starvin in der Muskulatur führte zu dem gleichen Flügelphänotyp, wie die Überexpression von dTPR2 in der Muskulatur (Tawo R., unveröffentlichte Daten). Ein Grund für den starken Funktionsverlust der Muskulatur, durch Überexpression von dTPR2, könnte daher eine Zerstörung der Z-Scheiben sein, vergleichbar mit den Auswirkungen der Starvin-Depletion. Entscheidend hierfür könnte die nachgewiesene antagonistische Bindung von CHIP und Tpr2 an Hsc70 sein (Abb. 4.2). Erhöhte dTPR2-Mengen könnten die Interaktion zwischen CHIP und Hsc/Hsp70 in den Muskelzellen inhibieren. Dadurch würde der CHIP-vermittelte Abbauweg CASA inhibiert werden, was zur Folge hätte, dass beschädigte Z-Scheiben-Komponenten nicht mehr abgebaut würden. Es käme zu einer Zerstörung der Z-Scheiben, wodurch eine progressive Myopathie hervorgerufen würde. Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass die muskuläre Depletion von dTPR2 keinen sichtbaren Phänotyp hervorrief, der auf eine Beeinträchtigung der Muskulatur schließen ließ. Die Funktion der Flugmuskulatur von dTPR2-Depletionsmutanten wurde ebenfalls 30 Tage lang mit Hilfe des Mobilitäts-Assays überprüft. Dabei blieb die Kletterfähigkeit der Fliegen unbeeinträchtigt (Abb. 4.12 B).

Mit Blick auf die Lebensspanne der Fliegen konnte festgestellt werden, dass sowohl die muskuläre Überexpression als auch die muskuläre Depletion von dTPR2 zu einer Lebensverlängerung führte (Abb. 4.11 C und Abb. 4.12 C). Insbesondere die muskuläre Depletion von dTPR2 führte zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne um 11 ½ Tage (Kap. 3.4.5). In Zusammenhang mit lebensverlängernden Effekten werden häufig Komponenten des Insulinsignalweges betrachtet. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass eine Depletion von Tpr2 zu einer Destabilisierung des INSR führt (Abb. 4.4). Vorherige Publikationen konnten in verschiedensten Modellorganismen zeigen, dass die stressinduzierten Transkriptionsfaktoren FOXO und HSF-1 („heat shock transcription factor 1“) für lebensverlängernde Prozesse hauptverantwortlich sind (Garigan et al., 2002; Henderson und Johnson, 2001; Hwangbo et al., 2004).

Experimente mit *Caenorhabditis elegans* konnten zeigen, dass HSF-1 und DAF-16 (*C. elegans* Ortholog des FOXO Transkriptionsfaktors) Bestandteile des Insulinsignalweges sind und die Expression verschiedenster Hitzeschock-Gene induzieren. Kleine Hitzeschockproteine binden fehlgefaltete Proteine und verhindern während des Alterungsprozesses, dass oxidierte oder anders beschädigte Proteine aggregieren, bevor sie neu gefaltet oder abgebaut werden können (Hsu et al., 2003). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass DAF-2 (*C. elegans* Ortholog des INSR)-Mutanten mehr als doppelt so lange leben, wie Wildtypwürmer. Die DAF-2-Mutanten waren auffällig aktiv, während 90 % der Wildtypwürmer bereits tot oder unbeweglich waren. Der lebensverlängernde Effekt der DAF-2-Mutation hängt dabei von der Funktion des *downstream* fungierenden Transkriptionsfaktors DAF-16 ab (Kenyon et al., 1993). In diesem Zusammenhang konnte 2010 gezeigt werden, dass ein Mangel an DAF-2 dazu führt, dass DAF-16 nicht wie normal phosphoryliert und dadurch inaktiviert wird, sondern im Nukleus einen Transkriptionsprozess anstößt, der zur Lebensverlängerung führte (Kaletsky und Murphy, 2010).

In *Drosophila melanogaster* konnten Demontis und Perrimon 2010 eine Funktion von dFOXO (*Drosophila* Ortholog des FOXO Transkriptionsfaktors) in Muskelzellen nachweisen. dFOXO induziert unter anderem die Expression von Chaperonen und die von d4E-BP (*Drosophila initiation factor 4E binding protein*), einem Regulator der Proteintranslation. Eine erhöhte Aktivität von dFOXO und d4E-BP führte in Muskelzellen dazu, dass der altersbedingte Verlust der Muskelfunktion hinausgezögert und der Erhalt der Muskelfunktion verlängert wurde. d4E-BP reguliert dabei die Expression von Hsp70 und Hsp70-Kofaktoren und fördert so den Abbau von Proteinaggregaten. Demontis und Perrimon konnten weiter zeigen, dass die Signalwirkung von dFOXO in der Muskulatur zur Regulation der Proteostase in anderen Geweben führte. Hierbei wurde das Fressverhalten der Fliegen inhibiert und die Insulinausschüttung vermindert, was wiederum zur systemischen Aktivierung von d4E-BP führte. dFOXO und d4E-BP verstärken autophagische Prozesse in der Muskulatur und kontrollieren im entfernten Sinne den Alterungsprozess in anderen Geweben, wodurch die Lebensspanne der Fliegen verlängert werden konnte (Demontis and Perrimon 2010).

