Universität Ulm
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Institutsleiter: Prof. Dr. med. Tobias Böckers

Bedeutung von HspB5 und dessen Phosphorylierung bei Staurosporin-induzierter Apoptose in C6-Gliomzellen und bei der Hitzeschock-induzierten Rarefizierung des Dendritenbaums in hippocampalen Neuronen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Maximilian Glomb
geboren in Rottweil, Baden-Württemberg

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Nikola Golenhofen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Deniz Yilmazer-Hanke

Tag der Promotion: 12.07.2019

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Bartelt-Kirbach B, Moron M, Glomb M, Beck C-M, Weller M-P, Golenhofen N. “HspB5/alphaB-crystallin increases dendritic complexity and protects the dendritic arbor during heat shock in cultured rat hippocampal neurons.” Cellular and molecular life sciences: CMLS 2016; 73(19): 3761 – 3775
Eine Genehmigung zur Verwendung wurde durch den Springer-Verlag erteilt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen iii
1 Einleitung 1
1.1 Nervengewebe 1
1.2 Neurodegenerative Erkrankungen 2
1.3 Zelluläre Stressantwort und Apoptose 3
1.3.1 Stresstoleranz 3
1.3.2 Apoptose 3
1.4 Hitzeschockproteine 4
1.4.1 Kleine Hitzeschockproteine (HspBs) 5
1.4.2 αB-Crystallin / HspB5 6
1.5 Fragestellung 11
2 Material und Methoden 12
2.1 Material 12
2.1.1 Material, Chemikalien und Enzyme 12
2.1.2 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien 15
2.1.3 Antikörper 16
2.1.4 Organismen 16
2.1.5 Vektoren 17
2.1.6 Primer 17
2.2 Molekularbiologische Methoden 17
2.2.1 Ortsspezifische Mutagenese von HspB5-Konstrukten 17
2.2.2 Umklonierung der HspB5-Konstrukte in einen Lentiviralen Vektor 23
2.3 Zellkulturmethoden 27
2.3.1 Zelllinien 27
2.3.2 Primäre Zellkultur 29
2.3.3 Herstellung von Lentiviren 31
2.4 Immunzytochemie 34
2.4.1 TUNEL-Reaktion 35
2.5 Biochemische Methoden 36
2.5.1 Herstellung von Zelllysaten 36
2.5.2 Amidoschwarz 36
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 37
2.5.4 Western-Blot Analyse 38
2.5.5 Proteindetektion 39
2.6 Datenerhebung und Analyse 39
2.6.1 Quantitative Analyse der Apoptose in C6-Zellen 39
2.6.2 Charakterisierung der Neuronenmorphologie mittels Sholl-Analyse 40
2.6.3 Statistik 40
3 Ergebnisse 41
3.1 Mutagenese von HspB5 41
3.2 Umklonierung der HspB5-Konstrukte in einen lentiviralen Expressionsvektor 44

3.3 Herstellung von Viruspartikeln 45
3.4 Effekt von HspB5 und dessen Phosphorylierung auf Staurosporin-induzierte Apoptose in C6-Gliomzellen 46
3.4.1 Überexpression der HspB5-Konstrukte 46
3.4.2 Staurosporin-induzierte Apoptose in C6-Zellen 48
3.5 Effekt von HspB5 und der HspB5-Mutanten auf Staurosporin-induzierte Apoptose .. 50
3.6 Effekt von HspB5 und der HspB5-Mutanten auf Hitzeschock-induzierte Rarefizierung des Dendritenbaums in hippocampalen Neuronen 53
3.6.1 Überexpression von HspB5 in hippocampalen Neuronen 53
3.6.2 Etablierung einer zellulären Stressbedingung, die zur Rarefizierung des Dendritenbaums hippocampaler Neurone führt 55
3.6.3 Effekt von HspB5 und den HspB5-Mutanten auf Hitzeschock-induzierte Rarefizierung des Dendritenbaums hippocampaler Neurone 58
4 Diskussion 65
4.1 Methodik 65
4.1.1 Aminosäureaustausch als Simulation der Phosphorylierung 65
4.1.2 Überexpression von HspB5 und den HspB5-Mutanten durch ein Lentivirales Expressionssystem 66
4.2 Protektive Funktion von HspB5 67
4.2.1 Effekt von HspB5 und der Phosphorylierung von HspB5 auf Staurosporin-induzierte Apoptose in Gliomzellen 67
4.2.2 Protektion des Dendritenbaums vor Hitzeschock-induzierten Rarefizierung durch HspB5 69
4.2.3 Möglicher neuroprotektiver Effekt von HspB5 bei neurodegenerativen Erkrankungen 73
5 Zusammenfassung 75
6 Literatur 77
Abbildungsverzeichnis 86
Danksagung 87
Lebenslauf 88

Abkürzungen

3' LTR	3' Long Terminal Repeat
5' LTR	5' Long Terminal Repeat
A	Aminosäure Alanin und Nukleinbase Adenin
ACD	Alpha-crystallin Domäne
AG	Arbeitsgruppe
Akt	Proteinkinase B
Amp^r	Ampicillin Resistance Gene; β-lactamase
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	Actin-Related Proteins 2 und 3
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl2	B-Cell Lymphoma 2
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cPPT/CTS	Central Polypurine Tract/Central Termination Sequence
Cyt c	Cytochrom C
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Dest.	Destilliert
DIV	Day In Vitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSCAM	Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EcoRI	E. coli Restriktionsenzym I
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Et al	Und weitere
F	Phenylalanin
FasR	Fas-Rezeptor

FCS	Filtred calw serum
G	Aminosäure Glycin und Nukleinbase Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H	Histidin
H_2O	Wasser
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEK	Human Epithelial Kidneycell
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus-1
HPLC H_2O	High performance liquid chromatography water
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Hitzeschock
HSF	Heat shock factor
Hsp	Hitzschockprotein
HspBs	Kleine Hitzeschockproteine
I	Isoleucin
IAP	Inhibitor of apoptosis Protein
IgG	Immunglobulin G
IRES	Encephalomyocarditis Virus Internal Ribosome Entry Site
IXI	Aminosäuresequenz Isoleucin - Variable x - Isoleucin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
kb	Kilobasen
L	Leucin
LB	Luria Broth
LV	Leervektor
M.	Morbus
MAP	Mitogen-Activiertes Protein
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MAPK	Mitogen-Activierte Proteinkinase
MCS	Multiple Cloning Site
Mg	Magnesium
$MgCl_2$	Magnesiumdichlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
Mn	Mangan
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
Na_2HPO_4	Natriumdihydrogenphoshat
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Normal Goat Serum
P	Prolin
PBS	Phosphat Buffered Saline

PBS	Primer Binding Site
$P_{CMV\ IE}$	Human Cytomegalovirus Immediate Early Promoter
PCR	Polymerase Chain Reaction, dt. Polymerase - Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLL	Poly-L-Lysin
POX	Prolinoxidase
pRB	Retinoblastom-Protein
PTM	Posttranslationale Modifikation
pUC ori	origin of replication
RNAse	Ribonukleinase
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rounds per minute
RRE	Rev-Response Element
rSAP	Rekombinante Shrimp alkalische Phosphatase
RT	Raumtemperatur ca. 22°C
S	Serin
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sHsp	Small heat shock protein, dt. kleine Hitzeschockproteine
siRNA	Small interfering RNA
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
Strep	Streptomycin
STS	Staurosporin
SYBR Green1	N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine
T	Nukleinbase Thymin und Temperatur
TAE	Tris Acetat EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	International unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Tryptophan
WPRE	woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
Z-VAD-FMK	3-[2-(2-benzyloxycarbonylamino-3-methyl-butyrylamino)-propionyla-mino]-4-oxo-pentanoic acid
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZsGreen1	Zoanthus sp. green fluorescent protein

1 Einleitung

1.1 Nervengewebe

Das Nervengewebe wird von Neuronen und Glia gebildet. Neurone leiten Informationen wie Schmerz, Sinneswahrnehmungen oder Stellung der Extremitäten an das Gehirn und, nach Verarbeitung in einer Feedbackschleife als Reaktion auf den Reiz, zurück an die betreffenden Organe oder die Muskulatur. Die von dem Neuron wegführenden Zellfortsätze verlaufen in der Peripherie gebündelt als Nerven und verbinden im ZNS die beteiligten Kerngebiete. Die intrazelluläre Reizweiterleitung erfolgt elektrisch durch Potentialunterschiede. Von Zelle zu Zelle wird dieses Signal durch Freisetzung eines Neurotransmitters chemisch übertragen. Während ihrer Differenzierung polarisieren die Neurone und bilden zwei verschiedene Arten von Fortsätzen aus. Zum einen das singuläre Axon, das die Reize vom Perikaryon wegleitet (efferent) und zum anderen multiple Dendriten, die über Synapsen die Informationen aufnehmen, um sie dann in Richtung Perikaryon weiterzuleiten (afferent).
Der Dendritenbaum ist die Grundlage für die Entwicklung eines komplexen Nervensystems. Er vergrößert die Oberfläche von Neuronen um ein Vielfaches, wovon die Anzahl an Synapsen und damit die Informationsweiterleitung und -verarbeitung abhängig ist. Je nach Funktion des Neurons entwickeln sich morphologisch unterschiedliche Dendritenbäume. Das konnte schon vor 125 Jahren Ramón y Cajal darstellen [13]. Das neuronale Zytoskelett stabilisiert, macht weitere Verzweigungen möglich und ist somit ein wichtiger Faktor der Dendritogenese. Mikrotubuli, die aus den heterodimeren α- und β-Tubulin polymerisiert werden, können sich beispielsweise an Zentrosomen und Teilen des Golgi-Apparates anlagern und so in die Dendriten einsprießen und sich verzweigen. Dendriten exprimieren DSCAM (Down Syndrome cell adhesion molecule) auf ihrer Oberfläche. Das führt zur Selbsterkennung und Selbstvermeidung und ermöglicht Koexistenz. Fehlerhafte Entwicklung oder Abbau des Dendritenbaums, ist bei vielen psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen nachweisbar, darunter Autismus, Schizophrenie und neurodegenerative Erkrankungen [53].

1.2 Neurodegenerative Erkrankungen

Die Anzahl, der an einer neurodegenerativen Erkrankung leidenden Menschen nimmt aufgrund der stetig steigenden Lebenserwartung beständig zu. Global lässt sich eine rasante Alterung der Weltbevölkerung beobachten. Zwischen 2015 und 2050 wird sich, laut Schätzungen der World Health Organisation, der Anteil der über 60-jährigen global von 12 % auf 22 % nahezu verdoppeln [72]. Mit zunehmendem Alter steigt auch die Inzidenz neurodegenerativer Erkrankungen. Als neurodegenerative Erkrankungen werden chronische Krankheiten bezeichnet, welche durch zunehmenden Funktionsverlust der Nervenzellen gekennzeichnet sind. Die genauen Ursachen, wie es im Laufe des Lebens zu diesem Funktionsverlust kommt, sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Genetik, Lebensführung und Umweltfaktoren haben auf zellulärer Ebene Einfluss darauf, wie resistent eine Zelle gegenüber pathologischen Bedingungen ist. Neben direkter Schädigung durch Temperaturschwankungen, pH-Wert Veränderungen, Toxinen, Mikroorganismen oder Energiemangel durch Hypoxie und Ischämie, kann eine intra- und extrazelluläre Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen zu Störungen im zellulären Stoffwechsel führen, sodass es erst zu Funktionsverlust und letztendlich zum Zelluntergang kommt. Die Symptomatik ist variabel und unterscheidet sich je nach betroffener Region. Klinisch manifestiert sich der Untergang von Nervenzellen in einem Verlust höherer kortikaler Funktionen, darunter auch Gedächtnisverlust oder Störung der Lernfähigkeit, als Leitsymptom der Neurodegeneration [22]. In Europa macht die Alzheimer Krankheit einen Anteil von etwa 60 % aller Demenzen aus. In Deutschland sind ca. 1,6 Millionen Menschen betroffen. Laut Daten des Statistischen Bundesamtes ist bis 2060 mit einem Anstieg auf rund 3 Millionen Erkrankten zu rechnen. Diese Situation und die fehlenden Therapieoptionen machen deutlich, wie wichtig es ist Ursachenforschung zu betreiben, um auf diese Weise in Zukunft präventive Maßnahmen und geeignete Therapien anbieten zu können.

Neurodegenerative Erkrankungen sind vielfältig und werden unter anderem nach ihren molekularen Pathomechanismen klassifiziert [59]. Zu den häufigsten Krankheitsbildern gehören Morbus Alzheimer (M. Alzheimer) und Morbus Parkinson. Aber auch seltenere Erkrankungen wie Chorea Huntington, Multiple Sklerose und Amyotrophe Lateralsklerose werden den neurodegenerativen Erkrankungen zugerechnet. Histopathologisch lassen sich oft Proteinaggregate nachweisen, in welchen auch Hitzeschockproteine gefunden werden. Mutationen in einigen Hitzeschockproteinen führen zu verschiedenen Erkrankungen und es wird angenommen, dass Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von

neurodegenerativen Erkrankungen einnehmen [9, 57]. Möglicherweise sind sie wichtig im Vorbeugen von entstehenden Proteinaggregaten [12, 28].

1.3 Zelluläre Stressantwort und Apoptose

Die Resilienz, ein in der Psychologie gebräuchlicher Begriff, beschreibt die Fähigkeit eines Menschen, wie gut er Stress aushalten oder kompensieren kann um gesund zu bleiben. Äquivalent dazu, haben auch Zellen einen molekularen Apparat, um sich vor schädigenden Einflüssen zu schützen. Davon machen die Hitzeschockproteine einen großen Anteil aus. Je nach Intensität des Stressors können sie den zellulären Stoffwechsel der Zelle aufrechterhalten. Ist der Stress zu groß, wird in der Zelle der programmierte Zelltod, die Apoptose, aktiviert.
Im ZNS kann sowohl zellulärer Stress, als auch Apoptose in einzelnen Kerngebieten zu der Entstehung einer neurodegenerativen Erkrankung führen [70].

1.3.1 Stresstoleranz

Die endogenen Schutzmechanismen in den Zellen, bewahren diese vor Zellschädigungen und Zelltod. Dabei muss die Zelle auf viele verschiedene Arten von Stress reagieren.
Infektionen, Energiemangel, Intoxikationen, pH-Wert- und Temperaturänderungen sind einige Beispiele, die zu einer Denaturierung der Proteine führen können. Als Antwort darauf werden Hitzeschockproteine hochreguliert, welche die denaturierten Proteine entweder in ihre funktionelle Form zurückbringen, oder sie zum Abbau dem Proteasom zuführen. In der Folge eines subletalen Stresses findet eine Präkonditionierung statt, sodass die Überlebensrate bei einem weiteren nachfolgenden Stressereignis steigt. So kann z.B. ein ischämischer Apoplex besser überlebt werden, wenn kurze Zeit davor eine transitorisch ischämische Attacke aufgetreten ist [88].

1.3.2 Apoptose

Die Apoptose ist der sogenannte programmierte Zelltod, der im Unterschied zur Nekrose weder eine Entzündungsreaktion noch eine Aktivierung des Immunsystems nach sich zieht. Morphologisch lässt sich zunächst eine Kondensation des Chromatins beobachten. Später kommt es dann zu Einschnürungen der Plasmamembran, Fragmentierung der DNA durch Endonucleasen, Karyolyse und schließlich zur Auflösung der Zelle in apoptotische Partikel [91]. Man kann zwischen einer intrinsischen und extrinsischen Aktivierung der Apoptose

unterscheiden. Eine Schlüsselrolle bei beiden Wegen spielen dabei die Caspasen. Diese Cystein-enthaltenden Aspartat-spezifischen Proteasen können sich gegenseitig aktivieren. Sie bauen DNA und Zytoskelettanteile ab, sodass die Zelle zu Grunde geht. Der extrinsische Weg erfolgt über die Aktivierung der Todesrezeptoren (FasR). Diese Transmembranproteine aktivieren initial Caspase-8, welche im weiteren Verlauf die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktiviert. Zum Zelluntergang führt dann die Degradation essentieller Proteine, beispielsweise Lamin und Aktin als Teile des Zytoskeletts, oder verschiedene Enzyme z.B. Proteinkinasen oder andere Faktoren wie das Retinoblastomprotein (pRB). Bei der intrinsischen Aktivierung, durch DNA-Schäden oder Zellstress, werden zunächst proapoptotische Proteine, darunter Bcl2, Bax und Bak, aktiviert. Diese führen zu einer erhöhten Membranpermeabilität in den Mitochondrien, wodurch Cytochrom c (Cyt c) und Smac ins Zytosol übertreten. Cytochrom c bildet, an Apaf-1 gebunden, das Apoptosom, ein scheibenförmiges Heptamer aus Cyt c/Apaf-1 Komplexen. Es aktiviert zunächst Caspase-9 und darüber die Effektorcaspasen. Diese Kaskade wird unter anderem von dem proapoptotischen Smac unterstützt. Es bindet an IAPs (inhibitor of apoptosis) und blockiert diese. Dadurch wird die Aktivierung der Caspasen-3, -6, -7 und -9 nicht mehr unterdrückt. Neben der Unterscheidung zwischen einer intrinsischen und extrinsischen Apoptoseaktivierung, wird neuerdings auch zwischen einer Caspase-abhängigen und einer Caspase-unabhängigen Apoptose unterschieden. Ergebnisse aus verschiedenen Zelllinien zeigen, dass ein solcher Mechanismus in Zellen vorhanden sein kann. In mehreren Zelllinien konnte Apoptose morphologisch und immunhistochemisch nachgewiesen werden, obwohl eine Aktivierung der Caspasen durch einen Inhibitor geblockt worden war [6, 55]. So findet man in HL60-Zellen einen Caspase-unabhängigen Weg, wohingegen in der Jurkat-Zelllinie der programmierte Zelltod nur Caspase-abhängig eintritt.

1.4 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine sind nach ihrer Entdeckung benannt. Bei der Chromosomenanalyse von Larven der Drosophila melanogaster, welche zufällig bei erhöhten Temperaturen inkubiert worden waren, bemerkte 1962 Ferruccio Ritossa Regionen von dekondensierten Banden [74, 82]. Diese sogenannten Puffs entstehen in Bereichen verstärkter Replikation und Transkription, wodurch die Expression, der in diesen Regionen kodierten Proteine, steigt. Nach dieser grundlegenden Beobachtung wurden die Proteine, die als Antwort auf erhöhte Temperaturen hochreguliert werden, als Hitzeschockproteine (Hsp) bezeichnet. Eine Einteilung der Hitzeschockproteine erfolgte später gemäß ihrem Molekulargewicht: HspH (Hsp110),

HspC(Hsp90), HspA(Hsp70), DNAJ(Hsp40) und HspB (kleine Hitzeschockproteine) [47]. Eine Hochregulierung der Hitzeschockproteine erfolgt nicht nur bei Hitze, sondern auch bei Sauerstoffmangel, Minderdurchblutung, Vergiftung und Entzündungsreaktionen. Durch ihre Funktion als Chaperone bewahren sie Proteine in ihrer nativen Konfiguration und verhindern Denaturierung und irreversible Aggregation. Sie sind somit wichtige Bestandteile der zelleigenen Stressantwort [23, 68]. Nicht nur bei subletalem Zellstress, sondern auch im Rahmen des programmierten Zelltodes spielen Hitzeschockproteine eine protektive Rolle. Es wird vermutet, dass diese antiapoptotische Eigenschaft auch im Rahmen der Tumorgenese zu einem verlängerten Zellüberleben von Tumorzellen führt. In der letzten Zeit wurden weitere Zusammenhänge deutlich, die darauf hinweisen, dass die Hitzeschockproteine auch in der Tumorgenese von verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle spielen[14, 17, 45, 76]. So konnte in Tumorbiospien eine hohe Expression von Hsps nachgewiesen werden, beispielsweise in Mamma-, Endometriums-, Lungen- und Prostatakarzinomen. Eine Korrelation mit schlechter Prognose, früherer Metastasierung und schlechterer Sensibilität für Chemotherapie wird mit einer Hsp-Expression assoziiert [67].

1.4.1 Kleine Hitzeschockproteine (HspBs)

Unter der Bezeichnung der kleinen Hitzeschockproteine (HspBs) lassen sich aktuell 10 bekannte Proteine dieser Familie zusammenfassen (Tabelle 1). Seit der systematischen Namensgebung des „HUGO gene nomenclature comittees“ sind die kleinen Hsps von HspB1 bis HspB10 durchnummeriert. In der Literatur finden sich des Öfteren noch die ehemaligen Bezeichnungen, die sich an Expressionsort oder molekularem Gewicht anlehnen. Auf Grund ihrer hohen Expressionsrate in der Augenlinse sind HspB4 als αA-crystallin bzw. HspB5 als αB-crystallin bereits bekannt und beschrieben [90]. In verschiedenen Geweben lässt sich die Expression von mehreren HspBs nachweisen, darunter in Muskulatur (HspB1-B3, HspB5-B8), Gehirn (HspB1, HspB5, HspB6, HspB8) und Hoden (HspB9, HspB10). Charakteristisch für die kleinen Hitzeschockproteine ist eine molekulare Masse von 12 - 43 kDa, sowie eine konservierte α-Crystallin Domäne. Diese umfasst 80 - 100 Aminosäuren und ist in allen HspBs zu finden. Eingefasst ist diese Domäne von sehr variablen N- und C-terminalen Enden, welche in Länge und Struktur variieren [35, 66]. HspBs werden durch Hitzeschock und weiteren Arten von zellulärem Stress hochreguliert und schützen Zellen vor stress-induziertem Schaden. Im Gegensatz zu anderen Hsps, die als Chaperone an der Proteinfaltung beteiligt sind, haben HspBs zytoprotektive chaperon-ähnliche Funktion und bewahren vor Proteinaggregation, indem sie partiell ungefaltete Proteine binden und sie in einer löslichen

Phase halten [37, 42]. Für die Rückfaltung in die native Form sind andere Chaperone notwendig. Weitere Funktionen sind Inhibiton von Apoptose und Stabilisation des Zytoskeletts durch Interaktion mit dessen Bestandteilen.

Tabelle 1: Übersicht der kleinen Hitzeschockproteine (HspBs). kDa = Kilodalton - =keine Expression (+) = schwache Expression, + = Expression, ++ = starke Expression

	Alte Bezeichnung	**Molekulargewicht**	**Präferentielle Expression**	**Expression im Gehirn**
HspB1	Hsp25/Hsp27	22,7 kDa	Muskel	+
HspB2	MKBP	20,2 kDa	Muskel	(+)
HspB3	HspL27	17,0 kDa	Muskel	(+)
HspB4	αA-crystallin	19,9 kDa	Augenlinse	-
HspB5	αB-crystallin	20,2 kDa	Augenlinse, Muskel	++
HspB6	Hsp20	16,8 kDa	Muskel	++
HspB7	cvHsp	18,6 kDa	Muskel	-
HspB8	Hsp22, H11	21,6 kDa	Muskel	+
HspB9	CT51	17,5 kDa	Hoden	-
HspB10	ODF1	28,3 kDa	Hoden	-

1.4.2 αB-Crystallin / HspB5

Eine erste Beschreibung von HspB5 stammt von Carl Theodor Mörner, unter der Bezeichnung der Crystalline aus dem Jahre 1894. Er beschrieb bei der Untersuchung der Augenlinse Proteine, welche kristalline Eigenschaften aufwiesen [64]. Der Proteinanteil in den Linsenfasern setzt sich zu 90 % aus Crystallinen zusammen. Neben β- und γ-Crystallinen sind vor allem α-Crystalline vorhanden. Zu ihnen zählt αA-Crystallin (HspB4) und αB-Crystallin (HspB5). Sie schützen vor Denaturierung und Aggregation der vorhandenen Proteine und tragen somit zur lebenslangen Transparenz der Augenlinse bei [37, 64]. Im Gegensatz zu HspB4, wird HspB5 ubiquitär exprimiert und ist in Retina, Haut, Gehirn [7, 51], Rückenmark und Lunge [7] und besonders stark in der Herz- und Skelettmuskulatur zu finden. Eine Induktion von HspB5 erfolgt zum einen durch die Transkriptionsfaktoren HSF-1 und -2 bei verschiedenen Stressformen, welche zu einer Hochregulation von HspB5 und weiteren Hitzeschockproteinen führt. Zum anderen kann die HspB5-Expression, aber auch HSF-unabhängig induziert werden [19].

1.4.2.1 Struktur

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der HspB5 Struktur. α -Crystallin Domäne (ACD) hellblau, IXI-Motif dunkelblau, N-Terminus und C-Terminus gelb dargestellt mit den drei Hauptphosphorylierungsstellen Serin 19, 45 und 59 mit „P“ als Phosphatrest.

Humanes HspB5 ist ein Protein mit 175 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 21 kDa. Eine Gemeinsamkeit der HspBs ist die zentrale α -Crystallin Domäne (ACD), die innerhalb der Hsps hoch konserviert ist und 84 Aminosäuren ausmacht. Die ACD setzt sich aus mehreren β-Faltblättern zusammen, die sich in zwei antiparallelen Schichten zusammenlagern. Diese Struktur ermöglicht es, dass sich zwei ACDs zusammenlagern und sich so Dimere bilden können. Der N-Terminus umfasst etwa 65 Aminosäuren, von denen die Reste der Aminosäuren 14 - 17 und 27 - 31 jeweils eine α-Helix ausbilden und ein antiparalleles β-Faltblatt von den Resten 48 - 50 und 61 - 63 gebildet wird [46]. Der N-Terminus enthält die drei wichtigsten Phosphorylierungsstellen Serin 19, 45 und 59. Der kurze C-Terminus ist innerhalb der Hsps mit Ausnahme eines Ile159-X-Ile161 Motifs (IXI-Motif), das in der Tertiärstruktur eine Ausbuchtung bildet, sehr variabel (**Abbildung 1**). Der Aufbau aus flexiblen N- und C-Termini und der konservierten ACD spielt auch für das Verständnis der Eigenschaften und Funktionen von HspB5 eine große Rolle.

Als eine zentrale Eigenschaft von HspB5 gilt die Bildung von Homo- und Heterooligomeren. Die Zusammensetzung und Größe kann dabei stark variieren. Dafür sorgt ein dynamischer und konstanter Austausch von Untereinheiten, die zu heterogenen und dynamischen Oligomeren [5, 18, 20, 26, 35, 52] führt. Zwei Monomere, die sich an der ACD antiparallel zu Dimeren zusammenlagern, bilden den Grundbaustein der Oligomere. Drei Dimere können sich wie ein Dreieck arrangieren, verbunden über die benachbarten IXI-Motife der jeweiligen Dimere. Vier dieser Hexamere bilden zusammen ein 24-mer, an das sich weitere Dimere anlagern können. Somit sind auch größere Oligomere möglich [46]. Der Aufbau ist variabel und das Spektrum der Oligomere reicht von kleinen Formen mit 10 Molekülen bis zu größeren Multimeren von bis zu 40 Molekülen und einer molekularen Masse von 800 kDa [2]. Daten verschiedener massenspektrografischer Untersuchungen zeigen einen Peak bei 586 kDa. Daraus lässt sich vermuten, dass HspB5 Homooligomere vorwiegend als 28-

mere vorliegen. So wie die ACD wichtig für die Bildung von Dimeren ist, geht die Bildung von Oligomeren von dem N- und C-Terminus aus. Das IXI-Motif im C-Terminus verankert benachbarte Dimere [20, 36]. Veränderungen im N-Terminus von HspB5 führen zu kleineren Oligomeren. Eine Deletion des N-Terminus in Versuchen mit bovinem ($HspB5_{70-175}$) und humanem ($HspB5_{69-175}$) HspB5, führt in der Folge zu verkleinerten Oligomeren. Die Regulation der Oligomerisierung durch Phosphorylierung wird ebenfalls diskutiert. So führt eine simulierte dreifach-Phosphorylierung, zur Bildung von Hexameren und 12-meren [69].

1.4.2.2 Funktionen

Die Eigenschaft Oligomere zu bilden, steht in engem Zusammenhang mit den unterschiedlichen Funktionen von HspB5. Im Vordergrund steht die chaperon-ähnliche Funktion. Daneben hat HspB5 spezifische Funktionen: Schutz vor oxidativem Stress, Stabilisierung und Organisation des Zytoskeletts [89], sowie antiapoptotische Funktionen.

Die chaperon-ähnliche Funktion von HspB5 ist die charakteristische und gut beschriebene Hauptfunktion. Denaturierte oder teilweise ungefaltete Proteine können durch HspB5 gebunden und stabilisiert werden. Dadurch wird eine Aggregation verhindert. In einem Versuch mit HspB5-Proteinfragmenten zeigte ein sogenanntes Mini-HspB5-Fragment, aus den Aminosäuren 73 - 93 diese chaperon-ähnliche Eigenschaften und konnte als Substratbindungsstelle identifiziert werden [8]. Im Verlauf können diese gebundenen ungefalteten Proteine von Chaperonen wie Hsp70 in einer ATP-abhängigen Reaktion richtig gefaltet werden [35]. Ist die korrekte Faltung nicht erreichbar, werden die gebundenen denaturierten Proteine dem Proteasom und somit dem Proteinabbau zugeführt. Eine weitere wichtige Funktion von HspB5, die höhermolekulare Hsps nicht aufweisen, ist die Stabilisierung des Zytoskeletts.

Die Integrität des Zytoskeletts ist notwendig für die Funktionalität und das Überleben jeder Zelle. Die wichtige Rolle von HspB5 in der Stabilisierung des Zytoskeletts wird auch dadurch belegt, dass Mutationen von HspB5 kardio- und skelettale Myopathien verursachen [84]. Eine dieser Mutationen ist die gut untersuchte R120G Mutation von HspB5, die von Katarakten und von Kardiomyopathie begleitet ist [85].

Die direkte Interaktion von HspB5 mit dem Zytoskelett zeigt sich in Kardiomyozyten bei der Translokation an die Z-Scheiben, I-Banden und Glanzstreifen während einer Ischämie [30, 31]. Als zytoskelettale Bindungspartner von HspB5 konnte hier Desmin und Titin beschrieben werden [27]. Ein weiterer beschriebener Interaktionspartner ist Tubulin, aus dem sich die Mikrotubuli polymerisieren [3]. HspB5 reguliert hier die Aggregation und wirkt protektiv auf die Stabilität der Mikrotubuli [25, 92].

Eine weitere Funktion von HspB5 ist die antiapoptotische Eigenschaft. So zeigt sich an verschiedenen Stellen, dass sich HspB5 hemmend auf die Apoptose auswirkt. HspB5 inhibiert die p53-induzierte Freisetzung von Bax ins Zytosol oder auch direkt über eine Hemmung von Bax. Beispielsweise wirkt HspB5 in humanen retinalen Pigmentzellen über eine Interaktion mit Bax und Bcl-2 einer Apoptoseinduktion durch Staurosporin entgegen [62].

