Universität Ulm

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Institutsleiter: Prof. Dr. med. Tobias Böckers

Phosphorylierungsabhängige Interaktion von HspB5 mit seinem Zielprotein α-Tubulin

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

Eingereicht von: Lennart Schawinsky

Geburtsort: Köln

Jahr der Einreichung: 2020

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Nikola Golenhofen
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Deniz Yilmazer-Hanke
Tag der Promotion:	29. April 2022

Widmung

Ich möchte diese Arbeit meinen Eltern Claudia Rühr und Karl Schawinsky widmen, die mir die wunderbare Möglichkeit gegeben haben, Medizin zu studieren und mich in allen Richtungen dieses Studiums auszuprobieren. Sei es in der Lehre mit anderen Medizinstudierenden oder in der Forschung im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Ulm. Diese Zeit beinhaltet unzählbar viele wertvolle Erinnerungen und Erlebnisse, die mich sehr bereichern. Ich möchte diese Arbeit auch meiner Freundin Magdalena Engelmann widmen, die mir über die vergangenen Jahre mit ihrer liebevollen Art und aufmunternden Worten zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Die zelluläre Stressantwort 1
1.2 Das Hitzeschockprotein HspB5/ αB-Crystallin 1
1.2.1 Die Proteinfamilie der HspBs 1
1.2.2 Struktur und Phosphorylierung von HspB5 2
1.2.3 Expressionsmuster von HspB5 3
1.2.4 HspB5 und Neuroprotektion 4
1.3 Mikrotubuli 5
1.3.1 Aufbau von Mikrotubuli 5
1.3.2 Mikrotubuli in Neuronen und Gliazellen 6
1.3.3 Interaktion von HspB5 mit Mikrotubuli 7
1.4 Fragestellung 7
2 Material und Methoden 9
2.1 Materialien 9
2.1.1 Chemikalien 9
2.1.2 Antikörper 11
2.1.3 Bakterien – E.coli-Stämme 12
2.1.4 Enzyme 12
2.1.5 Geräte 12
2.1.6 Kits 15
2.1.7 Marker 15
2.1.8 Primer 16
2.1.9 Vektoren 16
2.1.10 Verwendete Plasmide 17
2.1.11 Verbrauchsmaterialien 18
2.1.12 Zelllinien 20
2.2 Methoden 20
2.2.1 Zellkultur 20
2.2.2 Molekularbiologie 23
2.2.3 Proteinbiochemie 29

2.2.4 Datenerhebung und Analyse ... 43
3 Ergebnisse ... 44
3.1 Untersuchung des Effektes von HspB5 und seiner Phosphorylierung auf das Mikrotubulussystem in C6-Gliomzellen ... 44
3.1.1 Überexpression von HspB5 und seinen Mutanten in kultivierten C6-Zellen ... 44
3.1.2 Depolymerisation von Mikrotubuli in kultivierten C6-Zellen durch Nocodazol ... 46
3.1.3 Beeinflussung der Mikrotubulistabilität durch Überexpression von HspB5 und seinen Phosphomimetika ... 47
3.2 *In-vitro*-Untersuchung zur Bedeutung der Phosphorylierung von HspB5 bei seiner Interaktion mit Tubulin ... 50
3.2.1 Rekombinante Synthese von HspB5 und seinen Mutanten ... 50
3.2.2 Bindungsstudien zwischen HspB5 und seinen Mutanten mit Tubulin ... 59
3.3 Kurzzusammenfassung ... 63
4 Diskussion ... 64
4.1 Methodendiskussion ... 64
4.1.1 Methoden zur Simulation der Phosphorylierung von HspB5 ... 64
4.1.2 Überexpression von HspB5 und seinen Phosphomimetika in C6-Zellen ... 65
4.1.3 Rekombinante Synthese von HspB5 mit Polyhistidin-Rest ... 66
4.2 Effekt von HspB5 auf die Stabilität von Mikrotubuli in C6-Gliomzellen ... 67
4.3 *In-vitro*-Untersuchung der phosphorylierungsabhängigen Interaktion von HspB5 mit α-Tubulin ... 70
4.4 Mögliche Bedeutung der Interaktion von HspB5 und Tubulin *in vivo* ... 72
5 Zusammenfassung ... 74
6 Literaturverzeichnis ... 75
Abbildungsverzeichnis ... 84
Tabellenverzeichnis ... 86
Danksagung ... 87
Lebenslauf ... 88

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
(et) al.	(et) alia
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Amp^r	Resistenzgen, Beta-Laktamase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
CA1	Cornu Ammonis 1
Ca^{2+}	Calcium-(2+)-Ion
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
$DMEM^+$	DMEM+FBS
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Codierende DNA
DNAse	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
E (1-9)	Eluate (1-9)
EAE	Experimentell erzeugte Autoimmunenzephalitis
ECL	Enhanced Chemiluminescent
E. coli	Escherichia coli
EcoRI	E. coli Restriktionsenzym 1

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure
FBS	Fetal Bovine Serum
Fus	Fused in Sarcoma
G	Globulär
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GR	Gene Ruler
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
Hn	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hsp	Hitzeschockprotein
sHsp/ HspB	Kleines Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
IXI	Isoleucin-Variable X-Isoleucin
(-) K	(Negativ-) Kontrolle
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LacI	Lac-Repressor
LB	Lysogeny Broth
M	Marker

M.	Morbus
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAP-Kinase	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-aktivierte-Proteinkinase
MCS	Multiple Cloning Site
MSB	Mikrotubuli-stabilisierender Puffer
N	Anzahl Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NcoI	Restriktionsenzym
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
(pBR322) ori	Replikationsursprung
P	Polymerisiert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIPES	Piperazine-N,N′-bis(2-Ethansulfonsäure)
POX	Peroxidase
P_{T7lac}	T7-lac-Promotor
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Re-pression
SOD-1	Superoxid-Dismutase-1
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline

TBS/T	Tris-Buffered Saline mit Tween
Temed	N, N, N′, N′-Tetramethylethylendiamin
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Transf.	Transformiert
Tris	Tris-Aminomethan
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
Wt	Wildtyp
W (1-6)	Waschschritte (1-6)
ZsGreen1	Zoanthus Green Fluorescent Protein 1

1 Einleitung

1.1 Die zelluläre Stressantwort

Die Zelle ist die strukturelle Einheit unseres Organismus. Durch den reibungslosen Ablauf intrazellulärer Stoffwechselwege, interzellulärer Signalwege sowie durch die Organisation der Zellen in der extrazellulären Matrix entstehen spezifische Gewebe, aus denen sich die unterschiedlichen Organe und letztlich der funktionierende Organismus zusammensetzen. Im Laufe des Lebens sieht sich jeder Organismus verschiedenen Stressoren ausgesetzt, die die Funktionalität der Zellen und damit von Geweben und Organen bedrohen können. Hierzu gehören beispielweise die intrazelluläre Akkumulation reaktiver Sauerstoffradikale, Hitzestress, Ischämie, Veränderungen im pH-Wert oder Veränderungen in der Ca^{2+}-Konzentration [76]. Die Folge können Schäden an der DNA oder auch die Aggregation fehlgefalteter Proteine sein [71]. Die Zellen haben während der Evolution hochkonservierte Mechanismen entwickelt, die sie vor verschiedenen Arten zellulären Stresses schützen können. Die wichtigsten vier Mechanismen [71] sind: Checkpoint-Kontrollen im Zellzyklus, die zum Wachstumsarrest führen können [9, 15], die Aktivierung von Mechanismen zur Stabilisierung der Nukleinsäuren und des Chromatins beispielsweise über den p53- oder NFκB-Signalweg [48, 107], die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems zur Beseitigung fehlgefalteter Proteine [33] und die vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen (Hsp) [30]. Diese sind eine Gruppe konservierter Proteine, die nach ihrem Molekulargewicht in vier verschiedene Subgruppen eingeteilt werden: Hsp90, Hsp70, Hsp60 und HspBs (kleine Hitzeschockproteine) [36]. Die großen Hitzeschockproteine, beispielsweise Hsp70 und Hsp90, können fehlgefaltete Proteine unter ATP-Verbrauch in ihre ursprüngliche Form zurückfalten und verhindern die Entstehung langer Polypeptidketten [12]. Die Bedeutung und Funktion der kleinen Hitzeschockproteine und insbesondere von HspB5 sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2 Das Hitzeschockprotein HspB5/ αB-Crystallin

1.2.1 Die Proteinfamilie der HspBs

Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine (HspBs) beinhaltet 10 Mitglieder (HspB1-10), die sich alle durch ein niedriges Molekulargewicht von 12 bis 43 kDa auszeichnen. Sie verfügen über eine charakteristische α-Crystallin-Domäne, die hoch konserviert ist und

sich aus 80-100 Aminosäureresten zusammensetzt. Zudem enthalten sie einen N- und C-Terminus, die in ihrer Länge und Struktur variabel sind [87]. Am N-Terminus der kleinen Hitzeschockproteine sind Phosphorylierungsstellen lokalisiert. Die Phosphorylierung nimmt Einfluss auf die Struktur und Funktion der kleinen Hitzeschockproteine. So ist bekannt, dass die HspBs mit- beziehungsweise untereinander über ihre α-Crystallin-Domäne Homo- beziehungsweise Heterooligomere bilden können [6, 67, 105, 106]. Der dynamische Austausch an HspB-Untereinheiten ist dabei phosphorylierungsabhängig. Die Phosphorylierung führt hierbei vermehrt zu der Bildung kleinerer Oligomere, zum Beispiel Hexa- und Dodekamere, wie anhand von HspB1 und HspB5 gezeigt werden konnte [49, 92]. Der N- und C-Terminus sind zudem bedeutsam für die Bildung höhergradiger Oligomere.
Die kleinen Hitzeschockproteine werden in unterschiedlichen Geweben in zellulären Stresssituationen hochreguliert, zum Beispiel bei Hitzestress oder oxidativem Stress, und bewahren die Zellen vor Stress-induziertem Schaden [44]. Viele der kleinen Hitzeschockproteine zeigen eine gewebespezifische Expression, beispielsweise im Muskel (HspB1, HspB2, HspB3, HspB5, HspB6, HspB7, HspB8), in der Augenlinse (HspB4, HspB5) oder im Hoden (HspB9, HspB10). Auch im Gehirn konnten einige der kleinen Hitzeschockproteine nachgewiesen werden (HspB1, HspB2, HspB3, HspB5, HspB6 und HspB8). Sie scheinen hier im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen. Die HspBs haben unter zellulärem Stress eine Chaperone-ähnliche Funktion und binden partiell denaturierte Proteine [53, 59]. Dadurch verhindern sie ihre intrazelluläre Aggregation, reduzieren ihre zelluläre Toxizität [90] und ermöglichen eine ATP-abhängige Rückfaltung durch die großen Hitzeschockproteine, zum Beispiel Hsp70 [74]. Neben dieser sogenannten „Holdase“-Funktion, wodurch partiell denaturierte Proteine in löslichem Zustand gehalten werden [18], verfügen die kleinen Hitzeschockproteine individuell über weitere zelluläre Funktionen. Sie haben beispielsweise anti-apoptotische Eigenschaften, wirken anti-inflammatorisch oder interagieren mit Teilen des Zytoskeletts.
Diese Arbeit beschäftigt sich im Speziellen mit dem kleinen Hitzeschockprotein HspB5, das sich in seiner Struktur, Funktionalität sowie dem Expressionsmuster von den restlichen HspBs unterscheidet.

1.2.2 Struktur und Phosphorylierung von HspB5

HspB5 wurde erstmals 1894 als eine der Hauptkomponenten der Augenlinse [82] entdeckt und erhielt zunächst den Namen αB-Crystallin, unter dem es auch heute noch häufig in der

Literatur zu finden ist. Es verfügt über ein Molekulargewicht von 22 kDa und über die charakteristische α-Crystallin-Domäne. Sie besteht aus mehreren β-Faltblättern, die sich in zwei antiparallelen Strängen organisieren [44]. Wie oben beschrieben, ist diese α-Crystallin-Domäne wichtig für die Interaktion und Oligomerbildung von HspB5-Untereinheiten miteinander. Die α-Crystallin-Domäne wird beiderseits von einem N- beziehungsweise C-Terminus eingefasst. Am C-Terminus befindet sich ein sogenanntes IXI-Motiv, dass die Ausbildung höhergradiger Oligomere mitbeeinflusst [25]. Am N-Terminus von HspB5 befinden sich zudem drei Phosphorylierungsstellen an den Serinresten 19, 45 und 59, an denen posttranslationale Phosphorylierung zu einer Änderung der Struktur aber auch Funktion von HspB5 führt. Es ist davon auszugehen, dass zellulärer Stress Proteinkinasen aktiviert, die HspB5 phosphorylieren [72]. Die p44/42 MAP-Kinase phosphoryliert den Serinrest an Stelle 45 und die MAPKAP-Kinase 2 den Serinrest an Stelle 59 [64]. Für die Phosphorylierung an Serin-19 konnte bislang noch keine spezifische Kinase identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung zu einer Dissoziation der Oligomere hin zu kleineren Komplexen [57, 92] und dadurch zu einer Erhöhung der Chaperone-ähnlichen Funktion *in vivo* und *in vitro* [1, 29], sowie zu einer Veränderung der intrazellulären Lokalisation von HspB5 führt [27, 99]. Die Phosphorylierung ist damit eine bedeutsame posttranslationale Modifikation dieses kleinen Hitzeschockproteins im zellulären Kontext.

1.2.3 Expressionsmuster von HspB5

Nach seiner Entdeckung im Jahr 1894 wurde HspB5 zunächst als Protein der Augenlinse beschrieben, das für den Erhalt der refraktären Eigenschaften der Linse wichtig ist [82]. Später wurde gezeigt, dass HspB5 zur Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine gehört und Chaperone-ähnliche Eigenschaften aufweist [53, 69]. Es wirkt einer Trübung der Linse mithilfe seiner Chaperone-ähnlichen Funktion entgegen und ist von großer Bedeutung für den Erhalt der Linsentransparenz [52]. HspB5 zeigt außerdem hohe Expressionslevel in Herzmuskelzellen und macht 1 - 2 % der löslichen Proteine im Herzen aus [20, 45]. Es schützt die Myofibrillen der Herzmuskelzellen unter Ischämie und Reperfusion im Mausmodell [84, 95] und interagiert während zellulärem Stress mit Titinfilamenten, um so die schädigende Wirkung auf die Elastizität und diastolische Funktion des Herzens zu reduzieren [16, 42, 43]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HspB5 auch im Gehirn exprimiert wird, wobei das Expressionsniveau deutlich niedriger liegt als in der Augenlinse und im

Herzmuskel [65, 68]. HspB5 wird hier zum größten Teil in Gliazellen, besonders in Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert [58], aber auch in Neuronen. Dabei handelt es sich um sogenannte „ballooned neurons“ von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen oder nach zerebralem Insult [35, 58, 66, 77, 80]. In kultivierten hippocampalen Neuronen der Ratte konnte HspB5 auch unter Kontrollbedingungen nachgewiesen werden [99]. HspB5 ist zudem in Gliomzellen, primären Astrozytenkulturen und Oligodendrozyten durch verschiedene Arten von Stress [41, 50, 62] und in kultivierten hippocampalen Neuronen durch Hitzestress, sowie durch Sodium-Arsenit-, oxidativen und hyperosmolaren Stress [10, 68] induzierbar, vermutlich um die behandelten Zellen unter diesen Stressbedingungen zu schützen.

1.2.4 HspB5 und Neuroprotektion

Weil HspB5 unter verschiedenen Stressbedingungen in den Zellen des zentralen Nervensystems nachgewiesenermaßen vermehrt exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass dieses Protein unter pathophysiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass HspB5 beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen hochreguliert wird [103]. Diese Erkrankungen sind durch einen fortschreitenden Untergang des Nervengewebes, speziell der Neurone gekennzeichnet [8]. Die pathophysiologische Grundlage dieser Neurodegeneration sind fehlgefaltete Proteine, die intra- sowie extrazellulär präzipitieren und vermutlich eine schädigende Wirkung auf die intrazellulären Stoffwechselwege sowie den Interzellularraum haben. Daraus können Störungen der Kognition und des Gedächtnisses, der Spontanmotorik sowie neuropsychiatrische Symptome resultieren. Dass HspB5 neuroprotektive Eigenschaften hat, konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Beispielsweise interagiert HspB5 mit Amyloid-β und inhibiert durch seine Chaperone-Aktivität die Bildung unlöslicher Fibrillen *in vitro* [101]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass fehlendes HspB5 in einem Knock-out-Mausmodell mit experimentell erzeugter Autoimmunenzephalitis (EAE) zu einer deutlich stärkeren Ausprägung der Entzündungsherde führt [89]. In einem weiteren Knock-out-Mausmodell mit experimentell erzeugtem Schlaganfall war das resultierende Ischämieareal signifikant größer als bei der Wildtyp-Maus. Die zusätzliche Verabreichung von HspB5 nach Schlaganfall reduzierte nachweislich die Größe des betroffenen Areals sowie die begleitenden Entzündungsprozesse [4].

1.3 Mikrotubuli

Die Mikrotubuli gehören zu den wichtigsten Bestandteilen des Zytoskeletts. Dieses ist ein intrazelluläres Netzwerk aus unterschiedlichen Proteinfilamenten, die für die Formgebung und Stabilisierung der Zelle, für den intrazellulären Transport von beispielsweise Zellorganellen aber auch für Zellmigration, Zelladhäsion und Zellteilung von entscheidender Bedeutung sind [37]. Neben den Mikrotubuli sind Aktin- und Intermediärfilamente weitere Bestandteile des Zytoskeletts. Alle drei besitzen die charakteristische Eigenschaft, dass ihre polymerisierten Filamente in ständigem dynamischem Austausch mit ihren gelöst vorliegenden Untereinheiten stehen und die Zelle sich so an die intra- sowie extrazellulären Erfordernisse rasch anpassen kann.

1.3.1 Aufbau von Mikrotubuli

Bei Mikrotubuli handelt sich um 25 nm durchmessende Hohlzylinder, deren strukturelle Grundeinheit ein Heterodimer aus α- und β-Tubulin ist. Die Mikrotubuli verfügen über ein Plus- und ein Minus-Ende. Am Plus-Ende findet unter GTP-Verbrauch eine rasche Polymerisierung aber auch rascher Zerfall statt. Am Minus-Ende laufen dieselben Prozesse ab, nur mit niedrigerer Geschwindigkeit. Aufgrund dieser ständigen Umbauprozesse spricht man hierbei auch von einer dynamischen Instabilität. Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) sind Begleitproteine, die die Mikrotubuli gegen den Zerfall stabilisieren. Am Zentrosom in der Nähe des Zellkerns werden Mikrotubuli neu gebildet. Deshalb wird diese Struktur auch als Mikrotubuli-Organisationszentrum bezeichnet. Ein Ring aus γ-Tubulin und assoziierten Proteinen bildet den Grundbaustein für die Neuentstehung der Mikrotubuli. Anschließend lagern sich die α- und β-Tubulin-Heterodimere an, wodurch die oben beschriebene Polarität der Mikrotubuli entsteht. Das Minus-Ende bleibt während der Neubildung zunächst im Zentrosom verankert. Fertige Mikrotubuli werden vom Zentrosom abgelöst und in verschiedene zelluläre Kompartimente transportiert [78].

Die Mikrotubuli erfüllen in Zellen wichtige Funktionen. Einerseits sorgen sie mit den anderen Bestandteilen des Zytoskeletts für mechanische Stabilität, andererseits dienen sie auch als Transportwege zwischen verschiedenen Zellkompartimenten. Dynein und Kinesin sind assoziierte Proteine, die ATP-abhängig beispielsweise Zellorganellen wie Mitochondrien aber auch Lysosomen entlang der Mikrotubuli transportieren. Kinesine wandern dabei zum Plus-Ende, Dyneine zum Minus-Ende. Während der Zellteilung bilden die Mikrotubu-

li zudem die Mitosespindeln. Gleichzeitig sind sie wichtige Bausteine des Binnengerüsts von Kinozilien und Flagellen [78].

1.3.2 Mikrotubuli in Neuronen und Gliazellen

Die Mikrotubuli spielen im zentralen Nervensystem eine bedeutsame Rolle. Neurone migrieren während der Entwicklung des ZNS an die für sie vorgesehenen Orte und nutzen dafür das wachsende Axon als Leitstruktur. Die dafür notwendigen Umbauprozesse finden hauptsächlich an den Mikrotubuli des Binnengerüsts statt. Weiterhin sind sie formgebend für die Neurone und verleihen Axonen sowie Dendriten ein strukturelles Rückgrat. Gleichzeitig dienen sie in den Fortsätzen als intrazelluläre Transportwege. Außerdem sind sie vermutlich ein wichtiger Faktor, wenn es um Veränderungen der Dendritenmorphologie im Rahmen kognitiver Plastizität geht [7]. Die Anordnung der Mikrotubuli unterscheidet sich zwischen Dendriten und Axonen in charakteristischer Weise. In Axonen liegt eine strenge Polarität der Mikrotubuli vor, wobei das Plus-Ende stets in Richtung Synapse zeigt. Diese Polarität ermöglicht einen anterograden Transport von Zellorganellen und Membranbestandteilen nach distal, da im Axon selbst keine ausreichende Proteinsynthese stattfindet. Der retrograde Transport zum Soma ermöglicht den Abtransport von Membranbestandteilen oder Zellorganellen in autophagischen Vakuolen. In den Dendriten liegen die Mikrotubuli hingegen in gemischter Polarität vor. Auch der Besatz an Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) unterscheidet sich zwischen diesen beiden Kompartimenten. In Axonen befinden sich hauptsächlich MAP1 und Tau, in den Dendriten kommt besonders häufig MAP2 vor. Sie stabilisieren die Mikrotubuli und verknüpfen sie mit Neuro- und Aktinfilamenten zu einem dichten Netzwerk. [78].

Die neuronalen Mikrotubuli sind aufgrund ihrer Bedeutsamkeit für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des zentralen Nervensystems in der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen vermehrt in den Fokus gerückt. Sie sind die zytoskelettalen Hauptbestandteile des Dendritenbaums sowie des Axons, sie verleihen Struktur und Stabilität und sind für die intraneuronalen Transportprozesse von besonderer Bedeutung [7]. Die polymerisierte Form der Mikrotubuli steht mit den löslichen Tubulin-Untereinheiten dabei in einem dynamischen Gleichgewicht. In vielen neurodegenerativen Erkrankungen ist der Verlust von Mikrotubuli durch Destabilisierung und Depolymerisierung ein bedeutsamer pathophysiologischer Prozess [7]. So konnte für die Alzheimer-Erkrankung gezeigt werden, dass

eine Hyperphosphorylierung und Acetylierung des Tau-Proteins zu einer Dissoziation dieses MAPs von den Mikrotubuli führt und diese destabilisiert [2, 28]. Daraus resultieren ein gestörter axonaler Transport sowie eine generelle axonale Dysfunktion [56]. Neben der axonalen Degeneration spielt auch die Rarefizierung des Dendritenbaums in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung eine wichtige Rolle [70]. Beispielsweise konnte in Körnerzellen der Fascia dentata [24, 32] als auch in pyramidalen Neuronen in den hippocampalen Arealen CA1 (Cornu ammonis 1) und dem Subiculum [31, 47] eine Reduktion der Komplexität des Dendritenbaums beobachtet werden. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte in einer durch das Amyloid-β ausgelösten Umverteilung des hyperphosphorylierten Tau-Proteins in die Dendriten erklärt werden. Eine lokal steigende Ca^{2+}-Konzentration führte nachweislich zu einer Destabilisierung und Depolymerisierung der Mikrotubuli [112].

1.3.3 Interaktion von HspB5 mit Mikrotubuli

HspB5 interagiert bekannterweise mit allen drei Komponenten (Aktinfilamente, Intermediärfilamente, Mikrotubuli) des Zytoskeletts. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion zudem durch Phosphorylierung an den Serinresten 45 und 59 moduliert wird [104]. HspB5 übernimmt wichtige Funktionen in der Mikrotubuli-Organisation. Es konnte gezeigt werden, dass Mikrotubuli-depolymerisierende Substanzen, sogenannte Spindelgifte, wie Vinblastin, Colchicin, Nocodazol und Colcemid in den behandelten Zellen eine HspB5-Überexpression induzierten [63]. Zudem wurde nachgewiesen, dass HspB5 denaturiertes Tubulin erkennt, temporär bindet und seine Aggregation dadurch verhindert [5]. Die Bindung an Mikrotubuli findet über Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) statt. So wurde gezeigt, dass HspB5 dosisabhängig an Mikrotubuli gebunden hatte, die mit MAPs assoziiert waren, während dieser Effekt an Mikrotubuli ohne MAPs nicht gesehen werden konnte [34]. HspB5 hat daher eine stabilisierende Wirkung auf die Dynamik der Mikrotubuli und ist an der Regulation von Polymerisation und Depolymerisation beteiligt [40, 109].