Die muskuläre Depletion von dTPR2 könnte demnach eine Verlängerung der Lebensspanne von *Drosophila* hervorgerufen haben, indem autophagische Prozesse verstärkt wurden. Dies könnte bedeuten, dass CHIP-Substrate, wie z.B. der dInR, verstärkt abgebaut wurden. Hierdurch könnte z.B. der dFOXO-Signalweg aktiviert und der dTOR-Signalweg inhibiert worden sein. Der dTOR-Signalweg reguliert den Stoffwechsel und Wachstumsprozesse. Die Proteinkinase dTOR (*Drosophila Target Of Rapamycin*) wird durch die Aufnahme von Glukose aktiviert und fungiert dadurch als Nahrungssensor. dTOR phosphoryliert und aktiviert dS6K (*Drosophila p70 S6 kinase*), wodurch die Proteinsynthese und damit einhergehende Wachstumsprozesse reguliert werden. Studien in *Drosophila melanogaster* konnten zeigen, dass die Inaktivierung von dTOR oder Aktivierung der Negativ-Regulatoren dTSC1 und dTSC2 zur Verlängerung der Lebensspanne führten. Hierbei konnte durch Inhibition von dTOR eine Resistenz gegenüber oxidativem Stress erzeugt werden. Der dTOR-Signalweg fungiert parallel und interaktiv mit dem Insulinsignalweg (Abb. 5.2) (Kapahi et al., 2004; Katewa und Kapahi, 2011; Martin und Hall, 2005; Potter et al., 2002). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Co-Chaperon BAG-3 mit dem TSC1-TSC2-Komplex interagiert, wodurch mTORC1 (*mammalian target of*

rapamycin complex 1) inhibiert wird. mTORC1 stimuliert unter normalen Bedingungen die Translation und inhibiert autophagische Abbauprozesse. In Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass BAG-3 in der Lage ist den TSC1-TSC2-Komplex an das Zytoskelett zu rekrutieren, wo eine Inhibition von mTORC1 Autophagie induziert. Gleichzeitig wird die Inhibition von mTORC1 im Zytosol aufgehoben, wodurch die Translationseffizienz erhöht wird und die Erhaltung des Proteoms trotz mechanischen Stresses gewährleistet werden kann (Kathage et al., 2017).