1.4.2.3 Regulation durch Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von Proteinen im Allgemeinen ist einer von etwa 200 verschiedenen Mechanismen, der zu den posttranslationalen Modifikationen (PTM) gehört. Fällt eine PTM aus, kann dies Erkrankungen zur Folge haben. Die Phosphorylierungsstellen von HspB5 sind gut beschrieben. Dabei erwiesen sich vor allem drei Phosphorylierungsstellen für die Regulierung der HspB5-Funktionen als relevant. Diese befinden sich in dem N-terminalen Ende an den Resten von Serin 19, 45 und 59 [39, 50]. Die Phosphorylierung von HspB5 kann durch Hitzeschock induziert werden[39]. Die verantwortlichen Enzyme sind p44/42 MAP Kinase für Serin 19 und 45, sowie die MAPKAP Kinase 2 für die Phosphorylierung an Serin 59 [50]. Abgesehen davon wurde auch eine Autophosphorylierung von HspB5 beobachtet [49].

Die Phosphorylierung an den Serinen 19, 45 und 59 reduziert die Komplexgröße der Oligomere und beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation [21].

1.4.2.4 HspB5 in Neuronen

Neben dem Vorkommen in Linse und Muskelgewebe, wurde HspB5 auch in Nervengewebe nachgewiesen [7]. Ursprünglich wurde HspB5 in Gliazellen detektiert, insbesondere bei neurologischen Erkrankungen, bei denen es offensichtlich hochreguliert wird. Bei der Untersuchung der Alexander-Krankheit lieferten Iwaki et al. [40] den Nachweis von HspB5 in Astrozyten. Sie wiesen die für die Pathologie typischen intrazellulären Rosenthalfasern auf. Später konnte HspB5 in reaktiver Glia bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden, sowie vereinzelt in „ballooned neurons“ bei Morbus Alzheimer [41].

Der Nachweis kleiner Hitzeschockproteine, darunter eine hohe Expression von HspB5, in kultivierten Neuronen gelang der AG Golenhofen und machte eine spezifische Untersuchung der Rolle von HspB5 in Neuronen möglich [51]. Dabei zeigte sich in hippocampalen

Neuronen, dass die intrazelluläre Lokalisation von HspB5 von der Phosphorylierung beeinflusst wird. Phosphoryliertes HspB5 ist u.a. an der Plasmamembran und in Dendriten lokalisiert [75].

Auf Grund dieser Lokalisation wurde der Einfluss von HspB5 auf den Dendritenbaum weiter untersucht. Es zeigte sich eine erhöhte Komplexität der dendritischen Verzweigung bei Überexpression von HspB5. Interessanterweise scheint auch hier die Phosphorylierung eine Rolle zu spielen, da dieser Effekt bei der Überexpression von unphosphoryliertem HspB5 unter physiologischen Bedingungen verschwand [4].

Die vorliegende Arbeit, die zum Teil zeitgleich mit oben genannten Erkenntnissen entstand, untersucht unter anderem die Rolle der Phosphorylierung auf die dendritische Funktion von HspB5.

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Bedeutung der Phosphorylierung von HspB5 in Nervengewebe zu untersuchen. Dafür wurden zunächst Mutanten von HspB5 hergestellt, die die Phosphorylierung an genau einer, an zwei und an allen drei Phosphorylierungsstellen simulierten. Außerdem wurde eine nicht phosphorylierbare Mutante durch einen Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin oder Glutaminsäure hergestellt.

Im ersten Teilprojekt wurde ein eventuell protektiver Effekt von phosphoryliertem HspB5 in Gliazellen untersucht, in dem der Effekt von HspB5 und den entsprechenden Mutanten auf eine durch Staurosporin-induzierte Apoptose in C6-Gliomzellen studiert wurde. Die Verwendung von Staurosporin, ein wirksamer Inhibitor verschiedener Kinasen, führt in Zellen zur Apoptose. Experimentell sollte ermittelt werden, welche Zeitspanne und Konzentration von Staurosporin benötigt wird, um eine ungefähre Apoptoserate von 20% zu erzielen. C6-Zellen wurden im Anschluss mit HspB5 und den HspB5-Phosphomimetika transduziert und nach Überexpression mit Staurosporin inkubiert, um den programmierten Zelltod zu induzieren. Apoptotische Zellen konnten immunzytochemisch ermittelt und deren Zahl in Beziehung zu den überlebenden Zellen gesetzt werden. Dabei zeigte sich in diesem Modell kein signifikanter protektiver Effekt von HspB5.

In einem zweiten Teilprojekt wurde ein möglicher protektiver Effekt von HspB5 auf den Dendritenbaum hippocampaler Neurone bei zellulärem Stress untersucht. Dafür wurde zunächst ein Stressmodell etabliert, welches zu einer signifikanten Rarefizierung des Dendritenbaums führte. Als geeignetes Experimentalmodell erwies sich ein Hitzeschock durch Exposition der Neurone bei 43 °C für 30 min. Nach Überexpression von HspB5 und den HspB5-Phosphomimetika in kultivierten hippocampalen Neuronen, wurden diese dann dem Hitzeschock ausgesetzt und mittels Immunmarkierung der Dendriten durch MAP-2 die Komplexität des Dendritenbaums mit der Sholl-Analyse analysiert. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von HspB5 einer Hitzeschock-induzierten Rarefizierung des Dendritenbaums entgegenwirkt. Überexpression der acht verschiedenen HspB5-Phosphomimetika zeigten unterschiedliche Effekte auf den Dendritenbaum.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Material, Chemikalien und Enzyme

Geräte und Material	**Firma**
96-wellplatte	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Abzug TA-1200	Hemling, Ahaus, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
Avanti J-25 Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Axioskop2 mot plus	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Becherglas	Schott, Mainz, Deutschland
Binokulares Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
BioFuge pico	Haereus, Hanau, Deutschland
Cell Scraper 23 cm	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Cellstar Petrischalen 12 cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Petrischalen 6 cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Pipettenspitzen 5/10/25ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkulturflasche 25cm²	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkulturflasche 75cm²	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Celluloseacetat	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Cryo -1°C Freezing Container	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
CryoTube Vials	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Deckgläschen	Assistent, Sondheim, Deutschland
Einmalskalpell	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresesystem	Bio-Rad, München, Deutschland
ELISA Reader Multiskan RC	Labsystems, Victoria, Australien
Falcon 15 ml, 50ml	Sarsted, Nümbrecht, Deutschland
Feinwaage CPA42025	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Feuchtkammer	Feinwerktechnik Universität, Ulm, Deutschland
Folienschweißgerät	A.Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Forma 900 Series -80°C	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Glaswasserbecken	VWR, Darmstadt, Deutschland
Haereus Cytoperm 2	Haereus, Hanau, Deutschland
Heizrührgerät MR3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
HeraCell	Haereus, Hanau, Deutschland
HeraSafe	Haereus, Hanau, Deutschland
Inkubator	WTC Binder, Tuttlingen, Deutschland
Innova4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scient., Nürtingen, Deutschland
Kühlschrank	Privileg Öko, München, Deutschland
LaminAir HLB 2448 GS	Haereus, Hanau, Deutschland
LightCycler	Roche, Basel, Schweiz

Messbecher 1000ml	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikroschere	FineScienceTools, Heidelberg, Deutschland
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart, Deutschland
MultiFuge 3 S-R	Haereus, Hanau, Deutschland
Multiwell 24-well	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Neubauerzählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Nitrocelluloseacetatmembran	GE Healthcare, München, Deutschland
Objektträger	VWR, Darmstadt, Deutschland
Parafilm M	Bemis, Neenah, Wisconsin USA
Primus 96 advanced Thermocycler	VWR, Darmstadt, Deutschland
pH-Meter FiveEasy	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pinzette	FineScienceTools, Heidelberg, Deutschland
Pipetboy	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipetten research plus P10 - P1000	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen bis 1ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präparierschere	FineScienceTools, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,2 - 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenkasette Gevamatic	Rego, Augsburg, Deutschland
Safeseal Reaktionsgefäß 2ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe-seal Tips professional	Biozym Scient., Hessisch Oldendorf, Deutschland
Schüttler SM-30	Edmung Bühler, Hechingen, Deutschland
Stickstoffkühler Cryo 200	FormaScientific, Marietta, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV-Tisch TFX-35M	LifeTechnologies, Carlsbad, USA
Vortexgenie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage CP4202 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad WiseCircu	Wisd. Laboratory Instruments
Whatman Filterpapier	GE Healthcare Life Science
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Chemikalien	**Firma**
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amidoschwarz	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfate	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
DTT	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
Ethansäure	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
GeneRuler 1kbp plus DNA Ladder	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Gibco DMEM	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Gibco DPBS	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Gibco FCS	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Gibco HBSS	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Gibco Neurobasal	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Gibco OptiMEM	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
HCl	FlukaAnalytical, München, Deutschland
HPLC H20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt, Deutschland
LB Agar	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
LB Broth Base	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
LoadingDye	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
Methansäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt, Deutschland
$MgSO_4$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4.88	Hoechst, Frankfurt a. M. Deutschland
Na_2HPO_4	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
Natriumcitrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Normal goat serum	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pen/Strep	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
PLL	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
Ponceau S	Merck, Darmstadt, Deutschland
Redsafe	Intron Biotechnology, Lynnwood, USA
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS ultrapure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim Deutschland
TEMED	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Trichlorethansäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris hydrochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypton 2%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20 Polysorbat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Enzyme	**Firma**
DNAse	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
EcoRI	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
rSAP	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4Ligase	Promega, Madison, USA
Trypsin (2,5% in PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland

Kits	**Firma**
In situ cell death detection Kit, Fluorescein	Roche, Basel, Schweiz
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	GenoMed GmbH, Löhne Deutschland
Jetquick PCR Product Purification Spin Kit	GenoMed GmbH, Löhne Deutschland
JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit	GenoMed GmbH, Löhne Deutschland
Jetstar Plasmid Purification MIDI Kit	GenoMed GmbH, Löhne Deutschland
NucleoSpin RNA Virus qRT-PCR-Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Phusion Site-directed Mutagenesis Kit	ThermoFisherScientific, Waltham, USA

2.1.2 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

Neurobasalmedium	Lösung von 1 ml B27, 250 µl Glutamin, 250 µl Pen/Strep-Lösung in 50 ml Neurobasal
PBS 1x	Lösung von 80,06 g NaCl, 2 g KCl, 17,06 g Na_2HPO_4 und 2 g KH_2PO_4 in 10 l destilliertem H_2O
Pen/Strep-Lösung	Lösung von 1 Mio U Penicillin und 1 g Streptomycin in 100 ml destilliertem H_2O, steril filtriert.
PLL-Lösung	Lösung von 5 mg Poly-L-Lysin in 50 ml HBSS, steril filtriert.
SOC-Medium	Lösung von 20 g Trypton, 2 g Hefeextrakt, 0,584 g NaCl, 0,168 g KCl, 1,204 g $MgSO_4$, 0,951 $MgCl_2$ und 3,63 g Glucose in 1 l destilliertem H_2O bei 121 °C für 20 min autoklaviert

TAE 50x	Lösung von 242 g Tris, 100 ml EDTA (0,5M bei pH 8), 57,1 ml Essigsäure in 1 l destilliertem H_2O
TBS 10x	Lösung von 48,44 g Tris und 116,88 g NaCl in 2 l destilliertem H_2O
LB-Medium	Lösung von 20 g LB Broth Base in 1 l destilliertem H_2O, bei 121 °C für 20 min autoklaviert
TBST	Lösung von 1000 ml TBS 1x mit 0,5 ml Tween
Trypsin-Lösung	Lösung von 25 g Trypsin und 12,5 g EDTA in 100 ml PBS
Zellkulturmedium	Mischung von 500 ml DMEM mit 4mM L-Glutamin und 3,7 g/l Natriumbicarbonat, 50 ml FCS und 5 ml Pen/Strep-Lösung

2.1.3 Antikörper

- Kaninchen anti-HspB5 IgG, Genetex
- Maus anti-MAP-2 IgG Millipore
- Maus anti-GAPDH IgG, Thermofischer
- Ziege anti-Kanninchen IgG mit POX konjugiert, Dianova
- Ziege anti-Maus IgG mit POX konjugiert, Dianova
- Ziege anti-Kaninchen IgG-AlexaFluor568, Invitrogen
- Ziege anti-Maus IgG-AlexaFluor568, Invitrogen

2.1.4 Organismen

- E. coli DH5α, Invitrogen
- C6-Zellen, Cell Lines Services
- Lenti-X 293T Zellen, Clontech

2.1.5 Vektoren

- pCR2.1TOPO-HspB5, AG Golenhofen,
- pLVX-IRES-ZsGreen1, Clontech,

2.1.6 Primer

Die Mutageneseprimer (Tabelle 2) wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg bestellt.

Tabelle 2: Mutageneseprimer. Die verwendeten Primer sind tabellarisch aufgeführt, links die Bezeichnung und rechts die Sequenz in 5‘-3‘ Richtung, gelb markiert sind die Stellen der Mutagenese, welche zu dem jeweiligen Aminosäureaustausch führen. S19 = Serin 19, S45 = Serin 45, S59 = Serin 59, E = Glutaminsäure, A = Alanin, H = Hinprimer, R = Rückprimer, G = Guanin , T = Thymin A = Adenin, C = Cytosin

Primerbezeichnung	Sequenz
S19E-H	5'-cccttctttcctttccacgagccaagccgcctctttgac-3'
S19E-R	5'-acgccggatccaggggtggtggatgg-3'
S45E-H	5'-ctacagccacttccctggagcccttctaccttcggcc-3'
S45E-R	5'-agaagaggtcagactccaacaggtgctctccgaa-3'
S45A-H	5'-acagccacttccctggccccttctaccttcg-3'
S45A-R	5'-agagaagaggtcagactccaacaggtgctctcc-3'
S59E-H	5'-ctccttcctgcgggcacctgagtggattgacactgg-3'
S45E-S59E-R	5'-ggtggccgaaggtagaagggctccagggaagtg-3'
S45A-S59E-R	5'-ggagggtggccgaaggtagaaggggccag-3'
S59A-H	5'-ttcctgcgggcacctgcctggattgacactgg-3'
S45E-S59A-R	5'-ggagggtggccgaaggtagaagggctccag-3'
S45A-S59A-R	5'-ggagggtggccgaaggtagaaggggccag-3'

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Ortsspezifische Mutagenese von HspB5

Um die Bedeutung der Phosphorylierung von HspB5 zu untersuchen, wurden mittels zielgerichteter Mutagenese Punktmutationen an den Phosphorylierungsstellen in der HspB5-Sequenz durchgeführt. Die Serinreste wurden durch Alanin (A) oder Glutaminsäure (E) ersetzt. Da alle drei Phosphorylierungsstellen in den verschiedenen Kombinationen mutiert werden mussten, wurden insgesamt acht verschiedene HspB5-Mutanten benötigt. Die Konstrukte HspB5-A/A/A, HspB5-A/A/E, HspB5-A/E/A und HspB5-A/E/E lagen in der Arbeitsgruppe Golenhofen bereits vor, die vier Konstrukte HspB5-E/E/E, HspB5-E/E/A, HspB5-E/A/E und

HspB5-E/A/A wurden in diesem Projekt generiert. Für die Mutagenese wurde das Phusion Site-directed Mutagenesis Kit von ThermoScientific verwendet. Nach Protokoll wurden für jeden Mutagenese-Zyklus zuerst die PCR durchgeführt und dann nach Ligation und Transformation in kompetente E.coli Bakterien mit einer Sequenzierung des Produkts die Mutagenese kontrolliert. Für die Sequenzierung wurde der M13 (-20) Forward Primer und ein M13 (-20) Reverse Primer verwendet. Die zu mutierende HspB5 cDNA lag im Ausgangsvektor pCR2.1TOPO zwischen zwei EcoRI Restriktionsstellen in der Arbeitsgruppe vor. In den pCR2.1-TOPO-Vector ist neben einem Kanamycin Restistenzgen auch ein Ampicillin Resistenzgen integriert, letzteres wurde für die Selektion durch Ampicillin-haltiges Medium verwendet. Die Primer wurden für jede Position spezifisch ausgewählt (Tabelle 2).

2.2.1.1 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

PCR-Ansatz	Lösung von 10 µl Phusion Puffer 5x, 1 µl dNTPs 10mM, 2,5 µl Primer H (Hin) 0,5 µM, 2,5 µl Primer R (Rück) 0,5 µM, 100 pg Template und Phusion Hot Start DNA Polymerase II 2U/µl ad 50 µl HPLC H_2O

Für die Vervielfältigung der cDNA ist die PCR eine grundlegende Methode. Durch das Verwenden von spezifischen Mutageneseprimern (Tabelle 2) konnte an der entsprechenden Position durch Änderung der Basensequenz in der Primärstruktur ein Aminosäureaustausch erzeugt werden. Der PCR-Ansatz wurde initial für 30 sek mit 98 °C denaturiert. Anschließend wurden 25 Zyklen mit den drei Schritten durchgeführt:

1. Denaturierung bei 98 °C für 10 sek
2. Primerhybridisierung bei 65 °C für 30 sek
3. Polymerisation bei 72 °C für 4 min

Finale Elongation für 10 min bei 72 °C.

Abfolge der Mutagenese-Zyklen

Durch den ersten Mutagenese-Zyklus sollte ein Aminosäureaustausch an Position 19 von Serin zu Glutaminsäure erzielt werden. Dafür wurde ein Ansatz mit dem Template pCR2.1TOPO-B5, dem Hinprimer S19E-H und dem Rückprimer S19E-R verwendet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Ansatz des ersten Mutagenese-Zyklus.

	Template DNA	Hinprimer	Rückprimer	Produkt
Ansatz 1	pCR2.1TOPO-B5	S19E-H	S19E-R	pCR2.1TOPO-B5-E/S/S

Für den zweiten Mutagenese-Zyklus wurden zwei Ansätze mit dem Template pCR2.1TOPO-HspB5-E/S/S angelegt (Tabelle 4). Der eine Ansatz wurde mit S45E-H als Hinprimer und S45E-R als Rückprimer angesetzt, der zweite mit S45A-H als Hinprimer und S45A-R als Rückprimer.

Tabelle 4: Ansätze des zweiten Mutagenese-Zyklus.

	Template DNA	Hinprimer	Rückprimer	Produkt
Ansatz 1	pCR2.1TOPO-B5-E/S/S	S45E-H	S45E-R	pCR2.1TOPO-B5-E/E/S
Ansatz 2	pCR2.1TOPO-B5-E/S/S	S45A-H	S45E-R	pCR2.1TOPO-B5-E/A/S

Für den dritten Mutagenese-Zyklus wurden vier Ansätze angelegt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ansätze des dritten Mutagenese-Zyklus.

	Template DNA	Hinprimer	Rückprimer	Produkt
Ansatz 1	pCR2.1TOPO-B5-E/E/S	S59E-H	S59E-R	pCR2.1TOPO-B5-E/E/E
Ansatz 2	pCR2.1TOPO-B5-E/E/S	S59A-H	S59A-R	pCR2.1TOPO-B5-E/E/A
Ansatz 3	pCR2.1TOPO-B5-E/A/S	S59E-H	S59E-R	pCR2.1TOPO-B5-E/A/E
Ansatz 4	pCR2.1TOPO-B5-E/A/S	S59A-H	S59A-R	pCR2.1TOPO-B5-E/A/A

Der Erfolg der PCRs wurde mittels Gelelektrophorese und durch Sequenzierung kontrolliert.

2.2.1.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode um Moleküle ihrer Größe nach aufzutrennen. Die Proben werden durch eine angelegte Spannung durch ein Medium mit definierter Porengröße gezogen. Kleinere Moleküle wandern daher schneller durch das Gel als große Moleküle. DNA ist negativ geladen und wandert im elektrischen Feld somit zur Kathode. Der, dem Agarosegel, zugefügte Farbstoff „RedSafe“ lagert sich in die DNA ein und emittiert unter UV-Licht grüne Fluoreszenz. Auf diese Weise können die DNA-Banden sichtbar gemacht und auf ihre Länge geprüft werden. Für ein 0,8% Agarosegel wurde 0,4 mg Agarose in 50 ml 1x TAE Puffer aufgekocht und gelöst. Dann wurden 1,5 µl RedSafe zugefügt und alles in eine Form gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt, um Taschen in dem Gel zu bilden. Nach dem Abkühlen wurde das festgewordene Agarosegel in der Form in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TAE Puffer bedeckt. Die Taschen wurden jeweils mit 12 µl Probe beladen. Als Skalierung wurden 5 µl einer DNA-Leiter geladen. Eine Spannung von 110 V wurde für 40 min angelegt. Die Kontrolle erfolgte unter UV-Belichtung.

2.2.1.3 Ligation

Ligationsansatz A	Lösung von 5 µl PCR-Produkt, 2 µl Ligationspuffer 10x, 2 µl T4-Ligase ad 20 µl destilliertem H_2O

Durch eine End-zu-End Ligation der linear vorliegenden PCR-Produkte konnte wieder ihre zyklische Vektorform hergestellt werden. Das war notwendig für die Transformation der Plasmide in kompetente Bakterien. Der Ligationsansatz A wurde 3 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der T4-Ligase für 10 min bei 65 °C.

2.2.1.4 Transformation in chemisch kompetente E.coli DH5α

Transformationsansatz	Lösung von 5 µl Ligationsprodukt, 50 µl E.coli DH5α und 450 µl SOC-Medium
LB-Agar-Platten	Lösung von 32 g LB-Agar-Pulver ad 1 l destilliertem H_2O, bei 121 °C für 20 min autoklaviert, Zugabe von 50mg/ml Ampicillin und Guss in 6cm-Platten, Lagerung bei 4 °C

Plasmide können einen Teil des bakteriellen Erbguts bilden, sie liegen ringförmig vor und replizieren sich autonom. Durch das Wachstum von Bakterienkolonien ist es möglich, große Mengen an Plasmid zu gewinnen. Die ligierten PCR-Produkte wurden in kompetente E. coli DH5α transformiert. Dazu wurde der Transformationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde er für 45 sek einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt, anschließend auf Eis gekühlt und 450 µl SOC-Medium zugegeben. Nun folgte eine Inkubation bei 37 °C für 90 min in einem Rüttler bei 850 rpm. Von diesem Transformationsansatz wurden 50 µl auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der restliche Transformationsansatz wurde bei -20 °C eingefroren.

2.2.1.5 Isolation von Plasmiden aus E. coli DH5α

Für die Isolation von Plasmiden wurde das JETSTAR 2.0 Plasmid Purification Kit verwendet. Für die Sequenzkontrolle wurde das MINI Kit verwendet, für das Anlegen eines Plasmidstocks mit einer größeren Menge an Plasmid das MIDI Kit. Die Isolation erfolgte gemäß dem Protokoll der Firma Genomed.

2.2.1.5.1 Präparation von DNA mittels des JETQUICK Plasmid Purification Kit MINI

Über Nacht wurde zunächst eine Bakterienkultur angesetzt. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze etwas von einer Bakterienkolonie entnommen und in 10 ml LB-Medium über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Diese Übernachtkultur wurde bei 4 °C mit 12000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun mit 250 µl Lösung G1, welche RNAse enthält, resuspendiert, bis die Lösung homogen war. Die Lyse erfolgte nach Zugabe von 250 µl Lösung G2 für 5 min, das Lysat wurde dann durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Die Zugabe von 350 µl Lösung G3 neutralisierte den Lysevorgang. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt bis diese homogen war. Anschließend wurde für 10 Minuten bei RT mit 12000 g zentrifugiert. Die JetQuick Säulen wurden in ein Sammelgefäß gesteckt und der Überstand auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden nun für 1 min mit 12000 g zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Als nächstes wurde 500 µl Puffer G4 auf die Säule gegeben und erneut für 1 min mit 12000 g zentrifugiert, im Anschluss wurde das Eluat verworfen. Die Zentrifugation für 1 min mit 12000 g wurde dann mit einem neuen Sammelgefäß wiederholt und das Eluat verworfen. Auf die Säule wurden nun 50 µl auf 65 °C vorgewärmtes H_2O gegeben. Nach 1 min Inkubation bei RT wurde die Säule für 2 min bei 12000 g zentrifugiert. Die Konzentration des Überstands wurde als letzter Schritt mit dem Spektrophotometer bei 260 nm ermittelt. Die Plasmidlösung konnte bei -20 °C gelagert werden.

2.2.1.5.2 Präparation von DNA mittels des JETSTAR Plasmid Purification Kit MIDI

Um größere Mengen Plasmid DNA herzustellen, wurde das JETSTAR Plasmid Purification Kit MIDI verwendet. Die in 250 ml LB-Medium und 250 µl Ampicillin (50 µg/ml) angelegte Übernachtkultur wurde für 15 min bei 4 °C mit 3000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml Lösung E1 resuspendiert, RNA Reste wurden durch die enthaltene RNAse entfernt. Lysiert wurde die Suspension durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 für 5 min. Anschließend wurde das Lysat durch Zugabe von 4 ml Lösung E3 neutralisiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei RT und 14000 g. Der Überstand wurde in equilibrierte JETSTAR Säulen überführt. Nachdem der Überstand durch die Säulen gelaufen war, wurden diese zweimal mit je 10 ml Lösung E5 gewaschen. Anschließend wurde die DNA aus den Säulen mit zweimaligem Durchlauf von 5 ml Lösung E6 eluiert. Das Eluat wurde dann präzipitiert, um die DNA anschließend in H_2O zu lösen. Dazu wurde die DNA durch Zugabe von 3,5 ml 100% Isopropanol ausgefällt und anschließend für 1 h bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl Ethanol resuspendiert und für 5 min bei RT und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 250 µl H_2O über Nacht gelöst und die Konzentration mit dem Spektrophotometer bei 260 nm.

2.2.1.6 Glycerolstock

Für die Lagerung eines Bakterienvorrats wurde 500 µl Medium aus einer Übernachtkultur abgenommen und in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß mit 500 µl Glycerin 60 % gemischt. Nach Kühlung auf -20 °C wurde der Glycerolstock bei -80 °C eingelagert.

2.2.1.7 Bakterienkultur

Für den Ansatz einer Bakterienkultur wurde LB-Medium bei RT mit Ampicillin (50 µg/ml) 1:1000 vorbereitet und mit einer sauberen Pipettenspitze aus dem Glycerolstock oder einer Bakterienkultur beimpft.

2.2.2 Umklonierung der HspB5-Konstrukte in einen lentiviralen Vektor

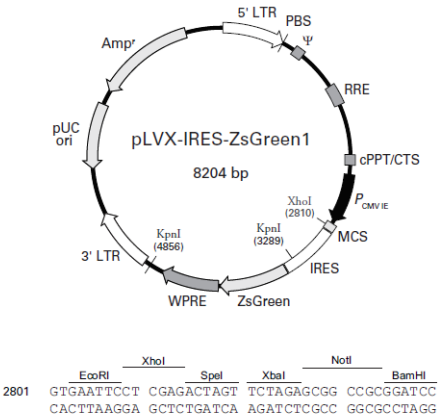

Abbildung 2: pLVX-IRES-ZsGreen 1 Vektor.
bp = base pair, G = Guanin , T = Thymin A = Adenin, C = Cytosin, 5' LTR = 5' long terminal repeat, PBS = primer binding site, Ψ = packaging signal, RRE = Rev-response element, cPPT/CTS = central polypurine tract/central termination sequence, $P_{CMV\ IE}$ = human cytomegalovirus immediate early promoter, MCS = multiple cloning site, IRES = encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site, ZsGreen1 = *Zoanthus sp*. green fluorescent protein, WPRE = woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, 3' LTR =3' long terminal repeat, pUC ori = origin of replication, Amp^r = ampicillin resistance gene; β-lactamase.

Der pLVX-IRES-ZsGreen1-Vektor (Abbildung 2) ist ein lentiviraler Vektor und ermöglicht die Herstellung von Viruspartikeln (siehe 2.3.3), die auf HIV-1 basieren und dadurch in vielen Säugetierzelltypen zur Transduktion verwendet werden können. Der bicistronische Vektor erlaubt die simultane Expression des gewünschten Proteins und eines codon-optimierten „grün fluoreszierendes Protein“ der Koralle Zoanthus sp. (ZsGreen1 Protein). Dadurch ist es möglich, Zellen, die das ZsGreen und das gewünschte Gen exprimieren, unter UV-Licht zu identifizieren. Für die Umklonierung von dem pCR2.1TOPO-Vektor in den pLVX-IRES-ZsGreen-Vektor wurde die gemeinsame EcoRI-Restriktionsstelle verwendet. Zunächst wurden der Zielvektor durch einen Restriktionsverdau linearisiert und anschließend am 5’Ende dephosphoryliert damit kein unerwünschter Ringschluss mehr möglich war. Das Insert wurde durch Restriktion aus dem pCR2.1TOPO-Vektor ausgeschnitten, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, dann aus dem Gel extrahiert und nach Aufreinigung in einem Ansatz mit dem pLVX-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente E. coli DH5α Bakterien transformiert. Die Kontrolle erfolgte über Sequenzierung nach Isolation aus den Bakterien.

2.2.2.1 Restriktion des Vektors pLVX-IRES-ZsGreen1

Restriktionssansatz A	Lösung von 5 µg pLVX-IRES-ZsGreen Vektor, 5 µl EcoRI 10u/ µl und 10 µl EcoRI-Puffer 10x ad 100 µl destilliertem H_2O

Für die Umklonierung in den pLVX-Vektor wurde das Plasmid zunächst durch eine Restriktion an der EcoRI Schnittstelle linearisiert, die sich in der Multiple Cloning Site des Vektors vor der IRES-Stelle befindet. Der Restriktionsansatz A wurde (in einem 0,4 ml Eppendorfgefäß) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Plasmid Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit wie beschrieben in Absatz 3.2.1.5.1.

2.2.2.2 DNA Aufreinigung

Vor der Transformation wurde der obige Restriktionsansatz aufgereinigt und von Pufferresten und Salzen befreit. Für die Aufreinigung wurde das PCR Purification Kit nach Protokoll verwendet. Zu 100 µl DNA-Lösung wurde 400 µl Lösung H1 zugegeben und das Gemisch auf die Säule pipettiert. Nach der Zentrifugation für 1 min bei 12000 g wurde der Überstand verworfen und 500 µl Puffer H2 auf die Säule gegeben. Nach zweimaligem Zentrifugieren für 1 min und 12000 g wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Gefäß gestellt und 50 µl auf 65 °C vorgewärmtes H_2O mittig auf die Säule pipettiert. Nach 1 min bei RT wurde für 2 min mit 12000 g zentrifugiert und so die DNA aus der Säule eluiert.

