

**Streß- und Differenzierungs- abhängige Expression von
HSP70 bei *Neurospora crassa*:**

Regulative Funktion von cAMP

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt
dem Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen

von
Franco Fracella

Bremen im April 1995

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ludger Rensing
2. Prof. Dr. Detmar Beyersmann

Beisitzer: Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg
Prof. Dr. Armin Hildebrandt

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: 19. April 1995

Zusammenfassung

Das 70 kDa große Haupt-Hitzeschockprotein (HSP70) von *Neurospora crassa* wurde durch aufeinanderfolgende DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie und ATP-Affinitäts-Chromatographie in fast vollständiger Homogenität isoliert. Die ersten 54 aminoterminalen Aminosäuren wurden sequenziert und mit der entsprechenden HSP70-Sequenz anderer Organismen verglichen.

Gegen das isolierte HSP70 wurden monospezifische, polyklonale Antikörper in Kaninchen hergestellt, durch HSP70-Affinitäts-Chromatographie gereinigt und im Enzym-Immunoassay (ELISA) und Western Blot charakterisiert. Basierend auf diesen Antikörpern und dem isolierten HSP70 wurde ein HSP70-ELISA entwickelt.

Mit Hilfe dieser Techniken wurden die HSP70-Gesamtmenge in unbehandelten Zellen von exponentiell wachsendem Myzelium von *N. crassa*, während eines kontinuierlichen HS und während der Erholung nach einem HS analysiert. Des Weiteren wurde die Kerntranslokation von HSP70 untersucht. Bereits nach 5 min HS ist eine stark erhöhte HSP70-Menge im Zellkern nachweisbar. Bei moderaten Temperaturerhöhungen kommt es bereits während des HS zu einer Relokalisation von HSP70 ins Cytoplasma. Diese Relokalisation korreliert mit der Rückregulation der HS-Genexpression nach der anfänglichen Induktion.

Die Degradationsrate der Hitzeschockproteine wird durch einen HS verringert. Ein ~40 kDa Degradationsprodukt wurde ansequenziert und ist identisch mit dem N-Terminus des Haupt-HSP70 von *N. crassa*. Dieses ~40 kDa Degradationsprodukt von HSP70 kann im Western Blot detektiert werden und liegt nach einem HS zunächst in deutlich geringerer Menge vor. Später zeigt sich wieder eine Zunahme, sowohl während eines langandauernden, moderaten HS als auch bei Erholung von einem HS, allerdings mit unterschiedlicher Kinetik.

Das Haupt-HSP70 von *N. crassa* wird während der asexuellen Entwicklung und Differenzierung unterschiedlich stark exprimiert. Höchste Mengen an HSP70 wurden in Lufthyphen während der späten Konidiationsphase und in schlafenden Konidien gefunden. Während der Konidienkeimung nimmt die HSP70-Menge leicht ab und steigt bei dem vegetativen Wachstum der Hyphen wieder an. Die HSP70-Expression ist mit dem cAMP-Gehalt [Kallies, unveröff.] in diesen Entwicklungsstadien invers korreliert.

Um eine mögliche kausale Beziehung zwischen der HSP70-Expression und dem cAMP-Gehalt zu analysieren, wurde die Defektmutante der Adenylatzyklase von *N. crassa* (*crisp-1*) mit endogen reduziertem cAMP-Gehalt untersucht. *crisp-1* ist konstitutiv thermotolerant [Terenzi *et al.*, 1974] und hat einen leicht erhöhten HSP70-Gehalt. Die Zugabe von 20 μ M 8-Brom-cAMP zum Wildtyp und der *crisp-1* Mutante führt zu einer Reduktion der konstitutiven HSP70-Expression. In Gegenwart von 20 μ M 8-Brom-cAMP gebildete Konidien vom Wildtyp und der *crisp-1* Mutante zeigen reduzierte HSP70-Mengen. Die *crisp-1* Konidien verlieren in Gegenwart von cAMP ihre konstitutive Thermotoleranz [Cruz *et al.*, 1988]. Während der Keimung dieser Konidien vom Wildtyp bzw. von *crisp-1* in Gegenwart von 20 μ M 8-Brom-cAMP bleibt der HSP70-Gehalt, im Gegensatz zur Abnahme der HSP70-Menge in Abwesenheit von cAMP, nahezu konstant bzw. steigt an.

Ein HS bewirkt eine schnelle und vorübergehende Erhöhung des cAMP-Gehaltes [Kiang *et al.*, 1991; Kallies, unveröff.] und kurz darauf eine erhöhte HSP70-Expression. Möglicherweise hat cAMP unterschiedliche Effekte bei konstitutiver, entwicklungsabhängiger und HS-induzierter HSP70-Expression. In Anwesenheit von 20 μ M 8-Brom-cAMP bewirkt ein HS eine leichte Erhöhung der HSP70-Expression. Eine HS-Behandlung fördert auch Differenzierungsprozesse wie Lufthyphenbildung und eine verstärkte Konidiation [Kallies, unveröff.].

Zur exakten Bestimmung der Gesamt-HSP70-Menge in unbehandelten und HS-behandelten Ratten Gliom (C6) Zellen wurde ein ELISA für HSP70 in Säugerzel-

len und Geweben entwickelt. Ein solches System für HSP70-Analysen ließe sich bei Versuchen mit toxikologischer Fragestellung einsetzen.

Abstract

The major heat shock protein of 70 kDa (HSP70) from mycelial extracts of *Neurospora crassa* was purified to near homogeneity employing DEAE anion-exchange chromatography followed by affinity chromatography on ATP-agarose. The first 54 amino terminal amino acids of the isolated protein were sequenced and compared with HSP70 sequences of other species.

Monospecific polyclonal antibodies against isolated HSP70 were raised in rabbits, purified using an HSP70-affinity-column and characterized by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting. Based on these antibodies and isolated HSP70 a HSP70-ELISA was developed.

Using these techniques total HSP70-levels of untreated cells from exponentially growing mycelia of *N. crassa* were analyzed during continuous heat exposure and during recovery from heat shock. Furthermore, we followed the kinetics of nuclear translocation of HSP70. Already after 5 min HS a strong accumulation is observed in the nucleus. During continuous heat exposure at moderate temperatures a relocalization of HSP70 to the cytoplasm begins a few minutes later. This relocalization is correlated with a downregulation of HS-gene expression after HS.

The degradation rate of heat shock proteins is inhibited by heat shock treatment. A ~40 kDa degradation product was partially sequenced and shown to be identical to the N-terminus of the major HSP70 of *N. crassa*. This ~40 kDa degradation product of HSP70 is detected by Western blot analysis and showed reduced amounts shortly after heat shock. The degradation product increases again during recovery from HS and during continuous heat exposure at moderate temperatures.

The major HSP70 of *N. crassa* is differently expressed during asexual development and differentiation. Highest values occur in aerial hyphae during the later part

of conidiation and in dormant conidia. The level decreases during conidial germination and increases during vegetative growth. The HSP70-expression is inversely correlated with the cAMP-content [Kallies, unpub.] at these developmental stages.

In order to test causal relations between HSP70-expression and cAMP-content the adenylate cyclase-deficient mutant *crisp-1* of *N. crassa* was analyzed which exhibits reduced levels of endogenous cAMP. *Crisp-1* shows a constitutive thermotolerance [Terenzi *et al.*, 1974] and a slightly enhanced HSP70-level. Addition of 20 μ M 8-bromo-cAMP to the wild type and *crisp-1* mutant resulted in a reduction of the constitutive HSP70-level. Conidia of the wild type and *crisp-1* formed in the presence of 8-bromo-cAMP show reduced HSP70-levels and *crisp-1* conidia lose their constitutive thermotolerance [Cruz *et al.*, 1988]. Germination of these wild type and *crisp-1* conidia in the presence of 20 μ M 8-bromo-cAMP resulted in approximately constant or increasing HSP70-levels, respectively, in contrast to the decrease of HSP70 during germination when cAMP is absent.

Furthermore, heat shock induced an early and transient increase in cAMP [Kiang *et al.*, 1991; Kallies, unpub.] and - slightly later - in the amount of HSP70, which suggest different cAMP-effects on the basal expression, the constitutive expression during development and the stress-induced expression of HSP70. In the presence of 20 μ M 8-bromo-cAMP the heat shock induced expression of HSP70 is enhanced. Heat shock treatment also promotes differentiation such as aerial hyphae formation and conidiation [Kallies, unpub.].

For exact quantification of total HSP70-levels in untreated and heat-treated rat glioma (C6) cells an ELISA for mammalian cells and tissues was developed. This system is a tool for later analyses of HSP70 in toxicological projects.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
1 Einleitung	7
2 Material und Methoden	17
2.1 Abkürzungen und Zeichenerklärungen	17
2.1.1 Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren	18
2.2 Kultivierung von <i>Neurospora crassa</i>	19
2.3 Kultivierung der Ratten Gliom (C6) Zellen	20
2.4 Hitzeschock, cAMP und [³⁵ S]-Methionin	21
2.5 Isolierung von Zellbestandteilen	22
2.6 Isolierung und Sequenzierung von HSP70	23
2.7 Herstellung polyklonaler Anti-HSP70 Antikörper	24
2.7.1 Affinitätsreinigung der Anti-HSP70-Antikörper	25
2.8 Analytische Methoden	26
2.8.1 Proteinbestimmung	26
2.8.2 Gelelektrophorese	26
2.8.3 Western Blotting und Immunodetektion	27
2.8.4 Antikörper	28
2.9 Indirekter HSP70 - Enzym-Immunoassay (HSP70-ELISA)	29
2.9.1 Coating-Effizienz	31
2.9.2 ELISA-Durchführung (Ag-Detektion)	32
2.9.3 ELISA-Durchführung (Ak-Detektion)	36
2.10 Mathematische und statistische Methoden	36

3 Ergebnisse	39
3.1 HSP70 aus <i>N. crassa</i>	39
3.2 Polyklonale Anti-HSP70 Antikörper	44
3.3 HSP70 bei Ratten Gliom (C6) Zellen	50
3.4 Expression und Translokation von HSP70 bei Hitzeschock	54
3.5 Degradation von HSP70 bei Hitzeschock	58
3.6 Einfluß von cAMP auf die konstitutive und Hitzeschock-induzierte Expression und Translokation von HSP70	61
3.7 Expression von HSP70 während der asexuellen Entwicklung	66
3.8 Einfluß von cAMP auf die Expression von HSP70 während der asexuellen Entwicklung	73
3.9 Aufnahme von [³⁵ S]-Methionin und die Gesamtproteinsynthese bei Hitzeschock auch unter dem Einfluß von cAMP	77
3.10 Expression und Translokation von HSP70 während des circadianen Rhythmus	79
4 Diskussion	83
4.1 HSP70 aus <i>N. crassa</i>	83
4.2 Translokation von HSP70 bei Hitzeschock	89
4.3 Expression von HSP70 während der asexuellen Entwicklung	96
4.4 Zur Rolle von cAMP bei der Expression und Translokation von HSP70	100
4.5 Translokation von HSP70 während des circadianen Rhythmus	107
5 Literatur	109
6 Eigene Veröffentlichungen	129
Danke	131
Lebenslauf	133

Abbildungsverzeichnis

1 Einleitung

Abb. 1.1: Die zelluläre Streßantwort _____	8
Abb. 1.2: Modell der Chaperon-abhängigen Faltung neugebildeter und streßbedingt entfalteter Proteine im Cytoplasma prokaryotischer Zellen und in der Matrix von Mitochondrien oder Chloroplasten _____	11

2 Material und Methoden

Abb. 2.1: Prinzip der Immunodetektion auf Western Blots und im indirekten Antikörperfang-ELISA _____	28
Abb. 2.2: Coating-Effizienz der Kavitäten der Mikrotiterplatten als Funktion der zugefügten Proteinmenge _____	32
Abb. 2.3: Typische Standardkurve mit isoliertem HSP70 aus <i>N. crassa</i> _____	34
Abb. 2.4: Typische Standardkurve mit kommerziell erhältlichem, isoliertem HSP70 aus Rindergehirn _____	35

3 Ergebnisse

Abb. 3.1: Fluorogramm der Proteine aus hitzegeschocktem Myzelium von <i>N. crassa</i> aus Fraktionen der aufeinanderfolgenden Schritte der Isolation _____	39
Abb. 3.2: Fluorographie der zweidimensionalen PAGE der Elutionsfraktionen der Extrakte von unbehandeltem und hitzegeschocktem Myzelium aus der direkten ATP-Affinitäts-Chromatographie und durch die gesamte Isolationsroutine gereinigtes HSP70 _____	41
Abb. 3.3: N-terminale Teilsequenz des Haupt-HSP70 von <i>N. crassa</i> im Vergleich zu korrespondierenden Regionen anderer HSP70 _____	44
Abb. 3.4: Vergleich des Titers spezifischer Anti-HSP70-Ak verschiedener Seren im ELISA _____	45
Abb. 3.5: Reinigung spezifischer Anti-HSP70-Ak aus den Antiseren durch HSP70-Affinitäts-Chromatographie _____	47
Abb. 3.6: Western Blot Analyse von HSP70 nach zweidimensionaler Gelelektrophorese von unbehandelten und hitzegeschockten Extrakten aus exponentiell wachsendem Myzelium von <i>N. crassa</i> _____	48

Abb. 3.7: Western Blot Analyse von HSP70 nach 10 % SDS-PAGE von Proteinen aus unbehandeltem und hitzegeschocktem exponentiell wachsendem Myzelium von <i>N. crassa</i> _____	49
Abb. 3.8: Autoradiographien und HSP70 Western Blot Analysen der zweidimensionalen PAGE von Ratten Gliom Gesamtzellextrakten unter "Kontroll-" und Hitzeschock-Bedingungen _____	51
Abb. 3.9: Vergleich der Western Blot und ELISA Bestimmung der konstitutiven und Hitzeschock-induzierten HSP70-Menge in Ratten Gliom (C6) Zellen _____	52
Abb. 3.10: Western Blot Analyse der HSP70-Gesamtmenge in Abhängigkeit von der Höhe der Temperatur eines einstündigen Hitzeschock _____	55
Abb. 3.11: Quantifizierung von HSP70 in unbehandelten und hitzegeschockten Extrakten von exponentiell wachsendem Myzelium von <i>N. crassa</i> _____	55
Abb. 3.12: Veränderungen der Gesamt-HSP70-Menge während eines länger andauernden Hitzeschock und während der Erholung nach einem Hitzeschock im Gesamtzellhomogenat, der Kernfraktion und im Cytoplasma von exponentiell wachsendem Myzelium von <i>N. crassa</i> _____	57
Abb. 3.13: Gesamt-HSP70-Menge während der Erholung nach einem Hitzeschock im Gesamtzellhomogenat von exponentiell wachsendem Myzelium von <i>N. crassa</i> _____	59
Abb. 3.14: Veränderung der Menge von HSP70 und des 40 kDa-HSP70-Abbauproduktes während einem andauernden Hitzeschock und der Erholung nach einem Hitzeschock im Gesamtzellhomogenat von exponentiell wachsendem Myzelium von <i>N. crassa</i> _____	60
Abb. 3.15: Einfluß von cAMP auf die konstitutive und Hitzeschock-induzierte Expression von HSP70 beim Wildtyp und der <i>crisp-1</i> -Mutante von <i>N. crassa</i> _____	64
Abb. 3.16: Kerntranslokation von HSP70 und Einfluß von cAMP bei der <i>band</i> - und <i>crisp-1</i> -Mutante von <i>N. crassa</i> unter Hitzeschock-Bedingungen _____	66
Abb. 3.17: Vegetativer Lebenszyklus von <i>N. crassa</i> _____	67
Abb. 3.18: cAMP-Gehalt in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung der <i>band</i> -Mutante von <i>N. crassa</i> _____	70
Abb. 3.19: HSP70 Gehalt in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung des Wildtyps und der <i>band</i> -Mutante von <i>N. crassa</i> _____	70
Abb. 3.20: Detektion und Lokalisation von HSP70 während des Wachstums zur stationären Phase _____	71
Abb. 3.21: Einfluß von cAMP auf die HSP70-Expression in Lufthyphen und während der Konidiation des Wildtyps _____	74
Abb. 3.22: Einfluß von cAMP auf die HSP70-Expression während der Konidienkeimung des Wildtyps und der <i>crisp-1</i> -Mutante von <i>N. crassa</i> _____	75
Abb. 3.23: Einfluß von cAMP auf die Gesamtproteinsynthese und Vergleich mit der Anreicherung von HSP70 im Zellkern während eines kontinuierlichen Hitzeschock beim wt der <i>band</i> - und der <i>crisp-1</i> -Mutante von <i>N. crassa</i> _____	78

Abbildungsverzeichnis 5

Abb. 3.24: Entwicklung der cAMP-Menge und der Anreicherung von cPKA im Zellkern während des circadianen Rhythmus der band-Mutante von *N. crassa* _____ 81

Abb. 3.25: Entwicklung der HSP70-Menge und Lokalisation von HSP70 während des circadianen Rhythmus der band-Mutante von *N. crassa* _____ 81

4 Diskussion

Abb. 4.1: Übersicht der Expression, Funktion und Lokalisation der Hefe HSP70-Familie _____ 84

Abb. 4.2: Struktur von HSP70 _____ 85

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Bestimmung der absoluten konstitutiven und Hitzeschock-induzierten HSP70-Menge in Ratten Gliom (C6) Zellen im ELISA. _____ 53

Tab. 3.2: Bestimmung der absoluten HSP70-Menge des Wildtyps von *N. crassa* in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung im ELISA. _____ 71

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Effekte von cAMP auf die Expression von HSP70 bei *N. crassa*. _____ 106

1 Einleitung

Alle Organismen und Zellen reagieren auf äußere Reize, auf Veränderungen der Umweltbedingungen. Diese Reaktionen sind ein wichtiges Kennzeichen des Lebens. Oft führt eine solche Reaktion zu qualitativen und quantitativen Änderungen der Genexpression.

Reaktionen auf unterschiedliche Belastungen bezeichnet man als Streßantworten. Der am besten untersuchte und wichtigste Bestandteil der Streßantwort ist die vorübergehende, kurz nach einem Streß einsetzende, massive Synthese von Streßproteinen (Hitzeschockproteine, HSP) gegen einen Hintergrund reduzierter Synthese von "normalen" oder "house keeping" Proteinen [zur Übersicht siehe Nover, 1991; Morimoto *et al.* 1990 & 1994]. Streßproteine sind phylogenetisch hochkonserviert und universell bei allen Organismen zu finden. Die verschiedenen Streßproteine werden in Gruppen zusammengefaßt, die man nach ihrem Molekulargewicht in Kiloton, wie etwa HSP60, 70, 90 usw., unterscheidet.

Die diese Streßantwort auslösenden Faktoren sind sehr vielfältig (Nover, 1991; Abb. 1.1), und ständig werden neue beschrieben. So scheint auch "Elektromog" sowie die Erhöhung des hydrostatischen Druckes bei verschiedenen Zellen, und eine "Bewegungshemmung" bei Ratten, eine Induktion von Streßproteinen auszulösen [Goodman *et al.*, 1994; Iwahashi *et al.*, 1993; Holbrook & Udelsman, 1994]. Ein der Bewegungshemmung ähnliches Expressionsmuster von Streßproteinen findet sich auch nach operativen Eingriffen. Ob auch physischer, psychischer oder emotionaler Streß zur Induktion von Streßproteinen führen kann, wurde bislang nur wenig untersucht. Erste Experimente deuten diese Möglichkeit an [Kirschbaum & Fracella, unveröff.]. Alle Streßfaktoren bewirken eine Reihe von Veränderungen im zellulären Milieu, wobei nicht alle Stressoren die komplette Liste der Änderungen hervorrufen (Abb. 1.1). Nach einem Hitzeschock kommt es neben

der Induktion von Streßproteinen kurzfristig auch zu einigen morphologischen Veränderungen [Laszlo, 1992; Nover, 1991; Xu, 1995], zu einem intrazellulären pH-Anstieg [Weitzel *et al.*, 1987; Kiang *et al.*, 1990; Neuhaus-Steinmetz *et al.*, in Vorbereitung], einer Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration [Kiang *et al.*, 1990] und des cAMP-Gehaltes [Kiang *et al.*, 1991]. Eine gemeinsame Wirkung vieler Stressoren ist die direkte oder indirekte Schädigung von Proteinen [Persson & Gekas, 1994; Thomas & Dill, 1993]. Es häufen sich mißgefaltete Proteine und unerwünschte Proteinaggregationen an [Kabakov & Gabai, 1993; Nguyen & Bensaude, 1994]. Diese spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Streßantwort. Ananthan *et al.* (1986) konnte allein durch die Mikroinjektion von mißgefalteten Proteinen in Zellen die Synthese von HSP induzieren.

Abb. 1.1: Die zelluläre Streßantwort [verändert nach Zoeger *et al.*, 1992b]. HS-Induktoren bewirken eine Reihe von Veränderungen in der Zelle. Mindestens eine davon dient als Signal zur Aktivierung des Hitzeschockfaktors (HSF), der an spezifische Hitzeschockelemente (HSE) im Promotor der HS-Gene bindet und deren Transkription stimuliert. Dasselbe oder ein anderes Signal unterdrückt die Transkription der "normalen" (n) Gene. Auch auf der Translationsebene findet eine Stimulation der Synthese von Streßproteinen und eine Hemmung der Synthese von normalen Proteinen statt [Übersicht: Sierra & Zapata, 1994]. Die Menge einiger Streßproteine (HSP70) bilden möglicherweise regulatorische Rückkopplungsschleifen. Streßproteine sind für die korrekte Faltung, Zusammenlagerung, Stabilisierung, den Transport sowie den Abbau von Proteinen essentiell. Das führt auf zellulärer Ebene zu Schutz, Toleranz, Resistenz und Adaptation, kann aber auch zu Differenzierungs-, Proliferations- und Transformationsprozessen führen.

Die verschiedenen Gruppen der Streßproteine enthalten neben nur durch Streß induzierbaren Vertretern auch solche, die bei Abwesenheit von Streß wichtige Funktionen erfüllen. Die Expression einiger HSP (z. B. HSP70) während spezifischer Stadien der Zellentwicklung, der Differenzierung und des Zellzyklus sind gute Beispiele für die Bedeutung dieser Proteine bei zahlreichen Prozessen [Milarski & Morimoto, 1986; Milarski *et al.*, 1989; Pauli & Tissières, 1990; Pechan, 1991; Hightower & Nover, 1991; Heikkila, 1993].

Viele Streßproteine und konstitutiv gebildete verwandte Proteine sind für die korrekte Faltung, Zusammenlagerung, Stabilisierung, den Transport sowie den Abbau von Proteinen essentiell. Sie erfüllen Schutzfunktionen und wirken somit einer Schädigung der Zellen entgegen. Aufgrund dieser Funktion werden sie als molekulare Chaperone (Gouvernanten) bezeichnet. Sie sind in der Lage die Tendenz zur Aggregation vorhandener und neugebildeter Proteine zu verringern, indem sie an hydrophobe Teile der Proteine binden und so deren korrekte Faltung aufrechterhalten oder erst ermöglichen (HSP70/60). Bereits aggregierte oder denaturierte Proteine werden wieder dissoziiert bzw. renaturiert oder der lysosomalen Degradation zugeführt (HSP70). HSP70 ist außerdem am Transport intakter Proteine in den Zellkern und andere Kompartimente beteiligt, wobei die zu transportierenden Proteine partiell entfaltet werden [Morimoto *et al.*, 1994].

Aus den Arbeiten der letzten Jahre ergibt sich die wichtige Erkenntnis, daß die Hauptchaperone (HSP60 und HSP70) nur in Kooperation mit Helferproteinen, den sog. "cohort"-Proteinen, ihre Aufgabe effizient erfüllen (Abb. 1.2). Wegen dieser Kooperation mehrerer Komponenten spricht man zunehmend von "Chaperon-Maschinen". HSP60 befindet sich in Mitochondrien und Chloroplasten und bildet zwei Ringe aus je 7 identischen Untereinheiten [Saibil *et al.*, 1993; Braig *et al.*, 1994], an die sich Helferproteine (GrpE, HSP10) anlagern. Ein entsprechender Komplex wurde kürzlich auch im Cytoplasma entdeckt. Dieser sog. TCP-1-Komplex besteht aus zwei Ringen mit je bis zu 9 verschiedenen Untereinheiten. Mitglieder der HSP70-Genfamilie sind die wichtigsten Chaperone in der Zelle. Sie kommen im Cytoplasma, in Mitochondrien und Chloroplasten, im ER und im Zellkern vor. Sie kooperieren spezifisch mit

kleineren Proteinen (HSP40 und GrpE), sind aber auch an vielen anderen Kooperationen zum Zwecke der Faltung, der Translokation und des Abbaus von Proteinen beteiligt [Hendrick & Hartl, 1993; Hartl *et al.*, 1994; Frydman & Hartl, 1994; Becker & Craig, 1994]. Ein dem GrpE entsprechendes Helferprotein (Mge1p) wurde vor kurzem auch in Mitochondrien der Hefe beschrieben [Craig, CSH 1994; Voos *et al.*, 1994]. Während die Hauptchaperon-Maschinen nur unter Verbrauch von ATP arbeiten, scheinen die "Junior"-Chaperone (HSP25) ihre Funktion ohne ATP erfüllen zu können [Jakob *et al.*, 1993; Jakob & Buchner, 1994]. Durch Streß, einige Wachstumsfaktoren, Cytokine usw. wird HSP25 phosphoryliert und bildet unter nativen Bedingungen hochmolekulare rotationssymmetrische Komplexe (bis zu 4 gestapelte Ringe aus je 8 identischen Untereinheiten [Behlke, pers. Mitt.; Benndorf *et al.*, 1994; Groenen *et al.*, 1994]).

Neben der Chaperon-Funktion erfüllen die Streßproteine der verschiedenen Gruppen auch eine Reihe anderer Funktionen. Sie werden in einigen aktuellen Übersichtsartikeln zusammengefaßt [Bohen & Yamamoto, 1994; Pratt, 1993; Parsell & Lindquist, 1993 & 1994; Arrigo & Landry, 1994; Jentsch, 1992; Hershko & Chichanover, 1992; Dunn *et al.*, 1987; Nover, 1991; Jakob & Buchner, 1994; Morimoto *et al.*, 1990; 1994]. Einige Streßproteine - vor allem solche aus der HSP70-Familie - akkumulieren nach einem Streß schnell im Zellkern [Velazquez & Lindquist, 1984; Welch & Feramisco, 1984; Ohtsuka *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 1991; Ohtsuka & Laszlo, 1992] und scheinen die Erholung der Zellkernmorphologie zu beschleunigen [Pelham, 1984]. HSP70 besitzt eine Kern- und Nucleolus-Translokationssequenz (NLS, NOS [Dang & Lee, 1989; Milarski & Morimoto, 1989]), kann aber auch an die NLS anderer Proteine binden. HSP70 ist aktiv am Transport anderer Proteine in den Zellkern beteiligt [Feldherr, 1992; Shi & Thomas, 1992; Imamoto *et al.*, 1992; Osborne & Silver, 1993; Pratt, 1993; Yang & DeFranco, 1994].

Auch verschiedene Krankheitszustände führen zu erhöhter Expression von Streßproteinen. Aufgrund ihrer Rolle in der Immunologie und bei der Entstehung und Therapie von Krebs finden sie ein wachsendes Interesse in der Medizin [zur Übersicht siehe Morimoto *et al.*, 1990 und 1994; Fracella & Rensing, 1994 und 1995a].

Abb. 1.2: Modell der Chaperon-abhängigen Faltung neugebildeter (a-e/f) und streßbedingt entfalteter (g,c,d,e/f) Proteine im Cytoplasma prokaryotischer Zellen und in der Matrix von Mitochondrien oder Chloroplasten (c-e/f) [verändert nach Frydman & Hartl, 1994; aus Fracella & Rensing, 1994 und 1995a]. (a) DnaJ und DnaK assoziieren mit der am Ribosom neugebildeten Peptidkette; (b) durch die Interaktion mit DnaJ wird DnaK im ADP-gebundenem Zustand stabilisiert; (c) DnaK, DnaJ und das ungefaltete Peptid bilden einen stabilen Komplex; (d) mit Hilfe von GrpE wird ADP von DnaK abdissoziiert; (e) durch ATP-Bindung an DnaK wird das ungefaltete Protein entlassen und erlangt entweder sofort seinen nativen Zustand, wird erneut von DnaJ und DnaK gebunden (e) oder zur vollständigen Faltung an GroEL/ES weitergegeben (f). Durch Streßbedingungen entfaltete Proteine (g) werden von DnaJ und DnaK gebunden und durchlaufen einen ähnlichen Faltungsprozeß wie neugebildete Proteine (g-c-d-e bzw. g-c-d-f). Im Cytoplasma eukaryotischer Zellen laufen vermutlich sehr ähnliche Faltungsmechanismen ab. Für viele prokaryotische Chaperone wurden schon homologe Proteine identifiziert. Bei Eukaryoten kann cytoplasmatisches HSP70 außer der Renaturierung streßbedingt entfalteter Proteine auch deren lysosomale Degradation veranlassen. HSP70 scheint auch an der Präsentation von prozessierten Proteinen beteiligt zu sein.

Die schnelle, vorübergehende Induktion der Synthese von Streßproteinen in Streßsituationen wird hauptsächlich von einem spezifischen Hitzeschock-Transkriptionsfaktor (HSF1) kontrolliert. Der konstitutiv exprimierte HSF1 liegt in ungestreßten Säugerzellen in einer inaktiven monomeren Form vor. Als Folge von Streß bildet der HSF1 Trimere und akkumuliert im Zellkern. HSF1 bindet dann an spezifische Hitzeschockelemente (HSE) im Promotor der Streßgene und initiiert deren Transkription (Bienz & Pelham, 1987; Morimoto *et al.*, 1992). Die Rolle einer Phosphorylierung des HSF1 ist noch unklar; sie könnte sowohl zur Aktivierung [Morimoto *et al.*, 1994] als auch Desaktivierung [Høj & Jakobsen, 1994] beitragen. Der HSF von Hefe ist auch unter nicht-Streßbedingungen an HSE gebunden und wird streßabhängig phosphoryliert [Sorger *et al.*, 1987; Sorger & Pelham, 1988].

Der HSF wird negativ reguliert, d.h. die Ausbildung der aktiven trimeren Form wird unter nicht induzierenden Bedingungen durch Stabilisierung der monomeren Form verhindert. Als mögliche Kandidaten für die negative Regulation von HSF1 gelten die HSP (vor allem HSP70) selbst. Sie könnten so ihre eigene Synthese über negative Rückkopplung kontrollieren [Morimoto, 1993; Morimoto *et al.*, 1994]. Andererseits berichten Rabindran *et al.* (1994), daß zur Unterdrückung der DNA-bindenden Aktivität des HSF eine Interaktion mit HSP70 nicht ausreicht.

Die entwicklungsbedingte HSP Synthese wird nicht durch HSF1 vermittelt und ist im Vergleich zur streßinduzierten schwächer, langsamer und länger anhaltend. Sie hängt von anderen, bis jetzt weniger gut bekannten Faktoren ab. Im Promotor von HSP70 wurden auch schon entsprechende regulative Elemente gefunden. Beispielsweise fanden Boorstein & Craig (1990) im SSA3-Promotor der Hefe ein dem auf zyklisches 3', 5' Adenosinmonophosphat (cAMP)-reagierendes ähnliches Element (CRE). Zusammen mit dem angrenzenden HSE ist es verantwortlich für die Expression von SSA3 nach dem "diauxic shift" und in der stationären Phase einer "batch"-Kultur. Die CRE-abhängige SSA3-Expression resultiert aus einer reduzierten Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cPKA). Auch für ein Polyubiquitin-Gen (*UBI4*) wurde eine Regulation durch HS und cAMP beschrieben [Tanaka *et al.*, 1988]. Vor kurzem haben Engelberg *et al.* (1994) für Hefe und Säugerzellen zeigen

können, daß durch eine Aktivierung des RAS/cAMP-Signalweges die Expression einiger HS-Gene unabhängig vom HSF abgeschwächt wurde.

Wichtig ist auch die Entdeckung weiterer HSF: HSF2 wird nicht durch Streß aktiviert und scheint wesentlich für die entwicklungsbedingte HSP-Synthese verantwortlich zu sein. Er wird durch Hämin-induzierte Differenzierungsprozesse, während der Spermatogenese und der frühen Embryonalentwicklung aktiviert [Sistonen *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1994; Mezger *et al.*, 1994]. HSF3 scheint ein Zelltyp-spezifischer HSF zu sein, der wie HSF1 durch Streß - aber mit verzögerter Kinetik - aktiviert wird [Nakai & Morimoto, 1993; Morimoto *et al.*, 1994].

Einige Arbeiten beschäftigen sich mit der Streßantwort von *N. crassa*. Die wichtigsten Streßproteine wurden bereits isoliert, charakterisiert und sequenziert [Plesofsky-Vig & Brambl, 1985a,b, 1990; Hutchinson *et al.*, 1989; Kapoor & Lewis, 1987; Vassilev *et al.*, 1992; Roychowdhury *et al.*, 1992; Zoeger *et al.*, 1992a; Machwe & Kapoor, 1993; Fracella *et al.*, 1993]. In einer neueren Arbeit ist die gesamte codierende Gensequenz und die Promotorregion des HS-induzierbaren Haupt-HSP70 von *N. crassa* beschrieben [Kapoor *et al.*, 1995].

Über die konstitutive Expression von Streßproteinen während der Entwicklung und Differenzierung von *N. crassa* existieren nur folgende Hinweise: Plesofsky-Vig & Brambl (1985a & b) fanden in schlafenden Konidien von *N. crassa* gespeicherte mRNA der 70, 90 und 100 kDa großen HSP. Weiter berichteten sie, daß sich HSP34 und HSP38 nur in Zellen die älter als 7 h sind durch HS induzieren lassen. Carl Scholle, ein Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, konnte durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Northern Blot Analysen eine differentielle Expression einiger HSP während verschiedener Phasen der asexuellen Entwicklung von *N. crassa* zeigen. In Konidien fand er eine hohe konstitutive Expression von Streßproteinen im 80 und 70 kDa-Bereich. Einige für Lufthyphen und Konidien spezifische Proteine um 45 kDa [Roberts *et al.*, 1988; Berlin & Yanofsky, 1986] zeigen auch unter Hitzestreß in Konidien eine hohe Synthese. Während des Hitzestresses nimmt die Synthese vieler "normaler" Proteine in Konidien im Gegensatz zu vegetativen Myzelium nicht ab

[Scholle, 1992].

Die Rolle und der Wirkungsmechanismus von cAMP bei der Differenzierung von *N. crassa* ist noch wenig bekannt [siehe Übersicht: Pall, 1981]. Einige Berichte beschreiben Effekte von cAMP auf das Wachstum von *N. crassa* [Mishra, 1976; Pall & Robertson, 1986; Scott & Solomon, 1973; Terenzi *et al.*, 1976], andere beschreiben Eigenschaften von Defektmutanten der Adenylatzyklase [Scott, 1976; Rosenberg & Pall, 1979].