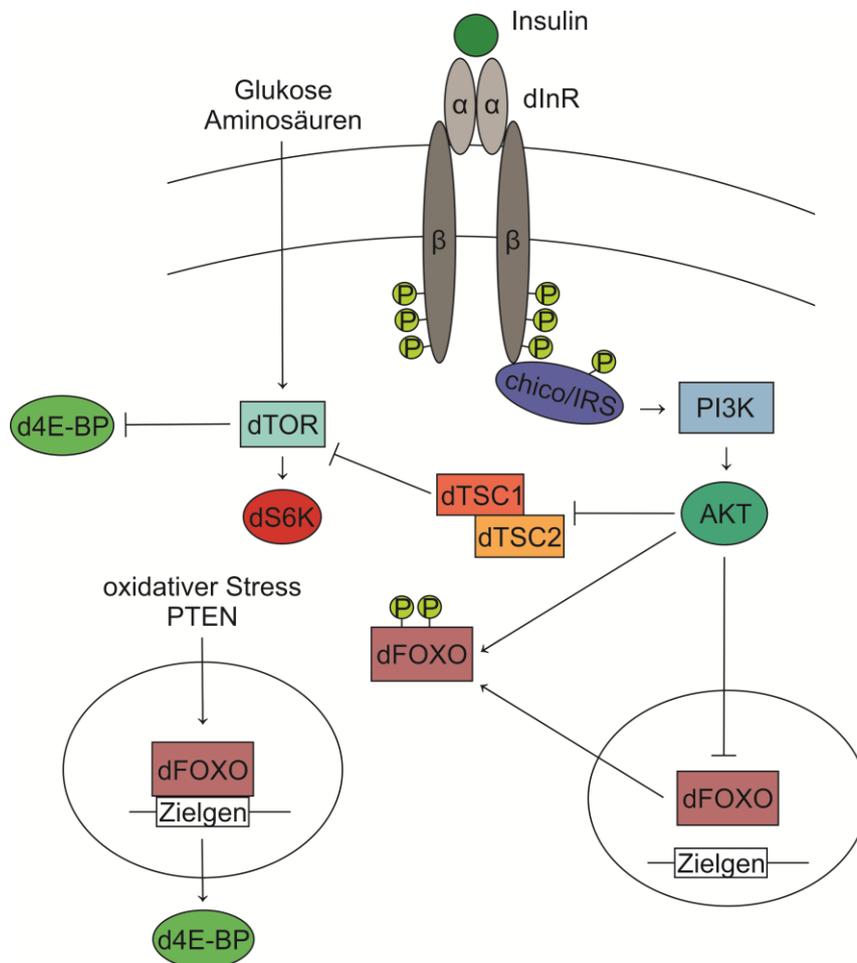


Abbildung 5.2: **Schematische Darstellung der Insulin/TOR-Signalwege in *Drosophila*.** Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor führt zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. Dadurch wird die Glukoseaufnahme und Synthese von Glykogen, Lipiden und Proteinen induziert. Die Proteinkinase dTOR fungiert als Nahrungssensor und wird durch AKT-Aktivität und Aufnahme von Glukose und Aminosäuren in die Zelle aktiviert. dTOR aktiviert die Kinase dS6K, wodurch Proteintranslation induziert wird, und inhibiert gleichzeitig dFOXO. Durch oxidativen Stress oder Nährstoffmangel wird dFOXO aktiviert und in den Zellkern transportiert. Im Zellkern induziert dFOXO die Transkription bestimmter Zielgene, unter anderem die von d4E-BP. Durch die Aktivierung von 4E-BP kann die Proteintranslation inhibiert und Autophagie induziert werden. Der Insulinsignalweg fungiert parallel und interaktiv mit dem dTOR-Signalweg, wodurch Wachstumsprozesse in *Drosophila* reguliert werden können.

Welche Prozesse durch eine verminderte dTPR2-Menge in der Muskulatur reguliert werden, bleibt noch zu klären. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente gab es leider keinen ausreichend funktionierenden Antikörper gegen den dInR, weshalb Expressionsveränderungen des dInR an dieser Stelle nicht nachgewiesen werden konnten. Mit Hilfe eines funktionierenden Antikörpers müsste zunächst eine Regulation des Insulinsignalweges aufgrund veränderter dInR-Mengen nachgewiesen werden. Im Anschluss daran könnten untersucht werden, ob verminderte dTPR2-Mengen die Lebensspanne der Fliegen durch Regulation des dFOXO-Signalweges oder des dTOR-Signalweges verlängern könnten.

Der lebensverlängernde Effekt der dTPR2-Überexpression in der Muskulatur war sehr überraschend, da die Muskulatur der Fliegen bereits nach wenigen Tagen stark beeinträchtigt war (Abb. 4.11 B) und im Zusammenhang mit progressiver Myopathie eine Kurzlebigkeit der Tiere erwartet wurde. In Hek293-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Tpr2 die Stabilität des INSR nicht beeinflusst (Abb. 4.5), weshalb eine Regulation von Signalwegen, die im Zusammenhang mit lebensverlängernden Effekten stehen, an dieser Stelle nicht vermutet wurde.

Verschiedene Studien in *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* konnten allerdings zeigen, dass eine verlängerte Lebensspanne nicht gleichzeitig bedeuten muss, dass die Gesundheit der Tiere zeitlich verlängert ist (Bansal et al., 2015). Im Gegenteil, W. A. Van Voorhies und S. Ward postulierten bereits 1999, dass lebensverlängernde Effekte eine sekundäre Konsequenz aus Genmutationen sind, die der primären Konsequenz eines verringerten Stoffwechselumsatzes folgen. Diese Mutationseffekte wären damit vergleichbar mit einfachen umweltverändernden Effekten, wie z.B. einer Veränderung der Raumtemperatur. Studien in *C. elegans* konnten zeigen, dass Wildtypwürmer bei niedriger Temperatur viermal so lange leben, wie Wildtypwürmer bei hoher Temperatur. Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass Temperaturveränderungen den Stoffwechselumsatz verändern. Langlebige *C. elegans* Mutanten, wie z.B. DAF2-Mutanten, zeigten ebenfalls einen reduzierten Stoffwechselumsatz. Die Mutanten entwickelten sich langsamer und zeigten eine reduzierte Wachstumsrate und Fruchtbarkeit, Effekte, die charakteristisch sind für Würmer, welche bei niedrigen Temperaturen gehalten werden. Es wurde daher vermutet, dass der lebensverlängernde Effekt eine Konsequenz der reduzierten metabolischen Leistung war (Van Voorhies und Ward, 1999).