2.2.2.3 Dephosphorylierung des pLVX-Vektors

Dephosphorylierungsansatz	Lösung von 1,2 µg pLVX-IRES-ZsGreen-Vektor, 2 µl rSAP und 6 µl rSAP-Puffer 10x ad 60 µl destilliertem H_2O

Die Dephosphorylierung des linearen pLVX-IRES-ZsGreen am 5‘-Ende verhindert eine Religation des Vektors. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Insertion der generierten HspB5-cDNA-Fragmente in den pLVX-IRES-ZsGreen-Vektor konnte so erhöht werden. Für die Dephosphorylierung wurde die rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) nach Protokoll verwendet. Der Dephosphorylierungsansatz wurde in einem 0,4 ml Eppendorfgefäß für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend erfolgte die Inaktivierung bei 65 °C für 5 min.

2.2.2.4 Restriktion der pCR2.1TOPO-HspB5-Konstrukte

Restriktionssansatz B	Lösung von 5 µg pCR2.1TOPO-HspB5-Konstrukt, 10 µl EcoRI 10u/ µl und 10 µl EcoRI-Puffer 10x ad 100 µl destilliertem H_2O.

Für die Umklonierung wurde die HspB5-cDNA aus dem pCR2.1TOPO-Vektor ausgeschnitten. Dies erfolgte an den beidseits vorhandenen EcoRI Restriktionsschnittstellen. Die so erhaltenen Inserts wurden mittels Gelelektrophorese aus dem Restriktionsansatz getrennt und aus dem Gel isoliert bevor sie weiterverwendet werden konnten. Die Restriktion wurde mit den generierten HspB5-Konstrukten pCR2.1TOPO-HspB5-E/E/E, pCR2.1TOPO-HspB5-E/E/A, pCR2.1TOPO-HspB5-E/A/E und pCR2.1TOPO-HspB5-E/A/A durchgeführt. Der Restriktionsansatz B wurde in 0,4 ml Eppendorfgefäßen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Auftrennung der cDNA-Fragmente durch Gelelektrophorese in mit RedSafe versetztem 1,5 % Agarosegel für 1 h bei 80 V. Die Banden wurden unter UV-Beleuchtung aus dem Gel ausgeschnitten, die Isolation der DNA erfolgte mit dem JetQuick Gel Extraction Spin Kit.

2.2.2.5 Gelextraktion

Die cDNA wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Bis zu 400 mg Gel konnte pro Gefäß verarbeitet werden. Im ersten Schritt wurde das Agarosegel aufgelöst, dazu wurde 300 µl Lösung L1 pro 100 mg Gel zugegeben und 15 min bei 50 °C inkubiert. Es wurde alle 3 min gevortext bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Dann wurden bis zu 600 µl auf eine Säule gegeben, bei größerem Volumen wurde der Schritt wiederholt. Anschließend wurden 500 µl Lösung L2 auf die Säule aufgetragen und zweimal für 1 min bei 14000 g zentrifugiert. Zuletzt wurden 30 µl auf 70 °C vorgewärmtes H_2O auf die Säule aufgetragen, nach 1 min Inkubation wurde für 2 min mit 14000 g zentrifugiert.

2.2.2.6 Ligation der mutierten HspB5-cDNA in den pLVX-IRES-ZsGreen Vektor

Ligationsansatz B	Lösung von 125 ng pLVX-IRES-ZsGreen-Vektor, 8,5 ng HspB5-Konstrukt Insert, 2 µl T4-Ligase und 2 µl Ligationspuffer 10x ad 20 µl destilliertem H_2O

Für die Ligation wurde ein Verhältnis von 5 Einheiten HspB5-cDNA-Insert zu 1 Einheit Vektor verwendet. Das Ligationsverhältnis 5:1 (Insert : Vektor) wurde gemäß Formel 1 berechnet.

Formel 1: Berechnung der benötigten Insertmenge.

$$ng\ (Insert) = \frac{125\ ng(Vektor)\ \times Insert\ (bp)}{Vektor\ (bp)} = \frac{125\ ng \times 560\ bp}{8200\ bp} = 8{,}5\ ng$$

Der Ligationsansatz B wurde für 3 h bei 22 °C Inkubiert. Die Inaktivierung der Ligationsreaktion erfolgte bei 65 °C für 10 min. Anschließend erfolgte eine Transformation in kompetente E.coli DH5α Bakterien. Aus einzelnen Kolonien wurde eine 10 ml Übernachtkultur angelegt und das Plasmid mit dem JETQUICK Plasmid Purification Kit MINI isoliert. Zunächst wurde eine Kontrollrestriktion mit EcoRI und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt, um sicherzustellen, dass das Plasmid ein Insert von 500 bp enthielt. Nachdem die korrekte Bandengröße festgestellt werden konnte, wurde erfolgreiche Umklonierung durch eine Sequenzierung kontrolliert. Bei erfolgreicher Klonierung wurde ein Bakterienstock angelegt und bei - 80 °C gelagert.

2.2.2.7 Sequenzierung von HspB5-cDNA

Die Sequenzierung wurde jeweils von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg übernommen. Die 15 µl cDNA wurde in einer Konzentration von 100 ng DNA/µl in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß verschickt.

2.3 Zellkulturmethoden

2.3.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien C6-Gliomzellen und LentiX-293T Zellen verwendet (siehe 2.1.7). Nachfolgende Absätze gelten für beide Zelllinien.

2.3.1.1 Auftauen von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei - 173 °C (in flüssigem Stickstoff) gelagert. Es wurde ein Aliquot aus dem Stickstofftank genommen und unter eine Arbeitsbank mit laminarer Strömung gebracht. Unter sterilen Bedingungen wurde eine T25-Zellkulturflasche mit 4 ml und ein Falcon mit 9 ml Zellkulturmedium vorbereitet. Die eingefrorenen Zellen wurden mit 1 ml Zellkulturmedium verdünnt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis alle Zellen im Falcon resuspendiert waren. Anschließend wurden die Zellen 4 min bei 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Suspension wurde dann in die T25-Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C 5 % CO_2 über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 passagiert (siehe 2.3.1.3).

2.3.1.2 Einfrieren von Zellen

Die Zelllinien wurden in Aliquots von 2 Millionen Zellen bei - 173 °C eingefroren. Dafür wurden die bei 37 °C kultivierten Zellen unter sterilen Bedingungen, nach Abnahme des Mediums, einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschschritt wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-Lösung benetzt und 2 min inkubiert bis die Zellen durch leichtes Klopfen mobilisierbar waren. Die Zellen wurden in 9 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium resuspendiert und mit der Neubauerzählkammer gezählt. Dann wurden die Zellen 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um eine entsprechende Zellzahl pro Aliquot zu erreichen, wurde pro 2 Millionen Zellen 700 µl DMEM und 200 µl FCS zugefügt um die Zellen darin zu resuspendieren. In CryoTubes wurde nun 100 µl DMSO vorgelegt und dazu wurde 900 µl Zellsuspension zugefügt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen um 1 °C pro Stunde herunter gekühlt. Dazu wurden die CryoTubes in einem Behälter mit Isopropanol für 24 h bei - 80 °C inkubiert. Anschließend wurden sie in den Stickstofftank überführt, in dem sie bei - 173 °C gelagert wurden.

2.3.1.3 Passagieren von Zellen

Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium von den Zellen abgenommen und verworfen. Für die neue Passage wurden Kulturflaschen mit auf 37 °C vorgewärmtem Zellkulturmedium vorbereitet (5 ml in T25-Flaschen und 15 ml in T75-Flaschen). Die Zellen wurden mit 5 ml auf 37 °C vorgewärmten sterilen PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde 1 ml Trypsin-Lösung in die Kulturflasche gegeben und die Zellen damit benetzt. Inkubiert wurde solange, bis die Zellen durch leichtes Klopfen mobilisiert werden konnten. Für einen Splitt Faktor von 1:20 wurden die Zellen in 9 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Davon wurden 0,5 ml in die vorbereitete T75-Flasche überführt und die Zellen durch vorsichtiges schwenken in dem Medium verteilt.
Die restliche Zellsuspension konnte entweder verworfen werden oder für die Aussaat verwendet werden. Die Zellen wurden alle drei Tage passagiert.

2.3.1.4 Aussaat von Zellen

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Zellzahl und Volumen

Zellen	Anzahl	Volumen	Gefäß	Fläche
C6-Gliomzellen	10 000 Zellen	500 µl	24-Well-Platte	2 cm^2
C6-Gliomzellen	250 000 Zellen	4 ml	6 cm-Platte	28,2 cm^2
HEK-Zellen	250 000 Zellen	4 ml	6 cm-Platte	28,2 cm^2

Für die Durchführung der Versuche mussten die C6-Gliomzellen in einer bestimmten Anzahl auf Deckgläschen bzw. für Proteinanalyse in einer Petrischale ausgesät werden (**Tabelle 6**). Die LentiX-HEK Zellen wurden für die Virusproduktion in 6 cm-Schalen ausgesät. Die C6-Gliomzellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Dazu wurden 13 mm Deckgläschen in eine 24-well Platte gelegt und mit 500 µl Poly-L-Lysin-Lösung (PLL-Lösung) beschichtet. Nach 20 min Inkubation bei 22 °C wurde die PLL-Lösung abgenommen und die Deckgläschen dreimal mit Wasser gewaschen. Die Zellen wurden wie bei der Passage mit PBS gewaschen, 3 min mit 1 ml Trypsin-Lösung inkubiert, mobilisiert und mit 9 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellkonzentration wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Die durchschnittliche Zellzahl der vier Quadranten gibt die Anzahl der Zellen multipliziert mit dem Faktor 10^3 pro ml Medium an. Für die benötigte Zellzahl konnte die Stammlösung nach Zentrifugation für 4 min bei 500 g in entsprechendem Volumen resuspendiert werden. Es wurde so verdünnt, dass die benötigte Zellzahl

in 500 µl Medium vorlag. 500 µl Zellsuspension wurde nun auf die beschichteten Deckgläschen so pipettiert, dass diese vollständig bedeckt waren. Für die Aussaat in 6 cm Schalen wurde die Zellzahl in 4 ml resuspendiert.

2.3.1.5 Transduktion von Ratten C6-Gliomzellen

Für eine Überexpression der HspB5-Konstrukte in C6-Gliomzellen wurde eine Transduktion mit Viruspartikeln durchgeführt, die zur Expression des HspB5-Konstrukts und dem Protein ZsGreen führte (siehe 2.3.3). Es wurden im Folgenden alle acht vorliegenden HspB5-Konstrukte verwendet. Dazu wurden 20000 C6-Gliomzellen auf ein PLL-beschichtetes 13 mm Deckgläschen ausgesät. Die Transduktion erfolgte 24 h später durch Zufügen von 100 µl Virus-Medium, welches Viruspartikel enthielt. Nach weiteren 24 h wurde das Transduktionsmedium durch 500 µl frisches Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen weiter kultiviert.

2.3.1.6 Apoptoseinduktion in C6-Gliomzellen durch Staurosporin

Um in C6-Gliomzellen eine Apoptose zu induzieren, wurde Staurosporin verwendet. C6-Gliomzellen wurden, wie oben beschrieben, in einer 24-Well-Platte ausgesät, nach 24 h mit pLVX-Leervektor, pLVX-HspB5 und den pLVX-HspB5-Konstrukten transduziert und für weitere 24 h inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das Medium durch 500 µl Zellkulturmedium ersetzt, das mit vorgewärmtem Zellkulturmedium und Staurosporin in der gewünschten Konzentration vorbereitet worden war. Es wurden zunächst in einem einmal durchgeführten Vorversuch die verschiedenen Staurosporinkonzentrationen von 50 nM, 100 nM und 200 nM getestet und die Zellen anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Zelldichte und Vitalität beurteilt. Dabei zeigte die Staurosporinkonzentration von 200 nM ein nicht zu dichtes Wachstum und eine erkennbare Apoptoseinduktion. Sie wurde nicht statistisch ausgewertet. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher eine Staurosporinkonzentration von 200 nM verwendet.

2.3.2 Primäre Zellkultur

2.3.2.1 Präparation und Aufbereitung hippocampaler Neurone

Die Sprague-Dawley Ratten wurden von Janvier bezogen. Die Genehmigung zur Organentnahme ist unter der Registernummer O.103-8 einzusehen. Für die Präparation hippocampaler Neurone wurden Rattenembryonen am Embryonaltag E18 oder E19 verwendet. Das Muttertier wurde mit CO_2 narkotisiert und dann dekapitiert. Mit einem medianen Bauchschnitt,

der y-artig in die Inguinalregion erweitert wurde, konnte der abdominelle Situs dargestellt werden. Die Embryonen wurden inklusive dem Uterus entnommen. Die aus ihrer Amnionhülle herauspräparierten Embryonen wurden mit einer Präparierschere dekapitiert und die Capita auf Eis in einer Petrischale bis zur Weiterverwendung gelagert. Als nächstes wurde mit einer Mikroschere die knorpelige Kalotte median von caudal nach rostral eingeschnitten und nach lateral umgeschlagen. Mit einer Pinzette konnte nun das Enzephalon aus der Schädelhöhle in eine Petrischale mit eiskaltem HBSS überführt werden. Unter einem binokularen Mikroskop mit 2-3x Vergrößerung konnten im weiteren Procedere zunächst beide Hemisphären vom Hirnstamm getrennt und anschließend die Hirnhäute entfernt werden. In der medialen Seite der Hemisphäre konnte nun der Hippocampus anhand seiner Lage identifiziert werden. Er bildet eine Aufwerfung zwischen Seitenventrikel und Interhemisphärenspalt. Entlang dieser Aufwerfung konnte der Hippocampus vom restlichen Cortex separiert werden. Die Hippocampi wurden in einem 15 ml Röhrchen mit HBSS auf Eis gesammelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die gesammelten Hippocampi wurden dreimal mit 10 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurde das Medium bis auf 1,8 ml abgenommen und mit 200 µl 2,5 % Trypsinlösung versetzt. Pro Embryo wurden die Hippocampi für eine Zeitspanne von 1 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgten 5 Waschschritte mit jeweils 10 ml HBSS. Das Medium wurde bis auf 1,6 ml abgenommen und mit 400 µl DNAse versetzt. Durch vorsichtige Resuspension mit einer 1 ml Pipette wurde der Zellverband gelöst. Die Zellsuspension wurde nun durch ein 100 µm Sieb gegeben und mit Zellkulturmedium ad 10 ml versetzt. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerzählkammer bestimmt.

2.3.2.2 Kultivierung von hippocampalen Neuronen

Die aufbereiteten hippocampalen Neurone wurden dem Verwendungszweck entsprechend, entweder in 24-Well-Platten auf 13 mm Deckgläschen oder in 6 cm-Schalen kultiviert. Dazu wurden sie in entsprechender Zellzahl auf PLL-beschichtete Platten ausplattiert. Für die Beschichtung wurde 5 mg Poly-L-Lysin in 100 ml HBSS gelöst, die Deckgläschen bzw. Platten wurden damit für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit H_2O gewaschen. Die aufbereiteten Neurone wurden entsprechend Tabelle 7 der Verwendung ausgesät.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Neuronen Zahl und Volumen.

Zellen	Anzahl	Volumen	Gefäß	Fläche	Verwendung
Neurone	30 000 Zellen	500 µl	24-well-Platte	2 cm^2	Stressversuche
Neurone	250 000 Zellen	6 ml	6 cm-Platte	28,2 cm^2	Gewinnung von konditioniertem Medium

Die 24-Well-Platten wurden für die Stressversuche verwendet. Eine entsprechende Anzahl an 6 cm-Schalen wurde parallel ausgesät um konditioniertes Medium zu gewinnen, das für den Mediumwechsel benötigt wird. Nach 2 h erfolgte der Mediumwechsel von Zellkulturmedium auf Neurobasalmedium.

2.3.2.3 Transduktion von kultivierten hippocampalen Neuronen

Für die Überexpression von HspB5 und allen vorliegenden HspB5-Konstrukten wurden an DIV 7 unter sterilen Bedingungen die Lentiviren zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend jeweils 200 µl auf die Zellen gegeben. An DIV 8 erfolgte ein Mediumwechsel, dazu wurde das virushaltige Medium abgenommen und durch 500 µl konditioniertes Medium ersetzt.

2.3.2.4 Induktion von Zellstress durch Hitzeschock

Für die Induktion eines Zellstresses wurden die Neurone einem Hitzeschock ausgesetzt. Dazu wurde Wasser in einem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur erhitzt. In das Wasserbad wurde ein Reagenzglasständer so hineingestellt, dass eine 24-Well-Platte in halber Höhe im Wasser steht. Die kultivierten Neurone wurden aus dem 37 °C Brutschrank genommen, mit Parafilm abgedichtet und für 30 min in das Wasserbad gestellt. Anschließend wurden sie bei 37 °C weiter inkubiert. Der ganze Ablauf fand unter S2-Laborstandard statt.

2.3.3 Herstellung von Lentiviren

Für die Produktion von Viruspartikeln wurde das Lenti-X™ Lentiviral Expression System der Firma Clonetech Laboratorys verwendet. In diesem System werden HEK293T LentiX Zellen mit den drei Vektoren transfiziert, die zur Virusherstellung benötigt werden. Der pMD2-Vekor codiert für die Envelope-Proteine, welche die Virushülle bilden und auf dem psPAX2-Vektor sind Informationen die Packaging-Proteine enthalten. Der pLVX-IRES-ZsGreen- Vektor enthält das für die Virusbildung notwendige Ψ Startsignal, das von den

Packaging und Envelope Proteinen erkannt wird. Sie lagern sich um den pLVX-Vektor zu einem Viruspartikel zusammen, der später aus der Zelle in das Medium ausgeschleust wird. Das so gebildete Viruspartikel enthält nun auf dem bicistronischen pLVX-IRES-ZsGreen-Vektor neben der cDNA des ZsGreen Proteins auch die des gewünschten Proteins. Die lentivirale Eigenschaft befähigt die Viruspartikel nahezu jede Zelle zu infizieren und die cDNA einzuschleusen, so dass es zur Expression des gewünschten Proteins kommt.

2.3.3.1 Transfektion der HEK293T LentiX Zellen

Transfektionsansatz	Lösung von 8 µg pLVX-IRES-ZsGreen-Vektor-DNA, 5,5 µg psPAX2-Vektor, 2 µg pMD2-Vektor und 100 µl PEI in 400 µl OptiMEM

Am Tag vor der Transfektion wurden jeweils 5 Mio. Zellen der HEK293T-LentiX Zelllinie in 6 cm-Schalen ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Konfluenz der Zellen sollte am Tag der Transfektion etwa 90 % betragen. Für jeden Virus mit seiner entsprechenden in den pLVX-Vektor integrierten cDNA wurde eine eigene Schale mit Transfektionsansatz in einem 2 ml Eppendorfgefäß gemischt und 10 min bei 22 °C inkubiert. Unter sterilen Bedingungen und S2-Sicherheitsstandard wurde zunächst 3,5 ml Medium von den HEK293T-LentiX Zellen abgenommen, anschließend wurde tropfenweise der Transfektionsansatz zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium verworfen und durch 8 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt. Nach 24 h Inkubation hat sich das Medium mit ausreichend Viruspartikeln angereichert und kann, nach Zentrifugation mit 300 g für 3 Minuten und Filtration durch einen 45 µm-Filter, in 400 µl Aliquots bei -80 °C gelagert werden.

2.3.3.2 RNA Isolation

Für die RNA Isolation aus dem virushaltigen Medium wurde, für eine spätere Titerbestimmung das NucleoSpin RNAVirus Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die Isolation fand gemäß dem Herstellerprotokoll statt. Zunächst wurden 150 µl virushaltiges Medium mit 350 µl Carrier-RNA enthaltendem Lysepuffer für 5 min bei 70 °C inkubiert. Dadurch wurden die Viruspartikel lysiert und vorhandene RNAsen inaktiviert. Dann wurden 600 µl 100 %-Ethanol zugegeben und gemischt. 600 µl der Lösung wurden nun auf eine NucleoSpin Säule gegeben und bei 12000 g für 1 min zentrifugiert, dieser Schritt wurde mit der restlichen Lösung wiederholt. Drei Waschschritte mit dem Puffer RA3 und die Elution der RNA mit

50 µl vorgewärmten RNAse freiem H_2O erfolgten jeweils bei 12000 g für 1 min. Die isolierte RNA wurde bei - 20 °C gelagert.

2.3.3.3 Virentiterbestimmung mittels qRT-PCR

DNAse-Ansatz	Lösung von 12,5 µl Virus-RNA, 2,5 µl DNAseI-Puffer, 4 µl DNAseI 5U/µl in 6 µl RNAse-freies H_2O
qRT-PCR-Ansatz	Lösung von 2 µl RNA-Template, 8,5 µl RNAse-freies H_2O, 12,5 µl Quant-X-Puffer 2x, 0,5 µl LentiX-Fwd Primer, 0,5 µl LentiX-Rev Primer, 0,5 µl Quant-X-Enzym und 0,5 µl RT-Enzyme-Mix, Kühlung auf Eis

Die quantitative real time-PCR (qRT-PCR) basiert auf den Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit dem Zusatz, dass die Menge der amplifizierten DNA bestimmt werden kann. Dazu wird sich SYBR Green1, ein fluoreszierender Marker genutzt, der sich an die DNA anlagert. Während der PCR kann die Intensität der Fluoreszenz gemessen werden. Sie nimmt proportional mit der Menge der synthetisierten DNA zu. Als Referenzwert setzt man eine Verdünnungsreihe mit bekannter RNA Menge ein. Aus diesem Referenzwert lässt sich die absolute Menge an RNA-Kopien berechnen. Für die Bestimmung des Virentiters wurde das qRT-PCR Kit nach Herstellerprotokoll verwendet. Reste von DNA im Medium wurde durch eine Inkubation mit DNAseI aus den Proben entfernt. Dazu wurde die isolierte RNA auf Eis aufgetaut und 12,5 µl mit dem DNAse-Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte bei 70 °C für 5 min. Im nächsten Schritt wurden 2 µl dieses RNA-Templates mit dem qRT-PCR-Ansatz vorbereitet. Für die qRT-PCR im LightCycler wurden Verdünnungsreihen vorbereitet. Eine Standard-Verdünnungsreihe wurde mit 2 µl der RNA-Stammlösung und 18 µl EasyDilution-Puffer und weiteren drei Verdünnungsschritten in den Verhältnissen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 angesetzt. Die RNA-Proben wurden ebenfalls mit EasyDilution Puffer verdünnt. Dazu wurden 2 µl RNA-Probe und 18 µl EasyDilution Puffer angesetzt (= 1:10) und zusätzlich 1:10 und 1:100 verdünnt. Mit diesen drei RNA-Ansätzen und der Standard-Verdünnungsreihe wurde die qRT-PCR in dem LightCycler gemäß folgendem Protokoll durchgeführt:

Reverse Transskription:	42 °C, 5 min
	95 °C, 10 min
qPCR (40 Zyklen):	95 °C, 5 sek

	60 °C, 30 sek
Schmelzkurve:	95 °C, 15 sek,
	60 °C, 30 sek
Kontinuierlich:	60 - 95 °C

2.4 Immunzytochemie

Fixierlösung (4 % Formaldehyd)	Lösung von 4 ml Formaldehyd (10% in destilliertem H_2O gelöst) mit 2 ml Succrose (50% in PBS gelöst) und 4 ml PBS bei 4°C gelagert
Permeabilisierungslösung	Mischung von 0,1% Triton-X-100 und 0,1% Natriumcitrat in PBS
Blockierlösung	Lösung von 3% BSA und 1 % NGS in PBS
Eindeckmedium	Lösung von 10 g Mowiol 4.88, 1 g n-Propyl-Gallat in 39 ml PBS, danach 20 ml Glycerin dazu geben und über Nacht bei RT rühren lassen Zentrifugation für 30 min

Tabelle 8: Antikörper Immunzytochemie. IgG = Immunglobulin G, AK = Antikörper,

1. AK (1:200)	2. AK (1:900)	Zellart
Kaninchen anti-HspB5 IgG	Ziege anti-Kaninchen IgG-AlexaFluor568	C6-Gliomzellen und Neurone
Maus anti-MAP-2 IgG	Ziege anti-Maus IgG-AlexaFluor568	Neurone

Für die immunzytochemische Untersuchung wurde aus den kultivierten 24-Well-Platten das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Fixierlösung bedeckt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Soweit erforderlich wurde bis zum Ende der Fixierung unter S2-Laborbedingungen gearbeitet. Nach der Fixierung erfolgten drei Waschschritte mit PBS. Dann wurden die Zellen mit Permeabilisierungslösung bedeckt und 10 min bei 22 °C inkubiert. Es folgten weitere 3 Waschschritte mit PBS. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden nun ein eine feuchte Kammer überführt und mit jeweils 30 µl Blockierungslösung für 1 h bei 22 °C abgedunkelt blockiert. Die Primärantikörperlösungen wurden je nach Zellart (**Tabelle 8**) vorbereitet, indem sie mit Blockierungslösung im

Verhältnis 1:200 verdünnt wurden. Im nächsten Schritt wurden die Deckgläschen mit 30 µl Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten drei Waschschritte mit PBS für jeweils 15 min. Die Verdünnung der Sekundärantikörper in Blockierungslösung erfolgte je nach Zellart (**Tabelle 8**) im Verhältnis 1:900. Anschließend wurden die Zellen mit 30 µl Sekundärantikörper abgedunkelt in der Feuchtekammer für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten erneut drei Waschschritte von jeweils 15 min mit PBS. Die Deckgläser wurden im letzten Schritt einmal in demineralisiertes Wasser getaucht und dann mit 2 µl Mowiol eingedeckt. Gelagert wurden die Objektträger abgedunkelt bei 4 °C.

2.4.1 TUNEL-Reaktion

Für die Differenzierung zwischen lebendigen und apoptotischen Zellen ist die TUNEL-Reaktion eine etablierte Methode. Bei diesem sogenannten TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) werden in einer enzymatischen Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotide an freie 3‘-OH-Enden von DNA Strangbrüchen polymerisiert. Apoptotische Zellkerne können mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Exzitationswellenlänge von 540 ± 20 nm anhand ihrer roten Fluoreszenz (max. 580 nm) detektiert werden. Nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin (siehe 2.4.1.6) wurden, vor der immunzytochemischen Markierung gemäß dem Herstellerprotokoll die apoptotischen Zellkerne mit der TUNEL-Reaktion markiert. Dazu wurde zunächst das Medium der 24-Well-Platten entfernt und bis zur Permeabilisierung die gleichen Schritte durchgeführt wie in 2.5.1. Für eine Negativkontrolle wurden 100 µl der Färbelösung ohne Enzymlösung separiert und die verbliebenen 450 µl im Verhältnis 1:10 mit der Enzymlösung zum Reaktionsmix gemischt. Nach der Permeabilisierung wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend auf mindestens 30 µl Reaktionsmix in eine feuchte Kammer überführt. Eine Negativkontrolle wurde mit 30 µl Färbelösung angelegt. Ein zuvor mit DNAseI behandeltes Deckgläschen wurde als positiv Kontrolle verwendet. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 37 °C in der abgedunkelten Feuchtekammer. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss an die TUNEL-Reaktion fand, wie oben beschrieben, die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht statt. Am nächsten Tag, nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper, das Eindecken mit Mowiol und DAPI.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Lämmli-Probenpuffer 3x	Lösung von 0,454 g Tris und 1,2 g SDS in deionisiertem Wasser lösen, dann pH-Wert-Einstellung auf 6,9 durch Titration mit HCl, dann Zugabe und Lösung von 7,56 g Glycerin, 0,03 g DTT und 400 µl Bromphenolblau (10 mg/ml) in 20 ml destilliertem Wasser

Für verschiedene Versuchszwecke wurden Zelllysate verwendet. Dazu erfolgte die Aussaat von 250 000 C6-Gliomzellen in einer 6 cm Petrischale. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann wurde 200 µl Lämmli-Probenpuffer dazugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gelagert. Eine Denaturierung der Proben erfolgte im Heizblock bei 95 °C für 5 min und 850 rpm. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mittels Ultraschall für 10 sek im Intervall bis sich die Probe verflüssigt hatte. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben stets auf Eis gelagert. In den Lysaten wurde zunächst die Proteinkonzentration bestimmt, bevor sie zur Western-Blot Analyse verwendet oder bei - 20 °C gelagert wurden.

2.5.2 Amidoschwarzfärbung zur Proteinmengenbestimmung

Färbelösung	Lösung von 2,5 g Amidoschwarz, 225 ml Methanol, 50 ml Ethansäure in destilliertem H_2O auf ein Volumen von500 ml
Entfärber (frisch)	Lösung von 237,5 ml Methanol und 25 ml Ethansäure in destilliertem H_2O auf ein Volumen von 500 ml
Auflöse-Lösung	Lösung von 8 ml Methansäure, 1 ml Ethansäure und 1 g Trichloressigsäure

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe ist für die Vergleichbarkeit in der Western-Blot Analyse notwendig. Mit der Amidoschwarzfärbung ist die Konzentrationsbestimmung von SDS-haltigen Proben möglich. Ein Protein-Standard erlaubt eine spätere Berechnung der Proteinkonzentration. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe verwendet mit folgenden, in Probenpuffer angesetzten BSA-Konzentrationen: 4 µg/µl, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5

µg/ml, 0,2 µg/ml und 0 µg/ml. Die Zelllysate und die Protein-Standards wurden in Duplikaten von je 5 µl auf eine Celluloseacetat-Membran aufgetragen und luftgetrocknet, bevor sie für 10 min bei RT in der Färbelösung, unter Rotation zur gleichmäßigen Verteilung, inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Entfärbung, ebenfalls in Rotation mit der Entfärbelösung, durch dreimaliges waschen für 10 min bei RT. Nach erneuter Lufttrocknung, wurden die Membranstücke mit den einzelnen Proben in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach Zugabe von 950 µl Auflöselösung pro Probe wurde für 30 min bei 50 °C und 1000 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Durch diesen Vorgang löste sich die die Celluloseacetat-Membran auf und es blieb eine Lösung zurück, die mit steigender Proteinkonzentration einen dunkleren Farbton hatte. Er konnte mittels ELISA ausgewertet werden. Dazu wurden die 200 µl Proben in eine 96-well Platte überführt und die Absorption photometrisch bestimmt. Aus den Proteinstandards wurde eine Standardkurve ermittelt, anhand derer eine Konzentrationsbestimmung der Proteinproben erfolge konnte.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Elektrophorese Puffer 5x	Lösung von 5 g SDS, 72 g Glycin und 15 g Tris ad 1 l destilliertem H_2O, Lagerung bei 4°C.
Sammelgel 5%	Lösung von 500 µl Acrylamid (30%), 30 µl SDS (10%), 380 µl Tris 1,5M (pH 6,8), 30 µl APS und 3 µl TEMED ad 3 ml destilliertem H_2O.
Trenngel 15 %	Lösung von 5 ml Acrylamid (30%), 100 µl SDS (10%), 2,5 ml Tris 1,5M (pH 8,8), 100 µl APS und 10 µl TEMED ad 10 ml destilliertem H_2O.

Die Polyacrylamid-Gelektrophorese ist ein Verfahren, in dem Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Denaturierte Proteine werden durch zugefügtes SDS negativ geladen. Deswegen werden sie in einem elektrischen Feld von der Kathode angezogen. Kleine Proteine wandern bei einer Gelelektrophorese entlang des Spannungsgradienten schneller durch das Gel als größere. Sie sind somit im Gel weiter vom Startpunkt entfernt detektierbar. Zunächst wurde eine Glasplatte vor eine entsprechende Spacerplatte gespannt und dazwischen das Trenngel in den 1,2 mm weiten Spalt gegossen. Nach dem Festwerden, wurde das Sammelgel, mit einem Platzhalter für die Probenkammern, auf das Trenngel zwischen die

beiden Platten gegossen. Die Elektrophoresekammer mit dem Gel wurde nun mit Elektrophorese-Puffer bedeckt. Nach Ladung der Proben mit gleichmäßiger Proteinmenge von 30 µg je Tasche, wurde eine Spannung von 90 V für 20 min angelegt, um die Proben zunächst im Gel zu sammeln. Danach folgte die Auftrennung bei 150 V für 1 h. Der Gesamtvorgang fand bei einer Temperatur von 4 °C statt.

2.5.4 Western-Blot Analyse

Blotpuffer	Lösung von 3,03 g Tris, 14,64 g Glycin, 1 g SDS, 200 ml Methanol ad 1 l destilliertem H_2O.
Ponceau-S-Lösung	Lösung von 0,5 g Ponceau-S und 3 g Trichloressigsäure in 100 ml destilliertem H_2O

Mit einem Western-Blot lassen sich aufgetrennte Proteine aus dem Gel der Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf eine Nitrocelluloseacetatmembran transferieren. Im Anschluss kann mittels Immunmarkierung eine spezifische Proteindetektion durchgeführt werden. Entlang eines elektrischen Spannungsgradienten werden die negativ geladenen Proteine aus dem Gel von der Kathode angezogen und somit auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde eine passende Nitrocellulose Membran auf ein Filterpapier gelegt und mit Blotpuffer angefeuchtet. Auf die vorbereitete Nitrocellulosemembran wurde nun das Trenngel der Polyacrylamid-Gelelekrophorese gelegt und mit Blotpuffer bedeckt. Störende Luftblasen zwischen Gel und Membran wurden entfernt. Nach Auflage eines zweiten Filterpapiers wurde der gesamte Stapel noch einmal mit Blotpuffer getränkt, dann in die Blotkammer eingespannt und mit Blotpuffer bedeckt. Der Blot erfolgte nun bei 100 V für 90 min bei 4 °C. Anschließend wurde mit einer Ponceau-S-Lösung die Nitrocellulosemembran für 2 min unter leichter Rotation angefärbt. Es folgten 3 Waschschritten mit PBS. Danach konnte, an den nun sichtbaren Proteinbanden, der erfolgreiche Transfer der aufgetrennten Proteinproben auf die Membran kontrolliert werden.

2.5.5 Proteindetektion

Tabelle 9: Antikörper Proteindetektion

1.AK	Verdünnung	2. AK (1:10000)	Blockierlösung in TBST	Belichtungszeit
HspB5	1:2500	rb-pox	Milch 1 %	10 min
GAPDH	1:10000	rb-pox	Milch 2,5 %	1 min

Die Proteindetektion erfolgte mittels Immunmarkierung mit einem spezifischen Primärantikörper. Der nächste Schritt war die Markierung des Primärantikörpers (1.AK) mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper (2.AK) (Tabelle 9). Das Konjugat ist die Meerrettichperoxidase (pox) diee die Chemolumineszenzreaktion des verwendeten Luminols in der ECL-Lösung katalysiert. Bei dieser chemischen Reaktion wird elektromagnetische Strahlung im sichtbaren Bereich emittiert. Wird damit ein Film belichtet und entwickelt, so kann das markierte Protein einheitlich auf der Nitrocellulosemembran detektiert werden. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran zunächst in Blockierlösung (Tabelle 9) für 30 min unter Rotation bei RT blockiert. Der Primärantikörper wurde durch Verdünnung in der Blockierlösung vorbereitet. Die Membran wurde nun mit dem vorbereiteten Primärantikörper in eine Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST über einen Zeitraum von 1 h erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT unter Rotation. Dazu wurde der Sekundärantikörper in neuer Folie mit der Blockierlösung verdünnt. Es erfolgten erneut drei Waschschritte für insgesamt eine Stunde mit TBST. Die Membran wurde nun mit einem Film in eine Belichtungsbox gelegt und mit ECL1 und ECL2 im Verhältnis 1:1 bedeckt. Dann wurde der Film belichtet und anschließend entwickelt.

2.6 Datenerhebung und Analyse

2.6.1 Quantitative Analyse der Apoptose in C6-Zellen

Für die Analyse der Apoptoseinduktion durch Staurosporin in C6-Gliomzellen wurden mit der TUNEL-Methode apoptotische Zellkerne markiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden von jedem der drei unabhängigen Versuche mit AxioVision, 5 Aufnahmen pro Versuchsbedingung gemacht. Auf jedem dieser Bilder waren etwa 200 bis 300 Zellen abgebildet. Apoptotische Zellkerne konnten an ihrem roten Signal identifiziert und gezählt werden. Die Anzahl an apoptotischen Kernen wurde ins Verhältnis zu der Gesamtzellzahl gesetzt.

2.6.2 Charakterisierung der Neuronenmorphologie mittels Sholl-Analyse

Um den Dendritenbaum von kultivierten Neuronen zu analysieren eignet sich die Sholl-Analyse, in der die Schnittpunkte der Dendriten mit konzentrischen Ringen in verschiedener Entfernung um das Perikaryon ausgezählt werden. Dazu wurden hippocampale Neurone an DIV 16 fixiert und der Dendritenbaum mittels MAP-2 Immunmarkierung dargestellt. Dann erfolgte die Verblindung der einzelnen Versuchsbedingungen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden Bilder von möglichst einzeln liegenden Neuronen mit AxioVision 4.9 aufgenommen und in das jpeg-Format exportiert werden. Diese Bilder wurden unter eine Schablone mit 11 konzentrischen Ringen gelegt. Der kleinste Sholl-Ring hatte den Radius, der maßstabsgetreu einem Abstand von 15 µm zum Zellsoma des Neurons entsprach. Mit jedem weiteren Ring vergrößerte sich der Abstand um 15µm, sodass der Dendritenbaum in dem Bereich von 15 - 165 µm um das Zellsoma untersucht werden konnte. Dazu wurden für jedes Neuron die Schnittpunkte der Dendriten mit den Sholl-Ringen gezählt und dargestellt. Die Anzahl der Schnittpunkte steht in Korrelation zum Verzweigungsgrad des Dendritenbaums. Es wurden 10 mit dem Leervektor transduzierte Neurone ohne Hitzeschock und 10 mit dem Leervektor bzw. HspB5 transduzierte Neurone mit Hitzeschock und 15 Neurone, die mit den 8 HspB5-Konstrukten transduziert wurden mit Hitzeschock, in drei unabhängigen Versuchen ausgezählt.

2.6.3 Statistik

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und dem Standardfehler des Mittelwertes. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem nicht parametrischen Mann-U-Whitney-White Test durchgeführt. Mit ihm können die Tendenzen von zwei unabhängigen Stichproben auf Signifikanz getestet werden. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Phosphorylierung von HspB5 auf dessen anti-apoptotische Funktion und dessen Bedeutung bei der Regulation der Komplexität des Dendritenbaums in Neuronen untersucht werden. Dazu wurden die Phosphorylierungsstellen von HspB5, Serin 19, 45 und 59, so mutiert, dass diese nicht phosphorylierbar waren oder eine Phosphorylierung simulierten.

3.1 Mutagenese von HspB5

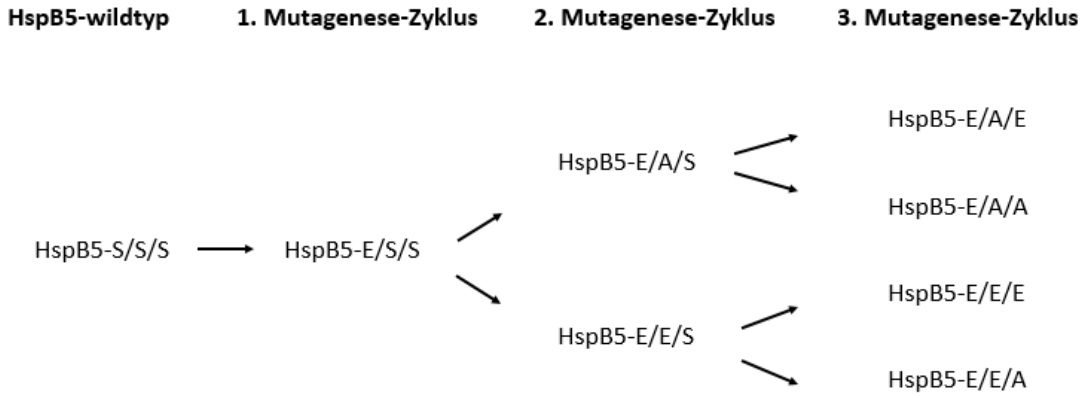

Abbildung 3: Abfolge der einzelnen Mutagenese-Zyklen. Die HspB5-wildtyp cDNA (HspB5-S/S/S) wurde in drei Mutagenese-Zyklen nacheinander an den Aminosäuren Serin (S) 19, 45 und 59 durch Glutaminsäure (E) bzw. Alanin (A) ersetzt. Dabei entspricht jeder Zyklus einer Polymerasekettenreaktion bei der durch entsprechende Primer die Punktmutation erzeugt wurde. Als Template diente jeweils das Produkt des vorhergehenden Zyklus bzw. die HspB5-wildtyp cDNA als Ausgangsform.

Ein etabliertes Modell zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Phosphorylierung von Proteinen ist der Austausch von Serin durch Alanin (A). Damit wird durch das Fehlen der Hydroxylgruppe eine Phosphorylierung unmöglich gemacht. Der pseudophosphorylierte Zustand wird durch den Austausch von Serin mit Glutaminsäure (E) erreicht, denn die negative Ladung an der Carboxylgruppe imitiert die Phosphorylierung des Serins. Um eine eventuell unterschiedliche Bedeutung der einzelnen drei Phosphorylierungsstellen untersuchen zu können, wurden Mutanten hergestellt, die genau eine Phosphorylierung, genau zwei Phosphorylierungen, genau drei oder gar keine Phosphorylierung simulierten. Insgesamt ergaben sich dadurch acht verschiedene Konstrukte. Die HspB5-Konstrukte HspB5-A/A/A, HspB5-A/E/A, HspB5-A/A/E und HspB5-A/E/E lagen der Arbeitsgruppe bereits in geeigneter Form vor. Die Konstrukte HspB5-E/E/E, HspB5-E/E/A, HspB5-E/A/E und HspB5-E/A/A wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert (**Abbildung 3**). Die dazu verwendete HspB5 cDNA lag in der Arbeitsgruppe (AG Golenhofen) im pCR2.1TOPO-Vektor vor.

Um einen gezielten Austausch der Aminosäure Serin in der HspB5 Primärstrukur an den Positionen 19, 45 und 59 zu erreichen, wurde das Phusion site-directed Mutagenesis Kit der Firma ThermoScientific verwendet. Es wurden entsprechende Primerpaare entworfen und bei MWG Operon synthetisiert, für Sequenzen der Primer, siehe Methodenteil. Durch insgesamt sieben Mutagenesen in drei Zyklen konnten die vier an je drei Stellen mutierten Konstrukte hergestellt werden.

Beim ersten Mutagenese-Zyklus wurde an Position 19 das Serin durch Glutaminsäure ausgetauscht. Die Amplifikation des Mutageneseprodukts wurde zunächst durch Gelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 4 A). Es zeigte sich eine Bande auf der zu erwartenden Höhe bei 4500 bp. Im nächsten Schritt wurde das Amplifikat mit dem pCR2.1TOPO Vector ligiert und in chemokompetente E. coli DH5α transformiert. Aus einzelnen Bakterienkolonien wurde das Plasmid pCR2.1TOPO-HspB5-E/S/S extrahiert, aufgereinigt und zur Sequenzkontrolle sequenziert. Tabelle 10 zeigt die erfolgreiche Mutation des Codons TCC zu GAG, woraus der gewünschte Aminosäureaustausch resultiert. Der zweite Mutagenese-Zyklus ersetzte das Serin an Position 45 mit Glutaminsäure oder Alanin. Es wurden das Template pCR2.1TOPO-HspB5-E/S/S sowie entsprechende Primer verwendet. Die Aufarbeitung bis zur Sequenzkontrolle erfolgte analog dem ersten Zyklus. Abbildung 4 B zeigt die korrekte Höhe der Banden der Mutageneseprodukte auf Höhe von 4500 bp. Die Produkte pCR2.1TOPO-B5 E/E/S und pCR2.1TOPO-B5 E/A/S wurden in der Sequenzierung bestätigt (

Tabelle *11*). Der dritte Mutagenese-Zyklus ersetzte das Serin an Position 59 mit Glutaminsäure und Alanin, als Template wurde pCR2.1TOPO-HspB5-E/E/S und pCR2.1TOPO-HspB5-E/A/S verwendet. Entsprechende Primer wurden eingesetzt. Die Aufarbeitung bis zur Sequenzkontrolle erfolgte analog dem ersten Zyklus. Abbildung 4 C zeigt die Banden der Mutageneseprodukte auf der korrekten Höhe von 4500 bp.

Die Endprodukte pCR2.1TOPO-B5-E/E/E, pCR2.1TOPO-B5-E/E/A, pCR2.1TOPO-B5-E/A/E und pCR2.1TOPO-B5-E/A/A wurden in der Sequenzanalyse bestätigt (siehe Tabelle 12). Alle vier für die folgenden Experimente benötigten Konstrukte konnten somit erfolgreich hergestellt werden.

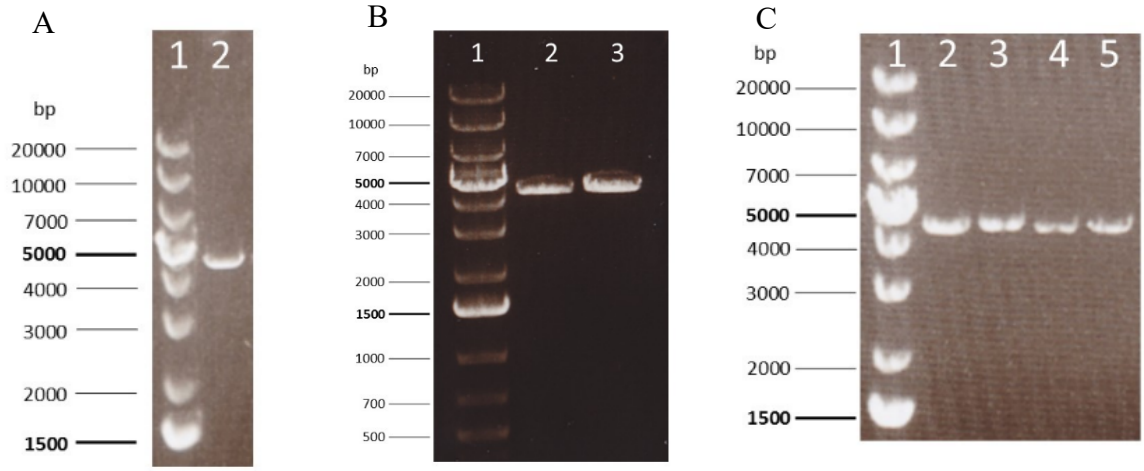

Abbildung 4: Kontrolle der PCR durch Gelelektrophorese. **A 1. Mutagenese-Zyklus** Spur 1: DNA-Leiter, Spur 2: Erfolgreiche Amplifikation des PCR Ansatz mit einer Höhe der Bande von ca. 4500 bp. **B 2. Mutagenese-Zyklus** Spur 1: DNA-Leiter, Spur 2: erfolgreiche Amplifikation des Produkts pCR2.1TOPO-B5 E/E/S und Spur 3: erfolgreiche Amplifikation des pCR2.1TOPO-B5-E/A/S PCR Ansatzes mit einer Höhe der Bande von ca. 4500 bp. **C 3. Mutagenese-Zyklus** Spur 1: DNA-Leiter, Die erfolgreiche Amplifikation der PCR Ansätze ist gezeigt in Spur 2 pCR2.1TOPO-B5 E/E/E, Spur 3 pCR2.1TOPO-B5 E/E/A, Spur 4 pCR2.1TOPO-B5 E/A/E und Spur 5 pCR2.1TOPO-B5 E/A/A. Die jeweilige Bande ist auf einer Höhe von ca. 4500 bp erkennbar. Detektion der fluoreszierenden DNA unter UV-Beleuchtung. bp = basepairs

Tabelle 10: Aminosäureaustausch an Codon 19 in der Sequenzkontrolle. In der ersten Zeile grau hinterlegt ist die Nummerierung der Codons der HspB5 cDNA Sequenz, welche in der zweiten Zeile aufgeführt ist. Die Aminosäure ist in der dritten Zeile dargestellt. Die vierte Zeile zeigt das Ergebnis der Sequenzierung des PCR-Produktes des ersten Mutagenese-Zyklus. Rot markiert ist das Codon 19, welches durch die Mutagenese die Sequenz GAG zeigt und sich somit die Aminosäuresequenz von Serin (S) zu Glutaminsäure (E) geändert hat. cDNA = copyDNA, F = Phenylalanin, G = Glycin, P = Prolin, L = Leucin, A = Alanin, W = Tryptophan, I = Isoleucin.

Codon	17	18	19	20	21	[...]	43	44	45	46	47	[...]	57	58	59	60	61
cDNA Sequenz HspB5	TTC	CAC	TCC	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	AGC	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	AGC	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5	F	G	S	P	S	[...]	S	L	S	P	F	[...]	A	P	S	W	I
cDNA Sequenz HspB5-E/S/S	TTC	CAC	**GAG**	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	AGC	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	AGC	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5-E/S/S	F	G	**E**	P	S	[...]	S	L	S	P	F	[...]	A	P	S	W	I

Tabelle 11: Aminosäureaustausch an Codon 45 in der Sequenzkontrolle des 2.Zyklus In der ersten Zeile grau hinterlegt ist die Nummerierung der Codons der HspB5 cDNA Sequenz, welche mit der entsprechenden Aminosäure Sequenz in der dritten Zeile aufgeführt ist. Die Zeile 4 zeigt an Codon 45 die Mutagenese von AGC zu GAG (rot), welche zu einem Einbau von Glutaminsäure (E) führt. In den Zeilen 6 ist die erfolgreiche Mutagenese des zweiten PCR-Ansatz von AGC zu GCC (rot) zu erkennen, welche zu einem Einbau von Alanin (A) anstelle des Serin (S) in Codon 45 führte. cDNA = copyDNA, F = Phenylalanin, G = Glycin, P = Prolin, L = Leucin, W = Tryptophan, I = Isoleucin.

Codon	17	18	19	20	21	[...]	43	44	45	46	47	[...]	57	58	59	60	61
cDNA Sequenz HspB5	TTC	CAC	TCC	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	AGC	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	AGC	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5	F	G	S	P	S	[...]	S	L	S	P	F	[...]	A	P	S	W	I
cDNA Sequenz HspB5-E/E/S	TTC	CAC	**GAG**	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	**GAG**	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	AGC	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5-E/E/S	F	G	**E**	P	S	[...]	S	L	**E**	P	F	[...]	A	P	S	W	I
cDNA Sequenz HspB5-E/A/S	TTC	CAC	**GAG**	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	**GCC**	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	AGC	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5-E/A/S	F	G	**E**	P	S	[...]	S	L	**A**	P	F	[...]	A	P	S	W	I

Tabelle 12: Aminosäureaustausch an Codon 59 in der Sequenzkontrolle des 3.Zyklus In der ersten Zeile grau hinterlegt ist die Nummerierung der Codons der HspB5 cDNA Sequenz, welche mit der entsprechenden Aminosäure Sequenz in der dritten Zeile aufgeführt ist. Die Spalte des Codon 59 zeigt die erfolgreiche Mutagenese des 3. Mutagenese-Zyklus in rot markiert. Die cDNA Sequenz in Zeile 4 und 8 von HspB5-E/E/E und HspB5-E/A/E zeigt die Mutagenese des Codon 59 von AGC zu GAG (rot) und somit einen Einbau von Glutaminsäure (E). Die cDNA Sequenz in der Zeile 6 und 10 von HspB5-E/E/A und HspB5-E/A/A zeigt die Mutagenese des Codon 59 von AGC zu GCC (rot) und den dadurch resultierenden Einbau von Alanin (A). cDNA = copyDNA, F = Phenylalanin, G = Glycin, P = Prolin, L = Leucin, W = Tryptophan, I = Isoleucin.

Codon	17	18	19	20	21	[...]	43	44	45	46	47	[...]	57	58	59	60	61
cDNA Sequenz HspB5	TTC	CAC	TCC	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	AGC	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	AGC	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5	F	G	S	P	S	[...]	S	L	S	P	F	[...]	A	P	S	W	I
cDNA Sequenz HspB5-E/E/E	TTC	CAC	GAG	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	GAG	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	GAG	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5-E/E/E	F	G	E	P	S	[...]	S	L	E	P	F	[...]	A	P	E	W	I
cDNA Sequenz HspB5-E/E/A	TTC	CAC	GAG	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	GAG	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	GCC	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5-E/E/A	F	G	E	P	S	[...]	S	L	E	P	F	[...]	A	P	A	W	I
cDNA Sequenz HspB5-E/A/E	TTC	CAC	GAG	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	GCC	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	GAG	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5-E/A/E	F	G	E	P	S	[...]	S	L	A	P	F	[...]	A	P	E	W	I
cDNA Sequenz HspB5-E/A/A	TTC	CAC	GAG	CCA	AGC	[...]	TCC	CTG	GCC	CCC	TTC	[...]	GCA	CCT	GCC	TGG	ATT
Aminosäuresequenz HspB5-E/A/A	F	G	E	P	S	[...]	S	L	A	P	F	[...]	A	P	A	W	I

3.2 Umklonierung der HspB5-Konstrukte in einen lentiviralen Expressionsvektor

Zur Überexpression von HspB5 und den hergestellten HspB5-Phosphomimetika wurde ein lentivirales Expressionssystem benutzt. Dafür wurden die Konstrukte in den bicistronischen Expressionsvektor pLVX-IRES-ZsGreen1 umkloniert. Dieser exprimiert neben den HspB5-Mutanten auch ZsGreen, ein grün fluoreszierendes Protein, so dass erfolgreich transduzierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden können. Die im pCR2.1TOPO-Vektor generierten Konstrukte HspB5-E/E/E, HspB5-E/E/A, HspB5-E/A/E und HspB5-E/A/A wurden in den pLVX-IRES-ZsGreen Vektor umkloniert. Nach Restriktion an der gemeinsamen EcoRI Restriktionsstelle in beiden Vektoren, wurde das isolierte HspB5-Insert mit dem linear vorliegenden pLVX-IRES-ZsGreen1 Vektor ligiert und anschließend in chemokompetente E. coli DH5α transformiert. Nach Isolation aus einzelnen Bakterienkolonien, wurde zur Kontrolle eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt und die cDNA Fragmente mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Abbildung 5 zeigt für alle Restriktionsverdaue der vier generierten Konstrukte sowie vom wildtyp HspB5 eine Bande auf

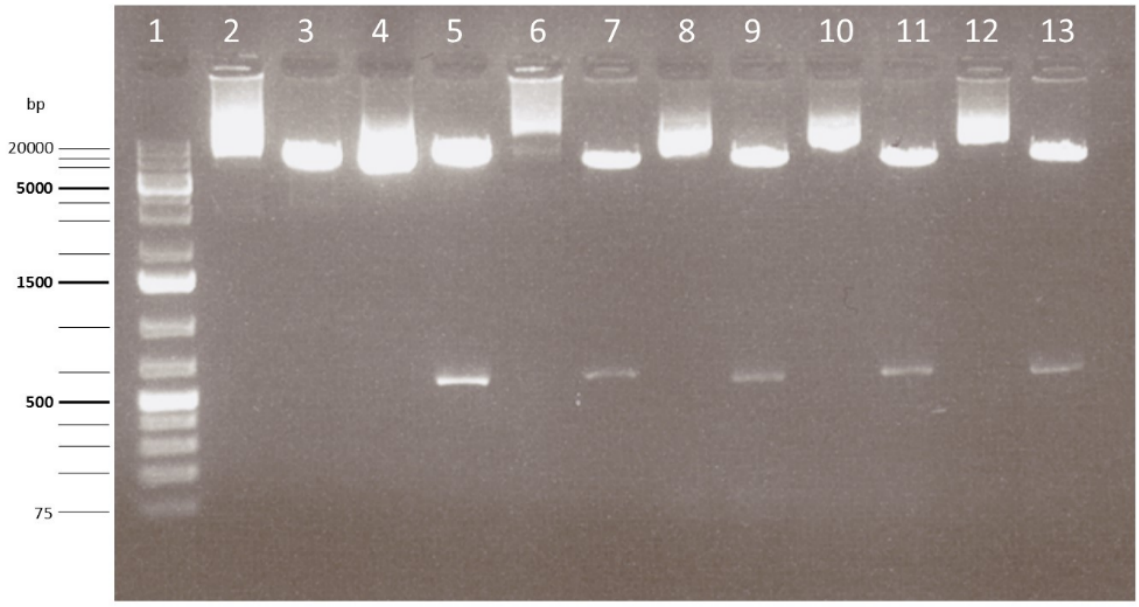

Abbildung 5: Restriktionsverdau zur Kontrolle der Umklonierung der HspB5-Konstrukte in den pLVX-IRES-ZsGreen Vektor. Für die Umklonierung wurde die EcoRI Schnittstelle in dem Vector pLVX-IRES-ZsGreen verwendet, die cDNA der HspB5-Phosphomimetika wurde ebenfalls an der EcoRI Schnittstelle aus dem pCR2.1-TOPO Vektor ausgeschnitten und aufgereinigt. 1: DNA-Leiter; 2,3: pLVX-IRES-ZsGreen Leervektor; 4,5: pLVX-IRES-ZsGreen-HspB5wt; 6,7: pLVX-HspB5-E/E/E; 8,9: pLVX-HspB5-E/E/A; 10,11: pLVX-HspB5-E/A/E; 12,13: pLVX-HspB5-E/A/A. Die geradzahligen Spuren zeigen die genannten Konstrukte ohne Restriktionsverdau, die ungeradzahligen Spuren nach Verdau mit EcoRI. Beachte die Bande in Höhe von 500bp in den Spuren 5,7,9,11 und 13, welche den verschiedenen HspB5-Inserts entspricht. Eine Bande des pLVX-IRES-ZsGreen Vektors ist jeweils auf der Höhe von 8200bp sichtbar. bp = basepairs

der zu erwartenden Höhe von ca. 500 bp. Das entspricht was der Größe des HspB5-Inserts (Spuren 5, 7, 9, 11 und 13).

Um nach erfolgter Umklonierung die korrekte Ausrichtung des Inserts im Vektor zu überprüfen, wurden die entsprechenden Plasmide bei korrekter Größe der Fragmente durch Sequenzierung überprüft. Sie zeigten die entsprechenden gewünschten Mutationen, wie bereits in Tabelle 12 dargestellt.

3.3 Herstellung von Viruspartikeln

Für die Herstellung von Viruspartikeln, die HspB5-Phosphomimetika enthalten, wurde das Lenti-X™ Lentiviral Expression System der Firma Clonetech Laboratorys verwendet. Für die vier selbst generierten (siehe 3.1), sowie für die vier bereits vorliegenden Konstrukte wurden Viruspartikel hergestellt. Die erfolgreiche Virusproduktion wurde mit real-time PCR kontrolliert. Dabei wurde quantitativ die vorhandene Virus-RNA-Konzentration bestimmt.

3.4 Effekt von HspB5 und dessen Phosphorylierung auf Staurosporin-induzierte Apoptose in C6-Gliomzellen

3.4.1 Überexpression der HspB5-Konstrukte

Zur Untersuchung des Effektes von HspB5 und den hergestellten Mutanten auf die Apoptose wurde die C6-Gliomzelllinie (Ratte) verwendet. 24 h nach Aussaat der C6-Zellen wurde dem Medium Viren zugegeben, die HspB5 oder die acht verschiedenen Mutanten enthielten. Sie wurden für 48 h inkubiert und dann zunächst auf erfolgreiche Überexpression durch Immunmarkierung mit einem HspB5-Antikörper analysiert. HspB5-überexprimierende Kulturen wurden dann später zur Analyse des Effekts von HspB5 auf die Apoptose verwendet (3.4.3). Abbildung 6 zeigt einzelne Bildausschnitte von C6-Zellen nach immunhistochemischer Färbung mit HspB5-Antikörpern. Als Kontrolle dienten untransduzierte C6-Zellen (A1-A3). Die Zellkerne wurden durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI dargestellt (A3). Es war gegen ZsGreen kein Signal (A2) und nur eine ganz geringe HspB5-Immunreaktivität (A1) sichtbar. In allen Versuchen wurde zur Vergleichbarkeit eine identische Belichtungszeit verwendet und diese so kurz gewählt, dass es in den HspB5-überexprimierenden Kulturen zu keiner Überbelichtung kam. Daher ist in den entsprechenden Abbildungen der Kontrollen kein Signal erkennbar (A1). Die mit dem Leervektor enthaltenden Viren transduzierten Zellen zeigten als Zeichen der erfolgreichen Transduktion ein deutliches ZsGreen-Signal, jedoch kein bzw. ein sehr geringes anti-HspB5 Signal (B1). Im Gegensatz dazu, sah man in HspB5-transduzierten Zellen ein deutliches Immunsignal (C1) als Zeichen der Überexpression von HspB5. Die weiteren Bildausschnitte (D-K) zeigen eine vergleichbare Darstellung der erfolgreichen Transduktion und Überexpression der HspB5-Mutanten. Einem starken ZsGreen Signal lässt sich bei allen acht HspB5-Mutanten eine deutliche HspB5-Immunreaktivität zuordnen. Somit konnte durch Immunmarkierung eine Überexpression von HspB5 und den HspB5-Mutanten in C6-Zellen nachgewiesen werden.

Um die Überexpression von HspB5 mit einer zweiten Methode nachzuweisen, wurden mit allen verschiedenen Viren transduzierte Kulturen lysiert und mittels Immunoblot auf den Gehalt von HspB5 untersucht.

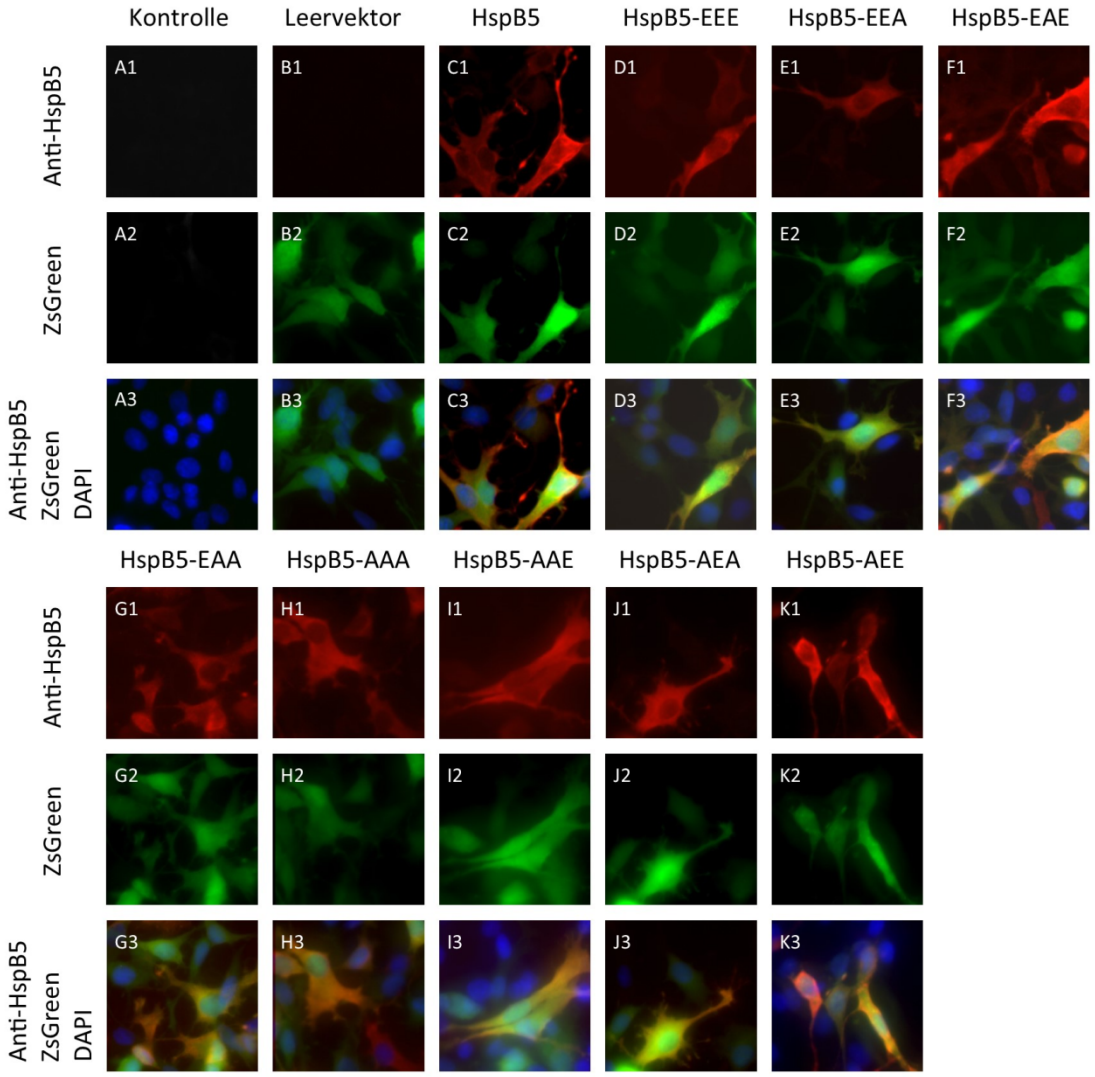

Abbildung 6: Nachweis der Transduktion und Überexpression von HspB5 und den HspB5-Konstrukten in C6-Zellen. Die untransduzierte Kontrolle **A** zeigt nur ein Signal der Zellkerne die mit DAPI dargestellt werden konnten A3. Bei den mit Leervektor transduzierten Zellen **B** zeigt sich eine ZsGreen Fluoreszenz (B2). Die Transduktion mit HspB5-Wildtyp **C** zeigt in der C6-Zelle ein starkes Anti-HspB5 Signal (C1), welches mit einem starken ZsGreen Fluoreszenz einhergeht (vgl. C2 und C3). Die Immunmarkierungen der HspB5-Konstrukte von D1-3 bis K1-3 zeigen mit C1-3 vergleichbare Signale. (DAPI = 4′,6-Diamidin-2-phenylindol)

In Abbildung 7 A und B ist beispielhaft der Gehalt von HspB5 dargestellt. Zum einen in Lysaten einer untransduzierten Kontrolle, zum anderen in C6-Zellen, die durch Viren mit Leervektor oder mit den verschiedenen HspB5-Mutanten transduziert wurden. Der Immunoblot mit Anti-HspB5-Antikörper zeigt im Lysat der Kontrolle kein Anti-HspB5-Signal. Das mit dem pLVX-Leervektor transduzierte Lysat zeigt eine schwache Bande. Die Lysate mit HspB5 und HspB5-Phosphomimetika zeigen Banden unterschiedlicher Stärke, wobei sich die HspB5-E/E/E Bande am schwächsten zeigt. Alle anderen HspB5-Mutanten zeigen deutliche Banden unterschiedlicher Stärke und damit eine deutliche Überexpression. Ein auf derselben Membran durchgeführter Immunoblot mit einem GAPDH-Antikörper zeigt für

alle Bedingungen Banden gleicher Intensität. Das deutet auf eine gleichmäßige Ladung von Proteinmengen hin. Es lässt sich somit folgern, dass bereits die Transduktion der Zellen mit dem Leervektor zu einer leichten Hochregulation von HspB5 führt. Die Transduktion mit den verschiedenen, HspB5-Konstrukten enthaltenden, Viren führte jedoch in allen Fällen zu einer deutlich stärkeren Hochregulation. Sie variierte jedoch bei den verschiedenen HspB5-Mutanten in ihrer Stärke.

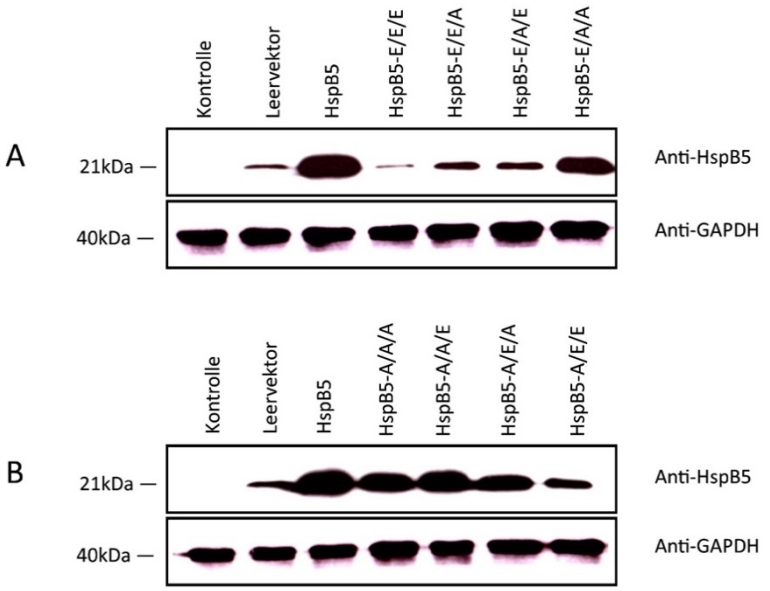

Abbildung 7: Nachweis der Überexpression von HspB5 und den HspB5-Phosphomimetika in C6-Zellen im Immunoblot. A Darstellung des Anti-HspB5 Immunsignals in transduzierten C6-Zellen. Man erkennt im Vergleich zur untransduzierten Kontrolle ein Anti-HspB5 Signal unterschiedlicher Stärke in den erstellten HspB5-Phosphomimetika. B Darstellung des Anti-HspB5 Immunsignals in transduzierten C6-Zellen. Man erkennt im Vergleich zur untransduzierten Kontrolle ein Anti-HspB5 Signal unterschiedlicher Stärke in den weiteren vier HspB5-Phosphomimetika. Das Anti-GAPDH Signal zeigt eine gleichmäßige Ladung der Proteinmenge.

3.4.2 Staurosporin-induzierte Apoptose in C6-Zellen

Staurosporin (STS) ist ein Alkaloid, das aus Streptomyces staurosporeus isoliert wird. Es ist ein potenter Inhibitor von Proteinkinasen. Staurosporin verhindert die Bindung von ATP an Proteinkinasen. Dadurch wird Caspase-3 aktiviert und führt letztlich zur Apoptose. Um zu untersuchen, ob sich HspB5 und die HspB5-Mutanten auf die Apoptose in C6-Gliomzellen auswirken, wurde zunächst in einem Vorversuch die optimale Staurosporinkonzentration ermittelt, die zu einer sichtbaren Apoptoseinduktion in C6-Gliomzellen führt. Für die Detektion der Apoptose wurde die Methode der TUNEL-Reaktion genutzt. Sie basiert auf folgendem Prinzip: Fluorescein markierte Nukleotide polymerisieren an freien Hydroxylgruppen am 3‘-Ende der DNA. Diese freien Enden entstehen durch Endonukleasen, die während der

Apoptose im Zellkern aktiviert werden und für Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA sorgen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop lassen sich apoptotische Zellkerne anhand der roten Emission (560 - 670 nm) von Fluorescein identifizieren. Zu Beginn wurden kultivierte C6-Gliomzellen auf Deckgläschen in einer Dichte von 10000 Zellen/Deckglas ausgesät. Am nächsten Tag wurden dem Kulturmedium verschiedene Mengen an Staurosporin zugesetzt, so dass Staurosporinkonzentrationen von 50 nM, 100 nM und 200 nM im Kulturmedium vorlagen. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisation wurde dann die TUNEL-Reaktion durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft Ausschnitte des Vorversuchs, in dem verschiedene Staurosporinkonzentrationen getestet wurden, um in C6-Gliomzellen ein geeignetes Ausmaß an Apoptose zu induzieren. Dabei wurde zum einen die Zelldichte beurteilt und zum anderen auf einen sichtbaren Anteil an TUNEL-positiven Zellkernen geachtet.

In Abbildung 8 A ist ein Ausschnitt der Kontrolle zu sehen, welche nicht mit Staurosporin behandelt wurde. Es zeigen sich in der Detektion der TUNEL-Reaktion keine positiven Zellkerne, d.h. keine apoptotischen Zellen. Bei der Betrachtung des DAPI Signals war eine normale Morphologie der Zellkerne erkennbar. Im Gegensatz dazu, war bei 50 nM, 100 nM und 200 nM Staurosporin eine abnehmende Dichte der Zellen und eine zunehmende Zahl TUNEL-positiver Zellkerne zu beobachten. Bei einer Staurosporinkonzentration von 50 nM zeigt die TUNEL Markierung vereinzelte positive Zellkerne (Abbildung 8 B), bei einer Konzentration von 100 nM Staurosporin deutlich mehr positive Zellkerne und bei 200 nM STS ca. 20 % positive Zellkerne, d.h. eine deutliche Apoptoseinduktion. Anhand dieses Vorversuchs wurde für die folgenden Versuche eine Konzentration von 200 nM Staurosporin und eine Inkubationszeit von 24 h gewählt.

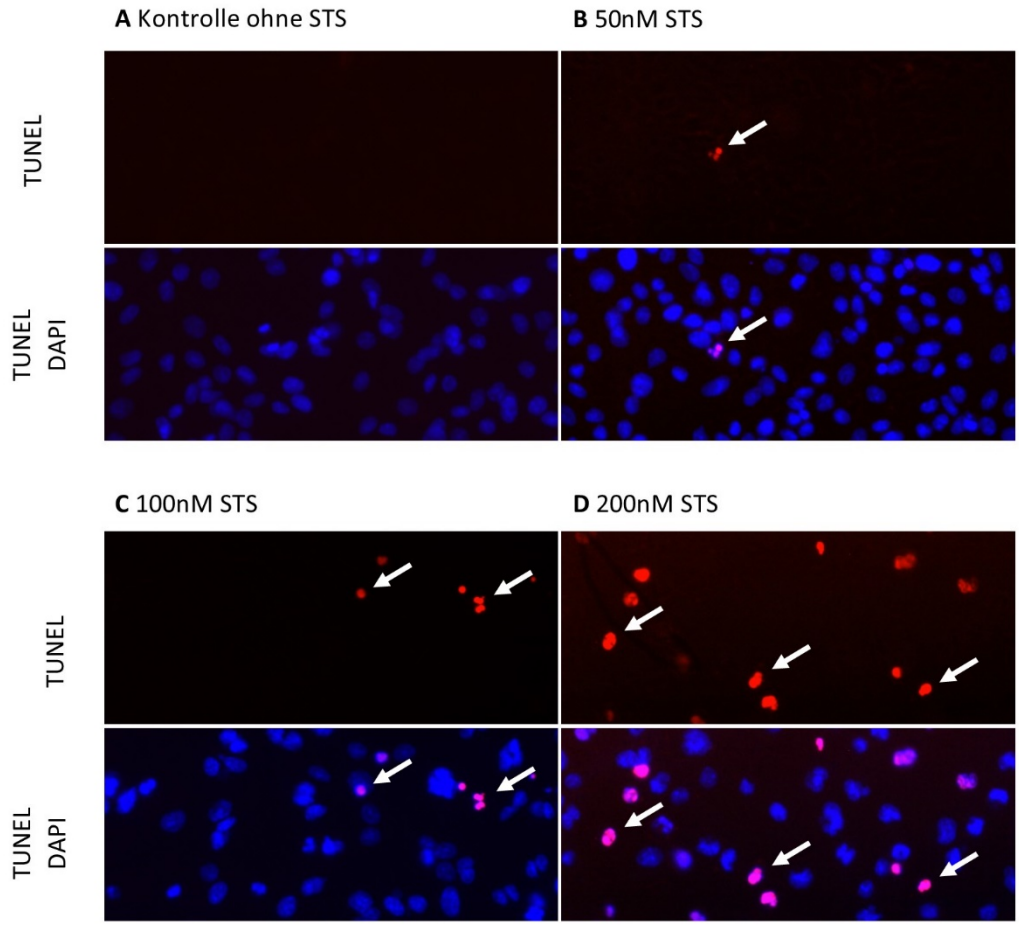

Abbildung 8: Etablierung einer geeigneten Staurosporinkonzentration zur Apoptoseinduktion in C6-Gliomzellen. TUNEL-Reaktion (rot) und DAPI-Markierung (blau) von C6-Zellen nach Inkubation ohne STS (A), mit 50 nM STS(B), 100 nM STS (C) und 200 nM STS (D). Aufsteigende STS-Konzentration führte zur Zunahme TUNEL-positiver Zellen. Bei 200nM STS zeigte sich ein Apoptoseanteil von ca. 20 % (D). Die Pfeile markieren beispielhaft apoptotische Zellen. (TUNEL=Tdt-dUTP-nick-end-labeling, STS=Staurosporin, DAPI=4′,6-Diamidin-2-phenylindol)

3.5 Effekt von HspB5 und der HspB5-Mutanten auf Staurosporin-induzierte Apoptose

Der Effekt der Phosphorylierung von HspB5 auf STS-induzierte Apoptose wurde an transduzierten C6-Gliomzellen untersucht. Dazu wurden die kultivierten C6-Gliomzellen am Tag nach der Aussaat mit Viren transduziert, die HspB5 und die HspB5-Mutanten enthielten. Am nächsten Tag wurde 200 nM Staurosporin zugefügt und für weitere 24 h inkubiert. Nach Fixation wurde die TUNEL-Markierung durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie die Zahl apoptotischer Zellen bestimmt. Transduzierte C6-Gliomzellen konnten durch das ZsGreen Signal identifiziert werden, apoptotischen Zellen waren an der roten Fluoreszenz erkennbar.

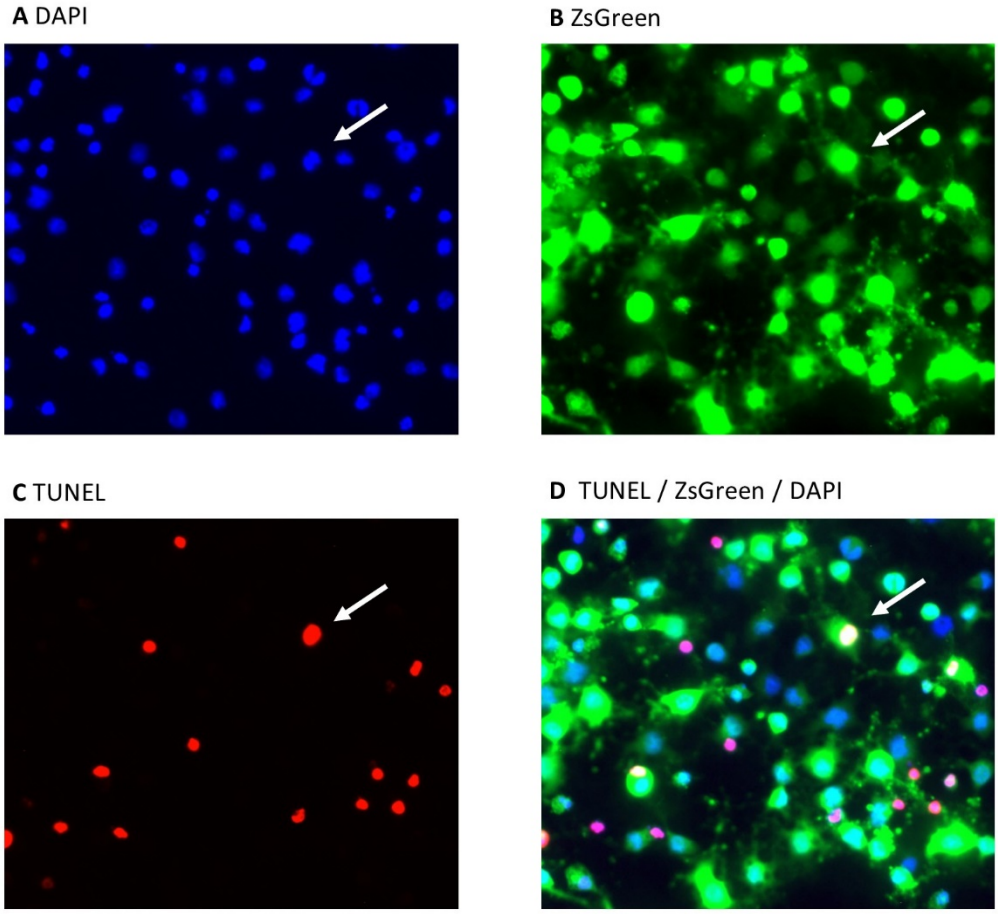

Abbildung 9: TUNEL nach Apoptoseinduktion in transduzierten C6-Gliomellen. **A:** Darstellung der Zellkerne der C6-Gliomzellen mittels DAPI Fluoreszenz, **B:** Transduzierte C6-Zellen sind an dem grünen ZsGreen Signal erkennbar, bis auf einzelne Zellen sind alle Zellen transduziert worden. **C**: Die TUNEL-Methode markiert apoptotische Zellkerne (rot) **D**: Überlagerte Aufnahme der Bilder A-C, der Pfeil markiert einen Zellkern, an dem ein DAPI, ZsGreen und TUNEL Signal erkennbar ist. (TUNEL=Tdt-dUTP-nick-end-labeling, DAPI=4′,6-Diamidin-2-phenylindol)

Abbildung 9 zeigt beispielhaft den Ausschnitt einer Aufnahme, die für die Auswertung des Versuches gemacht wurde. Von jeder Versuchsbedingung wurden fünf Bilder aufgenommen, auf denen 200 - 300 Zellen an der DAPI Färbung erkennbar waren (Abbildung 9 A). Fast alle Zellen waren transduziert d.h. ZsGreen positiv (Abbildung 9 B), sodass zur Vereinfachung, für die Berechnung des Anteils apoptotischer Zellen, der Quotient aus den TUNEL-positiven Zellen (9C) und der Gesamtzellzahl verwendet werden konnte. Ein Pfeil kennzeichnet beispielhaft den Zellkern einer Zelle, die transduziert und apoptotisch ist. In Abbildung 10 sind die Mittelwerte aus den drei unabhängigen Versuchen, mit je ca. 1000 ausgewerteten Zellen für jede Bedingung, in einem Säulendiagramm dargestellt.

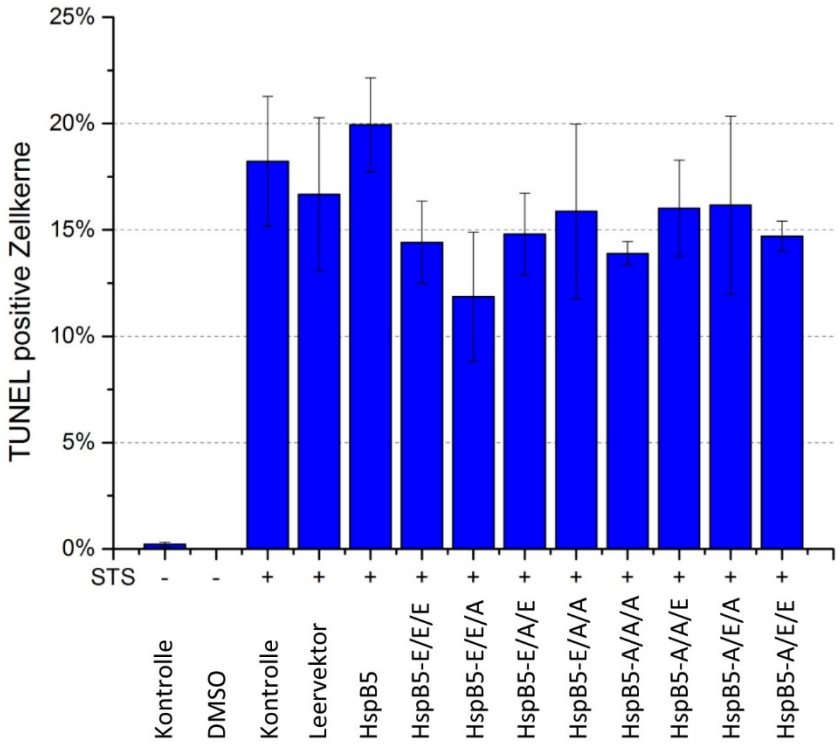

Abbildung 10: Anteil der TUNEL-positiven Zellkerne nach Apoptoseinduktion an C6-Gliomzellen durch 200 nM Staurosporin. Der Anteil der apoptotischen Zellkerne zu der in DAPI dargestellten Gesamtzahl der Zellkerne ist in dem Säulendiagramm dargestellt. **Säule 1:** Untransduzierte Kontrolle ohne STS zeigt einen minimalen Apoptoseanteil **Säule 2:** Kontrollbedingung mit DMSO induziert keine Apoptose in untransduzierten Zellen ohne STS **Säule 3:** Untransduzierte Kontrolle mit 200 nM STS mit Apoptoseinduktion von 18,23 %, vergleichbar mit Überexpression des Leervektors (Säule 4). Transduktion von HspB5 und den HspB5-Mutanten hat keinen signifikanten protektiven Effekt auf das Überleben der C6-Gliomzellen nach Apoptoseinduktion mit 200 nM STS (Säulen 5-13). n = 3

Nicht transduzierte und nicht mit Staurosporin behandelte Zellen hatten einen minimalen Apoptoseanteil von 0,021 % ± 0,1 % (**Abbildung 10**, Säule 1). Als weitere Kontrolle wurde den Zellen Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt, das als Lösungsmittel für Staurosporin diente (0 % Apoptose). Die Inkubation von untransduzierten Zellen mit 200 nM STS für 24 h, induzierte in 18,23 % ± 3,06 % der Zellen Apoptose (**Abbildung 10**, Säule 3). Einen ähnlichen Apoptoseanteil wiesen C6-Gliomzellen auf, die den Leervektor exprimierten auf (16,67 % ± 3,61 %). Ebenso zeigte sich bei allen anderen Versuchsbedingungen ähnliche Apoptoseraten. Sie sind im Folgenden aufgeführt: HspB5-E/E/E 14,41 % ± 1,94 %, HspB5-E/E/A 11,86 % ± 3,03 %, HspB5-E/A/E 14,81 % ± 1,93 %, HspB5-E/A/A 15,87 % ± 4,11 %, HspB5-A/A/A 13,9 % ± 0,5 %, HspB5-A/A/E 16,02 % ± 2,26 %, HspB5-A/E/A 16,17 % ± 4,19 % und HspB5-A/E/E 14,71 % ± 0,7 %. Im statistischen Vergleich konnte zwischen keiner der mit STS-behandelten Versuchsgruppe ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Es kann folglich gesagt werden, dass kein signifikant protektiver Effekt von HspB5 oder von HspB5-Mutanten auf STS-induzierte Apoptose in diesem Versuchsansatz gezeigt werden konnte.

3.6 Effekt von HspB5 und der HspB5-Mutanten auf Hitzeschock-induzierte Rarefizierung des Dendritenbaums in hippocampalen Neuronen

In der AG Golenhofen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HspB5 in hippocampalen Neuronen die Komplexität des neuronalen Dendritenbaums erhöht und dass dieser Effekt phosphorylierungsabhängig ist. Dies führte zu der Hypothese, dass HspB5 bei neurodegenerativen Erkrankungen, in denen HspB5 bekannterweise hochreguliert wird, einer Rarefizierung des Dendritenbaums entgegenwirken könnte. In dieser Arbeit sollte daher HspB5 und die HspB5-Mutanten in Neuronen überexprimiert und die Neurone einer zellulären Stresssituation ausgesetzt werden, welche zu einer Rarefizierung des Dendritenbaums führt und so eventuelle Effekte von HspB5 auf den Dendritenbaum untersucht werden.

3.6.1 Überexpression von HspB5 in hippocampalen Neuronen

Für die Versuche an hippocampalen Neuronen sollten zunächst die HspB5-Mutanten in hippocampalen Neuronen überexprimiert werden, um eine Hochregulation von HspB5, wie sie in vivo bei neurodegenerativen Erkrankungen zu beobachten ist, zu simulieren. Nach Präparation und Kultivierung hippocampaler Neurone wurden diese am 7. Tag in Kultur (day in vitro, DIV 7) mit virushaltigem Medium versetzt und so mit HspB5-Viruspartikeln infiziert. Parallel dazu wurde mit den erstellten Viruspartikeln der HspB5-Mutanten verfahren. An DIV 14 wurden die Neurone fixiert und immunzytochemisch für HspB5 markiert. Erfolgreich transduzierte Neurone konnten durch das koexprimierte ZsGreen-Signal im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden.

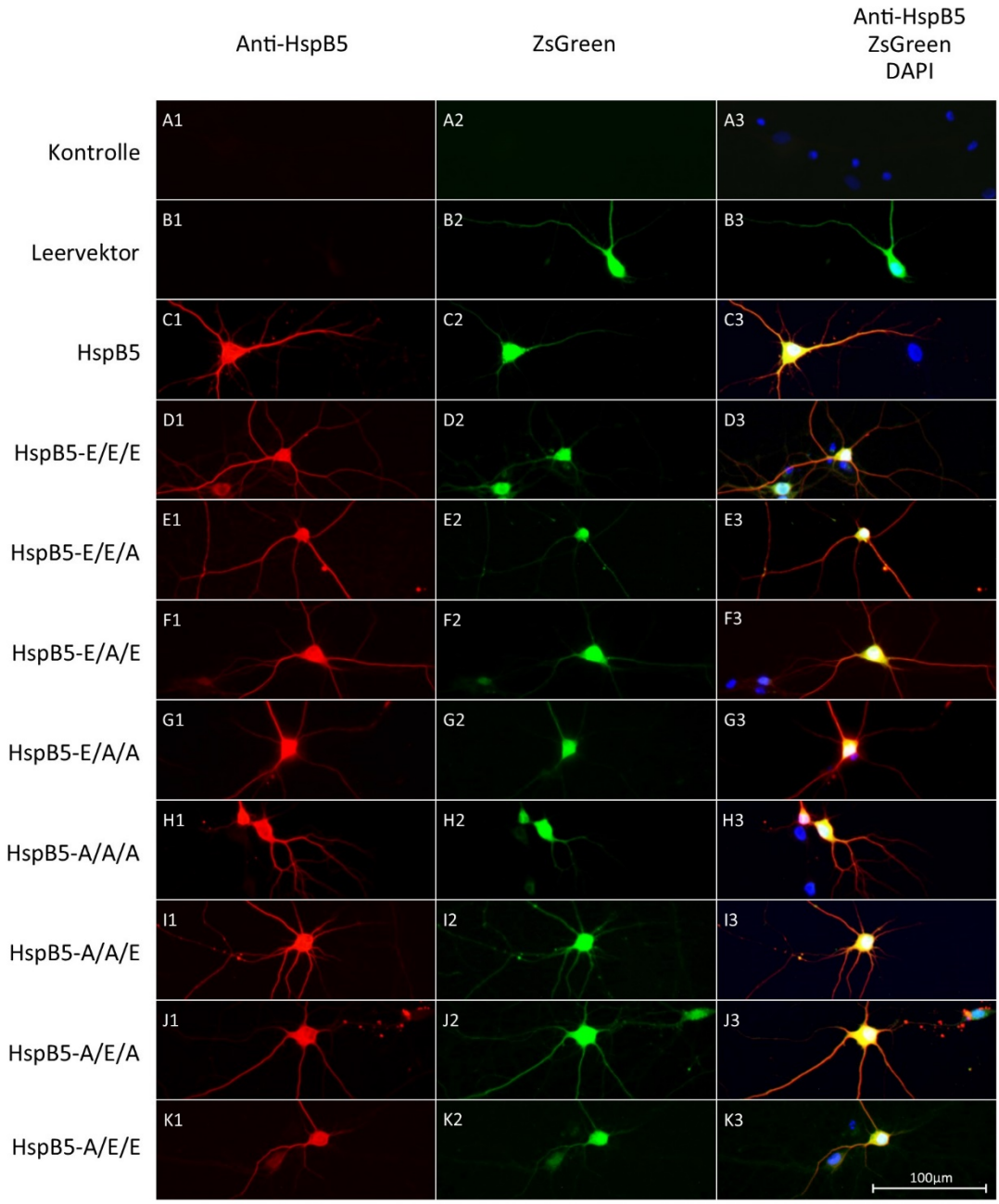

Abbildung 11: Nachweis der Transduktion und Überexpression von HspB5 und den HspB5-Mutanten in hippocampalen Neuronen. Die untransduzierte Kontrolle **A** zeigt nur ein Signal der Zellkerne, die mit DAPI dargestellt werden konnten A3. Bei den mit Leervektor transduzierten Zellen **B** zeigt sich eine ZsGreen Fluoreszenz B2. Die Transduktion mit HspB5-wildtyp **C1-3** zeigt in dem dargestellten Neuron ein starkes Anti-HspB5 Signal (C1), das mit starker ZsGreen Fluoreszenz korreliert (vgl. C2 und C3). Die Immunmarkierungen der HspB5-Phosphomimetika von D1-3 bis K1-3 zeigen mit C1-3 vergleichbare Signale. (DAPI = 4′,6-Diamidin-2-phenylindol)

Abbildung 11 zeigt hippocampale Neurone nach Transduktion mit Viren, die zu einer Überexpression von HspB5, den HspB5-Mutanten und dem Leervektor führten. Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem Anti-HspB5-Antikörper durchgeführt, der gegen das C-terminale Ende gerichtet war und somit sowohl die Überexpression von HspB5, als auch von den HspB5-Phosphomimetika aufzeigen konnte. Als Kontrolle dienten Neurone, die

nicht transduziert wurden. Sie zeigt weder ein Anti-HspB5-Signal noch eine ZsGreen Fluoreszenz (A1-3). Die Expression des Leervektors in Auschnitt B1-3 führte zu einer ZsGreen Fluoreszenz der transduzierten Neurone, ohne ein positives Anti-HspB5-Signal. In C1-3 ist die Überexpression von HspB5 zu sehen. Das deutliche Signal der Anti-HspB5-Markierung und der ZsGreen Fluoreszenz, beweist die erfolgreiche Überexpression von HspB5. Die weiteren Bildausschnitte der **Abbildung 11** zeigen den entsprechenden Nachweis einer Überexpression aller acht verwendeten HspB5-Mutanten. Die lentivirale Transduktion der Neurone mit den verschiedenen HspB5-Konstrukten, führte somit zu einem Anstieg des Anti-HspB5-Signals in der immunzytochemischen Färbung. Daraus kann auf eine erfolgreiche Überexpression geschlossen werden kann.

3.6.2 Etablierung einer zellulären Stressbedingung, die zur Rarefizierung des Dendritenbaums hippocampaler Neurone führt

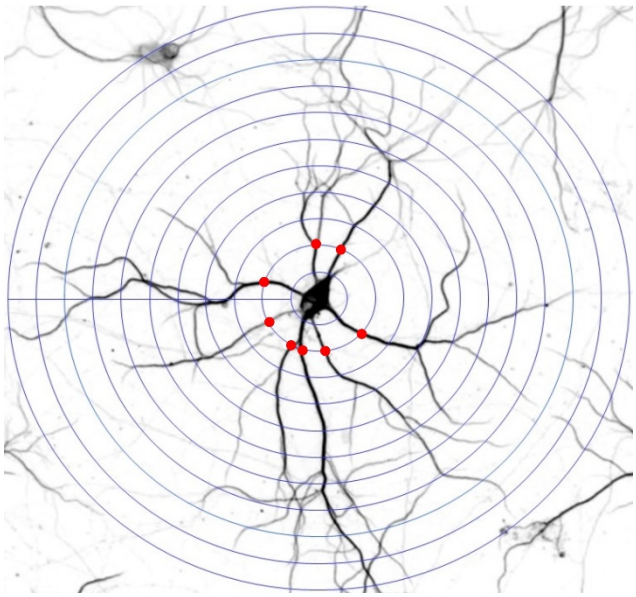

Abbildung 12: Methodik der Sholl-Analyse. Die Scholl-Analyse ist eine Methode zur quantitativen Darstellung der Verzweigung des Dendritenbaums. Der Dendritenbaum und das Soma wird mit einer Anti-MAP-2- Immunofärbung dargestellt. Um das Soma zeigen konzentrische Ringe, jeweils die Entfernung vom Zellsoma an. Der kleinste Ring hat einen Radius von 15µm, bei jedem weiteren Ring nimmt der Radius um 15 µm zu. Für jede Entfernung kann so die Anzahl der Schnittpunkte gezählt werden. Die roten Markierungen zeigen beispielhaft 8 Schnittpunkte der Dendriten bei einer Entfernung von 30 µm von Soma.

Um zu untersuchen, ob HspB5 einer Rarefizierung des Dendritenbaums bei neuronalem Stress entgegenwirken kann, war es zunächst nötig, ein geeignetes Stressmodell in

hippocampalen Neuronen zu etablieren, bei dem eine signifikante Reduktion des Dendritenbaum zu beobachten ist. Bei der Auswahl der Art des Zellstresses wurden verschiedene Faktoren berücksichtigt. Entscheidende Faktoren waren zum einen, die Vergleichbarkeit mit Zellstress in lebenden Organismen und zum anderen, die Möglichkeit der quantitativen Analyse. Die Etablierung passender Versuchsbedingungen fand in einem einmal durchgeführten Vorversuch statt. Als Stressbedingung wurde eine temporäre Temperaturerhöhung gewählt, mit zwei verschiedenen Stressstärken von 42 °C und 43 °C. Dazu wurden an DIV 7 die Neurone mit Viren transduziert, um zu einer Expression des Leervektors zugelangen. An DIV 14 wurde eine Gruppe von Neuronen einem Hitzeschock von 42 °C und eine zweite Gruppe einem Hitzeschock von 43 °C für jeweils 30 min ausgesetzt. Eine Kontrollgruppe wurde konstant bei 37 °C inkubiert. Mittels immunzytochemischer Markierung von MAP-2 (microtubiliassoziiertes Protein 2) wurde dann der Dendritenbaum dargestellt und dessen Komplexität durch Sholl-Analyse bestimmt. Die Auswertung erfolgte an 10 Neuronen für jede der Bedingungen. Auf eine Testung der Signifikanz wurde bei diesem Vorversuch verzichtet. Wie in Abbildung 12 beispielhaft dargestellt, werden bei der Sholl-Analyse um das Soma eines Neurons elf konzentrische Ringe mit ansteigenden Radius (je 15 µm) gelegt. Für jeden Ring werden dann die Schnittpunkte der Dendriten ausgezählt. Ihre Anzahl stellt ein Maß für den Verzweigungsgrad der Dendriten dar. Die roten Markierungen in Abbildung 12 geben beispielhaft die Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten in einer Entfernung von 30 µm vom Zellsoma an.

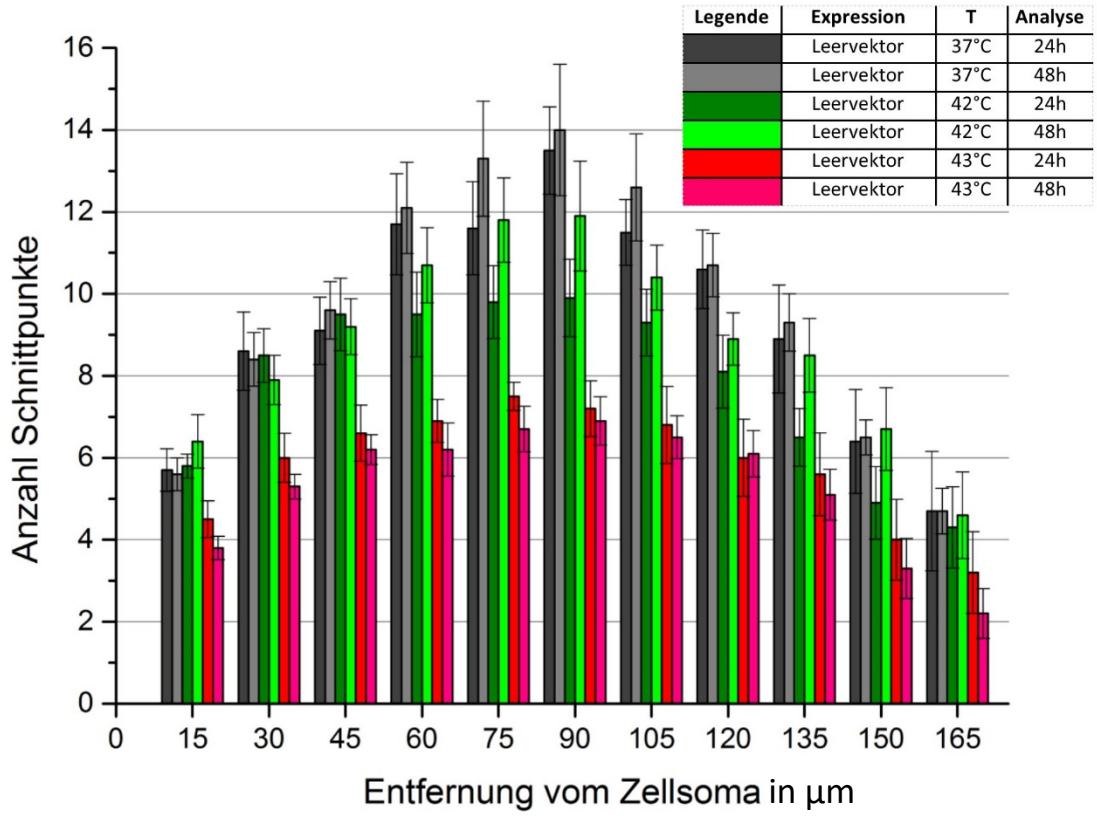

Abbildung 13: Hitzeschock vermindert die Komplexität des Dendritenbaums in hippocampalen Neuronen. Analyse des Dendritenbaums von Neuronen, die den Leervektor exprimierten, nach Hitzeschock von 42 °C und 43 °C für 30 min und Analyse nach 24 bzw. 48 h. Die Kontrolle ohne Hitzeschock wird von den dunkelgrauen (24 h) und hellgrauen (48 h) Säulen dargestellt. Bei einem Hitzeschock von 42 °C für 30 min nehmen die Werte ab (Analyse nach 24 h dunkelgrün, nach 48 h hellgrün). Eine deutliche Reduktion ist bei Hitzeschock von 43 °C für 30 min zu sehen (rot, magenta). T = Temperatur in °C h = Stunden bis zur Analyse, n = 10 Neurone, Mittelwerte mit SEM dargestellt.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Sholl -Analyse an verschiedenen mit Hitzeschock behandelten Neuronenkulturen. Die x-Achse entspricht den Radien der konzentrischen Ringe und somit der Entfernung zum Zellsoma. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Schnittpunkte zwischen den Dendriten und den Ringen der Shollanalyse aufgetragen. Als Kontrolle dienten Neurone, die den Leervektor exprimierten und bei 37 °C ohne Temperaturerhöhung inkubiert wurden. In Abbildung 13 sind diese Kontrollwerte als graue Balken dargestellt. Die grünen Balken zeigen die Werte nach einer Temperaturerhöhung auf 42 °C für 30min (Hitzeschock), die dunkelgrünen Säule gibt die Zahl der Schnittpunkte bei einer Analyse des Dendritenbaums 24 h nach Hitzeschock wieder, die hellgrüne Säule 48 h nach Hitzeschock. Im Vergleich zur Kontrolle, ist bei beiden Zeitpunkten ab einer Entfernung von 60 µm vom Zellsoma eine tendenzielle Abnahme der Schnittpunkte zu sehen. Ein Hitzeschock von 30 min bei 42 °C führte somit zu einer leichten Verringerung der Komplexität des Dendritenbaums und tendenziell höheren Verzweigungen nach 48 h. Bei einem

Hitzeschock von 43 °C für 30 min zeigt sich eine deutliche Abnahme der Zahl der Schnittpunkte mit allen Sholl-Ringen, sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h (hell-, dunkelrote Säule Abb. 13). Zusammengefasst zeigt der Vergleich der Mittelwerte gegenüber Kontrollbedingungen eine sichtbare und bleibende Abnahme der Schnittpunkte bei einer Temperatur von 43 °C und einer Inkubationszeit von 48 Stunden und nur eine geringe Abnahme der dendritischen Verzweigung bei 42 °C. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde somit als Modell eines stress-induzierten rarefizierten Dendritenbaums ein Hitzeschock von 30 min mit 43 °C, mit anschließender Erholungszeit von 48 h bei 37 °C verwendet.

3.6.3 Effekt von HspB5 und den HspB5-Mutanten auf Hitzeschock-induzierte Rarefizierung des Dendritenbaums hippocampaler Neurone

Im folgenden sollte in diesem Experimentalsystem untersucht werden, ob HspB5 einer stress-induzierten Rarefizierung des Dendritenbaums entgegenwirken kann. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass HspB5 bei neurodegenerativen Erkrankungen bekannterweise hochreguliert wird.

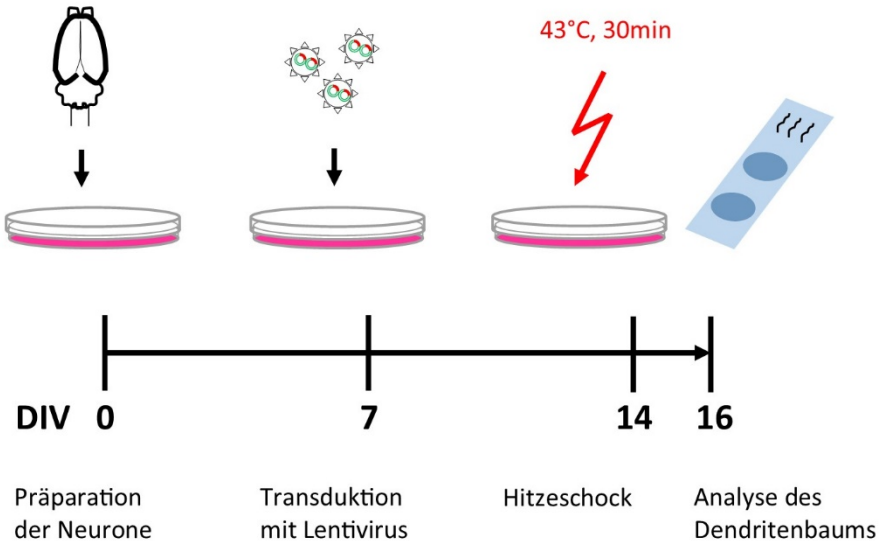

Abbildung 14: Schema des Versuchsverlaufs. Diese Zeitleiste zeigt den Verlauf des Versuchs im Überblick. An DIV 0 wurden die hippocampalen Neurone nach Präparation aufbereitet und in Kultur genommen. An DIV 7 erfolgte die Transduktion durch Zugabe von Lentivirus in das Medium. An DIV 14 erfolgte der Hitzeschock von 43 °C für 30 min, dafür wurden die Zellen in ein temperiertes Wasserbad gestellt. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37 °C inkubiert, bis sie an DIV 16 fixiert und zur späteren Analyse immunzytochemisch markiert wurden.

Durch die Überexpression von den HspB5-Mutanten können alle verschieden Varianten der Phosphorylierung von HspB5 simuliert und auf deren Effekte auf den Dendritenaum untersucht werden. So wird der dreifach phosphorylierte Zustand von HspB5-E/E/E und der unphosphorylierte Zustand von HspB5-A/A/A simuliert. Die einfache Phosphorylierung der

einzelnen Phosphorylierungsstellen an Serin 19, 45 und 59 werden durch die HspB5-Mutanten HspB5-E/A/A, HspB5-A/E/A und HspB5-A/A/E simuliert. Für die Untersuchung von zweifachphosphorylierten HspB5 wurden die HspB5-Mutanten HspB5-E/E/A, HspB5-E/A/E und HspB5-A/E/E verwendet. Ein Überblick über den zeitlichen Versuchsablauf gibt Abbildung 14. Nach Präparation des Hippocampus und Dissoziation der Neurone (DIV0) wurden die Neurone an DIV 7 mit pLVX-Leervektor als Kontrolle, HspB5 und den HspB5-Mutanten transduziert. An DIV 14 erfolgte der Hitzeschock für 30 min bei 43 °C. Im Anschluss wurden die Neurone für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert. Dann (DIV 16) wurden die Neurone fixiert, der Dendritenbaum durch eine Immunmarkierung mit MAP-2-Antikörper dargestellt und mittels Sholl-Analyse ausgewertet.

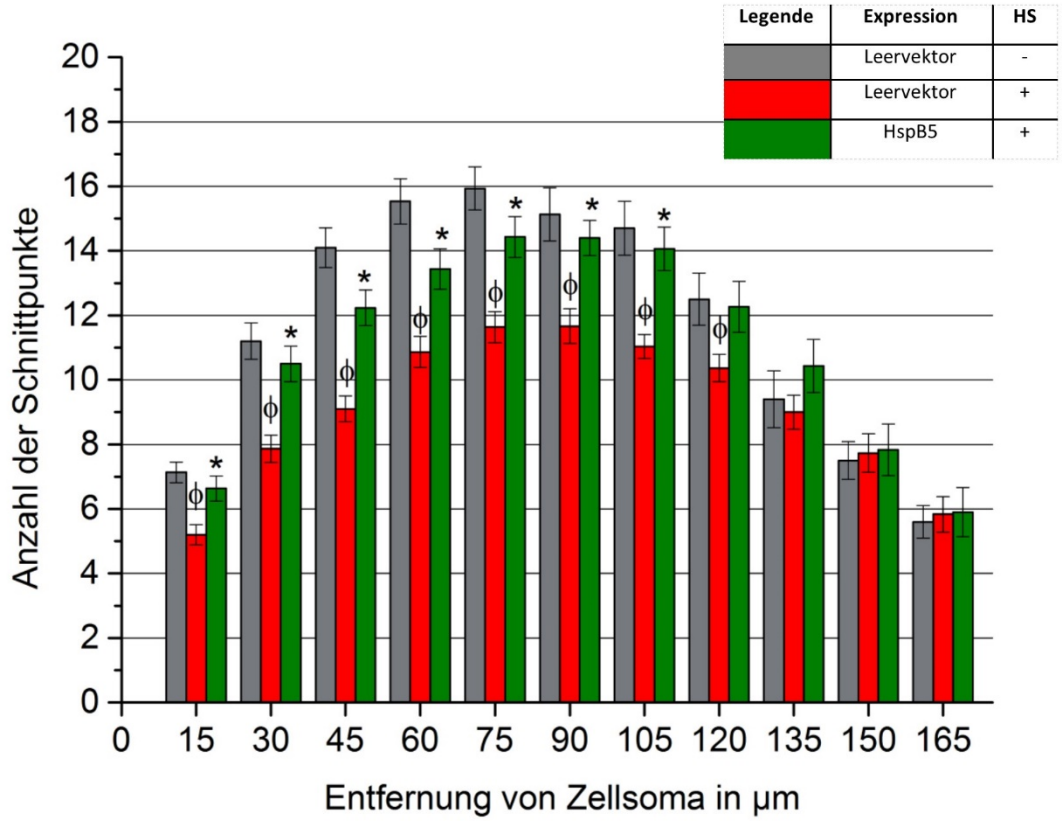

Abbildung 15: HspB5 wirkt der Rarefizierung der dendritischen Verzweigung in hippocampalen Neuronen nach Hitzeschock entgegen. Neurone mit Expression des Leervektors als Kontrolle (grau) ohne Hitzeschock (HS -). Signifikante Rarefizierung (15-120 µm vom Soma) des Dendritenbaums nach Hitzeschock (HS + = 43 °C, 30 min) bei Überexpression von Leervektor (rot). Überexpression von HspB5 (grün) bei Hitzeschock (HS +) führt zu signifikant höheren Werten im Vergleich zur Leervektorexpression, Φ p <0.05 versus Leervektor ohne Hitzeschock. * p<0.05 versus Leervektor mit Hitzeschock. n = 30 (30 Neurone aus 3 unabhängigen Versuchen)

In Abbildung 15 ist das Ergebnis der Sholl-Analyse zu sehen. Die grauen Säulen stellen die Kontrollen dar, hier wurden die Zellen mit Leervektor transduziert und keinem Hitzeschock ausgesetzt. Das Ergebnis des Hitzeschocks (43 °C) auf Neurone, die mit dem Leervektor

transduziert wurden, ist rot dargestellt. Die Anzahl der Schnittpunkte mit den Sholl-Ringen waren im Bereich von 15 - 120 µm statistisch signifikant reduziert (im Vergleich zur Kontrolle). Die grünen Säulen zeigen die Ergebnisse der Sholl-Analyse der Neurone, die HspB5 überexprimierten und einem Hitzeschock ausgesetzt waren. Im Bereich von 15 - 105 µm Abstand vom Zellsoma hatten sie eine statistisch signifikant größere Anzahl von Schnittpunkten im Vergleich zu den, mit Leervektor transduzierten, gestressten Neuronen. Dies bedeutet, dass eine Überexpression von HspB5 der durch Hitzeschock ausgelösten Rarefizierung des Dendritenbaums entgegenwirkte.

Um zu untersuchen, ob der protektive Effekt von HspB5 auf den Dendritenbaum auch durch Phosphorylierung reguliert wird, wurden in den kultivierten hippocampalen Neuronen die verschiedenen HspB5-Mutanten ausgewertet. Der Übersichtlichkeit wegen, werden die Ergebnisse der einzelnen Versuchsbedingungen in Gruppen aufgeführt. Zunächst die simulierte dreifach Phosphorylierung zusammen mit dem unphosphorylierten Zustand. Dann folgt die Gruppe der HspB5-Mutanten, die einen einfach phosphorylierten Zustand von HspB5 simulieren und zuletzt die Gruppe, die eine zweifache Phosphorylierung simulieren. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse von der Überexpression mit den Mutanten HspB5-E/E/E und HspB5-A/A/A aufgeführt, die den dreifach und den unphosphorylierten Zustand von HspB5 imitieren. Die Daten von HspB5 (wildtyp) und der Kontrolle aus Abbildung 15 sind zu Vergleichszwecken nochmals mit dargestellt.

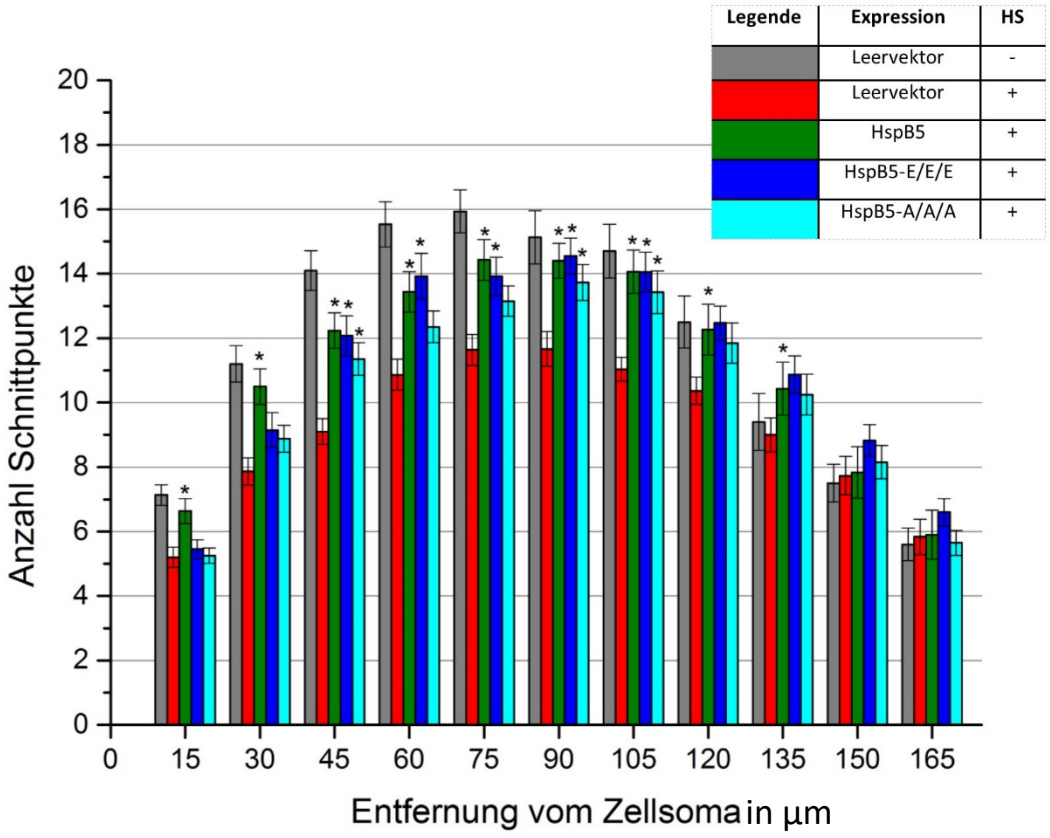

Abbildung 16: Effekt von Überexpression von HspB5-E/E/E und HspB5-A/A/A auf die dendritische Verzweigung nach Hitzeschock. Werte der Abbildung 15 sind als Referenzwerte dargestellt. Im Bereich von 45-105 µm zeigt sich bei Expression von HspB5-E/E/E (mittelblau) nach Hitzeschock (HS+ = 43 °C, 30 min) eine signifikant höhere dendritische Verzweigung. Auch die Expression von HspB5-A/A/A (hellblau) zeigt eine höhere dendritische Verzweigung, Signifikanzen sind bei 45 µm 90-105 µm erkennbar. * $p < 0.05$ versus Leervektor mit Hitzeschock (rot). n = 30 - 45 Neurone aus 3 unabhängigen Versuchen.

Die dunkelblaue Säule zeigt die Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten mit den Sholl-Ringen von Neuronen, die HspB5-E/E/E exprimierten und Hitzeschock ausgesetzt wurden. Die Anzahl war ähnlich hoch, wie bei mit Hitzeschock behandelten HspB5-wildtyp überexprimierenden Neuronen, aber signifikant höher als die gestressten Kontrollzellen (Leervektor, rote Säule, signifikante Unterschiede im Bereich von 45 - 135 µm vom Zellsoma). Dies bedeutet, dass nicht nur HspB5 wildtyp, sondern auch HspB5-E/E/E einer Hitzeschock-induzierten Rarefizierung des Dendritenbaums entgegen wirkte; eine Pseudophosphorylierung an allen drei Phosphorylierungsstellen von HspB5 zeigte den gleichen Effekt wie HspB5 (wildtyp). Interessanterweise hatte die nicht phosphorylierbare HspB5-Mutante (hellblaue Säulen) ebenfalls einen positiven Effekt, jedoch nicht so stark wie HspB5-E/E/E (signifikant im Abstand von 45 µm, 90 µm und 105 µm vom Zellsoma). Dies lässt darauf schliessen, dass die Phosphorylierung von HspB5 für seinen protektiven Effekt

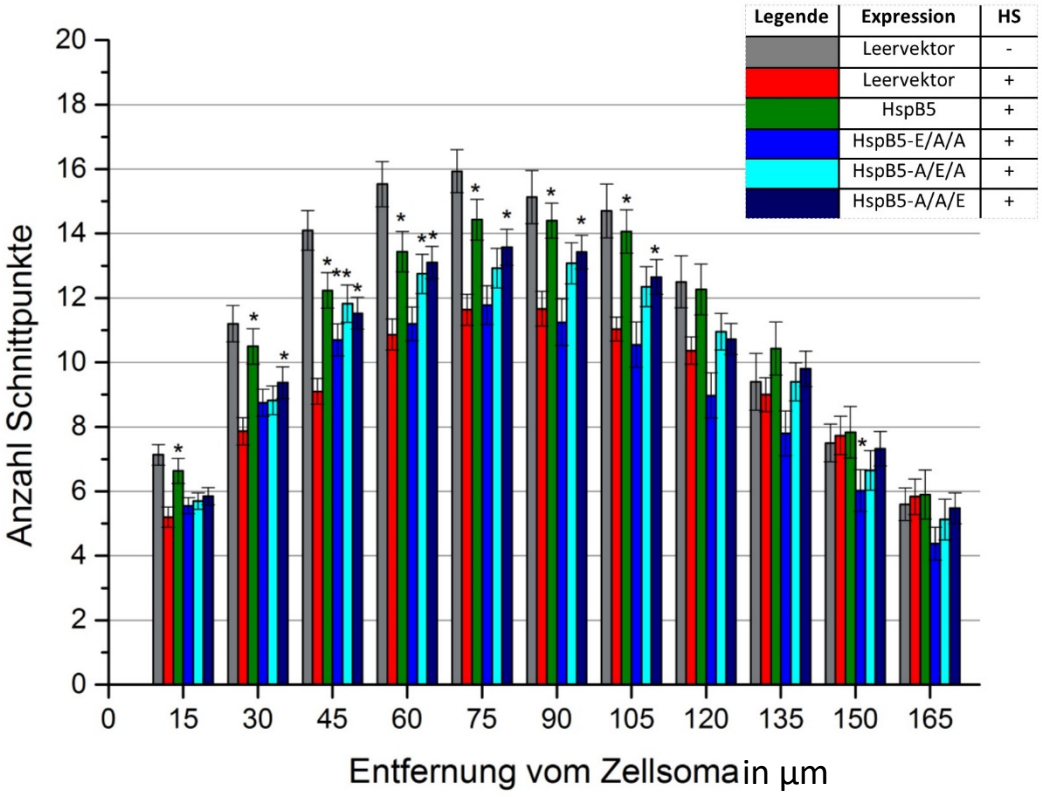

Abbildung 17: Effekt von Überexpression von HspB5-E/A/A, HspB5-A/E/A und HspB5-A/A/E auf die dendritische Verzweigung nach Hitzeschock. Zum Vergleich sind die Werte der Abbildung 15 als Referenzwerte dargestellt. Die Überexpression von HspB5-E/A/A (mittelblau) zeigt nach Hitzeschock (HS + = 43°C, 30min) vergleichbare Werte mit dem Leervektor (rot) signifikante Abweichung nur bei 45µm und 150µm. Bei Überexpression von HspB5-A/E/A (türkis) zeigt sich eine signifikant höhere dendritische Verzweigung bei 45 - 60µm vom Soma. Eine Expression von HspB5-A/A/E (dunkelblau), zeigt verglichen mit HspB5-E/A/A und HspB5-A/E/A höhere dendritische Verzweigung, Signifikanzen zeigen sich von 30µm bis 105µm. * $p<0.05$ versus Leervektor mit Hitzeschock (rot). n = 30 - 45 Neurone aus 3 unabhängigen Versuchen.

wichtig ist, jedoch auch unphosphoryliertes HspB5 einen kleinen protektiven Effekt ausüben kann. Abbildung 17 zeigt die Werte von durch Hitzeschock gestressten Neuronen, die mit HspB5-Mutanten transduziert wurden und die eine einzelne Phosphorylierung von HspB5 an den drei Phosphorylierungsstellen simulierten. Die mittelblaue Säule zeigt die Anzahl der Schnittpunkte mit Sholl-Ringen von Neuronen, die HspB5-E/A/A exprimierten. Die Anzahl unterschied sich nur unwesentlich von der Kontrolle (rot), lediglich der Wert bei 45 µm war signifikant erhöht und der Wert bei 150 µm signifikant erniedrigt. Die türkisfarbene Säule entspricht den Neuronen, diee HspB5-A/E/A exprimierten. Diese Werte sind tendenziell höher als die Werte der Expression des Leervektors mit Hitzeschock und HspB5-E/A/A, statistisch signifikant sind die Werte im Bereich von 45 - 60 µm im Vergleich zur Leervektorexpression bei Hitzeschock. Die dunkelblaue Säule entspricht den Werten von Neuronen, die HspB5-A/A/E exprimierten. Im Vergleich mit den beiden anderen dargestellten HspB5-Phosphomimetika, zeigen diese Werte die höchste Anzahl an Schnittpunkten

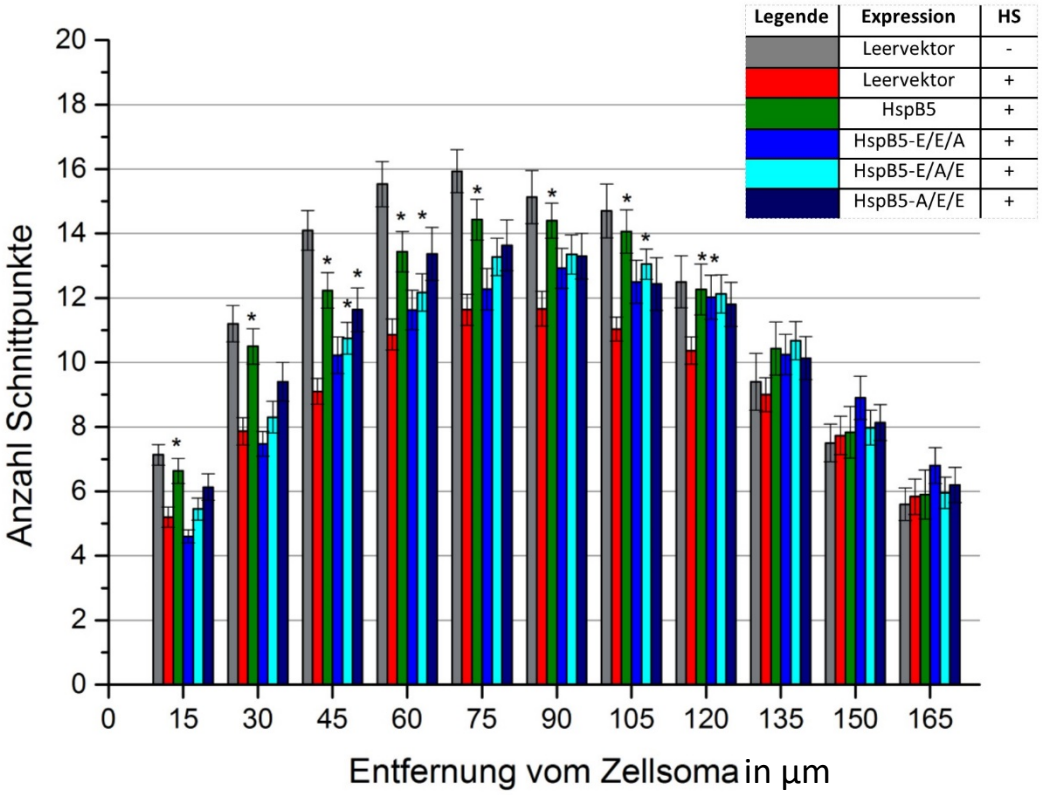

Abbildung 18: Effekt von Überexpression von HspB5-E/E/A, HspB5-E/A/E und HspB5-A/E/E auf die dendritische Verzweigung nach Hitzeschock. Zum Vergleich sind die Werte der Abbildung 15 dargestellt. Die Überexpression von HspB5-E/E/A (mittelblau) nach Hitzeschock (HS + = 43 °C, 30 min) hat einen Effekt auf den Dendritenbaum, signifikant im Bereich von 120 µm. Im Bereich 45-60 µm und 105 µm zeigt sich bei Expression von HspB5-E/A/E (hellblau) eine signifikant höhere dendritische Verzweigung. Eine Expression von HspB5-A/E/E(dunkelblau), zeigt verglichen mit HspB5-E/E/A und HspB5- E/A/E in der Tendenz eine höhere dendritische Verzweigung, signifikant bei 45 µm vom Soma. * $p < 0.05$ versus Leervektor mit Hitzeschock (rot). n = 30 - 45 Neurone aus 3 unabhängigen Versuchen.

auf. Eine statistische Signifikanz konnte für den Bereich von 30-105 µm gezeigt werden im Vergleich zur Leervektorexpression bei Hitzeschock.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der HspB5-Mutanten bei Hitzeschock unterschiedliche Effekte zeigte. Dies lässt darauf schließen, dass für die dendritische Funktion von HspB5 die Phosphorylierung an Serin 45 und bzw. oder Serin 59 von Bedeutung zu sein scheint, nicht aber von Serin 19. In vivo liegt HspB5 nicht nur einfach, sondern auch zweifach phosphoryliert vor. Daher wurde auch der Effekt von zweifach pseudophosphorylierten HspB5 auf den Dendritenbaum nach Hitzeschock untersucht (Abbildung 18). Die mittelblaue Säule stellt die Anzahl der Schnittpunkte mit Sholl-Ringen von Neuronen dar, die HspB5-E/E/A exprimierten. Im Vergleich mit den Werten einer Expression des Leervektors bei Hitzeschock, war nur der Wert im Abstand von 120 µm statistisch signifikant. Die türkisfarbene Säule zeigt die Werte für Neurone, die HspB5-E/A/E exprimierten. Diese waren gegenüber einer Expression des Leervektors bei Hitzeschock etwas erhöht und

erreichten das Signifikanzniveau im Abstand von 45 µm, 105 µm und 120 µm. Die dunkelblaue Säule zeigt die Werte der Neurone, welche HspB5-A/E/E exprimierten. Im Vergleich zu den anderen beiden gezeigten HspB5-Mutanten waren die Werte am höchsten. Eine statistische Signifikanz konnte für den Bereich von 45 µm bis 60 µm gezeigt werden. Somit zeigte die Simulation einer zweifachen Phosphorylierung von HspB5 bei Hitzeschock in einigen Bereichen signifikante Effekte. Wie schon bei einer einfach Pseudophosphorylierung des Serin 59 (Abbildung 17) durch HspB5-A/A/E, zeigte eine Expression der beiden HspB5-Mutanten, bei der eine solche Phosphorylierung imitiert wird, HspB5-E/A/E und HspB5-A/E/E, einen protektiven Effekt auf die Rarefizierung des Dendritenbaum bei Hitzeschock.
Aus den Versuchen in dieser Arbeit lassen sich verschiedene Schlüsse ableiten. Als Modellsystem für die auftretende Rarefizierung der Komplexität der Dendriten bei neurodegenerativen Erkrankungen, wurden kultivierte dissoziierte hippocampale Neurone einem Hitzeschock (43 °C, 30 min) ausgesetzt. Mittels Sholl-Analyse konnte gezeigt werden, dass es hierbei zu einer signifikanten Reduktion der Komplexität des Dendritenbaums kam. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HspB5-wildtyp in diesem Stressmodell einen protektiven Effekt auf den Dendritenbaum besaß. Die Frage, ob dieser protektive Effekt von HspB5 durch Phosphorylierung reguliert wird und wenn ja, durch welche Phosphorylierungsstellen, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es zeigte sich ein protektiver Effekt von pseudophosphoryliertem Serin 45 und Serin 59, sowohl einzeln als auch in Kombination, wohin gegen Serin 19 eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Aminosäureaustausch als Simulation der Phosphorylierung

Um die Bedeutung der Phosphorylierung von HspB5 zu untersuchen wurden in dieser Arbeit Mutanten verwendet, in denen die Phosphorylierungsstellen durch einen Aminosäureaustausch mit Glutaminsäure oder Alanin ersetzt wurden. Dadurch entsteht im Fall von Alanin nicht-phosphorylierbares HspB5, im Falle von Glutaminsäure, durch Einfügen einer negativen Ladung, pseudophosphoryliertes HspB5. Diese Methode ist ein etabliertes Modell zur Simulation des phosphorylierten und unphosphorylierten Zustands eines Proteins. Sie wird auch für viele andere Proteine erfolgreich eingesetzt. Dabei darf jedoch nicht vergessen werden, dass die Proteine nicht wirklich phosphoryliert sind.

Viele Arbeiten, die sich mit der Phosphorylierung von HspB5 beschäftigen, machen von dieser Technik gebrauch [48, 56, 65]. Jedoch wurde in keiner dieser Arbeiten alle Kombinationsmöglichkeiten der drei Phosphorylierungsstellen umfassend untersucht. Da jede der drei Phosphorylierungsstellen von HspB5, Serin 19, 45 und 59, unabhängig voneinander entweder phosphoryliert oder unphosphoryliert vorliegen können, ergeben sich acht Kombinationsmöglichkeiten. Die meisten Arbeitsgruppen haben sich auf eine unvollständige Untersuchung der Phosphorylierungsstellen beschränkt. Morrison et al. [65] verwendeten nur die drei HspB5-Mutanten HspB5-A/A/A, HspB5-A/A/E und HspB5-E/E/E und schlossen auf die Funktion von phosphoryliertem Serin-59 zurück. Ebenso verwendeten Li, Reiser et al. [56] bei Stressversuchen in Astrozyten verschiedene HspB5-Mutanten, in denen nur ein Serin mutiert wurde (S19E, S45E, S59E sowie S19A, S45A und S59A) zwei Serine (S19E-S45E, S19E-S59E, S45E-S59E und S19A-S45A, S19A-S59A, S45A-S59A) und dreifach Mutation aller Phosphorylierungsstellen (S19E-S45E-S59E und S19A-S45A-S59A). Dabei lässt sich nicht beurteilen, ob die nicht mutierten Serinreste dabei phosphoryliert waren oder nicht. Die Rolle der Phosphorylierung von HspB5, kann ohne die Betrachtung aller Möglichkeiten nicht umfassend beurteilt werden und kann kein abschließendes Bild im Ganzen liefern.

Der Vorteil der vorliegenden Arbeit war, dass durch eine Mutation aller drei Phosphorylierungsstellen jede der acht möglichen Kombinationen der Phosphorylierung untersucht werden konnten.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass andere Arbeitsgruppen für die Simulation der Phosphorylierung anstelle von Glutaminsäure, Aspartat als negativ geladene Aminosäure verwenden. Physikalisch unterscheiden sich diese beiden Aminosäuren in ihrer Struktur und in der Elektronegativität des Restes. Molekularbiologisch ist kein nennenswerter Unterschied bekannt. So verwendete Ciano et. al. [16], für die Untersuchung der chaperon-ähnlichen Funktion, HspB5-Phosphomimetika mit dem Serinaustausch durch Aspartat und erzielte vergleichbare Ergebnisse.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Apoptoseinduktion und der damit einhergehenden Aktivierung von Caspasen. Namensgebend ist die Eigenschaft dieser Cysteinyl-Aspartat spezifischen Proteasen (kurz: Caspasen) Proteine an Aspartatresten zu zerschneiden. Die Affinität zwischen den Caspasen und ihren Substraten variiert je nach Sequenz der drei Aminosäuren vor dem Aspartat [80]. Die Primärstruktur von HspB5 weist an Stelle 32 bis 36 mit der Sequenz L-E-S-D eine mögliche Bindungsstelle mit den Caspasen auf. Diese ist jedoch nicht mit den Phosphorylierungsstellen assoziiert [81]. Bei der Mutagenese von HspB5 ist es möglich, dass sich bei zusätzlich eingefügten Aspartat-Resten die Affinität zwischen HspB5 und den Caspasen erhöht. Es kann so zu ungewollten Restriktionen kommen, da Caspasen Proteine spezifisch nach Aspartatresten zerschneiden [71]. Dadurch ist eine Beeinflussung der Effekte von HspB5 bei der Pseudophosphorylierung mittels Aspartat nicht sicher ausschließen. Durch die Verwendung von Glutaminsäure konnten wir dieses erhöhte Risiko von unkontrollierten Restriktionen reduzieren.

4.1.2 Überexpression von HspB5 und den HspB5-Mutanten durch ein Lentivirales Expressionssystem

Grundlage vieler funktioneller Protein-Untersuchungen ist die Überexpression des Zielproteins. Wird nach Überexpression ein signifikanter Effekt beobachtet, kann auf das Protein zurückgeschlossen werden. Die Bandbreite an Methoden ist groß. Je nach Ziel werden für verschiedene Organismen eine Reihe von Reagenzien und Methoden bereitgehalten. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es durch die hohe Expression eines Proteins auch zu einem dominant negativen Effekt kommen kann, der nicht die eigentliche Funktion widerspiegelt. Die häufig verwendeteten Verfahren Transfektion und Transduktion müssen auf Zelltyp und Versuchsaufbau abgestimmt sein. So kann über eine Transfektion cDNA durch Transportmoleküle in die Zelle aufgenommen werden. Die Effizienz variiert jedoch sehr stark, da insbesondere Neurone mit klassischen Transfektionssystemen schwer transfizierbar sind. Eine effizientere Methode ist die Transduktion, in der die gewünschte cDNA mittels Viren

in die Zelle aufgenommen wird. Lentiviren haben das Merkmal, dass sie sehr viele Zelltypen vergleichsweise schonend infizieren können und dass sie das Transduktionslevel nicht unphysiologisch erhöhen. Damit sinkt das Risiko eines durch Überexpression verursachten dominant negativen Effektes. Die Sicherstellung einer gleichmäßig starken Überexpression ist schwierig, da innerhalb der Zelle, Abbau, Proteolyse oder Aggregation nicht kontrollierbar sind. In dieser Arbeit konnte die in der Arbeitsgruppe etablierte lentivirale HspB5-Überexpression sicher reproduziert werden. Sowohl die C6-Zellen zeigten immunhistochemisch und im Westernblot eine HspB5-Überexpression, als auch in den hippocampalen Neuronen konnte immunhistochemisch eine Überexpression dargestellt werden. In der Bewertung von funktionellen Effekten sollte die Möglichkeit mit einbezogen werden, dass die beiden überexprimierten Proteine HspB5 und ZsGreen unterschiedliche Halbwertzeiten aufweisen könnten.

Voraussetzung für die Oligomerisierung von HspB5 und viele weitere Funktionen ist eine intakte Quartärstruktur. Durch die Überexpression von HspB5 mittels bicistronischem Expressionssystem, kann auf die Verwendung eines Protein-Tags, der an das HspB5 angehängt wird, verzichtet werden. In der Literatur findet man viele Arbeiten über die Funktion von HspB5 in denen mit solchen Fusionsproteinen von HspB5 gearbeitet wurde, darunter HA-Tags [65], myc-his-Tags [56] und GFP-Proteintags [16]. Das kleine HspB5 Protein wird durch solche Zusätze unphysiologisch vergrößert. Es gilt zu bedenken, dass sich durch einen GFP-Tag welcher 26,9 kDa groß ist, das Molekulargewicht von HspB5 mehr als verdoppelt. Da anzunehmen ist, dass HspB5 mit solchen Proteintags keine normale Quartärstruktur bilden kann, wurde in dieser Arbeit ein bicistronischer Vektor verwendet, der eine physiologische Oligomerisierung erlaubt. Durch die separate Koexpression von HspB5 und ZsGreen wird das HspB5 Protein nicht durch strukturelle Anhänge bei der Oligomerisierung behindert.

4.2 Protektive Funktion von HspB5

4.2.1 Effekt von HspB5 und der Phosphorylierung von HspB5 auf Staurosporin-induzierte Apoptose in Gliomzellen

Wie in der Einleitung beschrieben, ist bekannt, dass HspB5 die Apoptose beeinflusst. In dieser Arbeit wurde in der C6-Gliomzelllinie nach Überexpression von HspB5 und den HspB5-Phosphomimetika mittels Staurosporin Apoptose induziert. Mit der TUNEL-Me-

thode konnte eine Apoptoserate von 18,23 % nach 24 h Inkubation mit Staurosporin detektiert werden. Weder das wildtyp HspB5, noch die erstellten HspB5-Mutanten zeigten einen Effekt auf die Apoptose. Dies steht zunächst in Widerspruch zu bestehender Literatur.
Nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin zeigte HspB5 einen protektiven Effekt in primären Astrozyten [56]. Die Arbeit von Li et al [56] zeigte bei Suppression der HspB5-Expression durch siRNA eine Zunahme der Apoptose von 340% auf 390%, sowie bei HspB5-Überexpression eine Reduktion von 550% auf 350%. Weiterhin konnte in der Arbeit die Bedeutung der Phosphorylierung an Serin 45 und 59 für den Apoptose-hemmenden Effekt von HspB5 gezeigt werden. Dass dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnte, kann an verschiedenen Faktoren liegen. Li et al. [56] verwendeten primäre Astrozyten, hier wurden C6-Gliomzellen benutzt. Weiterhin verwendete Li et al. [56] zur Überexpression Fusionsproteine (myc-his tag), was die Proteinfunktion beeinflussen kann. Ebenso unterscheiden sich die verwendeten HspB5-Mutanten. In der vorliegenden Arbeit wurden alle drei Serine mutiert, bei den HspB5- Mutanten von Li et al [56] blieb mindestens ein Serin unverändert. Auch an ihm konnte eine spontane Phosphorylierung stattfinden, sodass der Effekt nicht allein auf das mutierte Serin zurückzuführen war. Eine Übereinstimmung gibt es bei den Mutanten, in denen alle drei Serine ausgetauscht wurden (HspB5-E/E/E und HspB5-A/A/A). Bei gleicher Staurosporinkonzentration von 200 nM wurden die Zellen bei Li et al [56] nur für 18 Stunden dem Zellstress ausgesetzt. Damit war die Inkubationszeit 6 Stunden kürzer als in dieser Arbeit. Auch dies kann zu erheblich unterschiedlichen Effekten führen, da für Staurosporin auch eine sogenannte Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion beschrieben ist. Darüber berichten die Ergebnisse von Belmokthar et al. [6]. Dort wird beschrieben, dass in kultivierten Leukämiezelllinie der Maus (sogenannte L1210/S Zellen) nach 3 h und nach 12 h Staurosporin-Inkubation Apoptose detektiert werden konnte. Interessanterweise, konnte die frühe Apoptose mit dem Caspaseinhibitor z-VAD-fmk in der oben genannten Zelllinie blockiert werden, nicht jedoch nach 12 h Staurosporin-Inkubation. Dies führte zu der Vermutung, dass Apoptose durch einen caspase-unabhängigen Weg induziert werden kann. Ähnlich könnte auch in C6-Gliomzellen Apoptose über einen caspase-unabhängigen Mechanismus induziert werden, der nach einer Inkubation über 18 h aktiviert wird. Über welche Signale dieser Mechanismus geregelt wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Darauf hat HspB5 entweder keinen Einfluss oder der Mechanismus ist über ein „Alles oder nichts“-Prinzip gesteuert.

Übersteigt die apoptotische Wirkung einen gewissen Grad, so ist es denkbar, dass HspB5 weder durch die allgemeine chaperon-ähnliche Funktion, noch über spezielle Proteininteraktion den Zellstoffwechsel aufrechterhalten kann.
Alle diese Faktoren können dazu geführt haben, dass die Apoptoserate nach Überexpression mit HspB5 keine signifikanten protektiven oder negativen Effekte zeigte.

4.2.2 Protektion des Dendritenbaums vor Hitzeschock-induzierten Rarefizierung durch HspB5

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass HspB5 in Neuronen, die Komplexität des Dendritenbaums unter zellulärem Stress vor Rarefizierung bewahren kann. Ein Hitzeschock von 43 °C über 30 min führte bei kultivierten hippocampalen Neuronen nach 48 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der dendritischen Verzweigungen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HspB5 dieser Reduktion entgegenwirkt. Interessanterweise beschreiben bereits frühere Arbeiten, dass das Proteinlevel von HspB5 im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nach einem Hitzeschock in den gleichen Zellen um das Zweifache erhöht ist [51]. Die Auswirkungen davon wurden jedoch dort nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte nicht nur gezeigt werden, dass HspB5 eine protektive Funktion besitzt, sondern auch dass diese sehr wahrscheinlich über Phosphorylierung vermittelt wird.
Dafür spricht die unterschiedliche Wirkung der eingesetzten HspB5-Mutanten. Wurden die möglichen Kombinationen einer Phosphorylierung an den typischen Phosphorylierungsstellen simuliert, zeigten sich nach Hitzeschock variabel starke Effekte, je nachdem welche der Serine pseudo- bzw. nicht-phosphoryliert wurden. So bewirkt eine Pseudophosphorylierung von Serin 19 keine Protektion. Im Gegensatz zu den protektiven Effekten, die sich ergaben, wenn die Serine 45 und 59 durch Glutaminsäure ersetzt wurden und so eine Phosphorylierung simuliert wurde. Interessanterweise wirkte auch der dreifach unphosphorylierte Zustand von HspB5 protektiv gegenüber Hitzeschock.
Diese unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen HspB5-Mutanten weisen auf einen komplexen Wirkmechanismus hin, der aktuell noch unvollständig bekannt ist. Der protektive Effekt von HspB5 auf die Komplexität des Dendritenbaums könnte durch eine allgemeine Stabilisierung des Zytoskeletts vermittelt werden, oder durch eine Förderung der Dendritogenese oder auch durch eine neue Dynamik in spezifischer Protein-Protein Interaktion. Im Folgenden sollen nun diese potentiellen Möglichkeiten erörtert werden.

4.2.2.1 Neuronales Zytoskelett als möglicher molekularer Angriffspunkt von HspB5

Für den Erhalt der neuronalen Funktionalität ist die korrekte Dendritogenese und die dendritische Stabilität erforderlich.

Die Stabilität von Dendriten, ihre Verzweigung und ihre Reaktion auf zellulären Stress ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine wichtige Rolle spielt dabei das neuronale Zytoskelett, welches sich aus Mikrotubuli, Mikrofilamenten (F-Aktin) und Intermediärfilamenten zusammensetzt. Eine Bindung von HspB5 an Aktin und Tubulin ist in anderen Zellsystemen gut belegt [33, 78]. Beispielweise in kultivierten Herzmuskelzellen der Ratte kommt es nach Hitzeschock zu einem Nachweis von HspB5 in der unlöslichen Phase mit zytoskelettalen Anteilen. Dort konnte auch mittels konfokaler Mikroskopie die Kolokalisation von HspB5 an Aktin beschrieben werden [78]. Auch die Interaktion von HspB5 mit Tubulin ist gut belegt. In der Literatur sind fünf interaktive Sequenzen von HspB5 beschrieben, welche direkt mit Tubulin interagieren. Mikrotubuli stehen in einem Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau durch Tubulinmonomere [3, 25]. In vitro konnte gezeigt werden, dass diese Untereinheiten in einem dynamischen Gleichgewicht mit HspB5 Untereinheiten stehen und so die Balance zwischen Tubulin und Mikrotubuli regulieren [38]. Ein weiterer Mechanismus könnte die veränderte Affinität zu Bindungsproteinen durch Phosphorylierung von HspB5 sein. Wie bereits beschrieben, konnte in den Dendriten von kultivierten Neuronen eine Lokalisation von phosphorylierten HspB5 an der Zellmembran, den Synapsen und am Schaft der Dendriten beschrieben werden [75]. Bei Untersuchung von epithelialen Zellen der Augenlinse wurde in den Ausläufern von Lamellipodien die Lokalisation von HspB5 im Aktinnetzwerk beschrieben. Sie ist abhängig von der Phosphorylierung [60]. Verzweigende Dendriten bilden ebenfalls Lamellipodien aus. So besteht die Möglichkeit, dass phosphoryliertes HspB5 auch dort stabilisierend auf das Aktinnetzwerk wirkt und nach einem Hitzeschock so seine protektive Wirkung auf den Dendritenbaum entfaltet. Eine mögliche Erklärung für die, in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, könnte die direkte Interaktion zwischen diesen beiden wichtigen zytoskelettalen Molekülen und HspB5 sein.

4.2.2.2 Intrazelluläre Signalwege als mögliche Angriffspunkte für HspB5

Die Regulation der Dendritogenese ist ein Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren. Über verschiedene Signalwege wirken Transkriptonsfaktoren, Oberflächenmoleküle und Regulatoren des Zytoskeletts, darunter die Rho-GTPasen (RHOA), zusammen auf die dendritische Morphologie. Bekannt ist die Wirkung der Signalwege durch PI3K-Akt-mTOR- und die des

Ras-MAPK-Signalweges. Sie beeinflussen die Dendritenmorphologie [44, 54]. Eine Aktivierung dieser beiden Signalwege durch die Stimulation mit BDNF ist in der Literatur bereits gut beschrieben [63]. Kumar et. al [54] konnten in Dendriten von kultivierten hippocampalen Neuronen zeigen, dass über den PI3K-Akt-mTor-Signalweg die Größe der Somata und Dendriten reguliert wird. Durch Kotransfection von PI3K und Akt erhöhte sich die Gesamtlänge der Dendriten, die Anzahl der Endungen, das Kaliber und die Fläche signifikant. Diese Ergebnisse wurden von Jaworski et al. [44] bestätigt. In ihren Versuchen führte eine Aktivierung von PI3K in kultivierten hippocampalen Neuronen in der Sholl-Analyse zu einer höheren Verzweigung. Eine Inhibition von mTOR durch Rapamycin oder siRNA führte zu einer Verringerung der dendritischen Verzweigung.

In kultivierten olfaktorischen Zellen ist ein Effekt von HspB5 auf die Zunahme der Proliferation festgestellt worden. Er wird durch die Aktivierung des PI3K-Akt-mTOR Signalweges vermittelt [86]. Auch in den hippocampalen Neuronen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ist ein ähnlicher Mechanismus denkbar, der jedoch bislang noch nicht beschrieben wurde. Ein weiterer wichtiger Regulator der Dendritogenese ist die Proteinfamilie der Rho-GTPasen. Eine Schlüsselrolle haben diese Proteine darunter RhoA und dessen Effektoren, in der Bildung von Dendriten und Synapsen. Sie begünstigen über Aktivierung des arp2/3-Komplexes die dendritische Verzweigung an Aktinfilamenten. Ebenso regulieren sie auch das Gleichgewicht zwischen Auf-und Abbau der zytoskelettalen Anteile und sind in die Aufrechterhaltung der Stabilität involviert [58]. RhoA als Negativ-Regulator fördert dagegen die unverzweigte Verlängerung von Aktinfilamenten [15, 43]. Eine Interaktion zwischen RhoA und HspB5 zeigte die intravitreale Injektion von HspB5 nach Durchtrennung des Sehnervs in Ratten. Die Expression von RhoA war nicht verringert, aber das Vorliegen von aktivierten RhoA-GTP war nach HspB5 Injektion reduziert. Das verbesserte die axonale Regeneration [87]. Diese vielfältigen Mechanismen sind in den Aufbau und den Erhalt der dendritischen Verzweigung involviert und erlauben viele Interaktionsmöglichkeiten mit HspB5. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die oben beschriebenen Mechanismen einige neue Erklärungsmodelle. So kann eine Hochregulation von HspB5 bei Hitzeschock durch vermehrte direkte Interaktion zur Stabilität von Dendriten beitragen und die Depolymerisierung zytoskelettaler Anteile reduzieren. Auch eine Verstärkung der Signalwege, besonders über mTOR könnte eine weitere neue Funktion von HspB5 sein, die zu einer Protektion des Dendritenbaumes bei Hitzeschock führt.

4.2.2.3 Regulation der Funktion von HspB5 durch Phosphorylierung

In der Literatur finden sich viele Beispiele, in denen die Phosphorylierung von HspB5, dessen protektive Funktion reguliert. So wird in Herzmuskelzellen HspB5 bei Ischämie phosphoryliert und transloziert dann vom Zytoplasma an die Myofibrillen, was zu einer verbesserten Kontraktilität unter diesen Bedingungen führt [31].

In der vorliegenden Arbeit konnte für die HspB5-Mutante HspB5-E/E/E, HspB5-E/A/E, HspB5-A/A/E, HspB5-A/E/E, HspB5-A/E/A und HspB5-A/A/A protektive Effekte auf den Dendritenbaum von Neuronen nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Phosphorylierung an Serin 45 und mehr noch an Serin 59 eine wichtige Rolle spielt. Die Pseudophosphorylierung an Serin 19 hatte keinen deutlichen Effekt auf die Komplexität des Dendritenbaums. Dies ist die erste Untersuchung zur Phosphorylierung von HspB5 in Neuronen, insofern sind hier keine Vergleiche zur Literatur möglich. Li et al. [56] haben jedoch mittels Überexpression von HspB5-Phosphomimetika den anti-apoptotischen Effekt in primären Astrozyten untersucht. Auch sie konnten zeigen, dass in ihrem Experimentalsystem eine Phosphorylierung an Serin 45 und 59, nicht aber an Serin 19 für die Funktion von HspB5 von Bedeutung war. Dies bestätigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Phosphorylierung von HspB5 in Neuronen. Im Gegensatz zu Li et al [56] konnte in dieser Arbeit aber kein anti-apoptotischer Effekt auf Gliazellen gefunden werden, auch nicht von Seiten der Phosphomimetika. Die zytoprotektive Bedeutung der Phosphorylierung an Serin 59 konnte auch im Herzen gezeigt werden. Morrison et al. [65] konnten zeigen, dass in Kardiomyozyten HspB5-A/A/E und HspB5-E/E/E, aber nicht HspB5-A/A/A einen antiapoptotischen Effekt aufwies. Daraus zogen sie Rückschlüsse auf die Bedeutung der Phosphorylierung an Serin 59. Über Serin 19 und 45 konnte jedoch keine Aussage getroffen werden, da entsprechende Mutanten nicht untersucht wurden. Eine Erklärung für den beobachteten protektiven Effektes von HspB5-A/A/A in dieser Arbeit lässt sich eventuell über die Expression von endogenem HspB5 herleiten und der Eigenschaft beider Formen, Heterooligomere zu bilden. Hier wurde in den gestressten Neuronen neben den HspB5-Mimetika auch endogenes HspB5 exprimiert und phosphoryliert. Dadurch kommt es zur Bildung von Heterooligomeren mit der Beteiligung von HspB5-A/A/A und dem endogenen, phosphorylierten HspB5. Darauf könnte die protektive Funktion zurückzuführen sein. Ein ähnlicher Mechanismus ist bei Staurosporin schwer denkbar, da Staurosporin als potenter Polykinase-Inhibitor eine mögliche Phosphorylierung von endogenem HspB5 in Astrozyten hemmt und eine Bildung von protektiven Heterooligomeren unmöglich macht. Zusammenfassend lässt sich sagen,

dass der neuroprotektive Effekt von HspB5 über Phosphorylierung reguliert wird und dabei die Phosphorylierung an Serin 45 und 59 eine wichtige Rolle spielt.

4.2.3 Möglicher neuroprotektiver Effekt von HspB5 bei neurodegenerativen Erkrankungen

Viele neurodegenerative Erkrankungen gehen mit pathologischen Aggregaten von Proteinen einher. Sie scheinen für die Pathogenese ursächlich zu sein, wie in der Einleitung beschrieben. Bei all diesen Erkrankungen werden Hsps hochreguliert, auch HspB5, vermutlich um der Proteinaggregation entgegenzuwirken [24, 29, 83]. Im Folgenden soll beispielhaft auf Morbus Alzheimer eingegangen werden. Histomorphologisch lassen sich bei M. Alzheimer im Nervengewebe Amyloid-β Ablagerungen finden. Amyloid-β ist ein Abbauprodukt des Amyloid precursor proteins (APP), das sich als β-Faltblattstruktur akkumuliert und sich als neurofibrilläre Veränderungen in Form von Amyloid-Plaques ablagert. Ebenso akkumuliert hyperphosphoryliertes Tau-Protein und lässt sich nach Immunmarkierung als „Neurofibrilläre Tangles“ und Neuropil-Fäden in Nervengewebe bei M. Alzheimer darstellen, wie Braak et al. [11] nachweisen konnten.

Morphologisch zeigt sich bei Morbus Alzheimer ein reduzierter Dendritenbaum, eine reduzierte Synapsenanzahl, sowie ein Nervenzellverlust zunächst im Bereich des Hippocampus und Parahippocampus [10, 53]. Hanks et al. [34] konnten in Untersuchungen des Dendritenbaums in der CA1c Region des Hippocampus von Alzheimerpatienten eine Reduktion der Zellkörperfläche, eine reduzierte Gesamtlänge, eine verringerte Anzahl der Segmente und eine kleinere durchschnittliche Segmentlänge der apikalen Dendriten im Vergleich mit der Kontrollgruppe aufzeigen. Auch ein Neuronenverlust von 32 % bei der milden Form von M. Alzheimer in Layer II des entorhinalen Cortex wird von Gomez Isla et al. [32] beschrieben. Bei der schweren Form beträgt er sogar über 90 %.

Der Zusammenhang zwischen der veränderten Neuronenmorphologie und den Proteinablagerungen bei M. Alzheimer wurde von Anderton et al. [1] untersucht. Sie konnten zwischen der veränderten Morphologie des Dendritenbaums und der Organisation des Zytoskeletts einen Zusammenhang feststellen. Als Ursache für die veränderte Neuronenmorphologie und den im Verlauf zunehmenden Substanzverlust, kommen zum einen die intrazelluläre Ablagerungen in Frage. Sie führen u.a. zu starken Veränderungen im Zytoskelett von Dendriten und im Perikaryon betroffener Neurone. Zum anderen ist es möglich, dass es durch den Untergang von afferenten Neuronen zu einem Rückgang des Dendritenbaums durch Deafferenzierung kommt.

Die Beschreibung dieser morphologischen und histomorphologischen Veränderungen in den betroffenen Gehirnarealen bei M. Alzheimer ist wichtig, um Rückschlüsse auf molekulare Mechanismen zu ziehen.

Ein weiteres Charakteristikum ist der progrediente Verlauf von Morbus Alzheimer. Die pathologischen Veränderungen beginnen im Hippocampus und breiten sich aus, bis auch assoziierte Regionen des Isocortex betroffen sind. Nach einem Stadium der neuronalen Dysfunktion kommt es abschließend zum Zelluntergang betroffener Neurone.

HspBs sind bei M. Alzheimer hochreguliert und lassen sich neben reaktiven Astrozyten auch in Mikroglia und Oligodendrozyten bei Amyloid-β Plaques lokalisieren [73, 77]. Ebenso konnte HspB5 in sogenannten „balloned neurons“ nachgewiesen werden. Diese Neuronen wiesen dabei morphologische Veränderungen mit kleinen Zellsomata und zum Teil unsortierten Neuriten auf [61]. In-vitro Untersuchungen zeigen, dass HspB5 die Bildung von Amyloid-Fibrillen hemmt, sodass davon auszugehen ist, dass HspB5 der Plaque-Bildung entgegenwirkt. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass HspB5 die Toxizität von Amyloid- β erhöhen kann, insofern wird der Effekt von HspB5 auf Amyloid-β kontrovers diskutiert [79].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, einen protektiven Effekt von HspB5 auf den Dendritenbaum gestresster Neurone. Es konnte gezeigt werden, dass HspB5 einer Hitzeschock-induzierten Rarefizierung des Dendritenbaums entgegenwirkt. Möglicherweise ist diese dendritische Funktion von HspB5 auch bei der Rarefizierung von Dendriten durch andere Ursachen, wie z.B. bei M. Alzheimer, zu beobachten. Es ist möglich, dass endogenes HspB5 in einem frühen Stadium den pathologischen Veränderungen des neuronalen Zytoskeletts entgegenwirkt und als Schutzmechanismus vor den krankheitstypischen Veränderungen hochreguliert werden kann. Dieser Schutzmechanismus könnte möglicherweise als Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapien dienen.

5 Zusammenfassung

Die endogene Stressantwort der Zellen beinhaltet die Hochregulation von Hitzeschockprotein B5 (HspB5), dass die Toxizität denaturierter Proteine durch die typische chaperon-ähnliche Funktion verringert und protektiv auf die Zelle wirkt. Die Funktion von HspB5 wird über Phosphorylierung an Serin 19, 45 und 59 reguliert. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Phosphorylierung von HspB5 in Nervengewebe zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Effekt der Phosphorylierung auf die antiapoptotische Funktion von HspB5 in Gliazellen untersucht, im zweiten Teil die Auswirkung auf die Komplexität des Dendritenbaums in Neuronen. Um die Phosphorylierung zu untersuchen, wurden die drei Serine mittels ortsspezifischer Mutagenese durch Alanin (A) oder Glutaminsäure (E) ersetzt. Mit dem negativ geladenen Carboxylrest der Glutaminsäure wird eine Phosphorylierung simuliert. An Alanin kann dagegen keine Phosphorylierung stattfinden, sodass der unphosphorylierte Zustand simuliert wird. Es wurden acht HspB5-Mutanten (HspB5-E/E/E, -E/E/A, -E/A/E, -A/E/E, -E/A/A, -A/A/E, -A/E/A und -A/A/A) verwendet und mittels eines lentiviralen Expressionssystems in C6-Gliomzellen oder in kultivierten hippocampalen Neuronen überexprimiert. Zur Untersuchung des antiapoptotischen Effekts von HspB5 in der C6-Gliomzelllinie wurde Staurosporin verwendet und die Apoptose mit dem sogenannten TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL-Methode) quantifiziert. Die Inkubation mit 200 nM Staurosporin für 24 h, induzierte eine Apoptoserate 18,23 % ± 3,06 %. Ein protektiver Effekt durch HspB5 und seiner Phosphorylierung, konnte in diesem Apoptoseversuch, entgegen der Literatur, nicht bestätigt werden. Es ist bekannt, dass HspB5 in kultivierten Neuronen die Komplexität des Dendritenbaums erhöht. Um zu untersuchen, ob HspB5 unter Stressbedingungen einer Rarefizierung der Dendriten entgegenwirkt, wurden zunächst Stressbedingungen etabliert, die zu einer Reduktion der dendritischen Verzweigung führen. Ein Hitzeschock von 43 °C für 30 min konnte den Dendritenbaum signifikant reduzieren. Eine Überexpression von HspB5 wirkte diesem Prozess entgegen. Ebenso zeigte sich ein protektiver Effekt auf den Dendritenbaum bei Überexpression der HspB5-Mutanten, die eine Phosphorylierung an Serin 45 und/oder 59 simulierten, so dass daraus geschlossen werden kann, dass eine Phosphorylierung an Serin 45 und 59, nicht aber an Serin 19, für die dendritische Funktion von HspB5 von Bedeutung ist. Interessanterweise hat auch die nicht phosphorylierbare Form HspB5-A/A/A einen mit dem wildtyp HspB5 vergleichbar protektiven Effekt. Das bedarf weiterer Untersuchungen. In dieser Arbeit konnte somit ein neuer

Wirkmechanismus von HspB5 identifiziert werden, nämlich die Protektion des Dendritenbaums vor Hitzeschock-induzierter Rarefizierung. Möglicherweise kann HspB5 auch bei anderen Stressarten protektiv auf die Morphologie des Dendritenbaums wirken, z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen.

Dabei könnte eine Hochregulation von HspB5 die Rarefizierung des Dendritenbaumes und die Progredienz des Substanzverlustes verlangsamen und durch diese neue dendritische Funktion bei Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen eine protektive Rolle einnehmen und als Zielstruktur für therapeutische Ansätze dienen.

6 Literatur

[1] ANDERTON, B. H., L. CALLAHAN, P. COLEMAN, P. DAVIES, D. FLOOD, G. A. JICHA, T. OHM UND C. WEAVER: *Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes.* Prog Neurobiol, 55:595-609 (1998)

[2] AQUILINA, J. A., J.L. BENESCH, O. A. BATEMAN, C. SLINGSBY UND C. V. ROBINSON: *Polydispersity of a mammalian chaperone: mass spectrometry reveals the population of oligomers in alphaB-crystallin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 100:10611-10616 (2003)

[3] ARAI, H. U. Y. A.: *Chaperone activity of alpha B-crystallin suppresses tubulin aggregation through complex formation.* Cell Struct Funct, 22:539-544 (1997)

[4] BARTELT-KIRBACH, B., M. MORON, M. GLOMB, C. M. BECK, M. P. WELLER UND N. GOLENHOFEN: *HspB5/alphaB-crystallin increases dendritic complexity and protects the dendritic arbor during heat shock in cultured rat hippocampal neurons.* Cell Mol Life Sci, 73:3761-3775 (2016)

[5] BASHA, E., H. O'NEILL UND E. VIERLING: *Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions.* Trends Biochem Sci, 37:106-117 (2012)

[6] BELMOKHTAR, C. A., J. HILLION UND E. SEGAL-BENDIRDJIAN: *Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms.* Oncogene, 20:3354-3362 (2001)

[7] BHAT, S. P. U. C. N. N.: *alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues.* Biochem Biophys Res Commun, 158:319-325 (1989)

[8] BHATTACHARYYA, J., E. G. PADMANABHA UDUPA, J. WANG UND K. K. SHARMA: *Mini-alphaB-crystallin: a functional element of alphaB-crystallin with chaperone-like activity.* Biochemistry, 45:3069-3076 (2006)

[9] BJORKDAHL, C., M. J. SJOGREN, X. ZHOU, X., H. CONCHA, J. AVILA, B. WINBLAD UND J. J. PEI: *Small heat shock proteins Hsp27 or alphaB-crystallin and the protein components of neurofibrillary tangles: tau and neurofilaments.* J Neurosci Res, 86:1343-1352 (2008)

[10] BOUTET, C., M. CHUPIN, S. LEHERICY, L. MARRAKCHI-KACEM, S. EPELBAUM, C. POUPON, C. WIGGINS, A. VIGNAUD, D. HASBOUN, B. DEFONTAINES, O. HANON, B. DUBOIS, M. SARAZIN, L. HERTZ-PANNIER und O. COLLIOT: *Detection of volume loss in hippocampal layers in Alzheimer's disease using 7 T MRI: a feasibility study.* Neuroimage Clin, 5:341-348 (2014)

[11] BRAAK, H. und E. BRAAK: *Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes.* Acta Neuropathol, 82:239-259 (1991)

[12] BROWNELL, S. E., R. A. BECKER und L. STEINMAN: *The protective and therapeutic function of small heat shock proteins in neurological diseases.* Front Immunol, 3:74 (2012)

[13] CAJAL, R. Y.: *Estructura de los centros nerviosos de las aves.* Rev. Trim. Histol. Norm. Pat., (1888)

[14] CALDERWOOD, S. K., M. A. KHALEQUE, D. B. SAWYER und D. R. CIOCCA: *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis.* Trends Biochem Sci, 31:164-172 (2006)

[15] CHEN, H. und B. L. FIRESTEIN: *RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels.* J Neurosci, 27:8378-8386 (2007)

[16] CIANO, M., S. ALLOCCA, M. C. CIARDULLI, L. DELLA VOLPE, S. BONATTI und M. D'AGOSTINO: *Differential phosphorylation-based regulation of alphaB-crystallin chaperone activity for multipass transmembrane proteins.* Biochem Biophys Res Commun, 479:325-330 (2016)

[17] CIOCCA, D. R., A. P. ARRIGO und S. K. CALDERWOOD: *Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update.* Arch Toxicol, 87:19-48 (2013)

[18] DE JONG, W. W., G. J. CASPERS und J. A. LEUNISSEN: *Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily.* Int J Biol Macromol, 22:151-162 (1998)

[19] DE THONEL, A., A. LE MOUEL und V. MEZGER: *Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond.* Int J Biochem Cell Biol, 44:1593-1612 (2012)

[20] DELBECQ, S. P. und R. E. KLEVIT: *One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin.* FEBS Lett, 587:1073-1080 (2013)

[21] DEN ENGELSMAN, J., D. GERRITS, W. W. DE JONG, J. ROBBINS, K. KATO und W. C. BOELENS: *Nuclear import of {alpha}B-crystallin is phosphorylation-dependent and hampered by hyperphosphorylation of the myopathy-related mutant R120G.* J Biol Chem, 280:37139-37148 (2005)

[22] DEUSCHL, G. M., W.: *S3-Leitlinie „Demenzen“.* (2016) http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/038-013l_S3-Demenzen-2016-07.pdf (01.04.2018)

[23] ELLIS, J.: *Proteins as molecular chaperones.* Nature, 328:378-379 (1987)

[24] FORMAN, M. S., J. Q. TROJANOWSKI und V. M. LEE: *Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs.* Nat Med, 10:1055-1063 (2004)

[25] FUJITA, Y., E. OHTO, E. KATAYAMA und Y. ATOMI: *alphaB-Crystallin-coated MAP microtubule resists nocodazole and calcium-induced disassembly.* J Cell Sci, 117:1719-1726 (2004)

[26] GARRIDO, C., C. PAUL, R. SEIGNEURIC und H. H. KAMPINGA: *The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones.* Int J Biochem Cell Biol, 44:1588-1592 (2012)

[27] GOLENHOFEN, N., A. ARBEITER, R. KOOB und D. DRENCKHAHN: *Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin.* J Mol Cell Cardiol, 34:309-319 (2002)

[28] GOLENHOFEN, N. und B. BARTELT-KIRBACH: *HspB5/αB-Crystallin in the Brain*. In: R.M. Tanguay und L.E. Hightower (Hrsg) *The Big Book on Small Heat Shock Proteins,* Springer, Quebec, S. 365 - 381 (2015)

[29] GOLENHOFEN, N. und B. BARTELT-KIRBACH: *The Impact of Small Heat Shock Proteins (HspBs) in Alzheimer's and Other Neurological Diseases.* Curr Pharm Des, 22:4050-4062 (2016)

[30] GOLENHOFEN, N., P. HTUN, W. NESS, R. KOOB, W. SCHAPER und D. DRENCKHAHN: *Binding of the stress protein alpha B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial damage during ischemia/reperfusion in vivo.* J Mol Cell Cardiol, 31:569-580 (1999)

[31] GOLENHOFEN, N., W. NESS, R. KOOB, P. HTUN, W. SCHAPER und D. DRENCKHAHN: *Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein alpha B-crystallin to Z lines of myocardium.* Am J Physiol, 274:H1457-1464 (1998)

[32] GOMEZ-ISLA, T., J. L. PRICE, D. W. MCKEEL, JR., J. C. MORRIS, J. H. GROWDON und B. T. HYMAN: *Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease.* J Neurosci, 16:4491-4500 (1996)

[33] GOPALAKRISHNAN, S., D. BOYLE und L. TAKEMOTO: *Association of actin with alpha crystallins.* Trans Kans Acad Sci, 96:7-12 (1993)

[34] HANKS, S. D. und D. G. FLOOD: *Region-specific stability of dendritic extent in normal human aging and regression in Alzheimer's disease. I. CA1 of hippocampus.* Brain Res, 540:63-82 (1991)

[35] HASLBECK, M., T. FRANZMANN, D. WEINFURTNER und J. BUCHNER: *Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins.* Nat Struct Mol Biol, 12:842-846 (2005)

[36] HOCHBERG, G. K., H. ECROYD, C. LIU, D. COX, D. CASCIO, M. R. SAWAYA, M. P. COLLIER, J. STROUD, J. A. CARVER, A. J. BALDWIN,

C. V. ROBINSON, D. S. EISENBERG, J. L. BENESCH und A. LAGANOWSKY: *The structured core domain of alphaB-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 111:E1562-1570 (2014)

[37] HORWITZ, J.: *Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone.* Proc Natl Acad Sci U S A, 89:10449-10453 (1992)

[38] HOUCK, S. A. und J. I. CLARK: *Dynamic subunit exchange and the regulation of microtubule assembly by the stress response protein human alphaB crystallin.* PLoS One, 5:e11795 (2010)

[39] ITO, H., K. OKAMOTO, H. NAKAYAMA, T. ISOBE und K. KATO: *Phosphorylation of alphaB-crystallin in response to various types of stress.* J Biol Chem, 272:29934-29941 (1997)

[40] IWAKI, T., A. KUME-IWAKI, R. K. LIEM und J. E. GOLDMAN: *Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain.* Cell, 57:71-78 (1989)

[41] IWAKI, T., T. WISNIEWSKI, A. IWAKI, E. CORBIN, N. TOMOKANE, J. TATEISHI und J. E. GOLDMAN: *Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions.* Am J Pathol, 140:345-356 (1992)

[42] JAKOB, U., M. GAESTEL, K. ENGEL und J. BUCHNER: *Small heat shock proteins are molecular chaperones.* J Biol Chem, 268:1517-1520 (1993)

[43] JAN, Y. N. und L. Y. JAN: *Branching out: mechanisms of dendritic arborization.* Nat Rev Neurosci, 11:316-328 (2010)

[44] JAWORSKI, J., S. SPANGLER, D. P. SEEBURG, C. C. HOOGENRAAD und M. SHENG: *Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway.* J Neurosci, 25:11300-11312 (2005)

[45] JEGO, G., A. HAZOUME, R. SEIGNEURIC und C. GARRIDO: *Targeting heat shock proteins in cancer.* Cancer Lett, 332:275-285 (2013)

[46] JEHLE, S., B. S. VOLLMAR, B. BARDIAUX, K. K. DOVE, P. RAJAGOPAL, T. GONEN, H. OSCHKINAT und R. E. KLEVIT: *N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 108:6409-6414 (2011)

[47] KAMPINGA, H. H., J. HAGEMAN, M. J. VOS, H. KUBOTA, R. M. TANGUAY, E. A. BRUFORD, M. E. CHEETHAM, B. CHEN und L. E. HIGHTOWER: *Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins.* Cell Stress Chaperones, 14:105-111 (2009)

[48] KAMRADT, M. C., F. CHEN, S. SAM und V. L. CRYNS: *The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during*

myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. J Biol Chem, 277:38731-38736 (2002)

[49] KANTOROW, M. und J. PIATIGORSKY: *Alpha-crystallin/small heat shock protein has autokinase activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 91:3112-3116 (1994)

[50] KATO, K., H. ITO, K. KAMEI, Y. INAGUMA, I. IWAMOTO und S. SAGA: *Phosphorylation of alphaB-crystallin in mitotic cells and identification of enzymatic activities responsible for phosphorylation.* J Biol Chem, 273:28346-28354 (1998)

[51] KIRBACH, B. B. und N. GOLENHOFEN: *Differential expression and induction of small heat shock proteins in rat brain and cultured hippocampal neurons.* J Neurosci Res, 89:162-175 (2011)

[52] KRIEHUBER, T., T. RATTEI, T. WEINMAIER, A. BEPPERLING, M. HASLBECK und J. BUCHNER: *Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins.* FASEB J, 24:3633-3642 (2010)

[53] KULKARNI, V. A. und B. L. FIRESTEIN: *The dendritic tree and brain disorders.* Mol Cell Neurosci, 50:10-20 (2012)

[54] KUMAR, V., M. X. ZHANG, M. W. SWANK, J. KUNZ und G. Y. WU: *Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways.* J Neurosci, 25:11288-11299 (2005)

[55] LAVOIE, J. N., M. NGUYEN, R. C. MARCELLUS, P. E. BRANTON und G. C. SHORE: *E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk.* J Cell Biol, 140:637-645 (1998)

[56] LI, R. und G. REISER: *Phosphorylation of Ser45 and Ser59 of alphaB-crystallin and p38/extracellular regulated kinase activity determine alphaB-crystallin-mediated protection of rat brain astrocytes from C2-ceramide- and staurosporine-induced cell death.* J Neurochem, 118:354-364 (2011)

[57] LOPEZ-GONZALEZ, I., M. CARMONA, L. ARREGUI, G. G. KOVACS und I. FERRER: *alphaB-crystallin and HSP27 in glial cells in tauopathies.* Neuropathology, 34:517-526 (2014)

[58] LUO, L.: *Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity.* Annu Rev Cell Dev Biol, 18:601-635 (2002)

[59] MACKENZIE, I. R., M. NEUMANN, E. H. BIGIO, N. J. CAIRNS, I. ALAFUZOFF, J. KRIL, G. G. KOVACS, B. GHETTI, G. HALLIDAY, I. E. HOLM, P. G. INCE, W. KAMPHORST, T. REVESZ, A. J. ROZEMULLER, S. KUMAR-SINGH, H. AKIYAMA, A. BABORIE, S. SPINA, D. W. DICKSON, J. Q. TROJANOWSKI und D. M. MANN: *Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update.* Acta Neuropathol, 119:1-4 (2010)

[60] MADDALA, R. und V. P. RAO: *alpha-Crystallin localizes to the leading edges of migrating lens epithelial cells.* Exp Cell Res, 306:203-215 (2005)

[61] MAO, J. J., S. KATAYAMA, C. WATANABE, Y. HARADA, K. NODA, Y. YAMAMURA und S. NAKAMURA: *The relationship between alphaB-crystallin and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.* Neuropathol Appl Neurobiol, 27:180-188 (2001)

[62] MAO, Y. W., J. P. LIU, H. XIANG und D. W. LI: *Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis.* Cell Death Differ, 11:512-526 (2004)

[63] MCALLISTER, A. K., L. C. KATZ und D. C. LO: *Neurotrophins and synaptic plasticity.* Annu Rev Neurosci, 22:295-318 (1999)

[64] MÖRNER CARL, T., *Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den leichtbrechenden Medien des Auges I*, in *Zeitschrift für physiologische Chemie*. 1894. p. 61.

[65] MORRISON, L. E., H. E. HOOVER, D. J. THUERAUF und C. C. GLEMBOTSKI: *Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis.* Circ Res, 92:203-211 (2003)

[66] MYMRIKOV, E. V., A. S. SEIT-NEBI und N. B. GUSEV: *Large potentials of small heat shock proteins.* Physiol Rev, 91:1123-1159 (2011)

[67] NANBU, K., I. KONISHI, M. MANDAI, H. KURODA, A. A. HAMID, T. KOMATSU und T. MORI: *Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas.* Cancer Detect Prev, 22:549-555 (1998)

[68] PELHAM, H. R.: *Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins.* Cell, 46:959-961 (1986)

[69] PESCHEK, J., N. BRAUN, J. ROHRBERG, K. C. BACK, T. KRIEHUBER, A. KASTENMULLER, S. WEINKAUF und J. BUCHNER: *Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of alphaB-crystallin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 110:E3780-3789 (2013)

[70] POPESCU, B. O. und M. ANKARCRONA: *Mechanisms of cell death in Alzheimer's disease: role of presenilins.* J Alzheimers Dis, 6:123-128 (2004)

[71] POREBA, M., A. STROZYK, G. S. SALVESEN und M. DRAG: *Caspase substrates and inhibitors.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 5:a008680 (2013)

[72] PRINCE, M.: *World Alzheimer Report 2015*. (2015) https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf (01.04.2018)

[73] RENKAWEK, K., C. E. VOORTER, G. J. BOSMAN, F. P. VAN WORKUM und W. W. DE JONG: *Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease.* Acta Neuropathol, 87:155-160 (1994)

[74] RITOSSA, F.: *A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila.* Experientia, 18:571-573 (1962)

[75] SCHMIDT, T., B. BARTELT-KIRBACH und N. GOLENHOFEN: *Phosphorylation-dependent subcellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/alphaB-crystallin in cultured hippocampal neurons.* Histochem Cell Biol, 138:407-418 (2012)

[76] SHERMAN, M. und G. MULTHOFF: *Heat shock proteins in cancer.* Ann N Y Acad Sci, 1113:192-201 (2007)

[77] SHINOHARA, H., Y. INAGUMA, S. GOTO, T. INAGAKI und K. KATO: *Alpha B crystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease.* J Neurol Sci, 119:203-208 (1993)

[78] SINGH, B. N., K. S. RAO, T. RAMAKRISHNA, N. RANGARAJ und M. RAO CH: *Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo.* J Mol Biol, 366:756-767 (2007)

[79] STEGE, G. J., K. RENKAWEK, P. S. OVERKAMP, P. VERSCHUURE, A. F. VAN RIJK, A. REIJNEN-AALBERS, W. C. BOELENS, G. J. BOSMAN und W. W. DE JONG: *The molecular chaperone alphaB-crystallin enhances amyloid beta neurotoxicity.* Biochem Biophys Res Commun, 262:152-156 (1999)

[80] TALANIAN, R. V., C. QUINLAN, S. TRAUTZ, M. C. HACKETT, J. A. MANKOVICH, D. BANACH, T. GHAYUR, K. D. BRADY und W. W. WONG: *Substrate specificities of caspase family proteases.* J Biol Chem, 272:9677-9682 (1997)

[81] THORNBERRY, N. A., T. A. RANO, E. P. PETERSON, D. M. RASPER, T. TIMKEY, M. GARCIA-CALVO, V. M. HOUTZAGER, P. A. NORDSTROM, S. ROY, J. P. VAILLANCOURT, K. T. CHAPMAN und D. W. NICHOLSON: *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis.* J Biol Chem, 272:17907-17911 (1997)

[82] TISSIERES, A., H. K. MITCHELL und U. M. TRACY: *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs.* J Mol Biol, 84:389-398 (1974)

[83] VAN VEEN, T., L. VAN WINSEN, J. B. CRUSIUS, N. F. KALKERS, F. BARKHOF, A. S. PENA, C. H. POLMAN und B. M. UITDEHAAG: *[Alpha]B-crystallin genotype has impact on the multiple sclerosis phenotype.* Neurology, 61:1245-1249 (2003)

[84] VICART, P., A. CARON, P. GUICHENEY, Z. LI, M. C. PREVOST, A. FAURE, D. CHATEAU, F. CHAPON, F. TOME, J. M. DUPRET, D. PAULIN und M. FARDEAU: *A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy.* Nat Genet, 20:92-95 (1998)

[85] WANG, X., H. OSINSKA, R. KLEVITSKY, A. M. GERDES, M. NIEMAN, J. LORENZ, T. HEWETT und J. ROBBINS: *Expression of R120G-alphaB-crystallin causes aberrant desmin and alphaB-crystallin aggregation and cardiomyopathy in mice.* Circ Res, 89:84-91 (2001)

[86] WANG, Y. H., Y. C. LI, S. J. HUO und Z. Q. YIN: *Alpha-crystallin promotes rat olfactory ensheathing cells survival and proliferation through regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathways.* Neurosci Lett, 531:170-175 (2012)

[87] WANG, Y. H., D. W. WANG, N. WU, Y. WANG und Z. Q. YIN: *alpha-Crystallin promotes rat axonal regeneration through regulation of RhoA/rock/cofilin/MLC signaling pathways.* J Mol Neurosci, 46:138-144 (2012)

[88] WEIH, M., K. KALLENBERG, A. BERGK, U. DIRNAGL, L. HARMS, K. D. WERNECKE und K. M. EINHAUPL: *Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain?* Stroke, 30:1851-1854 (1999)

[89] WETTSTEIN, G., P. S. BELLAYE, O. MICHEAU und P. BONNIAUD: *Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity?* Int J Biochem Cell Biol, 44:1680-1686 (2012)

[90] WISTOW, G. J. und J. PIATIGORSKY: *Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue.* Annu Rev Biochem, 57:479-504 (1988)

[91] WYLLIE, A. H.: *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.* Nature, 284:555-556 (1980)

[92] XI, J. H., F. BAI, R. MCGAHA und U. P. ANDLEY: *Alpha-crystallin expression affects microtubule assembly and prevents their aggregation.* FASEB J, 20:846-857 (2006)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der kleinen Hitzeschockproteine (HspBs). 6
Tabelle 2: Mutageneseprimer. 17
Tabelle 3: Ansatz des ersten Mutagenese-Zyklus. 19
Tabelle 4: Ansätze des zweiten Mutagenese-Zyklus. 19
Tabelle 5: Ansätze des dritten Mutagenese-Zyklus. 19
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Zellzahl und Volumen 28
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Neuronen Zahl und Volumen. 31
Tabelle 8: Antikörper Immunzytochemie. 34
Tabelle 9: Antikörper Proteindetektion 39
Tabelle 10: Aminosäureaustausch an Codon 19 in der Sequenzkontrolle. 43
Tabelle 11: Aminosäureaustausch an Codon 45 in der Sequenzkontrolle des 2.Zyklus. 43
Tabelle 12: Aminosäureaustausch an Codon 59 in der Sequenzkontrolle des 3.Zyklus 44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der HspB5 Struktur. 7
Abbildung 2: pLVX-IRES-ZsGreen 1 Vektor. 23
Abbildung 3: Abfolge der einzelnen Mutagenese-Zyklen. 41
Abbildung 4: Kontrolle der PCR durch Gelelektrophorese. 43
Abbildung 5: Restriktionsverdau zur Kontrolle der Umklonierung der HspB5-Konstrukte in den pLVX-IRES-ZsGreen Vektor. 45
Abbildung 6: Nachweis der Transduktion und Überexpression von HspB5 und den HspB5-Konstrukten in C6-Zellen. 47
Abbildung 7: Nachweis der Überexpression von HspB5 und den HspB5-Phosphomimetika in C6-Zellen im Immunoblot. 48
Abbildung 8: Etablierung einer geeigneten Staurosporinkonzentration zur Apoptoseinduktion in C6-Gliomzellen. 50
Abbildung 9: TUNEL nach Apoptoseinduktion in transduzierten C6-Gliomellen. 51
Abbildung 10: Anteil der TUNEL-positiven Zellkerne nach Apoptoseinduktion an C6-Gliomzellen durch 200 nM Staurosporin. 52
Abbildung 11: Nachweis der Transduktion und Überexpression von HspB5 und den HspB5-Mutanten in hippocampalen Neuronen. 54
Abbildung 12: Methodik der Sholl-Analyse. 55
Abbildung 13: Hitzeschock vermindert die Komplexität des Dendritenbaums in hippocampalen Neuronen. 57
Abbildung 14: Schema des Versuchsverlaufs. 58
Abbildung 15: HspB5 wirkt der Rarefizierung der dendritischen Verzweigung in hippocampalen Neuronen nach Hitzeschock entgegen. 59
Abbildung 16: Effekt von Überexpression von HspB5-E/E/E und HspB5-A/A/A auf die dendritische Verzweigung nach Hitzeschock. 61
Abbildung 17: Effekt von Überexpression von HspB5-E/A/A, HspB5-A/E/A und HspB5-A/A/E auf die dendritische Verzweigung nach Hitzeschock. 62
Abbildung 18: Effekt von Überexpression von HspB5-E/E/A, HspB5-E/A/E und HspB5-A/E/E auf die dendritische Verzweigung nach Hitzeschock. 63

Danksagung

Die Inhalte der Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Die Inhalte der Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Die Inhalte der Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.