Die Defektmutante der Adenylatzyklase von *N. crassa* (*crisp-1*; *cr-1*) mit geringem cAMP-Gehalt im Myzelium bildet nur sehr kurze Lufthyphen und zeigt eine schnelle Konidiation [Lindgren, 1936]. Hier scheint die Lufthyphenbildung von einer höheren cAMP-Konzentrationen abzuhängen. Eine andere Mutante mit geringer Aktivität der Adenylatzyklase (*frost*, *fr*) bildet Lufthyphen aber keine Konidien [Perkins, 1959]. *cr-1* ist als konstitutiv thermotolerant beschrieben worden [Cruz *et al.*, 1988]. Eine konstitutive Thermotoleranz wird zum Teil durch die erhöhte Expression einiger Streßproteine (u. a. HSP70) vermittelt oder durch sie bewirkt [Weber, 1992; Hahn & Li, 1990; Li & Laszlo, 1985; Iida & Yahara, 1984; Sanchez *et al.*, 1993; Parsell & Lindquist, 1994; Kampinga, 1993]. Die *cyr1*-Mutante der Hefe (analog zu *cr-1* von *N. crassa*) zeigt neben einer konstitutiven Thermotoleranz eine erhöhte HSP-Expression. Die *byc1*-Mutante der Hefe (mit ständig aktiver katalytischer Untereinheit der cPKA) zeigt den umgekehrten Phänotyp - eine erhöhte Thermosensitivität und reduzierte Expression einiger HSP [Shin *et al.*, 1987; Werner-Washburne *et al.*, 1989; Boorstein & Craig, 1990; Engelberg *et al.*, 1994].

Zur genaueren Analyse der Streßantwort von *N. crassa* während eines kontinuierlichen Hitzeschocks sollte eine mögliche Adaptation der HSP70-Expression untersucht und die Translokation von HSP70 in den Zellkern zeitlich genau verfolgt werden. Bei der Hefe scheint cAMP an der Regulation der konstitutiven Synthese von HSP70 beteiligt zu sein. Beim Wildtyp und der *cr-1*-Mutante von *N. crassa* sollte daher analysiert werden, ob cAMP einen ähnlichen Einfluß auf die konstitutive oder HS-stimulierte Expression oder auf die Translokation von HSP70 hat.

Ferner sollte die Expression von HSP70 während der Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse im asexuellen Lebenszyklus von *N. crassa* und ein möglicher Einfluß von cAMP analysiert werden. Der asexuelle Lebenszyklus von *N. crassa* beinhaltet Hyphenwachstum, Lufthyphenbildung, Konidiation und Konidienkeimung [Nelson *et al.*, 1975; Russo & Pandit, 1992; Springer, 1993]. In diesen Phasen des Lebenszyklus sollten der cAMP- [Kallies, 1995] und HSP70-Gehalt in verschiedenen Entwicklungsstadien gemessen und miteinander verglichen werden. Ein direkter Einfluß von cAMP auf die Menge an HSP70 sollte bei Bildung und Keimung von Konidien in Abwesenheit und Gegenwart von cAMP untersucht werden.

Wenn cAMP direkt oder indirekt an Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen beteiligt ist und außerdem die konstitutive HSP-Expression beeinflusst, könnten HSP auch aktiv an Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen beteiligt sein. Indirekte Hinweise für eine Rolle von HSP während der Differenzierung könnten durch Untersuchungen zur Wirkung eines HS auf Differenzierungsprozesse abgeleitet werden. So führt ein 15 minütiger HS bei Neuroblastoma-Zellen nach 6 Tagen zur Differenzierung [Stoklosinski *et al.*, 1992]. Bei *N. crassa* induziert ein HS 18 h später eine starke Konidiation [Gebauer *et al.*, 1995].

Wenn Hitzeschockproteine - möglicherweise durch eine verstärkte Synthese bzw. deren starke Anreicherung im Zellkern (HSP70) - am Prozeß der Lufthyphenbildung und Konidiation beteiligt wären, müßte das auch bei einer endogen ausgelösten Konidiation zu beobachten sein. Die *bdA*-Mutante von *N. crassa* zeigt unter konstanten Bedingungen eine endogene, circadiane Rhythmik, die nach außen durch eine periodische Konidienbildung mit einer Periodenlänge von etwa 21.5 h gut sichtbar ist (siehe Umschlagbild [Deutsch, 1990; Deutsch *et al.*, 1993]). Wenn eine lokale Erhöhung oder eine insgesamt erhöhte HSP70-Menge neben der Funktion im Konidiationsprozeß auch eine Rolle bei der Ausbildung der circadianen Rhythmik von *N. crassa* spielt, sollten solche Veränderungen auch in einer Flüssigkultur der *bdA*-Mutante auftreten, in der die circadiane Sporulationsrhythmik nicht ausgeprägt ist, eine biochemische Rhythmik aber weiterläuft [Nakashima, 1981]. Eine rhythmische Regulation der Expression von HSP70 oder die spezifische Akkumulation von HSP70

im Zellkern könnten auch als Zeiger der Uhr die rhythmische Sporulation regulieren. Daher sollte die Menge an HSP70 von bdA unter Bedingungen die eine circadiane Rhythmik erlauben, in verschiedenen Kompartimenten bestimmt werden.

Das Auftreten oder die Erhöhung der Menge von Streßproteinen in verschiedenen Geweben kann diagnostisch als Indikator für pathogene Veränderungen genutzt werden. Entsprechend liegt es nahe, Veränderungen der zellulären Streßproteinmenge auch als Indikator für toxikologische Analysen einzubeziehen. Ein solches Indikatorsystem könnte vor allem der Ermittlung einer Proteintoxizität dienen und Ergebnisse von Gentoxizitätsuntersuchungen stützen. Auswirkungen von Belastungen auf Organismen könnten mit derartigen Testsystemen differenzierter beurteilt werden, als über globale Parameter wie Zellproliferation und Zelltod allein. Auch zur Überwachung von Umweltschadstoffen ließe sich ein solches System einsetzen [Ödberg-Ferragut *et al.*, 1991; Köhler *et al.*, 1992; Welch, 1993; Sanders, 1993; Neuhaus-Steinmetz *et al.*, 1994; Morimoto *et al.* (eds), 1990, Fracella & Rensing, 1994 & 1995a].

Basierend auf Arbeiten von Ulrich Neuhaus-Steinmetz [Neuhaus-Steinmetz *et al.*, 1994; Neuhaus-Steinmetz, 1995] aus unserer Arbeitsgruppe sollte die Anwendung der Streßantwort (HSC70/HSP68-Induktion) als möglicher Toxizitätsindikator (Proteintoxizität) näher analysiert werden. Dazu sollte zunächst die HSP70-Familie von Ratten Gliom (C6) Zellen näher charakterisiert und ein ELISA-System zur empfindlichen und schnellen Detektion und Quantifizierung von HSP70 aus Säugerzellkulturen und Geweben entwickelt werden. Erste toxikologische Untersuchungen mit Hilfe dieses HSP70 - ELISA wurden in Zusammenarbeit mit Ulrich Neuhaus-Steinmetz durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen und Zeichenerklärungen

acon-2	= <i>aconidial 2</i> , Defektmutante der Konidiation von <i>N. crassa</i>
Ag	= Antigen(e)
Ak	= Antikörper
AP	= alkalische Phosphatase
AS	= Aminosäure(n)
BCA	= bicinchoninic acid
BIP	= Immunglobulin heavy chain binding protein
bdA	= <i>band A</i> , <i>N. crassa</i> Mutante mit ausgeprägter Sporulationsrhythmik
BSA	= bovine serum albumine (Rinderserum-Albumin)
cAMP	= cyclic 3', 5' adenosine monophosphate
° C	= Temperatur in Grad Celsius ([° K] -273.15)
CHBF	= constitutive HSE-binding factor
Ci	= Curie
CNBr	= Cyanbromid
cPKA	= cAMP dependent protein kinase
cpm	= Impulse pro Minute
CRE	= cAMP-responsive(-like) element
CREB	= CRE-binding protein
cr-1	= <i>crisp-1</i> , Defektmutante der Adenylatzyklase von <i>N. crassa</i>
DEA	= Diethanolamin
DEAE	= Di-ethyl-amino-ethyl
DMSO	= Di-methyl-sulfoxid
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
EDTA	= Ethylen-diamino-tetra-essigsäure
eIF	= eukaryotic initiation factor
ELISA (EIA)	= enzyme linked immunosorbent assay (enzyme immunoassay)
Fab	= Antigenerkennungsregion der Ak
Fc	= Fußregion der Ak
<i>g</i>	= relative Zentrifugalbeschleunigung
g	= Gramm
GRP	= Glucose regulierte(s) Protein(e)
h	= Stunde
HS	= Hitzeschock
HSC	= konstitutive HSP
HSE	= Hitzeschockelement(e)
HSF	= Hitzeschock(transkriptions)faktor(en)
HSP(<i>x</i>)	= Hitzeschockprotein(e) mit einer Größe von <i>x</i> kDa
I	= Ionenstärke
IEF	= isoelektrische Fokussierung
Ig(G)	= Immunglobulin (G)
kDa	= Kilodalton

LL	= Dauerlicht
MEIC	= multicentre evaluation of <i>in vitro</i> cytotoxicity
MHC	= Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	= messenger ribonucleic acid
MW	= molecular weight
NLS	= nuclear localization sequenz
NOS	= nucleolar localization sequenz
OD _(n)	= optische Dichte bei <i>n</i> Nanometern
PAGE	= Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	= phosphat buffered saline
pI	= isoelektrischer Punkt(e)
PKI _⊗	= protein kinase inhibitor _⊗ (specific for cPKA)
PMSF	= Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
pNPP	= para-Nitrophenylphosphat
PPO	= Diphenyloxazol
PTH	= Phenylthiohydantoin
PVDF	= Polyvenylidendifluorid
s	= Sekunde(n)
SDS	= Natriumdodecylsulfat
TCA	= Trichloressigsäure
Tris	= Tris-hydroxy-methyl-amino-methan
UV	= ultraviolett
wt	= Wildtyp von <i>N. crassa</i>

2.1.1 Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Asparagin oder Asparaginsäure	Asx	B
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin oder Glutaminsäure	Glx	Z
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

2.2 Kultivierung von *Neurospora crassa*

Stämme

Für die meisten Versuche wurde der Wildtyp (wt, St. Lawrence 74A, FGSC Nr. 262) und die Mutante *band A* (bdA, 74A, FGSC Nr. 1858) von *Neurospora crassa* verwendet. bdA zeigt unter bestimmten Kulturbedingungen eine deutliche, tagesperiodische Bildung von Makrokonidien. Die anderen Eigenschaften der bdA-Mutante sind denen des Wildtyps (wt) sehr ähnlich.

Die Mutante *crisp-1* (cr-1, FGSC Nr. 826A) hat einen Defekt in der Adenylatzyklase und daher einen stark reduzierten cAMP-Gehalt [Terenzi *et al.*, 1974]. Sie zeigt eine schnelle Konidiation mit sehr kurzen Konidiophoren [Lindgren, 1936]. In der Flüssigkultur wächst die cr-1-Mutante etwa halb so schnell wie die bdA-Mutante. cr-1 zeichnet sich durch ein lineares Wachstum bis zur stationären Phase (die in 20 ml Flüssigkulturen erst nach 110 h bei 25° C erreicht wird) aus, eine exponentielle Wachstumsphase fehlt (Schröder, unveröff.).

Konidien

Zur Konidiengewinnung wurde *N. crassa* vier Tage auf Horowitz-Konidiationsmedium [Horowitz, 1947] bei Dauerlicht (LL) und einer Temperatur von 25° C kultiviert. Die Konidien wurden dann in sterilem H₂O suspendiert und durch Glaswolle gefiltert. Die Konidienzahl wurde über die Dichte der Konidien bei 480 nm photometrisch bestimmt. Ihre Lagerung erfolgte bei -20° C. Schlafende Konidien wurden von der Mediumoberfläche abgeklopft und konnten so in inaktiver Form geerntet werden. Keimende Konidien wurden nach 0.25 - 8 h Schüttelkultur (siehe Myzelium) bei 25° C und Dauerlicht durch Zentrifugation geerntet.

Myzelium

Das Myzelium wurde in Flüssigkulturen unter Verwendung von LL-Medium herangezogen. LL-Medium besteht aus 2 % Saccharose und 2 % "Vogel-Salzen" [Vogel,

1956] mit erhöhter Calciumkonzentration (1 mM). Zur Anzucht geringer Mengen von Myzel wurden Petrischalen (ϕ 9 cm, 20 ml LL-Medium) mit 1.2×10^9 Konidien angeimpft und bei Dauerlicht und 25°C für 24 h (wt, bdA, acon-2) oder 48 h (cr-1) kultiviert. Für große Mengen, z. B. zur Isolation von HSP70, wurden Schüttelkulturen in Fernbachkolben (1 l LL-Medium) angesetzt. Diese Kulturen wurden auf einem Schüttler ständig geschüttelt. Alle anderen Bedingungen waren wie die der Petrischalenkulturen. Die Flüssigkulturen wurden durch Filtration geerntet und bis zur weiteren Behandlung bei -20° C gelagert.

Lufthyphen

Zur Gewinnung von Lufthyphen wurde Horowitz-Konidiationsmedium [Horowitz, 1947] mit wt-Konidien angeimpft. Nach 30 - 48 h Wachstum im Dauerlicht (LL) bei einer Temperatur von 25° C wurden verschieden alte Lufthyphen zu verschiedenen Zeiten der Konidiation geerntet.

2.3 Kultivierung der Ratten Gliom (C6) Zellen

Ratten Gliom (C6) Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium; Flow) mit 10 % fötalem Kälberserum (Gibco) bei 37° C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 10 % CO₂/ 90 % Luft kultiviert. Zum passagieren und das Ansetzen der Versuchskulturen wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS durch 0.2 %iges Trypsin / EDTA abgelöst. Je 10⁵ Zellen wurden in Petrischalen (ϕ 35 mm) für 3 Tage kultiviert. Für die Applikation erhöhter Temperatur wurden die Zellkulturen in ein auf 44° C vorgeheiztes Wasserbad überführt und nach einer Aufwärmzeit von 5 min für weitere 30 min inkubiert. Die Temperaturmessung erfolgte im Wasserbad. Zur Exposition verschiedener Substanzen wurden diese im Kulturmedium gelöst und für 1 h appliziert. Vor der Analyse von HSP70 wurde die jeweils angegebene Erholungszeit bei 37° C gewährt.

2.4 Hitzeschock, cAMP und [³⁵S]-Methionin

Hitzeschock

Für die Applikation erhöhter Temperatur wurden die Flüssigkulturen in ein entsprechend vorgeheiztes Wasserbad überführt und nach einer Aufwärmzeit von 15 min für die jeweils vorgesehene Versuchszeit inkubiert. Die Temperaturmessung erfolgte im Wasserbad.

cAMP

Zur Behandlung mit cAMP wurden die Kulturmedien mit 2 mM cAMP (Sigma) oder 20 µM 8-Brom-cAMP (Sigma) versetzt. Die entsprechenden Stämme wurden während ihres ganzen Entwicklungszyklus mit dem Nukleotid kultiviert. Insbesondere auch während der vorherigen Bildung der Konidien der entsprechenden Stämme [Cruz *et al.*, 1988].

[³⁵S]-Methionin

Die radioaktive Markierung in einem bestimmten Zeitraum neu synthetisierter Proteine wurde in Kulturmedien mit 5 µCi [³⁵S]-Methionin (Amersham) pro ml Kulturmedium für den jeweils angegebenen Zeitraum durchgeführt. Nach Ernte und Waschen des Myzels wurden die Zellen homogenisiert (Gesamthomogenat) und die Radioaktivität (cpm) der TCA-präzipitierbaren Proteine in einem Szintillationszähler (Beckman LS 8000) bestimmt [Mans & Novelli, 1961]. Zur Bestimmung der Aufnahme von [³⁵S]-Methionin in die Zelle wurde die Gesamtradioaktivität (cpm) im Zellhomogenat im Szintillationszähler gemessen. Bei diesen Versuchen entspricht jeder Meßpunkt dem Mittelwert aus drei unabhängigen Proben die in Triplikaten analysiert wurden (n = 9).

2.5 Isolierung von Zellbestandteilen

Gesamthomogenat

Zur Isolation von HSP70 wurde das Myzel aus den Kulturen in Fernbachkolben unter flüssigem Stickstoff bis zur vollständigen Pulverisierung gemörsert, anschließend mit Puffer A (20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) plus 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt und 2 h bei 48000 x g zentrifugiert (Sorvall RC 28S, SS 34). Der resultierende Überstand wurde dann durch einen Membranfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 595) filtriert und der Isolationsroutine zugeführt [Fracella *et al.*, 1993].

Die zur immunologischen Analyse von HSP70 im Western Blot vorgesehenen Proben wurden in Laemmli-Probenpuffer [Laemmli, 1970] aufgenommen, durch Ultraschall (10 x 1 s) aufgeschlossen und 5 min gekocht. Zur Analyse im ELISA wurden die Proben in Puffer A plus 10 mM Na₂ATP unter ständiger Kühlung durch Ultraschall aufgeschlossen.

Zellkerne und Cytoplasma

Die Isolation von Zellkernen aus Myzel wurde nach der von Loros und Dunlap (1991) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Temperatur während der gesamten Isolation betrug 4° C. 0.5 - 1 g Myzel wurde mit Glasperlen (ϕ 1 - 2 mm) und Kernisolationspuffer (1 M Sorbitol, 7 % [wt/vol] Ficoll, 20 % [vol/vol] Glycerol, 5 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 1 % [vol/vol] Triton X-100, pH 7.5) in einer Zelmühle (bead beater, Jürgens) durch drei 45 s Pulse aufgeschlossen. Das Homogenat wurde dann 10 min bei 1500 x g zentrifugiert (Labofuge, Heraeus), der Überstand erneut 10 min bei 15000 x g zentrifugiert (Labofuge, Heraeus). Das Pellet enthielt die angereicherten Kerne und wurde bei -20° C gelagert. Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert (1 h, 48000 x g; Sorvall RC 28S, SS 34) und wird im Folgenden als cytoplasmatische Fraktion bezeichnet. Die Reinheit der Kernfraktion wurde elektrooptisch und in der "run off" -Transkription überprüft (Kallies & Helmboldt,

unveröff.; Mulisch, unveröff.). Zur weiteren Analyse wurden die Kerne in Laemmli-Probenpuffer [Laemmli, 1970] aufgenommen, durch Ultraschall (10 x 1 s) aufgeschlossen und 5 min gekocht. Die cytoplasmatische Fraktion wurde ebenfalls mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht.

2.6 Isolierung und Sequenzierung von HSP70

Das Haupt-HSP70 aus Myzelium von *N. crassa* wurde in Anlehnung an eine von Welch und Feramisco (1985) für Säugerzellen entwickelte Methode in zwei Hauptschritten, durch aufeinanderfolgende DEAE-Anionenaustausch- und ATP-Affinitäts-Chromatographie, isoliert [Fracella *et al.*, 1993].

In Zusammenarbeit mit Cunshuan Xu aus unserer Arbeitsgruppe wurde eine sehr ähnliche Methode auch erfolgreich zur Isolation von HSP70 aus Ratten Gliom (C6) Zellen angewandt [Xu, 1995].

Zur Affinitätsreinigung geringer Mengen von HSP70 aus dem Myzel von *N. crassa* in einem Schritt wurden 5 mg der selbst hergestellten polyklonalen Anti-HSP70-Ak an 0.6 g einer CNBr-aktivierten Agarose-Matrix (Sigma) nach Herstellerangaben gekoppelt (Gelbettvolumen der Anti-HSP70-Ak Affinitätssäulen = 2 x 1 ml). Zellextrakte, aus denen HSP70 mittels Anti-HSP70-Ak Affinitäts-Chromatographie isoliert werden sollte, wurden mit Waschpuffer (0.5 M NaCl, 0.02 % NaN₃ in 20 mM PBS, pH 7.4) im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und auf die mit Waschpuffer äquilibrierte Affinitätssäule aufgetragen. Darauf wurde mit 5 ml Waschpuffer gespült und anschließend mit 3 ml Elutionspuffer (0.2 M Glycin, pH 2.7) gebundene Proteine eluiert. Die saure Elutionsfraktion wurde dann mit Tris (1.5 M) neutralisiert.

Zur Mikrosequenzierung wurden 5 µg (70 pM) des gereinigten HSP70 zunächst in der eindimensionalen 10 % SDS-PAGE [Laemmli, 1970] getrennt und anschließend in der Trans-Blot-Cell (Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad) übertragen und mit Coomassie Blau (Serva) gefärbt [Towbin *et al.*, 1979]. Die HSP70 enthaltende Bande wurde dann ausgeschnitten und direkt in der Reaktorkam-

mer des Dual - Phase Proteinsequenzierungsautomaten (Knauer, Model 816 E) plaziert. In der Reaktorkammer wurden die N-terminalen Aminosäuren (AS) durch mehrere Schritte automatisch, sequentiell nach Edman (1950) abgebaut [zur Übersicht siehe Fischer *et al.*, 1988; Fischer & Reimann, 1990]. Die abgespaltenen AS lagen schließlich als Phenylthiohydantoin (PTH) -Derivate vor. Da die 20 möglichen AS-PTH-Derivate im UV-Bereich absorbieren, konnten sie durch Chromatographie mit einer Reversed-Phase-Säule im Vergleich zu AS-PTH-Standards identifiziert werden. Die untere Nachweisgrenze lag bei 1 pM in der Narrowbore-HPLC. Cystein kann durch die angewandte Sequenzierungsmethode nicht detektiert werden. Auf die mögliche Existenz eines Cystein an einer bestimmten Position kann nur indirekt aufgrund des Fehlens eines Peaks geschlossen werden. Zur eindeutigen Identifizierung müßte auf eine andere Methode zur Sequenzierung zurückgegriffen werden.

2.7 Herstellung polyklonaler Anti-HSP70 Antikörper

Zwei Kaninchen wurden mit HSP70 immunisiert. Dazu wurden 240 µg gereinigtes, lyophilisiertes HSP70 in 0.5 ml PBS pH 7.4 aufgenommen und mit 1.5 ml vollständigem Freundschens Adjuvans (mit mycobakteriellen Anteil) vermischt. Eine Woche nach Entnahme von etwa 20 ml Blut (zur Gewinnung des Präimmuserums) wurde jedem Kaninchen 4 Wochen lang in wöchentlichem Abstand 0.25 ml der Antigenmischung, verteilt auf zwei Stellen der Rückenregion, subcutan injiziert. Eine Woche nach der letzten primären Injektion wurden 10 ml Blut entnommen und das gewonnene Serum durch Dot- und Western Blotting bzw. ELISA auf die Anwesenheit spezifischer Antikörper überprüft. Durch sekundäre Injektionen ("boosten"), bei denen HSP70 (die Hälfte der Menge aus den Primärinjektionen) in PBS und unvollständigem Freundschens Adjuvans (ohne mycobakteriellen Anteil) injiziert wurde, konnte die Immunisierung bei Bedarf wieder aufgefrischt werden. Dabei zeigte sich, daß der Titer spezifischer Ak im Serum zunahm je länger die Tiere mit dem Ag in Kontakt waren.

Blut wurde den Kaninchen über die Marginalvene des Ohres entnommen. Nach einstündiger Gerinnungszeit bei Raumtemperatur wurde das Blut zur vollständigen Agglutination für etwa 6 h bei 4° C inkubiert. Verbleibende Erythrozyten wurden durch Zentrifugation (1000 x g, 10 min; Labofuge, Heraeus) entfernt. Anschließend wurde der Überstand (das Präimmun- bzw. Antiserum) abgenommen, aliquotiert und bei -80° C gelagert.

2.7.1 Affinitätsreinigung der Anti-HSP70-Antikörper

Zur Affinitätsreinigung spezifischer Anti-HSP70-Ak aus den Seren wurden 1.5 mg (21 nM) aus 18 l *N. crassa* -Schüttelkultur isoliertes HSP70 an 60 mg einer CNBr-aktivierten Agarose-Matrix (Sigma) nach Herstellerangaben gekoppelt (Gelbettvolumen der HSP70 Affinitätssäule = 200 µl).

10 µl Serum wurden mit 90 µl Waschpuffer (0.5 M NaCl, 0.02 % NaN₃ in 20 mM PBS, pH 7.4) verdünnt und auf die mit Waschpuffer äquilibrierte HSP70-Affinitätssäule aufgetragen. Darauf wurde mit 1 ml Waschpuffer gespült und anschließend mit 1 ml Elutionspuffer (0.2 M Glycin, pH 2.7) gebundene Ak eluiert. Die saure Elutionsfraktion wurde dann mit Tris (1.5 M) neutralisiert.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Extrakten oder Elutionsfraktionen aus chromatographischen Trennungen wurde nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Proteinbestimmung nach Bradford ist störanfällig gegenüber höheren Konzentrationen von SDS und einigen reduzierenden Substanzen. Waren Proben mit solchen Substanzen versetzt, wurde die Proteinbestimmung nach Neuhoff *et al.* (1979) durchgeführt.

2.8.2 Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Trennung von Proteinen aus Gesamthomogenaten, isolierten Zellbestandteilen oder Fraktionen aus der Chromatographie aufgrund ihrer Größe wurde die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-PAGE nach Laemmli (1970) angewandt. Eine optimale Trennung von Proteinen mit einer Masse von 50 - 90 kDa wurde in 1 mm starken Trenngelen mit 8 und 10 % Acrylamid/Bisacrylamid erzielt. War eine Trennung von Proteinen innerhalb eines größeren Gewichtsbereiches erforderlich, wurden Gradiententrenngele mit 7.5 - 15 % Acrylamid/Bisacrylamid eingesetzt. Das Sammelgel hatte in allen Fällen eine Konzentration von 5 % Acrylamid/Bisacrylamid. Die verwendete Acrylamid/Bisacrylamid (Serva) Lösung hatte eine Konzentration von 29 : 0.8 % (wt/wt/vol).

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde nach der von O'Farrel (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. In der ersten Dimension wurde eine isoelektrische Fokussierung (IEF) in Rundgelen (\varnothing 2 mm) mit 1 % Ampholinen (pH 2 - 11, Serva) und 4 % Ampholinen (pH 5 - 7, Serva) durchgeführt. In der zweiten Dimension wurden die fokussierten Proben in den Rundgelen auf 2 mm starken

Trenngelen mit 8 oder 10 % Acrylamid/Bisacrylamid nach ihrer Größe getrennt (SDS-PAGE nach Laemmli, 1970).

Gele mit [³⁵S]-Methionin markierten Proteinen wurden nach der Elektrophorese entweder direkt getrocknet und auf einem Röntgenfilm (X-OMat AR5, Kodak) bei -70° C exponiert (Autoradiographie), oder die radioaktive Strahlung wurde vorher noch durch eine Behandlung der Gele mit PPO nach Bonner & Laskey (1974) in eine intensivere Fluoreszenzstrahlung umgesetzt (Fluorographie).

2.8.3 Western Blotting und Immunodetektion

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus der ein- oder zweidimensionalen PAGE auf eine PVDF- (Bio-Rad) oder Nitrozellulosemembran (BA83, Schleicher & Schüll) wurde nach Towbin *et al.* (1979) und Burnette (1981) in einer Trans-Blot-Cell (Bio-Rad) durchgeführt.

Zur Immunodetektion von Proteinen (meist HSP70) auf Western Blots wurden restliche Bindungsstellen auf der Membran direkt nach dem Transfer durch 30 min Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in PBST (0.2 % Tween20, 0.02 % NaN₃ in PBS, pH 7.4) blockiert. Nun wurden die Blots für 1 h mit dem Primärantikörper (für *N. crassa* HSP70 = affinitätsgereinigter, polyklonaler Anti-HSP70-Ak, 1 : 1000 verdünnt in PBST; für andere Ag = entsprechend anderer Ak und eventuell andere Verdünnung und Inkubationszeit) auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Blots dreimal je 5 min mit PBST gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Sekundärantikörper (alkalische Phosphatase (AP; EC 3.1.3.1)-Ak Konjugat spezifisch für die Fc-Region von IgG von Kaninchen oder Maus (Sigma) in der Regel 1 : 5000 verdünnt mit PBST) auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschritte wie oben und zusätzlich einer mit Puffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ in 100 mM Tris-HCl, pH 9.7). Der Enzym-Immunkomplex wurde mit 40 mM 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT, Biomol) und 40 mM 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP, Biomol) in Puffer 3 detektiert. Nach ausreichender Farbentwicklung (10 - 60 min)

wurde die Reaktion mit Stop-Lösung (100 mM EDTA) gestoppt. In Abb. 2.1 ist das Prinzip Immundetektion auf Western Blots in einer übersichtlichen Form dargestellt. Dieses Prinzip ist identisch mit der Immunodetektion im indirekten Antikörperfang-ELISA.

Abb. 2.1: Prinzip der Immunodetektion auf Western Blots und im indirekten Antikörperfang-ELISA.

2.8.4 Antikörper

prim. Antikörper

- 4A I - XII = selbst hergestellte polyklonale Kaninchen Anti-HSP70-Ak (affinitätsgereinigt), spezifisch gegen das Haupt-HSP70 von *N. crassa* mit konstitutiver und HS-induzierbarer Expression.
- Ab1147 = polyklonaler Kaninchen Anti-SSA1-Ak (Rohserum, Geschenk von Jörg Becker, 1993), spezifisch gegen eine Sequenz von 90 C-terminale AS von SSA1, detektiert in der Hefe hauptsächlich SSA1, erkennt schwach jedoch auch SSA2 - 4.
- H5147 = monoklonaler Maus Anti-HSP70-Ak (Ascites, IgG₁, Sigma), spezifisch gegen HSP70 und HSC72 aus dem Rindergehirn.

SPA 820 = monoklonaler Maus Anti-HSP70-Ak (Ascites, IgG₁, Stressgen, aus der Literatur unter der Bezeichnung N27F3-4 bekannt), spezifisch gegen HSP70 und HSC72 aus HeLa-Zellen.

SPA810AP = monoklonaler Anti-HSP70-Ak (Ascites, IgG₁, Stressgen, aus der Literatur unter der Bezeichnung C92F3A-5 bekannt), spezifisch gegen HSP70 aus HeLa-Zellen.

A2066 = polyklonaler Kaninchen Anti-Actin-Ak (affinitätsgereinigt, Sigma).

T3526 = polyklonaler Kaninchen Anti-Tubulin-Ak (affinitätsgereinigt, Sigma), spezifisch gegen Microtubuli aus dem Hühnergehirn).

H0148 = monoklonaler Maus Anti-HSP25-Ak (Ascites, IgG₁, Sigma), spezifisch gegen HSP25 aus Truthahnmuskel.

sek. Antikörper

A7434 = polyklonaler Ziegen Anti-Maus IgG-Ak-AP-Konjugat (affinitätsgereinigt, Sigma); spezifisch gegen Fc von Maus IgG.

A3812 = polyklonaler Ziegen Anti-Kaninchen IgG-Ak-AP-Konjugat (affinitätsgereinigt, Sigma) spezifisch gegen Gesamt-IgG von Kaninchen.

2.9 Indirekter HSP70 - ELISA

Bei der Anwendung eines Immunoassays zur Detektion und Quantifizierung von Protein-Ag oder spezifischer Ak in biologischen Proben wird die Fähigkeit von Ak und Ag genutzt, sich gegenseitig zu binden. Die spezifische Bindung des Ak an das Ag erfolgt durch die in den Fab-Fragmenten der Ak liegenden Ag-Bindungsstellen (Paratope). Die Stelle des Ag, an die der Ak bindet, wird als antigene Determinante oder Epitop bezeichnet. Für die Bildung der Ag-Ak-Komplexe sind schwache intermolekulare Wechselwirkungen verantwortlich. Diese nichtkovalenten Bindungen werden mit zunehmender räumlicher Annäherung der Bindungspartner stärker und sind folglich abhängig von der Übereinstimmung von Epitop und Paratop. Je besser diese Übereinstimmung ist, desto größer ist die Affinität, d. h. die Bindungsstärke eines Ak. Daher liefert ein Immunoassay nur dann verlässliche Ergebnisse, wenn

erstens der Ak eine hohe Spezifität für das zu messende Ag besitzt und zweitens die chemische Umgebung, in der die Reaktion stattfindet, eine optimale Ausbildung der reversiblen Wechselwirkungen ermöglicht.

Ag oder Ak in biologischen Proben werden in Immunoassays durch die Bestimmung der gebildeten Ag-Ak-Komplexe detektiert und quantifiziert. Dafür wird einer der beiden Reaktionspartner direkt oder indirekt (sek. Ak) mit einem Marker (Label) gekennzeichnet. Diese Label können Radioisotope, Enzyme, fluoreszierende oder lumineszierende Moleküle sein, also alle Verbindungen, die sich aufgrund ihrer physikalischen oder chemischen Eigenschaften noch in sehr geringen Konzentrationen nachweisen lassen.

Bei den Enzymimmunoassays (EIA oder ELISA) werden Enzyme als Marker eingesetzt [Porstmann *et al.*, 1985]. Eines der am häufigsten und auch von mir verwendeten Enzyme ist alkalische Phosphatase (AP; EC 3.1.3.1). Sie hat ihr pH-Optimum bei 9.7. Als lösliches Substrat wird *p*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP) eingesetzt und zu dem gelben Farbstoff *p*-Nitrophenol umgesetzt. Die Farbintensität wird bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt [Snyder *et al.*, 1972].

ELISA ist also eine Methode zur schnellen Detektion und der exakten Quantifizierung von Ag oder Ak in Lösungen mit Hilfe von Enzymen und wird meist in sog. Mikrotiterplatten durchgeführt. Dieses gewährleistet einen hohen Probendurchsatz in kürzester Zeit. Es gibt eine Fülle verschiedener ELISA-Variationen für unterschiedliche Zwecke [Harlow & Lane, 1988; Bergmeyer, 1986]. Kommerziell ist kein ELISA-System für HSP70 erhältlich. Zur Detektion von HSP70 in Extrakten von *N. crassa* und Säugerzellen wurden daher indirekte Antikörperfang-ELISA-Systeme entwickelt. Die relativ hohe Menge an HSP70 in den Zellen (~0.5 - 3 % der Gesamtproteinmenge in nicht gestreßten und 3 - 6 % in gestreßten Zellen) verleihen dem einfachen, indirekten ELISA eine ausreichende Sensitivität. Das Reaktionsprinzip der Immunodetektion ist identisch mit dem aus dem Western Blot (siehe Abb. 2.1), allerdings läuft die Reaktion hier an der Polystyrolmatrix in den Kavitäten der Mikrotiterplatten ab, und das Substrat zur Detektion des Enzym-Immunkomplexes ist

ein anderes (pNPP). Im ersten Schritt wurde im indirekten ELISA das Ag an die Matrix gebunden. Die insgesamt relativ geringe Proteinbindungsfähigkeit (Coating-Effizienz) der Matrix liegt bei ~300 ng Protein pro cm² und ist die die Sensitivität begrenzende Größe. Deshalb, und zur absoluten Quantifizierung anhand einer Eichkurve, ist es wichtig, diese Bindungskapazität der verwendeten Matrix genau zu kennen.

2.9.1 Coating-Effizienz

Bedingungen wie die Proteinkonzentration, pH, Ionenstärke, Inkubationszeit und Temperatur beeinflussen die Effizienz der Bindung von Proteinen an die Polystyrolmatrix in den Kavitäten der Mikrotiterplatten. Die Coating-Effizienz für HSP70 oder Proteine aus den im ELISA zu testenden Zellextrakten wurde nach der von Sorensen und Brodbeck (1986) beschriebenen Methode bestimmt. Dazu wurde eine Proteinbestimmung mittels Bicinchonin-Säure (BCA, Pierce) [Smith *et al.*, 1985] direkt in den Mikrotiterplatten durchgeführt. Diese Proteinbestimmung ist sehr genau und mit einer unteren Nachweisgrenze von 50 ng Protein auch sehr empfindlich (siehe Eichkurve im Insert in Abb. 2.2). Abb. 2.2 zeigt die Beziehung zwischen der pro Kavität zugefügten und der tatsächlich gebundenen Proteinmenge. An die Daten wurde eine einfache Sättigungskurve angepaßt.