In *Drosophila melanogaster* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Fliegen bei hoher Raumtemperatur kürzer leben, als bei niedriger Raumtemperatur (Miquel et al., 1976). Der Alterungsprozess korreliert mit biochemischen Veränderungen, wie z.B. dem Proteinabbau. Bei erhöhter Temperatur schreitet der Alterungsprozess und der damit verbundene Proteinabbau schneller voran (Atlan et al., 1976). Die Überexpression des Co-Chaperons dTPR2 könnte daher, wie bereits oben beschrieben, zur Inhibition des CHIP-vermittelten Abbaus von Proteinen führen. Dies könnte zur Folge haben, dass der Alterungsprozess langsamer voranschreitet, vergleichbar mit einem verlangsamten Alterungsprozess aufgrund von niedriger Raumtemperatur. Die hervorgerufene Schädigung der Muskulatur könnte zusätzlich dazu geführt haben, dass der Stoffwechselumsatz der Fliegen, im Vergleich zu Wildtypfliegen, deutlich geringer war. Verglichen mit dem Effekt der DAF2-Mutation auf den Stoffwechsel, könnte die, durch Überexpression von dTPR2, hervorgerufene Myopathie den lebensverlängernden Effekt noch verstärkt haben. Um diese Hypothese jedoch weiter stützen zu können, müsste zunächst der Einfluss der dTPR2-Überexpression auf CHIP-vermittelte

Abbauprozesse untersucht werde. Eine mögliche Korrelation mit einem verlangsamten Alterungsprozess könnte anschließend durch Untersuchung weiterer Faktoren der Alterung, wie z.B. der Akkumulation von Lipidperoxidierungs-Pigmenten, untersucht werden (Atlan et al., 1976).

Der Effekt der Tpr2-Depletion auf die Stabilität des INSR in humanen Zellen (Abb. 4.4) und die lebensverlängernden Effekte durch veränderter dTPR2-Mengen in der Muskulatur von *Drosophila melanogaster* (Abb. 4.11 C und Abb. 4.12 C), gaben den Anstoß für nähere Untersuchungen der dTPR2-Funktion in Abdominal-Geweben wie Fettkörper und Mitteldarm. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass insbesondere der Mitteldarm während der Alterung auf eine CHIP-Funktion angewiesen ist. Dabei reguliert CHIP den dInR und den Insulinsignalweg (Tawo R., Dissertation 2016, Universität Bonn). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die wildtypische Expression von dTPR2 in den Abdominal-Geweben besonders stark war (Abb. 4.8).

Die Zellen des Fettkörpers sind für die Energiespeicherung und -nutzung zuständig. Des Weiteren findet hier die Synthese von Energielieferanten (Glykogen und Fette), Metaboliten und Hämolympheproteinen statt. Ein Großteil der Stoffwechselprozesse, wie Proteinsynthese, Lipid-, Aminosäure- und Kohlenhydratmetabolismus, finden ebenfalls im Fettkörper der Fliegen statt (Arrese und Soulages, 2010). Der Mitteldarm ist eins der größten Organe in der Fliege, in dem wichtige Prozesse wie Verdauung und Nährstoffaufnahme stattfinden. Darüber hinaus spielt der Mitteldarm eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr (Buchon et al., 2013; Jiang und Edgar, 2011).

Es stellte sich die Frage, ob eine Depletion von dTPR2 in Mitteldarm und Fettkörper die Lebensspanne von *Drosophila melanogaster* verlängern könnte. Mit Hilfe der Treiberlinie *PSwitch106* wurde dTPR2 zunächst gleichzeitig in Fettkörper und Mitteldarm depletiert. Die Lebensspanne der dTPR2-depletierten Fliegen war jedoch mit der von Wildtypfliegen vergleichbar (Abb. 4.13). Daraufhin wurde dTPR2 gewebespezifisch depletiert, was weder im Fettkörper noch im Mitteldarm zu einer signifikanten Veränderung der Lebensspanne führte (Abb. 4.14 und Abb. 4.15).

Diese Ergebnisse konnten zeigen, dass eine Depletion von dTPR2 in Abdominal-Geweben nicht dazu führte, dass der Alterungsprozess der Fliegen beeinflusst wurde. Auch zu diesem Zeitpunkt der experimentellen Durchführung gab es keinen ausreichend funktionierenden Antikörper gegen den dInR, weshalb Expressionsveränderungen nicht untersucht werden konnten. Dennoch wäre es interessant zu sehen, ob dTPR2 die Stabilität des dInR, als beispielhaftes CHIP-Substrat, insbesondere im Mitteldarm beeinflusst. In diesem Zusammenhang wäre es spannend zu sehen, ob eine dTPR2-Überexpression im Mitteldarm eine Verkürzung der Lebensspanne hervorruft, vergleichbar mit dem Effekt der CHIP-Depletion im Mitteldarm (Tawo R., Dissertation 2016, Universität Bonn).