1.4 Fragestellung

Es wurde angenommen, dass HspB5 stabilisierende Effekte auf Mikrotubuli hat und die Phosphorylierung hierfür eine notwendige Voraussetzung ist. Dazu wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der einzelnen Phosphorylierungsstellen von HspB5 für seine Interaktion mit

Tubulin beziehungsweise Mikrotubuli genauer untersucht. Es wurden HspB5-Mutanten, die eine Phosphorylierung an genau einer, genau zwei oder an allen drei Phosphorylierungsstellen simulierten und eine nicht phosphorylierbare Mutante verwendet. Die Phosphorylierung wurde durch den Aminosäureaustausch von Serin mit Glutaminsäure simuliert oder durch Alanin unmöglich gemacht. Im ersten Versuchsteil wurde der Einfluss der Phosphorylierung von HspB5 in C6-Zellen untersucht, die nach Transfektion und Überexpression der mutierten HspB5-Formen mit Nocodazol behandelt wurden, um eine möglicherweise protektive Wirkung von HspB5 auf die Mikrotubuli nachzuweisen. Die durch Nocodazol erzeugten Fraktionen an globulärem und polymerisiertem Tubulin wurden anschließend im Western Blot analysiert und schließlich densitometrisch ausgewertet. Im zweiten Versuchsteil wurden rekombinant synthetisierte HspB5-Phosphomimetika sowie der HspB5-Wildtyp in *in-vitro*-Bindungsstudien auf eine phosphorylierungsabhängige Interaktion mit α-Tubulin untersucht. Die Ergebnisse des Pull-Down Assays wurden im Western Blot auf phosphorylierungsabhängige Unterschiede in der Bindungskapazität analysiert und densitometrisch weiter ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

A

30%ige Acrylamid-Mischung, Rotiphorese®Gel 30 (37, 5:1), Roth, Produkt-Nr. 3029.2

Agarose (SeaKem LE Agarose), Lonza Rockland inc., Produkt-Nr. 50004

Ammoniumchlorid, Roth, Produkt-Nr. K298

Ammoniumpersulfat (APS), Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. A3678

Ampicillin-Natriumsalz (50 mg/ml), Roth, Produkt-Nr. K029.2

B

Bactotryptone, Roth, Produkt-Nr. 8952

Bromphenolblau, Merck, Produkt-Nr. 1.08122.0005

C

Calciumchlorid (dihydrat, ≥ 99 %), Roth, Produkt-Nr. HN04

Chloramphenicol (≥ 98 %), Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. C0378

Complete Ultra Tablets, Mini, EDTA-free, Easy Pack Protease-Inhibitor Cocktail, Roche/Sigma, Produkt-Nr. 05892791001

Coomassie Brilliant Blue G-250, Serva, Produkt-Nr. 17524

D

D(+)-Saccharose, Roth, Produkt-Nr. 4621

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Produkt-Nr. 1.16743.1000

Dinatriumhydrogencarbonat, AppliChem, Produkt-Nr. A1353

Dinatriumhydrogenphosphat, Merck, Produkt-Nr. 1.06586.0500

Dithiothreitol (DTT), Merck, Produkt-Nr. 1.11474.0025

DNA-Ladepuffer (5x), Qiagen, Produkt-Nr. 239901

dNTP-Mix (10 mM), Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. R0191

Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco, Produkt-Nr. 4195-039

Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (DPBS), Gibco, Produkt-Nr. 14190-169

E

Essigsäure, VWR Chemicals Prolabo, Produkt-Nr. 20104.312

Ethanol, Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. 32205

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Merck, Produkt-Nr. 108452.0250

Ethylenglycol-bis(aminoethylether)N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure (EGTA), Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. E4378

F

Fetales Rinderserum (FBS), Gibco, Produkt-Nr. 10500-064

G

GelRed (Nucleic Acid Gel Stain, 10000x in DMSO), Biotium, Produkt-Nr. 41002

Glycerol (99 %), Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. 15523

Glycin, Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. 33226

Guanosintriphosphat (GTP, 100 mM), Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. R0461

H

Halt®-Protease/Phosphatase-Inhibitor Cocktail, EDTA-free, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. 78441

HCL (37 %, Anala R Normapur), VWR Prolabo BDH, Produkt-Nr. 20252.290

HPLC (high performance liquid chromatography) H_2O, AppliChem, Produkt-Nr. A1589

I

Imidazol, Sigma, Produkt-Nr. 10250

Isopropanol (Anala R Normapur), VWR Chemicals Prolabo, Produkt-Nr. 20842.330

Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Roth, Produkt-Nr. CN08.2

K

Kaliumchlorid, Roth, Produkt-Nr. 6781

Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Produkt-Nr. 1.04873.1000

L

LB-Agar (Lennox), Roth, Produkt-Nr. X965

LB-Medium (Luria/Miller), Roth, Produkt-Nr. X968

M

Magermilchpulver, Roth, Produkt-Nr. T145

Magnesiumchlorid (≥ 98,5 %, wasserfrei), Roth, Produkt-Nr. KK36

Magnesiumsulfat, Roth, Produkt-Nr. 0261

Methanol, Honeywell/Riedel-de-Haen, Produkt-Nr. 32213

N

Natriumacetat, Merck, Produkt-Nr. 1.06268.0250

Natriumchlorid, Honeywell/Fluka, Produkt-Nr. 31434

Natriumhydroxid (1 mol/l), VWR Prolabo BDH, Produkt-Nr. 31627.290

Natriumphosphat (monobasic, 99 %), Sigma, Produkt-Nr. S5011

Nocodazol, Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. M1404

P

PCR Supermix, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. 10572014

Piperazine-N,N′-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), Sigma, Produkt-Nr. P6757

Purified Brain Tubulin (porcine brain, > 99 % pure), Biozol, Produkt-Nr. CYS-T240-B-5

R

Red Safe (Nucleic Acid Staining Solution), Intron Biotechnology, Produkt-Nr. 21141

S

SOC-Medium, Clontech, Produkt-Nr. 636763

Sodiumdodecylsulfat (SDS, ≥ 99 %), Roth, Produkt-Nr. 2326

Stickstoff, flüssig, VWR

T

Tango-Puffer (10x), Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. BY5

Temed (N,N,N‘,N‘- Tetramethylethylendiamin), BioRad, Produkt-Nr. 161-0800

Triton-X100, Merck, Produkt-Nr. 10864

Trizma® Base, Sigma, Produkt-Nr. 93362

Tween 20 (Polysorbate), Merck, Produkt-Nr. 817072

U

Urea, Riedel-de-Haen, Produkt-Nr. 33247

2.1.2 Antikörper

Primärantikörper:

Anti-α-Tubulin-Antikörper, Maus, monoklonal, Proteintech, Produkt-Nr. 66031-1-lg

Anti-HspB1-Antikörper, Kaninchen, polyklonal, Stressgen, Produkt-Nr. SPA-801

Anti-HspB5-Antikörper, Kaninchen, monoklonal, GeneTex, Produkt-Nr. GTX62094

Sekundärantikörper:

Ziege-Anti-Maus IgG+IgM, Peroxidase-konjugiert, Jackson Immunoresearch, Produkt-Nr. 115-035-068

Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert, Jackson Immunoresearch, Produkt-Nr. 111-035-144

2.1.3 Bakterien – E.coli-Stämme

Rosetta2 (DE3) Singles Competent Cells, Novagen/MerckMillipore, Produkt-Nr. 71400

Stellar Competent Cells, Clontech, Produkt-Nr. 636763

2.1.4 Enzyme

EcoRI (10 U/µl), Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. ER0271

Lysozym, Serva, Produkt-Nr. 28262

NcoI (10 U/µl), Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. ER0571

Rekombinante DNAse1, Takara-Clontech, Produkt-Nr. 2270A

Trypsin (2,5 %), Biochrom, Produkt-Nr. L2133

2.1.5 Geräte

A

Abzug TA 1200, Hemling, Ahaus, Deutschland

Agarosegel-Kammer Wide Mini-Subcell GT, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA

Axiovert 200 M (LifeCell-Mikroskop), Zeiss, Oberkochen, Deutschland

B

Brutschrank 720 Liter, WTC Binder, Tuttlingen, Deutschland

Brutschrank Hera Cell/Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

C

Cycler vapo.protect pro S, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

D

Drucker Mitsubishi P91E + Kopplung IPCF01.SD + Transilluminator E-Box-1000/26M, LTF Labortechnik Wasserburg

E

Eismaschine, Ziegra, Isernhagen, Deutschland

F

Feinwaage Quintix 124-1S, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Fernseher CDM-1003 COL, Monacor International, Bremen, Deutschland

Filmentwickler Cawomat 2000 IR, Cawo Solutions, Pöttmes, Deutschland

Filmkassette (18x24), rego, Augsburg, Deutschland

Folienschweißgerät, A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Fotometer Biochrom Libra S12, Biochrom US, Holliston, USA

G

Gelelektrophoresesystem, BioRad, Hercules, USA

H

Halogen-Herdplatte, Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland

K

Kryotiefkühlschrank Cryo 200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

Kühlschrank Marke Liebherr, Bulle, Schweiz

Kühlschrank Marke Privileg, Whirlpool Corporation, Benton Harbor, USA

L

Laborflaschen (1 l), Schott/Duran, Produkt-Nr. 218015455

M

Magnetrührer, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

Master Cycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Mikroskop Nikon Eclipse TS100, Nikon Instruments, Tokyo, Japan

Mikrowelle, BSH, Giengen, Deutschland

N

Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Neubauer-Zählkammer, Optik-Labor, Lancing, UK

P

PCR Thermal Cycler Primus 96 Advanced, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Perfect Schnellkochtopf, WMF, Geislingen an der Steige, Deutschland

pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland

Pipetboy, Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

Präzisionswaage CP4202S, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Q

Qubit® Fluorometer 3.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

R

Reinstwassersystem Q-POD®, Merck/Millipore, Burlington, Massachusetts, USA

S

Schüttel-Inkubator: Certomat® R, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Schüttel-Inkubator: Incubation Shaker Innova 4000, New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA

Schüttler KS 260 Basic, IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland

Schüttler SM-30, Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland

Sonifiziergerät HD2070, Bandelin, Berlin, Deutschland

Sonifizierstab UW2070, Bandelin, Berlin, Deutschland

Spannungsgeräte (für Gelelektrophorese):

Power Pac 300, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA

Power Pac HC, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA

Sterilbank, Nunc, Wiesbaden, Deutschland

T

test-tube-Rotator, Snijders Labs, Tilburg, Niederlande

Thermomixer C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

U

Ultra-Tiefkühlschrank Typ MDF-U, Sanyo, Moriguchi, Japan

V

Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA

W

Wasserbad, Grant Instruments, Shepreth, UK

Wasserbad, WiseCircu. Heidelberg, Deutschland

Western-Blot-Kammersystem (z.B. Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell), Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA

Z

Zentrifuge 5430 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

– Rotor FA 45-30-11

Zentrifuge Avanti J-25, Beckman, Brea, Kalifornien, USA

– Rotor JA-10

Rotor JA-25.50

Zentrifuge Biofuge pico Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA

Zentrifuge Multifuge 3 S-R Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Zentrifugengefäße 50 ml/500 ml, Beckman, Brea, Kalifornien, USA

2.1.6 Kits

GeneJet Plasmid MiniPrep Kit, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. K0502

GenJet DNA Pre-Optimized for C6, Tebu-Bio, Produkt-Nr. SL100489-C6

pET6xHN Expression Vector Set, Takara-Clontech, Produkt-Nr. 631432

His60 Ni Superflow & Gravity Column Purification Kit, Takara-Clontech, Produkt-Nr. 635658

Infusion HD-Cloning Plus, Clontech, Produkt-Nr. 638909

NucleoBond Xtra Midi EF-Kit, Macherey/Nagel, Produkt-Nr. 740420

Nucleospin® Gel and PCR clean up, Macherey/Nagel, Produkt-Nr. 740609

pET Express + Purify Kit - His60 (Infusion® Ready), Clontech, Produkt-Nr. 631428

Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. 32209

Profound™ Pull-Down PolyHis Protein:Protein Interaction Kit, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. 21277

Qubit® Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. Q33211

2.1.7 Marker

GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. SM1331

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa), Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. 26616

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 to 250 kDa), Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. 26619

PageRuler™ unstained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. 26614

2.1.8 Primer

Tabelle 1: Verwendete Primer für PCR und Sequenzierung

Primer	Richtung	Sequenz 5‘→ 3‘
HspB5- Hinprimer	Vorwärts	TAAGGCCTCTGTCGAGGACATAGCCATC CACCACC
HspB5- Rückprimer	Rückwärts	GTCTTAAGCGTTCGAAGAAGAATCCCCG ACGTCACT
T7-pET-mod	Vorwärts	CCCGCGAAATTAATACGACTCAC
T7-Term (Reverse)	Rückwärts	CTAGTTATTGCTCAGCGGT

Die HspB5-Hin- und Rückprimer wurden im Rahmen der PCR für die Vervielfältigung der einzelnen HspB5-DNA-Sequenzen verwendet. Die T7-Primer dienten zur Sequenzierung der klonierten HspB5-Sequenzen. Alle Primer wurden von der Firma MWG Eurofins Genomics synthetisiert.

2.1.9 Vektoren

pCR®2.1-TOPO®-Vektor, Invitrogen, Produkt-Nr. KNM4500-01

pET-Express-6xHN-C-Vektor, Clontech, Produkt-Nr. 631431

pET-Express-6xHN-N-Vektor, Clontech, Produkt-Nr. 631431

pET-Express-6xHN-GFPuv-Vektor, Clontech, Produkt-Nr. 631431

pLVX-IRES-ZsGreen1-Vektor, Clontech, Produkt-Nr. 632107

2.1.10 Verwendete Plasmide

Tabelle 2: Verwendete Vektoren zur Überexpression in C6-Zellen und E. coli

Überexpression in C6-Zellen	**Klone zur Überexpression in E. coli**
pLVX-IRES-ZsGreen1-Leervektor	**pET-Express-6xHN-C-Vektor**
pLVX-IRES-ZsGreen1-HspB5-Wt	HspB5-Wt/-AAA/-EAA/-AEA/-AAE
pLVX-IRES-ZsGreen1-HspB5-AAA	**pET-Express-6xHN-N-Vektor**
pLVX-IRES-ZsGreen1-HspB5-EAA	HspB5-Wt und alle 8 Phosphomimetika
pLVX-IRES-ZsGreen1-HspB5-AEA	
pLVX-IRES-ZsGreen1-HspB5-AAE	
pLVX-IRES-ZsGreen1-HspB5-AEE	
pLVX-IRES-ZsGreen1-HspB1	

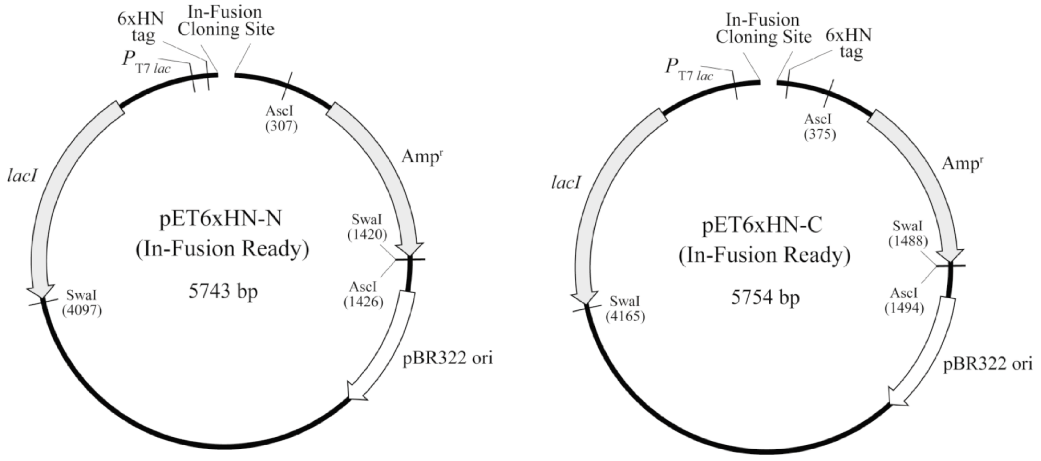


Abbildung 1: pET-Express-Vektoren für die Klonierung der HspB5-Konstrukte mit unterschiedlicher Lokalisation des Polyhistidin-Rests. Die Sequenzen der HspB5-Konstrukte und des Wildtyps wurden in die In-Fusion Cloning Site kloniert. Am N- bzw. C-Terminus befindet sich der Polyhistidin-Rest (6xHN tag), bestehend aus einer abwechselnden Abfolge von je 6 Histidinen und Asparaginen. T7 lac Promotor (P_{T7lac}), lac-Repressor (lacI, Inhibierung des lac-Operators des Promotors), Beta-Lactamase (Amp^r, Resistenzgen), pBR322 ori (Replikationsursprung). Modified pET6xHN-N, pET6xHN-C, and pET6xHN-GFPuv Vector Maps.; Certificate of Analysis, "pET6xHN Expression Vector Set" (Catalog No. 631432), ©2015 Clontech Laboratories, Inc. n/k/a Takara Bio USA, Inc.

Alle verwendeten pLVX-IRES-ZsGreen1-Vektoren lagen bereits in der AG Golenhofen vor. Insbesondere pLVX-IRES-ZsGreen1-HspB5-Wt, -AAA und -HspB1 wurden in den Experimenten einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe verwendet [11]. Die pET-Express-Vektoren für die bakterielle Überexpression wurden von Clontech synthetisiert. Die Klonierung der dargestellten HspB5-Formen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

A

Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Produkt-Nr. 28906837

Amersham Protran Premium 0,2 Nitrocellulose, GE Healthcare, Produkt-Nr. 10600004

Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter Unit 10K, Merck/Millipore, Produkt-Nr. UFC501008

D

Dry Ease Mini Cellophan, Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. NC2380

E

Einmal-Spatel (L-förmig), VWR, Produkt-Nr. 612-1561

F

Falcon Reaktionsgefäße 15 ml, Sarstedt, Produkt-Nr. 62554512

Falcon Reaktionsgefäße 50 ml, Sarstedt, Produkt-Nr. 62554254

Filtropur S 0,2, Sarstedt, Produkt-Nr. 831826001

Filtropur S 0,45, Sarstedt, Produkt-Nr. 831826

K

Küvetten, Sarstedt, Produkt-Nr. 67742

P

Parafilm M PM992 Laboratory Wrapping Film, Bemis, Produkt-Nr. 41120000

Pipettenspitzen (0,1–10 µl), Sarstedt, Produkt-Nr. 701130600

Pipettenspitzen (2–200 µl), Sarstedt, Produkt-Nr. 70760502

Pipettenspitzen (1000 µl), Sarstedt, Produkt-Nr. 701186100

Petrischalen 60 mm, Greiner Bio-One, Produkt-Nr. 628160

Q

Qubit® Assay Tubes (0,1 ml, durchsichtig), Thermo Fisher Scientific, Produkt-Nr. Q32856

R

Reaktionsgefäße 0,5 ml, Sarstedt, Produkt-Nr. 72704400

Reaktionsgefäße 1,5 ml, Sarstedt, Produkt-Nr. 72706400

Reaktionsgefäße 2,0 ml, Sarstedt, Produkt-Nr. 72695400

S

Serologische Pipetten 5 ml, Sarstedt, Produkt-Nr. 861253001

Serologische Pipetten 10 ml, Sarstedt, Produkt-Nr. 861254001

Serologische Pipetten 25 ml, Sarstedt, Produkt-Nr. 861685001

V

Vernichtungsbeutel, Sarstedt, Produkt-Nr. 861197

W

Whatman Gel Blotting Paper, GE Healthcare, Produkt-Nr. 10426994

Z

Zellkulturflasche 25 cm², Greiner Bio-One, Produkt-Nr. 690175

Zellkulturflasche 75 cm², Greiner Bio-One, Produkt-Nr. 658175

Zellschaber 25 cm, Sarstedt, Produkt-Nr. 831830

ZelluTrans 6,0 (25 mm), Roth, Produkt-Nr. E662

2.1.12 Zelllinien

C6 Glioma Cells, Ratte, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Produkt-Nr. ACC550

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Auftauen, Splitten und Aussäen der C6-Zellen

Kulturmedium ($DMEM^+$)	DMEM + 10% FBS	
Versen (EDTA) 0,05 %	Natriumchlorid	8,0 g
	Kaliumchlorid	0,2 g
	Dinatriumhydrogenphosphat	1,15 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g
	EDTA	0,5 g
	In 1 l Aqua dest. lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.	
Trypsin/Versen	Trypsin (2,5%)	25 ml
	DPBS (ohne Calcium und Magnesium)	225 ml
	Versen (0,05%)	250 ml
	Aliquotieren und bei -20°C lagern.	

Die verwendeten C6-Zellen wurden in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff gelagert. Nach Entnahme eines Aliquots wurden die Zellen unter einer Sterilbank resuspendiert. Hierzu wurde 1 ml erwärmtes Kulturmedium ($DMEM^+$) hinzupipettiert und die Suspension anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension 4 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde erneut mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Dann wurden die Zellen in eine mit 10 ml Medium befüllte Zellkulturflasche (25 cm^2) gegeben. Nach 1–2 Tagen erfolgte die erste Passagierung.

Für das Passagieren der Zellen wurden zunächst das PBS und das Kulturmedium circa 15 min bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Das Trypsin/Versen wurde unter die Sterilbank gestellt bis es Raumtemperatur erreichte. Die Zellen wurden aus dem Brutschrank genommen und die Dichte des Zellrasens unter dem Mikroskop kontrolliert. Das Medium wurde zunächst abgegossen. Anschließend wurden die Zellen 1-mal mit 5 ml PBS gewaschen. Dieses wurde abpipettiert und dann wurden die Zellen mit 500 µl Trypsin/Versen-Lösung benetzt und für 2 min in den Brutschrank zurückgestellt. In der Zwischenzeit wurden 10 ml Kulturmedium in eine neue Zellkulturflasche (25 cm²) gefüllt. Durch das Trypsin/Versen lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche und wurden mit 4,5 ml Kulturmedium vorsichtig resuspendiert. 200 µl dieser Suspension wurden in die neue Flasche überführt und nach kurzem Schwenken in den Brutschrank zurückgestellt. Dieser Vorgang wurde 15–20-mal circa alle 2-3 Tage wiederholt, danach wurde eine neue Zellcharge aufgetaut.

Für die Versuche wurden Zellen in definierter Dichte auf Petrischalen ausgesät. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 4,5 ml Kulturmedium resuspendiert (siehe oben). 15 µl dieser Zellsuspension wurden dann in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Anzahl der Zellen in jedem der 4 Quadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Summe der Zellen aller Quadrate wurde durch 4 geteilt, um den Mittelwert der Zellzahl/Quadrat zu erhalten. Dieser Wert wurde mit 10000 multipliziert, um die Anzahl an Zellen/ml zu errechnen. Die Multiplikation mit dem Gesamtvolumen der Suspension ergab die Gesamtzellzahl. Abhängig davon, wie viele Zellen nun benötigt wurden, wurde ein entsprechender Volumenanteil abpipettiert und ausgesät.

2.2.1.2 Transfektion der C6-Zellen

Für die Versuche wurden C6-Zellen mit verschiedenen Plasmiden transfiziert (siehe 2.1.10). Als Transfektionsreagenz wurde das GenJet DNA Pre-Optimized for C6 verwendet. Die ausgesäten C6-Zellen wurden transfiziert, sobald 60–80 % der Petrischale (6 cm^2) bewachsen waren. Das Kulturmedium wurde 1 h vor Transfektion durch 3 ml frisches Medium ersetzt. 5 µg Plasmid und 15 µl GenJet transfection reagent wurden zunächst jeweils in 250 µl DMEM (ohne FBS) gelöst. Dann wurde die GenJet-Lösung zur Plasmid-Lösung gegeben, vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieses Gemisch tropfenweise in die Petrischalen pipettiert. Nach kurzzeitigem Schwenken wurden die Zellen wieder in den Brutschrank zurückgestellt. Der Transfektionserfolg wur-

de nach 24 h und 48 h unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Ein Mediumwechsel erfolgte nach circa 5 h.

2.2.1.3 Nocodazolbehandlung kultivierter C6-Zellen und Herstellung globulärer und polymerisierter Tubulinfraktionen

Nocodazol-Stammlösung (5mg/ml)	2 mg Nocodazol in 400 µl DMSO	
Mikrotubuli-stabilisierender Puffer (MSB)	PIPES	1,3 g
	In 25 ml Aqua dest. lösen und pH mit 37% HCL auf 6,93 einstellen.	
	EGTA	20 mg
	Magnesiumchlorid	5 mg
	Glycerol	7,34 ml
	Ad 50 ml mit Aqua dest. auffüllen, Protease-Inhibitor-Tabletten darin lösen.	
MSB + Triton-X-100 (0,5%) auf 100 ml	MSB	99,5 ml
	Triton-X-100	0,5 ml
Lämmli-Probenpuffer, 3x	Trizma	0,45 g
	SDS	1,2 g
	In Aqua dest. lösen und pH mit HCL auf 6,9 einstellen.	
	Glycerin	7,56 g
	DTT	0,03 g
	Bromphenolblau (10 mg/ml)	400 µl
	Ad 20 ml mit Aqua dest. auffüllen.	

Das vorliegende Protokoll wurde nach Caron et al. (1985) [17] und Gundersen et al. (1987) [46] modifiziert. Das Spindelgift Nocodazol wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml

(16,6 mM) in DMSO (Dimethylsulfoxid) als Stammlösung angesetzt. Zu Versuchsbeginn wurde die Stammlösung auf die zur Behandlung gewünschten Nocodazol-Konzentrationen von 1 µM, 5 µM, 10 µM und 30 µM in $DMEM^+$ („Nocodazol-Medium“) verdünnt. Die Petrischalen wurden als erstes aus dem Brutschrank genommen, wobei immer nur zwei Schalen parallel behandelt wurden. Die Dichte und der Zustand des Zellrasens wurden lichtmikroskopisch überprüft. Das Kulturmedium wurde abpipettiert und 3 ml des angewärmten Nocodazol-Mediums über eine definierte Zeit zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden währenddessen in den Brutschrank zurückgestellt. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde das Nocodazol-Medium entfernt und die Zellen 2-mal mit 2 ml Mikrotubuli-stabilisierenden Puffer (MSB) gewaschen. Anschließend wurden 1,2 ml MSB + Triton-X-100 zu den Zellen gegeben, um diese über 3 min zu permeabilisieren. Die im Puffer enthaltene lösliche Tubulinfraktion wurde abpipettiert und mit 0,6 ml (3x) Lämmli-Puffer versetzt und dann auf Eis gelagert. Die auf den Petrischalen verbliebenen C6-Zellen wurden dann 1-mal mit 2 ml MSB gespült. Dann wurden 0,6 ml (3x) Lämmli-Puffer und 1,2 ml MSB auf die Schalen gegeben, 5 min gewartet und der Zellrasen mit einem Schaber abgekratzt. Die 1,8 ml Zellsuspension wurden mit einer Pipette aufgenommen, in ein Eppendorf-Hütchen überführt und auf Eis gelagert. In dieser Probe befand sich das anteilige, polymerisierte Tubulin der C6-Zellen, das nicht mit dem Triton-Puffer herausgelöst werden konnte. Beide Proben wurden anschließend sonifiziert und bei 95 °C über 5 min erhitzt. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte bei -20 °C.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 Agarosegelelektrophorese

TAE-Laufpuffer, 50x	EDTA (100 mM)	18,6 g
	Trizma (2 M)	121 g
	Essigsäure (100%, 2 M)	28,55 ml
	Aqua dest.	Ad 500 ml
0,8%-ige/ 1,5%-ige Agarosegel-Lösung	Agarose	0,8 g/ 1,5 g
	In 100 ml (1x) TAE-Puffer lösen und kurz aufkochen.	

	GelRed	5-10 µl

Die Agarosegelelektrophorese ist eine analytische Methode der Molekularbiologie, die es ermöglicht, DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufzutrennen. Die negativ geladenen Moleküle wandern je nach Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in einem angelegten Spannungsfeld zur Kathode. Hierzu wurden 0,8 g oder 1,5 g Agarose in 100 ml (1x) TAE-Puffer gelöst. Der Ansatz wurde anschließend in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Zuletzt wurden 5-10 µl des Farbstoffs „GelRed“ hinzupipettiert, der unter UV-Licht zu einer Fluoreszenz der aufgetragenen DNA-Moleküle führte. Das Gel wurde anschließend in die vorgesehene Kammer gegossen.

2.2.2.2 PCR und Aufreinigung der PCR-Produkte

PCR-Ansatz	PCR-Supermix	45 µl
	Hinprimer	1 µl
	Rückprimer	1 µl
	Plasmid-DNA	Ein 100 pg entsprechendes Volumen
	Ad 50 µl mit HPLC-Wasser auffüllen.	