*Abb. 2.2: Coating-Effizienz der Kavitäten der Mikrotiterplatten als Funktion der zugefügten Proteinmenge. Die Kavitäten wurden mit Proteinextrakten aus Myzelium von *N. crassa* inkubiert, und gebundenes Protein mit der BCA-Methode (Pierce) bestimmt. Die durchgezogene Kurve zeigt eine Sättigungskurve, die an die Meßpunkte angefitet wurde. Die gestrichelten Linien zeigen das 95 %ige Vertrauensintervall (n = 3). Im Insert ist die Eichkurve der Proteinbestimmung mit BCA gezeigt (n = 3).*

2.9.2 ELISA-Durchführung (Ag-Detektion)

*Detektion und Quantifizierung von HSP70 in Extrakten von *N. crassa* und Säugerzellen (Ratten C6-Gliom-Zellen)*

Proben wurden in Coating-Puffer (50 mM Na₂CO₃, 50 mM NaHCO₃, pH 9.5) auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe von HSP70 zwischen 0 und 0.5 µg/ml in Coating-Puffer angesetzt. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten (Maxisorb, Nunc) wurden 100 µl der

Proben und der HSP70-Verdünnungsreihe in die Kavitäten pipettiert. Die abgedichtete Platte wurde bei 4° C über Nacht (~18 h) inkubiert und anschließend für 1 h bei 25° C mit 200 µl Block/Assay-Puffer (0.05 % Pferde-IgG, 1 % BSA, 0.02 % NaN₃, 0.05 % Tween20 in PBS, pH 7.4) blockiert. Danach wurde jede Kavität mit 100 µl Primärantikörper (affinitätsgereinigter, polyklonaler Anti-HSP70-Ak bzw. monoklonaler Anti-HSP70-Ak (H5147, Sigma) in Block/Assay-Puffer 1 : 1000 verdünnt) befüllt und 1 h bei 25° C inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 200 µl PBST (0.05 % Tween20, 0.02 % NaN₃ in PBS) gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG- bzw. Anti-Maus IgG-AP Konjugat, 1 : 2000 verdünnt mit Block/Assay-Puffer) 1 h bei 25° C inkubiert. Nach erneutem Waschen wie oben und einem weiteren Waschschriff mit 200 µl Substrat-Puffer (50 mM MgCl₂ in 1 M DEA, pH 9.7) wurde die Aktivität der gebundenen Phosphatase durch Konvertierung von 100 µl para-Nitrophenylphosphat (pNPP, Biomol) in Substrat-Puffer (1 mg/ml) zu einem farbigem Produkt (OD_{max} = 405 nm) gemessen. Nach ausreichender Farbentwicklung (0.5 - 2 h) wurde die Reaktion mit 50 µl Stop-Lösung (100 mM EDTA) gestoppt. Die Intensität der Farbe wurde am Computer-gestützten Mikrotiterplatten-Photometer (SLT) gemessen. Sie ist nach Hintergrundkorrektur direkt proportional zur HSP70-Menge in den entsprechenden Kavitäten. Die HSP70-Menge ist in Prozent der Kontrolle oder als absoluter Wert in ng HSP70/µg Gesamtprotein angegeben. Jeder Einzelwert ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Proben.

Typische Standardkurve: N. crassa

Zur Quantifizierung von HSP70 in Proben von *N. crassa* wurde eine Standardkurve mit HSP70 erstellt. Dazu wurde isoliertes HSP70 in mehreren Verdünnungen (0 - 2 µg /ml; 0 - 28 nM) im ELISA detektiert. Die untere Nachweisgrenze für HSP70 liegt bei 6 ng /ml (85.7 pM). Die resultierenden Extinktionswerte wurden gegen die Konzentration graphisch dargestellt. An die Meßpunkte wurde eine Sättigungsfunktion angepaßt (Abb. 2.3).

Abb. 2.3: Typische Standardkurve mit isoliertem HSP70 aus N. crassa. Die durchgezogene Linie zeigt eine Sättigungskurve angepaßt an die Meßpunkte. Die gestrichelten Linien geben das 99 %ige Vertrauensintervall an.

Typische Standardkurve: Ratten Gliom (C6) Zellen

Die Standardkurve zur Quantifizierung von HSP70 in Proben von Ratten Gliom (C6) und anderen Säugerzellen wurde mit kommerziell erhältlichen HSP70 (SPA750; Stressgen) erstellt. Eine Überprüfung dessen Reinheit durch Coomassie-Blau Färbung einer zweidimensionalen gelelektrophoretischen Trennung ergab einen Anteil von etwa 80 % HSC72 und 20 % HSP70 (nicht gezeigt). Die Immunodetektion mit Anti-HSP70-AK (H5147, Sigma) im 2D-Western Blot zeigte eine hohe Affinität der Ak zum kleinen Anteil des HS-induzierbaren HSP70 und eine relativ geringe Affinität zum großen Anteil des konstitutiven HSC72 (Insert in Abb. 2.4).

HSP70 (SPA750, Stressgen) wurde in mehreren Verdünnungen (0 - 500 ng/ml; 0 - 7 nM) im ELISA detektiert. Die untere Nachweisgrenze für HSP70 liegt bei 2 ng/ml (28 pM). Die resultierenden Extinktionswerte wurden gegen die Konzentration graphisch dargestellt. An die Meßpunkte wurde eine klassisch logistische Funktion angepaßt (Abb. 2.3). Aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten der Anti-HSP70-Ak (H5147, Sigma) zum HSC70 bzw. HSP70-Anteil im kommerziellen HSP70 (SPA750, Stressgen) ist eine absolute Quantifizierbarkeit anhand der erstellten Standardkurve nur bedingt möglich.

Abb.2.4: *Typische Standardkurve mit kommerziell erhältlichem, isoliertem HSP70 aus Rindergehirn (SPA750, Stressgen). Die durchgezogene Linie zeigt eine klassisch logistisch sigmoide Kurve angepaßt an die Meßpunkte. Die gestrichelten Linien geben das 99 %ige Vertrauensintervall an. Im Insert ist ein zweidimensionaler Western Blot des mit Anti-HSP70-Ak (H5147, Sigma) detektierten HSP70 aus Rindergehirn gezeigt (heller Pfeil = konstitutives HSC72; dunkler Pfeil = induzierbares HSP70).*

2.9.3 ELISA-Durchführung (Ak-Detektion)

Detektion spezifischer Anti-HSP70-Ak in den Seren der immunisierten Kaninchen

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurden 100 μl isoliertes HSP70 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Coating-Puffer) in die Kavitäten pipettiert. Die abgedichtete Platte wurde wie oben inkubiert und anschließend blockiert. Danach wurden 100 μl der zu testenden Seren (Präimmunserum, Antiseren) wie oben verdünnt, in die Kavitäten pipettiert und inkubiert. Anschließend wurde wie oben gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG-AP Konjugat, Sigma) inkubiert. Nach dem zweiten Waschen wie oben wurde die Aktivität der gebundenen alkalischen Phosphatase wie oben bestimmt. Die gemessene Intensität der Farbe ist nach Hintergrundkorrektur direkt proportional zur spezifischen Affinität aller Anti-HSP70-Ak der Seren (Avidität) in den entsprechenden Kavitäten. Die Avidität der Anti-HSP70-Ak ist in der absoluten $\text{OD}_{405/690 \text{ nm}}$ angegeben. Jeder Einzelwert ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Proben.

2.10 Mathematische und statistische Methoden

Die Daten in vielen Versuchen (wenn angegeben) zeigen das jeweilige arithmetische Mittel aus n unabhängigen Versuchen. Ist $n > 2$ ist oft zusätzlich die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken angegeben.

Die ermittelten Meßwerte der Bindung von Proteinen an die Polystyrolmatrix der Mikrotiterplatten ($a = 410.85$ und $b = 431.31$) und die Detektion der Konzentrationsreihe (Eichkurve) von HSP70 (isoliert aus *N. crassa*, $a = 42.63$ und $b = 0.45$) folgten einer einfachen Sättigungskurve.

$$\left[y = \frac{a \cdot x}{b + x} \right]$$

Die Eichkurve der Proteinbestimmung nach der BCA-Methode (Pierce) in der Mikrotiterplatte ($X50 = 503.77$, $K = 0.0019$, $Max = 0.45$, $Min = -0.17$) und die Meßwerte der Detektion der Konzentrationsreihe (Eichkurve) von HSP70 (SPP 750, Stressgen; $X50 = 11.12$, $K = 0.19$, $Max = 2.61$, $Min = -0.29$) folgten einem logarithmisch sigmoiden Kurvenverlauf.

$$\left[y = Min + \frac{(Max - Min)}{\left(1 + \exp^{(-k \cdot (x - x50))}\right)} \right]$$

Die Funktionen wurden mit dem Computerprogramm FigP (BioSoft) an die Meßwerte der Eichkurven angepaßt. Nach Umformung zu

$$\left[x = \frac{b \cdot y}{a - y} \right] \quad \text{und}$$

$$\left[x = \frac{\ln\left(\left(\frac{Max - Min}{y - Min}\right) - 1\right)}{-k} + x50 \right]$$

läßt sich die gemessene Extinktion einer unbekanntem Probe direkt in eine Mengeneinheit umrechnen.

3 Ergebnisse

3.1 HSP70 aus *N. crassa*

Das Haupt-HSP mit einem Molekulargewicht von ~70 kDa aus hitzegeschocktem (1 h, 45° C) exponentiell wachsendem Myzelium von *N. crassa* wurde in Anlehnung an eine von Welch und Feramisco (1985) für Säugerzellen entwickelte Methode durch aufeinanderfolgende DEAE-Anionenaustausch- und ATP-Affinitäts-Chromatographie in nahezu vollständiger Homogenität aufgereinigt [Fracella *et al.*, 1993].

Abb. 3.1: Fluorogramm des 10 % SDS-PAGE der Proteine aus hitzegeschocktem Myzelium von *N. crassa* aus Fraktionen der aufeinanderfolgenden Schritte der Isolation [aus Fracella *et al.*, 1993]. Rohextrakt unbehandelter (1) und hitzegeschockter (1 h, 45° C) Zellen (2); 80-140 mM NaCl-Elutionsfraktion der DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie von hitzegeschockten Extrakten mit dem größten Anteil an HSP70 (3); Elutionsfraktion der ATP-Affinitäts-Chromatographie der DEAE-Fraktion aus 3 (4). Pro Spur wurden jeweils 10^4 cpm aufgetragen. HSP70 ist durch die Pfeilspitze gekennzeichnet. Die MW der vorgefärbten Standardproteine (Sigma, SDS-7B) sind in kDa angegeben.

In Coomassie Blau gefärbten Gelen eindimensionaler SDS-PAGE wurde das isolierte Protein als eine Bande mit einem Molekulargewicht von 69 kDa detektiert (nicht gezeigt). Auch das Fluorogramm der 10 % SDS-PAGE einer Isolationsroutine mit [³⁵S]-Methionin markierten Proteinen bestätigt die Reinheit des Isolates (Abb. 3.1; Spur 4). Des weiteren zeigt Abb. 3.1 das Proteinprofil der Rohextrakte von unbehandeltem (Spur 1) und hitzegeschocktem Myzelium (Spur 2) sowie die Elutionsfraktion der DEAE - Anionenaustausch - Chromatographie (80 - 140 mM NaCl; Spur 3) der Isolationsroutine mit [³⁵S]-Methionin markiertem Proteinextrakt aus hitzegeschocktem Myzelium.

Zur Analyse der gesamten HSP70-Familie von *N. crassa* wurden Rohextrakte von unbehandeltem und hitzegeschocktem Myzelium direkt an ATP-Affinitäts-säulen chromatographiert. Alle bisher untersuchten Mitglieder der HSP70-Familie verschiedener Organismen besitzen eine ATP-Bindungsstelle [McKay *et al.*, 1994] und binden daher an die ATP-Agarosematrix der Affinitätssäule. Die HSP70-Familie von *N. crassa* enthält insgesamt mindestens sieben ATP-bindende Mitglieder. Vier Mitglieder werden auch in Abwesenheit von Streß synthetisiert (Abb. 3.2 a), die drei weiteren sind nur durch Streß induzierbar (Abb. 3.2 b). Die vier konstitutiv gebildeten Mitglieder werden durch einen HS verstärkt synthetisiert. Zu ihnen gehört auch das isolierte Haupt-HSP70 von *N. crassa*. Es hat einen Anteil von etwa 80-90 % am Gesamt-HSP70 und einen *pI* um pH 5.2. Die nur durch Streß induzierbaren Mitglieder der HSP70-Familie haben etwas alkalischere *pI* im Bereich von pH 5.5. Die meisten HSP-70-Homologe anderer Organismen haben ähnliche *pI* (um pH 4.7 - 6.3) [Vierling, 1991; Nover, 1991]. Auch für andere HS-induzierbare Vertreter sind etwas alkalischere *pI* als für die konstitutiven beschrieben [Pelham, 1986]. Möglicherweise stellen einige der Proteinspots verschieden phosphorylierte Isoformen desselben Proteins dar. Eine Coomassie Blau Färbung der in Abb. 3.2 a, b dargestellten Fluorogramme zeigte einige weitere Proteine (nicht gezeigt). Diese wurden durch die Anwendung der gesamten Isolationsroutine eliminiert (Abb. 3.2 c). Die Gesamtmenge ATP-bindender Proteine aus Extrakten von hitzegeschocktem Myzelium ist ~40 - 60 % höher als in Extrakten unbehandelter Zellen. Das ist hauptsächlich auf die gesteigerte HSP70-Synthese zurückzuführen. Das Fluorogramm der zweidimensionalen

Auftrennung des Isolates bestätigt die Reinheit des isolierten HSP70 aus der eindimensionalen PAGE. Neben dem Haupt-HSP70 waren nur noch Spuren anderer konstitutiver HSP70-Mitglieder vorhanden (Abb. 3.2 c).

Abb. 3.2: Fluorographie der zweidimensionalen PAGE der Elutionsfraktionen der Extrakte von unbehandeltem (a) und hitzegeschocktem (1 h 45° C) Myzelium (b) aus der direkten ATP-Affinitäts-Chromatographie. (c) Durch die gesamte Isolationsroutine gereinigtes HSP70 [aus Fracella et al., 1993]. Die einzelnen Mitglieder der HSP70-Familie sind durch Pfeile gekennzeichnet. Horizontal: IEF; Vertikal: 10 % SDS-PAGE, die MW der vorgefärbten Standardproteine (Sigma, SDS-7B) sind in kDa angegeben.

Zur absoluten Klärung der Identität des isolierten Proteins wurde es ansequenziert. Die aminoterminalen AS ist Alanin. Die ersten 54 N-terminalen AS konnten identifiziert werden und wurden mit korrespondierenden Regionen der HSP70 Consensus-Sequenz [Nover, 1991] und der HSP70-Sequenz anderer Organismen in der EMBL Protein-Datenbank (Swiss-Prot) verglichen (Abb. 3.3). Die vom *Drosophila melanogaster* HSC71-Gen [Perkins et. al., 1990] abgeleitete Proteinsequenz hat mit 87 %iger Identität die höchste Homologie zur HSP70-Sequenz von *N. crassa*. Im Vergleich zu den Sequenzen der Hefe HSP70-Familie (SSA1-4) ist eine geringere Gesamthomologie vorhanden. Interessanterweise haben SSA1 und 2 aber drei AS

(Asparaginsäure, Arginin und Phenylalanin an den Positionen 27, 28 und 44 vom Methionin-Terminus, in Abb. 3.3 unterstrichen und fett dargestellt) in identischen Positionen wie *N. crassa*, welche von der HSP70-Consensus-Sequenz abweichen. Asparaginsäure und Arginin an Position 27 und 28 stimmen ferner mit denen von SSA4 und einigen Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, Petunien und Mais) überein. Ein Sequenzvergleich der 30 kDa HSP zeigte eine höhere Homologie zwischen *N. crassa* und Hefe und einigen Pflanzenarten, während *Drosophila* und andere Tierspezies weniger identische AS aufwiesen [Plesofsky-Vig & Brambl, 1990; Plesofsky-Vig *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1993]. Eine neuere Arbeit von Boorstein *et al.* (1994) zeigt für die cytoplasmatischen SSA1-4 der Hefe neben einer nahen Verwandtschaft zu HSP70 verschiedener Pflanzen auch eine Verwandtschaft zu *Drosophila*.

Innerhalb der cytoplasmatischen Vertreter der Hefe HSP70-Familie (SSA1-4) hat das isolierte Haupt-HSP70 von *N. crassa* die höchste Gesamthomologie zu SSA1 und SSA4 (83 %ige Identität), die zweithöchste zu SSA2 (81 %ige Identität) und die niedrigste zu SSA3 (54 %ige Identität). Zu dem im ER lokalisierten HSP70-Vertreter KAR2 und einem weiteren konstitutivem HSP70-Vertreter SSB2 besteht eine 68 bzw. 70 %ige Identität. Die abgeleitete Proteinsequenz des kürzlich klonierten und sequenzierten Haupt- hitzeinduzierbaren HSP70-Gens von *N. crassa* [Kapoor *et al.*, 1995] stimmt komplett mit der Sequenz des hier beschriebenen Haupt-HSP70 von *N. crassa* überein.

Abb. 3.3: (Siehe vorherige Seite) *N*-terminale Teilsequenz (54 AS) des Haupt-HSP70 von *N. crassa* im Vergleich zu korrespondierenden Regionen anderer HSP70 [verändert nach Fracella et al., 1993]. Die AS sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt (siehe Kap. 2.1.1). Zum Vergleich der HSP70-Sequenzen 1 bis 25 mit der hypothetischen HSP70-Consensus-Sequenz [Nover, 1991] und der HSP70-Teilsequenz von *N. crassa* sind gleiche AS durch Punkte, fehlende AS durch Striche und unbekannte oder irgendeine der 20 AS durch ein X wiedergegeben. Die ? in der *N. crassa* HSP70-Sequenz stehen für mögliches Cystein an diesen Positionen. Cystein ist mit der benutzten Sequenzierungsroutine nicht direkt detektierbar. Die vier GRP78-Sequenzen enthalten *N*-terminale Erweiterungen (NTE), welche beim Eintritt ins ER abgespalten werden. aa=total amino acids; Da=Dalton; com=comment (f=fragment, na=sequence from nucleic acid, p=sequence from protein); hom=homology with *N. crassa* HSP70 in percent.

01 Dm-HSC70, *D. melanogaster* [Perkins et al., 1990; Craig et al., 1983]; **02 Dm-HSP70** *D. melanogaster* [Ingoila et al., 1980]; **03 Rn-HSC70** *Rattus norvegicus* [Sorger & Pelham, 1987; O'Malley et al., 1985]; **04 Cg-HSC70** *Cricetulus griseus* (Chinese hamster) [Ahmad et al., 1990]; **05 Hs-HSC70** *Homo sapiens* [Dworkiczak & Mirault, 1987]; **06 Hs-HSP70** *H. sapiens* [Voellmy et al., 1985]; **07 Hs-HSP70** *H. sapiens* [Leung et al., 1990]; **08 Hs-HSP70** *H. sapiens* [Hunt & Morimoto, 1985]; **09 Bt-HSC70** *Bos taurus* [DeLuca-Flaherty & McKay, 1990; Flaherty et al., 1990]; **10 Gg-HSP70** *Gallus gallus* [Morimoto et al., 1986]; **11 Mm-HSC70** *Mus musculus* [Giebel et al., 1988]; **12 Mm-HSP70** *Mus musculus* [Zakeri et al., 1988]; **13 At-HSP70** *Arabidopsis thaliana* [Wu et al., 1988]; **14 Ph-HSP70** *Petunia hybrida* [Winter et al., 1988]; **15 Zm-HSP70** *Zea mays* [Rochester et al., 1986]; **16 Nc-HSP70** *N. crassa* [Kapoor et al., 1995]; **17 Sc-SSA1** *Saccharomyces cerevisiae* [Ogden et al., 1984; Slater & Craig, 1989]; **18 Sc-SSA2** *S. cerevisiae* [Slater & Craig, 1989]; **19 Sc-SSA3** *S. cerevisiae* [Boorstein & Craig, 1990b; Martindale et al., 1989; Boorstein et al., 1994]; **20 Sc-SSA4** *S. cerevisiae* [Boorstein & Craig, 1990a]; **21 Sc-SSB2** *S. cerevisiae* [Boorstein et al., 1994]; **22 Sc-KAR2** *S. cerevisiae* [Normington et al., 1989; Rose et al., 1989]; **23 Rn-GRP78** *Rattus norvegicus* [Munro & Pelham, 1986; Chang et al., 1987]; **24 Bs-DNAK** *Bacillus subtilis* [Wetzstein et al., 1990a; Wetzstein et al., 1990b]; **25 Ec-DNAK** *E. coli* [Bardwell & Craig, 1984; Ohki et al., 1986].

3.2 Polyklonale Anti-HSP70 Antikörper

Die Affinität verschiedener kommerziell erhältlicher Anti-HSP70-Ak (H5147, Sigma; SPA810 und SPA820, Stressgen) ist für HSP70 aus Extrakten von *N. crassa* nur sehr gering, oder es treten erhebliche Kreuzreaktionen zu anderen Proteinen auf. Zur immunologischen Detektion von HSP70 aus Zellextrakten von *N. crassa* in Western Blots und zur Entwicklung eines ELISA-Systems wurden daher monospezifische, polyklonale Anti-HSP70-Ak selbst hergestellt. Dazu wurden zwei

Kaninchen mit isoliertem HSP70 immunisiert. Der Titer (die spezifische Affinität und Menge) der Anti-HSP70-Ak in den Seren wurde während des Immunisierungszeitraumes im Enzym-Immunoassay (ELISA) und durch Western Blots beobachtet. Dabei zeigte sich eine stete Zunahme des Titers spezifischer Ak im Serum je länger die Tiere mit dem Ag in Kontakt waren (Abb. 3.4).

Abb. 3.4: Vergleich des Titers spezifischer Anti-HSP70-Ak verschiedener Seren im ELISA. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden mit 25 ng HSP70 beschichtet und mit den Roh-Antiseren (4A I, 4A IV, 4A VIII; 4A XII, Seren vom ersten, vierten, achten und zwölften Boost) bzw. dem Roh-Präimmunserum (P3604) in gleicher Verdünnung inkubiert.

Der Anstieg des Titers beruht neben einem Anstieg der Ak-Menge hauptsächlich auf einer Erhöhung der Ak-Spezifität, der sogenannten "affinity maturation" [Nossal, 1992]. Das Präimmunserum (P3604) wurde vor dem Immunisierungsbeginn gewonnen. Die Antiseren wurden nach dem ersten (4A I; 5 Wochen Ag-Kontakt), dem vierten (4A IV; 6 Monate Ag-Kontakt), dem achten (4A VIII; 14 Monate Ag-Kontakt) und dem zwölften Boost (4A XII; 24 Monate Ag-Kontakt) gewonnen (Abb. 3.4).

Neben der durch fortgesetztes Boosten hervorgerufenen "affinity maturation" wurde die Spezifität der Seren auch durch eine Affinitätsreinigung gesteigert. Zur HSP70-Affinitäts-Chromatographie wurde HSP70 an eine Agarosematrix gekoppelt. Mit Hilfe der HSP70-Affinitätssäule konnten für HSP70 unspezifische Ak eliminiert und monospezifische isoliert werden. Ein Western Blot mit dem Roh-Antiserum (4A XII) und der Wasch- bzw. Elutionsfraktion aus der HSP70-Affinitäts-Chromatographie zeigt eindeutig den Reinigungseffekt (Abb. 3.5). Bei HSP70-Detektionen mit dem Roh-Antiserum sind außer HSP70 und einigen seiner Abbauprodukte (< 70 kDa) auch größere Proteine markiert (Abb. 3.5 a). Die Detektion mit der Waschfraktion der HSP70-Affinitäts-Chromatographie zeigt hier eine Anreicherung der meisten für HSP70 unspezifischen Ak (Abb. 3.5 b). Mit der Elutionsfraktion wurde im wesentlichen nur noch HSP70 detektiert (Abb. 3.5 c). Bei sehr langer Enzymreaktion wurden auch hier noch einige wahrscheinliche Abbauprodukte von HSP70 detektiert. Ein detektiertes ~40 kDa großes Protein konnte durch N-terminale Ansequenzierung eindeutig als Abbauprodukt von HSP70 identifiziert werden (großer Punkt in Abb. 3.5). Die ersten 12 N-terminalen AS (APAVGIDLGTTY) sind identisch mit denen vom Haupt-HSP70 von *N. crassa* [Mohsenzadeh *et al.*, 1994]. Degradationsprodukte von ~40 und ~27-30 kDa wurden auch von Mitchell *et al.* (1985) nach einem ersten Degradationsschritt von HSP70 beschrieben. Das bedeutet ein wichtiges Epitop für die hergestellten Anti-HSP70-Ak liegt innerhalb des N-terminalen ~40 kDa-Fragmentes von HSP70. In diesen Fragment liegt auch die ATP-Bindungsstelle [Flaherty *et al.*, 1990], welche - obwohl sie stark konserviert ist - als immunogen beschrieben ist [Milarski *et al.*, 1989; Margulis *et al.*, 1991].

Abb. 3.5: Reinigung spezifischer Anti-HSP70-Ak aus den Antiseren durch HSP70-Affinitäts-Chromatographie. Ein Extrakt aus hitzegeschocktem Myzelium von *N. crassa* wurde in der 10 % SDS-PAGE getrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Rohserum (4A XII, a), der Waschfraktion (b) bzw., der Elutionsfraktion (c) der Affinitätsreinigung des Rohserums inkubiert. Der Pfeil kennzeichnet HSP70, die kleinen Punkte kennzeichnen mögliche Degradationsprodukte von HSP70 und der große Punkt kennzeichnet ein durch Ansequenzierung sicher identifiziertes ~40 kDa großes Degradationsprodukt von HSP70.

Auf den Western Blots der eindimensionalen 10 % SDS-PAGE ist die spezifische Detektion von HSP70 als eine distinkte Bande gezeigt (Abb. 3.5). Aus der 1D-Western Blot-Analyse geht allerdings noch nicht hervor welche Mitglieder der HSP70-Familie von *N. crassa* erkannt werden, da bei *N. crassa* die einzelnen Mitglieder der HSP70-Familie nach der Trennung durch 1D-PAGE nicht unterschieden werden können. Daher sollte eine 2D-PAGE in der mindestens sieben Vertreter (vier konstitutive und drei induzierbare) aufgetrennt werden können mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt werden. Der Ak (4A XII) reagierte nur mit dem Haupt-HSP70, welches auch als Ag eingesetzt wurde und eine konstitutive sowie HS-induzierbare Expression zeigt (Abb. 3.6 a,b). Der kommerziell erhältliche Anti-HSP70-Ak (H5147, Sigma) detektiert dasselbe HSP70. Zusätzlich detektiert er schwach einen induzierbaren HSP70-Vertreter aber auch eine Reihe anderer unspezifischer Proteine (Abb. 3.6 a,b und nicht gezeigt).

Abb. 3.6: Western Blot Analyse von HSP70 nach zweidimensionaler Gelelektrophorese von unbehandelten (a, c) und hitzegeschockten (b, d) Extrakten aus exponentiell wachsendem Myzelium von *N. crassa*. a, b: Detektion von HSP70 mit affinitätsgereinigtem Antiserum (4A XII) und c, d: mit einem kommerziellen monoklonalen Anti-HSP70-Ak (H5147, Sigma). Horizontal: IEF; Vertikal: 10 % SDS-PAGE.

Zur weiteren Klärung der Identität des detektierten HSP70 wurde eine Detektion auf Western Blots von 1D-SDS-PAGE mit einem Anti-SSA1-Ak (Jörg Becker) im Vergleich zur Detektion mit 4A XII durchgeführt (Abb. 3.7). Die Detektion beider Ak ist identisch. Neben der Ansequenzierung des Haupt-HSP70 und dem Vergleich mit anderen bekannten HSP70-Sequenzen (Abb. 3.3) ist diese Detektion des Haupt-HSP70 von *N. crassa* durch einen spezifischen Anti-SSA1-Ak ein weiterer Hinweis auf eine starke Homologie zu SSA1. In der 1D-Western Blot-Analyse zeigen 4A XII und Anti-SSA1-Ak ein identisches Detektionsmuster von HSP70 in Extrakten von Ratten Gliom (C6) Zellen - beide erkennen mit schwacher Affinität nur das HS-induzierbare HSP68 (nicht gezeigt). In Extrakten von *Physarum polycephalum* erkennt nur der Anti-SSA1-Ak einen sowohl konstitutiv als auch durch HS induzierbar synthetisierten Vertreter der HSP70-Familie von 69 kDa [Gevers *et al.*, unveröff. nicht gezeigt; Wright & Tollon, 1982; Shimada *et al.*, 1992]. In Extrakten von *Gonyaulax polyedra* werden keine Vertreter der HSP70-Familie von 4A XII und

Anti-SSA1-Ak erkannt (nicht gezeigt).

Abb. 3.7: Western Blot Analyse von HSP70 nach 10 % SDS-PAGE von Proteinen aus unbehandeltem (a, c) und hitzegeschocktem (b, d) exponentiell wachsendem Myzelium von *N. crassa*. a, b: Detektion von HSP70 mit affinitätsgereinigtem Antiserum (4A XII) und c, d: mit einem polyklonalen Anti-SSA1-Ak (Rohserum, Jörg Becker, 1993). Der Pfeil kennzeichnet HSP70, die Punkte mögliche Abbauprodukte von HSP70.

3.3 HSP70 bei Ratten Gliom (C6) Zellen

Basierend auf Arbeiten von Ulrich Neuhaus-Steinmetz [Neuhaus-Steinmetz *et al.*, 1994; Neuhaus-Steinmetz, 1995] aus unserer Arbeitsgruppe und in Zusammenarbeit mit ihm sollte die Anwendung der Streßantwort (HSC70/HSP68-Induktion) als möglicher Indikator für Proteintoxizität näher analysiert und mit Hilfe der ersten 10 Chemikalien der MEIC-Liste (multicentre evaluation of *in vitro* cytotoxicity) evaluiert werden. In einem ersten Versuch wurde die HSP70 Familie der Ratten Gliom (C6) Zellen durch Markierung mit [³⁵S]-Methionin und anschließender 2D-PAGE sowie der Immunodetektion von HSC70/ HSP68 auf 2D-Western Blots charakterisiert (Abb. 3.8). Außerdem sollten geeignete "Werkzeuge" zur empfindlichen und schnellen Detektion von HSP70 und/oder HSP68 entwickelt werden. Dazu wurde ein dem HSP70-ELISA für *N. crassa* [Fracella *et al.*, 1993b] ähnliches ELISA-System für HSP70 in Säugetierzellkulturen und Gewebe entwickelt (siehe Kap. 2.9; [Fracella *et al.*, 1995b]) und deren Ergebnisse mit der Western Blot Technik verglichen (Abb. 3.9).

Bei 37° C wird in asynchron wachsenden Zellen hauptsächlich ein Mitglied der HSP70 Familie (HSC70; Abb. 3.8 a, c) synthetisiert. Nach 2 - 6 h Erholung nach einem HS (44° C; 30 min) ist die Synthese des HSC70 verstärkt. Zusätzlich wird ein weiterer Vertreter (HSP68) deutlich synthetisiert. Die verstärkte Synthese des HSC70 spiegelt sich in der nur schwach erhöhten Gesamtmenge an HSC70 in den 2D-Western Blots wider (nach 12 h Erholung nach HS; Abb. 3.8 d). Auf dem Western Blot nach 12 h Erholung nach HS sind im Bereich des HSC70 noch zwei weitere induzierte Vertreter von HSP70 zu erkennen. Eines mit leicht alkalischerem *pI* und eines mit etwas geringerem Molekulargewicht (Abb. 3.8 d). Nach 12 h Erholung nach HS sind außer dem Haupt-HSP70, welches schon nach 4 h nach der Erholung nach HS auf Western Blots detektierbar ist, noch mindestens vier weitere Mitglieder der HSP70 Familie zu erkennen. Eines hat einen alkalischeren *pI*, ein weiteres hat ein etwas geringeres Molekulargewicht von ~66 kDa, und die anderen beiden haben ein

geringeres Molekulargewicht und einen saureren *pI*. Ob es sich hierbei um eigenständige Vertreter der HSP70-Familie mit verzögerter Induktionskinetik handelt, oder ob es sich möglicherweise um posttranslational veränderte oder schon teilweise degradierte Proteine handelt ist noch unklar.

Abb. 3.8: Autoradiographien (a, b; 5×10^5 cpm pro Gel) und HSP70 Western Blot Analysen (c-f; 50 μ g Gesamtprotein pro Gel) der zweidimensionalen PAGE von Ratten Gliom (C6) Gesamtzellextrakten unter "Kontroll-"(a, c, e) und HS-Bedingungen (44° C, 30 min; b, d, f). (b) Die Zellen wurden während 2 - 6 h Erholung vom HS mit [³⁵S]-Methionin markiert. (c, d) Immunodetektion mit dem H5147-Anti-HSP70-Ak (Sigma), in (d) nach 12 h Erholung vom HS. (e, f) Immunodetektion mit den SPA810AP-Anti-HSP70-Ak (Stressgen), in (f) nach 12 h Erholung. Die Pfeile kennzeichnen die konstitutiven und induzierbaren Haupt-HSP70 (Die Arbeit zu dieser Abb. wurde zum Teil gemeinsam mit Ulrich Neuhaus-Steinmetz durchgeführt).

Bestimmung der absoluten konstitutiven und HS-induzierten HSP70-Menge im ELISA

Zur Bestimmung der absoluten konstitutiven und HS-induzierten HSP70-Menge in Ratten Gliom (C6) Zellen wurden die Zellen bei 44° C für 30 min hitzegeschockt und nach unterschiedlich langer Erholungszeit bei 37° C geerntet. Die Proben wurden in PBS plus 10 mM Na₂ATP und 10 mM MgCl₂ durch Ultraschall homogenisiert, entsprechend verdünnt und im ELISA analysiert. Die errechneten HSP70-Mengen sind in Tab. 3.1 dargestellt und wurden mit den Werten aus den Western Blot Analysen mit zwei verschiedenen Anti-HSP70-Ak verglichen (Abb. 3.9 b). Die Ergebnisse stimmen gut überein und zeigen im Vergleich zu *N. crassa* eine relativ geringe HSP70-Menge unter konstitutiven Bedingungen.

Abb. 3.9: Vergleich der Western Blot und ELISA Bestimmung der konstitutiven (offene Säulen) und HS-induzierten (44° C, 30 min, 8 - 48 h Erholung; gestreifte und schattierte Säulen) HSP70-Menge in Ratten Gliom (C6) Zellen. (a) HSP70-ELISA Ergebnisse als absolute Absorbanz (Ordinate). (b) HSP70-Western Blot Ergebnisse, densitometrische Auswertung der gefärbten HSP70-Bande (rel. Dichte in Pixel).

	HSP70 (ng / μ g total protein)	percent
control	7.6 (\pm 1.4)	0.8
heat shock (8 h recovery)	22.8 (\pm 2.2)	2.3
heat shock (16 h recovery)	27.1 (\pm 3.1)	2.7
heat shock (24 h recovery)	20.2 (\pm 2.8)	2.0
heat shock (48 h recovery)	19.5 (\pm 3.6)	1.9

Tab. 3.1: Bestimmung der absoluten konstitutiven und HS-induzierten (44° C, 30 min, 8 - 48 h Erholung) HSP70-Menge in Ratten Gliom (C6) Zellen im ELISA.