In jedem Fall konnten die hier vorgestellten Daten deutlich machen, dass dTPR2 sowohl während der larvalen Entwicklung als auch während der Alterung von *Drosophila melanogaster* essentiell ist. Dabei beruht die Funktion des Co-Chaperons auf einem genau definierten Expressionslevel. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dTPR2 die Protein-Homöostase reguliert, sowohl in Bezug auf den gesamten Organismus als auch in Bezug auf Muskelzellen.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

Alberti, S., Esser, C., und Höhfeld, J. (2003). BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones* 8, 225–231.

Alberti, S., Böhse, K., Arndt, V., Schmitz, A., und Höhfeld, J. (2004). The Cochaperone HspBP1 Inhibits the CHIP Ubiquitin Ligase and Stimulates the Maturation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Mol. Biol. Cell* 15, 4003–4010.

Andres, A.J., und Thummel, C.S. (1992). Hormones, puffs and flies: the molecular control of metamorphosis by ecdysone. *Science* (80-.). 8, 132–138.

Aravind, L., und Koonin, E. V. (2000). The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr. Biol.* 10, 132–134.

Arndt, V., Daniel, C., Nastainczyk, W., Alberti, S., und Höhfeld, J. (2005). BAG-2 Acts as an Inhibitor of the Chaperone-associated Ubiquitin Ligase CHIP. *Mol. Biol. Cell* 16, 5891–5900.

Arndt, V., Rogon, C., und Höhfeld, J. (2007). To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2525–2541.

Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D.O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B.K., Hoch, M. und Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr. Biol.* 20, 143–148.

Arrese, E.L., und Soulages, J.L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–225.

Atlan, H., Miquel, J., Helmle, L.C., und Dolkas, C.B. (1976). Thermodynamics of Ageing in *Drosophila Melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 5, 371–387.

Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.-Y., und Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4535–4545.

Bansal, A., Zhu, L.J., Yen, K., und Tissenbaum, H.A. (2015). Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E277–E286.

Bevan, A.P., Seabright, P.J., Tikerpae, J., Posner, B.I., Smith, G.D., und Siddle, K. (2000). The role of insulin dissociation from its endosomal receptor in insulin degradation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 164, 145–157.

Bilen, J., und Bonini, N.M. (2007). Genome-Wide Screen for Modifiers of Ataxin-3 Neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 3, 1950–1964.

- Blatch, G.L., und Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* 21, 932–939.
- Brand, A.H., und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Brinker, A., Scheufler, C., Von Der Mülbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I., und Hartl, F.U. (2002). Ligand discrimination by TPR domains. *J. Biol. Chem.* 277, 19265–19275.
- Broggiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., und Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11, 213–221.
- Broughton, S.J., Piper, M.D.W., Ikeya, T., Bass, T.M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D.J., Leivers, S.J. und Partridge, L. (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *PNAS* 102, 3105–3110.
- Brychzy, A., Rein, T., Winklhofer, K.F., Hartl, F.U., Young, J.C., und Obermann, W.M.J. (2003). Cofactor Tpr2 combines two TPR domains and a J domain to regulate the Hsp70/Hsp90 chaperone system. *EMBO J.* 22, 3613–3623.
- Buchon, N., Osman, D., David, F.P.A., Yu Fang, H., Boquete, J.-P., Deplancke, B., und Lemaitre, B. (2013). Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep.* 3, 1725–1738.
- Bukau, B., und Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351–366.
- Burch, L., Shimizu, H., Smith, A., Patterson, C., und Hupp, T.R. (2004). Expansion of Protein Interaction Maps by Phage Peptide Display Using MDM2 as a Prototypical Conformationally Flexible Target Protein. *J. Mol. Biol.* 337, 129–145.
- Carra, S., Seguin, S.J., Lambert, H., und Landry, J. (2008). HspB8 chaperone Activity toward poly(Q)-containing Proteins Depends on Its Association with Bag3, a Stimulator of Macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 283, 1437–1444.
- Chartier, A., Benoit, B., und Simonelig, M. (2006). A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J.* 25, 2253–2262.
- Chen, C., Jack, J., und Garofalo, R.S. (1996). The *Drosophila* Insulin Receptor Is Required for Normal Growth. *Endocrinology* 137, 846–856.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Höfelfeld, J., und Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* 3, 93–96.
- Coulson, M., Robert, S., und Saint, R. (2005). *Drosophila* starvin Encodes a Tissue-Specific BAG-Domain Protein Required for Larval Food Uptake. *Genetics* 171, 1799–1812.