Für die Versuche wurden die einzelnen durch Mutagenese erzeugten HspB5-Mutanten von HspB5 amplifiziert. Die für die PCR benötigten Primer, HspB5-Hinprimer und HspB5-Rückprimer, wurden von einer Stammlösung mit der Konzentration von 100 pmol/µl auf eine Gebrauchslösung von 10 pmol/µl mit HPLC-Wasser verdünnt. Für die Amplifikation der Sequenzen aller acht HspB5-Phosphomutanten sowie des HspB5-Wildtyps wurde je ein Ansatz mit 45 µl PCR-Supermix, 1 µl HspB5-Hinprimer, 1 µl HspB5-Rückprimer sowie ein 100 pg entsprechendes Volumen an Plasmid-DNA pipettiert und mit HPLC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die Plasmide dienten hier als *template* und enthielten bereits die entsprechenden HspB5-Sequenzen (z.B. pCR-TOPO-Vektoren mit codierender Sequenz für HspB5-Wt). Die Konzentrationen der einzelnen Plasmide wurden zuvor im Nanodrop bestimmt. Die anschließende PCR im Peqlab Primus 96 begann mit einer initialen Denaturierung bei 94 °C über 3 min. Die folgenden 30 Zyklen wurden zu je 30 Sekunden bei 94 °C, 30 Sekunden bei 53 °C und einer Minute bei 72 °C durchgeführt. Nach weiteren

10 min bei 72 °C wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. Die PCR-Produkte wurden dann auf 1,5%-igem Agarose-Gel kontrolliert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit nach Protokoll des Herstellers. 50 µl PCR-Produkt wurden mit 100 µl NTI-Puffer gemischt. Das Volumen wurde auf eine mitgelieferte Säule übertragen und für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Die Membran der Säule wurde anschließend 2-mal mit 700 µl Wasch-Puffer NT3 gewaschen und jeweils 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Zur Trocknung wurde die Säule eine weitere Minute bei 11000 g zentrifugiert. Die Elution der DNA wurde mit 25 µl NE-Puffer oder HPLC-Wasser durchgeführt. Nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule erneut eine Minute bei 11000 g zentrifugiert und das Eluat in einem separaten Eppendorf-Hütchen aufgefangen. Die Konzentrationen wurden mittels Nanodrop bestimmt.

2.2.2.3 Klonierung

Für die Transformation der Bakterien wurden die amplifizierten Sequenzen vom Wildtyp und der HspB5-Mutanten in einen bakteriellen Expressionsvektor mit C- (5 Sequenzen) beziehungsweise N-terminal (9 Sequenzen) lokalisiertem Polyhistidin-Rest kloniert (siehe 2.1.10 und Abbildung 1), der aus einer abwechselnden Abfolge von je 6 Histidinen und Asparaginen bestand. Zur Klonierung wurde das InFusion HD-Cloning Kit von Clontech verwendet. 2 µl (5x) InFusion HD Enzyme Mix wurden mit 1 µl mitgeliefertem bakteriellen Expressionsvektor, mit einem 50 ng entsprechenden Volumen PCR-Produkt zusammenpipettiert und mit HPLC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Dann wurde dieser Ansatz 15 min bei 50 °C inkubiert und anschließend auf Eis oder bei -20 °C gelagert, sofern nicht direkt transformiert wurde.

2.2.2.4 Transformation von Bakterien

LB-Agarplatten	LB	35 g
	In 1 l Aqua dest. gut vermischen, anschließend autoklavieren und auf 45-50°C abkühlen lassen.	
	Ampicillin	1 µl pro ml Medium
	Chloramphenicol	1 µl pro ml Medium
	Agarplatten steril begießen und bei 4°C lagern.	

LB-Medium	LB	25 g
	In 1 l Aqua dest. lösen und anschließend autoklavieren. Nach Abkühlung je nach Bedarf 1 µl Ampicillin oder Chloramphenicol pro 1 ml Medium hinzugeben.	

2.2.2.4.1. Transformation in E.coli (Stellar Competent Cells, Clontech)

Verwendete Plasmide	pET-Express-6xHN-C-HspB5-Wt/-AAA/-EAA/-AEA/-AAE
	pET-Express-6xHN-N-HspB5-Wt und alle 8 Mutanten

50 µl der E.coli-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl der verschiedenen Plasmide zu den Bakterien pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Hitzeschock für eine Minute bei 42 °C Temperatur. Die Bakterien wurden anschließend für 1–2 min auf Eis gestellt, dann mit 450 µl aufgewärmtem (37°C) SOC-Medium vermischt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit Ampicillin versetzt waren und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.2.4.2. Transformation in E.coli (Rosetta2 (DE3) Competent Cells, Novagen)

Verwendete Plasmide	pET-Express-6xHN-C-HspB5-Wt
	pET-Express-6xHN-N-HspB5-Wt und alle 8 Mutanten

50 µl der E.coli-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 1 µl mit 1 – 10 ng Plasmid-DNA der HspB5-Formen wurde hinzupipettiert und vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden für 5 Minuten auf Eis gelagert und anschließend ein Hitzeschock über 30 Sekunden bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden für 2 Minuten erneut auf Eis gelagert und dann mit 250 µl SOC-Medium (37 °C) vermischt. Nach einstündigem Schütteln bei 37 °C wurden die Zellen auf LB-Agarplatten ausplattiert, die Ampicillin und Chloramphenicol enthielten und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der beschriebene E.coli-Stamm verfügte über eine stammeigene Resistenz gegenüber Chloramphenicol, die zur besseren Selektion genutzt wurde.

2.2.2.4.3. Ansetzen eines Bakterienstocks

Zur Langzeitlagerung wurde eine Einzelkolonie ausplattierter, transformierter Stellar oder Rosetta2 (DE3) Cells mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 3–5 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C angeimpft. Das Kulturmedium wurde am nächsten Tag in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei ca. 16000 g in mehreren Durchläufen zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl angeimpftem Kulturmedium resuspendiert, mit weiteren 500 µl Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.5 DNA-Präparation mithilfe des GeneJet Plasmid MiniPrep Kits

Zur Durchführung der DNA-Präparation wurde eine Einzelkolonie transformierter Bakterien mit einer Pipettenspitze von den Agarplatten aufgenommen, die der Animpfung von 3–5 ml LB-Medium mit Ampicillin diente (siehe 2.2.2.4). Das Reagenzglas wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden am nächsten Tag bei ca. 6000 g und Raumtemperatur sedimentiert und das Medium abgenommen. Anschließend wurden 250 µl Resuspensionspuffer (mischen), 250 µl Lysepuffer (4–6-mal invertieren) und 350 µl Neutralisationspuffer (4–6-mal invertieren) hinzupipettiert. Danach wurde dieser Ansatz für 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf eine Säule pipettiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation wurde die Säule 2-mal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und je 1 min zentrifugiert. Zur Trocknung wurde die leere Säule ein weiteres Mal 1 min lang zentrifugiert. Die Elution wurde mit 50–75 µl Elutionspuffer oder HPLC-Wasser durchgeführt. Es folgte eine letzte Zentrifugation für 2 min unter Auffangen des Eluats. Die Konzentrationen wurden im Nanodrop gemessen. Die verwendeten Puffer wurden im Kit mitgeliefert.

2.2.2.6 DNA-Präparation mithilfe des NucleoBond Xtra Midi EF-Kits

Die DNA-Präparation mithilfe des NucleoBond Xtra Midi EF-Kits diente der Gewinnung größerer Mengen an Plasmiden, die für die Transformation kompetenter Bakterien oder Zellen benötigt wurden. Hierzu wurden entweder Einzelkolonien bereits transformierter Bakterien von Agarplatten gepickt oder eine Pipettenspitze aus den angelegten Bakterienstocks aufgenommen und in 100–150 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C angeimpft. Am nächsten Tag wurde das beimpfte Kulturmedium bei 5000 g und 4 °C über

15 min zentrifugiert. Alle im Folgenden verwendeten Puffer wurden im Kit mitgeliefert. Das Pellet wurde zunächst mit 8 ml Resuspensionspuffers versetzt und anschließend mit 8 ml Lysepuffer lysiert. Die Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Filter der Säule mit 15 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Zur Suspension wurden 8 ml Neutralisationspuffer hinzupipettiert, dann wurde die Lösung 5 min auf Eis gelagert. Nach dreimaliger Invertierung wurde die Lösung auf den Filter geladen. Der Filter wurde nach Durchlaufen des Lysats mit 5 ml Filterwaschpuffer gewaschen und anschließend aus der Säule entfernt. Die verbliebene Säule wurde zuerst mit 35 ml Endo-Waschpuffer und dann mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer. Zum Eluat wurden 3,5 ml Isopropanol pipettiert und anschließend eine Zentrifugation bei 15000 g und 4 °C über 30 min durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Präzipitat mit 2 ml 70 % Ethanol resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation bei ca. 16000 g und Raumtemperatur über 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zentrifugat nach ausreichender Trocknung in HPLC-Wasser gelöst. Die Konzentrationsmessung erfolgte im Nanodrop.

2.2.2.7 Restriktionsverdau der klonierten, bakteriellen Expressionsvektoren

Restriktionsansatz	(10x) Tango-Puffer	4 µl
	NcoI	0,5 µl
	EcoRI	0,5 µl
	Plasmid-DNA	Ein 300 ng entsprechendes Volumen
	Ad 20 µl mit HPLC-Wasser auffüllen.	

Zunächst wurde ein Gemisch angesetzt, das zu 4 µl aus (10x) Tango-Puffer und zu je 0,5 µl aus den Restriktionsenzymen NcoI und EcoRI bestand. Diese 5 µl wurden mit einem 300 ng entsprechenden Volumen an Plasmid mit HPLC-Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde dieser Restriktionsansatz für 1 h bei 37 °C im Thermomixer geschüttelt. Dann wurden 8–10 µl des Ansatzes mit 5 µl (5x) DNA-Probenpuffer vermischt und mithilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Proteinüberexpression in Rosetta2 (DE3) Cells

M9ZB	Bactotryptone	10 g
	Dinatriumhydrogenphosphat	15 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	3 g
	Natriumchlorid	0,5 g
	Ammoniumchlorid	1 g
	In 1 l Aqua dest. lösen und anschließend autoklavieren.	
	Bei Gebrauch:	
	20% D[+]-Saccharose	1 ml auf 100 ml Medium
	1 M Magnesiumsulfat	200 µl auf 100 ml Medium
	1 M Calciumchlorid	100 µl auf 100 ml Medium
	Ampicillin/Chloramphenicol	Je 1 µl pro ml Medium
xTractor-Puffer	Teil des His60 Ni Superflow & Gravity Column Purification Kit, Takara-Clontech, Produkt-Nr. 635658	

Für die Versuche wurden die Phosphomimetika von HspB5 sowie der Wildtyp mithilfe der der transformierten Bakterien (Rosetta2 (DE3)) überexprimiert. Aus dem Stock der mit den Plasmiden transformierten Bakterien wurde pro Versuchsansatz mit einer Pipettenspitze eine kleine Menge Bakterien aufgenommen. 5 ml LB-Medium wurden mit den Bakterien beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Hauptkultur wurde am nächsten Tag mit 500 ml M9ZB, 5 ml 20 % Glucose, 1 ml Magnesiumsulfat (1M), 500 µl Calciumchlorid (1M) und 500 µl Ampicillin hergestellt. Vor Hinzugabe des angeimpften Mediums zur Hauptkultur wurde 1 ml des Ansatzes abgenommen, dessen Trübung später als Bezugswert bei der Messung der optischen Dichte verwendet wurde. Die beimpfte Hauptkultur wurde anschließend bei 37 °C über mehrere Stunden geschüttelt. Dabei wurde alle 30–60 min die optische Dichte der Kultur gemessen. Nach Erreichen einer Dichte von 0,4–0,6 wurden 500 µl IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) hinzupipettiert, das die Überexpression des gewünschten Proteins induzierte. Die induzierte Kultur wurde über Nacht bei Raumtemperatur weiter geschüttelt. Am Folgetag wurde die Hauptkultur bei ca. 3000 g

und 4 °C über 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 18 ml xTractor-Puffer + 2 ml Lysozym (1 mg/ml in xTractor-Puffer) resuspendiert. Nach mehrmaliger Sonifizierung wurden 10 µl DNAse1 hinzugegeben und das Lysat für 15–30 min auf Eis gelagert. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation bei ca. 17500 g und 4 °C über 20 min. Der Überstand wurde aufgefangen und davon eine Probe zur späteren Kontrolle in der Gelelektrophorese abgenommen (Lysat-Probe). Für die denaturierende Aufreinigung der HspB5-Konstrukte -EEA, -EAE und -EEE wurde zum xTractor-Puffer anstatt 2 ml Lysozym eine entsprechende Menge Urea hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 8 M erreicht wurde.

2.2.3.2 Proteinaufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Äquilibrierungspuffer	Natriumphosphat	50 mM
	Natriumchlorid	300 mM
	Imidazol	20 mM
	Entsprechende Mengen in Aqua dest. lösen und pH auf 7,4 einstellen, anschließend auf Endvolumen mit Aqua dest. auffüllen.	
Waschpuffer ohne Imidazol (Endkonzentrationen)	Dinatriumhydrogenphosphat (50 mM)	2,99 g
	Natriumchlorid (350 mM)	10,22 g
	In 250 ml Aqua dest. lösen und pH auf 7,4 einstellen, anschließend auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen.	
Waschpuffer mit Imidazol	Für 100 mM Endkonzentration Imidazol (auf 100 ml):	
	Äquilibrierungspuffer	71,6 ml
	Elutionspuffer	28,4 ml
Elutionspuffer	Natriumphosphat	50 mM
	Natriumchlorid	300 mM
	Imidazol	300 mM

Entsprechende Mengen in Aqua dest. lösen und pH auf 7,4 einstellen, anschließend auf Endvolumen mit Aqua dest. auffüllen.

Für die Versuche mussten die rekombinant hergestellten HspB5-Formen in Reinform vorliegen. Hierzu wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Diese Methode beruht darauf, dass Proteine, die mit einem Polyhistidin-Rest fusioniert wurden, an Nickel-Ionen beschichteter Agaroseperlen binden und so aus einer Probe selektiert werden. Der Polyhistidin-Rest war im bakteriellen Expressionsvektor, in den die HspB5-Sequenzen kloniert wurden, unmittelbar neben der multiplen Klonierungsstelle lokalisiert und befand sich entweder am C- oder N-Terminus des überexprimierten Proteins. Mithilfe eines Elutionspuffers mit Imidazol werden die Proteine aus der Bindung gelöst, da das Imidazol kompetitiv an die Nickelperlen bindet. Die verwendeten Puffer wurden einerseits im Kit mitgeliefert, andererseits nach Protokoll des Herstellers (His60 Ni Superflow Resin & Gravity Columns User Manual, Clontech) selbst hergestellt.

Die mitgelieferte Nickelagarose wurde zunächst mit 10–15 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde sie zum Bakterienlysat gegeben, sodass die überexprimierten Proteine mit dem Polyhistidin-Rest ca. 2 h bei Raumtemperatur oder im Falle von HspB5-AEE bei 4°C anbinden konnten. Nach Anbindung wurde eine Probe der Nickelagarose abgenommen, 3-mal mit Waschpuffer ohne Imidazol gespült und dazwischen jeweils anzentrifugiert. Diese Probe diente der Kontrolle in der Gelelektrophorese, ob das überexprimierte Protein an die Nickelagarose gebunden hatte (Agarose-Probe). Das Bakterienlysat und die darin befindliche Nickelagarose wurden in ein mitgeliefertes Gefäß mit endständigem Filter gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und enthielt keine Nickelperlen mehr. Auch hiervon wurde eine Probe abgenommen (Durchfluss-Probe). Die im Gefäß verbliebenen Nickelperlen wurden anschließend 10-mal mit 1 ml Waschpuffer mit Imidazol gewaschen. Der Puffer hatte eine Imidazol-Konzentration von 100 mM. Einige der Waschschritte wurden aufgefangen und später mit den Kontrollen in der Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft. Auf die Waschschritte folgte die Elution der Proteine des Säulenmaterials. Hierzu wurde der Elutionspuffer mit einer Imidazol-Konzentration von 300 mM verwendet. Alle 10 Elutionsschritte à 1 ml wurden separat aufgefangen. Von den Eluaten wurde jeweils eine Probe entnommen, die der Überprüfung in der Coomassie-Färbung nach Polyacrylamidgelelektrophorese diente.

Tabelle 3: In der Proteinüberexpression und -aufreinigung verwendete HspB5-Konstrukte, sowie die dazugehörige Bedingung und Anzahl der Versuche

Konstrukt	Bedingung	Anzahl durchgeführter Aufreinigungen
HspB5-Wt, Polyhistidin-Rest C-terminal	nativ	2
HspB5-Wt, Polyhistidin-Rest C-terminal	denaturierend	2
HspB5-Wt, Polyhistidin-Rest N-terminal	nativ (ohne Lysozym)	2
HspB5-Wt, Polyhistidin-Rest N-terminal	nativ (mit Lysozym)	4
HspB5-Wt, Polyhistidin-Rest N-terminal	denaturierend	1
HspB5-AAA,-EAA,-AEA,-AAE,-AEE, Polyhistidin-Rest N-terminal	nativ (mit Lysozym)	1
HspB5-EEA,-EAE,-EEE	denaturierend	1

Im Ergebnisteil wird pro Konstrukt und Bedingung eine repräsentative Aufreinigung in der Polyacrylamidgelelektrophorese dargestellt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Tris-Puffer (1 M, pH = 6,8)	Trizma	30,29 g
	In wenig Aqua dest. lösen und pH auf 6,8 mit 37% HCL einstellen. Anschließend mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen.	
Tris-Puffer (1,5 M, pH = 8,8)	Trizma	45,43 g

	In wenig Aqua dest. lösen und pH auf 8,8 mit 37% HCL einstellen. Anschließend mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen.	
Sammelgel	Aqua dest.	2,1 ml
	30%-ige Acrylamid-Lösung	0,5 ml
	Tris-Puffer (1 M, pH = 6,8)	0,38 ml
	SDS (10%)	30 µl
	APS (10%)	30 µl
	Temed	3 µl
Trenngel	Aqua dest.	1,15 ml
	30%-ige Acrylamid-Lösung	2,5 ml
	Tris-Puffer (1,5 M, pH = 8,8)	1,25 ml
	SDS (10%)	50 µl
	APS (10%)	50 µl
	Temed	5 µl
SDS-Laufpuffer, 10x	Trizma (247 mM)	75 g
	Glycin (1,92 M)	360 g
	SDS (1%)	25 g
	Mit Aqua dest. ad 2500 ml.	
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Färbelösung)		
Entfärbelösung	Ethanol	300 ml
	Essigsäure	100 ml
	Aqua dest.	600 ml
Trocknungslösung	Methanol	300 ml
	Glycerol	50 ml

	Aqua dest.	650 ml
Lämmli-Probenpuffer, 3x	Trizma	0,45 g
	SDS	1,2 g
	In Aqua dest. lösen und pH mit HCL auf 6,9 einstellen.	
	Glycerin	7,56 g
	DTT	0,03 g
	Bromphenolblau (10 mg/ml)	400 µl
	Ad 20 ml mit Aqua dest. auffüllen.	

Zum Nachweis von Proteinen wurde in dieser Arbeit die Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Proteine werden bei dieser Methode in Abhängigkeit ihrer Größe in einem Spannungsfeld aufgetrennt. Das im Gel und Puffer verwendete Sodiumdodecylsulfat (SDS) überträgt negative Ladungen auf die Proteine, die in der Folge zur Kathode wandern. Für die Gelelektrophorese wurden zwei unterschiedliche Gele hergestellt. Zwei Glasplatten wurden derart eingespannt, dass dazwischen ein Hohlraum entstand, in den zunächst das Trenngel pipettiert wurde. Nach kurzer Aushärtung wurde anschließend das Sammelgel pipettiert und ein Kamm für die späteren Taschen eingesetzt. Nach Aushärtung des Sammelgels und Entfernung des Kamms wurden die Proben in die Taschen hineinpipettiert, in die erste Tasche wurden circa 7 µl Marker gegeben. Das Trenngel diente der Auftrennung der Proteine jeder einzelnen Probe. Die befüllten Gele wurden anschließend in einen Behälter gespannt, der mit (1x) SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Dann wurden für 30 min eine Spannung von 100 V an den Behälter angelegt, sodass die Proben gut in das Gel diffundieren konnten. In der Folge wurde auf 160 V erhöht und diese Spannung bis zum Ende des Laufs beibehalten. Die Gele wurden aus der Vorrichtung entnommen und für mindestens 30 min in einer Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Anschließend wurden die Gele in einer Entfärbelösung ausreichend lange gelagert, bis die Banden der Proteine gut erkennbar waren. Nach kurzem Schwenken in einer Trocknungslösung wurden die Gele zwischen zwei Cellophan-Papieren eingespannt und über Nacht getrocknet.

2.2.3.3.1. Polyacrylamidgelelektrophorese nach Nocodazolbehandlung

Die Proben der Versuche nach Nocodazolbehandlung (siehe 2.2.1.3), also die lösliche Tubulinfraktion einer HspB5-Mutante und die Polymerfraktion derselben HspB5-Mutante, wurden immer gemeinsam mit je 20 µl auf ein Gel aufgetragen. Auf jedem Gel befanden sich zudem die beiden Proben der mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

2.2.3.3.2. Polyacrylamidgelelektrophorese zur Überprüfung der Proteinaufreinigung

Die zu untersuchenden Proteinproben (20 µl) wurden mit 10 µl (1,5x) Lämmli-Puffers versetzt. Die Proben wurden anschließend kurz gemischt und anzentrifugiert, bevor sie für 3 min bei 95 °C erhitzt wurden. Die selbst hergestellten Gele (siehe oben) wurden mit 20 µl der vorbereiteten Proben in den Taschen des Sammelgels befüllt. Die Reihenfolge der Proben blieb dabei zumeist die gleiche: Lysat-Probe, Agarose-Probe, Durchfluss-Probe, Waschschritte, Eluate. Anschließend wurde wie oben beschrieben eine Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt.

2.2.3.3.3. Polyacrylamidgelelektrophorese nach Pull-Down Assay

20 µl der Pull-Down-Proben wurden zunächst mit 10 µl (1,5x) Lämmli-Puffer vermischt und anzentrifugiert. Anschließend wurden sie für 3 min bei 95°C erhitzt. Pro Tasche wurden 20 µl der Eluate des Pull-Down Assays sowie der zugehörigen Negativkontrolle (Eluat der Beute-Kontrollsäule, siehe 2.2.3.7) auf dasselbe Gel aufgetragen, um die Resultate im späteren Western Blot miteinander vergleichen zu können.

2.2.3.4 Dialyse, Aufkonzentrierung und Quantifizierung der gereinigten Proteine

Dialysepuffer (Endkonzentration)	Trizma (25 mM)	3,03 g
	Natriumchlorid (150 mM)	8,77 g
	In 500 ml Aqua dest. lösen, pH auf 7,2 einstellen und dann auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.	

Anhand der Polyacrylamidgelelektrophorese konnte überprüft werden, ob die Proteine in den Eluaten aufgereinigt vorlagen. Eluate mit deutlich sichtbaren Banden auf der zu erwartenden Höhe und möglichst gering ausgeprägten Nebenbanden wurden zunächst gepoolt

und anschließend gegen den Dialysepuffer dialysiert. Hierzu wurde die Lösung in einen Dialyse-Schlauch überführt, der vorher mit Aqua dest. auf Dichtigkeit geprüft wurde. Nach vollständiger Entfernung verbliebener Luftblasen, wurde der Schlauch an beiden Enden fest mit Klammern verschlossen und in ein Becherglas gelegt. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren. Das hierfür verwendete Volumen des Dialysepuffers betrug das 10–20-fache der Lösung.

Die Konzentration der dialysierten Proteinproben wurde mithilfe des Qubit®-Assays nach Protokoll bestimmt. Hierzu wurde als Erstes eine Gebrauchslösung angesetzt. Dabei wurde die im Kit mitgelieferte Qubit®-Protein-Reagenz 1:200 im Qubit®-Protein-Puffer verdünnt. Zu Beginn der Messungen waren zur Kalibrierung des Geräts drei Standard-Messungen notwendig. Die drei Standard-Proben wurden aus 190 µl Gebrauchslösung und 10 µl Qubit® Protein-Standard zusammen pipettiert und gemischt. Die zu messende Probe wurde aus 199 µl Gebrauchslösung und 1 µl der zu bestimmenden Ausgangslösung pipettiert und über 15 min inkubiert. Dann wurden in festgelegter Reihenfolge die drei Standards gemessen und anschließend die Konzentration der Probe. Das Qubit®-Fluorometer hat dabei immer direkt auch die Konzentration der Originallösung berechnet.

Anschließend wurden die Proben aufkonzentriert. Dazu wurde stets abhängig von der gemessenen Konzentration circa die Hälfte des Volumens der dialysierten Proteinlösung verwendet. Amicon®-Filterröhrchen wurden mit 500 µl der Proteinlösung beladen und anschließend bei 13700 g für 5–10 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das verbliebene Volumen im Amicon®-Röhrchen in einem separaten Eppendorf-Hütchen nach erneuter Zentrifugation über 1 min bei 1000 g aufgefangen. Dieser Vorgang wurde mehrmals mit 500 µl der Proteinlösung wiederholt, bis circa die Hälfte des Ausgangsvolumens vorhanden war. Das Konzentrat wurde anschließend mit der verbliebenen Proteinlösung verdünnt und erneut die Konzentration mit dem Qubit®-Fluorometer gemessen. Schließlich wurde die konzentrierte Lösung aliquotiert und dabei mit dem Halt®-Protease/Phosphatase-Inhibitor versetzt. Hierbei wurde die Inhibitor-Mischung von 100facher Konzentration auf eine 1fache verdünnt. Die präparierten Aliquots wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.5 Herstellung eines Lysats aus HspB1-überexprimierenden C6-Zellen für den Pull-Down Assay

TBS, 10x	(Endkonzentrati-	Trizma (0,199 M)	24,10 g

on)		
	Natriumchlorid (1M)	58,44 g
	In 500 ml Aqua dest. lösen und pH auf 7,4 einstellen, dann auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen.	
TBS, 1x	TBS, 10x	100 ml
	Aqua dest.	900 ml

Wie unter 2.2.1.2 beschrieben wurden C6-Zellen mit einem HspB1-codierenden Plasmid transfiziert, und nach 48 h zunächst mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Trypsin/Versen von den Petri-Schalen abgelöst. Die Suspension wurde mit 1 ml Kulturmedium ($DMEM^+$) vermischt und in Eppendorf-Hütchen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei ca. 560 g über 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml (1x) TBS resuspendiert und in ein steriles Zentrifugenröhrchen transferiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei ca. 560 g über 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Gewicht des Pellets gemessen. Pro Gramm Zellen wurde das Pellet in 2,5 ml (1x) TBS mit 1/50 Vol. Halt™-Protease/Phosphatase-Inhibitor-Cocktail resuspendiert. Dann wurden 2,5 ml des mitgelieferten Lysepuffers (Profound™ Pull-Down PolyHis Protein:Protein Interaction Kit) pro Gramm Zellen hinzupipettiert und das Gemisch mehrmals invertiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Lösung 5 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Röhrchen aufgefangen und auf Eis gelagert. Die Konzentration wurde im Qubit®-Fluorometer gemessen (siehe 2.2.3.4). Anschließend wurde die Lösung mit der mitgelieferten 4 M Imidazol-Stammlösung nach Herstellerprotokoll versetzt, bis zu einer Imidazol-Endkonzentration von 10 mM. Das Lysat wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.6 Vorbereitung der Tubulin-Proben für den Pull-Down Assay

Tubulin-Puffer, 1x (Endkonzentration)	PIPES (80 mM)	1,21 g
	In 25 ml Aqua dest. lösen und pH mit 37% HCL auf 6,93 einstellen.	

	Magnesiumchlorid (2 mM)	9,5 mg
	EGTA (0,5 mM)	9,5 mg
	Ad 50 ml mit Aqua dest. auffüllen, anschließend filtrieren mit Filtropur-S-0,45-Filter.	
Tubulin-Puffer G	(1x) Tubulin-Puffer	99 µl
	GTP, 100 mM Stammlösung	1 µl

Das lyophilisiert vorliegende Tubulin wurde in dem Tubulin-Puffer G so aufgelöst, dass man eine Endkonzentration von 10 mg/ml erreichte, d.h. 1 mg Tubulin wurde in 100 µl Puffer gelöst, 10 µl Aliquots (100 µg Tubulin) wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei Gebrauch wurden die Proben für 1 min in einem Wasserbad mit Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gelagert.

2.2.3.7 Pull-Down Assay

Waschpuffer	1:1 (1x) TBS und Lysepuffer (im Kit enthalten)

Für die Pull-Down Assays wurde das Profound™ Pull-Down PolyHis Protein:Protein Interaction Kit verwendet. Die kühlgelagerten Proben der aufgereinigten HspB5-Mutanten, des Wildtyps sowie des C6-Zelllysats nach HspB1-Überexpression oder des α-Tubulins wurden langsam auf Eis beziehungsweise im Wasserbad bei Raumtemperatur für 1 min aufgetaut. Die mitgelieferten Pull-Down-Hütchen wurden mit 50 µl Kobalt-Agarose befüllt (Säule). Anschließend wurde wie im Protokoll des Herstellers beschrieben ein Waschpuffer angesetzt, der 1:1 aus (1x) TBS sowie dem im Kit beigefügten Lysepuffer und einer entsprechenden Menge 4 M Imidazol-Stammlösung bestand. Die Endkonzentration an Imidazol im Puffer betrug 10 mM. Pro Säule wurden ungefähr 8 ml Waschpuffer für einen Pull-Down Assay benötigt. Die Säulen wurden zunächst zur Äquilibrierung 3-mal mit je 400 µl Waschpuffer gespült. Dazwischen wurde das Volumen jeweils bei 1250 g über 1 min aus der Säule zentrifugiert und ein neuer Waschschritt durchgeführt. Die Säule wurde anschließend mit 100-150 µg des „Köder-Proteins“ HspB5-Wt und seinen 8 Phosphomutanten mit Polyhistidin-Rest beladen. Die folgende 1-2-stündige Inkubation in einem *test-*

tube-Rotator bei 4 °C diente der Anbindung des Köder-Proteins an die Kobalt-Agarose. Anschließend wurde die Säule 1-mal bei 1250 g über 1 min zentrifugiert und der Durchfluss aufgefangen, dann erneut 3-mal mit 400 µl des Waschpuffers gespült und dazwischen jeweils zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte über 1h bei 4°C auf dem *test-tube*-Rotator die Anbindung des „Beute-Proteins", dem potenziellen Interaktionspartner, an den „Kobalt-Köder-Komplex." Für die Versuche wurden einerseits ein 150 µg entsprechendes Volumen des C6-Lysats nach HspB1-Überexpression und andererseits 100 µg α-Tubulin in 150 µl (1x) Tubulin-Puffer verwendet. Die Pull-Down-Hütchen wurden dann erneut zentrifugiert und der Durchfluss aufgefangen. Danach folgten drei weitere Waschschritte mit jeweils 400 µl Waschpuffer und dazwischen liegender Zentrifugation. Für die Elution des Bindungskomplexes von der Säule wurde ein Puffer angesetzt, der 1:1 aus (1x) TBS und Lysepuffer angesetzt wurde und eine Imidazolkonzentration von 400 mM enthielt. Diese wurde mit der Hinzugabe eines entsprechenden Volumens an 4 M Imidazol-Stammlösung erreicht.

Die Köder-Kontrollsäule wurde mit 100-150 µg HspB5-Wt und -Phosphomutanten beladen und anstatt des Beute-Proteins wurde dieselbe Menge Waschpuffer hinzupipettiert. Die Beute-Kontrollsäule wurde mit demselben Volumen an Waschpuffer anstatt des Köder-Proteins beladen und im nächsten Schritt mit derselben Menge an C6-Zelllysat beziehungsweise α-Tubulin (siehe oben).

2.2.3.8 Western Blot

Blotpuffer, 10x (Endkonzentration)	Trizma (250 mM)	30,3 g
	Glycin (1,95 M)	146,4 g
	SDS (1%)	10 g
	Ad 1 l mit Aqua dest. auffüllen. Bei Gebrauch, Verdünnung wie folgt:	
	(10x) Blotpuffer	100 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua dest.	700 ml

Der Western Blot wurde als semiquantitative Nachweismethode bestimmter Proteine verwendet. Hierbei wandern die negativ geladenen Proteine vom Trenngel aus einer vorangegangen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zur Kathode und werden auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Auf einen mit (1x) Blotpuffer getränkten Schwamm wurde das Whatman-Filterpapier gelegt. Darauf wurden die Membran, das Trenngel und ein weiterer Filter gestapelt und mögliche Luftblasen verstrichen. Anschließend wurde ein weiterer Schwamm auf den Stapel gelegt. Alle verwendeten Filter und Schwämme, sowie die Membran wurden stets in (1x) Blotpuffer getränkt. Der Stapel wurde anschließend in die dafür vorgesehene Western Blot-Kammer eingespannt, die vorher mit gekühltem (1x) Blotpuffer bis zum Rand befüllt wurde. Der Proteintransfer wurde über 90 min bei einer Spannung von 100 V und auf Eis durchgeführt.

2.2.3.9 Proteindetektion

TBS/T	TBS, 10x	250 ml
	Tween 20	1,25 ml
	Ad 2,5 l mit Aqua dest. auffüllen.	
Blockierlösung	Je nach benötigter Konzentration, für 1%:	
	Magermilchpulver	1 g
	TBS/T	100 ml

Im nächsten Schritt wurden die Western Blots semiquantitativ ausgewertet. Hierzu wurden die Nitrocellulose-Membranen nach dem Proteintransfer aus dem Stapel entfernt und zunächst in 2,5%iger Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Hierdurch wurden unspezifische Bindungsstellen an den Proteinen abgesättigt, was später das Hintergrundsignal auf den durch Chemolumineszenz belichteten Filmen reduzierte. Anschließend wurden die Membranen in Klarsichtbeuteln eingeschweißt, diese mit der Primärantikörper-Lösung befüllt und verschlossen und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Membran aus der Plastikhülle entfernt und 3-mal 20 min in TBS/T geschwenkt und gewaschen. Anschließend wurde die Membran in der Sekundärantikörper-Lösung über mindestens 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3-mal in TBS/T

über 20 min gewaschen. Der Primärantikörper sollte selektiv an die nachzuweisenden Proteine binden. Der Sekundärantikörper war gegen den Erstantikörper gerichtet und mit einer Meerretichperoxidase (POX) gekoppelt. Die Antikörperlösungen wiesen teilweise unterschiedliche Konzentrationen auf und waren in Blockierlösungen mit unterschiedlichem Gehalt an Magermilchpulver gelöst. Das Verhältnis von Bandenintensität, Belichtungszeit und Hintergrundsignal war unter den beschriebenen Lösungsbedingungen für die verschiedenen Versuche am besten. Die Antikörperlösungen wurden wie in Tabelle 4 gezeigt, angesetzt.

Tabelle 4: Projektbezogene Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörperlösungen gegen HspB5, HspB1 und α-Tubulin

Antikörper	**Nocodazolversuch**	**Pull-Down Assays**
Primärantikörper		
• HspB5	Anti-HspB5 (Kaninchen) - 1:2500 in 1% Blockierlösung	Anti-HspB5 (Kaninchen) - 1:5000 in 10% Blockierlösung
• α-Tubulin	Anti-α-Tubulin (Maus) - 1:2000 in 1% Blockierlösung	Anti-α-Tubulin (Maus) - 1:500 in 1% Blockierlösung
• HspB1		Anti-HspB1 (Kaninchen) - 1:1000 in 2,5% Blockierlösung
Sekundärantikörper		
• HspB5	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POX - 1:10000 in 1% Blockierlösung	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POX - 1:10000 in 10% Blockierlösung
• α-Tubulin	Ziege-anti-Maus-IgG-POX - 1:5000 in 1% Blockierlösung	Ziege-anti-Maus-IgG-POX - 1:5000 in 1% Blockierlösung
• HspB1		Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POX - 1:10000 in 2,5% Blockierlösung

Nach Inkubation des Sekundärantikörpers und der folgenden Waschschritte wurde die Membran in eine transparente Plastiktasche gelegt, dann in eine Filmkassette überführt und mit einer 1:1 Mischung zweier ECL-Lösungen aus dem Pierce ECL Western Blotting Kit benetzt. Die am Sekundärantikörper gekoppelte Meerretichperoxidase setzte das Luminol-basierte Substrat um, sodass ein Lichtsignal abgegeben wurde. In einem abgedunkelten

Raum wurde ein Film in die Kassette gelegt und über eine definierte Zeit belichtet. Anschließend wurden die Banden des Films mithilfe eines Entwicklers sichtbar gemacht.

2.2.3.10 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Die entwickelten Filme beider Projekte wurden eingescannt und anschließend weiter ausgewertet mithilfe des Programms ImageJ. Hierbei wurden die Banden separat markiert und das unspezifische Hintergrundsignal des Films über die Funktionsfolge *Image - Adjust - Brightness/Contrast* vermindert. Die Bandenintensität blieb durch diesen Schritt unbeeinflusst. Das Bandensignal wurde vom Programm als eingipflige Kurve wiedergegeben. Durch eine manuell eingefügte Grundlinie durch den Beginn des Anstiegs und das Ende des Abfalls der Kurve entstand eine eingeschlossene Fläche. Der zugeschriebene Zahlenwert repräsentierte die Intensität der Bande. Um Aussagen über Proteinmengenunterschiede treffen zu können, wurden die Intensitäten in entsprechender Weise zueinander ins Verhältnis gesetzt.

2.2.4 Datenerhebung und Analyse

Für die Untersuchung der Mikrotubulistabilität unter HspB5-Überexpression und Nocodazolbehandlung in C6-Zellen wurden die Werte der Bandenintensitäten von HspB5 und der zugehörigen polymerisierten Tubulinfraktion für die entsprechende Anzahl an Versuchen (n = 8) ins Verhältnis gesetzt. Die Darstellung der Werte, für die in dieser Arbeit transfizierten und überexprimierten Phosphomimetika sowie den Leervektor, erfolgte als Säulendiagramm. Angegeben ist jeweils der Mittelwert über die Anzahl der acht Versuche, sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Für die Pull-Down-Versuche wurden die Werte der Tubulin-Bande zu den Werten der HspB5-Bande ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis der Werte des gebundenen Tubulins zum HspB5-Wildtyp-Signal wurde als Bezugswert mit 1 normiert. Die Werte für die einzelnen HspB5-Phosphomimetika wurden dazu in Verhältnis gesetzt. Die Anzahl der Versuche (n) lag für HspB5-Wt und -AAA bei n = 7, für HspB5-EAA,-AEA,-AAE und -AEE bei n = 4 und für HspB5-EEA,-EAE und -EEE bei n = 3. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Box-Plot. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Für die statistischen Berechnungen wurde jeweils der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung der drei Phosphorylierungsstellen von HspB5 für seine Interaktion mit Tubulin. Hierzu wurde erstens die Wirkung von HspB5 und seiner pseudophosphorylierten oder nicht phosphorylierbaren Mutante auf die Stabilität der Mikrotubuli in einem zellulären System genauer analysiert. Zweitens wurden *in-vitro*-Bindungsstudien zwischen HspB5 und seinen Mutanten mit Tubulin durchgeführt.

3.1 Untersuchung des Effektes von HspB5 und seiner Phosphorylierung auf das Mikrotubulussystem in C6-Gliomzellen

Um zu untersuchen, ob HspB5 beziehungsweise seine pseudophosphorylierten oder nicht phosphorylierbaren Mutanten die Stabilität von Mikrotubuli beeinflussen, wurden in kultivierten C6-Zellen HspB5 und seine Phosphomimetika überexprimiert. Dann wurden die Zellen mit Nocodazol behandelt, einem Spindelgift, das die Polymerisierung der Tubulinmonomere zu Mikrotubuli inhibiert und so zu einer Depolymerisation führt. Anschließend wurde das polymerisierte Tubulin in Abhängigkeit der einzelnen HspB5-Mutanten bestimmt.

3.1.1 Überexpression von HspB5 und seinen Mutanten in kultivierten C6-Zellen

Für die Überexpression von HspB5 und seinen Mutanten erfolgte zunächst eine Transfektion der kultivierten C6-Zellen mithilfe der Transfektionsreagenz GenJet DNA Pre-Optimized for C6 und den entsprechenden pLVX-IRES-ZsGreen1-Vektoren mit codierender Sequenz für die HspB5-Formen. Folgende HspB5-Konstrukte wurden für die Transfektion der C6-Gliomzellen verwendet: HspB5-Wt, HspB5-AAA, HspB5-EAA, HspB5-AEA, HspB5-AAE und HspB5-AEE. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Leervektor verwendet, der lediglich für ZsGreen1 codierte. In Vorarbeiten wurde die cDNA-Sequenz von HspB5 so mutiert, dass die drei Serinreste des Proteins durch Aminosäureaustausch an den Stellen 19, 45 und 59 entweder durch Alanin (A) oder Glutaminsäure (E) ersetzt wurden. Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe im Alanin wurde eine Phosphorylierung unmöglich. Glutaminsäure simulierte durch die Übertragung einer negativen Ladung hingegen den Effekt einer Phosphorylierung. Die Transfektion der C6-Zellen erfolgte zum Zeitpunkt

eines subkonfluenten Zellrasens, entsprechend circa 70 % bewachsener Kulturoberfläche. Der Transfektionserfolg wurde ungefähr 24 h später anhand der ZsGreen1-Expression mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops kontrolliert (Abbildung 2).

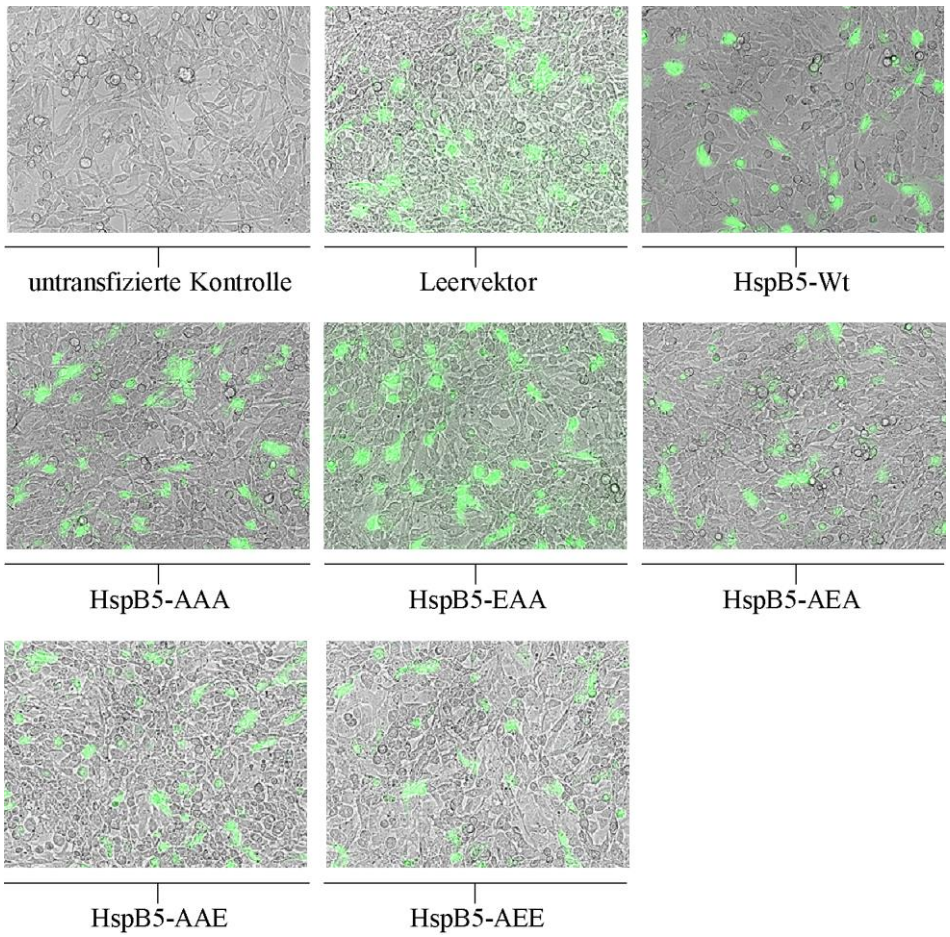


Abbildung 2: Fluoreszenzaufnahmen von C6-Zellen, transfiziert mit verschiedenen Plasmiden. C6-Zellen wurden mit verschiedenen Plasmiden mit codierender Sequenz für die HspB5-Konstrukte, wie unter den Bildern angegeben, transfiziert. Die grüne Fluoreszenz des im bicistronischen Vektor enthaltenen ZsGreen1 zeigt die erfolgreiche Transfektion (nach 24 h). Im Durchschnitt lag die Transfektionseffizienz bei 15-20%.

Die untransfizierte Kontrolle (Abbildung 2, oben links) zeigte einen unbehandelten Zellrasen. In den weiteren Bildern sieht man ZsGreen1-exprimierende Zellen, die erfolgreich mit entsprechenden Plasmiden transfiziert wurden. Der Anteil transfizierter Zellen an der Gesamtheit der Zellen lag bei dem Leervektor und den HspB5-Formen bei circa 15–20 %, was für die geplanten Experimente als ausreichend angenommen werden konnte.

3.1.2 Depolymerisation von Mikrotubuli in kultivierten C6-Zellen durch Nocodazol

Um mögliche Effekte von überexprimiertem HspB5 an Mikrotubuli zu sehen, war es notwendig, ein Experimentalsystem zu etablieren, was zu partieller Depolymerisation von Mikrotubuli führte. Kultivierte C6-Zellen wurden mit dem Spindelgift Nocodazol behandelt. Hierzu wurden in Vorversuchen unterschiedliche Nocodazol-Konzentrationen und Expositionszeiten getestet. Zunächst wurden drei Konzentrationen (1 µM, 5 µM und 10 µM) an Nocodazol über eine Expositionsdauer von 30 Minuten ausprobiert.

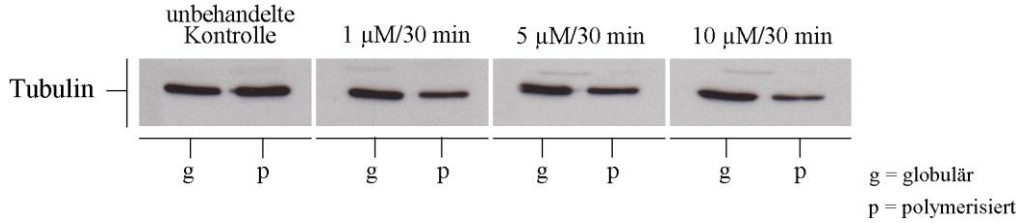


Abbildung 3: Repräsentativer Western Blot der Tubulinfraktionen mit Nocodazol behandelter C6-Zellen. Einer unbehandelten Kontrolle sind Zellen gegenübergestellt, die entweder mit 1 µM (Versuchsanzahl n = 4), 5 µM (n = 5) oder 10 µM (n = 6) Nocodazol über 30 min behandelt wurden. Es wurden jeweils Proben des globulären und polymerisierten Tubulins aufgetragen. Der größere Anteil des Tubulins liegt bei der Kontrolle als Polymer vor. Mit zunehmender Nocodazol-Konzentration nimmt das polymerisierte Tubulin ab und die globuläre Fraktion zu.

Die Abbildung 3 zeigt einen Western Blot Nocodazol-behandelter C6-Zellen. Das globuläre und polymerisierte Tubulin wurden wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben aus den behandelten Zellen isoliert und für die entsprechende Bedingung nebeneinander im Blot aufgetragen. In der Kontrollfraktion ist die Bande des polymerisierten Tubulins etwas stärker, was zeigt, dass der größere Anteil des Tubulins in der Zelle als Polymer vorliegt. Die Fraktionen der behandelten Zellen zeigen hingegen eine Abnahme dieser Polymerfraktion mit intensiveren Banden beim globulären Tubulin. Je höher die Nocodazol-Konzentration, desto ausgeprägter war auch die Depolymerisation. Im nächsten Versuch wurde die Nocodazol-Konzentration auf 30 µM erhöht und die Expositionszeit auf 2 min verringert. Zusätzlich wurde eine Petri-Schale C6-Zellen vor der Nocodazolbehandlung mit dem Plasmid für HspB5-Wt transfiziert. Das Ergebnis nach der Behandlung ist in Abbildung 4 dargestellt.

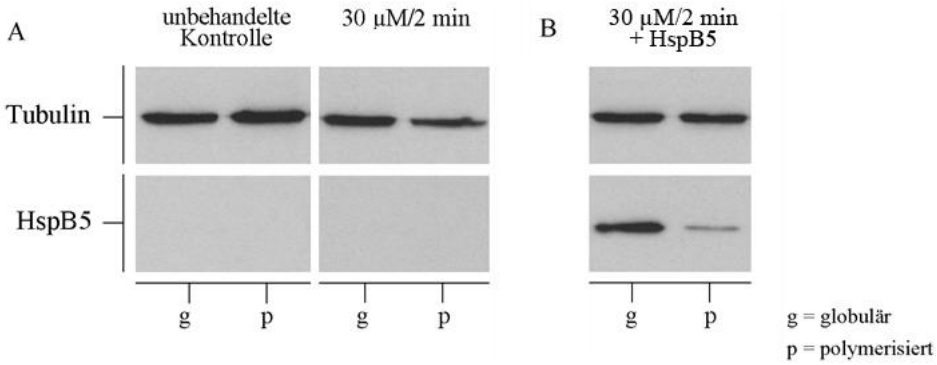


Abbildung 4: Western Blot der Tubulinfraktionen Nocodazol-behandelter sowie zusätzlich HspB5-transfizierter C6-Zellen (30 µM/2min). Obere Reihe: Signale des globulären und polymerisierten Tubulins. Untere Reihe: zugehöriges HspB5-Signal. A: Der unbehandelten Kontrolle ist hier das Ergebnis nach Nocodazolbehandlung ohne HspB5-Transfektion gegenübergestellt. Die Polymerfraktion hat erkennbar abgenommen. B: Hier ist das Ergebnis nach HspB5-Überexpression und Nocodazolbehandlung zu sehen. Im Vergleich zur Polymer-Bande der behandelten, nicht transfizierten C6-Zellen zeigte sich hier eine stärkere Bande des polymerisierten Tubulins.

Es zeigt sich, dass durch die höhere Konzentration an Nocodazol (30 µM) in kürzerer Zeit (2 min) eine vergleichbar gute Depolymerisation der Mikrotubuli erzeugt wurde (A) wie in den Vorversuchen (siehe oben). HspB5-Überexpression (B) führte zu einer Erhöhung der Polymerfraktion von Tubulin unter Nocodazolbehandlung. Somit wurde hier ein geeignetes Experimentalsystem etabliert, um den Einfluss der Phosphorylierung von HspB5 auf die Mikrotubulistabilität genauer zu untersuchen.

3.1.3 Beeinflussung der Mikrotubulistabilität durch Überexpression von HspB5 und seinen Phosphomimetika

Für die Untersuchung des Einflusses der einzelnen Phosphorylierungsstellen sowie der Pseudophosphorylierung von HspB5 auf die Stabilität von Mikrotubuli unter Nocodazol-Bedingungen wurden die C6-Gliomzellen, wie unter 3.1.1. beschrieben, mit den Expressionsvektoren für HspB5 und seinen Mutanten transfiziert und 24 h in Kultur gehalten. Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte am Folgetag der Transfektionserfolg überprüft werden. Bei ausreichender Transfektionsrate und Zelldichte wurden die Zellen anschließend mit 30 µM Nocodazol über 2 min behandelt. Die Isolation der einzelnen Tubulinfraktionen erfolgte wie unter 2.2.1.3 beschrieben. Die Analyse der Tubulinfraktionen und der Expression der einzelnen HspB5-Konstrukte erfolgte mithilfe von Western Blots. In der

folgenden Abbildung 5 ist ein repräsentativer Western Blot unter den geschilderten Bedingungen gezeigt.

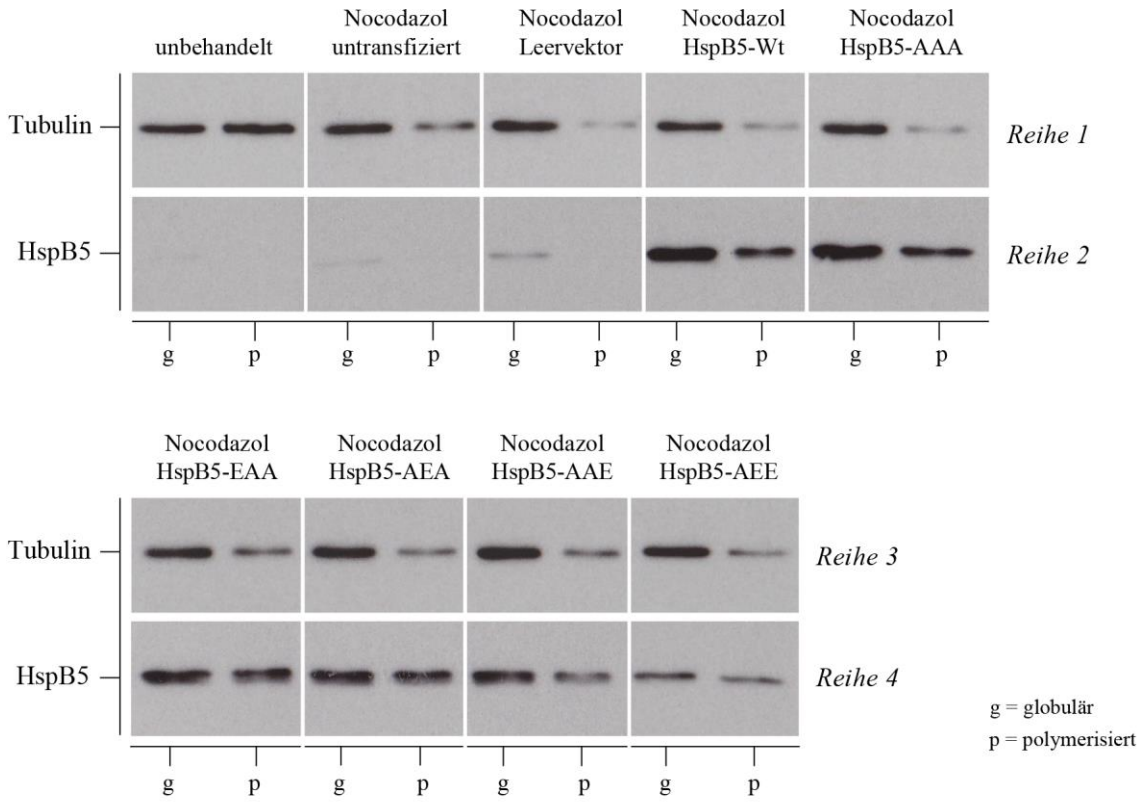


Abbildung 5: Repräsentativer Western Blot für HspB5 und Tubulin von C6-Zellen nach HspB5-Überexpression und anschließender Nocodazolbehandlung. Untransfizierte und mit verschiedenen HspB5-Konstrukten (wie über den Spuren angegeben) transfizierte C6-Zellen wurden 2 min mit 30 µM Nocodazol behandelt und anschließend globuläre (g) und polymerisierte (p) Tubulinfraktionen isoliert. Nocodazol führte zu einer Abnahme von polymerisierten Tubulin (Reihe 1 und 3). Dieser Effekt war auch in allen mit den verschiedenen HspB5-Konstrukten transfizierten C6-Zellen zu beobachten.

Die Menge des polymerisierten Tubulins der unbehandelten C6-Zellen war stets etwas mehr als die des globulären Tubulins (Abbildung 5). Die Behandlung mit Nocodazol führte zu einer Abnahme der polymerisierten Tubulinfraktion. Durch die Depolymerisierung ist die Fraktion des löslichen Tubulins bei allen behandelten Zellen größer. Im Vorversuch (siehe Abbildung 4) war zu sehen, dass die Überexpression von HspB5-Wt zu einer stärkeren Bande der Polymerfraktion im Western Blot führte und somit einen stabilisierenden Effekt auf die Mikrotubuli hatte. Dieser Effekt von HspB5-Wt war in den nun durchgeführten Western Blots nicht eindeutig erkennbar. Auch unter Überexpression der HspB5-Konstrukte (Reihe 2 und 4) hatte die Polymerfraktion nach Nocodazolbehandlung abge-

nommen. Auffällig ist, dass sich der überwiegende Anteil des überexprimierten HspB5, wie auch im Vorversuch zu sehen, in der globulären Tubulinfraktion befand.

Abbildung 6 zeigt die densitometrische Auswertung aller Versuche. Hierbei wurden die Fraktionen des polymerisierten Tubulins der Leervektor-Probe mit den Proben der HspB5-exprimierenden Zellen verglichen. Zunächst wurde der prozentuale Anteil des polymerisierten Tubulins des Gesamttubulins für alle Proben bestimmt. Diese prozentualen Anteile an polymerisiertem Tubulin der einzelnen HspB5-Konstrukte wurden dann zu dem Wert der Leervektor-Proben ins Verhältnis gesetzt.

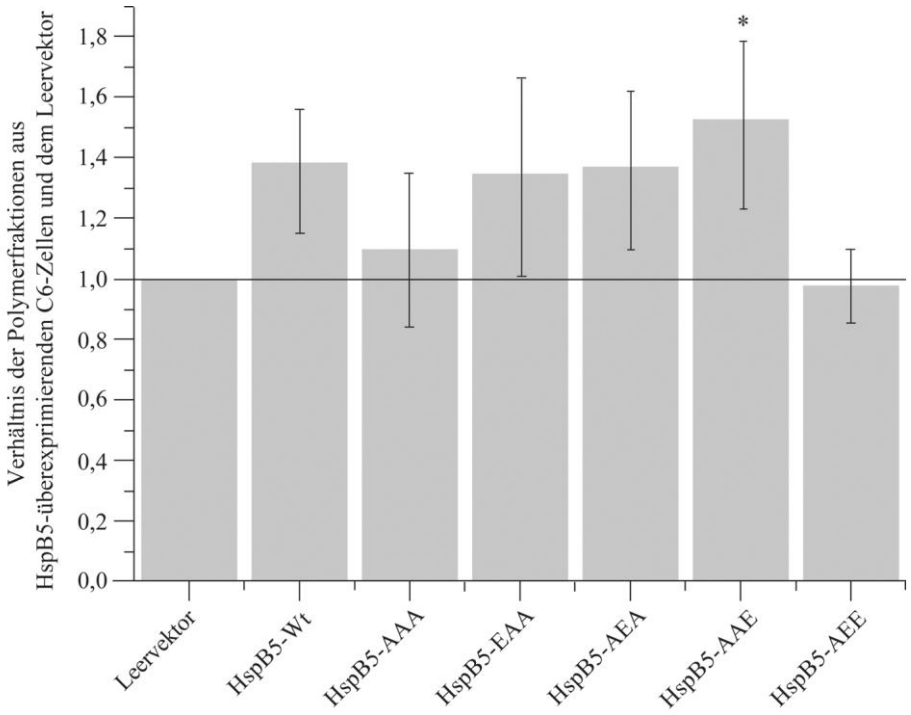


Abbildung 6: Quantifzierung der Tubulin-Polymerfraktionen nach Nocodazolbehandlung. Das Verhältnis des polymerisierten Tubulins zum Gesamttubulin wurde für den Leervektor als 1 definiert. Dieselben Verhältnisse wurden für die einzelnen HspB5-Formen errechnet und auf den Leervektor bezogen. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM). n = 8, * $p < 0,05$.

Es zeigte sich kein deutlicher Effekt auf die Mikrotubulistabilität in C6-Zellen nach HspB5-Überexpression und anschließender Nocodazol-Behandlung (Abbildung 6). Eine leichte tendenzielle, nicht signifikante Erhöhung der Polymer-Fraktion war bei den HspB5-Konstrukten -Wt, -AAA, -EAA und -AEA nachweisbar. Das Phosphomimetikum HspB5-AAE führte hingegen in den Versuchen zu einer statistisch signifikanten, geringer ausge-

prägten Depolymerisierung der Mikrotubuli im Vergleich zu den mit einem Leervektor transfizierten C6-Zellen.

3.2 *In-vitro*-Untersuchung zur Bedeutung der Phosphorylierung von HspB5 bei seiner Interaktion mit Tubulin

Im Mittelpunkt dieses Projekts stand die Frage, inwiefern der Phosphorylierungsstatus von HspB5 die Interaktion mit seinem Zielprotein Tubulin beeinflusst. Dazu wurden HspB5 und pseudophosphorylierte sowie nicht phosphorylierbare Mutanten mit einem Polyhistidin-Rest fusioniert, bakteriell überexprimiert, aufgereinigt und anschließend in einem Pull-Down Assay auf Bindung an Tubulin getestet.

3.2.1 Rekombinante Synthese von HspB5 und seinen Mutanten

Der erste Schritt bestand darin, HspB5 und die zu untersuchenden Mutanten rekombinant herzustellen und in Reinform zu generieren. Dies wurde durch bakterielle Überexpression der Proteine in kompetenten E.coli und anschließende Affinitätschromatographie erreicht. Dazu, und für die späteren Versuche, war es notwendig, die Proteine mit einem Polyhistidin-Rest zu fusionieren.

3.2.1.1 Klonierung einzelner HspB5-Formen in zwei bakterielle Expressionsvektoren mit unterschiedlicher Lokalisation des Polyhistidin-Rests

Die rekombinante Herstellung des HspB5 und seiner Mutanten erforderte die Klonierung der entsprechenden cDNAs in einen geeigneten bakteriellen Expressionsvektor mit einer codierenden Sequenz für den Polyhistidin-Rest. Hierfür standen zwei bakterielle Expressionsvektoren zur Auswahl, die sich in der Lokalisation des Polyhistidin-Rests unterschieden, der im Vektor entweder am C- oder N-Terminus der multiplen Klonierungsseite lokalisiert war (siehe Abbildung 1, Kapitel 2.1.10). Es sollten beide Lokalisationen ausprobiert werden, da unklar war, wie und ob ein Polyhistidin-Rest die Funktion von HspB5 beeinflusst. Hierfür wurden die im Folgenden beschriebenen 4 cDNAs von HspB5 und seiner Mutanten zunächst in den pET6xHN-C-Vektor mit C-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest kloniert. Das Vorgehen ist im Folgenenden exemplarisch für alle übrigen Klonierungsversuche dargestellt, insbesondere für die Klonierungen der Sequenzen des HspB5-

Wt und seiner Phosphomimetika in den pET6xHN-N-Vektor mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest.

Es erfolgte zuerst eine PCR der Sequenzen für HspB5-AAA, -EAA, -AEA, -AAE, die im pCR®2.1-TOPO®-Vektor vorlagen und eine anschließende Überprüfung in einer Agarosegelelektrophorese (Abbildung 7). Die Sequenz für HspB5-Wt lag zu Beginn der Versuche bereits im bakteriellen Expressionsvektor mit C-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest vor.

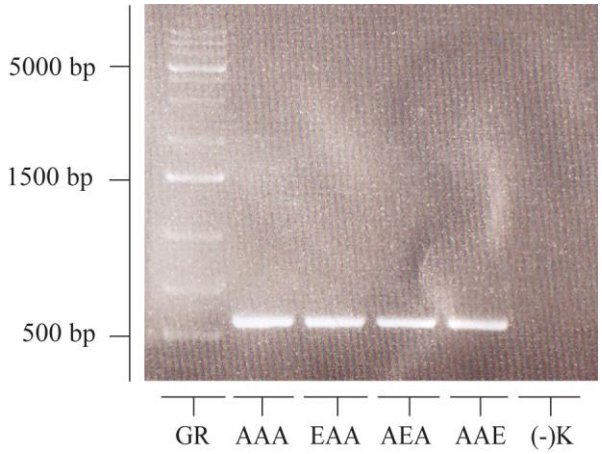


Abbildung 7: PCR der im pCR®2.1-TOPO®-Vektor codierten HspB5-Sequenzen. 1 % Agarose-Gel, GR: GeneRuler mit orientierenden Banden bei 500, 1500 und 5000 Basenpaaren (bp). Banden von links: HspB5-AAA, HspB5-EAA, HspB5-AEA, HspB5-AAE, Negativkontrolle (-K). Die PCR-Produkte der HspB5-Sequenzen hatten eine Größe von knapp über 500 Basenpaaren. Die Negativkontrolle (-K) mit H_2O anstatt des Vektors war negativ.

Anschließend wurden die PCR-Produkte in den pET6xHN-C-Vektor kloniert. Nach Transformation von E.coli-Bakterien und anschließender Ausplattierung, wurden pro Klon 5 Einzelkolonien von den Agarplatten aufgenommen, angeimpft und eine Plasmidpräparation durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.4 und 2.2.2.5). Dann wurde mittels Restriktionsverdau überprüft, ob die HspB5-Sequenzen in den Vektor integriert wurden (Abbildung 8).

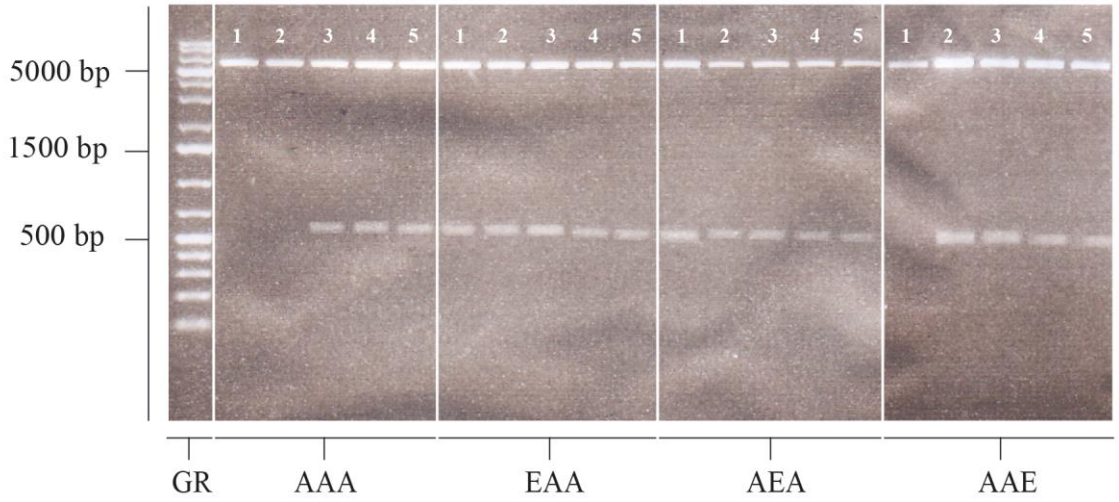


Abbildung 8: Beispielhafter Restriktionsverdau ausgewählter HspB5-Sequenzen klonierter Plasmide. 1%iges Agarose-Gel, GR: GeneRuler mit orientierenden Banden bei 500, 1500 und 5000 Basenpaaren (bp). 1-5: angeimpfte Einzelkolonien des jeweiligen Klons. Zwischen 5000 und 7000 bp: Vektor-Bande. Zwischen 500 und 700 bp: HspB5-Sequenzen.

Die korrekte Sequenz der Plasmide und richtige Orientierung im Vektor wurde durch Sequenzierung überprüft und weiterhin wurden die Sequenzen aller HspB5-Formen in den pET6xHN-N-Vektor mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest umkloniert.

3.2.1.2 Testung verschiedener Protokolle zur Aufreinigung von HspB5-Wt mit Polyhistidin-Rest

Zunächst wurde die Proteinaufreinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie einer Positivkontrolle (GFP (green fluorescent protein) mit Polyhistidin-Rest) getestet. Im Kit pET6xHN Expression Vector Set war dieser Vektor beigelegt. Nach Transformation kompetenter E.coli mit dem Plasmid wurde das Protein anschließend überexprimiert und durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Die GFP überexprimierenden Bakterien wurden lysiert und eine Probe abgenommen (Lysat-Probe). Nach Anbindung des Bakterienlysats an die Nickel-Agarose wurde eine weitere Probe mit Säulenmaterial entnommen, um zu überprüfen ob das GFP gebunden hatte (Agarose-Probe). Die Durchfluss-Probe zeigte, wie viel des überexprimierten GFP nicht gebunden hatte. Nach Entfernung unspezifischer Proteine vom Säulenmaterial durch die einzelnen Waschschritte mit einem Imidazol-Puffer (20 mM), wurde das GFP von der Säule eluiert. Hierzu wurde ein Elutionspuffer mit einer Imidazol-Konzentration von 300mM verwendet. Die gewonnenen Proben (Lysat-, Agaro-

se-, Durchfluss-Probe, Waschschritte und Eluate) wurden in einer Polyacrylamidgelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt (Abbildung 9).

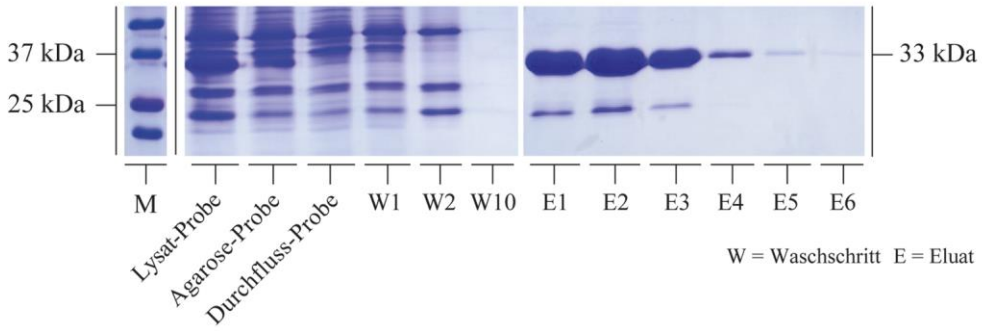


Abbildung 9: Polyacrylamidgelelektrophorese der aufgereinigten Positivkontrolle GFP, Coomassie-Färbung. M: Marker, mit orientierenden Banden bei 25 und 37 kDa (Kilodalton). Lysat-Probe: Bakterienlysat und überexprimiertes GFP, Agarose-Probe: an Nickel-Agarose gebundene Proteine, Durchfluss-Probe: Bakterienlysat ohne beladene Nickelagarose. W 1, 2, 10: Waschschritte E 1–6: Eluate. Molekulargewicht von GFP mit Polyhistidin-Rest: 33 kDa.

In der Lysat-Probe erkennt man eine starke Bande, die knapp unterhalb von 37 kDa läuft und repräsentativ für das überexprimierte GFP steht. Die Agarose-Probe zeigt, dass neben GFP einige Proteine unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden haben. In der Durchfluss-Probe ist das überexprimierte GFP hingegen kaum mehr nachweisbar, was zeigt, dass der überwiegende Anteil am Säulenmaterial gebunden blieb. Die Eluate 1–4 zeigen starke GFP-Banden und vergleichsweise schwache Nebenbanden. Die Aufreinigung war unter den gewählten Bedingungen somit erfolgreich.

Im Folgenden wurde die Aufreinigung von HspB5-Wt mit N- sowie C-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest unter nativen und denaturierenden Bedingungen getestet. Zuerst erfolgte die Überexpression des HspB5-Wt mit C-terminalem Polyhistidin-Rest in E.coli. Das entsprechende Plasmid wurde bereits vor Beginn der Versuche in E.coli transformiert. Die Überexpression und Aufreinigung erfolgten nach den Vorgaben wie in Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben. Die Proben wurden in der folgenden Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft (Abbildung 10). Das Fusionsprotein aus HspB5-Wt und dem Polyhistidin-Rest zeigte eine Bande auf einer Höhe von 27 kDa.

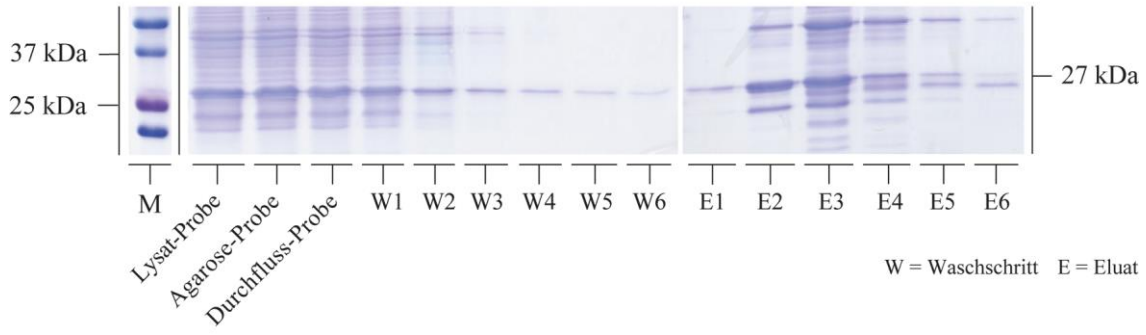


Abbildung 10: Polyacrylamidgelelektrophorese des nativ aufgereinigten HspB5-Wt mit C-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. M: Marker, mit orientierenden Banden bei 25 und 37 kDa (Kilodalton). Lysat-Probe: Bakterienlysat mit überexprimiertem HspB5-Wt, Agarose-Probe: an Nickel-Agarose gebundene Proteine, Durchfluss-Probe: Bakterienlysat ohne beladene Nickel-Agarose, W 1-6: Waschschritte, E 1–6: Eluate. Molekulargewicht von HspB5-Wt mit Polyhistidin-Rest (C-terminal): 27 kDa.

In der Abbildung 10 ist knapp oberhalb der Markerbande für 25 kDa das überexprimierte HspB5-Wt in der Lysat-Probe als vergleichsweise stärkere Bande erkennbar. In der Agarose-Probe ist zu sehen, dass das Protein an das Säulenmaterial gebunden hatte. Die Durchfluss-Probe zeigt ebenfalls eine Bande in entsprechender Höhe, was bedeutet, dass HspB5 nicht gänzlich an die Nickel-Agarose gebunden hatte. Die folgenden Waschschritte sollten unspezifisch gebundene Proteine des Bakterienlysats von der Säule entfernen. In den Eluaten ist zu sehen, dass unterhalb der 27 kDa weitere Banden erkennbar sind und HspB5 nur unzureichend aufgereinigt werden konnte.

In der nächsten Versuchsserie wurde deshalb eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Zum Bakterienlysat wurde nach Überexpression eine definierte Menge an Urea hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 8 M erreicht wurde. Dies führt bekannterweise durch Auflösung der Tertiärstruktur zu einer besseren Zugänglichkeit des Polyhistidin-Rests und damit meist auch zu einer besseren Bindung an die Nickel-Agarose. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Aufreinigung von HspB5-Wt mit C-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest unter denaturierenden Bedingungen gezeigt (Abbildung 11).

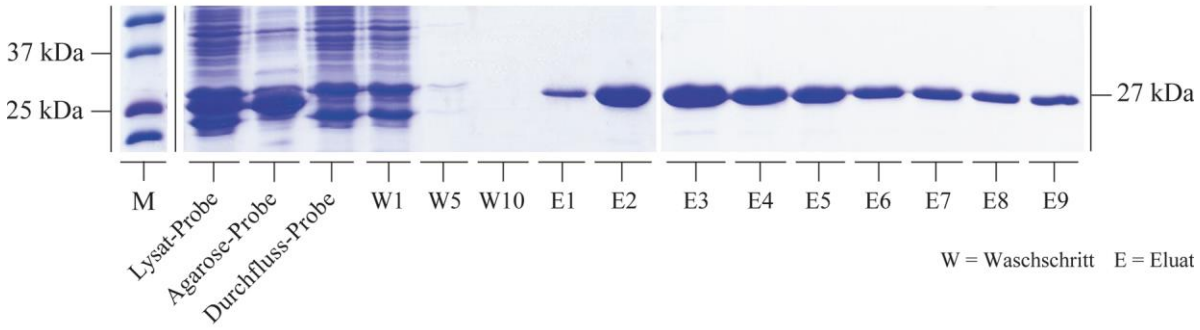


Abbildung 11: Polyacrylamidgelelektrophorese des denaturiert (+ Urea) aufgereinigten HspB5-Wt mit C-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. M: Marker, mit orientierenden Banden bei 25 und 37 kDa (Kilodalton). Lysat-Probe: Bakterienlysat mit überexprimiertem HspB5-Wt, Agarose-Probe: an Nickel-Agarose gebundene Proteine, Durchfluss-Probe: Bakterienlysat ohne beladene Nickel-Agarose, W 1, 5, 10: Waschschritte, E 1–9: Eluate. Molekulargewicht von HspB5-Wt mit Polyhistidin-Rest (C-terminal): 27 kDa.

Abbildung 11 zeigt das Ergebnis einer Aufreinigung unter diesen Bedingungen. In der Lysat-Probe ist das überexprimierten HspB5-Wt nachweisbar. Auch die Agarose-Probe zeigt eine große Menge des gebundenen Proteins. In der Durchfluss-Probe fehlt die entsprechende Bande, wobei sowohl oberhalb als auch unterhalb starke Nebenbanden erkennbar sind. Diese haben nur in geringem Maße an die Nickel-Agarose gebunden und werden bis Waschschritt 5 fast gänzlich von der Säule entfernt. In den folgenden Eluaten ist eine singuläre Bande des überexprimierten HspB5-Wt sichtbar. Spaltproduktbanden und sonstige Nebenbanden fehlen. Die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen war somit erfolgreich.

Die Löslichkeit des überexprimierten HspB5-Wt als auch die Zugänglichkeit zum Polyhistidin-Rest wurde unter Hinzugabe von Urea deutlich verbessert. Wie unter 3.2.1.1. beschrieben, wurden die cDNAs des HspB5 und seiner Mutanten in einen zweiten Expressionsvektor mit N-terminal lokalisierten Polyhistidin-Rest kloniert und nach Transformation in E.coli überexprimiert. Die Ergebnisse der nativen Aufreinigung des HspB5-Wt unter Nutzung dieses Vektors sind in Abbildung 12 genauer dargestellt.

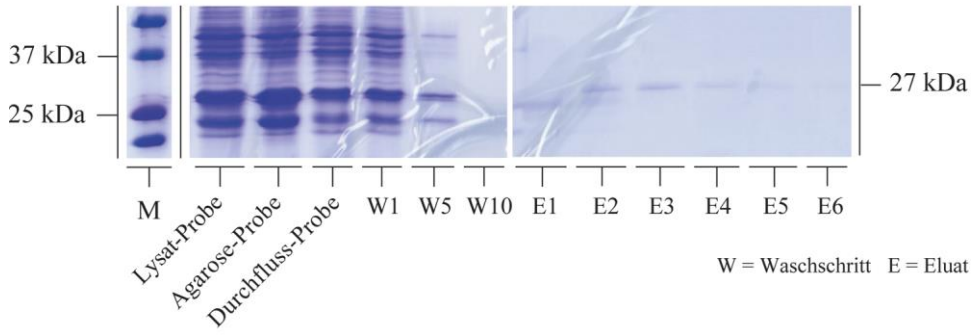


Abbildung 12: Polyacrylamidgelelektrophorese des nativ aufgereinigten HspB5-Wt mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. M: Marker, mit orientierenden Banden bei 25 und 37 kDa (Kilodalton). Lysat-Probe: Bakterienlysat mit überexprimiertem HspB5-Wt, Agarose-Probe: an Nickel-Agarose gebundene Proteine, Durchfluss-Probe: Bakterienlysat ohne beladene Nickel-Agarose, W 1, 5, 10: Waschschritte, E 1–6: Eluate. Molekulargewicht von HspB5-Wt mit Polyhistidin-Rest (N-terminal): 27 kDa.

In der Lysat- und Agarose-Probe sieht man anhand der Banden auf Höhe 27 kDa, dass die Überexpression erfolgreich war und das Protein an die Nickel-Agarose gebunden hatte. In den Eluaten waren hingegen nur geringe Mengen Protein nachweisbar, möglicherweise durch eine zu schwache Bindung an das Säulenmaterial. Wie auch schon für das Plasmid mit C-terminal lokalisierten Polyhistidin-Rest beschrieben, wurde auch für den zweiten Expressionsvektor eine denaturierende Aufreinigung des codierten HspB5-Wt durchgeführt (Abbildung 13).

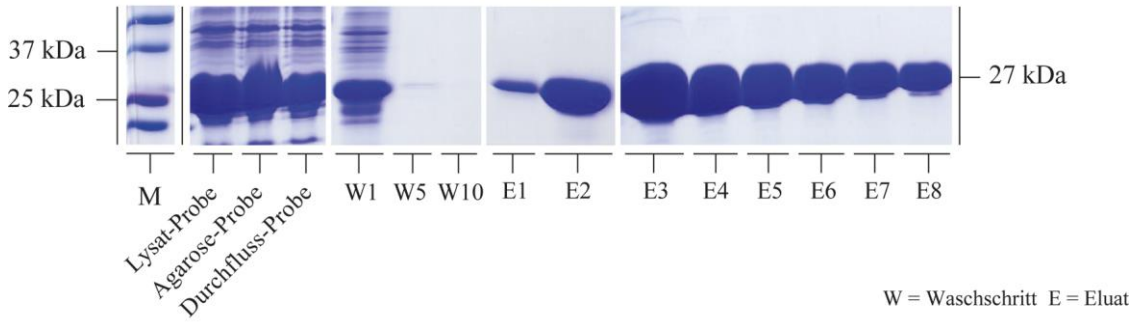


Abbildung 13: Polyacrylamidgelelektrophorese des denaturiert (+ Urea) aufgereinigten HspB5-Wt mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie Färbung. M: Marker, mit orientierenden Banden bei 25 und 37 kDa (Kilodalton). Lysat-Probe: Bakterienlysat mit überexprimiertem HspB5-Wt, Agarose-Probe: an Nickel-Agarose gebundene Proteine, Durchfluss-Probe: Bakterienlysat ohne beladene Nickel-Agarose, W 1, 5, 10: Waschschritte, E 1–8: Eluate. Molekulargewicht von HspB5-Wt mit Polyhistidin-Rest (N-terminal): 27 kDa.

Die Überexpression als auch die Anbindung des HspB5-Wt an die Nickel-Agarose war unter den denaturierenden Versuchsbedingungen erfolgreich. Auch die anschließende Elution zeigte reine Proben an überexprimierten HspB5-Wt. Die Aufreinigung des HspB5-Wt unter denaturierenden Bedingungen funktionierte in beiden Expressionssystemen, während der native Ansatz jeweils erfolglos blieb.

Für die weiteren Versuche war es notwendig, die überexprimierten HspB5-Konstrukte in nativer Konformation aufzureinigen, deshalb wurden weitere Aufreinigungsmethoden getestet. Bekannterweise kann mithilfe von Lysozym ein effektiverer Aufschluss von Bakterien erzielt werden, was zu besseren Ergebnissen in der Proteinaufreinigung führen kann. In der folgenden Abbildung 14 ist die Polyacrylamidgelelektrophorese nach nativer Aufreinigung des HspB5-Wt unter Hinzugabe von Lysozym dargestellt.

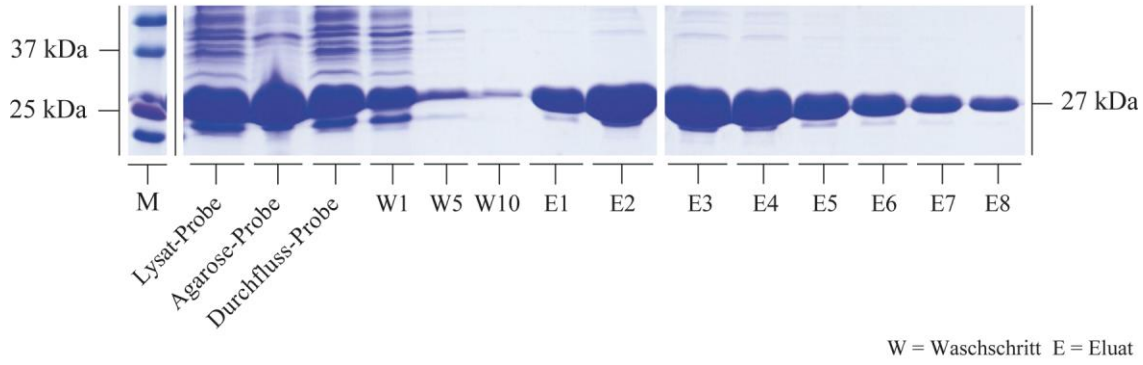


Abbildung 14: Polyacrylamidgelelektrophorese des nativ (mit Lysozym) aufgereinigten HspB5-Wt mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. M: Marker, mit orientierenden Banden bei 25 und 37 kDa (Kilodalton). Lysat-Probe: Bakterienlysat mit überexprimiertem HspB5-Wt, Agarose-Probe: an Nickel-Agarose gebundene Proteine, Durchfluss-Probe: Bakterienlysat ohne beladene Nickel-Agarose, W 1, 5, 10: Waschschritte, E 1–8: Eluate. Molekulargewicht von HspB5-Wt mit Polyhistidin-Rest (N-terminal): 27 kDa.

Die Überexpression und Bindung von HspB5-Wt an die Nickel-Agarose hatte unter diesen Bedingungen gut funktioniert. Sowohl in der Lysat- als auch in der Agarose-Probe sind deutliche Banden bei 27 kDa erkennbar. Die Eluate 1–8 sind annähernd so rein wie in den denaturierenden Aufreinigungen. Leichte Nebenbanden sind erkennbar, jedoch überwiegt vergleichsweise die Menge des aufgereinigten HspB5-Wt. Da dieser native Ansatz unter Hinzugabe von Lysozym in Versuchen mit dem ersten Expressionsvektor pET6xHN-C erfolglos blieb (nicht gezeigt), wurde in den folgenden Proteinüberexpressionen und -

aufreinigungen von HspB5 und seinen Phosphomimetika der bakterielle Expressionsvektor pET6xHN-N mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest verwendet.

3.2.1.3 Herstellung der rekombinanten HspB5-Mutanten mit Polyhistidin-Rest für die Bindungsstudien

Für die *in-vitro*-Bindungsstudie mit Tubulin wurden HspB5-Wt und seine 8 Phosphomimetika mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest in E.coli überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigung der HspB5-Konstrukte -EAE, -EEA und -EEE erfolgte im Gegensatz zu den anderen HspB5-Konstrukten unter denaturierenden Bedingungen, da die native Aufreinigung, wie unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben, in Vorversuchen nicht funktionierte. In der Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Eluate auf Reinheit geprüft. Die einzelnen Eluate der verschiedenen Konstrukte wurden wie oben beschrieben miteinander gepoolt, gegen einen Tris-NaCl-Puffer (Dialysepuffer) dialysiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

In der folgenden Abbildung 15 sind die Ergebnisse der einzelnen Aufreinigungen von HspB5 und seinen Phosphomimetika zusammengefasst. Die Banden der überexprimierten HspB5-Konstrukte sind auf der Höhe von 27 kDa deutlich erkennbar (A). Es ist davon auszugehen, dass trotz der sichtbaren Nebenbanden aufgrund der großen Menge der überexprimierten HspB5-Konstrukte eine Reinheit von 90-95% vorlag. Die Intensität der Banden unterschied sich teilweise, da die gepoolten Eluate jeweils unterschiedliche Konzentrationen aufwiesen. Für die Bindungsstudien wurden die Konzentrationen gemessen und gleiche Mengen an HspB5 verwendet. Zusätzlich ist rechts neben dem Marker eine Probe des Tubulins aufgetragen, dessen Bande auf einer Höhe von 55 kDa lief und in den anschließenden Bindungsstudien verwendet wurde. Außerdem sind je ein Eluat der denaturiert aufgereinigten Phosphomimetika HspB5-EAE, -EEA und -EEE gezeigt (B).

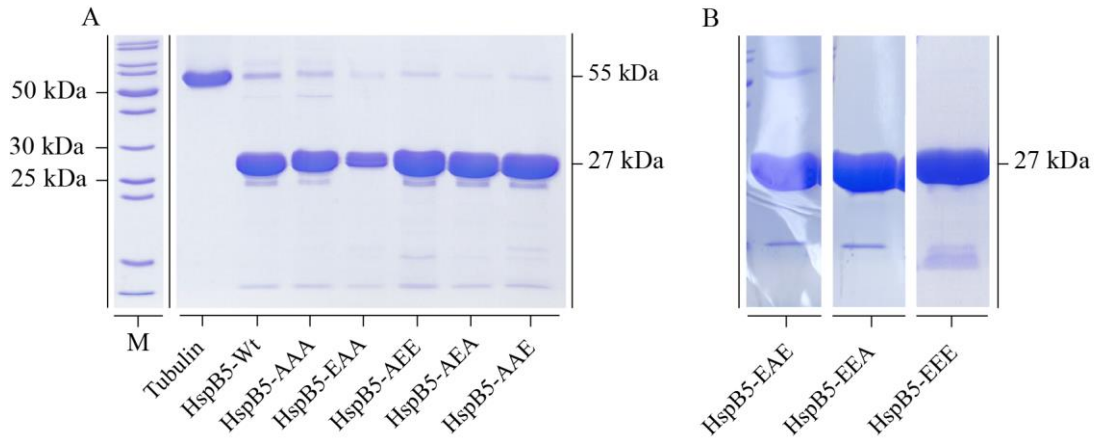


Abbildung 15: Polyacrylamidgelelektrophorese mit Tubulin und allen nativ (A) und denaturierend (B) aufgereinigten HspB5-Mutanten mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. M: Marker, mit orientierenden Banden bei 25, 30 und 50 kDa. A: Tubulinbande bei 55 kDa. Banden der einzelnen nativ aufgereinigten HspB5-Konstrukte bei 27 kDa. B: Banden der denaturierend aufgereinigten HspB5-Konstrukte bei 27 kDa.

3.2.2 Bindungsstudien zwischen HspB5 und seinen Mutanten mit Tubulin

Der Effekt der Phosphorylierung von HspB5 auf die Interaktion mit Tubulin wurde durch *in-vitro*-Bindungsstudien genauer untersucht. Es wurden Pull-Down Assays durchgeführt, bei denen HspB5 oder seine Mutanten über den Polyhistidin-Rest an eine Kobalt-Agarose gebunden wurden und Tubulin in löslicher Form appliziert wurde. In Vorversuchen wurde zunächst die Bindung zwischen HspB5 und HspB1 als Positivkontrolle genutzt, um geeignete Bedingungen für das Experimentalsystem zu etablieren. Die Ergebnisse der Bindungsstudien wurden im Western Blot dargestellt und dann densitometrisch ausgewertet.

3.2.2.1 Nachweis der Bindung von HspB1 an HspB5 als Positivkontrolle

Für die Bindungsstudien wurde das Profound™ Pull-Down PolyHis Protein:Protein Interaction Kit verwendet. Zunächst wurde dieses Versuchssystem mit einer Positivkontrolle getestet. Es ist bekannt, dass HspB1 mit HspB5 interagiert und Heterooligomere bildet. Da HspB1 nicht als isoliertes Protein vorlag, wurde ein Zelllysat von HspB1-überexprimierenden C6-Zellen verwendet. Dazu wurden transfizierte C6-Zellen 24–48 h nach Transfektion aufgeschlossen und das im Lysat enthaltene, überexprimierte HspB1 auf Bindung an HspB5 untersucht. Kobalt-Agarose diente hier der Immobilisation von HspB5-Wt sowie der nicht phosphorylierbaren Mutante HspB5-AAA über ihren Polyhistidin-Rest,

die mit dem Zelllysat inkubiert wurden. Der Bindungskomplex wurde im letzten Schritt von der Säule eluiert und im Western Blot dargestellt (Abbildung 16). Gleichzeitig wurden Kontrollsäulen entweder nur mit dem Köder-Protein, HspB5-Wt oder -AAA beziehungsweise nur mit C6-Lysat nach HspB1-Überexpression als „Beute“ inkubiert. Die Behandlung erfolgte analog zum Säulenmaterial, dass sowohl mit den beiden HspB5-Formen als auch dem C6-Lysat inkubiert wurde.

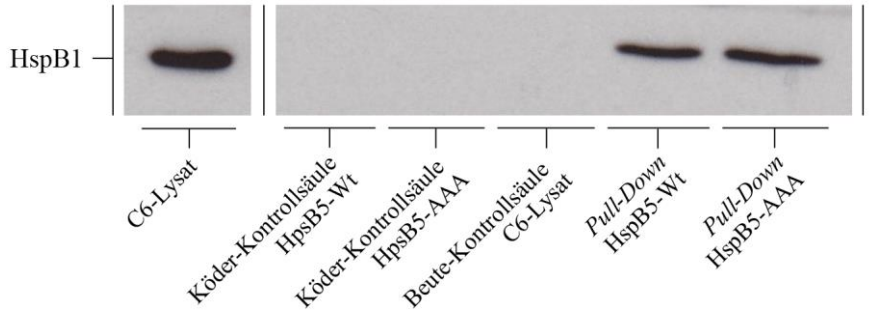


Abbildung 16: Repräsentativer Western Blot des Pull-Down Assays zwischen HspB5-Wt/-AAA und HspB1. (Von links) 1. Bande: C6-Zelllysat nach HspB1-Überexpression. 2. Bande: Köder-Kontrollsäule HspB5-Wt. 3. Bande: Köder-Kontrollsäule HspB5-AAA. 4. Bande: Beute-Kontrollsäule C6-Lysat nach HspB1-Überexpression. 5. Bande: Pull-Down zwischen HspB5-Wt und HspB1 aus C6-Lysat. 6. Bande: Pull-Down zwischen HspB5-AAA und HspB1 aus C6-Lysat.

In der ersten Spur von links sieht man das Signal des C6-Lysats nach Überexpression von HspB1. Die Köder-Kontrollsäulen wurden lediglich mit HspB5-Wt oder HspB5-AAA inkubiert, entsprechend war hier nach dem Pull-Down kein HspB1 nachweisbar. Die Beute-Kontrollsäule wurde nur mit dem C6-Lysat nach HspB1-Überexpression inkubiert und es zeigte sich, dass HspB1 nicht unspezifisch an die Kobalt-Agarose band. Die letzten beiden Banden zeigen jeweils ein HspB1-Signal. Die an der Kobalt-Agarose immobilisierten Köder-Proteine HspB5-Wt und -AAA hatten selektiv mit HspB1 aus dem C6-Lysat interagiert. Dies bestätigte die Interaktion dieser beiden Hitzeschockproteine unter den gewählten Bedingungen, sodass der Pull-Down Assay nun für die Untersuchung der Bindung von HspB5 an Tubulin eingesetzt werden konnte.

3.2.2.2 Phosphorylierungsabhängige Bindung von HspB5 an Tubulin *in vitro*

Zur Untersuchung der Bedeutung der Phosphorylierung von HspB5 auf seine Interaktion mit Tubulin wurden nun HspB5-Wt und alle 8 Mutanten an der Kobalt-Agarose immobili-

siert und mit löslichem Tubulin inkubiert. Anschließend wurden jeweils Pull-Down Assays durchgeführt und der Bindungskomplex von der Säule eluiert. Die Analyse einer möglichen phosphorylierungsabhängigen Interaktion erfolgte im Western Blot (Abbildung 17) und wurde dann densitometrisch weiter ausgewertet. Kontrollsäulen (-K) wurden nur mit Tubulin inkubiert, um eine unspezifische Bindung an das Säulenmaterial zu prüfen.

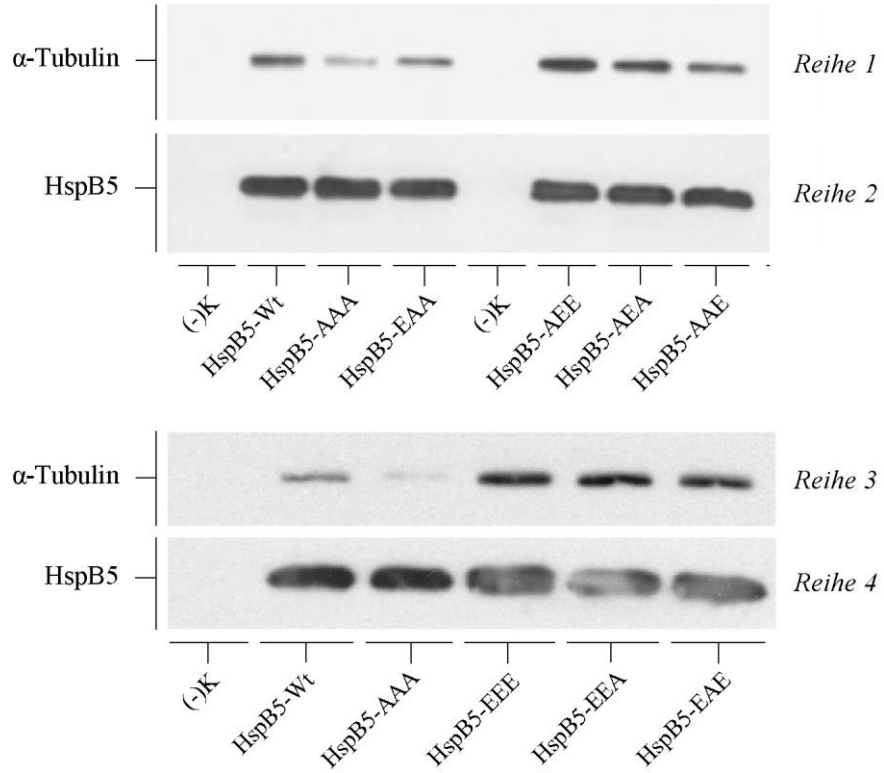


Abbildung 17: Repräsentativer Western Blot des Pull-Down Assays zwischen den einzelnen HspB5-Konstrukten und Tubulin. Reihe 1 und 3: anti-Tubulin. Reihe 2 und 4: anti-HspB5, Negativkontrollen (-) K.

In Abbildung 17 sind zwei repräsentative Western Blots dargestellt. Die Banden der Reihen 1 und 3 zeigen das Tubulin-Signal nach Anbindung an die immobilisierten HspB5-Konstrukte und anschließender Elution des Komplexes von der Säule. In den Reihen 2 und 4 sieht man das zugehörige HspB5-Signal. Die Kontrollsäulen sind jeweils signalfrei, als Nachweis, dass Tubulin nicht unspezifisch an die Kobalt-Agarose gebunden hatte.
Die Western Blots zeigten, dass Tubulin sowohl mit HspB5 als auch allen getesteten Mutanten interagiert hatte. Die Intensität der Tubulin-Banden und somit der gebundenen Tubulin-Menge variierte allerdings. Um diese zu quantifizieren, erfolgte eine densitometrische Auswertung aller Versuche. Es wurde die gebundene Tubulin-Menge auf die einge-

setzte HspB5-Menge bezogen. Das Verhältnis des Tubulin-Signals zum Signal von HspB5-Wt galt als Bezugspunkt, um den Einfluss der Phosphorylierung zu untersuchen. Hierfür wurden die HspB5- und Tubulinbanden densitometrisch ausgewertet und die Unterschiede in der Bindung quantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Box-Plot in Abbildung 18 dargestellt.

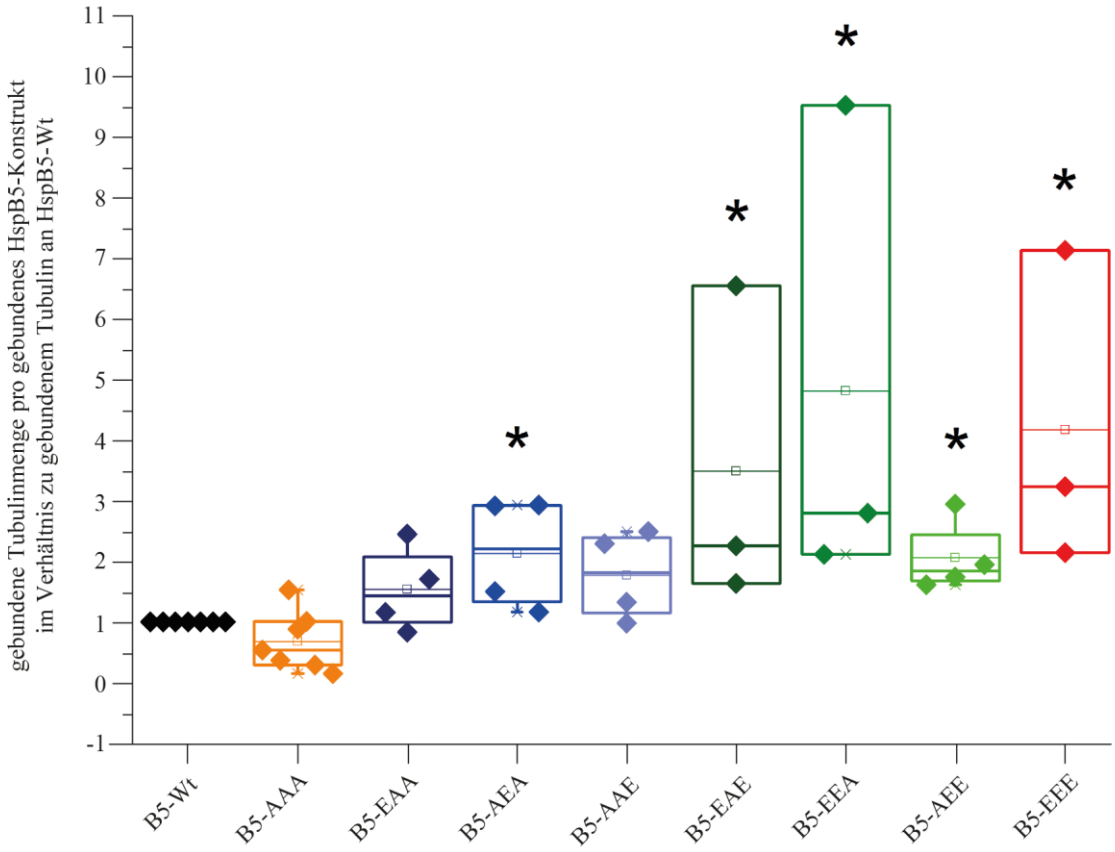


Abbildung 18: Box-Plot der gebunden Tubulinmenge jeder Phosphomutante von HspB5 bezogen auf HspB5-Wt. Das Verhältnis aus gebundener Tubulinmenge pro gebundenem HspB5-Wt wurde für alle Versuche als 1 definiert. In den Boxplots ist für jedes Phosphomimetikum und jeden der Versuche die Menge des gebundenen Tubulins an das Phosphomimetikum auf die entsprechende Menge gebundenen Tubulins an HspB5-Wt bezogen. Median: horizontale Linie ohne Kästchen, Mittelwert: horizontale Linie mit leerem Kästchen. HspB5-Wt und -AAA n = 7, HspB5-EAA,-AEA,-AAE und -AEE n = 4, HspB5-EAE,-EEA und -EEE n = 3. * $p < 0,05$ versus HspB5-Wt.

Jeder Messpunkt der einzelnen Phosphomimetika, der repräsentativ für einen Versuch steht, ist zu dem korrespondierenden Messpunkt desselben Versuchs von HspB5-Wt bezogen, der in diesem Box-Plot mit 1 normiert wurde. Es zeigte sich, dass die Phosphomutanten HspB5-AEA, -EAE, -EEA, -AEE und -EEE signifikant mehr Tubulin gebunden hatten

als HspB5-Wt. HspB5-AAA hingegen zeigte keinen Anstieg, und HspB5-EAA und -AAE nur eine leicht aber nicht signifikant höher liegende Menge an gebundenem α-Tubulin.

3.3 Kurzzusammenfassung

In den Nocodazol-Versuchen ließ sich für das Phosphomimetikum HspB5-AAE ein protektiver Effekt auf die Mikrotubulistabilität nachweisen, die übrigen Mutanten zeigten keine signifikante Beeinflussung und Stabilisierung der Mikrotubuli unter Nocodazol. Im Pull-Down Assay konnte die Interaktion von HspB5 mit Tubulin bestätigt werden. Diese zeigte sich abhängig vom Phosphorylierungsstatus. Die nicht phosphorylierbare HspB5-Mutante (-AAA) führte tendenziell zu einer geringeren Interaktion mit Tubulin, wohingegen pseudophosphoryliertes HspB5, insbesondere doppelt- und dreifach pseudophosphorylierte Mutanten signifikant stärker an Tubulin gebunden hatten.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit sogenannten Phosphomimetika von HspB5 gearbeitet. Durch gezielte Mutagenese der cDNA von HspB5 wurden in Vorarbeiten die Serinreste entweder durch Glutaminsäure (E) oder durch Alanin (A) ersetzt. Dadurch wurde entweder eine Phosphorylierung durch die Übertragung einer negativen Ladung imitiert (E) oder durch das Fehlen einer Hydroxyl-Gruppe unmöglich (A). Die so erzeugten mutierten HspB5-Sequenzen wurden einerseits zur Transfektion von C6-Zellen in einen bicistronischen Vektor kloniert, der zusätzlich für das fluoreszierende Protein ZsGreen1 codierte und überexprimiert bevor die Zellen mit dem Spindelgift Nocodazol behandelt wurden. Andererseits wurden die mutierten Sequenzen in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert, dabei mit der Sequenz für einen Polyhistidin-Rest fusioniert, nach anschließender Überexpression aufgereinigt und in Bindungsstudien auf ihre Interaktion mit α-Tubulin untersucht.

4.1.1 Methoden zur Simulation der Phosphorylierung von HspB5

Da sich am N-Terminus von HspB5 drei Phosphorylierungsstellen an Serin-19, -45 und -59 befinden, ergeben sich daraus acht Kombinationsmöglichkeiten wie die Phosphorylierungsstellen von HspB5 besetzt sein können. Die in dieser Arbeit verwendeten, durch Mutagenese erzeugten HspB5-Mutanten sollten eine Phosphorylierung simulieren beziehungsweise unmöglich machen. Die beschriebenen Serinreste dabei durch Alanin und Glutaminsäure zu ersetzen, ist eine etablierte Technik, die bereits mehrfach für andere Versuchszwecke erfolgreich angewendet wurde [73, 92]. Jedoch muss bei der Interpretation der Ergebnisse immer bedacht werden, dass HspB5 nicht phosphoryliert vorlag, sondern die Phosphorylierung simuliert wurde. Eine weitere Möglichkeit, eine Phosphorylierung zu simulieren, ist der Austausch von Serin durch Asparaginsäure [21, 26, 29, 57]. Es zeigten sich hierbei ähnliche Effekte im Hinblick auf die Oligomerisierung [57], subzelluläre Lokalisation [26] und den intrazellulären Transport [27] im Vergleich mit der natürlichen *in-vivo*-Phosphorylierung von HspB5 [29]. Die Bedeutung der Phosphorylierungsstellen von HspB5 für seine zellulären Funktionen mithilfe der Pseudophosphorylierung zu untersuchen, ist derzeit das geeignetste Modell diese *in-vivo*-Phosphorylierung bestmöglich zu imitieren. In vielen Veröffentlichungen, die sich mit der phosphorylierungsabhängigen

Funktion von HspB5 beschäftigen, wurden immer nur bestimmte einzelne Serinreste durch Mutagenese verändert, um Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Phosphorylierungsstellen zu ziehen. Morrison et al. [83] arbeiteten lediglich mit den drei HspB5-Mutanten HspB5-AAA, -AAE und -EEE. Li und Reiser [75] verwendeten für ihre Versuche in Astrozyten HspB5-Mutanten, bei denen immer nur ein, zwei oder alle drei Serinreste durch Mutagenese zu Alanin oder Glutaminsäure verändert wurden. Bei den einfach oder zweifach pseudophosphorylierten HspB5-Mutanten blieben somit immer unveränderte Serinreste, die in den Zellen phosphoryliert werden konnten. In dieser Arbeit wurden erstmals alle acht HspB5-Mutanten sowie der Wildtyp auf ihre Interaktion mit Tubulin und Mikrotubuli untersucht, wodurch umfassende Aussagen zu Unterschieden zwischen einfach, doppelt und dreifach pseudophosphoryliertem HspB5 getroffen werden konnten.

4.1.2 Überexpression von HspB5 und seinen Phosphomimetika in C6-Zellen

In dieser Arbeit wurden Proteine intrazellulär mithilfe eines bicistronischen pLVX-IRES-ZsGreen1-Vektors überexprimiert. Dieser kodierte jeweils für eine der mutierten HspB5-Formen und für das grün fluoreszierende Proteine ZsGreen1. Dieser Vektor ermöglichte eine voneinander unabhängige Translation der beiden Proteine. Dadurch konnte über die Fluoreszenz der Transfektionserfolg überprüft werden, ohne dass das überexprimierte HspB5 durch spezielle Modifikationen, wie beispielsweise der Fusion mit einem fluoreszierenden Protein, verändert werden musste. Diese hätten die Eigenschaften von HspB5 negativ beeinflussen können, insbesondere seine Oligomerisierung.

Die Überexpression spezieller Proteine ist eine häufig in der Wissenschaft angewandte Methode, wenn es um die Beschreibung neuer Funktionen geht oder wenn die Bedeutsamkeit der überexprimierten Proteine im Zellmetabolismus untersucht werden soll. Die Überexpression von Proteinen kann sich aber auch negativ auf das Zellwachstum sowie die Zellfunktionen auswirken. Hierbei werden vier Mechanismen beschrieben, die zu Zellschäden führen können [81]: die Überladung der Zelle mit dem überexprimierten Protein, das hieraus resultierende Ungleichgewicht zwischen den Untereinheiten des überexprimierten Proteins, die ungewollte Interaktion mit nicht-physiologischen Zielproteinen und die Interferenz mit intrazellulären Signalwegen können zu einer Verzerrung des Ergebnisses führen und werden in ihrer Summe als dominant negativer Effekt bezeichnet. So ist bekannt, dass unter Stressbedingungen höchstens 30% der Gesamtmenge an HspB5 phosphoryliert vorliegen [86]. Durch die Überexpression wurden selektiv einzelne Phosphomi-

metika über das natürliche Maß hinaus exprimiert. Neben sogenannten „loss-of-function"-Modellen, bei denen selektiv Proteine ausgeschaltet werden, ist die Proteinüberexpression ein geeignetes Hilfsmittel zur spezifischen Untersuchung eines Proteins, seiner Funktionen und den mengenmäßigen Einfluss auf die Stoffwechselprozesse der Zelle. Insbesondere dann, wenn der Effekt der selektiven Ausschaltung keine eindeutigen Aussagen über die Funktion des zu untersuchenden Proteins zulässt [94].

4.1.3 Rekombinante Synthese von HspB5 mit Polyhistidin-Rest

Für die *in-vitro*-Bindungsstudien musste HspB5 mit einem Polyhistidin-Rest fusioniert werden, um das Protein nach bakterieller Überexpression chromatografisch aufzureinigen. Hierfür wurde der bakterielle Expressionsvektor pET-Express-6xHN verwendet. An seiner multiplen Klonierungsstelle war entweder C- oder N-terminal ein Polyhistidin-Rest codiert, mit dem die codierende Sequenz für HspB5 während der Klonierung fusioniert wurde. Dieser Polyhistidin-Rest ermöglichte die Immobilisierung des Proteins an einer Nickel-beschichteten Agarose und die anschließende selektive Aufreinigung.

Weil auch Proteine an das Säulenmaterial binden, die von Natur aus reich an Histidinen sind, kommt es so häufig zu einer Kontamination der aufgereinigten Proben [100]. Ist der Polyhistidin-Rest in der nativen Form des Proteins unzugänglich, gelingt in den allermeisten Fällen die Aufreinigung nur unzureichend. Denaturierende Bedingungen, zum Beispiel durch die Hinzugabe von Urea, führen zu einer verbesserten Zugänglichkeit der Histidine, auch ein Wechsel des Polyhistidin-Rests an das andere Ende des Proteins kann die Aufreinigung entscheidend verbessern [100]. Für viele rekombinant hergestellte Proteine konnte gezeigt werden, dass der Polyhistidin-Rest aufgrund seiner geringen Größe nicht mit der Funktionalität des Proteins interferiert [51, 60, 61]. Für HspB5 hingegen liegen keine vergleichbaren Studien vor, ob und wie eine solcher Polyhistidin-Rest die Funktionen des Proteins beeinflusst. Vor dem Hintergrund, dass sowohl der N- aber auch der C-Terminus die Oligomerisierung des Proteins beeinflussen, ist nicht auszuschließen, dass durch die Fusion mit dem Polyhistidin-Rest Veränderungen in den Proteineigenschaften auftreten. Besonders weil sich die drei Phosphorylierungsstellen am N-Terminus von HspB5 befinden, ist nicht auszuschließen, dass eine N-terminale Fusion des Polyhistidin-Rests die phosphorylierungsabhängige Bindung an α-Tubulin beeinflusst. In der vorliegenden Literatur sind interaktive Domänen von HspB5 beschrieben, die mit Tubulin beziehungsweise Mikrotubuli interagieren und Zusammenlagerung, Zerfall und Aggregation beeinflussen.

Außerhalb des N-Terminus, genauer in der alpha-Crystallin-Domäne sowie am C-Terminus befinden sich drei dieser Domänen, die nachgewiesenermaßen auf die Mikrotubuli-Dynamik sowie die Proteinaggregation einwirken [40]. Die Lokalisation des Polyhistidin-Rests am N-Terminus kann vor diesem Hintergrund sogar von Vorteil sein, weil die für die Interaktion wichtigen Domänen strukturell nicht verändert werden. Das beschriebene Experimentalmodell wurde in dieser Arbeit als das derzeit geeignetste zur Aufreinigung überexprimierter Proteine verwendet.

4.2 Effekt von HspB5 auf die Stabilität von Mikrotubuli in C6-Gliomzellen

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwiefern die Überexpression von HspB5 und fünf seiner Phosphomimetika in C6-Zellen zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli beitragen kann. Die genauere Analyse, wie der Phosphorylierungsstatus von HspB5 auf diese Interaktion einwirkt, wurde in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Nach Nocodazolbehandlung der C6-Zellen wurde der Anteil des polymerisierten Tubulins am Gesamttubulin analysiert. Für HspB5-Wt, -AAA, -EAA und -AEA konnte ein Trend zu einer größeren Menge polymerisierten Tubulins gesehen werden, für HspB5-AEE wurde hingegen eine tendenziell geringere Menge beobachtet. In C6-Zellen, die HspB5-AAE überexprimierten, konnte eine signifikant höhere Menge an polymerisiertem Tubulin im Vergleich zum Leervektor nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis reiht sich gut in die bestehende Literatur ein, da der Serinrest an Stelle 59 bereits als bedeutsam für die Interaktion mit dem Mikrotubulizytoskelett beschrieben wurde [55, 72]. Dass gleichzeitig für HspB5-AEE ein solcher Effekt nicht nachgewiesen werden konnte, könnte für eine Selektivität der Phosphorylierungsstelle an Serin-59 für die Bindung an Mikrotubuli sprechen.

Dass der Effekt der überexprimierten HspB5-Mutanten insgesamt nicht so deutlich ausfiel, könnte einerseits auf eine zu geringe Menge an transfizierten Zellen (circa 15-20 %) an der insgesamt behandelten Zellpopulation zurückgeführt werden, um den Einfluss auf die Mikrotubuli sichtbar zu machen. Andererseits könnten die Konzentration von Nocodazol und die Expositionszeit (30 µM, 2 Minuten), die basierend auf der Veröffentlichung von Fujita et al. [34] ausgewählt wurden, im Verhältnis zu hoch beziehungsweise zu lang gewesen sein, wodurch ein protektiver Effekt von HspB5 überstiegen wurde.

Fujita et al. [34] zeigten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, dass C6-Zellen, die mit 33 µM Nocodazol behandelt wurden, bereits nach 2 Minuten ein desorganisiertes Mikrotubulizytoskelett aufwiesen, dass nach 10 Minuten noch weiter depolymerisiert war. Sie transformierten C6-Zellen mit einer „Sense- und Anti-Sense-“ mRNA von HspB5 und regulierten darüber die intrazelluläre Konzentration von HspB5. Die Anti-Sense-mRNA hatte selektiv an die mRNA für HspB5 gebunden und dadurch zu einer Verminderung des Proteins geführt. Die Sense-mRNA führte zu einem kontrollierten Anstieg der intrazellulären Konzentration von HspB5. Nach Nocodazolbehandlung konnten sie für C6-Zellen mit erhöhten HspB5-Spiegeln mikroskopisch ein organisierteres Mikrotubulizytoskelett beobachten als bei Zellen, bei denen die HspB5-Spiegel mittels Anti-Sense-mRNA reduziert wurden. Im Western Blot beobachteten sie, dass die Fraktionen des polymerisierten Tubulins nach Nocodazolbehandlung der C6-Zellen mit Anti-Sense-mRNA und niedrigeren HspB5-Spiegeln signifikant geringer ausfiel als bei normalen C6-Zellen. Western-Blot-Ergebnisse nach HspB5-Überexpression mithilfe der Sense-mRNA werden in der beschriebenen Arbeit von Fujita et al. [34] nicht gezeigt. Weiterhin demonstrierten sie anschaulich, dass höhere Konzentrationen von HspB5 einer Depolymerisierung der Mikrotubuli *in vitro* entgegenwirken können. Sie inkubierten Mikrotubuli mit steigenden Konzentrationen an HspB5 und behandelten die Proben anschließend mit Podophyllotoxin, das eine Depolymerisierung erzeugte. HspB5 schützte hierbei die Mikrotubuli in einer konzentrationsabhängigen Weise.

Dass die beschriebenen Ergebnisse von Fujita et al. [34] in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnten, kann verschiedene Gründe haben. Die Proteine wurden in dieser Arbeit in C6-Zellen mithilfe eines Vektorsystems über das physiologische Maß hinaus überexprimiert. Die Interferenz mit anderen Signalwegen kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Fujita et al. [34] regulierten die intrazellulären HspB5-Wildtyp-Spiegel hingegen über eine Sense- und Anti-Sense-mRNA. Ghosh et al. [40] zeigten, dass die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli unter bestimmten HspB5-Konzentrationen *in vitro* eine Parabel-ähnliche Funktion beschreibt. War das Verhältnis von HspB5 zu Tubulin kleiner als 1:4 gab es kaum Unterschiede zu einer Polymerisation ohne HspB5. Zwischen den Verhältnissen 1:4 und 2:1 war die Polymerisation am stärksten mit einem Maximum bei ungefähr 1:2. Ab einem Verhältnis von 4:1 wurde sogar eine Inhibierung der Polymerisation beobachtet. Die Autoren gingen davon aus, dass in den mittleren HspB5-Konzentrationen die Oberflächenareale von HspB5 frei zugänglich waren, die eine Zusammenlagerung unterstützten, während in höheren Konzentrationen die HspB5-

Untereinheiten miteinander über diese Domäne oligomerisierten, sodass lediglich die inhibitorische Domäne zur Bindung an das Tubulin zur Verfügung stand. Eine zu große Menge der überexprimierten HspB5-Mutanten könnte sich demnach negativ auf die Mikrotubuli-Zusammenlagerung in den C6-Zellen ausgewirkt haben.

Nach Überexpression der HspB5-Mutanten in C6-Zellen fiel auf, dass sich der größte Anteil des überexprimierten HspB5 stets in der löslichen, globulären Fraktion der Nocodazol-behandelten Zellen und weniger in der unlöslichen Polymerfraktion befand. Xi et al. [109] erwähnten ein Modell, in dem HspB4 und HspB5 den zytoplasmatischen Pool an freiem, ungebundenem Tubulin aufrechterhalten, das für die korrekte Zusammenlagerung der Mikrotubuli benötigt wird. Kato et al. [63] zeigten, dass die Exposition kultivierter C6-Zellen zu den Spindelgiften Colchicin oder Colcemid nach 10 Stunden zu einer Zunahme der Expression von HspB5 führte. HspB5 akkumulierte hierbei in der Zellperipherie in unmittelbarer Nähe zum depolymerisierten Tubulin. 24 Stunden später hatte es sich dann in Richtung Zytoplasma wieder umverteilt. Basierend auf der These von Carver et al. [19], dass oligomerisiertes HspB5 verschiedene Interaktionsdomänen exponiert, über die es an verschiedene Substrate binden kann, kommen Fujita et al. [34] zu der Vermutung, dass HspB5 einerseits direkt über MAPs (Mikrotubuli-assoziierte Proteine) an Mikrotubuli bindet, gleichzeitig freies Tubulin gebunden hat und es in unmittelbarer Nachbarschaft hält. Die Beobachtung, dass sich der größere Anteil des überexprimierten HspB5 in der globulären Tubulinfraktion befand, lässt sich mit den genannten Studien gut vereinbaren. Sie deuten aber auch auf die bereits gut beschriebene Chaperon-ähnliche Funktion von HspB5 hin, wobei Proteine gebunden und gegen Denaturierung sowie Aggregation geschützt werden. Diese Annahme wird außerdem durch mehrere Studien von Ghosh et al. [38-40] bestätigt. HspB5-Sequenzen, die die Mikrotubuli-Zusammenlagerung veränderten, überschnitten sich mit Sequenzen, die die Interaktion mit anderen Untereinheiten, die Chaperone-Aktivität aber auch die Interaktion mit Intermediärfilamenten beeinflussten.
Ein kleinerer Anteil des überexprimierten HspB5 war aber auch in der Polymerfraktion nachweisbar. In dieser Fraktion befinden sich neben den polymerisierten Mikrotubuli auch andere filamentäre, unlösliche Proteine der Zelle, die genauso potenzielle Interaktionspartner für HspB5 darstellen. HspB5 interagiert schließlich auch mit dem Aktinzytoskelett sowie verschiedenen Intermediärfilamenten [88, 91, 104]. Die Kolokalisation von HspB5 an Mikrotubuli wurde von Fujita et al. [34] ausführlich gezeigt. Außerdem inkubierten sie *in-vitro* mit Taxol-stabilisierte Mikrotubuli mit steigenden Konzentrationen an HspB5. Sie

beobachteten, dass HspB5 hierbei in logarithmischer Weise gebunden hatte und mit Tubulin kopräzipitiert werden konnte. Weil unter der Hinzugabe von 20 µM HspB5 weniger als 2 µM HspB5 an die Mikrotubuli gebunden hatten, kann man von einer Art Sättigungseffekt sprechen. Es wurden immer höhere Konzentrationen an HspB5 benötigt, damit eine weitere Bindung an die Mikrotubuli stattfand. Diese Eigenschaft könnte die Mengenunterschiede von HspB5 in der globulären und Polymerfraktion in den abschließenden Versuchen (Abbildung 5) zusätzlich erklären.

Die genauere Analyse der verschiedenen Phosphorylierungsstellen von HspB5 auf die Stabilität der Mikrotubuli im zellulären System ist so in der vorliegenden Literatur noch nicht beschrieben. Wenngleich der Gesamteffekt der untersuchten HspB5-Mutanten eher gering ausgefallen ist, konnte in dieser Arbeit für die Phosphorylierungsstelle an Serin-59 bei der einzeln pseudophosphorylierten HspB5-Mutante HspB5-AAE ein protektiver Effekt auf die Mikrotubuli unter depolymerisierenden Bedingungen gezeigt werden.

4.3 *In-vitro*-Untersuchung der phosphorylierungsabhängigen Interaktion von HspB5 mit α-Tubulin

Mithilfe von Pull-Down Assays wurde die Interaktion von HspB5 und seinen Mutanten mit α-Tubulin untersucht. Dafür wurden HspB5 und alle HspB5-Mutanten rekombinant synthetisiert und aufgereinigt, sodass sie zu Beginn der Versuche in ausreichender Reinheit vorlagen. Hierbei wurden HspB5-Wildtyp, HspB5-AAA, -EAA, -AEA. -AAE und -AEE nativ und die beiden doppelt- (-EAE, -EEA) und die dreifach-pseudophosphorylierte Mutante (-EEE) denaturierend unter Hinzugabe von Urea aufgereinigt. Eine Renaturierung der Proteine wurde durch Dialyse gegen einen geeigneten Puffer erreicht. Diese Methode wird in der Wissenschaft häufig zur effektiven Renaturierung angewendet [22, 79]. Zur Etablierung geeigneter Experimentalbedingungen und dem Nachweis der Funktionalität von HspB5 wurde die Bindung von HspB5 an HspB1 im Pull-Down Assay genutzt. In den daraufhin durchgeführten Bindungsstudien konnte zunächst die Interaktion zwischen HspB5 und α-Tubulin bestätigt werden. Weiterhin konnten phosphorylierungsbedingte Effekte von HspB5 auf die Bindung an α-Tubulin beobachtet werden. Im Vergleich zum HspB5-Wildtyp hatten die einfach-pseudophosphorylierte (HspB5-AEA) sowie die drei zweifach-pseudophosphorylierten (HspB5-EEA, -EAE, -AEE) und die dreifach-pseudophosphorylierte Mutante (HspB5-EEE) signifikant mehr Tubulin gebunden.

Dass HspB5 und lösliches Tubulin miteinander interagieren, wurde bereits von Houck und Clark gezeigt [54]. Sie beobachteten mithilfe der sogenannten Größenausschlusschromatographie (*Size-exclusion chromatography*) und in der anschließenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, dass Tubulin und HspB5 zusammen Komplexe bilden, die eine Masse zwischen 500 kDa und größer als 2000 kDa haben. Außerdem entdeckten sie sowohl im HspB5 als auch im Tubulin korrespondierende, homologe Sequenzen, die für die gegenseitige Interaktion sowie die Interaktion mit den eigenen Untereinheiten bedeutsam sind.

Die genauere Analyse des Einflusses der Phosphorylierungsstellen von HspB5 auf seine Bindung mit α-Tubulin *in vitro* ist so in der vorliegenden Literatur noch nicht beschrieben. HspB5-AEA und alle doppelt- sowie dreifach-pseudophosphorylierten Mutanten haben in den Bindungsstudien signifikant mehr α-Tubulin gebunden als der Wildtyp. Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von HspB5 die Interaktion mit Zielproteinen aber auch die Interaktion mit sich selbst beeinflusst. Peschek et al. [92] konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von HspB5 zu einer verringerten Oligomergröße führte und dadurch die Bindung an andere Proteine sowie die Chaperone-Aktivität *in vivo* sowie *in vitro* erhöht wurden. Der unphosphorylierte HspB5-Wildtyp bildet hingegen höhergradige Oligomere [57, 92]. In den Studien von Ghosh et al. [38-40] und Houck und Clark [54] wurden interaktive Domänen von HspB5 genauer analysiert, die einerseits für die Chaperone-Aktivität wichtig sind, über die HspB5-Proteine andererseits untereinander und beispielsweise auch mit Tubulin interagieren. Zwei dieser Domänen unterstützten, eine Domäne verzögerte und inhibierte die Polymerisierung der Mikrotubuli. Da die Phosphorylierung einer Oligomerisierung entgegenwirkte, waren am pseudophosphorylierten HspB5 in den Bindungsstudien dieser Arbeit vermutlich weitere Bindungsstellen verfügbar, die die vermehrte Bindung von α-Tubulin erklären könnten. Eine spezifische Interaktion von HspB5 und seinen Phosphoformen mit α-Tubulin und eine Chaperone-bedingte Interaktion lassen sich aber nicht eindeutig voneinander abgrenzen. Wenn α-Tubulin nicht durch besondere Inhaltsstoffe im Puffer, wie beispielsweise Glycerol oder Sucrose stabilisiert wird, neigt es beispielsweise zu einer raschen Denaturierung [93]. Arai und Atomi [5] konnten außerdem zeigen, dass HspB5 und Tubulin koimmunopräzipitiert werden konnten, die Menge des gebundenen α-Tubulins war hierbei abhängig von der Temperatur. Bei 37°C wurde mehr Tubulin gebunden als bei 4°C, was die Untersucher auf eine partielle Denaturierung des Tubulins unter höheren Temperaturen und damit auf die Chaperone-ähnliche Funktion von HspB5 zurückführten.

4.4 Mögliche Bedeutung der Interaktion von HspB5 und Tubulin *in vivo*

Weil das Grundgerüst der neuronalen Dendriten zu einem großen Teil aus Mikrotubuli besteht und sie für die Funktionalität des zentralen Nervensystems aber auch im Prozess der Neurodegeneration eine bedeutsame Rolle spielen, ist die Erforschung protektiver Faktoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts unter zellulärem Stress wegweisend, um künftig neue Therapieansätze für neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise den Morbus Alzheimer zu etablieren. Für HspB5 wurde gezeigt, dass es in kultivierten hippocampalen Neuronen unter Hitzestress hochreguliert wird [68]. Außerdem schützt eine HspB5-Überexpression die hippocampalen Neuronen vor Hitzeschock-induzierter Rarefizierung des Dendritenbaums [11]. Die Lokalisation und auch die Funktion von HspB5 in Neuronen werden durch die Phosphorylierung an den N-terminal gelegenen Phosphorylierungsstellen beeinflusst. Phosphoryliertes HspB5 an Serin-19 und auch Serin-45 wurde in Axonen und Dendriten lokalisiert, phosphoryliertes HspB5 an Serin-59 befand sich in den Dendriten insbesondere entlang der Plasmamembran und in den „Spines." Diese Beobachtungen legen nahe, dass vermutlich unterschiedliche Interaktionspartner für HspB5 in Dendriten, Axonen und Synapsen vorliegen, wobei die Interaktion mit ihnen phosphorylierungsabhängig ist [99]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des phosphorylierbaren HspB5-Wildtyp-Proteins in kultivierten, hippocampalen Neuronen aus Rattenhirnen zu einer Zunahme der Verzweigung und somit der Komplexität des Dendritenbaums führte. Dieses Ergebnis war nach Überexpression einer nicht phosphorylierbaren HspB5-Mutante nicht nachweisbar [11]. Damit wurde für HspB5 eine neue, dendritische Funktion beschrieben, die den Ausgangspunkt für diese Arbeit darstellte. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die dendritische Funktion von HspB5 über eine Bindung an Mikrotubuli vermittelt wird.

Es ist bekannt, dass HspB5 bei neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Die genauen Wirkmechanismen sind jedoch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von HspB5 in Gehirnen von Alzheimer-Patienten hochreguliert wird, hierbei signifikant mit phosphoryliertem Tau-Protein korreliert und die Überexpression von HspB5 zu einer Reduktion des phosphorylierten Tau-Proteins führt [13, 103]. Außerdem interagiert HspB5 mit dem extrazellulär vorliegenden Amyloid-β und inhibiert die Bildung unlöslicher Fibrillen *in vitro* [101]. Es wird insbesondere in Astrozy-

ten, Mikroglia und Oligodendrozyten vermehrt exprimiert, die um die extrazellulären Amyloid-β-Plaques lokalisiert sind [97, 103]. In Gehirnen von Patienten mit Morbus Parkinson wurde HspB5 in „ballooned neurons“ vermehrt exprimiert [14], aber auch in reaktivierten Astrozyten und Mikroglia von Parkinson-Patienten mit dementiellem Verlauf [98]. HspB5 schützt hier vermutlich gegen die α-Synuclein-induzierte Toxizität und verhindert die Aggregation unlöslicher Fibrillen, indem eine amorphe Aggregation begünstigt wird. Diese Aggregate sind intrazellulär leichter degradierbar [96, 108]. In einem Huntington-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von HspB5 mit dem Fortschreiten der Erkrankung geringer wird [111]. In einem HspB5-*knock-out*-Mausmodell mit gleichzeitiger Überexpression eines mutierten Huntingtin wurden schwerere Verläufe und eine vermehrte Proteinaggregation beobachtet. Diese Beobachtung weist indirekt auf eine protektive Wirkung von HspB5 auf die Chorea Huntington hin [85]. Wie auch bei M. Alzheimer ist in Gehirngewebe von Patienten mit amyotropher Lateralsklerose (ALS) eine erhöhte Expression von HspB5 nachweisbar [58]. HspB5 bildet mit mutiertem SOD-1 Komplexe [102], wodurch die Aggregation des mutierten Proteins *in vitro* reduziert werden konnte [110].

Dass HspB5 in Neuronen insbesondere auch über die Interaktion mit Mikrotubuli neuroprotektiv wirken kann, dafür sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit. Weil bei neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel dem Morbus Alzheimer der Dendritenbaum von Neuronen rarefiziert [3, 23, 70] und somit die Funktion des gesamten Neurons gestört wird, könnte über eine selektive Stabilisierung der Mikrotubuli durch die Bindung von HspB5 diesem Prozess entgegengewirkt werden. Dass der Phosphorylierungsstatus auf die Bindungskapazität von HspB5 mit α-Tubulin Einfluss nimmt, ist eine neue Erkenntnis und bietet einen neuen Ansatz, die neuroprotektive Funktion von HspB5 im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen weiter zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Die Expression kleiner Hitzeschockproteine ist ein wirksamer Mechanismus, wie sich Zellen vor externem Stress schützen. HspB5, als wichtiger Vertreter dieser Proteinfamilie, wirkt über seine bereits gut bekannte Chaperone-ähnliche Funktion zytoprotektiv, es wirkt zudem anti-inflammatorisch und anti-apoptotisch und interagiert mit verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts, unter anderen mit Mikrotubuli. Die Funktion von HspB5 wird über Phosphorylierung an den Stellen Serin-19, -45 und -59 reguliert. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von HspB5 in hippocampalen Neuronen zu einer Komplexitätszunahme des Dendritenbaums führte und die Dendriten vor Hitze-induzierter Rarefizierung schützte. Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von HspB5 und seiner Phosphomutanten auf die Mikrotubuli als strukturgebende Komponente der Dendriten und die Bedeutung der Phosphorylierung auf die Bindung zwischen HspB5 und seinem Zielprotein α-Tubulin genauer zu untersuchen. Im ersten Projektteil wurden HspB5 und seine in Vorarbeiten durch Mutagenese erzeugten Phosphomimetika in C6-Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend mit dem Spindelgift Nocodazol behandelt. Es konnte bei fünf der sechs untersuchten HspB5-Mutanten kein eindeutiger Effekt auf den Polymerisationsstatus der Mikrotubuli gezeigt werden. Allein die Überexpression des pseudophosphorylierten HspB5-AAE hat die Mikrotubuli signifikant mehr vor Depolymerisierung durch Nocodazol schützen können. Dies legt nahe, dass die Phosphorylierungsstelle Serin-59 für die Interaktion von HspB5 mit Mikrotubuli unter depolymerisierenden Bedingungen bedeutsam ist. Im zweiten Projektteil wurde die Interaktion zwischen HspB5 und α-Tubulin im Pull-Down Assay untersucht. Hierfür wurden HspB5 und seine Phosphomimetika zunächst mit einem Polyhistidin-Rest fusioniert, bakteriell überexprimiert und anschließend mit Nickel-basierter Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dann folgten Bindungsstudien mit α-Tubulin. Es zeigte sich, dass die Bindung von HspB5 an α-Tubulin *in vitro* durch den Phosphorylierungsstatus beeinflusst wird. Mit zunehmender Pseudophosphorylierung wurde signifikant mehr α-Tubulin gebunden im Vergleich zum HspB5-Wildtyp.

Diese beobachtete phosphorylierungsabhängige Interaktion von HspB5 mit α-Tubulin bietet neue Erklärungsansätze über den Wirkmechanismus von HspB5 in Neuronen. Möglicherweise wird der Effekt von HspB5 auf die Komplexität des Dendritenbaums über eine Bindung an Mikrotubuli vermittelt.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahmad M F, Raman B, Ramakrishna T, Rao C M: Effect of phosphorylation on αB-crystallin: differences in stability, subunit exchange and chaperone activity of homo and mixed oligomers of αB-crystallin and its phosphorylation-mimicking mutant. Journal of Molecular Biology, 375: 1040-1051 (2008)

2. Alonso A d C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K: Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. Nature Medicine, 2: 783-787 (1996)

3. Anderton B H, Callahan L, Coleman P, Davies P, Flood D, Jicha G A, Ohm T, Weaver C: Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. Progress in Neurobiology, 55: 595-609 (1998)

4. Arac A, Brownell S E, Rothbard J B, Chen C, Ko R M, Pereira M P, Albers G W, Steinman L, Steinberg G K: Systemic augmentation of αB-crystallin provides therapeutic benefit twelve hours post-stroke onset via immune modulation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108: 13287-13292 (2011)

5. Arai H, Atomi Y: Chaperone activity of αB-crystallin suppresses tubulin aggregation through complex formation. Cell Structure and Function, 22: 539-544 (1997)

6. Arrigo A: Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo-and hetero-oligomeric complexes: an update. FEBS Letters, 587: 1959-1969 (2013)

7. Baas P W, Rao A N, Matamoros A J, Leo L: Stability properties of neuronal microtubules. Cytoskeleton, 73: 442-460 (2016)

8. Barnham K J, Masters C L, Bush A I: Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nature Reviews Drug Discovery, 3: 205-214 (2004)

9. Bartek J, Lukas J: Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. FEBS Letters, 490: 117-122 (2001)

10. Bartelt-Kirbach B, Golenhofen N: Reaction of small heat-shock proteins to different kinds of cellular stress in cultured rat hippocampal neurons. Cell Stress and Chaperones, 19: 145-153 (2014)

11. Bartelt-Kirbach B, Moron M, Glomb M, Beck C, Weller M, Golenhofen N: HspB5/αB-crystallin increases dendritic complexity and protects the dendritic arbor during heat shock in cultured rat hippocampal neurons. Cellular and Molecular Life Sciences, 73: 3761-3775 (2016)

12. Beckmann R P, Mizzen L E, Welch W J: Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. Science, 248: 850-854 (1990)

13. Björkdahl C, Sjögren M J, Zhou X, Concha H, Avila J, Winblad B, Pei J: Small heat shock proteins Hsp27 or αB-crystallin and the protein components of neurofibrillary tangles: Tau and neurofilaments. Journal of Neuroscience Research, 86: 1343-1352 (2008)

14. Braak H, Tredici K, Sandmann-Keil D, Rüb U, Schultz C: Nerve cells expressing heat-shock proteins in Parkinson's disease. Acta Neuropathologica, 102: 449-454 (2001)

15. Bulavin D V, Amundson S A, Fornace Jr A J: p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G2/M checkpoint symphony. Current Opinion in Genetics & Development, 12: 92-97 (2002)

16. Bullard B, Ferguson C, Minajeva A, Leake M C, Gautel M, Labeit D, Ding L, Labeit S, Horwitz J, Leonard K R: Association of the chaperone αB-crystallin with titin in heart muscle. Journal of Biological Chemistry, 279: 7917-7924 (2004)

17. Caron J M, Jones A L, Kirschner M W: Autoregulation of tubulin synthesis in hepatocytes and fibroblasts. The Journal of Cell Biology, 101: 1763-1772 (1985)

18. Carver J A, Guerreiro N, Nicholls K A, Truscott R J: On the interaction of α-crystallin with unfolded proteins. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1252: 251-260 (1995)

19. Carver J A, Lindner R A, Lyon C, Canet D, Hernandez H, Dobson C M, Redfield C: The interaction of the molecular chaperone α-crystallin with unfolding α-lactalbumin: a structural and kinetic spectroscopic study. Journal of Molecular Biology, 318: 815-827 (2002)

20. Christians E S, Ishiwata T, Benjamin I J: Small heat shock proteins in redox metabolism: implications for cardiovascular diseases. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 44: 1632-1645 (2012)

21. Ciano M, Allocca S, Ciardulli M C, della Volpe L, Bonatti S, D'Agostino M: Differential phosphorylation-based regulation of αB-crystallin chaperone activity for multipass transmembrane proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 479: 325-330 (2016)

22. Clark E D B: Protein refolding for industrial processes. Current Opinion in Biotechnology, 12: 202-207 (2001)

23. Coleman P D, Flood D G: Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, 8: 521-545 (1987)

24. De Ruiter J P, Uylings H: Morphometric and dendritic analysis of fascia dentata granule cells in human aging and senile dementia. Brain Research, 402: 217-229 (1987)

25. Delbecq S P, Jehle S, Klevit R: Binding determinants of the small heat shock protein, αB-crystallin: recognition of the ‘IxI’motif. The EMBO Journal, 31: 4587-4594 (2012)

26. Den Engelsman J, Bennink E J, Doerwald L, Onnekink C, Wunderink L, Andley U P, Kato K, De Jong W W, Boelens W C: Mimicking phosphorylation of the small heat-shock

protein αB-crystallin recruits the F-box protein FBX4 to nuclear SC35 speckles. European Journal of Biochemistry, 271: 4195-4203 (2004)

27. den Engelsman J, Gerrits D, de Jong W W, Robbins J, Kato K, Boelens W C: Nuclear import of αB-crystallin is phosphorylation-dependent and hampered by hyperphosphorylation of the myopathy-related mutant R120G. Journal of Biological Chemistry, 280: 37139-37148 (2005)

28. Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z: Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: focusing on tau-mediated neurodegeneration. Translational Neurodegeneration, 1: 24 (2012)

29. Ecroyd H, Meehan S, Horwitz J, Aquilina J A, Benesch J L, Robinson C V, Macphee C E, Carver J A: Mimicking phosphorylation of αB-crystallin affects its chaperone activity. Biochemical Journal, 401: 129-141 (2007)

30. Feder M E, Hofmann G E: Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology, 61: 243-282 (1999)

31. Flood D G: Region-specific stability of dendritic extent in normal human aging and regression in Alzheimer's disease. II. Subiculum. Brain Research, 540: 83-95 (1991)

32. Flood D G, Buell S J, Horwitz G J, Coleman P D: Dendritic extent in human dentate gyrus granule cells in normal aging and senile dementia. Brain Research, 402: 205-216 (1987)

33. Fuchs S Y, Fried V A, Ronai Z: Stress-activated kinases regulate protein stability. Oncogene, 17: 1483-1490 (1998)

34. Fujita Y, Ohto E, Katayama E, Atomi Y: αB-Crystallin-coated MAP microtubule resists nocodazole and calcium-induced disassembly. J Cell Sci, 117: 1719-1726 (2004)

35. Fukushima K, Mizuno Y, Takatama M, Okamoto K: Increased neuronal expression of alpha B-crystallin in human olivary hypertrophy. Neuropathology, 26: 196-200 (2006)

36. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G: Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochemical and Biophysical Research Communications, 286: 433-442 (2001)

37. Gellert M, Hanschmann E, Lepka K, Berndt C, Lillig C H: Redox regulation of cytoskeletal dynamics during differentiation and de-differentiation. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1850: 1575-1587 (2015)

38. Ghosh J G, Clark J I: Insights into the domains required for dimerization and assembly of human αB crystallin. Protein Science, 14: 684-695 (2005)

39. Ghosh J G, Estrada M R, Clark J I: Interactive domains for chaperone activity in the small heat shock protein, human αB crystallin. Biochemistry, 44: 14854-14869 (2005)

40. Ghosh J G, Houck S A, Clark J I: Interactive domains in the molecular chaperone human αB crystallin modulate microtubule assembly and disassembly. PLoS One, 2: e498 (2007)

41. Goldbaum O, Richter-Landsberg C: Stress proteins in oligodendrocytes: differential effects of heat shock and oxidative stress. Journal of Neurochemistry, 78: 1233-1242 (2001)

42. Golenhofen N, Redel A, Wawrousek E F, Drenckhahn D: Ischemia-induced increase of stiffness of αB-crystallin/HSPB2-deficient myocardium. Pflügers Archiv, 451: 518-525 (2006)

43. Golenhofen N, Arbeiter A, Koob R, Drenckhahn D: Ischemia-induced association of the stress protein αB-crystallin with I-band portion of cardiac titin. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 34: 309-319 (2002)

44. Golenhofen N, Bartelt-Kirbach B: The impact of small heat shock proteins (HspBs) in Alzheimer's and other neurological diseases. Current Pharmaceutical Design, 22: 4050-4062 (2016)

45. Golenhofen N, Htun P, Ness W, Koob R, Schaper W, Drenckhahn D: Binding of the Stress Protein αB-crystallin to Cardiac Myofibrils Correlates with the Degree of Myocardial Damage During Ischemia/Reperfusion in vivo. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 31: 569-580 (1999)

46. Gundersen G G, Khawaja S, Bulinski J C: Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. The Journal of Cell Biology, 105: 251-264 (1987)

47. Hanks S D, Flood D G: Region-specific stability of dendritic extent in normal human aging and regression in Alzheimer's disease. I. CA1 of hippocampus. Brain Research, 540: 63-82 (1991)

48. Harkin D P, Hall P A: Measuring a cell's response to stress: the p53 pathway. Genome Biology, 1: reviews105. 1 (2000)

49. Hayes D, Napoli V, Mazurkie A, Stafford W F, Graceffa P: Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function. Journal of Biological Chemistry, 284: 18801-18807 (2009)

50. Head M W, Hurwitz L, Goldman J E: Transcription regulation of alpha B-crystallin in astrocytes: analysis of HSF and AP1 activation by different types of physiological stress. Journal of Cell Science, 109: 1029-1039 (1996)

51. Hoffmann A, Roeder R G: Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. Nucleic Acids Research, 19: 6337 (1991)

52. Horwitz J: Seminars in cell & developmental biology. The function of alpha-crystallin in vision, Elsevier S. 53-60, (2000)

53. Horwitz J: Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89: 10449-10453 (1992)

54. Houck S A, Clark J I: Dynamic subunit exchange and the regulation of microtubule assembly by the stress response protein human αB crystallin. PLoS One, 5: e11795 (2010)

55. Inaguma Y, Ito H, Iwamoto I, Saga S, Kato K: αB-Crystallin phosphorylated at Ser-59 is localized in centrosomes and midbodies during mitosis. European Journal of Cell Biology, 80: 741-748 (2001)

56. Iqbal K, Liu F, Gong C, Alonso A d C, Grundke-Iqbal I: Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. Acta Neuropathologica, 118: 53-69 (2009)

57. Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Nohara D, Kato K: Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of αB-crystallin. Journal of Biological Chemistry, 276: 5346-5352 (2001)

58. Iwaki T, Wisniewski T, Iwaki A, Corbin E, Tomokane N, Tateishi J, Goldman J E: Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. The American Journal of Pathology, 140: 345 (1992)

59. Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J: Small heat shock proteins are molecular chaperones. Journal of Biological Chemistry, 268: 1517-1520 (1993)

60. Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind R A, Nordheim A, Stunnenberg H G: Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88: 8972-8976 (1991)

61. Janknecht R, Nordheim A: Affinity purification of histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells. Gene, 121: 321-324 (1992)

62. Kato K, Goto S, Hasegawa K, Inaguma Y: Coinduction of two low-molecular-weight stress proteins, αB crystallin and HSP28, by heat or arsenite stress in human glioma cells. The Journal of Biochemistry, 114: 640-647 (1993)

63. Kato K, Ito H, Inaguma Y, Okamoto K, Saga S: Synthesis and accumulation of αB crystallin in C6 glioma cells is induced by agents that promote the disassembly of microtubules. Journal of Biological Chemistry, 271: 26989-26994 (1996)

64. Kato K, Ito H, Kamei K, Inaguma Y, Iwamoto I, Saga S: Phosphorylation of αB-crystallin in mitotic cells and identification of enzymatic activities responsible for phosphorylation. Journal of Biological Chemistry, 273: 28346-28354 (1998)

65. Kato K, Shinohara H, Kurobe N, Inaguma Y, Shimizu K, Ohshima K: Tissue distribution and developmental profiles of immunoreactive αB crystallin in the rat determined with a sensitive immunoassay system. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1074: 201-208 (1991)

66. Kato S, Hirano A, Umahara T, Llena J F, Herz F, Ohama E: Ultrastructural and immunohistochemical studies on ballooned cortical neurons in Creutzfeldt-Jakob disease: ex-

pression of αB-crystallin, ubiquitin and stress-response protein 27. Acta Neuropathologica, 84: 443-448 (1992)

67. Kim K K, Kim R, Kim S: Crystal structure of a small heat-shock protein. Nature, 394: 595-599 (1998)

68. Kirbach B B, Golenhofen N: Differential expression and induction of small heat shock proteins in rat brain and cultured hippocampal neurons. Journal of Neuroscience Research, 89: 162-175 (2011)

69. Klemenz R, Fröhli E, Steiger R H, Schäfer R, AoYAMA A: Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88: 3652-3656 (1991)

70. Kulkarni V A, Firestein B L: The dendritic tree and brain disorders. Molecular and Cellular Neuroscience, 50: 10-20 (2012)

71. Kültz D: Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. Journal of Experimental Biology, 206: 3119-3124 (2003)

72. Launay N, Goudeau B, Kato K, Vicart P, Lilienbaum A: Cell signaling pathways to αB-crystallin following stresses of the cytoskeleton. Experimental Cell Research, 312: 3570-3584 (2006)

73. Launay N, Tarze A, Vicart P, Lilienbaum A: Serine 59 phosphorylation of αB-crystallin down-regulates its anti-apoptotic function by binding and sequestering Bcl-2 in breast cancer cells. Journal of Biological Chemistry, 285: 37324-37332 (2010)

74. Lee G J, Vierling E: A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. Plant Physiology, 122: 189-198 (2000)

75. Li R, Reiser G: Phosphorylation of Ser45 and Ser59 of αB-crystallin and p38/extracellular regulated kinase activity determine αB-crystallin-mediated protection of rat brain astrocytes from C2-ceramide-and staurosporine-induced cell death. Journal of Neurochemistry, 118: 354-364 (2011)

76. Locke M: 5 The Cellular Stress Response to Exercise: Role of Stress Proteins. Exercise and Sport Sciences Reviews, 25: 105-136 (1997)

77. Lowe J, Errington D R, Lennox G, Pike I, Spendlove I, Landon M, Mayer R J: Ballooned neurons in several neurodegenerative diseases and stroke contain αB crystallin. Neuropathology and Applied Neurobiology, 18: 341-350 (1992)

78. Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenlehrbuch Histologie. 4., vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, (2012). S.24-31, 183-184

79. Maeda Y, Koga H, Yamada H, Ueda T, Imoto T: Effective renaturation of reduced lysozyme by gentle removal of urea. Protein Engineering, Design and Selection, 8: 201-205 (1995)

80. Minamu M, Mizutani T, Kawanishi R, Suzuki Y, Mori H: Neuronal expression of alpha B crystalline in cerebral infarction. Acta Neuropathol, 105: 549-554 (2003)

81. Moriya H: Quantitative nature of overexpression experiments. Molecular Biology of the Cell, 26: 3932-3939 (2015)

82. Mörner C T: Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den lichtbrechenden. Medien des Auges. III. Zeitschrift für Physiologische Chemie, 18: 233-256 (1894)

83. Morrison L E, Hoover H E, Thuerauf D J, Glembotski C C: Mimicking phosphorylation of αB-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. Circulation Research, 92: 203-211 (2003)

84. Morrison L E, Whittaker R J, Klepper R E, Wawrousek E F, Glembotski C C: Roles for αB-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 286: H847-H855 (2004)

85. Muchowski P J, Ramsden R, Nguyen Q, Arnett E E, Greiling T M, Anderson S K, Clark J I: Noninvasive measurement of protein aggregation by mutant huntingtin fragments or α-synuclein in the lens. Journal of Biological Chemistry, 283: 6330-6336 (2008)

86. Muranova L K, Sudnitsyna M V, Gusev N B: αB-Crystallin Phosphorylation: Advances and Problems. Biochemistry (Moscow), 83: 1196-1206 (2018)

87. Mymrikov E V, Seit-Nebi A S, Gusev N B: Large potentials of small heat shock proteins. Physiological Reviews, 91: 1123-1159 (2011)

88. Nicholl I D, Quinlan R A: Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. The EMBO Journal, 13: 945-953 (1994)

89. Ousman S S, Tomooka B H, Van Noort J M, Wawrousek E F, O'Conner K, Hafler D A, Sobel R A, Robinson W H, Steinman L: Protective and therapeutic role for αB-crystallin in autoimmune demyelination. Nature, 448: 474-479 (2007)

90. Outeiro T F, Klucken J, Strathearn K E, Liu F, Nguyen P, Rochet J, Hyman B T, McLean P J: Small heat shock proteins protect against α-synuclein-induced toxicity and aggregation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 351: 631-638 (2006)

91. Perng M D, Cairns L, Van Den IJssel P, Prescott A, Hutcheson A M, Quinlan R A: Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. Journal of Cell Science, 112: 2099-2112 (1999)

92. Peschek J, Braun N, Rohrberg J, Back K C, Kriehuber T, Kastenmüller A, Weinkauf S, Buchner J: Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of αB-crystallin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110: E3780-E3789 (2013)

93. Prakash V, Timasheff S N: Aging of tubulin at neutral pH. Journal of Molecular Biology, 160: 499-515 (1982)

94. Prelich G: Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. Genetics, 190: 841-854 (2012)

95. Ray P S, Martin J L, Swanson E A, Otani H, Dillmann W H, Das D K: Transgene overexpression of αB crystallin confers simultaneous protection against cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion. The FASEB Journal, 15: 393-402 (2001)

96. Rekas A, Adda C G, Aquilina J A, Barnham K J, Sunde M, Galatis D, Williamson N A, Masters C L, Anders R F, Robinson C V: Interaction of the molecular chaperone αB-crystallin with α-synuclein: effects on amyloid fibril formation and chaperone activity. Journal of Molecular Biology, 340: 1167-1183 (2004)

97. Renkawek K, Voorter C, Bosman G, Van Workum F, De Jong W W: Expression of αB-crystallin in Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica, 87: 155-160 (1994)

98. Renkawek K, Stege G J, Bosman G J: Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and αB-crystallin in Parkinson's disease. Neuroreport, 10: 2273-2276 (1999)

99. Schmidt T, Bartelt-Kirbach B, Golenhofen N: Phosphorylation-dependent subcellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/αB-crystallin in cultured hippocampal neurons. Histochemistry and Cell Biology, 138: 407-418 (2012)

100. Schmitt J, Hess H, Stunnenberg H G: Affinity purification of histidine-tagged proteins. Molecular Biology Reports, 18: 223-230 (1993)

101. Shammas S L, Waudby C A, Wang S, Buell A K, Knowles T P, Ecroyd H, Welland M E, Carver J A, Dobson C M, Meehan S: Binding of the molecular chaperone αB-crystallin to Aβ amyloid fibrils inhibits fibril elongation. Biophysical Journal, 101: 1681-1689 (2011)

102. Shinder G A, Lacourse M, Minotti S, Durham H D: Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins have altered solubility and interact with heat shock/stress proteins in models of amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Biological Chemistry, 276: 12791-12796 (2001)

103. Shinohara H, Inaguma Y, Goto S, Inagaki T, Kato K: αB crystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. Journal of the Neurological Sciences, 119: 203-208 (1993)

104. Singh B N, Rao K S, Ramakrishna T, Rangaraj N, Rao C M: Association of αB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. Journal of Molecular Biology, 366: 756-767 (2007)

105. Skouri-Panet F, Michiel M, Férard C, Duprat E, Finet S: Structural and functional specificity of small heat shock protein HspB1 and HspB4, two cellular partners of HspB5: role of the in vitro hetero-complex formation in chaperone activity. Biochimie, 94: 975-984 (2012)

106. van Montfort R L, Basha E, Friedrich K L, Slingsby C, Vierling E: Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. Nature Structural Biology, 8: 1025-1030 (2001)

107. Vermeulen L, De Wilde G, Notebaert S, Berghe W V, Haegeman G: Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-κB p65 subunit. Biochemical Pharmacology, 64: 963-970 (2002)

108. Waudby C A, Knowles T P, Devlin G L, Skepper J N, Ecroyd H, Carver J A, Welland M E, Christodoulou J, Dobson C M, Meehan S: The interaction of αB-crystallin with mature α-synuclein amyloid fibrils inhibits their elongation. Biophysical Journal, 98: 843-851 (2010)

109. Xi J, Bai F, McGaha R, Andley U P: Alpha-crystallin expression affects microtubule assembly and prevents their aggregation. The FASEB Journal, 20: 846-857 (2006)

110. Yerbury J J, Gower D, Vanags L, Roberts K, Lee J A, Ecroyd H: The small heat shock proteins αB-crystallin and Hsp27 suppress SOD1 aggregation in vitro. Cell Stress and Chaperones, 18: 251-257 (2013)

111. Zabel C, Chamrad D C, Priller J, Woodman B, Meyer H E, Bates G P, Klose J: Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's disease. Molecular & Cellular Proteomics, 1: 366-375 (2002)

112. Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow E: Aβ oligomers cause localized Ca2 elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. Journal of Neuroscience, 30: 11938-11950 (2010)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: pET-Express-Vektoren für die Klonierung der HspB5-Konstrukte mit unterschiedlicher Lokalisation des Polyhistidin-Rests. (Modified pET6xHN-N, pET6xHN-C, and pET6xHN-GFPuv Vector Maps.; Certificate of Analysis, "pET6xHN Expression Vector Set" (Catalog No. 631432), ©2015 Clontech Laboratories, Inc. n/k/a Takara Bio USA, Inc.). 18

Abbildung 2: Fluoreszenzaufnahmen von C6-Zellen, transfiziert mit verschiedenen Plasmiden. 45

Abbildung 3: Repräsentativer Western Blot der Tubulinfraktionen mit Nocodazol behandelter C6-Zellen. 46

Abbildung 4: Western Blot der Tubulinfraktionen Nocodazol-behandelter sowie zusätzlich HspB5-transfizierter C6-Zellen (30 µM/2min). 47

Abbildung 5: Repräsentativer Western Blot für HspB5 und Tubulin von C6-Zellen nach HspB5-Überexpression und anschließender Nocodazolbehandlung.. .. 48

Abbildung 6: Quantifzierung der Tubulin-Polymerfraktionen nach Nocodazolbehandlung. 49

Abbildung 7: PCR der im pCR®2.1-TOPO®-Vektor codierten HspB5-Sequenzen..51

Abbildung 8: Beispielhafter Restriktionsverdau ausgewählter HspB5-Sequenzen klonierter Plasmide. 52

Abbildung 9: Polyacrylamidgelelektrophorese der aufgereinigten Positivkontrolle GFP, Coomassie-Färbung. 53

Abbildung 10: Polyacrylamidgelelektrophorese des nativ aufgereinigten HspB5-Wt mit C-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. 54

Abbildung 11: Polyacrylamidgelelektrophorese des denaturiert (+ Urea) aufgereinigten HspB5-Wt mit C-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. 55

Abbildung 12: Polyacrylamidgelelektrophorese des nativ aufgereinigten HspB5-Wt mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. 56

Abbildung 13: Polyacrylamidgelelektrophorese des denaturiert (+ Urea) aufgereinigten HspB5-Wt mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie Färbung. 56

Abbildung 14: Polyacrylamidgelelektrophorese des nativ (mit Lysozym) aufgereinigten HspB5-Wt mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung. ……57

Abbildung 15: Polyacrylamidgelelektrophorese mit Tubulin und allen nativ (A) und denaturierend (B) aufgereinigten HspB5-Mutanten mit N-terminal lokalisiertem Polyhistidin-Rest, Coomassie-Färbung...... 59

Abbildung 16: Repräsentativer Western Blot des Pull-Down Assays zwischen HspB5-Wt/-AAA und HspB1...... 60

Abbildung 17: Repräsentativer Western Blot des Pull-Down Assays zwischen den einzelnen HspB5-Konstrukten und Tubulin...... 61

Abbildung 18: Box-Plot der gebunden Tubulinmenge jeder Phosphomutante von HspB5 bezogen auf HspB5-Wt...... 62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer für PCR und Sequenzierung..... 16

Tabelle 2: Verwendete Vektoren zur Überexpression in C6-Zellen und E. coli..... 17

Tabelle 3: In der Proteinüberexpression und -aufreinigung verwendete HspB5-Konstrukte, sowie die dazugehörige Bedingung und Anzahl der Versuche.. 32

Tabelle 4: Projektbezogene Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörperlösungen gegen HspB5, HspB1 und α-Tubulin..... 42

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Nikola Golenhofen, die mir die Promotion in ihrer Arbeitsgruppe des Instituts für Anatomie und Zellbiologie mit diesem spannenden Thema ermöglicht hat. Das Tutorium der makroskopischen Anatomie unter ihrer Leitung war eine großartige Erfahrung und ist bis heute prägend. Für die außerordentlich verlässliche und inspirierende Betreuung meiner Promotion bin ich sehr dankbar.
Ich möchte auch Frau Dr. Britta Bartelt-Kirbach danken, die mit ihrem Wissen und ihrer Expertise zu meiner Arbeit immer die richtige Ansprechpartnerin war.
Bianca Mekle und Stefanie Sues haben mich zu Beginn meiner Promotion an die Hand genommen und mir gezeigt, wie man Polyacrylamidgele gießt, wie man Bakterien richtig ausplattiert und Nährmedien autoklaviert, wie man Antikörper aliquotiert und richtig pipettiert. Ich habe sehr viel von euch gelernt, vielen Dank.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Tobias Böckers dafür danken, dass ich in seinem Institut an meiner Promotion arbeiten konnte. Alle Kollegen waren freundlich, immer hilfsbereit und sind zu Freunden geworden. Die Arbeit in diesem Institut war auch wegen der Menschen aus den unterschiedlichsten Ländern so bereichernd, inspirierend und produktiv.

Ich möchte auch dem Promotionsprogramm „experimentelle Medizin“ und allen an der Organisation beteiligten Personen danken. Die Begleitung mit hilfreichen Seminaren und spannenden Vorträgen erleichterte mir den Einstieg in die medizinische Forschung.

Ich möchte auch nochmal meinen Eltern, ihren Lebenspartnern und meiner Freundin Magdalena Engelmann danken. Ihr habt mich immer unterstützt und wart da, wenn es mal nicht ganz rund lief.

Zuletzt gilt mein Dank auch nochmal all meinen engen Freunden, Matthias Brand, Samuel Birk, Dr. Michael Schön und Jan Philipp Delling, weil wir während des Studiums und im Institut eine schöne Zeit hatten.

Lebenslauf

Vorname	Lennart
Familienname	Schawinsky
Geburtsjahr	1992
Geburtsort	Köln

Beruflicher Werdegang

April 2020	Weiterbildungsassistent für Allgemeinmedizin an der Universitätsklinik Ulm, Innere Medizin 3

Universitäre und schulische Laufbahn

November 2019	3. Staatsexamen - Abgeschlossenes Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
November 2018 - Oktober 2019	Praktisches Jahr in den Abteilungen Chirurgie, Innere Medizin und Pathologie
Februar 2016 - Dezember 2016	Beginn der Promotion im Institut für Anatomie und Zellbiologie (Prof. Dr. med. Nikola Golenhofen), Promotionsprogramm „experimentelle Medizin“
2011 - 2012	Absolvierung des Studium Generale am Leibniz-Kolleg in Tübingen
2004 - 2011	Besuch des Romain-Rolland-Gymnasiums in Dresden
1999 - 2004	Besuch der 4. Grundschule am Rosengarten in Dresden

Sprachen	Englisch, Französisch, Latinum
Praktika	Im Studienverlauf vorgesehene Pflegepraktika auf den Stationen der Urologie, Nephrologie, und Unfall- und Wiederherstellungschirurgie; vier Famulaturen im Rahmen des klinischen Abschnitts des Studiums in der Neurologie, Pulmologie, Dermatologie und Allgemeinmedizin

Universitäre und außeruniversitäre Lehrtätigkeit

Seit Oktober 2015	Dozent für das propädeutische Seminar „Medizin“ am Aicher-Scholl-Kolleg der Volkshochschule Ulm
Wintersemester 2014/2015	Tutor im Kurs der makroskopischen Anatomie (Universität Ulm)