In Zusammenarbeit mit Ulrich Neuhaus-Steinmetz, aus unserer Arbeitsgruppe, wurden erste Versuche zur Evaluierung eines auf der Induktion von Streßproteinen (HSP68) beruhenden Zytotoxizitäts- bzw. Proteintoxizitätstests durchgeführt. Dazu sollte die Zytotoxizität der ersten 10 MEIC-Substanzen im Neutralrottest bestimmt und mit der Induktion von HSP68 verglichen werden. Die ersten 10 MEIC-Substanzen sind gut untersucht. Es liegen bereits sehr viele Toxizitätsdaten verschiedener Arbeitsgruppen vor (Scandinavian society for cell toxicology; [Ekwall *et al.*, 1989; Fiskesjö & Levan, 1993]). Mit Hilfe der ELISA-Technik sowie des Western Blotting wurde bisher für Ethanol, Methanol und Paracetamol der HSP68 induzierende Konzentrationsbereich charakterisiert und mit der Zytotoxizität im Neutralrottest verglichen. Als Ergebnis fanden wir bei den geprüften Agentien eine maximale Streßproteininduktion dann, wenn ihre Konzentration den Beginn einer Reaktion bei den anderen Toxizitätsindikatoren erkennen ließ, in der Regel bei einer Gesamtzellschädigung von etwa 33% [Xu, 1995]. Daraus ergibt sich, daß das Auftreten erhöhter Mengen induzierbarer Streßproteine eine erste Zellschädigung anzeigt (nicht gezeigt; [Neuhaus-Steinmetz *et al.*, 1994; Neuhaus-Steinmetz, 1995; Xu, 1995]) und Ergebnisse aus anderen Toxizitätsuntersuchungen (z.B. Gentoxizität, Teratogenität u. a.) sinnvoll um Daten der Proteintoxizität ergänzen könnte. Da nicht alle Stressoren die Synthese aller Streßproteine in gleicher Weise bewirken, ist die Induktion von Streßproteinen für sich allein gesehen kein sicheres Werkzeug zur Detektion einer ersten Zellschädigung [Wiegant *et al.*, 1995].

3.4 Expression und Translokation von HSP70 bei Hitzeschock

Bei *N. crassa* ist die HS-induzierte Synthese des Haupt-HSP70 innerhalb eines bestimmten Bereiches abhängig von der Höhe der HS-Temperatur. Nach einstündiger Exposition bei 45° C ist die Synthese von HSP70 maximal [nicht gezeigte eigene Untersuchungen; Plesofsky-Vig & Brambl, 1985a]. Die Syntheserate ist allerdings nur ein Maß der Proteinneusynthese aus der man nicht abschätzen kann welchen Anteil die neu synthetisierten Proteine an der schon vorhandenen Menge dieses Proteins ausmachen. Mit den hergestellten polyklonalen Anti-HSP70-Ak (4A XII) wurde daher auf Western Blots die Gesamtmenge an HSP70 in Abhängigkeit von der Höhe der HS-Temperatur bestimmt (Abb. 3.10). 37° C ist die niedrigste Temperatur, die nach einstündiger Applikation zu einer im Western Blot sichtbaren Erhöhung der Gesamt-HSP70-Menge führt. Die stärkste Anreicherung ist auch hier bei 45° C zu erkennen. Bei noch höheren Temperaturen ist die HSP70-Menge wieder geringer. Vermutlich ist hier ein wesentlicher Teil der Kultur bereits letal geschädigt.

Eine absolute Quantifizierung der HSP70-Menge wurde im entwickelten ELISA anhand einer Eichkurve mit isoliertem HSP70 (siehe Abb. 2.3) durchgeführt und ergab eine Konzentration von 31 ng HSP70/µg Gesamtprotein (3.1 %) in Extrakten von unbehandeltem exponentiell wachsendem Myzelium und 52 ng HSP70/µg Gesamtprotein (5.2 %) nach einer Stunde HS bei 45° C. Zur Überprüfung dieses Anstieges um etwa 70 % wurde einem Extrakt aus unbehandeltem Myzelium eine steigende Menge an isoliertem HSP70 zugefügt (Abb. 3.11). Die Wiederfindung des den Kontrollextrakten zugefügtem HSP70 lag bei 110 % (± 10 %). Um den Extinktionswert von hitzegeschockten Zellen zu erreichen, mußten zu 1 µg Gesamtproteinextrakt aus unbehandelten Zellen 20 ng HSP70 zugefügt werden. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der direkten Quantifizierung anhand der HSP70-Standardkurve überein.

Abb. 3.10: Western Blot Analyse der HSP70-Gesamtmenge in Abhängigkeit von der Höhe der Temperatur eines einstündigen HS. Exponentiell wachsendes Myzelium (bdA) wurde für 1 h bei der angegebenen Temperatur hitzegeschockt (Abszisse: HS = schraffierte Säulen; Kontrolle, 25° C = offene Säule). 5 µg Gesamtprotein pro Spur wurden im 10 % SDS-PAGE getrennt. Die HSP70-Menge wurde densitometrisch bestimmt und ist in % der Kontrolle dargestellt (Ordinate).

Abb. 3.11: Quantifizierung von HSP70 in unbehandelten und hitzegeschockten (1 h, 45° C) Extrakten von exponentiell wachsendem Myzelium von *N. crassa* (bdA). Einem Homogenat von unbehandeltem Myzelium (Kontrolle) wurde eine steigende Menge an HSP70 zugefügt und mit dem hitzegeschocktem Homogenat verglichen (■ = Kontrolle (n = 6); □ = 1 h, 45° C (n = 5); ● = Kontrolle plus HSP70 (n = 3)).

Die HS-induzierte HSP70-Expression ist neben der Höhe der HS-Temperatur auch von der Dauer des HS abhängig. Im Gegensatz zu vielen anderen Organismen beginnt die Expression von HSP70 und anderen Streßproteinen bei *N. crassa* bereits während der Applikation der HS-Temperatur. Schon nach 20-minütiger Exposition bei 42° C ist eine erhöhte HSP70-Menge im Gesamthomogenat im Western Blot detektierbar und nach einstündiger Exposition ist ein Maximum erreicht (Abb. 3.12 a). Ebenso beginnt bei länger andauerndem HS nach etwa 1 -2 h eine Rückregulation der HS-Genexpression und eine Erholung der Synthese "normaler" Proteine [nicht gezeigte eigene Untersuchungen; Plesofsky-Vig & Brambl, 1985a]. Die Akkumulation von HSP70 im Zellkern ist ein sehr schneller Prozeß und bereits nach 5 min HS bei 42° C deutlich sichtbar. Nach 40 min HS ist die maximale Akkumulation erreicht. Danach beginnt eine langsame Relokalisation in das Cytoplasma, aber auch nach 6 h HS ist die HSP70-Menge im Zellkern noch deutlich erhöht. Im Cytoplasma nimmt die Menge an HSP70 in den ersten 20 min HS zunächst ab - wahrscheinlich aufgrund einer starken Translokation in den Zellkern - und erreicht dann langsam ein Maximum nach 4 -6 h HS (Abb. 3.12 a). Die Relokalisation von HSP70 aus dem Zellkern in das Cytoplasma ist während der Erholung von einem HS (1 h, 45° C) schneller als unter fortgesetztem HS bei 42° C (Abb. 3.12 b).

Abb. 3.12: Veränderungen der Gesamt-HSP70-Menge während eines länger andauernden HS bei 42° C (a) und während der Erholung bei 25° C nach einem HS (1 h, 45° C; b) im Gesamtzellhomogenat (■), der Kernfraktion (●) und im Cytoplasma (▲) von exponentiell wachsendem Myzelium von *N. crassa* (bd A). Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse mit dem Ak (4A XII). Abszisse: Zeit nach Beginn der HS-Behandlung (a) oder nach dem HS (b) in Stunden (h). Der schattierte Bereich in b kennzeichnet die Applikationsdauer des HS.

3.5 Degradation von HSP70 bei Hitzeschock

Gemeinsam mit Cunshuan Xu und aufbauend auf Arbeiten von Saadat Mohsenzadeh, zwei Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, sollte der "Turnover" von HSP70 unter konstitutiven sowie während HS-Bedingungen und der Erholung nach einem HS untersucht werden. Es ist bisher wenig bekannt, in welchem Ausmaß die erhöhte HSP70-Menge nach einem Streß auf eine verringerte Degradation dieses Proteins zurückzuführen ist. Saadat Mohsenzadeh (1993) [Mohsenzadeh *et al.*, 1994] und Cunshuan Xu (1995) konnten durch "Pulse - Chase" -Experimente mit [³⁵S]-Methionin zeigen, daß sowohl bei *N. crassa* als auch bei Ratten Gliom (C6) Zellen neben der verstärkten Synthese von HSP70 nach einem HS auch eine Reduktion seiner Abbaurrate wesentlich zum langanhaltend hohen HSP70-Gehalt beiträgt.

In einem Ansatz wurde die Abnahme der Gesamt-HSP70-Menge nach einem HS während der Erholung bei 25° C im ELISA analysiert (Abb. 3.13). Berücksichtigt man bei dieser Analyse das weitere Wachstum (Zunahme des Trockengewichtes um das 2-4fache in den ersten 12 h nach HS) von *N. crassa*, welches einen Verdünnungseffekt für das vorhandene HSP70 darstellt, ergibt sich eine recht lange Halbwertszeit - also eine geringe Abbaurrate - von HSP70.

Das durch Ansequenzierung identifizierte 40 kDa-Abbauprodukt von HSP70 ist im Western Blot bei langer Enzymreaktion detektierbar. In einem weiteren Versuch wurde die relative Menge dieses Abbauproduktes und die Menge an HSP70 selbst, während eines kontinuierlichen HS (42° C) und der Erholung nach einem HS (1 h, 45° C), bestimmt (Abb. 3.14). Die Ergebnisse des Erholungsexperimentes zeigen eine Abnahme der Menge des 40 kDa-Abbauproduktes auf etwa 60 % des Kontrollwertes 30 min nach einstündigem HS (45° C). Nach 2-6 h Erholung wird der Kontrollwert wieder erreicht. Die HSP70-Menge zeigt während dieser Zeit eine starke Zunahme gefolgt von einer Abnahme. Bei kontinuierlicher HS-Exposition (42° C) ist die Abnahme der HSP70-Menge und auch die Erholung der Menge des 40 kDa-Abbauproduktes verzögert. Eine weitgehend ähnliche Veränderung der Menge des 40

kDa-Abbauprodukt von HSP70 wurde auch in der Zellkernfraktion des oben beschriebenen Versuches sowohl während der Erholung von einem HS als auch während eines kontinuierlichen HS beobachtet.

Abb. 3.13: Gesamt-HSP70-Menge während der Erholung bei 25° C nach einem HS (1 h, 45° C) im Gesamtzellhomogenat von exponentiell wachsendem Myzelium von N. crassa (bd A). Der obere Teil der Grafik zeigt die Entwicklung des Trockengewichtes während des Versuchszeitraumes. Die Messung erfolgte im ELISA mit dem Ak 4A XII. Abszisse: Zeit nach HS in Stunden (h). Der schattierte Bereich kennzeichnet die Applikationsdauer des HS.

Abb. 3.14: Veränderung der Menge von HSP70 (■) und des 40kDa-HSP70-Abbauproduktes (□; 40 kDa-Protein) während einem andauernden HS (42° C; a) und der Erholung bei 25° C nach einem HS (1 h, 45° C; b) im Gesamtzellhomogenat von exponentiell wachsendem Myzelium von *N. crassa* (bd A). Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse mit dem Ak 4A XII. Abszisse: Zeit nach Beginn der HS-Behandlung (a) oder nach dem HS (b) in Stunden (h). Der schattierte Bereich in b kennzeichnet die Applikationsdauer des HS.

3.6 Einfluß von cAMP auf die konstitutive und HS-induzierte Expression und Translokation von HSP70

Wegen der unterschiedlich starken Expression von HS-Genen bei Entwicklungsvorgängen werden bei der Suche nach einem dabei wirksamen Signalüberträger auch die klassischen "second messenger" in einigen Arbeitsgruppen analysiert. So werden auch von unserer Arbeitsgruppe Ca^{2+} , InsP_3 , cGMP und cAMP seit längerem im Zusammenhang mit der Streßantwort untersucht [Cornelius *et al.*, 1989; Schultz *et al.*, 1990; Techel *et al.*, 1990; Gebauer, 1994; Kallies, 1995; Cornelius, 1994a & 1994b; Thevelein, 1994]. HS und andere Streßfaktoren führen zu Veränderungen der genannten "second messenger". Insbesondere cAMP wird als mögliches Stellglied bei der Regulation verschiedener HS-Gene sowohl bei Säugern als auch bei der Hefe diskutiert [Shin *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1988; Werner-Washburne *et al.*, 1989; Boorstein & Craig, 1990; Engelberg *et al.*, 1994]. Eine Defektmutante der Adenylatzyklase von *N. crassa* (*cr-1*) ist konstitutiv thermotolerant und zeigt darüber hinaus einige morphologische Veränderungen [Terenzi *et al.*, 1974; Lindegren, 1936]. Dieser Phänotyp wird durch externes cAMP ganz oder teilweise aufgehoben [Cruz *et al.*, 1988]. Eine erhöhte Thermotoleranz wird zum Teil auf eine erhöhte Expression verschiedener Streßproteine zurückgeführt [Iida & Yahara, 1984; Sanchez *et al.*, 1993; Parsell & Lindquist, 1994; Venetianer *et al.*, 1994; Kampinga, 1993; Weber, 1992] - wurde bei *cr-1* aber bisher nicht untersucht. Ebenso wurde bisher kein Versuch unternommen, einen direkten Einfluß von cAMP auf die konstitutive und HS-induzierte Streßgenexpression und einen möglichen Einfluß auf die Translokation von HSP70 bei *N. crassa* nachzuweisen.

In einem ersten Ansatz sollte daher der Einfluß von cAMP auf die Expression von HSP70 beim Wildtyp (*wt*) von *N. crassa* untersucht werden. Dazu wurden einige Kulturen in Gegenwart von 20 μM 8-Brom-cAMP (auch die Anzucht der vorherigen Generation von Konidien geschah in Gegenwart von cAMP) und andere unter Standardbedingungen herangezogen. Je eine Kultur wurde für 1 h bei 45° C

gehalten und HSP70 nach 30 min Erholung bei 25° C im Vergleich zu den nicht cAMP- und hitzegeschockten Kulturen im Western Blot analysiert (Abb. 3.15 A). Unter konstitutiven Bedingungen bewirkt cAMP eine Verringerung der HSP70-Menge. Die HS-stimulierte HSP70-Expression wurde durch cAMP verstärkt.

Nachdem ein Effekt von cAMP auf die HSP70-Expression beim Wildtyp (wt) von *N. crassa* gezeigt werden konnte, erscheint es besonders interessant, die HSP70-Expression bei der cr-1-Mutante mit sehr geringem cAMP-Gehalt mit der des wt zu vergleichen. Möglicherweise wird die konstitutive Thermotoleranz [Terenzi *et al.*, 1974; Cruz *et al.*, 1988] auch bei *N. crassa* von einer erhöhten HSP70-Expression begleitet oder durch sie bewirkt. Je eine in Gegenwart von 20 µM 8-Brom-cAMP und unter Standardbedingungen herangezogene Kultur der cr-1-Mutante wurde ebenfalls hitzegeschockt (1 h, 45° C) und HSP70 nach 30 min Erholung bei 25° C im Vergleich zu den nicht cAMP- und hitzegeschockten cr-1- und wt- Kulturen im Western Blot analysiert (Abb. 3.15 A). Im Vergleich zur konstitutiven HSP70-Expression des wt zeigt cr-1 eine leicht erhöhte HSP70-Expression. Auch bei der cr-1-Mutante wurde die konstitutive HSP70-Expression durch cAMP verringert und die HS-stimulierte leicht erhöht.

Gemeinsam mit Torsten Schröder, der im Rahmen seiner Diplomarbeit besonders an der Adaptation der HSP70-Expression und der Kerntranslokation von HSP70 interessiert war, wurde auch der Einfluß von 20 µM 8-Brom-cAMP auf die HSP70-Expression während eines kontinuierlichen HS bei 42° C bei der bdA- und der cr-1-Mutante untersucht (Abb. 3.15 B). Die Zunahme der HSP70-Menge während des andauernden HS ist bei der cr-1-Mutante deutlich geringer als bei bdA. Bei beiden Mutanten ist die HSP70-Expression während des HS in Anwesenheit von 8-Brom-cAMP deutlich erhöht.

Sehr schnell nach einem HS findet man eine starke Akkumulation von HSP70 im Zellkern [eigene Untersuchungen; Helmbrecht, unveröff.; Welch & Feramisco, 1984; Velaquez & Lindquist, 1984; Ohtsuka & Laszlo, 1992; Martin *et al.*, 1993]. Neben der insgesamt erhöhten Menge von HSP70 ist diese Akkumulation,

sowohl für die Ausbildung einer Thermotoleranz [Stege *et al.*, 1994 & 1995] als auch für die Erholung nach einem HS [Pelham, 1984] besonders wichtig. Wenn cAMP einem Einfluß auf die Anreicherung von HSP70 im Zellkern hat, sollte bei der cr-1-Mutante mit geringem cAMP-Gehalt eine veränderte Translokation von HSP70 zu beobachten sein. Ein direkter Effekt sollte auch in Gegenwart von 20 µM 8-Brom-cAMP zu beobachten sein. Kulturen der bdA- und cr-1-Mutante mit und ohne cAMP-Behandlung wurden im Wasserbad für 36 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, in Zellkerne und Cytoplasma fraktioniert und HSP70 im Western Blot analysiert (Abb. 3.16).

Die Kerntranslokation von HSP70 ist abhängig von der Höhe und Dauer der applizierten Temperatur. Sowohl bei bdA als auch bei cr-1 ist die Menge an HSP70 im Zellkern nach 2 h bei 42° C etwa doppelt so hoch wie nach 2 h bei 37° C. Bei der cr-1-Mutante beträgt der Anstieg der HSP70-Menge im Zellkern nach 2 h HS bei 37 und 42° C nur etwa 20 - 30 % des Anstiegs der bdA-Mutante und erreicht sehr schnell auch wieder Kontrollmengen bzw. noch darunter liegende Mengen. Im Cytoplasma nimmt die Menge an HSP70 zunächst ab - wahrscheinlich aufgrund einer starken Translokation in den Zellkern - und erreicht erst später erhöhte Mengen. Diese anfängliche Abnahme ist bei der cr-1-Mutante stärker ausgeprägt als bei bdA. Unter dem Einfluß von 20 µM 8-Brom-cAMP wird der Anstieg der HSP70-Menge im Zellkern bei cr-1 stark erhöht. Er ist nach 2 h bei 42° C dann nur unwesentlich geringer wie bei bdA.

Abb. 3.15: Einfluß von cAMP auf die konstitutive und HS-induzierte Expression von HSP70 beim Wildtyp (wt) und der *crp-1* (*cr-1*)-Mutante von *N. crassa*. (A) Mit cAMP behandelte Kulturen wurden in 20 μ M 8-Brom-cAMP herangezogen. Kontrollkulturen wurden unter Standardbedingungen herangezogen (25° C = offene Säulen). Die HS-Exposition erfolgte bei 45° C für eine Stunde, die Proben wurden nach 30 min Erholung bei 25° C (schraffierte Säulen) genommen und HSP70 im Western Blot analysiert, densitometrisch ausgewertet und als rel. Dichte dargestellt. (B) Einfluß von 20 μ M 8-Brom-cAMP auf die HSP70-Expression während eines kontinuierlichen HS bei 42° C (a= *bdA*; b = *cr-1*; □ = ohne cAMP; ■ = mit cAMP).

Abb. 3.16: (siehe vorherige Seite) **Kerntranslokation von HSP70 und Einfluß von cAMP bei der band (bdA) und crisp-1 (cr-1)-Mutante von *N. crassa* unter HS-Bedingungen.** *bdA* (a, b), *cr-1* (c, d) und in 20 µM 8-Brom-cAMP herangezogene *cr-1* (e) Kulturen wurden einem kontinuierlichem HS (a, c = 37° C; b, d, e = 42° C) ausgesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, fraktioniert (○ = Cytoplasma; ● = Zellkern) und HSP70 im Western Blot analysiert. HSP70 wurde densitometrisch ausgewertet und in % der Kontrolle angegeben (Ordinate). Abszisse: Zeit nach Beginn der HS-Behandlung in Stunden (h).

3.7 Expression von HSP70 während der asexuellen Entwicklung

Nachdem ein Einfluß von cAMP auf die Expression von HSP70 auch für *N. crassa* gezeigt werden konnte und unterschiedliche Gehalte an cAMP in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung und Differenzierung bekannt waren (Abb. 3.18 a, b; [Kallies, 1995]), sollte der HSP70-Gehalt in diesen verschiedenen Phasen bestimmt werden. Ein Einfluß von cAMP auf verschiedene Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge sind für *N. crassa* schon beschrieben [Mishra, 1976; Pall & Robertson, 1986; Scott & Solomon, 1973; Terenzi *et al.*, 1976; Scott, 1976; Rosenberg & Pall, 1979]. Eine Korrelation der Mengen von cAMP und HSP70 könnte einen weiteren Hinweis auf eine cAMP-regulierte HSP70-Expression liefern und auf eine mögliche Beteiligung von HSP70 an Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen hindeuten.

Die asexuelle Entwicklung von *N. crassa* beginnt mit der Differenzierung von Lufthyphen aus vegetativen Hyphen und der anschließenden Bildung von Konidien durch apikale Abschnürungen der älteren Lufthyphen (Konidiation). Der Prozeß der Konidiation dauert etwa 10 h (Abb. 3.17). Diese Differenzierung wird z. B. durch Licht induziert [Ninnemann, 1991a; b], aber auch das Alter der Kultur und das Nährstoffangebot spielen hierbei eine Rolle [Nelson *et al.*, 1975]. Eine verstärkte Konidiation wurde auch 18 h nach einem HS beobachtet [Gebauer *et al.*, 1995]. Während der Konidiation werden eine Reihe konidiationsspezifischer Proteine in den

Lufthyphen und Konidien synthetisiert [Berlin & Yanofsky, 1985]. Werden die noch nicht aktivierten Konidien (dormant conidia) in entsprechendem Medium inkubiert, beginnt die Keimung der Konidien. Die vollständige Keimung bei 25° C dauert etwa 6-8 h [Bonnen & Brambl, 1983] und führt zur Ausbildung von Hyphen (6-20 h) und einem exponentiell wachsendem Myzelium (nach ~20 h). Sind die Nährstoffe im Medium verbraucht, erreicht das Myzelium die stationäre Wachstumsphase (nach ~50-60 h) und bildet erneut Lufthyphen und Konidien (Abb. 3.17).

Abb. 3.17: Vegetativer Lebenszyklus von N. crassa. Die Dauer der einzelnen Phasen bezieht sich auf das Wachstum unter kontrollierten Laborbedingungen. Die asexuelle Entwicklung von N. crassa beginnt mit Differenzierung von Lufthyphen aus vegetativen Hyphen und der anschließenden Konidiation. Werden die Konidien in entsprechendem Medium inkubiert, beginnt die Keimung der Konidien und die Bildung eines Myzels [verändert nach Nelson et al., 1975; Russo & Pandit, 1992].

Lufthyphenbildung und Konidiation

Um Lufthyphen in verschiedenen Phasen während der Konidiation ernten zu können, wurde Konidiationsmedium [Horowitz, 1949] in großen Glaspetrischalen mit Konidien angeimpft. Nach etwa 24 -36 h bildeten sich die ersten Lufthyphen. Die erste Ernte von Lufthyphen wurde 6 h später vorgenommen. Danach wurde über einen Zeitraum von 24 h alle 6 h geerntet und HSP70 im Western Blot analysiert (Abb. 3.19 a). Gleichzeitig wurde in Coomassie Blau gefärbten Gelen die 45 kDa-Bande (vermutlich Actin) densitometrisch ausgewertet. Mit zunehmendem Alter der Lufthyphen bzw. mit zunehmender Konidiation nimmt die Menge an HSP70 zu. Die Menge an Actin bleibt über den Versuchszeitraum konstant. Der Gehalt an cAMP nimmt im selben Zeitraum ab [Kallies, 1995].

Konidienkeimung und exponentielles Wachstum

Zur Keimung von Konidien wurden 2 l Schüttelkulturen mit schlafenden Konidien des wt und der bdA-Mutante von *N. crassa* angeimpft. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben durch Zentrifugation geerntet und HSP70 im Western Blot analysiert (Abb. 3.19 b). Für den wt wurde gleichzeitig die relative Menge an Actin densitometrisch bestimmt - sie bleibt über den Versuchszeitraum konstant. Während der Konidienkeimung nimmt die Menge an HSP70 in beiden Stämmen ab. In exponentiell wachsendem Myzelium (24 h) ist etwa die gleiche Menge HSP70 vorhanden wie in den schlafenden Konidien. Im gleichen Zeitraum der Keimung nimmt der cAMP-Gehalt zu und ist in exponentiell wachsendem Myzelium wieder leicht reduziert [Kallies, 1995].

Wachstum zur stationären Phase

Zur Ernte von Myzelium während des Wachstums zur stationären Phase wurden Flüssigkulturen mit schlafenden Konidien angeimpft und bis zu 100 h bei 25° C wachsen gelassen. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und entweder zur Bestimmung der Wachstumskurve (Abb. 3.20A oben) lyophilisiert und das Trockengewicht bestimmt oder in verschiedene Fraktionen aufgespalten (Gesamtho-

mogenat, Zellkern, Cytoplasma) und HSP70 im Western Blot analysiert (Abb. 3.20A unten). Die Gesamtmenge an HSP70 nimmt mit zunehmendem Alter der Kultur leicht ab und noch vorhandenes HSP70 wird verstärkt im Zellkern angereichert. Beim Übergang zur stationären Phase ("diauxic shift") ist kurzfristig eine leicht erhöhte Expression von HSP70 zu erkennen. Ein ähnliches Expressionsverhalten während des Wachstums zur stationären Phase ist auch für SSA1-2 und SSB1-2 beschrieben worden [Werner-Washburne *et al.*, 1989]. Der cAMP-Gehalt nimmt während des Wachstums zur stationären Phase (70 h) leicht ab [Kallies, 1995].

Abb. 3.18: [Ergebnisse von Andreas Kallies, 1995] cAMP-Gehalt in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung der band (bdA)-Mutante von *N. crassa*. (a) cAMP-Gehalt in Luftthyphen und während der Konidiation (Abszisse = Zeit nach Luftthyphenbildung; Konidiation ab 12 h). (b) cAMP-Gehalt in schlafenden Konidien (0 h), während der Keimung von Konidien (0.2 - 6 h) und in exponentiell wachsendem Myzelium (24 - 40 h) und stationärem Myzelium (70 h) (n=3).

Abb. 3.19: HSP70 Gehalt in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung des Wildtyps (wt) und der band (bdA)-Mutante von *N. crassa*. (a) HSP70 Gehalt in Luftthyphen und während der Konidiation des wt (Abszisse = Zeit nach Luftthyphenbildung; Konidiation ab 12 h). (b) HSP70 Gehalt in schlafenden Konidien (0 h), während der Keimung von Konidien (0.2 - 8 h), im exponentiell wachsendem Myzelium (24 h) und nach einem HS (hs; 45° C, 1 h). Zusätzlich zur densitometrischen Auswertung der Western Blots sind diese im Insert unter den Diagrammen gezeigt. Die Entwicklung des HSP70 Gehaltes während der Konidienkeimung ist im Wildtyp (wt = schraffierte Säulen) und der bdA-Mutante (bdA = offene Säulen) dargestellt. ▲ = rel. Menge von

Bestimmung der absoluten HSP70-Menge in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung im ELISA

Zur Bestimmung der genauen HSP70-Menge des Wildtyps von *N. crassa* in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung wurden die Proben in PBS plus 10 mM Na₂ATP und 10 mM MgCl₂ durch Ultraschall homogenisiert, entsprechend verdünnt und im ELISA analysiert. Die errechneten HSP70-Mengen sind in Tab. 3.2 dargestellt und stimmen mit den Werten aus den Western Blot Analysen gut überein. Sie bestätigen eine hohe HSP70-Menge auch unter konstitutiven Bedingungen.

	HSP70 (ng / µg total protein)	percent
conidia (dormant)	34 (± 4)	3.4
conidia (1 h activated)	26 (± 5)	2.6
conidia (4 h activated)	30 (± 3)	3.0
aerial hyphae (6 h)	11 (± 2)	1.1
aerial hyphae (24 h)	33 (± 3)	3.3
exp. mycelium (24 h)	31 (± 2)	3.1
exp. mycelium (40 h)	29 (± 3)	2.9
stat. mycelium (70 h)	25 (± 3)	2.5
exp. mycelium (24 h; hs: 1 h, 45° C)	52 (± 6)	5.2

Tab. 3.2: Bestimmung der absoluten HSP70-Menge des Wildtyps von *N. crassa* in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung im ELISA.

Abb. 3.20: (siehe nächste Seite) Detektion und Lokalisation von HSP70 während des Wachstums zur stationären Phase. (A) Kulturen der *bdA*-Mutante von *N. crassa* wurden unter Standardbedingungen für die angegebene Zeit bei 25° C herangezogen. Die Entwicklung des Trockengewichtes ($n = 3$) ist im oberen Teil der Grafik gezeigt. Das Myzelium wurde fraktioniert (Gesamtzellhomogenat = ○; Cytoplasma = ▲; Zellkerne = ●) und HSP70 im Western Blot analysiert, densitometrisch ausgewertet und in rel. Dichte dargestellt, wobei die stärkste Intensität innerhalb eines Blots gleich 1 gesetzt wurde ($n = 3$). (B) Darstellung der Blots eines Experimentes.

3.8 Einfluß von cAMP auf die Expression von HSP70 während der asexuellen Entwicklung

Die HSP70-Expression zeigte eine inverse Korrelation mit dem cAMP-Gehalt in vielen Phasen der asexuellen Entwicklung. Daher scheint eine Analyse der HSP70-Menge der *cr-1*-Mutante, mit sehr geringem cAMP-Gehalt, in den verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung und der Vergleich mit dem *wt* besonders interessant. Außerdem sollte durch eine Manipulation mit externem cAMP sowohl beim *wt* als auch der *cr-1*-Mutante die für diese Phasen typische HSP70-Menge beeinflussbar sein und mögliche Folgen für die weitere Entwicklung haben.

Lufthyphenbildung und Konidiation

In einem ersten Versuch sollte der Einfluß einer permanenten Inkubation mit cAMP auf den "normalen" starken Anstieg der HSP70-Menge in Lufthyphen während der Konidiation untersucht werden. Lufthyphen des *wt* von *N. crassa* wurden in Gegenwart von 2 mM cAMP bzw. 20 µM 8-Brom-cAMP herangezogen und HSP70 im Western Blot sowie Actin in Coomassie Blau gefärbten Gelen analysiert (Abb. 3.21). Auch unter dem Einfluß von cAMP kommt es zu einem starken Anstieg von HSP70. Gegenüber den unbehandelten Lufthyphen ist der HSP70-Gehalt jedoch schon in sehr jungen Lufthyphen erhöht, und der Anstieg während der Konidiation scheint beschleunigt. Die Menge an Actin bleibt während der Konidiation etwa konstant.

Abb. 3.21: Einfluß von cAMP auf die HSP70-Expression in Lufthyphen und während der Konidiation des Wildtypes (wt). Zu den angegebenen Zeiten nach der Lufthyphenbildung (Konidiation ab 12 h; Abszisse) wurden Lufthyphen geerntet und HSP70 im Western Blot analysiert (A). Die densitometrische Auswertung der Western Blots ist in rel. Dichte dargestellt, wobei die stärkste Intensität innerhalb eines Blots gleich 1 gesetzt wurde (B; ■ = HSP70 wt 1; □ = HSP70 wt 2; ○ = HSP70 wt 2 mM cAMP; ● = HSP70 wt 20 µM 8-Brom-cAMP; ▲ = Actin).

Konidienkeimung

Bei der Keimung von Konidien des wt nimmt die Menge an HSP70 ab (Abb. 3.19 b und 3.22 a) und steigt erst beim Übergang zu exponentiellem Wachstum (nach etwa 18-24 h) wieder an. Zum Studium des Einflusses von cAMP wurde zunächst die HSP70-Menge während der Keimung von Konidien der cr-1-Mutante untersucht (Abb. 3.22 c). Ähnlich wie beim wt nimmt die HSP70-Menge rasch ab, nimmt aber im Gegensatz zum wt schon nach 8 h Keimung wieder zu. Extern zugegebenes cAMP hat einen deutlichen Effekt auf die Entwicklung der HSP70-Menge während der Keimung. In Gegenwart von 20 µM 8-Brom-cAMP keimende Konidien des wt zeigen nur sehr kurzfristig eine leichte HSP70-Abnahme mit anschließender Zunahme (Abb.

3.22 b). Bei den *cr-1*-Konidien nimmt die Menge an HSP70 während der ersten 4 h der Keimung in Gegenwart von 20 μ M 8-Brom-cAMP rasch zu, nimmt dann wieder ab und ist auch im vegetativen Myzelium (24 h) noch deutlich reduziert (Abb. 3.22 d). Während der Keimung beider Stämme unter allen Bedingungen war die Menge an Actin etwa konstant. Um die Menge an HSP70 während der Keimung beim *wt* und *cr-1* mit und ohne cAMP direkt vergleichen zu können, ist in Abb. 3.22 B die densitometrische Auswertung eines Western Blots, indem die Proben der identischen Zeitpunkte der Keimung (schlafende Konidien = a; nach 1 h Keimung = b; nach 4 h Keimung = c) beider Stämme und Behandlungen auf einem Blot waren, gezeigt. In den schlafenden Konidien der *cr-1*-Mutante ist eine deutlich geringere HSP70-Menge vorhanden als in Konidien des *wt*. In den keimenden Konidien (nach 1 und 4 h Keimung) ist die Menge an HSP70 bei *cr-1* gegenüber dem *wt* deutlich erhöht. In Anwesenheit von 20 μ M 8-Brom-cAMP war die HSP70-Menge beim *wt* und der *cr-1*-Mutante - wie beim vegetativen Myzelium (Abb. 3.16) - zu allen Zeiten der Konidienkeimung erniedrigt (Abb. 3.22 B).

Abb. 3.22: (siehe nächste Seite) **Einfluß von cAMP auf die HSP70-Expression während der Konidienkeimung des Wildtyps (*wt*) und der *crisp-1* (*cr-1*)-Mutante von *N. crassa*.** (A) Entwicklung der HSP70-Menge während der Konidienkeimung unter Standardbedingungen (*wt* = a; *cr-1* = c) und dem Einfluß einer Dauerbehandlung mit 20 μ M 8-Brom-cAMP (bdA = b; *cr-1* = d). Zu den angegebenen Zeiten wurden die keimenden Konidien bzw. exp. Myzelium = 24 h geerntet und HSP70 im Western Blot analysiert. Die densitometrische Auswertung der Western Blots ist in rel. Dichte dargestellt. Die stärkste Intensität innerhalb eines Blots wurde gleich 1 gesetzt ($n = 2$; ● = HSP70; ▲ = Actin). (B) Direkter Vergleich der HSP70-Menge aus schlafenden Konidien (a), 1 h (b) und 4 h (c) gekeimten Konidien des *wt* und der *cr-1*-Mutante in Gegenwart (*wt* 8; *cr1* 8) und Abwesenheit (*wt*, *cr1*) von 20 μ M 8-Brom-cAMP (Proben aus A).

3.9 Aufnahme von [³⁵S]-Methionin und die Gesamtproteinsynthese bei Hitzeschock auch unter dem Einfluß von cAMP

Über die Rolle von HSP70 im Zellkern wurde bereits viel spekuliert - eindeutige Beweise einer essentiellen Funktion existieren allerdings nicht. Erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von HSP70 an allgemeinen Transkriptionsvorgängen sollte ein gemeinsam mit Torsten Schröder, der sich im Rahmen seiner Diplomarbeit besonders für Adaptationsprozesse der Gesamtproteinsynthese bei kontinuierlichen HS interessierte, durchgeführter Versuch zeigen. Versuche von Paola Schweim und Ulf Meyer aus unserer Arbeitsgruppe zeigten eine maximale HSP70-Induktion durch verschiedene Alkohole und Phenole bei Konzentrationen die die Gesamtproteinsynthese um etwa 50% hemmten [Meyer *et al.*, 1995]. Wir waren an möglichen Korrelationen einer Anreicherung von HSP70 im Zellkern und der Hemmung bzw. Erholung der Gesamtproteinsynthese oder der Induktion bzw. der Rückregulation der HSP-Synthese während einer andauernden HS-Behandlung interessiert. Außerdem sollte der Einfluß von cAMP auf die Methioninaufnahme und die Gesamtproteinsynthese untersucht werden.

Kulturen des wt, von bdA und von cr-1 wurden mit und ohne 20 µM 8-Brom-cAMP einem kontinuierlichen HS bei 37 und 42° C für 24 - 36 h ausgesetzt (nur 42° C gezeigt; Abb. 3.23). Zu den angegebenen Zeiten wurden für einen Zeitraum von jeweils 15 min alle synthetisierten Proteine mit [³⁵S]-Methionin markiert. Aus der Bestimmung der Radioaktivität (cpm) und der Proteinkonzentration ließ sich dann die Methioninaufnahme und die Gesamtproteinsynthese berechnen und mit der Translokation von HSP70 vergleichen.

Schon 15 min nach dem Beginn eines andauernden HS (42° C) ist die Gesamtproteinsynthese beim wt, bdA und cr-1 um 30 - 60 % reduziert. Dann zeigt die Proteinsynthese eine kurze Erholung für 1 - 4 h und ist danach wieder reduziert. Die

kurzfristige Erholung bleibt in Gegenwart von 20 μ M 8-Brom-cAMP aus. Insgesamt zeigt die *cr-1*-Mutante gegenüber dem *wt* und der *bdA*-Mutante eine etwa doppelt so hohe Gesamtproteinsyntheserate (Abb. 3.23). Die Änderungen der Methioninaufnahme in die Zellen ist der Gesamtproteinsynthese im Verlauf sehr ähnlich und wird in gleicher Weise von cAMP beeinflusst (nicht gezeigt; Schröder & Fracella, unveröff.). Bei 37° C nimmt die Gesamtproteinsyntheserate bei *bdA* und *cr-1* in der ersten Stunde um etwa 50 % zu, erreicht dann wieder Kontrollwerte für etwa 4 h und fällt dann weiter ab. In Gegenwart von 20 μ M 8-Brom-cAMP ist die Gesamtproteinsyntheserate bei 37° C schon während der ersten Stunde nach HS-Beginn bei beiden Mutanten um etwa 30 - 50 % reduziert. Eine kurze Erholung der Proteinsynthese ist nach 2 - 4 h HS zu beobachten, danach ist sie wieder reduziert (nicht gezeigt; Schröder & Fracella, unveröff.).

Abb. 3.23: Einfluß von cAMP auf die Gesamtproteinsynthese (offene Symbole) und Vergleich mit der Anreicherung von HSP70 im Zellkern (●) während eines kontinuierlichen HS (42° C) beim *wt* (a, □), der *bdA*- (a, b) und *cr-1*-Mutante (c, d) von *N. crassa* (b, d = mit 20 μ M 8-Brom-cAMP; a, c = ohne cAMP).

3.10 Expression und Translokation von HSP70 während des circadianen Rhythmus

Eine von einem endogenen Oscillatormechanismus gesteuerte tagesperiodische Rhythmik läuft auch unter konstanten äußeren Bedingungen ab und wird als circadiane Rhythmik bezeichnet. *N. crassa* ist einer der wichtigsten Organismen für genetische und biochemische Untersuchungen der endogenen Rhythmik [Rensing, 1993 & 1995; Lakin-Thomas *et al.*, 1990; Brody, 1992; Dunlap, 1993]. Die circadiane Rhythmik von *N. crassa* ist nach außen durch eine periodische Konidienbildung gut sichtbar (siehe Umschlagbild [Deutsch, 1990; Deutsch *et al.*, 1993]). Die Konidienbildung wird zu Beginn der subjektiven Nacht (CT 12) initiiert und erfolgt über einen Zeitraum von etwa 12 h [Springer & Yanofski, 1989]. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch eine maximale Induzierbarkeit der Haupt-Streßproteine beobachtet [Cornelius & Rensing, 1986; Cornelius, 1994b]. Der Konidienbildungsprozeß ist zwar mit dem Oszillatormechanismus verbunden, aber verschiedene Beobachtungen zeigten, daß diese Verbindung nur in eine Richtung wirkt. So existiert die biochemische Rhythmik auch bei Mutanten, die einen Defekt in der Konidienbildung aufweisen [Brody & Martins, 1973; Nakashima, 1981].

Ist eine erhöhte Expression von HSP70 - wie sie bei der Lufthyphenbildung und der Konidiation beobachtet wurde - oder die spezifische Akkumulation von HSP70 im Zellkern rhythmisch reguliert? Solche Veränderungen könnten als Zeiger der Uhr die rhythmische Sporulation regulieren. Das Protein FRQ (frequency) ist bei *N. crassa* ein essentieller Bestandteil der "molekularen Uhr". FRQ zeigt eine circadiane Expressionsrhythmik und scheint seine Synthese auf transkriptionaler Ebene über einen negativen Feedback-Mechanismus selbst zu regulieren. Es besitzt eine NLS, seine Lokalisation ist allerdings noch unklar [Aronson *et al.*, 1994]. Möglicherweise ist HSP70 über die Vermittlung des Kerntransportes von FRQ am Mechanismus der "molekularen Uhr" beteiligt. Solche rhythmischen Veränderungen des HSP70 sollten in einer Flüssigkultur der *bdA*-Mutante von *N. crassa*, in der die circadiane

Sporulationsrhythmik nicht ausgeprägt ist, eine biochemische Rhythmik aber weiterläuft [Nakashima, 1981], zu beobachten sein. Gemeinsam mit Andreas Kallies, der insbesondere am cAMP-Gehalt und der Lokalisation der cPKA während des circadianen Rhythmus interessiert war (Abb. 3.24), wurde die Menge an HSP70 von bda unter Bedingungen, die eine circadiane Rhythmik erlauben, im Gesamtmyzelium, dem Zellkern und dem Cytoplasma im Western Blot bestimmt (Abb. 3.25).

Andreas Kallies konnte eine rhythmische Veränderung des cAMP-Gehaltes mit Maxima um ct 14 und ct 2 zeigen (Abb. 3.24a). Ebenso beobachtete er ein wenig verzögert um ct 17 und ct 2 auch eine maximale Anreicherung der katalytischen Untereinheit der cPKA im Zellkern (Abb. 3.24b).

HSP70 zeigt in zwei unabhängigen Versuchen (1 = ■; 2 = □) eine Anreicherung im Zellkern um ct 18 und ct 6 (Abb. 3.25 a). Zu diesen Zeitpunkten ist die Menge an HSP70 im Cytoplasma reduziert (nur ein Versuch (□); Abb. 3.25 b). Im Gesamthomogenat (nur ein Versuch (■); Abb. 3.25 c) sind nur geringe Schwankungen der HSP70-Menge mit leichter Erhöhung zu ct 18 und ct 6 zu beobachten. Zusätzlich ist in Abb. 3.25 c der Mittelwert der HSP70-Mengen aus dem Cytoplasma und der Zellkernfraktion des anderen Versuches (□) eingezeichnet. Die so erhaltenen HSP70-Mengen stimmen gut mit denen des Gesamthomogenates überein und bestätigen eine gute Präparation der Fraktionen.

Abb. 3.24: [Ergebnisse von Andreas Kallies, 1995] Entwicklung der cAMP-Menge (a) und der Anreicherung von cPKA im Zellkern (b) während des circadianen Rhythmus der band (bdA)-Mutante von *N. crassa*. bdA wurde unter konstanten Bedingungen (Dauerdunkel, 25° C) in Flüssigmedium kultiviert, zu den angegebenen ct-Zeiten wurden Proben genommen, fraktioniert (Gesamtmyzelium = a; Zellkerne = b) cAMP gemessen und cPKA im Western Blot analysiert, densitometrisch ausgewertet und die rel. Dichte in Prozent des Mittelwertes dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen (Mittelwerte) wobei die Daten den Mittelwert aus drei aufeinanderfolgenden Werten ("moving average") darstellen.

Abb. 3.25: (siehe nächste Seite) Entwicklung der HSP70-Menge und Lokalisation von HSP70 während des circadianen Rhythmus der band (bdA)-Mutante von *N. crassa*. bdA wurde unter konstanten Bedingungen (Dauerdunkel, 25° C) in Flüssigmedium kultiviert, zu den angegebenen ct-Zeiten wurden Proben genommen, fraktioniert (Zellkerne = a; Cytoplasma = b; Gesamtmyzelium = c) und HSP70 im Western Blot analysiert, densitometrisch ausgewertet und die rel. Dichte in Prozent des Mittelwertes dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen (1 = ■; 2 = □) wobei die Daten den Mittelwert aus drei aufeinanderfolgenden Werten ("moving average") darstellen. In (c) ist außer HSP70 im Gesamthomogenat aus Versuch 1 (■) auch der Mittelwert der Fraktionen des Cytoplasmas und der Kerne aus

Versuch 2 (□) dargestellt (▲).

4 Diskussion

4.1 HSP70 aus *N. crassa*

Die Mitglieder der HSP70-Familie sind die bisher am besten untersuchten Streßproteine. Es sind konstitutiv exprimierte und streßinduzierte Vertreter bei vielen Organismen bekannt. Unter konstitutiven Bedingungen sind sie hauptsächlich im Cytoplasma, im endoplasmatischen Retikulum, in der Mitochondrienmatrix, im Zellkern und bei Pflanzen auch in den Chloroplasten lokalisiert [Morimoto *et al.*, 1990; Nover, 1991; Morimoto *et al.*, 1994; Marshall *et al.*, 1990]. Während einer Streßphase akkumulieren sowohl konstitutiv exprimierte wie auch streßinduzierte HSP70-Vertreter im Zellkern und Nucleolus [Welch & Feramisco, 1984; Velaquez & Lindquist, 1984; Ohtsuka & Laszlo, 1992; Martin *et al.*, 1993]. Eine Sequenz von 17 AS wirkt als "targeting" Signal [Dang & Lee, 1988; Milarski & Morimoto, 1989]. Während der Erholung von einem Streß, bzw. noch während eines moderaten Stresses, relokalisiert HSP70 wieder ins Cytoplasma [Hayashi *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992]. In der Hefe wurden von der Arbeitsgruppe um Craig bisher 8 Mitglieder der HSP70-Familie identifiziert und charakterisiert [Lindquist & Craig, 1988; Craig, 1989]. Das Expressionsverhalten der gesamten HSP70-Familie der Hefe ist in Abb. 4.1 dargestellt [Boorstein *et al.*, 1994].

Bei den verschiedenen Mitgliedern der HSP70-Familie lassen sich zwei Hauptdomänen unterscheiden, die N-terminale-ATPase-Domäne und die C-terminale mit Substrat interagierende Domäne. Die am stärksten konservierten Bereiche der HSP70-Homologe wurden in der N-terminalen-Domäne (AS 1-350) gefunden. Mit Hilfe der Röntgen-Kristallographie zeigte die Arbeitsgruppe um McKay, daß diese Domäne ATP bindet. Die dreidimensionale Struktur der 44 kDa großen ATPase-

Domäne des Rinder-HSC70 zeigt vier Bereiche die zwei "Loops" bilden und ATP tief an der Basis der Spalte zwischen den "Loops" binden [Flaherty *et al.*, 1990; Flaherty *et al.*, 1994]. Die ATPase-Domäne ähnelt der des Actins und der Hexokinase [McKay, 1991; Bork *et al.*, 1992]. Sie besitzt eine Calmodulin- und Actin-Bindungsstelle [Stevenson & Calderwood, 1990; Tsang, 1993]. Die C-terminale-Domäne hat eine MHC-ähnliche Struktur [Rippmann *et al.*, 1991]. Pelham (1986) stellt sich eine auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Substratinteraktion vor. Eine bevorzugte Bindung hydrophober AS wurde bereits gezeigt [Richarme & Tohiyama, 1993; Gething *et al.*, 1994]. Die ATPase-Aktivität sowie die Substatbindung und die Faltung von Proteinen wird durch verschiedene "Helfer"-Proteine reguliert (siehe Einleitung; [Cheatham *et al.*, 1994]). In Abb. 4.2 ist die Struktur von HSP70 vereinfacht dargestellt.

Abb. 4.1: Übersicht der Expression, Funktion und Lokalisation der Hefe HSP70-Familie [Boorstein *et al.*, 1994]. Neben der konstitutiven und HS-induzierten Expression ist auch die Expression während des Wachstums in einer "batch"-Kultur gezeigt (exponentielles Wachstum = OD_{600} von 1.0, "diauxic shift" = OD_{600} von 10, stationäre Phase = OD_{600} von 23; KAR2 bzw. SSD1 ist das homologe Protein der Hefe zum Glucose-regulierten 78 kDa-Protein (GRP78) bei Säugerzellen).

Die HSP70-Familie von *N. crassa* besteht aus mindestens sieben ATP-bindenden Vertretern. Diese Zusammensetzung wurde auch von Kapoor & Lewis (1987) beschrieben. Möglicherweise stellen einige der Proteinspots verschieden phosphorylierte Isoformen desselben Proteins dar. In der Literatur sind verschiedene posttrans-

lationale Modifikationen von HSP70 beschrieben worden [Sherman & Goldberg, 1993; Gutierrez & Guerriero, 1995a]. Eine Modifikation ist möglicherweise auch für die HS-induzierte Translokation in den Zellkern nötig [Martin *et al.*, 1993]. Das isolierte Haupt-HSP70 von *N. crassa* hat ein Molekulargewicht von ~69 kDa und einen *pI* um pH 5.2. Innerhalb der cytoplasmatischen Vertreter der Hefe HSP70-Familie (SSA1-4) hat das isolierte Haupt-HSP70 von *N. crassa* die höchste Gesamthomologie zu SSA1 und SSA4 (83 %ige Identität). Aufgrund der identischen AS in den Positionen 27, 28 und 40 des *N. crassa* HSP70 und dem Hefe SSA1/2, und deren Abweichen von der Consensus-HSP70-Sequenz würde ich hier die größte funktionelle Homologie vermuten. Eine nähere Verwandtschaft zu SSA1/2 wird auch durch das Expressionsverhalten des HSP70 von *N. crassa* gestützt. Es wird wie SSA1 in exponentiell wachsenden Zellen konstitutiv exprimiert und läßt sich durch einen HS zu stärkerer Expression stimulieren. SSA3 wird in exponentiell wachsenden Zellen nur nach einem HS exprimiert. Auch die Expression von SSA4 ist nur durch HS induzierbar (Abb. 4.1) [Werner-Washburne *et al.*, 1989; Boorstein *et al.*, 1994; Fuge *et al.*, 1994]. Polyklonale Ak, die spezifisch für das C-terminale Ende von SSA1 sind (Jörg Becker), detektieren in der 2D-Western Blot Analyse von *N. crassa*-Gesamthomogenaten exponentiell wachsender Zellen dasselbe Protein wie die von mir hergestellten Ak gegen das isolierte Haupt-HSP70 von *N. crassa*.

Abb. 4.2: Struktur von HSP70. Eine Protease-sensitive Region unterteilt HSP70 in die ATP- und Substrat- bindende Domäne. Die Kerntranslokationssequenz (NLS) liegt im hinteren Drittel der ATP-bindenden Domäne.

Kürzlich wurde das Haupt- hitzeinduzierbare HSP70-Gen von *N. crassa* kloniert [Kapoor *et al.*, 1995]. Die abgeleitete Proteinsequenz stimmt komplett mit der Sequenz des hier beschriebenen und isolierten Haupt-HSP70 von *N. crassa* überein (siehe Abb. 3.3). Ebenso stimmt die von Kapoor und Mitarbeiter beschriebene geringe konstitutive und HS-induzierte Synthese der mRNA gut mit dem Expressionsverhalten unseres Haupt-HSP70 überein. Vermutlich handelt es sich bei unserem HSP70 um das Produkt des von Kapoor und Mitarbeitern klonierten HSP70-Gens. Für das aus der Gensequenz abgeleitete HSP70 von Kapoor errechnet sich ein Molekulargewicht von 70.5 kDa und ein *pI* von 6.01. Aufgrund der recht ungenauen Bestimmung von MW und *pI* (69 kDa und *pI* 5.2) für unser HSP70 durch 2D-PAGE und entsprechende Markerproteine sind diese Abweichungen mit den errechneten Werten kompatibel.

Die abgeleitete Proteinsequenz des HSP70-Gens von Kapoor und Mitarbeitern zeigt, neben den charakteristisch konservierten Bereichen, eine insgesamt relativ geringe Homologie zu HSP70 anderer Organismen. Die geringste Homologie weist die C-terminale-Domäne auf. Zu den Hefe-HSP70 SSA1 und 2 besteht mit etwa 81 %iger Identität die höchste Homologie. Zu HSP70 von Mais und Karotte bestehen mit 73 und 70 %iger Identität die nächsthöchsten Homologien. Obwohl für Pilze eine nähere Verwandtschaft mit tierischen Organismen angenommen wird [Baldauf & Palmer, 1993], zeigen die HSP (HSP30 und HSP70) von *N. crassa* eine höhere Homologie zu HSP pflanzlicher Organismen [Plesofsky-Vig & Brambl, 1990; Plesofsky-Vig *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1993].

Der Abbau von Streßproteinen wurde bisher nur wenig untersucht. Einige Streßproteine scheinen auch selbst Proteaseaktivität zu haben. Für HSP70 wurde eine autoproteolytische Aktivität beschrieben [Mitchell *et al.*, 1985]. HSP104 und HSP78 sind homolog zu Proteinen der Clp-Familie von *E. coli*, welche mit ATP-abhängigen Proteasen interagieren [Squires & Squires, 1992; Leonhardt *et al.*, 1993]. Proteine, die aufgrund zu starker Schädigung auch mit Hilfe der Streßproteine nicht renaturiert werden können, werden von den Streßproteinen der lysosomalen oder der ATP-abhängigen Degradation im Cytoplasma und dem Zellkern zugeführt [Dice *et al.*,

1994; Kandror *et al.*, 1994; Goldberg, 1992; Parsell & Lindquist, 1993].

Unter Streßbedingungen wird der Proteinumsatz in der Zelle stark verändert. Die Gesamtproteinsynthese- und die Gesamtproteindegradationsrate werden reduziert. Gleichzeitig zeigen einzelne Proteasen, vor allem ATP-abhängige, eine erhöhte Aktivität [Mohsenzadeh *et al.*, 1994; Hilt & Wolf, 1992; Fischer *et al.*, 1994; Higgins & Lilly, 1993; Pratt *et al.*, 1989; Harcum & Bentley, 1993; Váchoá *et al.*, 1994; Xu, 1995]. Eine parallele Reduzierung der Proteinsynthese- und der Proteindegradationsrate lassen eine gemeinsame Regulation beider Prozesse vermuten [Steinberg & Vaughan, 1956]. Eine neuere Arbeit beschreibt eine wichtige Funktion des Translationselongationsfaktor EF-1 σ auch für die ATP- und Ubiquitinabhängige Degradation durch Proteasomen. Bekannt ist seine Funktion im ternären Komplex mit aminoacyl-tRNA und GTP bei der Translationselongation. Eine Bindung von GTP an EF-1 σ schützt die Degradationsfunktion im Ubiquitinsystem vor einer Inaktivierung durch HS [Gonen *et al.*, 1994].

Saadat Mohsenzadeh (1993) [Mohsenzadeh *et al.*, 1994] und Cunshuan Xu (1995) konnten durch "Pulse - Chase" -Experimente mit [³⁵S]-Methionin zeigen, daß HSP70 eine recht lange Halbwertszeit hat und seine Degradation durch einen HS anscheinend noch mehr inhibiert wird. Eine Reduktion der Abbaurrate nach einem HS trägt neben der verstärkten Synthese von HSP70 wesentlich zum langanhaltend hohen HSP70-Gehalt bei und korrespondiert mit einer erhöhten Stabilität der HSmRNA [Petersen & Lindquist, 1988] und der ebenfalls für andere Organismen beschriebenen langen Halbwertszeit [Sanders *et al.*, 1992; Kiang *et al.*, 1994].

HSP70 wird in einem ersten Degradationsschritt in ein ~44 kDa und ein ~27-30 kDa großes Peptid gespalten (siehe Abb. 4.2 "protease sensitive site"; [Mitchell *et al.*, 1985]). Das N-terminale, stabilere ~44 kDa große Peptid ist wahrscheinlich identisch mit dem von uns ansequenzierten und im Western Blot detektierbaren ~40 kDa großen Abbauprodukt von HSP70. Die Abnahme der Menge des 40 kDa-Abbauproduktes von HSP70 im Western Blot in Gesamthomogenaten und Zellkernextrakten während und nach einem HS bestätigen die Reduktion der HSP70-Degradation aus

früheren Experimenten. Die Menge des 40 kDa-Abbauproduktes von HSP70 erreicht schon nach 2 h Erholung nach einem HS wieder die unter Kontrollbedingungen übliche Menge. Geht man davon aus, daß sich die Abbaurate des 40 kDa-Peptides durch den HS nicht verändert, ist diese Mengenveränderung sehr ähnlich der Hemmung und Erholung der ATP-unabhängigen Proteaseaktivitäten. Da von den ATP-unabhängigen Proteasen außerdem bekannt ist, daß sie bevorzugt langlebige Proteine - zu denen auch HSP70 gehört - abbauen, scheint zumindest der erste Schritt der HSP70-Degradation durch ATP-unabhängige Proteolyse zu erfolgen [Xu, 1995; Mohsenzadeh *et al.*, 1994]. Möglicherweise ist die Hemmung der HSP70-Degradation aber auch eine indirekte Folge des HS selbst. Die Bindung der durch HS vermehrt vorhandenen denaturierten Proteine an HSP70 könnte den Proteaseempfindlichen Bereich schützen und eine Bindung bzw. Aktivität von Proteasen verhindern.

Die absolute im ELISA bestimmte HSP70-Menge ist in exponentiell wachsendem Myzelium von *N. crassa* unter konstitutiven Bedingungen sehr hoch. HSP70 macht hier etwa 3 % des Gesamtproteins (31 ng HSP70/ μ g Gesamtprotein) aus und ist damit mehr als drei mal so hoch wie bei Ratten Gliom (C6) Zellen. Bei *N. crassa* nimmt die HSP70-Menge nach einem HS etwa um das 1.7 fache zu. Bei den C6-Zellen ist eine Zunahme um etwa das 3 fache zu beobachten. Die höhere Menge an HSP70 bei *N. crassa* könnte für die natürlicherweise auftretenden Schwankungen der Umweltbedingungen, im Sinne einer größeren Toleranz, von Vorteil sein. Bei einer extremen Belastung müßte zu einer ohnehin recht hohen Streßproteinmenge nur noch wenig neusynthetisiert werden um auch hier ausreichenden Schutz zu vermitteln. Säugerzellen sind in ihrer natürlichen Umgebung in der Regel keinen größeren Schwankungen ausgesetzt. Eine hohe Streßproteinmenge unter konstitutiven Bedingungen scheint daher entbehrlich zu sein. Bei Auftreten eines Stressses kann der erhöhte Bedarf an Streßproteinen nur durch eine massive Neusynthese gedeckt werden. Sehr hohe Streßproteinmengen unter konstitutiven Bedingungen sowie eine nur geringe Expressionssteigerung nach einem Streß wurde auch von anderen Organismen, die starken natürlichen Schwankungen ihrer Umwelt ausgesetzt sind, wie z.B. bei *Leishmanien*, wechselwarmen Tieren und bei Pflanzen, berichtet [J. Clos, persön-

liche Mitteilung; Zhongmo *et al.*, 1994; Fader *et al.*, 1994; Adham *et al.*, 1991]. Ein Vergleich der konstitutiven HSP70-Menge verschiedener Gewebe des Rindes zeigte eine relativ geringe Menge in Zellen des Gehirns und bestätigt unsere Mengenbestimmung bei Ratten Gliom (C6) Zellen [Gutierrez & Guerriero, 1991 & 1995b; Tanguay *et al.*, 1993].

4.2 Translokation von HSP70 bei Hitzeschock

Das mit dem von uns isoliertem HSP70 vermutlich identische Haupt-hitzeinduzierbare-HSP70 von *N. crassa* [Kapoor *et al.*, 1995] besitzt, wie viele HSP70, eine N-terminal zwischen AS 244 bis 260 lokalisierte, funktionelle Kerntranslokationssequenz (NLS). Sie besteht aus 17 AS und ist homolog zu bereits beschriebenen NLS [Dang & Lee, 1988; Milarski & Morimoto, 1989]. Am C-terminalen Ende existiert ein hydrophobes Pentapeptid, welches bei vielen HSP70 vorkommt und wahrscheinlich für die, trotz vorhandener NLS, hauptsächlich cytoplasmatische Lokalisation dieser HSP70 verantwortlich ist. Möglicherweise blockiert dieses Pentapeptide durch intramolekulare Wechselwirkungen die NLS unter konstitutiven Bedingungen. Durch einen Streß könnte diese Wechselwirkung direkt oder indirekt gestört und die NLS freigelegt werden. Zur Translokation von HSP70 scheint eine Phosphorylierung oder eine andere posttranslationale Modifikation nötig zu sein [Martin *et al.*, 1993]. Durch sie könnte die intramolekulare Interaktion zwischen dem C-Terminus und der NLS möglicherweise gehemmt werden. Versuche bei denen in *Xenopus* Oozyten injiziertes C-terminal deletiertes HSC70 auch unter konstitutiven Bedingungen eine Anreicherung im Zellkern zeigte, bestätigen eine Funktion der C-terminalen-Domäne bei der Translokation von HSC70 [Mandell & Feldherr, 1992]. Eine ähnliche Regulation ist auch für die Kerntranslokation des HSF beschrieben [Larson *et al.*, 1993; Rabindran *et al.*, 1993; Lis & Wu, 1993; Morimoto, 1993].

In isolierten Zellkernen ist der Gesamtproteingehalt nach einem HS stark erhöht [Tomasovic *et al.*, 1978; Roti Roti *et al.*, 1979; Stege *et al.*, 1995]. Sie ist nur zu etwa 10 % auf eine induzierte Translokation in den Zellkern [Chu *et al.*, 1993] zu-

rückzuführen und beruht hauptsächlich auf einer verstärkten Aggregation von Kernproteinen ("intranuclear protein aggregation"; Stege *et al.*, 1995), die im aggregiertem Zustand während der Isolation nicht aus dem Kern ausgewaschen werden. Zu diesen im Zellkern aggregierenden Proteinen gehören Polymerasen, Topoisomerasen und c-myc [Kampinga *et al.*, 1985; McConnell *et al.*, 1987; Fisher *et al.*, 1989; Evan & Hancock, 1985]. Das Ausmaß der anfänglichen Aggregation sowie die Dauer der anschließenden Erholung (Disaggregation) korrelieren mit dem Grad der letalen Zellschädigung nach einem HS [Kampinga *et al.*, 1987 & 1989; Wallen & Landis, 1990]. Sowohl die Verhinderung der anfänglichen Proteinaggregationen als auch eine erleichterte Reparatur denaturierter Proteine sind zwei Hauptfunktionen der Streßproteine (z.B. von HSP70; siehe Einleitung). Besser als eine insgesamt erhöhte HSP70-Menge korreliert eine erhöhte Menge an HSP70 im Zellkern mit einer Thermotoleranz dieser Zellen [Kampinga, 1993; Stege *et al.*, 1995]. Möglicherweise werden neben HSP70 aber auch Kofaktoren wie z.B. das DnaJ-homologe HSP40 benötigt [Ohtsuka *et al.*, 1993]. Der Bedarf an Kofaktoren ist möglicherweise auch der Grund warum mikroinjizierte Anti-HSP70-Ak zur Reduktion einer Hitzeresistenz führen, aber HSP70-überexprimierende Zellen keine erhöhte Thermotoleranz aufweisen [Riabowol *et al.*, 1988; Weitzel & Li, 1993; Stege *et al.*, 1995]. Bei einer induzierten Thermotoleranz durch eine Streßvorbehandlung werden sowohl HSP70 als auch die benötigten Kofaktoren verstärkt exprimiert [Stege *et al.*, 1995].

Das Haupt-HSP70 der *bdA*-Mutante von *N. crassa* akkumuliert während eines HS sehr schnell im Zellkern. Bereits nach 5 min ist es dort signifikant erhöht und erreicht ein Maximum nach 40 min andauerndem HS. Danach findet eine langsame Relokalisation statt, aber noch nach 36 h kontinuierlichem HS ist eine erhöhte HSP70-Menge im Zellkern nachweisbar. Eine Relokalisation von HSP70 ins Cytoplasma während der Erholung nach einem Streß bzw. noch während eines moderaten Stress wurde auch bei anderen Zellen beobachtet [Hayashi *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992]. Bei der *cr-1*-Mutante beträgt der Anstieg der HSP70-Menge im Zellkern nach 2 h HS bei 37 und 42° C nur etwa 20 - 30 % des Anstiegs bei der *bdA*-Mutante. Nach 4 - 8 h andauerndem HS ist die Menge an HSP70 im Zellkern schon wieder reduziert und sinkt bei noch längerem HS unter die nicht gestreßter Zellen. Die Kerntranslokation von

HSP70 ist wie die Synthese abhängig von der Höhe und Dauer der applizierten Temperatur. Sowohl bei bdA als auch bei cr-1 ist die Menge an HSP70 im Zellkern nach 2 h bei 42° C etwa doppelt so hoch wie nach 2 h bei 37° C. Unter dem Einfluß von 20 µM 8-Brom-cAMP wird die Anreicherung von HSP70 im Zellkern bei bdA und cr-1 erhöht. In Gegenwart von cAMP ist der Anstieg der HSP70-Menge im Zellkern der cr-1-Mutante nach 2 h bei 42° C dann annähernd genauso hoch wie bei bdA in Abwesenheit von cAMP.

Für den Schutz und die Reparatur von Proteinen wird eine bestimmte, von der Stärke des Stresses abhängige, Menge an HSP70 insgesamt, vor allem aber auch im Zellkern benötigt. Zellen der cr-1-Mutante haben eine konstitutiv erhöhte HSP70-Menge sowohl insgesamt als auch im Zellkern. Die zusätzlich benötigte Menge an HSP70 bei der cr-1-Mutante ist also geringer als die beim wt oder der bdA-Mutante. Dies könnte die geringere Anreicherung von HSP70 insgesamt und im Zellkern von cr-1 erklären. Die konstitutive Menge an HSP70 wird durch eine Behandlung mit 20 µM 8-Brom-cAMP beim wt wie bei cr-1- und der bdA-Mutante reduziert. Die durch cAMP verringerte Menge an HSP70 führt zu einem erhöhtem Bedarf an zusätzlichem HSP70. So ist dann auch die Anreicherung von HSP70 insgesamt und im Zellkern unter HS-Bedingungen in Gegenwart von cAMP bei bdA und cr-1 erhöht. Möglicherweise wird die Kerntranslokation von HSP70 aber auch direkt über cAMP bzw. cPKA regulierte Phosphorylierung von HSP70 beeinflusst. Die konstitutiv erhöhte Menge an HSP70 insgesamt und im Zellkern der cr-1-Mutante könnte zu der von Terenzi und Mitarbeitern [Cruz *et al.*, 1988] beschriebenen, erhöhten Thermotoleranz trotz einer geringeren zusätzlichen Anreicherung von HSP70 im Zellkern während eines Stresses erklären.

Außer den Hinweisen auf eine allgemeine Funktion wie Schutz, Stabilisierung und Wiederherstellung von Kernproteinen und der Kernmatrix sowie dem Schutz des Nucleoli (Präribosomen) ist ein möglicher weiterer funktioneller Aspekt der Kernakkumulation von HSP70 noch weitgehend unklar. Möglicherweise wird durch HSP70 auch ein Schutz der DNA oder eine erleichterte Reparatur geschädigter DNA sichergestellt [Abe *et al.*, 1995]. Während eines HS ist für HSC70 eine Assoziation

mit der Topoisomerase I im Zellkern beschrieben worden [Ciavarra *et al.*, 1994]. Da HSP70 als wichtige Komponente bei der Regulation der Streßantwort vermutet wird ist auch eine Beteiligung von HSP70 an Transkriptionsvorgängen denkbar. Möglicherweise ist HSP70 für den Transport spezifischer Transkriptionsfaktoren in den Zellkern verantwortlich [Moreau *et al.*, 1994]. Bei *Xenopus leavis* akkumuliert HSP70 während der Gastrulation im Zellkern der involutierenden Zellen in der marginalen Zone und scheint an der Kontrolle der zellulären Internalisation beteiligt zu sein [Herberts *et al.*, 1993]. Auch eine direkte Beteiligung an der Regulation bestimmter Gene wäre denkbar. Sowohl eine Beteiligung an der negativen Regulation der "normalen"-Gene unter HS-Bedingungen als auch an der Rückregulation der HS-Gene nach dem HS durch HSP70 wurden schon diskutiert [Morimoto, 1991; 1993; Morimoto *et al.*, 1992]. Einigen Berichten zufolge scheint HSP70 auch an der DNA-Synthese bzw. Replikation beteiligt zu sein [Milarski & Morimoto, 1986; Milarski *et al.*, 1989; Georgopoulos *et al.*, 1990].

Die Gesamtproteinsynthese wird durch einen HS und andere Stressoren stark inhibiert. Bei einer Hemmung der Gesamtproteinsynthese um 50 % beobachteten wir eine maximale Induktion der Streßproteine [Meyer *et al.*, 1995]. Unklar ist, ob die Hemmung der Gesamtproteinsynthese auf Transkriptions-, Translations- oder auf beiden Ebenen stattfindet, und ob die Streßproteine bei der Erholung der Proteinsynthese eine Rolle spielen. Eine induzierte Thermotoleranz [Henle, 1987] korreliert mit einer erhöhten Menge an Streßproteinen und der Stabilität der Proteinsynthese gegenüber dem Streß [Mizzen & Welch, 1988]. Mizzen und Welch (1988) prägten den Begriff einer "translational thermotolerance", die möglicherweise durch Streßproteine hervorgerufen wird.

Bei der Initiation der Translation am Ribosom ist der heterodimere eIF-2 ein wichtiger Faktor des ternären Komplexes. eIF-2 wird durch Phosphorylierung der α -Untereinheit reguliert. Durch die Phosphorylierung an Serin 51 wird die Ausbildung des ternären Komplexes inhibiert. Unter strengen HS-Bedingungen wurde eine Korrelation der Phosphorylierung von eIF-2 α und der Hemmung der Proteinsynthese gefunden [Duncan & Hershey, 1989]. Ein gegen die Phosphorylierung resistenter eIF-

2 ϵ (Ser51 \rightarrow Ala51) hat einen stabilisierenden Effekt auf die Proteinsynthesehemmung durch HS [Murtha-Riel *et al.*, 1993]. Zur Phosphorylierung des eIF-2 ϵ sind eine Hämin-kontrollierte- und eine durch doppelsträngige RNA-aktivierte Kinase in der Lage. Die aktivierte Hämin-kontrollierte Kinase kann, außer durch Hämin, auch durch einen "supernatant factor" im Kaninchenretikulocyten-Lysat inaktiviert werden. Dieser "supernatant factor" wurde kürzlich als ein Mitglied der HSP70-Familie beschrieben [Gross *et al.*, 1994]. Die inaktive Vorform der Hämin-kontrollierten Kinase interagiert ebenfalls mit verschiedenen Streßproteinen (HSP90, HSP70) und wird möglicherweise von diesen in der inaktiven Form gehalten. Eine ähnliche Funktion ist für HSP90 und Steroid-Hormon-Rezeptoren beschrieben worden [Bohen & Yamamoto, 1994]. Auch wird über die Aktivierung des HSF2 durch Hämin die Expression von HSP70 stimuliert [Sistonen *et al.*, 1992]. Der Zusatz von isoliertem HSP70 zu heterologen *in vitro* Translationsansätzen im Kaninchenretikulocyten-Lysat führte zu einer starken Hemmung der Translation [Saupe-Thies & Fracella, unveröff.]. Bei diesen Versuchen ist allerdings nicht ganz auszuschließen, daß ein Teil des HSP70 durch die Isolationsroutine denaturiert wurde und denaturierte Proteine sind als potente Aktivatoren der Hämin-kontrollierten Kinase beschrieben worden [Matts *et al.*, 1993]. Auch durch verschiedene Stressoren werden Proteine denaturiert. Diese werden als mögliche Auslöser der Streßantwort diskutiert und könnten über die Aktivierung der Hämin-kontrollierten Kinase auch zur Hemmung Gesamtproteinsynthese beitragen. Außer einer HS-abhängigen Phosphorylierung von eIF2 ϵ , wurde auch eine HS-abhängige Dephosphorylierung anderer Initiationsfaktoren (eIF-4B, eIF4F) beschrieben [Duncan *et al.*, 1995; Rhoads, 1993]. Diese haben ebenfalls Proteinsynthese-hemmende Effekte. Die Translation "normaler"-mRNA scheint von funktionsfähigem eIF-4F abzuhängen, während die Translation von HS-mRNA auch bei defektem oder inaktiven eIF-4F abläuft und eine präferentielle Translation der HS-mRNA erklären könnte [Zapata *et al.*, 1991; Sierra & Zapata, 1994; Zapata *et al.*, 1994]. Bei HS wird auch die große Untereinheit der RNA-Polymerase II phosphoryliert [Dubois *et al.*, 1994]. Bei einer Reihe eukaryotischer Zellen wurden auch Phosphorylierungsänderungen des ribosomalen Proteins S6 beobachtet [Tas & Martini, 1987]. Einige Mitglieder der HSP70-Familie

binden neusynthetisierte Proteine bereits am translatierenden Ribosomen-Komplex [Beckman *et al.*, 1990; siehe Einleitung]. Bei der Hefe übernehmen die konstitutiven SSB1 und 2 diese Funktion [Nelson *et al.*, 1992]. SSB1/2 defekte Mutanten wachsen sehr langsam und sind extrem sensitiv für verschiedene Proteinsynthese-Inhibitoren.

Ohtsuka und Mitarbeiter beschreiben eine Korrelation zwischen der Relokalisation von HSP70 aus dem Zellkern ins Cytoplasma nach bzw. während der ersten 4 h eines andauernden moderatem HS und der Erholung der Gesamtproteinsynthese bei verschiedenen Säugetierzellen [Hayashi *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992]. Diese Effekte ließen sich einerseits durch die eine Schutz- und Reparaturfunktion von HSP70 auf Transkriptionsebene erklären. Andererseits könnte das ins Cytoplasma relokalisierende HSP70 aber auch dort eine bessere Funktion auf Translationsebene vermitteln. Möglicherweise begleitet HSP70 unter Streßbedingungen gebildete ribosomale Untereinheiten aus dem Kern ins Cytoplasma und ist am korrekten Zusammenbau der Ribosomen beteiligt.

Erste gemeinsam mit Torsten Schröder durchgeführte Untersuchungen der Gesamtproteinsyntheserate unter verschiedenen kontinuierlichen HS-Bedingungen und dem Einfluß von cAMP sollten einen möglichen Zusammenhang zur Akkumulation von HSP70 im Zellkern bzw. der Relokalisation ins Cytoplasma auch bei *N. crassa* aufzeigen. Bereits nach 20 min andauerndem HS bei 43° C ist eine 30 - 70 %ige Hemmung der Proteinsynthese beim wt und der bdA-Mutante von *N. crassa* zu beobachten. Während der ersten 2 - 4 h des andauernden HS zeigt die Synthese eine kurze Erholung und wird dann wieder reduziert. Die Proteinsynthese der cr-1-Mutante unterscheidet sich nur leicht von der des wt und bdA. Insgesamt ist die Proteinsynthese bei cr-1 konstitutiv und unter HS-Bedingungen wesentlich stärker, und die anfängliche Hemmung beträgt hier nur etwa 25 %. Bei andauerndem HS in Gegenwart von 8-Brom-cAMP wird die Proteinsynthese stärker gehemmt und zeigt auch keine Erholung.

Ein milder HS bei 37° C führt beim wt, bdA und cr-1 zu einer anfänglichen Proteinsynthesesteigerung um etwa 30 %. Später ist die Proteinsynthese auch bei

37° C reduziert. In Gegenwart von 8-Brom-cAMP ist die Proteinsynthese schon zu Beginn des milden HS reduziert. Im Gegensatz zu den Versuchen von Ohsuka und Mitarbeitern [Hayashi *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992] scheint bei unseren Experimenten die Erholung der Proteinsynthese mit der Menge an HSP70 im Zellkern zu korrelieren. Eine Relokalisation von HSP70 aus dem Zellkern korreliert mit einer erneuten Hemmung der Proteinsynthese. Ein weiterer Versuch zeigte, daß die Methioninaufnahme in die Zellen während des gesamten Versuchs mit dem Einbau von Methionin in Proteine korreliert. Das bedeutet, daß die später reduzierte Proteinsynthese hauptsächlich auf die reduzierte Methioninaufnahme zurückzuführen ist. Aber zur genauen Verifizierung dieser Ergebnisse bedarf es noch weiterer Versuche. Bei Säugerzellen wurde ebenfalls eine starke Proteinsynthesehemmung von etwa 90 % beschrieben. Die Methioninaufnahme ist hier um etwa 50 - 60 % gehemmt. Bei diesen Zellen beruht die Reduktion der Proteinsynthese unter HS-Bedingungen auf der Kombination von reduzierter Methioninaufnahme und einem Defekt der Proteinsynthese [De Maio *et al.*, 1993]. Wenn HSP70 eine limitierende Größe des funktionellen Translationsapparates darstellt, könnte eine erhöhte Menge an HSP70 zu einer erhöhten Proteinsynthese führen. Die *cr-1*-Mutante zeigt sowohl eine erhöhte HSP70-Menge als auch eine erhöhte Gesamtproteinsynthese gegenüber dem *wt*. Ebenso zeigt eine HSP70-überexprimierende-Mutante [Häfker; unveröff.] eine erhöhte Gesamtproteinsynthese. Ein interessanter weiterer Ansatz zu einer möglichen Rolle von HSP70 bei allgemeinen Transkriptionsvorgängen wäre der Zusatz konstitutiv und HS-induziert exprimierter HSP70-Vertreter zu *in vitro*-Transkriptionen oder "nuclear run on/off" Experimenten.

4.3 Expression von HSP70 während der asexuellen Entwicklung

Wie schon erwähnt beinhalten die verschiedenen Gruppen der Streßproteine neben den nur durch Streß induzierbaren Vertretern auch solche, die bei Abwesenheit von Streß exprimiert werden und wichtige Funktionen erfüllen. Unter diesen konstitutiv exprimierten Streßproteinen unterscheidet man solche, die ständig in etwa gleicher Menge synthetisiert werden, sie sind für die korrekte Faltung neusynthetisierter Proteine und ihren Transport innerhalb der Zelle zuständig (siehe Einleitung), und solche, die während der Entwicklung und Differenzierung von Organismen und Zellen unterschiedlich stark oder nur kurzfristig exprimiert werden [Hightower & Nover, 1991; Heikkila, 1993]. Auch innerhalb der HSP70-Familie werden einzelne Mitglieder unterschiedlich reguliert. Von den in der Hefe identifizierten 8 Mitgliedern der HSP70-Familie finden sich SSA1 und 2 in relativ großer Menge in exponentiell wachsenden Zellen und beim Übergang zur stationären Phase während des "diauxic shift". SSA3 wird konstitutiv nur während der stationären Phase exprimiert. SSB1 und 2 sowie SSC1 zeigen ebenfalls hohe Konzentrationen während des exponentiellen Wachstums, wobei die Menge mit fortschreitendem Alter der Hefezellen - beim Wachstum zur stationären Phase - stetig geringer wird (siehe Abb. 4.1) [Werner-Washburne *et al.*, 1989; Lindquist & Craig, 1988; Craig, 1989; Boorstein *et al.*, 1994; Fuge *et al.*, 1994]. Bei *N. crassa* konnten wir vier konstitutiv exprimierte, ATP-bindende Mitglieder der HSP70-Familie identifizieren. Die entwicklungsabhängige Expression wurde nur für das Haupt-HSP70 - welches von den hergestellten Anti-HSP70-Ak erkannt wird - näher charakterisiert.

Während des Zellzyklus werden Mitglieder der HSP70-Familie in der S-Phase verstärkt synthetisiert und akkumulieren im Zellkern. Hier könnte eine mögliche Funktion eine Beteiligung an der DNA-Synthese bzw. Replikation sein [Milarski & Morimoto, 1986; Milarski *et al.*, 1989; Georgopoulos *et al.*, 1990]. Hang und Fox (1995) berichten eine vom Zellzyklus und der DNA-Synthese abhängige Expression

von HSP70. Durch Inhibitoren der DNA-Synthese wird auch die Induktion von HSP70 gehemmt [Hang & Fox, 1995]. In ersten Experimenten konnten auch wir eine verstärkte Akkumulation von HSP70 im Zellkern während der S-Phase des Zellzyklus des Schleimpilzes *Physarum polycephalum* zeigen. Diese Akkumulation scheint hauptsächlich auf einer Translokation aus dem Cytoplasma und weniger auf einer Neusynthese zu beruhen [Gevers *et al.*, unveröff.].

Viele Stadien der Entwicklung oder Differenzierung verschiedener Organismen sind nicht gleich sensitiv für erhöhte Temperaturen. Oft korreliert die durch einen HS hervorgerufene Schädigung in bestimmten Phasen, neben der Höhe und der Dauer der applizierten Temperatur, auch mit einer Unfähigkeit Streßproteine zu synthetisieren. Möglicherweise wird durch eine erhöhte Expression und Anreicherung von Streßproteinen vor Phasen in denen keine Streßproteine synthetisiert werden können, eine gewisse Streßproteinmenge für diese Phasen sichergestellt, um einem eventuellem Streß auch während dieser Phasen entgegenwirken zu können [Winter & Sinibaldi, 1991]. Einige Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse werden auch durch einen HS stimuliert.

Bei verschiedenen Pilzen ist eine unterschiedlich starke Regulation von Streßproteinen während der Entwicklung beschrieben worden. Beim Oomyceten *Achlya ambisexualis* wird durch Steroid-Hormone, neben der Differenzierung (lateral, verzweigtes Hyphenwachstum und Gametangienausbildung), auch eine verstärkte Synthese von HSP85 und HSP70 stimuliert. Während für HSP85 eine direkte Funktion in der Steroid-Hormon regulierten Genexpression bekannt ist [Bohen & Yamamoto, 1994], spielt HSP70 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der während der Differenzierung veränderten Proteinsekretion oder dem lateralen Hyphenwachstum [Brunt *et al.*, 1990; Silver *et al.*, 1993]. Bei *Dictyostelium discoideum* und *Saccharomyces cerevisiae* ist der Übergang von vegetativem Wachstum zu Differenzierung (Sporulation) mit einer erhöhten Transkription von HS-mRNA verbunden [Kurtz & Lindquist, 1984]. Eine erhöhte HSP70-Expression ist auch während der Sporulation von *Blatocladia emersonii* beschrieben worden [Bonato *et al.*, 1987; Marucci *et al.*, 1995]. Über die konstitutive Expression von

Streßproteinen während der Entwicklung und Differenzierung von *N. crassa* existieren nur wenige Berichte (siehe Einleitung).

Eine stark unterschiedliche Regulation der Streßproteine während der Entwicklung wurde auch bei Tieren und Pflanzen beschrieben [Hightower & Nover, 1991; Heikkila, 1993; Winter & Sinibaldi, 1991]. In keimenden Mais- und *Tradescantia*-Pollen können keine Streßproteine nach einem HS synthetisiert werden [Cooper *et al.*, 1984; Frova *et al.*, 1989]. Xiao und Mascarenhas (1985) zeigten, daß Streßproteine in *Tradescantia*-Pollen möglicherweise für den Gebrauch während der Keimung gespeichert werden.

Das Haupt-HSP70 von *N. crassa* wird während der asexuellen Entwicklung und Differenzierung unterschiedlich stark exprimiert. Höchste Mengen an HSP70 wurden in älteren Lufthyphen während der späten Konidiationsphase und in schlafenden Konidien gefunden. Während der Konidienkeimung nimmt die HSP70-Menge leicht ab und steigt während des exponentiellen Wachstums wieder an. Beim Wachstum zur stationären Phase nimmt der HSP70-Gehalt insgesamt leicht ab, während die HSP70-Menge im Zellkern leicht zunimmt. In all diesen Phasen, mit Ausnahme des Wachstums zur stationären Phase, ist die HSP70-Menge invers mit dem cAMP-Gehalt [Kallies, 1995] in diesen Entwicklungsstadien korreliert.

Bisher konnte den entwicklungspezifisch exprimierten Streßproteinen keine spezielle Funktion zugeordnet werden. Auch die Regulation der HS-Gene während der Entwicklung und Differenzierung ist noch weitgehend unbekannt (siehe Einleitung). Die Auslösung von Entwicklungs- oder Differenzierungsprogrammen ist immer mit starken Veränderungen der Proteinsynthese verbunden - möglicherweise ist auch hier die Kerntranslokation von regulativen Faktoren durch HSP70 essentiell. Des weiteren ist die Morphogenese bei Pilzen stark abhängig vom vesikulärem Transport neuen Zellwandmaterials [Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989]. Faktoren die diesen Transport beeinflussen haben also auch einen Effekt auf die Gestaltbildung der Zelle. Als ATPase zur Clathrin-Abspaltung von "coated"-Vesikeln ist HSP70 schon seit längerem bekannt [Schlossman *et al.*, 1984; Chappel *et al.*, 1987]. HSP70 kann also

direkt in den vesikulären Transport eingreifen. Innerhalb der Hefe-HSP70-Familie haben SSA1 und 2 die größte Clathrin-Abspaltungs-Aktivität [Gao *et al.*, 1991].

Die Sporulation bei der Hefe und die Konidiation bei *N. crassa* werden durch verschiedene ungünstige Umweltbedingungen ausgelöst. Eine erhöhte Menge an Streßproteinen in Konidien, die als Überdauerungsstadien widrigen Bedingungen standhalten müssen, erscheint sinnvoll, da sie eine Resistenz gegen viele sonst letale Einflüsse vermitteln können. In trockenen Sonnenblumen-Samen wird die mRNA verschiedener kleiner HSP und auch die HSP selbst gespeichert, ihre erhöhten Mengen nehmen während der Keimung ab [Almoguera & Jordano, 1992; Coca *et al.*, 1994]. Bei der frühen Entwicklung des Weizens nimmt die mRNA-Menge verschiedener Streßproteine (u. a. HSP70) zu, während die Menge der entsprechenden Proteine abnimmt (HSP26 und 70) [Kruse *et al.*, 1993]. Eine Abnahme der Menge bestimmter Mitglieder der HSP70-Familie bei gleichzeitiger Zunahme anderer HSP70-Vertreter wurde auch während der Samenkeimung von Bohnen beschrieben und scheint auf einer spezifischen Degradation zu beruhen [Wang & Lin, 1993]. In trockenen Kresse-Samen ist ein 32 kDa-Abbauprodukt von HSP70 stark angereichert. Dieses Abbauprodukt ist identisch mit der C-terminalen Substrat-bindenden Domäne von HSP70 und wird während der Keimung schnell weiterabgebaut. Der Keimungsinhibitor Coumarin verhindert die Proteolyse des 32 kDa großen HSP70-Fragmentes. Möglicherweise ist das 32 kDa-Peptid ein natürlicher Keimungsinhibitor und muß für eine erfolgreiche Keimung abgebaut werden. In den trockenen Samen könnte das 32 kDa-Peptid eine stabilisierende Funktion für andere gespeicherte Proteine haben. Dem 32 kDa-Peptid fehlt die zur Auflösung von HSP70-Substratprotein-Komplexen wichtige ATP-bindende Domäne, so daß das Substratprotein während der Keimung dann möglicherweise nur durch den proteolytischen Abbau des 32 kDa-Peptides entlassen werden kann [Oster *et al.*, 1992]. Eine vor einem HS schützende Funktion der C-terminalen-Domäne von HSP70 ohne funktionelle N-terminale-Domäne wurde auch von Li *et al.* (1992) berichtet.

Auch die Abnahme der im Western Blot bestimmten relativen HSP70-Menge während der Konidienkeimung könnte neben einer verringerten Synthese auch auf

einer verstärkten Degradation beruhen. Daher sind Untersuchungen zur Translation während der Konidienkeimung sowie eine Analyse der HSP70-mRNA-Menge besonders interessant. Thomas Häfker und Gabi Steier aus unserer Arbeitsgruppe zeigten eine geringe Translation der mRNA eines 70 kDa großen Proteins sowie eine geringe Menge einer HSP70-mRNA in schlafenden Konidien und eine Zunahme während der ersten zwei Stunden der Konidienkeimung. Vermutlich handelt es sich bei der mRNA um die eines nur HS-induzierbaren HSP70-Familienmitgliedes. Während der Konidiation der Lufthyphen nimmt die mRNA dieses Proteins in ähnlicher Weise zu wie die Menge des Haupt-HSP70. Plesofsky-Vig & Brambl (1985a & b) fanden in schlafenden Konidien von *N. crassa* gespeicherte mRNA der 70, 90 und 100 kDa großen HSP. Carl Scholle, ein Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, konnte durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Northern Blot Analysen eine differentielle Expression einiger HSP während verschiedener Phasen der asexuellen Entwicklung von *N. crassa* zeigen. In Konidien fand er eine hohe konstitutive Expression von Streßproteinen im 80 und 70 kDa-Bereich. Die verschiedenen Mitglieder der HSP70-Familie, so z.B. das Haupt-HSP70 von *N. crassa* und das nur HS-induzierbare HSP70, scheinen während der verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedlich reguliert zu sein. Möglicherweise unterliegen sie aber auch einer unterschiedlichen spezifischen Degradation, wie sie für verschiedene HSP70-Vertreter bei der Bohnensamenkeimung beschrieben wurde [Wang & Lin, 1993].

4.4 Zur Rolle von cAMP bei der Expression und Translokation von HSP70

Die Synthese von Streßproteinen in Streßsituationen wird hauptsächlich von einem spezifischen Hitzeschock-Transkriptionsfaktor (HSF1) kontrolliert. In multizellulären Eukaryoten wird der HSF in Folge von Streß aktiviert und bindet an regulatorische Hitzeschockelemente (HSE) im Promotor der HS-Gene [Morimoto *et al.*, 1994]. Diese Bindung des HSF an HSE ist notwendig, allerdings allein nicht ausreichend, zur Transaktivierung der HS-Gene. Unter verschiedenen Bedingungen ist

die Bindung des menschlichen HSF an HSE von der Transaktivierung der HS-Gene entkoppelt [Bruce *et al.*, 1993; Abravaya *et al.*, 1991; Hensold *et al.*, 1990; Jurivich *et al.*, 1992]. Bei den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis* ist der HSF sowohl vor als auch nach einem HS an HSE gebunden [Sorger *et al.*, 1987; Jakobsen & Pelham, 1988]. Zur Transaktivierung muß es hier also ebenfalls einen sekundären Schritt geben. Bei *S. cerevisiae* wird der HSF streßabhängig phosphoryliert [Sorger & Pelham, 1988]. Ob diese Phosphorylierung allerdings zur Aktivierung ausreicht oder eventuell auch zur Desaktivierung des HSF [Høj & Jakobsen, 1994] beiträgt ist noch unklar. Eine zur Transaktivierung wichtige Domäne des HSF bei *S. cerevisiae* und *K. lactis* ist unter konstitutiven Bedingungen durch eine interne Region des HSF maskiert [Bonner *et al.*, 1992; Jakobsen & Pelham, 1991; Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Sorger, 1990], und die transkriptionale Aktivität bei *S. cerevisiae* wird direkt oder indirekt durch HSP70 (SSA1/2) unterdrückt [Boorstein & Craig, 1990b]. Der HSF von Metazoen scheint ebenfalls negativ reguliert zu sein [Clos *et al.*, 1990]. Versuche, bei denen der menschliche HSF1 in heterologen Zellen exprimiert wurde, resultierten in einer Aktivierung des HSF bei wesentlich niedrigeren Temperaturen als für menschliche Zellen üblich [Clos *et al.*, 1993]. Ein Temperatur-sensitiver Faktor in eukaryotischen Zellen könnte eine inaktive Form des HSF stabilisieren. *In vitro* konnte eine Assoziation zwischen HSF und HSP70 gezeigt werden [Abravaya *et al.*, 1992; Baler *et al.*, 1992; Mosser *et al.*, 1993; Schlesinger & Ryan, 1993] und führte zu einem weit verbreitetem Model der HSF-Regulation durch HSP70 [Morimoto, 1993]. *In vivo* ist eine Funktion von HSP70 bisher nur für die Desaktivierung des HSF der Hefe beschrieben. Zur Hemmung der HSF-Aktivierung scheint eine Assoziation von HSP70 oder anderer Streßproteine mit dem HSF nicht auszureichen [Rabindran *et al.*, 1994]. *In vitro* wurde kürzlich von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen eine Konvertierung des isolierten, inaktiven HSF1 zur DNA-bindenden, trimeren Form direkt durch einen HS gezeigt [Larson *et al.*, 1995; Goodson & Sarge, 1995]. Der HSF1 besitzt damit alle Eigenschaften eines "molekularen Thermometers" ohne negative oder positive Regulation durch weitere Proteine [Goodson & Sarge, 1995]. Zur Transaktivierung und der Modulation des DNA-gebundenen HSF1 werden möglicherweise noch weitere Faktoren benötigt. Die

durch den HSF vermittelte Gentranskription bei der Hefe zeigt eine unterschiedliche Charakteristik die von der Art des Stimulus abhängt und möglicherweise durch unterschiedliche Aktivierungsdomänen des HSF vermittelt wird [Sorger, 1990]. So wird die HSF-regulierte Expression des Metallothionein-Gens bei der Hefe durch Hunger und HS mit unterschiedlicher Kinetik aktiviert [Tamai *et al.*, 1994]. Bei höheren Eukaryoten ist die HSF-HSE-Bindung unter konstitutiven Bedingungen nur sehr gering. Kingston und Mitarbeiter berichten eine basale Transkription des menschlichen HSP70 vermittelt durch Faktoren die mit TATA-, CCAAT- und SP1-"Boxen" interagieren [Greene *et al.*, 1987]. Die DNA-Bindung des SP1 scheint durch Redox-Veränderungen regulierbar zu sein [Ammendola *et al.*, 1994]. Unter konstitutiven Bedingungen bindet ein Faktor (CHBF) an eine Teilsequenz innerhalb des HSE. Unter Streßbedingungen dissoziiert dieser Faktor dosisabhängig vom HSE und reassoziert wieder mit dem HSE nach einem Streß. Die Dissoziation/Reassoziaton des CHBF vom/ans HSE korreliert unter allen bisher untersuchten Bedingungen mit der Induktion/Rückregulation von Streßproteinen [Liu *et al.*, 1993, 1994 und 1994b]. Die molekulare Basis der streßinduzierten Regulation der CHBF-DNA-Bindung ist noch unbekannt.

Ein HS führt neben der Induktion von Streßproteinen und einer Reihe anderer Veränderungen kurzfristig auch zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration [Kiang *et al.*, 1991]. Bei länger andauerndem HS und später während der Erholung nimmt der cAMP-Gehalt wieder ab und sinkt sogar unter den Kontrollwert [Kallies, 1995]. Eine mögliche Regulation der Expression und Translokation von Streßproteinen durch die Veränderungen des cAMP-Gehaltes, bzw. durch cPKA regulierte Phosphorylierungen, nach einem HS werden schon seit längerem diskutiert [Piper, 1993; Mager & Ferreira, 1993]. HSP70 ist eines der ersten in der Zygote von Mäusen gebildeten Proteine und wird vermutlich zur anfänglichen Transkriptionsaktivierung benötigt [Manejwala *et al.*, 1991]. Die Synthese der HSP70-mRNA in der Zygote wird durch Inhibitoren der cPKA inhibiert [Manejwala *et al.*, 1991]. Ähnlich ist auch das menschliche HSP70 durch cAMP bzw. cPKA regulierbar [Choi *et al.*, 1991]. Bei der Hefe scheint eine Abnahme des intrazellulären cAMP-Gehaltes (Abnahme cPKA-abhängiger Phosphorylierungen) die Synthese einiger

Streßproteine zu stimulieren [Idia & Yahara, 1984; Shin *et al.*, 1987]. Als Folge der Abnahme von cAMP in der stationären Phase zeigen eine Reihe von Streßproteinen eine erhöhte Expression [Brazzell & Ingoila, 1984; Tuite *et al.*, 1990; Praekelt & Meacock, 1990; Finley *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1987]. cAMP-defekte Mutanten der Hefe haben eine erhöhte Thermotoleranz und erhöhte Mengen verschiedener Streßproteine. Den umgekehrten Phänotyp zeigen Mutanten mit ständig aktiver cPKA [Idia & Yahara, 1984; Shin *et al.*, 1987; Cruz *et al.*, 1988]. Die konstitutive Thermotoleranz der cAMP-defekten Mutanten sowie eine erworbene Thermotoleranz des wt wird durch externes cAMP blockiert [Shin *et al.*, 1987; Cruz *et al.*, 1988]. Erhöhte cAMP-Mengen scheinen die konstitutive Expression von HSP70 negativ zu beeinflussen [Engelberg *et al.*, 1994]. Im Gegensatz dazu scheint cAMP die HS-induzierte Expression von HSP70 in menschlichen Monozyten (Makrophagen) und epidermalen Karzinomzellen zu verstärken [Pizurki & Polla, 1994; Kiang *et al.*, 1994]. Diese verschiedenen Effekte von cAMP auf die Expression von HSP70 unter konstitutiven und HS-Bedingungen sowie während der Entwicklung deuten eine unterschiedliche Regulation an.

Bei *N. crassa* induziert Hitzeschock eine Temperatur-abhängige Synthese des Haupt-HSP70. 37° C ist die niedrigste Temperatur bei der eine erhöhte HSP70-Menge im Western Blot detektierbar ist. Bei 45° C ist die maximale Expression von HSP70 erreicht. Bei noch höheren Temperaturen ist die HSP70-Menge vermutlich aufgrund letaler Zellschäden wieder reduziert. Neben der Höhe der Temperatur ist die Expression von HSP70 auch abhängig von der Dauer des HS. Nach etwa 1 - 2 h kontinuierlichem HS ist ein Maximum erreicht, und die HSP70-Menge nimmt langsam wieder ab. Bei der Defektmutante der Adenylatzyklase von *N. crassa* (cr-1) nimmt die HSP70-Menge relativ wenig zu, fällt dann nach etwa 2 h wieder ab, nimmt erneut wieder zu und ist auch nach 24 h HS noch erhöht. Eine Behandlung mit 20 µM 8-Brom-cAMP führt beim wt, bdA und der cr-1-Mutante zu einem konstitutiv reduzierten HSP70-Gehalt. Ein HS in Gegenwart von cAMP führt zu einem erhöhten Anstieg der HSP70-Menge.

Ebenso komplex wie die verschiedenen durch cAMP hervorgerufenen Ver-

änderungen der Expression von Streßproteinen ist die über cAMP- bzw. cPKA-abhängige Phosphorylierung regulierte Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors CREB an Ser-133 [Armstrong *et al.*, 1995]. Bei andauernder Stimulation durch cAMP korreliert eine erste schnelle Genaktivierung ("burst phase") nach 15 - 30 min mit der Kerntranslokation der cPKA und der Phosphorylierung des CREB. In den nachfolgenden 4 - 6 h nimmt die cAMP-abhängige Transkription kontinuierlich ab ("transcriptional attenuation"). Diese Abnahme ist auf Dephosphorylierungen durch die Protein-Phosphatasen 1 und 2 zurückzuführen deren Aktivität vermutlich durch cAMP-abhängige Inhibitoren reguliert wird. Anschließend wurde kürzlich eine auf erneute Stimulation mit cAMP nicht mehr reagierende Phase beschrieben ("transcriptional silencing"). Sie beginnt 6 - 8 h nach der ersten Stimulation und dauert etwa 3 - 5 Tage an. Sie beruht auf einer Rückregulation der Expression der katalytischen Untereinheit der cPKA auf translationaler Ebene [Armstrong *et al.*, 1995]. Ein hitzestabiler Inhibitor (PKI ϵ) der katalytischen Untereinheit der cPKA zeigt eine unterschiedliche Expression und Anreicherung im Zellkern während des Zellzyklus. Die geringste Expression und überwiegend cytoplasmatische Lokalisation des PKI ϵ wurde in hungrigen Zellen in der G1-Phase beobachtet. Die stärkste Expression und Akkumulation im Zellkern ist in der S-Phase gefunden worden [Wen *et al.*, 1995]. Interessanterweise wird HSP70 in diesen Phasen in ähnlicher Weise exprimiert. Die Expression von HSP70 ist hier invers mit der Aktivität der cPKA korreliert.

Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse werden durch bestimmte Botenstoffe eingeleitet und reguliert. Bei Pilzen spielt der "second messenger" cAMP eine wichtige Rolle. Bei vielen dimorphen Pilzen entscheidet der cAMP-Gehalt über die Wachstumsmorphologie [Maresca *et al.*, 1977; Medoff *et al.*, 1981; Paris & Garrison, 1983; Brunton & Gadd, 1989; Gold *et al.*, 1994]. Ein Defekt im Adenylatzyklase-Gen von *Ustilago maydis* resultiert in filamentösem Wachstum, und ein Hefe-ähnliches Wachstum ("budding") läßt sich durch die externe Zugabe von cAMP wieder herstellen [Gold *et al.*, 1994]. Bei *N. crassa* zeigt die Defektmutante der Adenylatzyklase (cr-1) ein Wachstum als kleine, kompakte Kolonien [Mishra, 1976], eine veränderte Hyphenverzweigung [Pall & Robertson, 1986], sehr kurze Lufthyphen

[Lindegren, 1936] und eine konstitutive Thermotoleranz [Terenzi *et al.*, 1974]. Während der Keimung von Sporen einiger Pilze ist ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes beschrieben [Maresca *et al.*, 1977; Medoff *et al.*, 1981; Niimi *et al.*, 1980; Sabie & Gadd, 1992; Paris & Garrison, 1983]. Für andere ist ein sinkender oder bei *N. crassa* ein nahezu gleichbleibender cAMP-Gehalt beschrieben [Rosenberg & Pall, 1978]. Rosenberg und Pall (1978) beschreiben für die *cr-1*-Mutante von *N. crassa* im Vergleich zum *wt* in Konidien und während der Keimung nahezu identische cAMP-Gehalte und erniedrigte Werte nur für vegetatives Myzelium. cAMP-Messungen während der Keimung der *bdA*-Mutante von *N. crassa* von Andreas Kallies aus unserer Arbeitsgruppe zeigen einen Anstieg des cAMP-Gehaltes während der Konidienkeimung, einen sehr hohen cAMP-Gehalt in jungen Lufthyphen und eine Abnahme während der Konidiation von Lufthyphen.

In den von uns untersuchten Entwicklungsstadien bei *N. crassa* ist die HSP70-Menge invers mit dem cAMP-Gehalt korreliert. Eine solche inverse Korrelation von cAMP-Gehalt und HSP70-Menge ist für SSA3 der Hefe und einige andere Streßproteine bereits bekannt [Boorstein & Craig; 1990; Engelberg *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1988]. Boorstein und Craig (1990) fanden im SSA3-Promotor der Hefe ein dem auf zyklisches 3', 5' Adenosinmonophosphat (cAMP)-reagierendes ähnliches Element (CRE). Die CRE-abhängige SSA3-Expression resultiert aus einer reduzierten Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cPKA). Im Promotor des cytosolischen Katalase T-Gens wurde ein cPKA reguliertes Element charakterisiert. Ohne ein HSE-ähnliches Element ist dieses Element im Promotor ausreichend, um die Katalase oder ein Reporter-Gen durch verschiedenartigen Streß zu induzieren [Marchler *et al.*, 1993].

Das Gen des mit dem von uns isoliertem HSP70 vermutlich identischen Haupt-hitzeinduzierbaren-HSP70 von *N. crassa* besitzt im Promotor außer den HSE-ähnlichen Sequenzen und einem auf Metall reagierendem Element auch solche Bereiche die auf eine Bindung anderer bisher nicht identifizierter Faktoren hindeuten [Kapoor *et al.*, 1995]. Einige Elemente zeigen mit SP1 und CRE ähnliche Sequenzen. Diese liegen zum Teil allerdings sehr weit distal im Promotor und lassen daher eine

funktionelle Homologie zweifelhaft erscheinen.

-
- *Reduktion der konstitutiven HSP70-Expression*
 - *Erhöhung der HS-induzierbaren HSP70-Expression*
 - *Inverse Korrelation des cAMP-Gehaltes mit der konstitutiven HSP70-Menge in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung und Differenzierung*
 - *Einfluß auf die HSP70-Expression in verschiedenen Phasen der asexuellen Entwicklung und Differenzierung*
 - *Verstärkung des Anstiegs der HSP70-Menge im Zellkern nach einem HS*
 - *Stärkste Anreicherung von HSP70 und cPKA im Zellkern kurz nach den höchsten cAMP Konzentrationen während des circadianen Rhythmus [Kallies, unveröff.]*
 - *Reduktion der Gesamtproteinsynthese unter konstitutiven und HS-Bedingungen*
 - *Reduktion der [³⁵S]-Methionin-Aufnahme in die Zelle*
-

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Effekte von cAMP auf die Expression und Translokation von HSP70 bei *N. crassa*.

In der Tabelle 4.1 sind die beobachteten Effekte von cAMP auf die Expression und die Translokation von HSP70 sowie auf die Gesamtproteinsynthese und [³⁵S]-Methionin-Aufnahme in Zellen von *N. crassa* zusammenfassend dargestellt. Die Regulation der HSP70-Synthese scheint konstitutiv und während der Entwicklung sowie unter HS-Bedingungen unterschiedlich reguliert zu sein. Möglicherweise sind bisher noch nicht identifizierte Elemente im HSP70-Promotor direkt über cPKA regulierte Faktoren ansprechbar. Eine Regulation über cPKA-abhängige Phosphorylierung wäre auch für den HSF oder den CHBF denkbar.

4.5 Translokation von HSP70 während des circadianen Rhythmus

Während des circadianen Rhythmus bei *N. crassa* sind Temperaturveränderungen, neben Lichtpulsen, die stärksten Zeitgeber. Durch Temperatur- und Lichtpulse, aber auch durch Pulse mit cAMP kommt es zu Phasenverschiebungen der circadianen Rhythmik. Gleichzeitig ist die Periodenlänge aber relativ unempfindlich gegenüber erhöhter Temperatur ("temperature compensation"). Das Protein PER (period) aus *Drosophila melanogaster*, eine wichtige Komponente des molekularen Uhr-Mechanismus, ist an der Fähigkeit der Temperaturkompensation des circadianen Rhythmus beteiligt [Huang *et al.*, 1995]. Die Anreicherung der cPKA im Zellkern und der cAMP-Gehalt zeigen einen circadianen Rhythmus [Kallies, 1995; Rensing *et al.*, 1993]. Bei *N. crassa* wurde vor kurzem ein Protein (frequency, FRQ) über seine mRNA identifiziert, welches für die circadiane Rhythmik essentiell ist. FRQ zeigt eine rhythmische Expression und reguliert seine eigene Synthese über einen negativen Feedback-Mechanismus [Aronson *et al.*, 1994]. FRQ erfüllt viele Eigenschaften eines Uhr-Proteins. Bisher konnte FRQ jedoch keine konkrete biochemische Funktion zugeordnet werden. FRQ besitzt eine NLS, mehrere PEST-Sequenzen und eine stark saure Region [Morrow & Dunlap, 1994]. Mehrere PEST-Sequenzen korrelieren mit einem hohem Proteinturnover [Rechsteiner, 1990]. Die NLS weist auf eine wichtige Funktion im Zellkern hin. PER aus *Drosophila melanogaster* akkumuliert ebenfalls im Zellkern [Liu *et al.*, 1992b]. Möglicherweise erfüllen diese Proteine im Zellkern regulatorische Aufgaben (Expression von "clock controlled genes"). Viele regulatorische Proteine besitzen stark saure Regionen [Ptashne, 1988], wie sie auch bei FRQ charakterisiert wurde.

HSP70 ist unter konstitutiven sowie HS-Bedingungen ein essentieller Faktor des Transportes anderer Proteine in den Zellkern [Feldherr, 1992; Shi & Thomas, 1992; Imamoto *et al.*, 1992; Osborne & Silver, 1993; Pratt, 1993; Yang & DeFranco, 1994; Okuno *et al.*, 1993]. Einige der in den Zellkern transportierten Proteine könn-

ten am Prozeß der Transkription beteiligt sein. Die Injektion von Anti-HSP70-Ak in das Cytoplasma von Oocyten führt zur Hemmung der Transkription von "lampbrush"-Chromosomen in diesen Zellen. Die Transkription im Nucleoli ist unbeeinflusst. Eine Injektion derselben Ak direkt in den Zellkern hatte keinen Effekt auf die Transkription [Moreau *et al.*, 1994].

Möglicherweise ist HSP70 auch an der Regulation des Transportes der Uhr-Proteine in den Zellkern beteiligt. Die Untersuchungen zur Lokalisation von HSP70 während des circadianen Rhythmus zeigen eine rhythmische Akkumulation im Zellkern mit einer Periodenlänge von etwa 12 h und maximaler Amplitude bei ct 18 und ct 6. Diese Akkumulation ist hauptsächlich auf eine Translokation aus dem Cytoplasma zurückzuführen und resultiert nur geringfügig aus einer periodisch insgesamt erhöhten HSP70-Expression. Die Hauptrhythmik von cAMP hat ebenfalls eine Periodenlänge von etwa 12 h, wobei die Maxima bei ct 14 und ct 2 zu beobachten sind. Ähnlich, aber zeitlich etwas verzögert, ist auch die stärkste Anreicherung der cPKA im Zellkern zu beobachten. cAMP-regulierte Prozesse sind an der Expression von HSP70 beteiligt. Die Kerntranslokation von HSP70 ist nach einem HS in Gegenwart von cAMP verstärkt. Andererseits findet man aber während des Wachstums zur stationären Phase - bei dem cAMP vermutlich reduziert wird - ebenfalls eine Anreicherung von HSP70 im Zellkern. Der dem Einfluß von cAMP auf die Kerntranslokation von HSP70 zugrunde liegende Mechanismus ist noch unklar. Bei vielen induzierten Lokalisationsänderungen spielen Phosphorylierungen neben anderen posttranslationalen Modifikationen eine wichtige Rolle. Über cAMP- und cPKA-gesteuerte Phosphorylierungen ist allerdings nur wenig bekannt. Die Lokalisation spezifischer mRNA während der Oogenese von *Drosophila* scheint durch cPKA regulierte Prozesse gesteuert zu werden [Lasko, 1995]. Versuche in denen cAMP bei *N. crassa* nur kurzfristig appliziert und der Einfluß auf die Lokalisation von HSP70 untersucht werden soll, stehen noch aus.

5 Literatur

- Abe, T., Konishi, T., Hirano, T., Kasai, H., Shimizu, K., Kashimura, M., Higashi, K. (1995). Possible correlation between DNA damage induced by hydrogen peroxide and translocation of heat shock protein 70 into the nucleus. *BBRC* **206**, 548-555.
- Abravaya, K., Phillips, B., and Morimoto, R. I. (1991). Attenuation of the heat shock response in HeLa cells is mediated by the release of bound heat shock transcription factor and is modulated by changes in growth and heat shock temperatures. *Genes Dev.* **5**, 2117-2127.
- Abravaya, K., Myers, M. P., Murphy, S. P., and Morimoto, R. I. (1992). The human heat shock protein interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev.* **6**, 1153-1164.
- Adham, K. G., Wilkinson, M. C., Smith, C. J., and Laidman, D. L. (1991). An enzyme-linked immunosorbent assay for heat-shock protein 70 in plants. *Food & Agricultural Immunology* **3**, 29-36.
- Ahmad, S., Ahuja, R., Venner, T. J., and Gupta, R. S. (1990). Identification of a protein altered in mutants resistant to microtubule inhibitors as a member of the major heat shock protein (Hsp70) family. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5160-5165.
- Almoguera, C. and Jordano, J. (1992). Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs. *Plant Molec. Biol.* **19**, 781-792.
- Ananthan, J., Goldberg, A. L., and Voellmy, R. (1986). Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* **323**, 522-524.
- Armstrong, R., Wen, W., Meinkoth, J., Taylor, S., and Montminy, M. (1995). A refractory phase in cyclic AMP-responsive transcription requires down regulation of protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1826-1832.
- Aronson, B. D., Johnson, K. A., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (1994). Negative feedback defining a circadian clock: Autoregulation of the clock gene *frequency*. *Science* **263**, 1578-1584.
- Arrigo, A.-P., and Landry, J. (1994). Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In Morimoto *et al.*, 1994, pp.335-374.
- Baler, R., Welch, W. J., and Voellmy, R. (1992). Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell Biol.* **117**, 1151-1159.
- Bardwell, J. C. A., and Craig, E. A. (1984). Major heat shock gene of *Drosophila* and *Escherichia coli* heat inducible dnaK gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 848-852.
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., and Gierz, G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* **153**, 46-57.
- Benndorf, R., Hayeß, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., and Lutsch, G. (1994). Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 20780-20784.
- Becker, J., and Craig, E. A. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* **219**, 11-23.

- Beckman, R. P., Mizzen, L., and Welch, W. (1990). Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* **248**, 850-856.
- Bergmeyer, H. U. ed. (1986). *Methods of enzymatic analysis* Vol. 9 and 10. Springer Verlag, Heidelberg.
- Berlin, V., and Yanofsky, C. (1985). Protein changes during the asexual cycle of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 839-848.
- Bienz, M., and Pelham, H. R. B. (1987). Mechanisms of heat shock activation in higher eukaryotes. *Adv. Genet.* **24**, 31-72.
- Bohen, S. P., and Yamamoto, K. R. (1994). Modulation of steroid receptor signal transduction by heat shock proteins. In Morimoto *et al.*, (1994). pp. 313-334.
- Bonato, M. C., Silvia, A. M., Gomes, S. L., Maia, J. C., and Juliani, M. H. (1987). Differential expression of heat shock proteins and spontaneous synthesis of HSP70 during the life cycle of *Blatocladia emersonii*. *Eur. J. Biochem.* **163**, 211-220.
- Bonnen, A., and Brambl, R. (1983). Germination physiology of *Neurospora crassa* Conidia. *Exp. Mycol.* **7**, 197-207.
- Bonner, J., Heyward, S., and Fackenthal, D. (1992). Temperature-dependent regulation of a heterologous transcriptional activation domain fused to yeast heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1021-1030.
- Bonner, W. M., and Laskey, R. A. (1974). A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamid gels. *Eur. J. Biochem.* **46**, 83-88.
- Boorstein, W. R., and Craig, E. A. (1990a). Structure and regulation of the SSA4 hsp70 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 18912-18921.
- Boorstein, W. R., and Craig, E. A. (1990b). Transcriptional regulation of Ssa3, an Hsp70 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3262-3267.
- Boorstein, W. R. and Craig, E. A. (1990c). Regulation of a yeast HSP70 gene by a cAMP responsive transcriptional control element. *EMBO J.* **9**, 2543-2553.
- Boorstein, W. R., Ziegelhoffer, T., and Craig, E. A. (1994). Molecular evolution of the HSP70 multigene Family. *J. Mol. Evol.* **38**, 1-17.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7290-7294.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-54.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A., Sigler, P. B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578-586.
- Brody, S., and Martins, S. (1973). Effects of morphological and auxotrophic mutations on the circadian rhythm of *Neurospora crassa*. *Genetics* **74**, 31.
- Brody, S. (1992). Circadian rhythms of *Neurospora crassa*. In: *Development: The molecular genetic approach* (Russo, V. E. A., Brody, S., Cove, D., and Ottolenghi, S. eds.) pp. 165-176. Springer Verlag, Heidelberg.
- Bruce, J. L., Price, B. D., Coleman, C. N., and Calderwood, S. K. (1993). Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. *Cancer Res.* **53**, 12-15.
- Brunt, S. A., Riehl, R., and Silver, J. C. (1990). Steroid hormone regulation of the *Achyla* 85kDa

- heat shock protein, a component of the *Achyla* steroid receptor complex. *Mol. Cell Biol.* **10**, 273-281.
- Brunton, A. H., and Gadd, G. M. (1989). The effect of exogenously-supplied nucleosides and nucleotides and the involvement of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) in the yeast mycelium transition of *Ceratocystis (=Ophiostoma) ulmi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**, 49-54.
- Burnette, W. N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Chang, S. C., Wooden, S. K., Nakaki, T., Kim, Y. K., Lin, A. Y., Kung, L., Attenello, J. W., and Lee, A. S. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 680-684.
- Chappel, T. G., Konforti, B. B., Schmid, S. L., and Rothman, J. E. (1987). The ATPase core of a Clathrin uncoating protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 746-751.
- Cheetham, M. E., Jackson, A. P., and Anderton, B. H. (1994). Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, Hsj1 and Hsj1b. *Eur. J. Biochem.* **226**, 99-107.
- Choi, H.-S., Li, B., Lin, Z., Huang, E., and Liu, A. Y.-C. (1991). cAMP and cAMP-dependent protein kinase regulate the human heat shock protein 70 gene promoter activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 11858-11865.
- Chu, G. L., Ross, G., Wong, R. S. L., Waters, R., and Dewey, W. C. (1993). Content of nonhistone protein in nuclei after hyperthermic treatment. *J. Cell. Physiol.* **154**, 217-221.
- Ciavarra, R. P., Goldman, C., Wen, K.-K., Tedeschi, B., and Castora, F. J. (1994). Heat stress induces hsc70/nuclear topoisomerase I complex formation *in vivo*: Evidence for hsc70-mediated, ATP-independent reactivation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1751-1755.
- Clos, J., Westwood, J. T., Becker, P. B., Wilson, S., Lambert, K., and Wu, C. (1990). Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell* **63**, 1085-1097.
- Clos, J., Rabindran, S. K., Wisniewski, J., and Wu, C. (1993). Induction temperature of human heat shock factor is reprogrammed in a *Drosophila* cell environment. *Nature* **364**, 252-255.
- Coca, M. A., Almuquera, C., and Jordano, J. (1994). Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Molec. Biol.* **25**, 479-492.
- Cooper, P., Ho, T. D., and Hauptmann, R. M. (1984). Tissue specificity of the heat-shock response in maize. *Plant Physiol.* **75**, 431-441.
- Cornelius, G., and Rensing, L. (1986). Circadian rhythm of heat shock protein synthesis of *Neurospora crassa*. *Eur. J. Cell. Biol.* **40**, 130-132.
- Cornelius, G., Gebauer, G., and Techel, D. (1989). Inositol Trisphosphate induces calcium release from *Neurospora crassa* vacuoles. *BBRC* **162**, 852-856.
- Cornelius, G. (1994a). Signalüberträger in der Zelle: Secon-Messenger-Forschung. *Naturwiss. Rdsch.* **47**, 181-189.
- Cornelius, G. (1994b). Vom Reiz zur Reaktion. Habilitationsschrift. Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Craig, E. A. (1989). Essential roles of 70 kDa heat inducible proteins. *BioEssays* **11**, 48-52.
- Craig, E. A., Ingoila, T. D., and Manseau, L. J. (1983). Expression of *Drosophila* heat-shock cognate genes during heat-shock and development. *Dev. Biol.* **99**, 418-426.

- Craig, E. A., and Gross, C. A. (1991). Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.* **16**, 135-140.
- Cruz, A. K., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., and Terenzi, H. F. (1988). Cyclic AMP-dependent, constitutive thermotolerance in the adenylate cyclase-deficient *cr-1* (*crisp*) mutant of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **13**, 451-454.
- Dang, C. V., and Lee, W. M. F. (1989). Nuclear and nucleolar targeting sequences of *c-erb-A*, *c-myc*, *N-myc*, p53, HSP70 and HIV *tat* proteins. *J. Biol. Chem.* **264**, 18019-18023.
- DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D. B. (1990). Nucleotide sequence of the cDNA of a bovine-70 kilodalton heat shock cognate protein. *Nucleic Acid Res.* **18**, 5569
- De Jong, W. W., Leunissen, J. A. M., and Voorter, C. E. M. (1993). Evolution of the α -crystallin /small heat-shock protein family. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 103-126.
- De Maio, A., Beck, S. C., and Buchman, T. G. (1993). Heat shock gene expression and development of translational thermotolerance in human hepatoblastoma cells. *Circulatory Shock* **40**, 177-186.
- Deutsch, A. (1990). Sporenmuster des Schlauchpilzes *Neurospora crassa*. In Rensing, L. und Deutsch, A. (eds.), *Natur und Form*, Universität Bremen, 1990, p. 83-96.
- Deutsch, A., Dress, A., and Rensing, L. (1993). Formation of morphological differentiation patterns in the ascomycete *Neurospora crassa*. *Mechanisms of Development* **44**, 17-31.
- Dice, J. F., Agarraberes, F., Kirven-Brooks, M., Terlecky, L. J., and Terlecky, S. R. (1994). Heat shock 70-kD proteins and lysosomal proteolysis. In Morimoto *et al.*, 1994, pp. 137-152.
- DiDomenico, B. J., Bugaisky, G. E., and Lindquist, S. (1982). The heat shock response is self-regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* **31**, 593-603.
- Dubois, M. F., Bellier, S., Seo, S.-J., and Bensaude, O. (1994). Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during heat shock and inhibition of transcription in HeLa cells. *J. Cell. Physiol.* **158**, 417-426.
- Duncan, R. F., and Hershey, W. B. (1989). Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *J. Cell Biol.* **109**, 1467-1481.
- Duncan, R. F., Cavener, D. R., and Qu, S. (1995). Heat shock effects on phosphorylation of protein synthesis initiation factor proteins eIF-4E and eIF-2 α in *Drosophila*. *Biochem.* **34**, 2985-2997.
- Dunlap, J. C. (1993). Genetic analysis of circadian clocks. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **55**, 685-728.
- Dunn, M. A., Blalock, S. A., and Cousins, R. J. (1987). Metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **185**, 107-119.
- Dworniczak, B. P., and Mirault, M.-E. (1987). Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock "cognate" protein. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5181-5197.
- Edman, P. (1950). *Acta Chem. Scand.* **4**, 283.
- Ekwall, B., Bondesson, I., Castell, J. V., Gómez-Lechòn, M. J., Hellberg, S., Höberg, J., Jover, R., Ponsoda, X., Romert, L., Stenberg, K., and Walum, E. (1989). Cytotoxicity evaluation of the first ten MEIC chemicals: Acute lethal toxicity in man predicted by cytotoxicity in five cellular assays and by oral LD50 tests in rodents. *ATLA* **17**, 83-100.
- Engelberg, D., Zandi, E., Parker, C. S., and Karin, M. (1994). The yeast and mammalian Ras pathway control transcription of heat shock genes independently of heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4929-4937.
- Evan, G. I., and Hancock, D. C. (1985). Studies on the interaction of the human c-myc protein with cell nuclei: P62C-myc as a member of a discrete subset of nuclear proteins. *Cell* **43**, 253-

261.

- Fader, S. C., Zhongmo, Y., and Spotila, J. R. (1994). Seasonal variation in the heat shock proteins (hsp70) in the stream fish under natural conditions. *J. therm. Biol.* **19**, 335-341.
- Feldherr, C. M. (ed.) (1992). Nuclear trafficking. Academic Press, Inc., San Diego.
- Fischer, M., Hilt, W., Richter-Ruoff, B., Gonen, H., Ciechanover, A., and Wolf, H. (1994). The 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **355**, 69-75.
- Fischer, S., Reimann, F., and Wittmann-Liebold, B. (1988). In: "Methods in protein sequence analysis", eds., Wittmann-Liebold, B., Springer Verlag, Berlin, pp. 98 - 107.
- Fischer, S. und Reimann, F. (1990). Dual-Phase Proteinsequenzanalyse. *BioTec Analytik* **7**, 44-49.
- Fisher, F. A., Lin, L., McCornell, M., Greenleaf, A., Lee, J.-M., and Smith, D. E. (1989). Heat shock-induced appearance of RNA polymerase II in karyoskeletal protein enriched (nuclear"matrix") fractions correlates with transcriptional shutdown in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **264**, 3464-3468.
- Fiskesjö, G., and Levan, A. (1993). Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *allium* test. *ATLA* **21**, 139-149.
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D. B. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70k heat-shock cognate protein. *Nature* **346**, 623-628.
- Flaherty, K. M., Wilbanks, S. M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D. B. (1994). Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 12899-12907.
- Fracella, F., Mohsenzadeh, S., and Rensing, L. (1993). Purification and partial amino acid sequence of the major 70,000-Dalton heat shock protein in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **17**, 362-367.
- Fracella, F., Oberheitmann, B., and Rensing, L. (1993b). ELISA technique applied to the analysis of HSP70 levels after heat-shock and during different developmental stages of *Neurospora crassa*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 766.
- Fracella, F., and Rensing, L. (1994). Streßproteine in Biologie und Medizin. *Biomol im Dialog* **7**, 1-11 (8/1994). Biomol Hamburg.
- Fracella, F. und Rensing, L. (1995a). Streßproteine: Ihre wachsende Bedeutung in der Medizin. *Naturwissenschaften* (im Druck).
- Fracella, F., Heilmann, H.-J., Wiesemann, T., Rensing, L., and Konnertz, M. (1995b). HSP70 - ELISA: Enzyme immunoassay in microwell plates, HSP70 Detection and quantitation assay (Anleitung zum BIOMOL HSP70-ELISA; p. 1-10). Biomol Hamburg.
- Frova, C., Taramino, G., and Binelli, G. (1989). Heat shock proteins during pollen development in maize. *Dev. Genet.* **10**, 324-332.
- Frydman, J., and Hartl, F.-U. (1994). Molecular chaperone functions of hsp70 and hsp60 in protein folding. In Morimoto *et al.*, (1994) pp. 251-284.
- Fuge, E. K., Braun, E. L., and Werner-Washburne, M. (1994). Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**, 5802-5813.
- Gao, B., Biosca, J., Craig, E. A., Greene, L. E., and Eisenberg, E. (1991). Uncoating of coated vesicles by yeast hsp70 proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 19565-19571.
- Gebauer, G., Kallies, A., and Rensing, L. (1995). Heat shock-induced changes in second messenger levels and differentiation. *submitted*
- Georgopoulos, C., Ang, D., Liberek, K., and Zylicz, M. (1990). Properties of *E. coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage lambda growth. In Morimoto *et al.*, (1990) pp.

- 191-222.
- Gething, M.-J., Blond-Elguindi, S., Mori, K., and Sambrook, J. F. (1994). Structure, function, and regulation of the endoplasmic reticulum chaperone, BIP. In Morimoto *et al.*, (1994) pp. 111-136.
- Giebel, L. B., Dworniczak, B. P., and Bautz, E. K. F. (1988). Developmental regulation of a constitutively expressed mouse mRNA encoding a 72-kDa heat shock-like protein. *Dev. Biol.* **125**, 200-207.
- Gold, S., Duncan, G., Berrett, K., and Kronstad, J. (1994). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes & Development* **8**, 2805-2816.
- Goldberg, A. L. (1992) The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* **203**, 9-23.
- Gonen, H., Smith, C. E., Siegel, N. R., Kahana, C., Merrick, W. C., Chakraborty, K., Schwartz, A. L., and Ciechanover, A. L. (1994). Protein synthesis elongation factor EF-1 ϵ is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N ϵ -acetylated proteins and may be substituted for the bacterial elongation factor EF-Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7648-7652.
- Goodman, R., Blank, M., Lin, H., Dai, R., Khorkova, O., Soo, L., Weisbrot, D., and Henderson, A. (1994). Increased levels of hsp70 transcripts induced when cells are exposed to low frequency electromagnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenerget.* **33**, 115-120.
- Goodson, M. L., and Sarge, K. D. (1995). Heat inducible DNA binding of purified heat shock transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* **270**, 2447-2450.
- Greene, J. M., Larin, Z., Taylor, I. C. A., Prentice, H., Gwinn, K. A., and Kingston, R. E. (1987). Multiple basal elements of a human hsp70 promoter function differently in human and rodent cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3646-3655.
- Groenen, P. J. T. A., Merck, K. B., DeJong, W. W., and Bloemendal, H. (1994). Structure and modifications of the junior chaperone ϵ -crystallin. *Eur. J. Biochem.* **225**, 1-19.
- Gross, M., Olin, A., Hessefort, S., and Bender, S. (1994). Control of protein synthesis by hemin: Purification of a rabbit reticulocyte hsp 70 and characterization of its regulation of the activation of hemin-controlled eIF2(ϵ) kinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 22738-22748.
- Gutierrez, J. A., and Guerriero, V. (1991). Quantitation of Hsp70 in tissues using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* **143**, 81-88.
- Gutierrez, J. A., and Guerriero, V. (1995a). Chemical modifications of a recombinant bovine stress-inducible 70 kDa heat-shock protein (Hsp70) mimics Hsp70 isoforms from tissues. *Biochem. J.* **305**, 197-203.
- Gutierrez, J. A., and Guerriero, V. (1995b). Relative abundance of bovine Hsp70 mRNA and protein. *BBA* **1260**, 239-242.
- Hahn, G. M., and Li, G. C. (1990). Thermotolerance, thermoresistance, and thermosensitization. In Morimoto *et al.*, (eds.) 1990, pp. 79-100.
- Hang, H. Y., and Fox, M. H. (1995). Expression of HSP70 induced in CHO cells by 45.0 degrees C hyperthermia is cell cycle associated and DNA-synthesis dependent. *Cytometry* **19**, 119-125.
- Harcum, S. W., and Bentley, W. E. (1993). Response dynamics of 26-, 34-, 39-, 54-, and 80-kDa proteases in cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioengineering* **42**, 675-685.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hartl, F.-U., Hlodan, R., and Langer, T. (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *TIBS* **19**, 20-25.

- Hayashi, Y., Tohnai, I., Kaneda, T., Kobayashi, T., and Ohtsuka, K. (1991). Translocation of hsp-70 and protein synthesis during continuous heating at mild temperatures in HeLa cells. *Radiat. Res.* **125**, 80-88.
- Heikkila, J. J. (1993). Heat shock gene expression and development. *Dev. Genet.* **14**, 1-5 (Part 1) and 87-91 (Part 2).
- Hensold, J. O., Hunt, C. R., Calderwood, S. K., Housman, D. E., and Kingston, R. E. (1990). DNA binding of heat shock factor to the heat shock element is insufficient for transcriptional activation in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1600-1608.
- Hendrick, J. P., and Hartl, F.-U. (1993). Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
- Henle, K. J. (1987). Thermotolerance in cultured mammalian cells. In "Thermotolerance" (ed. Henle, K. J.), vol. 1, pp 13-71, CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Herberts, C., Moreau, N., and Angelier, N. (1993). Immunolocalization of HSP70-related proteins constitutively expressed during *Xenopus laevis* oogenesis and development. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 397-406.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761-807.
- Higgins, S. M. and Lilly, W. W. (1993) Multiple responses to heat stress by the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Current Microbiol.* **26**, 123-127.
- Hilt, W., and Wolf, D. H. (1992) Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* **6**, 2437-2442.
- Hightower, L., and Nover, L. (eds.) (1991). Results and problems in cell differentiation 17: Heat shock and development. Springer Verlag, Heidelberg.
- Holbrook, N., and Udelsman, R. (1994). Heat shock gene expression in response to physiologic stress and aging. In Morimoto *et al.*, (1994) pp. 577-594.
- Horowitz, N. H. (1947). Methionine synthesis in *Neurospora*. The isolation of cystathionine. *J. Biol. Chem.* **171**, 255-264.
- Høj, A., and Jakobsen, B. K. (1994). A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J.* **13**, 2617-2624.
- Huang, Z. J., Curtin, K. D., and Rosbash, M. (1995). PER protein interactions and temperature compensation of a circadian clock in *Drosophila*. *Science* **267**, 1169-1172.
- Hunt, C., and Morimoto, R. I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6455-6459.
- Hutchinson, E. G., Tichelaar, W., Hofhaus, G., Weiss, H., and Leonard, K. R. (1989). Identification and electron microscopic analysis of a chaperonin oligomer from *Neurospora crassa* mitochondria. *EMBO J.* **8**, 1485-1490.
- Iida, H., and Yahara, I. (1984). A heat shock-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth. *J. Cell Biol.* **99**, 1441-1450.
- Imamoto, N., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Sakiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S., and Yoneda, Y. (1992). Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J. Cell Biol.* **119**, 1047-1061.
- Ingoila, T. D., Craig, E. A., and McCarthy, B. J. (1980). Sequence of three copies of the gene for the major *Drosophila* heat shock induced protein and their flanking regions. *Cell* **21**, 669-679.

- Iwahashi, H., Fujii, S., Obuchi, K., Kaul, S. C., Sato, A., and Komatsu, Y. (1994). Hydrostatic pressure is like high temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. *FEMS Letters* **108**, 53-58.
- Jentsch, S. (1992). The ubiquitin conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 179-207.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**, 1517-1520.
- Jakob, U., and Buchner, J. (1994). Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *TIBS* **19**, 205-211.
- Jakobsen, B. K., and Pelham, H. R. B. (1988). Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5040-5042.
- Jakobsen, B. K., and Pelham, H. R. B. (1991). A conserved heptopeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. *EMBO J.* **10**, 369-375.
- Jurivich, D., Sistonen, L., Kroes, R., and Morimoto, R. I. (1992). Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* **255**, 1243-1245.
- Kabakov, A. E., and Gabai, V. L. (1993). Protein aggregation as primary and characteristic cell reaction to various stresses. *Experientia* **49**, 706-710.
- Kallies, A. (1995). Dissertation, Universität Bremen.
- Kampinga, H. H., Jorritsma, J. B. M., and Konings, A. W. T. (1985). Heat-induced alterations in DNA polymerase activity of HeLa cells and of isolated nuclei: Relation to cell survival. *Int. J. Radiat. Biol.* **47**, 29-40.
- Kampinga, H. H., Lupes, J. G., and Konings, A. W. T. (1987). Heat-induced nuclear protein binding and its relation to thermal cytotoxicity. *Int. J. Hypertherm.* **3**, 459-465.
- Kampinga, H. H., Turkel-Uygur, N., Roti Roti, J. L., and Konings, A. W. T. (1989). The relationship of increased nuclear protein content induced by hyperthermia to killing of HeLa cells. *Radiat. Res.* **117**, 511-522.
- Kampinga, H. H. (1993). Thermotolerance in mammalian cells: Protein denaturation and aggregation, and stress proteins. *J. Cell Science* **104**, 11-17.
- Kandror, O., Busconi, L., Sherman, M., and Goldberg, A. L. (1994). Rapid degradation of abnormal proteins in *E. coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *J. Biol. Chem.* **269**, 23575-23582.
- Kapoor, M., and Lewis, J. (1987). Alteration of the protein synthesis pattern in *Neurospora crassa* cells by hyperthermal and oxidative stress. *Can. J. Microbiol.* **33**, 162-168.
- Kapoor, M., Curle, C. A., and Runham, C. (1995). The hsp70 gene family of *Neurospora crassa*: Cloning, sequence analysis, expression, and genetic mapping of the major stress-inducible member. *J. Bac.* **177**, 212-221.
- Kaufmann, S. H. E., and Schoel, B. (1994). Heat shock proteins as antigens in Immunity against infection and self. In Morimoto *et al.*, 1994, pp. 495-532.
- Kiang, J. G., McKinney, L. C., and Gallin, E. L. (1990). Heat induces intracellular acidification in human A 431 cells: role of Na⁺-H⁺ exchange and metabolism. *Am. J. Physiol.* **259** (Cell Physiol. 28), C727-C737.
- Kiang, J. G., Wu, Y. Y., and Lin, M. C. (1991). Heat treatment induces an increase in intracellular cAMP content in human epidermoid A-431 cells. *Biochem. J.* **276**, 683-689.
- Kiang, J. G., Koenig, M. L., and Smalridge, R. C. (1992). Heat shock increases cytosolic free Ca²⁺ concentration via Na⁺-Ca²⁺ exchange in human epidermoid A 431 cells. *Am. J. Physiol.* **263** (Cell Physiol. 32), C30-C38.

- Kiang, J. G., Carr, F. E., Burns, M. E., and McClain, D. E. (1994). HSP-72 synthesis is promoted by increase in $[Ca^{2+}]_i$ or activation of G proteins but not pH_i or cAMP. *Am. J. Physiol.* **267** (Cell Physiol. 36), C104-C114.
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P.-M., and Alberti, G. (1992). The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: A possible tool for monitoring environmental toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **22**, 334-338.
- Kruse, E., Liu, Z., and Kloppstech, K. (1993). Epression of heat shock proteins during development of barley. *Plant Molec. Biol.* **23**, 111-122.
- Kurtz, S. and Lindquist, S. (1984). Changing patterns of gene expression during sporulation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7323-7327.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakin-Thomas, P. L., Coté, G., and Brody, S. (1990). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Biochemistry and genetics. *Crit. Rev. Microbiol.* **17**, 365-416.
- Larson, J. S., Schuetz, T. J., Sheldon, L., Green, M., Prentice, H., Gallo, J., Saltsman, K., and Kingston, R. E. (1993). Structure/function analysis of human heat shock factors. *J. UOEH* **15**, 78-85.
- Larson, J. S., Schuetz, T. J., and Kingston, R. E. (1995). *In vitro* activation of purified human heat shock factor by heat. *Biochem.* **34**, 1902-1911.
- Lasko, P. (1995). Cell-cell signalling, microtubule organization and RNA localization: is PKA a link? *BioEssays* **17**, 105-107.
- Laszlo, A. (1992). The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. *Cell Prolif.* **25**, 59-87.
- Leonhardt, S. A., Fearon, K., Danese, P. N., and Mason, T. L. (1993). HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6304-6313.
- Leung, K. C., Rajendran, M. Y., Monfries, C., Hall, C., and Lim, L. (1990). The human heat-shock protein family - expression of a novel heat-inducible Hsp70 (Hsp70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem. J.* **267**, 125-132.
- Li, G. C., and Laszlo, A. (1985). Thermotolerance in mammalian cells: a possible role for heat shock proteins. In "Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress" (ed. Atkinson, B. G., and Walden, D. B.), pp. 227-254. Academic Press Inc., New York.
- Li, G. C., Li, L., Liu, R. Y., Rehman, M., and Lee, W. M. F. (1992). Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2036-2040.
- Lindegren, C. (1936). A six-point map of the sex chromosome of *Neurospora crassa*. *J. Genet.* **32**, 356-358.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 1151-91.
- Lindquist, S., and Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **22**, 631-77.
- Lis, J., and Wu, C. (1993). Protein traffic on the heat shock promotor: Parking, stalling, and trucking along. *Cell* **74**, 1-4.
- Liu, R. Y., Kim, D., Yang, S.-H., and Li, G. C. (1993). Dual control of the heat shock response: involvement of a constitutive heat shock element binding factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3078-3082.
- Liu, R. Y., Stromberg, J. S., Corry, P. M., and Lee, Y. J. (1994). Differential effects of heat shock on

- synthesis of Hsp70 and binding activities of heat shock transcription factors in CHO and L929 cells. *J. therm. Biol.* **19**, 373-383.
- Liu, R. Y., Corry, P. M., and Lee, Y. J. (1994b). Regulation of chemical stress-induced *hsp70* gene expression in murine L929 cells. *J. Cell Sci.* **107**, 2209-2214.
- Liu, Y.-C., Hayashi, Y., tohnai, I., Kaneda, T., and Ohtsuka, K. (1992). Effects of continuous heating at mild temperatures on the translocation of Hsp70 and protein synthesis in NRK cells. *J. Radiat. Res.* **33**, 199-210.
- Liu, X., Zweibel, L. J., Hinton, D., Benzer, S., Hall, J. C., and Rosbash, M. R. (1992b). *J. Neurosci.* **12**, 2735-2744.
- Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (1991). *Neurospora crassa* clock-controlled genes are regulated at the level of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 558-563.
- Machwe, A., and Kapoor, M. (1993). Identification of the heat shock protein of *Neurospora crassa* corresponding to the stress-inducible peroxidase. *BBRC* **196**, 692-698.
- Mager, W. H., and Ferreira, P. M. (1993). Stress response of yeast. *Biochem. J.* **290**, 1-13.
- Mandell, R. B., and Feldherr, C. M. (1992). The effect of carboxyl-terminal deletions on the nuclear transport rate of rat hsc70. *Exp. Cell. Res.* **198**, 164-169.
- Manejwala, F. M., Logan, C., Y., and Schultz, R. M. (1991). Regulation of hsp70 mRNA levels during oocyte maturation and zygotic gene activation in the mouse. *Dev. Biol.* **144**, 301-308.
- Mans, R. J. and Novelli, G. P. (1961). Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 48-53.
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G., and Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**, 1997-2003.
- Maresca, B., Medoff, G., Schlessinger, D., Kobayashi, G. S., and Medoff, J. (1977). Regulation of dimorphism in the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Nature* **266**, 447-448.
- Margulis, B. A., Nacharov, P. V., Tsvetkova, O. I., Welch, M., and Kinev, A. V. (1991). The characterization and use of different antibodies against the hsp70 major heat shock protein family for the development of an immunoassay. *Electrophoresis* **12**, 670-673.
- Marshall, J. S., DeRoche, A. E., Kefgstra, K., and Vierling, E. (1990). Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 374-378.
- Martin, F., Requena, J. M., Martin, J., Alonso, C., and López, M. C. (1993). Cytoplasmic-nuclear translocation of the HSP70 Protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *BBRC* **196**, 1155-1162.
- Martindale, D. W., Gu, Z. M., and Csank, C. (1989). Isolation and complete sequence of the isoleucyl-tRNA synthetase gene (*ILSI*) *Curr. Genet.* **15**, 99-106.
- Marucci, R., Stefani, P., and Gomes, S. L. (1995). A unique hsp70 gene induced by heat shock and during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Gene* **152**, 19-26.
- Matts, R. L., Hurst, R., and Xu, Z. (1993). *Biochem.* **32**, 7323-7328.
- McConnell, M., Whalen, A. M., Smith, D. E., and Fisher, P. A. (1987). Heat shock-induced changes in the structural stability of proteinaceous karyoskeletal elements *in vitro* and morphological effects *in situ*. *J. Cell Biol.* **195**, 1087-1098.
- McKay, D. B. (1991). Structure of the 70-kilodalton heat-shock-related proteins. *Springer Semin. Immunopathol.* **13**, 1-9.
- McKay, D. B., Wilbanks, S. M., Flaherty, K. M., Ha, J.-H., O'Brien, M. C., and Shirvane, L. L.

- (1994). Stress-70 proteins and their interaction with nucleotides. In: Morimoto *et al.*, (1994), pp. 153-178.
- Medoff, J., Jacobsen, E., and Medoff, G. (1981). Regulation of dimorphism in *Histoplasma capsulatum* by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *J. Bacteriol.* **145**, 1452-1455.
- Merrow, M. W., and Dunlap J. C. (1994). Intergeneric complementation of a circadian rhythmicity defect: phylogenetic conservation of structure and function of the clock gene *frequency*. *EMBO J.* **13**, 2257-2266.
- Meyer, U., Schweim, P., Fracella, F., and Rensing, L. (1995). Close correlation between heat shock response and cytotoxicity in *Neurospora crassa* treated with aliphatic alcohols and phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 979-984.
- Mezger, V., Rallu, M., Morimoto, R. I., Morange, M., and Renard, J.-P. (1994). Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Dev. Biol.* **166**, 819-822.
- Milarski, K. L., and Morimoto, R. I. (1986). Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9517-9521.
- Milarski, K. L., Welch, W. J., and Morimoto, R. I. (1989). Cell cycle-dependent association of HSP70 with specific cellular proteins. *J. Cell. Biol.* **108**, 413-423.
- Milarski, K. L., and Morimoto, R. I. (1989). Mutational analysis of the human hsp70 protein: Distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. *J. Cell Biol.* **109**, 1947-1962.
- Mishra, S. C. (1976). The effect of cyclic adenosine monophosphate on the growth of *Neurospora crassa*. *Naturwissenschaften* **63**, 485.
- Mitchell, H. K., Petersen, N. S., and Buzin, C. (1985) Self-degradation of heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4969-4973
- Mizzen, L., and Welch, W. J. (1988). Characterization of the thermotolerant cell. I. Effect on protein synthesis activity, the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J. Cell Biol.* **106**, 1106-1116.
- Mohsenzadeh, S. (1993). Zur Wirkung von Hitzeschock auf die Proteindegradation von *Neurospora crassa*. Dissertation, Universität Bremen.
- Mohsenzadeh, S., Xu, C., Fracella, F., and Rensing, L. (1994). Heat shock inhibits and activates different protein degradation pathways and proteinase activities in *Neurospora crassa*. *FEMS Letters* **124**, 215-224.
- Moreau, N., Lainé, M.-C., Billoud, B., and Angelier, N. (1994). Transcription of amphibian lampbrush chromosomes is disturbed by microinjection of HSP70 monoclonal antibodies. *Exp. Cell Res.* **211**, 108-114.
- Morimoto, R. I., Hunt, C., Huang, S.-Y., Berg, K. L., and Banerji, S. S. (1986). Organization, nucleotide sequence and transcription the of chicken HSP70 gene. *J. Biol. Chem.* **261**, 12692-12699.
- Morimoto, R. I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. (eds.) (1990). Heat shock proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Morimoto, R. I. (1991). Heat shock: The role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells* **3**, 295-301.
- Morimoto, R. I., Sarge, K. D., and Abravaya, K. (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes: A paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem.* **267**, 21987-21990.
- Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**, 1409-1410.

- Morimoto, R. I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. (eds.) (1994). The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mosser, D. D., Duchaine, J., and Massie, B. (1993). The DNA-binding activity of human heat shock transcription factor is regulated *in vivo* by hsp70. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5427-5438.
- Munro, S., and Pelham, H. R. B. (1986). An hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291-300.
- Murphy, S. P., Gorzowski, J. J., Sarge, K. D., and Phillips, B. (1994). Characterization of constitutive HSF2 DNA-binding activity in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5309-5317.
- Murtha-Riel, P., Davies, M. V., Scherer, B. J., Choi, S.-Y., Hershey, J. W. B., and Kaufman, R. J. (1993). Expression of a phosphorylation-resistant eukaryotic Initiation factor 2 α -subunit mitigates heat shock inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 12946-12951.
- Nakai, A., and Morimoto, R. I. (1993). Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1983-1997.
- Nakashima, H. (1981). A liquid culture method for the biochemical analysis of the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Plant Cell Physiol.* **22**, 231.
- Nelson, R. E., Selitrennikoff, C. P., and Siegel, R. W. (1975). Cell changes in *Neurospora*. In Reinert, J., and Holzer, H. eds., Results and problems in cell differentiation. Springer Verlag, Berlin.
- Nelson, R. J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M., Craig, E. A. (1992). The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* **71**, 97-105.
- Neuhaus-Steinmetz, U., Xu, C., Fracella, F., Oberheitmann, B., Richter-Landsberg, C., and Rensing, L. (1993). Heat shock and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: Structure and activity relationships of different alcohols. *Molec. Pharmacol.* **45**, 36-41.
- Neuhaus-Steinmetz, U. (1995). Dissertation, Universität Bremen.
- Neuhoff, V., Philipp, K., Zimmer, H. G., and Mesecke, S. (1979). A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe-Seyley's Z. Physiol. Chem.* **360**, 1657-1670.
- Nguyen, T., and Bensaude, O. (1994). Increases thermal aggregation of proteins in ATP-depleted mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **220**, 239-246.
- Nieto-Sotelo, J., Wiederrecht, G., Okuda, A., and Parker, C. S. (1990). The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* **62**, 807-817.
- Niimi, M., Niimi, K., Tokunaga, J., and Nakayama, H. (1980). Changes in cyclic nucleotide levels and dimorphic transition in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **142**, 1010-1014.
- Ninnemann, H. (1991a). Partizipation of molybdenum cofactor of nitrate reductase from *Neurospora crassa* in light promoted conidiation. *J. Plant. Physiol.* **137**, 677-682.
- Ninnemann, H. (1991b). Photostimulation of conidiation in mutants of *Neurospora crassa*. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **9**, 189-199.
- Nossal, G. J. V. (1992). The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. *Cell* **68**, 1-2.
- Nover, L. (ed), 1991. Heat Shock Response. CRC Press, Boca Raton.

- Ödberg - Ferragut, C., Espigares, M., and Dive, D. (1991). Stress protein synthesis, a potential toxicity marker in *E. coli*. *Ecotox. Environmen. Saf.* **21**, 275 - 282.
- O'Farrell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **259**, 4007-4021.
- Ogden, R. C., Lee, M.-C., and Knapp, G. (1984). *Nucleic Acid Res.* **12**, 9367-9382.
- Ohki, M., Tamura, F., Nishimura, S., and Ushida, H. (1986). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* dnaJ gene and purification of the gene product. *J. Biol. Chem.* **261**, 1778-1781.
- Ohtsuka, K., Nakamura, H., and Sato, C. (1986). Intracellular distribution of 73 000 and 72 000 dalton heat shock proteins in HeLa cells. *Int. J. Hyperthermia* **2**, 267-275.
- Ohtsuka, K., and Laszlo, A. (1992). The relationship between hsp 70 localization and heat resistance. *Exp. Cell. Res.* **202**, 507-518.
- Ohtsuka, K., Utsumi, K. R., Kaneda, T., and Hattori, H. (1993). Effect of ATP on the release of hsp70 and hsp40 from the nucleus in heat shocked HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **209**, 357-366.
- Okuno, Y., Imamoto, N., and Yoneda, Y. (1993). 70-kDa heat-shock cognate protein colocalizes with karyophilic proteins into nucleus during their transport *in vitro*. *Exp. Cell. Res.* **206**, 134-142.
- O'Malley, K., Mauron, A., Barchas, J. D., and Kedes, L. (1985). Constitutively expressed rat mRNA encoding a 70-kilodalton heat-shock-like protein. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3476-3483.
- Osborne, M. A., and Silver, P. (1993). Nucleocytoplasmic transport in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 219-254.
- Oster, U., Kardinal, C., Burghardt, H., Werner, B., Lottspeich, F., and Rüdiger, W. (1992). Natural inhibitors of germination and growth VI. Detection of a carboxyterminal fragment of the heat shock protein HSP70 after Coumarin treatment. *J. Plant Physiol.* **140**, 110-115.
- Pall, M. L. (1981). Adenosine 3'5'-phosphate in fungi. *Microbiol. Rev.* **45**, 462-480.
- Pall, M. L., and Robertson, C. K. (1986). Cyclic AMP control of hierarchical growth pattern of hyphae in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **10**, 161-165.
- Paris, S. and Garrison, R. G. (1983). Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (c-AMP) as a factor in phase morphogenesis of *Blastomyces dermatitides*. *Mykosen.* **27**, 340-345.
- Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1993). The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genet.* **27**, 437-496.
- Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1994). Heat shock proteins and stress tolerance. In Morimoto *et al.*, 1994, pp. 457-494.
- Pauli, D., and Tissières, A. (1990). Developmental expression of the heat shock genes in *Drosophila melanogaster*. In: Morimoto *et al.*, 1990; pp. 361-378.
- Pechan, P. M. (1991). Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Letters* **280**, 1-4.
- Pelham, H. R. B. (1984). Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* **3**, 3095-3100.
- Pelham, H. R. B. (1986). Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**, 959-961.
- Petersen, R. and Lindquist, S. (1988). The *Drosophila* HSP70 message is rapidly degraded at normal temperatures and stabilized by heat shock. *Gene* **72**, 161-168.
- Perkins, D. D. (1959). New markers and multiple point linkage data in *Neurospora crassa*. *Genetics* **44**, 1185-1208.

- Perkins, L. A., Doctor, J. S., Zhang, K., Stinson, L., Perrimon, N., and Craig, E. A. (1990). Molecular and developmental characterization of the heat shock cognate-4 gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3232-3238.
- Persson, K. M., and Gekas, V. (1994). Factors influencing aggregation of macromolecules in solution. *Process Biochem.* **29**, 89-98.
- Piper P. W. (1993). Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**, 339-356.
- Pizurki, L., and Polla, B. (1994). cAMP modulates stress protein synthesis in human Monocytes-Macrophages. *J. Cell. Physiol.* **161**, 169-177.
- Plesofsky-Vig, N., and Brambl, R. (1985a). The heat shock response of *Neurospora crassa*: Protein synthesis and induced thermotolerance. *J. Bacteriol.* **162**, 1083-1091.
- Plesofsky-Vig, N., and Brambl, R. (1985b). The heat shock response of fungi. *Exp. Mycol.* **9**, 187-194.
- Plesofsky-Vig, N., and Brambl, R. (1990). Gene sequence and analysis of hsp30, a small heat shock protein of *Neurospora crassa* which associate with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265**, 15432-15440.
- Plesofsky-Vig, N., Vig, J., and Brambl, R. (1992). Phylogeny of the σ -crystallin-related heat-shock proteins. *J. Mol. Evol.* **35**, 537-545.
- Porstmann, B, Porstmann, T, Nugel, E., and Evers, U. (1985). Which of the commonly used marker enzymes gives the best results in colorimetric and fluorimetric enzyme immunoassays: horseradish peroxidase, alkaline phosphatase or β -galactosidase? *J. Immunol. Meth.* **79**, 27-37.
- Pratt, G., Hough, R. and Rechsteiner, M. (1989). Proteolysis in heat-stressed HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 125-126.
- Pratt, W. B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and transport of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 21455-21458.
- Ptashne, M. (1988). *Nature* **335**, 683-689.
- Rabindran, S. K., Haroun, R. I., Clos, J., Wisniewski, J., and Wu, C. (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: Role of a conserved leucine zipper. *Science* **259**, 230-234.
- Rabindran, S. K., Wisniewski, J., Li, L., Li, G. C., and Wu, C. (1994). Interaction between heat shock factor and hsp70 is insufficient to suppress induction of DNA-binding activity *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6552-6560.
- Rechsteiner, M. (1990). *Semin. Cell Biol.* **1**, 433-440.
- Rensing, L. (1993). Morphogenesis of periodic conidiation patterns in *Neurospora crassa*: Its control by circadian rhythm and daily light and temperature signals. In "Oscillators and morphogenesis" (ed. L. Rensing), pp. 327-341, Marcel Dekker, New York.
- Rensing, L., Kohler, W., Gebauer, G., and Kallies, A. (1993). Protein phosphorylation and circadian rhythms. In "Post-translational modifications in plants" (ed. Battey, N. H., Dickenson, H. G., and Hetherington, A. M.), pp. 171-185, Cambridge University Press.
- Rhoads, R. E. (1993). Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J. Biol. Chem.* **268**, 3017-3020.
- Riabowol, K. T., Mizzen, L. A., and Welch, W. J. (1988). Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against HSP70. *Science* **242**, 432-436.
- Richarme, G., and Kohiyama, M. (1993). Specificity of the *Escherichia coli* chaperone DnaK (70-kDa heat shock protein) for hydrophobic amino acids. *J. Biol. Chem.* **268**, 24074-24077.

- Rippmann, F., Taylor, W. R., Rothbard, J. B., and Green, N. M. (1991). A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J.* **10**, 1053-1059.
- Roberts, A., Berlin, V., Hager, J., and Yanofsky, C. (1988). Molecular analysis of a *Neurospora crassa* gene expressed during conidiation. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2411-2418.
- Rochester, D. E., Winer, J. A., and Shah, D. M. (1986). The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO J.* **5**, 451-458.
- Rosenberg, G., and Pall, M. L. (1978). Cyclic AMP and cyclic GMP in germinating conidia of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.* **118**, 87-90.
- Rosenberg, G., and Pall, M. L. (1979). Properties of two cyclic nucleotide-deficient mutants of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **137**, 1140-1144.
- Roti Roti, J. L., Henle, K. J., and Winward, R. T. (1979). The kinetics of increase in chromatin protein content in heated cells: a possible role in cell killing. *Radiat. Res.* **78**, 522-531.
- Roychowdhury, H. S., Wong, D., and Kapoor, M. (1992). hsp80 of *Neurospora crassa*: cDNA cloning, gene mapping, and studies of mRNA accumulation under stress. *Biochem. Cell Biol.* **70**, 1356-1367.
- Russo V. E. A., and Pandit, N. N. (1992). Development in *N. crassa*. In: Development: The molecular genetic approach (Russo, V. E. A., Brody, S., Cove, D., and Ottolenghi, S. eds.) pp. 88-102. Springer Verlag, Heidelberg.
- Sabie, F. T., and Gadd, G. M. (1992). Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) and germ tube formation in *Candida albicans*. *Mycopathology* **119**, 147-156.
- Saibil, H. R., Zheng, D., Roseman, A. M., Hunter, A. S., Watson, G. M. F., Chen, S., auf der Mauer, A., O'Hara, B. P., Wood, S. P., Mann, N. H., Barnett, L. K., Ellis, R. J. (1993). ATP induces large quaternary rearrangements in a cage-like chaperonin structure. *Curr. Biol.* **3**, 265-273.
- Sanchez, Y., Parsell, D. A., Taulien, J., Vogel, J. L., Craig, E. A., and Lindquist, S. (1993). Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J. Bac.* **175**, 6484-6491.
- Sanders, B. M. (1993). Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**, 49-75.
- Sanders, B. M., Pascoe, V. M., Nakagawa, P. A., and Martin, L. S. (1992). Persistence of the heat-shock response over time in a common *Mytilus* mussel. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* **1**, 142-154.
- Schlesinger, M., and Ryan, C. (1993). An ATP- and hsc70-dependent oligomerization of nascent heat-shock factor (HSF) polypeptide suggest that HSF itself could be a "sensor" for the cellular stress response. *Protein Sci.* **2**, 1356-1360.
- Schlossman, D. M., Schmid, S. L., Braell, W. A., and Rothman, J. E. (1984). An enzyme that removes clathrin coats: Purification of an uncoating ATPase. *J. Cell Biol.* **99**, 723-733.
- Scholle, C. (1992). Differenzielle Expression und Induktion von Streßproteinen in verschiedenen Phasen der Entwicklung bei *Neurospora crassa*. Dissertation, Universität Bremen.
- Schultz, C., Gebauer, G., Metschies, T., Rensing, L., and Jastorff, B. (1990). cis, cis-Cyclohexane 1,3,5-Triol polyphosphates release calcium from *Neurospora crassa* via unspecific Ins 1,4,5-P₃ receptor. *BBRC* **166**, 1319-1327.
- Scott, W. A., and Solomon, B. (1973). Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and morphology in *Neurospora crassa*: drug induced alterations. *J. Bacteriol.* **122**, 454-463.

- Scott, W. A. (1976). Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate deficiency in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2995-2999.
- Sherman, M. Y.; and Goldberg, A. L. (1993). Heat shock of *Escherichia coli* increases binding of DnaK (the hsp70 homolog) to polypeptides by promoting its phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8648-8652.
- Shi, Y., and Thomas, J. O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2186-2192.
- Shimada, Y., Kasakura, T., Yokota, M., Miyata, Y., Murofushi, H., Sakai, H., Yahara, I., and Murakami-Murofushi, K. (1992). Expression of a 66-kD heat shock protein associated with the process of cyst formation of a true slime mold, *Physarum polycephalum*. *Cell Structure and Function* **17**, 301-309.
- Shin, D.-Y., Matsumoto, K., Iida, H., Uno, I., and Ishikawa, T. (1987). Heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 244-250.
- Sierra, J. M., and Zapata, J. M. (1994). Translational regulation of the heat shock response. *Mol. Biol. Reports* **19**, 211-220.
- Silver, J. C., Brunt, S. A., Kyriakopoulou, G., Borkar, M., and Nazarian-Armavil, V. (1993). Regulation of two different hsp70 transcript populations in steroid hormone-induced fungal development. *Dev. Gent.* **14**, 6-14.
- Sistonen, L., Sarge, K. D., Phillips, B., Abravaya, K., and Morimoto, R. I. (1992). Activation of heat shock factor 2 during Hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4104-4111.
- Slater, M. R., and Craig, E. A. (1989). The SSA1 and SSA2 genes of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 805-806.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76.
- Snyder, S. L., Wilson, I., and Bauer, W. (1972). The subunit composition of *Escherichia coli* alkaline phosphatase in 1 M Tris. *Biochim. Biophys. Acta* **258**, 178-187.
- Sorensen, K. and Brodbeck, U. (1986). Assessment of coating-efficiency in ELISA plates by direct protein determination. *J. Immunol. Meth.* **95**, 291-293.
- Sorger, P. K. (1990). Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell* **62**, 793-805.
- Sorger, P. K., Lewis, M. J., and Pelham, H. R. B. (1987). Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* **329**, 81-84.
- Sorger, P. K., and Pelham, H. R. B. (1987). Cloning and expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70-like protein in unstressed rat cells. *EMBO J.* **6**, 993-998.
- Sorger, P. K., and Pelham, H. R. B. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* **54**, 855-864.
- Springer, M., and Yanofsky, C. (1989). A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes and Development* **3**, 559-571.
- Springer, M. L. (1993). Genetic control of fungal differentiation: The three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *BioEssay* **15**, 365-374.
- Squires, C. and Squires, C. L. (1992) The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J. Bac.* **174**, 1081-1085.

- Stege, G. J. J., Li, G. C., Li, L., Kampinga, H. H., and Konnings, A. W. T. (1994). On the role of hsp72 in heat-induced intranuclear protein aggregation. *Int. J. Hyperthermia* **10**, 659-674.
- Stege, G. J. J., Li, L., Kampinga, H. H., Konnings, A. W. T., and Li, G. C. (1994). Importance of the ATP-binding domain and nuclear localization domain of HSP72 in the protection of nuclear proteins against heat-induced aggregation. *Exp. Cell. Res.* **214**, 279-284.
- Steinberg, D. and Vaughan, M. (1956). Observation on intracellular catabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 93-102.
- Stevenson, M. A., and Calderwood, S. K. (1990). Members of the 70-kilodalton heat shock protein family contain a highly conserved Calmodulin-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1234-38.
- Stoklosinski, A., Kruse, H., Richter-Landsberg, C., and Rensing, L. (1992). Effects of heat shock on neuroblastoma (N1E 115) cell proliferation and differentiation. *Exp. Cell Res.* **200**, 89-96.
- Tamai, K. T., Liu, X., Silar, P., Sosinowski, T., and Thiele, D. J. (1994). Heat shock transcription factor activates metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8155-8165.
- Tanaka, K., Matsumoto, K., and Toh-e, A. (1988). Dual regulation of the expression of the polyubiquitin gene by cyclic AMP and heat shock in yeast. *EMBO J.* **7**, 195-502.
- Tanguay, R. M., Wu, Y., and Khandjian, E. W. (1993). Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev. Genet.* **14**, 112-118.
- Tas, P. W. L., and Martini, O. H. W. (1987). Regulation of ribosomal protein S6 phosphorylation in heat shocked HeLa cells. *Eur. J. Biochem.* **163**, 553-559.
- Techel, D., Gebauer, G., Kohler, W., Braumann, T., Jastorff, B., and Rensing, L. (1990). On the role of Ca²⁺-calmodulin-dependent and cAMP-dependent protein phosphorylation in the circadian rhythm of *Neurospora crassa*. *J. Comp. Physiol. B* **159**, 695-706.
- Terenzi, H., Flawia, M., and Torres, H. (1974). A *Neurospora crassa* mutant morphological mutant showing reduced adenylate cyclase activity. *BBRC* **58**, 990-996.
- Terenzi, H. F., Flawia, M. M., Téllez-Inón, M. T., and Torres, H. (1976). Control of *Neurospora crassa* morphology by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Bacteriol.* **126**, 91-99.
- Thevelein, J. M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast* **10**, 1753-1790.
- Thomas, P. D., and Dill, K. A. (1993). Local and nonlocal interactions in globular proteins and mechanisms of alcohol denaturation. *Protein Science* **2**, 2050-2065.
- Tomasovic, S. P., Turner, G. N., and Dewey, W. C. (1978). Effect of hyperthermia on nonhistone proteins isolated with DNA. *Radiat. Res.* **73**, 535-552.
- Towbin, H., Staehelin, T. M., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tsang, T. C. (1993). New model for 70 kDa heat-shock proteins' potential mechanisms of function. *FEBS Letters* **323**, 1-3.
- Váchová, L., Kucerová, H., Benesová, J., and Chaloupka, J. (1994). Heat and osmotic stress enhance the development of cytoplasmic serine protease activity in sporulating *Bacillus megaterium*. *Biochem. Mol. Biol. Internat.* **32**, 1049-1057.
- Vassilev, A. O., Plesofsky-Vig, N., and Brambl, R. (1992). Isolation, partial amino acid sequence, and cellular distribution of heat-shock protein hsp98 from *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* **1156**, 1-6.

- Velaquez, J. M., and Lindquist, S. (1984). hsp70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* **36**, 655-662.
- Venetianer, A., Pirity, M., and Hever-Szabo, A. (1994). The function of heat-shock proteins in stress tolerance. *Cell Biol. Int.* **18**, 605-615.
- Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* **42**, 579-620.
- Voellmy, R., Ahmed, A., Schiller, P., Bromley, P., and Rungger, D. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4949-4953.
- Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (medium M). *Microb. Genet. Bull.* **13**, 42-43.
- Voos, W., Gambill, B. D., Laloraya, S., Ang, D., Craig, E. A., and Pfanner, N. (1994). Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6627-6634.
- Wallen, C. A., and Landis, M. (1990). Removal of excess nuclear protein from cells heated in different physiological states. *Int. J. Hypertherm.* **6**, 87-95.
- Wang, C., and Lin, B.-L. (1993). The disappearance of an hsc70 species in mung bean seed during germination: purification and characterization of the protein. *Plant Molec. Biol.* **21**, 317-329.
- Weber, L. A. (1992). Relationship of heat shock proteins and induced thermal resistance. *Cell Prolif.* **25**, 102-113.
- Weitzel, G., Pilatus, U., and Rensing, L. (1987). The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat-shock protein inducing treatments in yeast. *Exp. Cell Res.* **170**, 64-79.
- Weitzel, G., and Li, G. C. (1993). Thermal response of yeast cells overexpressing hsp70 genes. *Int. J. Hyperthermia* **9**, 783-797.
- Welch, W. J., and Feramisco, J. R. (1984). Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 4501-4513.
- Welch, W. J. and Feramisco, J. R. (1985). Rapid purification of mammalian 70,000-Dalton stress proteins: Affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1229-1237.
- Welch, W. J. (1993). How cells respond to stress. *Sci. Am.* **268**, 34-41.
- Wen, W., Taylor, S. S., and Meinkoth, J. L. (1995). The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J. Biol. Chem.* **270**, 2041-2046.
- Werner-Washburne, M., Becker, J., Kasic-Smithers, J., and Craig, E. A. (1989). Yeast HSP70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J. Bac.* **171**, 2680-2688.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **57**, 383-401.
- Wetzstein, M., Dedio, F., and Schumann, W. (1990). Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* gene homologous to the Grpe gene of *E. coli* located immediately upstream of the Dnak gene. *Nucleic Acid Res.* **18**, 1289.
- Wetzstein, M., Dedio, F., and Schumann, W. (1990). *Nucleic Acid Res.* **18**, 2172.
- Wiegant, F. A. C., Souren, J. E. M., Vanrij, J., Vanwijk, R. (1995). Stressor-specific induction of heat shock proteins in rat hepatoma cells. *Toxicology* **94**, 1-3.
- Winter, J., Wright, R., Duck, N., Gasser, C., Fraley, R., and Shah, D. M. (1988). The inhibition of

- petunia hsp70 mRNA processing during CdCl₂ stress. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 315-319.
- Winter, J., and Sinibaldi, R. (1991). The expression of heat shock protein and cognate genes during plant development. In Hightower & Nover (eds.) (1991), pp. 85-105.
- Wright, M., and Tollon, Y. (1982). Induction of heat-shock proteins at permissive growth temperatures in the plasmodium of the myxomycete *Physarum polycephalum*. *Eur. J. Biochem.* **127**, 49-56.
- Wu, C. Caspar, H., T., Browse, J., Lindquist, S., and Somerville, C. (1988). Characterization of an hsp70 cognate gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **88**, 731-740.
- Yang, J. and DeFranco, D. B. (1994). Differential roles of heat shock protein 70 in the *in vitro* nuclear import of glucocorticoid receptor and simian virus 40 large tumor antigen. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5088-5098.
- Xiao, C.-M., and Mascarenhas, J. P. (1985). High temperature-induced thermotolerance in pollen tubes of *Tradescantia* and heat shock proteins. *Plant Physiol.* **78**, 887-890.
- Xu, C. (1995). Dynamik von Protease-Aktivitäten und Hitzeschockproteinen bei der Streßantwort von Ratten Gliom (C6) Zellen. Dissertation, Universität Bremen.
- Zakeri, Z. F., Wolgemuth, D. J., and Hunt, C. R. (1988). Identification and sequence analysis of a new member of the mouse hsp70 gene family and characterization of its unique cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2925-2932.
- Zapata, J. M., Maroto, F. G., and Sierra, J. M. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 16007-16014.
- Zapata, J. M.; Martinez, M. A.; and Sierra, J. M. (1994). Purification and characterization of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 4F from *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Biol. Chem.* **269**, 18047-18052.
- Zhongmo, Y., Magee, W. E., and Spotila, J. R. (1994). Monoclonal antibody ELISA test indicates that large amounts of constitutive HSP-70 are present in salamanders, turtle and fish. *J. them. Biol.* **19**, 41-53.
- Zoeger, D., Scholle, C., Schröder-Lorenz, A., Techel, D., and Rensing, L. (1992a). Some starvation-induced proteins in *Neurospora crassa* are related to glucose-regulated proteins. *Exp. Mycol.* **16**, 138-145.
- Zoeger, D., Beyersmann, D., Rensing, L., and Hagemann, M. (1992b). Streßverarbeitung in der Zelle. *Naturwiss. Rdsch.* **45**, 9-17.

6 Eigene Veröffentlichungen

Im Rahmen meiner Promotion wurden folgende Publikationen angefertigt bzw. befinden sich im Druck oder sind in Vorbereitung, in ihnen sind Teile dieser Arbeit veröffentlicht:

- Fracella, F., Mohsenzadeh, S., and Rensing, L. (1993). Purification and partial amino acid sequence of the major 70,000 Dalton heat shock protein in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **17**, 362-367.
- Neuhaus-Steinmetz, U., Xu, C., Fracella, F., Oberheitmann, B., Richter-Landsberg, C., and Rensing, L. (1994). Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: Structure-activity relationship of different alcohols. *Molec. Pharmacol.* **45**, 36-41.
- Fracella, F., and Rensing, L. (1994). Streßproteine in Biologie und Medizin. *Biomol im Dialog* **7**, 1-11 (8/1994).
- Mohsenzadeh, S., Xu, C., Fracella, F., and Rensing, L. (1994). Heat shock inhibits and activates different protein degradation pathways and proteinase activities in *Neurospora crassa*. *FEMS Letters* **124**, 215-224.
- Meyer, U., Schweim, P., Fracella, F., and Rensing, L. (1995). Close correlation between heat shock response and cytotoxicity in *Neurospora crassa* treated with aliphatic alcohols and phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 979-984.
- Fracella, F. und Rensing, L. (1995). Streßproteine: Ihre wachsende Bedeutung in der Medizin. *Naturwissenschaften* (im Druck).
- Xu, C., Fracella, F., and Rensing, L. (1995). Stress changes protease activity in rat C6 glioma cells (in Vorbereitung).
- Fracella, F., Kallies, A., Häfker, T., Steier, G., Schröder, T., Techel, D., and Rensing, L. (1995). HSP70 expression during asexual development and heat shock in *Neurospora crassa*: a regulatory role of cAMP (in Vorbereitung).
- Fracella, F., Mohsenzadeh, S., Schröder, T., and Rensing, L. (1995). Heat shock adaptation of protein synthesis, HSP70 levels and nuclear location in *Neurospora crassa* (in Vorbereitung).

Teile dieser Arbeit wurden auch auf mehreren nationalen und internationalen Fachtagungen vorgestellt:

Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie (September 1992, Rostock):

- Fracella, F., Mohsenzadeh, S., and Rensing, L. (1992). Heat shock response in *Neurospora crassa*: Purification of the 70,000 Dalton stress protein. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **373**, 767.

The XIIth University of Occupational and Environmental Health international Symposium "Stress Proteins" (November 1992, Kitakyushu, Japan):

Fracella, F., Mohsenzadeh, S., and Rensing, L. (1993). Purification and partial amino acid sequence of the major 70,000 Dalton heat shock protein in *Neurospora crassa*: Posttranslational cleavage of one to six amino terminal amino acids. *J. UOEH* 15, 301.

Jahrestagung der Deutschen und Niederländischen Gesellschaften für Zellbiologie (März 1993, Münster):

Neuhaus-Steinmetz, U., Skrandies, S., Pilatus, U., Fracella, F., and Rensing, L. (1993). Monensin increases intracellular pH and inhibits heat shock proteins synthesis in a rat glioma cell line. *Eur. J. Cell Biol.* 60, 5.

Neuhaus-Steinmetz, U., Xu, C., Fracella, F., Oberheitmann, B., Richter-Landsberg, C., and Rensing, L. (1993). Heat shock response and cytotoxicity testing: The effects of different alcohols on rat glioma C6 cells. *Eur. J. Cell Biol.* 60, 5.

Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie (September 1993, Düsseldorf):

Fracella, F., Oberheitmann, B., and Rensing, L. (1993). ELISA technique applied to the analysis of HSP70 levels after heat-shock and during different developmental stages of *Neurospora crassa*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 766.

Xu, C., Fracella, F., Gebauer, G., and Rensing, L. (1993). Stress changes proteinase activity in C6 rat glioma cells. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 714.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (März 1994, Lübeck):

Kallies, A., Gebauer, G., Steier, G., Häfker, T., Fracella, F., and Rensing, L. (1994). Second messenger level, heat shock gene expression and development in *Neurospora crassa*.

Cold Spring Harbor Laboratory Conference "The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones" (Mai 1994, Cold Spring Harbor, NY, USA):

Fracella, F., Kallies, A., Gebauer, G., and Rensing, L. (1994). Expression of HSP70 and development in *Neurospora crassa*. Biology of heat shock proteins and molecular chaperones, p. 86, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Neuhaus-Steinmetz, U., Skrandies, S., Pilatus, U., Fracella, F., and Rensing, L. (1994). Intracellular pH and heat shock response: Monensin elevates the intracellular pH and inhibits the induction of HSPs. Biology of heat shock proteins and molecular chaperones, p. 209, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Neuhaus-Steinmetz, U., Xu, C., Fracella, F., Oberheitmann, B., Richter-Landsberg, C., and Rensing, L. (1994). Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: Structure activity relationship of different alcohols. Biology of heat shock proteins and molecular chaperones, p. 210, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Danke

An dieser Stelle mein Dank all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitragen. Allen voran meiner Familie und Martine, die mir viele häusliche Pflichten abnahmen und mir so die verschwiegene Zeit in meinem "Keller" ermöglichten, und die mich stets ermutigten, "weiter Pilze zu schocken".

Prof. Dr. Ludger Rensing danke ich für das Vertrauen, die Überlassung des Themas, das stete Interesse am Verlauf dieser Arbeit, die große Hilfe bei der Erstellung von Publikationen, sowie für die Möglichkeit der freien und selbstständigen Planung und Durchführung dieser Arbeit und die ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Für die Möglichkeit und Hilfe bei der Ansequenzierung von HSP70 danke ich der Fa. KNAUER (Berlin, Geschäftsbereich Biochemie), vor allem Dr. Frank Reimann und Dr. Stefan Fischer.

Weiterer Dank gilt der Fa. BIOMOL (Hamburg) insbesondere Dr. Thomas Wiesemann und Dr. Hans-Jürgen Heilmann für die interessante Zusammenarbeit bei der Planung und Durchführung eines gemeinsamen Projektes.

Dr. Jörg Becker danke ich für die freundliche Überlassung des Anti-SSA1-Ak. Dr. Clemens Kirschbaum danke ich für die gute Zusammenarbeit und einige Tips zur Durchführung des kompetitiven HSP70 - ELISA. Bei Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg möchte ich mich bedanken für die freundliche Überlassung einiger Antikörper und die Proben zur Chemilumineszenz Detektion auf Western Blots. Prof. Dr. Detmar Beyersmann habe ich für die Übernahme des Koreferates zu danken. Allen "Rensingern" danke ich für das kollegiale Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit - auch unter manchmal doch recht schwierigen Bedingungen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtstag und -ort: 9. März 1966 in Bremen

Familienstand: ledig

Schule

1972-1976 Grundschule in Bremen, Schule an der Melanchtonstraße

1976-1982 Gymnasium in Bremen, Sekundarbereich I des Schulzentrums am Waller Ring

1982-1985 Gymnasiale Oberstufe in Bremen, Sekundarbereich II des Schulzentrums am Waller Ring; Abschluß: Abitur, Notendurchschnitt: 2,1

Wehrdienst

1985-1986 Grundwehrdienst in Schwanewede

Studium

1986-1987 Universität Oldenburg, Studium der Biologie

1987-1992 Universität Bremen, Studium der Biologie, Fachrichtung Zell- und Molekularbiologie, Abschlußnote: sehr gut, Abschlußdiplom: Diplom-Biologe, Thema der Diplomarbeit: Entwicklung von Methoden zur Isolierung verschiedener Hitzeschockproteine aus *Neurospora crassa* und Herstellung polyklonaler Antikörper.

Beruf

seit 1992 Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter in Forschung und Lehre am Institut für Zellbiologie, Biochemie und Biotechnologie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. L. Rensing) der Universität Bremen, Thema der Dissertation: Streß- und Differenzierungs- abhängige Expression von HSP70 bei *Neurospora crassa*: Regulative Funktion von cAMP.

während dieser Tätigkeit:

- Isolation von Proteinen und Herstellung verschiedener polyklonaler Antikörper sowie Entwicklung von darauf basierenden Methoden zur Antigenanalytik (ELISA, Western-Blot)
- Herstellung und Mitarbeit an der Markteinführung eines neuen "Produktes" (HSP70-ELISA; Testkit zur Detektion und Quantifizierung von HSP70 in Säugerzellkulturen und Geweben) in industrieller Zusammenarbeit
- aktive Teilnahme an mehreren internationalen Fachtagungen in Deutschland, Japan und USA
- mehrere englische und deutsche Publikationen in Fachzeitschriften