- Davis, G.W., Schuster, C.M., und Goodman, C.S. (1997). Genetic Analysis of the Mechanisms Controlling Target Selection: Target-Derived Fasciclin II Regulates the Pattern of Synapse Formation. *Neuron* 19, 561–573.
- Demand, J., Lüders, J., und Höhfeld, J. (1998). The Carboxy-Terminal Domain of Hsc70 Provides Binding Sites for a Distinct Set of Chaperone Cofactors. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2023–2028.
- Demand, J., Alberti, S., Patterson, C., und Höhfeld, J. (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr. Biol.* 11, 1569–1577.
- Demontis, F., und Perrimon, N. (2010). FOXO/4E-BP Signaling in *Drosophila* Muscles Regulates Organism-wide Proteostasis during Aging. *Cell* 143, 813–825.
- Dutta, D., Bloor, J.W., Ruiz-Gomez, M., Raghavan, K.V., und Kiehart, D.P. (2002). Real-time Imaging of Morphogenetic Movements in *Drosophila* Using Gal4-UAS-Driven Expression of GFP Fused to the Actin-Binding Domain of Moesin. *Genesis* 34, 146–151.
- Edgar, B.A. (2006). How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat. Rev. Genet.* 7, 907–916.
- Esser, C., Scheffner, M., und Höhfeld, J. (2005). The Chaperone-associated Ubiquitin Ligase CHIP Is Able to Target p53 for Proteasomal Degradation. *J. Biol. Chem.* 280, 27443–27448.
- Fan, C.-Y., Lee, S., und Cyr, D.M. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones* 8, 309–316.
- Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M., und Schlessinger, J. (1995). The *Drosophila* insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *EMBO J.* 14, 3373–3384.
- Freeman, B.C., Myers, M.P., Schumacher, R., und Morimoto, R.I. (1995). Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.* 14, 2281–2292.
- Frydman, J., und Höhfeld, J. (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *TIBS* 22, 87–92.
- Garigan, D., Hsu, A.-L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., und Kenyon, C. (2002). Genetic Analysis of Tissue Aging in *Cenorhabditis elegans*: A Role for Heat- Shock Factor and Bacterial Proliferation. *Genetics* 161, 1101–1112.
- Geiger, D., Carpentier, J.-L., Gorden, P., und Orci, L. (1989). Down-Regulation of Insulin Receptors Is Related to Insulin Internalization. *Exp. Cell Res.* 185, 33–40.
- Gorden, P., Carpentier, J.-L., Moule, M.L., Yip, C.C., und Orci, L. (1982). Direct Demonstration of Insulin Receptor Internalization. *Diabetes* 31, 659–662.
- Green, A., und Olefsky, J.M. (1982). Evidence for insulin-induced internalization and degradation of insulin receptors in rat adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 427–431.
- Gupta, A., Toscano, S., Trivedi, D., Jones, D.R., Mathre, S., Clarke, J.H., Divecha, N., und Raghup, P. (2013). Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PIP4K) regulates TOR signaling and cell growth during *Drosophila* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5963–5968.

- Hartl, F.U., und Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* (80-.). 295, 1852–1858.
- Hartl, F.U., Bracher, A., und Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332.
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., und Gordon, C. (2003). Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem. Sci.* 28, 26–31.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., und Nakayama, K.-I. (2001). U Box Proteins as a New Family of Ubiquitin-Protein Ligases. *J. Biol. Chem.* 276, 33111–33120.
- Henderson, S.T., und Johnson, T.E. (2001). daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 11, 1975–1980.
- Höhfeld, J., und Jentsch, S. (1997). GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.* 16, 6209–6216.
- Höhfeld, J., Minami, Y., und Hartl, F.U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83, 589–598.
- Homma, S., Iwasaki, M., Shelton, G.D., Engvall, E., Reed, J.C., und Takayama, S. (2006). BAG3 Deficiency Results in Fulminant Myopathy and Early Lethality. *Am. J. Pathol.* 169, 761–773.
- Hsu, A.-L., Murphy, C.T., und Kenyon, C. (2003). Regulation of Aging and Age-Related Disease by DAF-16 and Heat-Shock Factor. *Science* (80-.). 300, 1142–1146.
- Hwangbo, D.S., Gershman, B., Tu, M.-P., Palmer, M., und Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429, 562–566.
- Jiang, H., und Edgar, B.A. (2011). Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut. *Exp. Cell Res.* 317, 2780–2788.
- Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Höhfeld, J., und Patterson, C. (2001). CHIP Is a U-box-dependent E3 Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* 276, 42938–42944.
- Kaletsky, R., und Murphy, C.T. (2010). The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging. *Dis. Model. Mech.* 3, 415–419.
- Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., und Benzer, S. (2004). Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in TOR Signaling Pathway. *Curr. Biol.* 14, 885–890.
- Katewa, S.D., und Kapahi, P. (2011). Role of TOR signaling in aging and related biological processes in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol.* 46, 382–390.
- Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Lüdecke, L., Tapia, V.E., Orfanos, Z., Wenzel, D., Bloch, W., Volkmer, R., Fleischmann, B.K., Fürst, D.O. und Höhfeld, J. (2017). The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 62–75.
- Kazemi-Esfarjani, P., und Benzer, S. (2000). Genetic Suppression of Polyglutamine Toxicity in *Drosophila*. *Science* (80-.). 287, 1837–1840.

- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., und Tabtlang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461–464.
- Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R., und Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol. Chem.* 391, 481–489.
- Kiang, J.G., und Tsokos, G.C. (1998). Heat Shock Protein 70 kDa : Molecular Biology , Biochemistry , and Physiology. *Pharmacol. Ther.* 80, 183–201.
- King, F.W., Wawrzynow, A., Höhfeld, J., und Zylicz, M. (2001). Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *EMBO J.* 20, 6297–6305.
- Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., und Dikic, I. (2009). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Mol. Cell* 34, 259–269.
- Kitamura, T., Kahn, C.R., und Accili, D. (2003). Insulin receptor knockout mice. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 313–332.
- Knutson, V.P. (1991). Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB* 5, 2130–2138.
- Lamb, J.R., Tugendreich, S., und Hieter, P. (1995). Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* 20, 257–259.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., und Hartl, F.U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356, 683–689.
- Levy, E.J., McCarty, J., Bukau, B., und Chirico, W.J. (1995). Conserved ATPase and luciferase refolding activities between bacteria and yeast Hsp70 chaperones and modulators. *FEBS Lett.* 368, 435–440.
- Liu, Y., Liu, H., Liu, S., Wang, S., Jiang, R.-J., und Li, S. (2009). Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 71, 16–30.
- Luther, P.K. (2009). The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 30, 171–185.
- Martin, D.E., und Hall, M.N. (2005). The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 158–166.
- Mayer, M.P., und Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., und Bukau, B. (1995). The Role of ATP in the Functional Cycle of the DnaK Chaperone System. *J. Mol. Biol.* 249, 126–137.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., und Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* 3, 100–105.
- Miquel, J., Lundgren, P.R., Bensch, K.G., und Atlan, H. (1976). Effects of Temperature on the Life Span, Vitality and Fine Structure of *Drosophila Melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 5, 347–370.

- Moffatt, N.S.C., Bruinsma, E., Uhl, C., Obermann, W.M.J., und Toft, D. (2008). Role of the Cochaperone Tpr2 in Hsp90 Chaperoning.
- Murthy, A.E., Bernards, A., Church, D., Wasmuth, J., und Gusella, J.F. (1996). Identification and Characterization of Two Novel Tetratricopeptide Repeat-Containing Genes. *DNA Cell Biol.* 15, 727–735.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., und Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* 31, 137–155.
- Obermann, W.M.J., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P., und Hartl, F.U. (1998). In Vivo Function of Hsp90 Is Dependent on ATP Binding and ATP Hydrolysis. *J. Cell Biol.* 143, 901–910.
- Olivares-Reyes, J.A., Arellano-Plancarte, A., und Castillo-Hernandez, J.R. (2009). Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 302, 128–139.
- Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H., und Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12596–12601.
- Park, S., Alfa, R.W., Topper, S.M., Kim, G.E.S., Kockel, L., und Kim, S.K. (2014). A Genetic Strategy to Measure Circulating Drosophila Insulin Reveals Genes Regulating Insulin Production and Secretion. *PLoS Genet.* 10, e1004555.
- Perdew, G.H., und Whitelaw, M.L. (1991). Evidence that the 90-kDa Heat Shock Protein (HSP90) Exists in Cytosol in Heteromeric Complexes Containing HSP70 and Three Other Proteins with Mr of 63,000, 56,000, and 50,000. *J. Biol. Chem.* 266, 6708–6713.
- Pickart, C.M. (2004). Back to the Future with Ubiquitin. *Cell* 116, 181–190.
- Poirier, L., Shane, A., Zheng, J., und Seroude, L. (2008). Characterization of the Drosophila Gene-Switch system in aging studies: a cautionary tale. *Aging Cell* 7, 758–770.
- Potter, C.J., Pedraza, L.G., und Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat. Cell Biol.* 4, 658–665.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., und Pearl, L.H. (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* 18, 754–762.
- Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Roe, S.M., Piper, P.W., und Pearl, L.H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular „clamp“ via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.* 19, 4383–4392.
- Ravichandran, K.S. (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20, 6322–6330.
- Richter, K., und Buchner, J. (2001). Hsp90: Chaperoning Signal Transduction. *J. Cell. Physiol.* 188, 281–290.
- Roman, G., Endo, K., und Davis, R.L. (2001). P {Switch}, a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12602–12607.
- Rüdiger, S., Buchberger, A., und Bukau, B. (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat. structural Biol.* 4, 342–349.

- Saltiel, A.R., und Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806.
- Santos, E., und Nebreda, A.R. (1989). Structural and functional properties of ras proteins. *Faseb* 3, 2151–2163.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., und Moarefi, I. (2000). Structure of TPR Domain-Peptide Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70-Hsp90 Multichaperone Machine. *Cell* 101, 199–210.
- Shieh, S.-Y., und Bonini, N.M. (2011). Genes and pathways affected by CAG-repeat RNA-based toxicity in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4810–4821.
- Thomas, P.J., Qu, B.-H., und Pedersen, P.L. (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* 20, 456–459.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., und Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94–102.
- Tripathi, V., Ali, A., Bhat, R., und Pati, U. (2007). CHIP Chaperones Wild Type p53 Tumor Suppressor Protein. *J. Biol. Chem.* 282, 28441–28454.
- Vogelstein, B., Lane, D., und Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.
- Van Voorhies, W.A., und Ward, S. (1999). Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11399–11403.
- Welchman, R.L., Gordon, C., und Mayer, R.J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 599–609.
- Wilkinson, K.D. (1999). Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *J. Nutr.* 129, 1933–1936.
- Wilkinson, K.D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: Targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Cell Dev. Biol.* 11, 141–148.
- Xiang, S.-L., Kumano, T., Iwasaki, S., Sun, X., Yoshioka, K., und Yamamoto, K. (2001). The J Domain of Tpr2 Regulates Its Interaction with the Proapoptotic and Cell-Cycle Checkpoint Protein, Rad9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 932–940.
- Young, J.C., Obermann, W.M.J., und Hartl, F.U. (1998). Specific Binding of Tetratricopeptide Repeat Proteins to the C-terminal 12-kDa Domain of hsp90. *J. Biol. Chem.* 273, 18007–18010.
- Zinke, I., Kirchner, C., Chao, L.C., Tetzlaff, M.T., und Pankratz, M.J. (1999). Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumppless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development* 126, 5275–5284.

6.2 Internetverweise

Bloomington *Drosophila* Stock Center:

<http://flystocks.bio.indiana.edu/>

Drosophila Genomics Resource Center:

<https://dgrc.bio.indiana.edu/>

FlyBase *Drosophila* Datenbank:

<http://flybase.org/>

PubMed Datenbank:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Vienna *Drosophila* Resource Center:

<http://stockcenter.vdrc.at/>

6.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
4E-BP	<i>initiation factor 4E binding protein</i>
Aa	Acrylamid
Abb.	Abbildung
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatasen
BafA1	Bafilomycin
BAG	<i>Bcl-2-associated athanogene</i>
BDSC	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAP	<i>chaperone-assisted proteasomal degradation</i>
CASA	<i>chaperone-assisted selective autophagy</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHIP	<i>carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CQ	Chloroquin
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CyO	<i>Curly of Oyster</i>
DILP	<i>Drosophila insulin-like peptides</i>
dInR	<i>Drosophila</i> Insulinrezeptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTPR2	<i>Drosophila tetratricopeptide repeat protein 2</i>
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym

Verzeichnisse

E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitinligase
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et aliter</i>
EtOH	Ethanol
Ex.	Extrakt
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FOXO	Forkhead Box Protein O
g	Gramm
GR	Glukokortikoidrezeptor
GST	Glutathion-S-Transferasen
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
Hip	<i>Hsc70-interacting protein</i>
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
Hop	<i>Hsp70/Hsp90-organizing protein</i>
Hsc70	<i>70 kDa heat shock cognate protein</i>
Hsp70	<i>70 kDa heat shock protein</i>
Hsp60	<i>60 kDa heat shock protein</i>
Hsp90	<i>90 kDa heat shock protein</i>
IFM	indirekte Flugmuskulatur
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	Gamma-Immunglobulin
INSR	Insulinrezeptor
IP	Immunpräzipitation
IPC	<i>insulin producing cell</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- <i>b</i> -D-galaktopyranosid
IRS	Insulinrezeptor-Substrate
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>

MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
Min.	Minute/Minuten
ml	Milliliter
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
n.d.	nicht detektierbar
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
n.s.	nicht signifikant
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p.a.	höchstmögliche Reinheitsstufe von Chemikalien (<i>pro analysis</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der [H]-Ionenkonzentration
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
pmol	Pikomol
PolyQ	Polyglutamin
ppl	<i>pumpless</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RU486	Mifepriston
S6K	<i>p70 S6 kinase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sek.	Sekunde/Sekunden
SEM	Standardfehler
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOS	<i>Son-of-sevenless</i>

Verzeichnisse

STUB1	<i>STIP1</i> homology and U-Box containing protein 1 (CHIP)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure (<i>Trichloroacetic acid</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Hybridisierungstemperatur
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
Tpr2	<i>tetratricopeptide repeat protein 2</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC1/TSC2	<i>tuberous sclerosis 1 and 2</i>
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
U	<i>units</i> , Mengeneinheit für Restriktionsenzyme
UAS	<i>upstream-activation-sequence</i>
UbcH5b	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2 (UBC4/5 homolog, yeast)</i>
Ubl	Ubiquitinähnliche Domäne (<i>ubiquitin-like domain</i>)
U-Box	E2-interagierende Domäne von Ubiquitinligasen
UV	ultraviolett
V	Volt
w ¹¹¹⁸	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter