

**Entwicklung von Methoden zur Isolierung verschiedener
Hitzeschockproteine aus *Neurospora crassa*
und Herstellung polyklonaler Antikörper gegen HSC 70**

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von
Franco Fracella
aus Bremen

angefertigt im
Fachbereich 2 Biologie/Chemie
(Zell- und Molekularbiologie)
der Universität Bremen

Bremen im Januar 1992

1. Gutachter : Prof. Dr. L. Rensing
2. Gutachter : Prof. Dr. D. Beyersmann

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1. Einleitung</u>	5
1.1. Die Hitzeschockantwort	5
1.2. Struktur und Funktion der Hitzeschockproteine	10
1.2.1. HSP 110.....	11
1.2.2. HSP 90	12
1.2.3. HSP 70	13
1.2.4. HSP 60	15
1.2.5. LMW HSP	16
1.2.6. Ubiquitin	17
1.3. Die Hitzeschockantwort von <i>Neurospora crassa</i>	17
1.4. Allgemeines zur Proteinisolierung.....	19
1.5. Allgemeines zur Immunantwort	22
1.6. Fragestellung.....	23
<u>2. Material und Methoden</u>	25
2.1. Der Versuchsorganismus <i>Neurospora crassa</i>	25
2.2. Kultivierung von <i>Neurospora crassa</i>	25
2.2.1. Konidiengewinnung.....	25
2.2.2. Flüssigkultur.....	26
2.3. Hitzeschockinduktion und Proteinmarkierung mit S ³⁵ -Methionin	26
2.4. Zellaufschluß und Gewinnung der cytoplasmatischen Fraktion	27
2.5. Konzentrierung und Aufbereitung der Proteinextrakte	28
2.5.1. Proteinfällung mit Ammoniumsulfat (AS)	28
2.5.2. Proteinfällung mit Polyethylenglycol (PEG)	28
2.5.3. Dialyse	29
2.5.4. Lyophilisation.....	29
2.6. Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.6.1. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)	30
2.6.2. Proteinbestimmung nach NEUHOFF (1979)	30
2.7. Chromatographische Reinigung der HSP	31
2.7.1. DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie	31
2.7.2. Hydroxylapatit-Chromatographie.....	33
2.7.3. Gelfiltration.....	34
2.7.4. Affinitätschromatographie mit ATP-Agarose	35

2.8. Gelelektrophoretische Trennmethoden.....	37
2.8.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)	37
2.8.1.1. Herstellung der verwendeten Geltypen.....	38
2.8.1.2. Probenaufbereitung	40
2.8.1.3. Elektrophorese	40
2.8.2. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach O'FARREL (1975).....	41
2.8.2.1. Isoelektrische Fokussierung (IF).....	41
2.8.2.2. Herstellung der Rundgele für die isoelektrische Fokussierung	41
2.8.2.3. Probenaufbereitung	43
2.8.2.4. Fokussierung.....	43
2.8.2.5. Die zweite Dimension.....	43
2.8.3. Fixierung, Färbung und Trocknung der Gele.....	43
2.8.3.1. Coomassie brilliant blue-Färbung.....	43
2.8.3.2. Silberfärbung.....	44
2.8.3.3. Trocknung der Gele.....	44
2.8.4. Diphenyloxazol (PPO) Fluorographie	44
2.9. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen (Western Blotting)	45
2.10. Immunologische Methoden.....	46
2.10.1. Aufbereitung der Antigene.....	46
2.10.2. Immunisierung der Kaninchen.....	46
2.10.3. Gewinnung und Aufbereitung der Seren (Gesamt-IgG- Reinigung)	47
2.10.3.1. Serumaufräufreinigung nach HURN und CHANTLER (1980).....	47
2.10.3.2. IgG Reinigung durch Protein G-Agarose Affinitäts- chromatographie	48
2.10.4. Immunologischer Antigennachweis auf Dot- und Western Blots.....	48
<u>3. Ergebnisse</u>	50
3.1. Ernte des Myzels und Zellaufschluß.....	50
3.2. Proteinmuster der cytoplasmatischen Fraktion hitzestressierter und ungestresseter Zellen.....	
3.2.1. ATP-Affinitätschromatographie der K und HS-Rohextrakte	51

3.3. Aufreinigung und Isolierung von HSP aus <i>Neurospora crassa</i>	54
3.3.1. Proteinfällung	55
3.3.2. Gelfiltration der Rohextrakte	56
3.3.3. DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie	56
3.4. Isolierung von HSC 69 aus <i>Neurospora crassa</i>	62
3.4.1. Gelfiltration der HSC 69 enthaltenden DEAE-Fractionen	62
3.4.2. Affinitätschromatographie mit der ATP-Agarose	62
3.5. Aufreinigung des HSP 81 aus <i>Neurospora crassa</i>	68
3.5.1. Affinitätschromatographie mit der ATP-Agarose	68
3.5.2. Hydroxylapatit-Chromatographie der HSP 81 enthaltenden	DEAE-Fraktion
3.5.3. Gelfiltration der HSP 81 enthaltenden Hydroxylapatit- Fraktionen.....	71
3.6. Ca ⁺⁺ -Freisetzung aus isolierten Vakuolen von <i>Neurospora</i>	durch isoliertes H
3.7. Charakterisierung der polyklonalen Antikörper gegen HSC 69	74
3.7.1. Aufbereitung der Seren (Gesamt-IgG-Reinigung)	74
3.7.2. Immunologischer Antigennachweis auf Dot- und Western Blots.....	76
<u>4. Diskussion</u>	79
4.1. Erhöhung des ATP-bindenden Proteinanteils in hitzegeschockten Extrakten	79
4.2. Konzentrierung der HSP.....	80
4.3. Isolierung des HSC 69.....	81
4.4. Aufreinigung des HSP 81	82
4.5. Ca ⁺⁺ -Freisetzung aus isolierten Vakuolen von <i>Neurospora</i>	durch isoliertes H
4.6. Herstellung polyklonaler Ak gegen HSC 69.....	83
<u>5. Zusammenfassung und Ausblick</u>	84
<u>6. Anhang</u>	86
6.1. Zusammensetzung der Kulturmedien	86
6.2. Abkürzungen.....	87
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	88

1. EINLEITUNG

1.1. Die Hitzeschockantwort

Alle Organismen werden ständig mit Umweltveränderungen konfrontiert, welche zu strukturellen und funktionellen Anpassungsvorgängen in ihren Zellen führen. Sind solche Veränderungen ungewöhnlich schnell oder intensiv, so bezeichnet man sie als Streß oder Schock.

Die Untersuchungen der Streßantwort der Zelle begannen mit einer Publikation von RITOSSA im Jahre 1962. In seinem wenig beachteten Artikel beschreibt er die Bildung einer Reihe neu gebildeter Puffs der Polytänchromosomen der Speicheldrüse von *Drosophila* - Larven. Er konnte die Puffs, die die Aktivität einzelner Gene widerspiegeln, durch Hitze, Dinitrophenol (DNP) und Salicylsäure induzieren. RITOSSA hat mit seiner Arbeit den Grundstein zur Beschreibung der allgemeinen Streßantwort gelegt, aber erst 1974, als TISSIERES und seine Mitarbeiter die entsprechenden Proteine (Hitzeschockproteine, HSP) bei *Drosophila* identifizierten, wurden seine scheinbar exotischen Experimente voll anerkannt.

Diese Klasse stark konservierter Hitzeschockgene bzw. Proteine wird zunehmend und an einer Vielzahl von Organismen analysiert, obwohl die Streßantwort über die Bildung dieser Proteine hinausgeht. So kommt es z.B. zu vielfältigen Veränderungen am Genexpressionsapparat, welche anscheinend eine Optimierung der Streßproteinsynthese zum Ziel haben. Zu den wichtigsten streßbedingten Veränderungen der zellulären Ultrastruktur zählen die Deformation von Nucleolus, Veränderungen von Plasmamembranen, Umordnung der Cytoskelett-Systeme und die Bildung von Protein-Aggregaten (zum Teil HSP-Aggregate) in Zellkern und Cytoplasma (NOVER, 1984 und 1990). Streßbedingungen beeinflussen auch die Zellteilung. Es kann zu Störungen in der DNA-Synthese und in der Ausbildung des mikrotubulären Spindelapparates kommen. Je nach Art und Strenge der Streßbedingungen ist der Ablauf der Zellzyklusphasen blockiert oder stark verzögert (NOVER, 1990).

Der Temperaturbereich, in dem die Hitzeschockantwort ausgelöst wird, hängt von den unterschiedlichen optimalen Wachstums- und Entwicklungstemperaturen der Organismen ab. Bei einigen aus dem arktischen Bereich stammenden Bakterien und Hefen bewirken bereits Temperaturen zwischen 15 und 20°C eine Hitzeschockantwort (LINDQUIST, 1986). Einige thermophile Bakterien zeigen entsprechende Reaktionen erst bei ca. 80°C (NOVER, 1984. TRENT et al, 1990). Im Allgemeinen beobachtet man eine maximale

Hitzeschockantwort bei Temperaturen die 10-15°C über dem Temperaturoptimum der entsprechenden Organismen liegen (LINDQUIST, 1986).

Schon RITOSSA hatte bei seinen Untersuchungen gezeigt, daß außer Hitzestress auch andere chemische Stressoren zu gleichartigen Veränderungen im Puffmuster der Polytänchromosomen von *Drosophila* führten. Heute sind mehr als 100 chemische Agentien oder Stressbehandlungen bekannt, die eine HSP-Synthese auslösen können (NOVER, 1984). Nach ihrem Wirkungsmechanismus lassen sich die verschiedenen Stressoren in zwei Gruppen, die hitzeschockartigen und die spezifischen Induktoren, unterteilen.

Zu den hitzeschockartigen Induktoren zählen Gifte der Atmungskette, Schwermetalle, Aminosäure-Analoga, Hemmstoffe der Proteinbiosynthese, Gifte für SH-Gruppen-haltige Proteine sowie verschiedene Alkohole. Die Stressoren dieser Gruppe führen zur Induktion aller HSP, häufig unabhängig vom Testorganismus. Sie wirken über das selbe Signalsystem wie die Temperaturerhöhung. Obwohl wichtige Details noch unklar sind, scheint die Genaktivierung durch diese Stressoren über die Modifikation des selben Aktivatorproteins (HSF=Hitzeschocktranskriptionsfaktor) zu erfolgen, welches an einen regulatorischen Genabschnitt (HSE=Hitzeschockelement) im Promotorbereich der HS-Gene bindet (NOVER, 1990). Hitzeschock und die hitzeschockartigen Induktoren führen zur Denaturierung von Proteinen bzw. zur Synthese von abnormen Proteinen. Diese Anreicherung von denaturierten Proteinen könnte Auslöser der Stressantwort sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch Experimente in denen die Stressantwort ausgelöst werden konnte, indem man Zellen durch Mikroinjektion oder durch gentechnische Manipulationen mit abnormen Proteinen überschwemmte (ANATHAN et al, 1986; GOFF und GOLDBERG, 1985).

Drei wichtige Teilstücke der Signalkette scheinen also klar: (1) die verschiedenartigen Signale, die (2) alle zur Akkumulation von deformierten Proteinen beitragen, und (3) der Promotorbindungsereich (HSE) mit dem spezifischen Aktivatorprotein (HSF). Die Verknüpfung von (2) und (3) gilt es zu finden. Vermutlich spielen das proteolytische System der Zelle und eine stressbedingte Modifikation des Aktivatorproteins (z.B. durch Phosphorylierung) hier eine wichtige Rolle (NOVER, 1990).

Stressoren aus der heterologen Gruppe der spezifischen Induktoren bewirken die Induktion einzelner HSP, meist spezifisch für einzelne Organismen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Schwermetallchelatoren, Steroidhormone, Infektionen durch Phagen bei Bakterien bzw. durch DNA-Tumorviren bei Säugern, Verwundungen oder Unterbrechungen der

Blutversorgung und Zellteilungshormone wie z.B. Mitogene oder Lymphokine. Innerhalb dieser Gruppe scheint es keine Gemeinsamkeit in der Signalwandlung zu geben. In einigen Fällen (Steroidhormone, DNA-Tumoviren) fand man Hinweise auf streßunabhängige regulatorische Bereiche im Promotor einzelner Gene (NOVER, 1990).

Das Vorkommen einiger HSP ist auch unter normalen Bedingungen essentiell und wird unter anderem durch verschiedene Entwicklungssignale reguliert. In alternden Fruchtfliegen wurde eine erhöhte Expression von HSP 70 gefunden. Dies ist vermutlich eine Reaktion auf im Alter vermehrt auftretende Proteine mit veränderter Konformation (NIEDZWIECKI et al, 1991).

Der bereits kurz erwähnte Genschalter, das HSE im Promotorbereich der HS-Gene, wurde bei allen bisher untersuchten Eukaryoten gefunden (LINDQUIST, 1986). Das HSE wurde 1982 von PELHAM entdeckt. Funktionelle HSE bestehen aus mindestens drei aufeinanderfolgenden 5-bp langen Einheiten mit wechselnden -N-G-A-A-N- und -N-T-T-C-N- Sequenzmotiven, und liegen etwa 20 bp stromaufwärts vor der TATA-Box. Tauscht man das HSE verschiedener Organismen untereinander aus, beobachtet man seine Funktion stets in dem für den jeweiligen Organismus typischen Hitzeschockbereich, d.h. die temperatursensitiven Elemente liegen nicht auf der DNA, sondern in dem vorgeschalteten Signalsystem der Zellen (NOVER, 1987). Hauptbestandteil dieses Signalsystems ist das regulatorische Protein (HSF), das kurz nach der Charakterisierung des HSE entdeckt wurde (WU, 1984; PARKER und TOPOL, 1984). Der HSF kann sowohl aus hitzegeschockten als auch aus Kontrollzellen isoliert werden. Der aus den hitzegeschockten Zellen isolierte HSF besitzt eine höhere Transkriptionsaktivität. In *Drosophila* und Hefe ist der aktive HSF aus drei gleichartigen Untereinheiten aufgebaut. Ob die Trimerisierung des HSF aus einer streßbedingten Aktivierung der Monomeren resultiert ist noch unklar. Der HSF bindet in seiner trimeren Form an das HSE. Wahrscheinlich bindet jedes Monomer eine 5-bp-Einheit des HSE (NOVER, 1990; PERISIC et al, 1989; SORGER, und NELSON, 1989). Sequenzanalysen zeigen eine konservierte, aus 90 -100 Aminosäureresten bestehende, DNA-bindende Domäne im N-terminalen Teil des HSF. Diese Domäne besteht aus zwei bis drei hydrophoben Motiven des sogenannten "Leucin-Zipper" Typs. Diese Domäne wird auch zur Oligomerisation der HSF Monomere benötigt werden. Am C-terminalen Teil des HSF ist eine Aktivierungsdomäne (ein hochkonserviertes Heptapeptid) beschrieben worden, an die entweder Aktivatoren oder eventuell auch Repressoren binden (NOVER, 1991). Diese Repressorhypothese wird gestützt durch die Tatsache, daß der HSF auch in ungestreßten Zellen in geringer Menge in aktiver Form vorliegt, so daß nicht die Streßbedingungen selbst das HSF aktivierende Signal sein können. Durch ein Repressorprotein könnte der trimere

HSF in einer inaktiven Form gehalten werden (Abb. 1.1.). HSP 70 ist an einer Hemmung der HS-Gentranskription beteiligt und könnte ein solches Repressorprotein für den HSF darstellen (NOVER, 1991). Die inaktive HSF-Form könnte durch HSP 70 in einer ähnlichen Art aufrechterhalten werden, wie dies vom HSP 90 für verschiedene Steroidhormonrezeptoren bekannt ist. Die prokaryotische Variante des HSF ist der 32 kD große Sigma (σ^{32})-Faktor (GROSS et al, 1990).

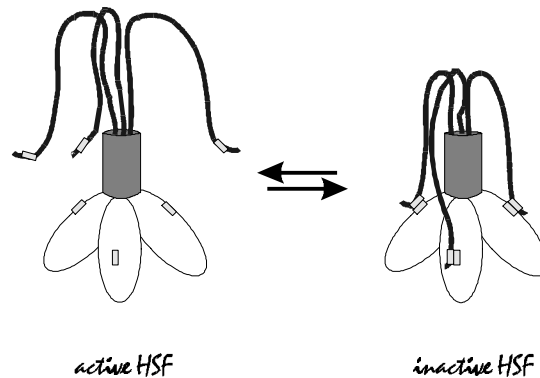


Abb. 1.1.: Hypothetische Darstellung des HSF in seiner aktiven und inaktiven trimeren Form. Eventuell muß zur Inaktivierung des HSF ein C-terminaler Peptidbereich (hochkonserviertes Heptapeptid am C-terminalen Teil der Monomeren) mit einem anderen Bereich des Proteins assoziieren. Ein Repressorprotein, hier wird HSP 70 diskutiert, könnte eine solche Assoziation stabilisieren und die inaktive Form aufrechterhalten. Von HSP 70 ist eine Selbstregulation bekannt, vielleicht kommt dem HSP 70 hier eine ähnliche Aufgabe zu, wie dem HSP 90 bei der Aufrechterhaltung der inaktiven Form vieler Steroidhormonrezeptoren. Der hydrophobe N-terminale Teil des aktiven HSF bindet nach Leucin-Zipper Art spezifisch an das HSE im Promotorbereich der HS-Gene.

Mit HSF-Antikörpern wurden Untersuchungen zur Lokalisierung des HSF an Polytänchromosomen von *Drosophila* durchgeführt. In Kontrollzellen bindet der HSF nur am hsp 83 Locus. In gestreßten Zellen wurde der HSF außer an den bekannten HS Genorten, an mehr als 40 weiteren Stellen gefunden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dies weitere HS induzierte Gene sind oder, ob der HSF eine zusätzliche Rolle als Repressor vieler normaler ("housekeeping") Gene spielt (NOVER, 1991).

Im Gegensatz zur kurz geschilderten Umprogrammierung der Transkription zu Gunsten der HS-Gene, scheinen die Veränderungen der Translation nicht von allen hitzeschockartigen Induktoren ausgelöst werden zu können. Auf Translationsebene kommt es zum vorübergehenden Zerfall der Polysomen und zu Veränderungen des Proteinsynthese-Apparates mit der Folge einer präferentiellen Translation von HS-mRNA.

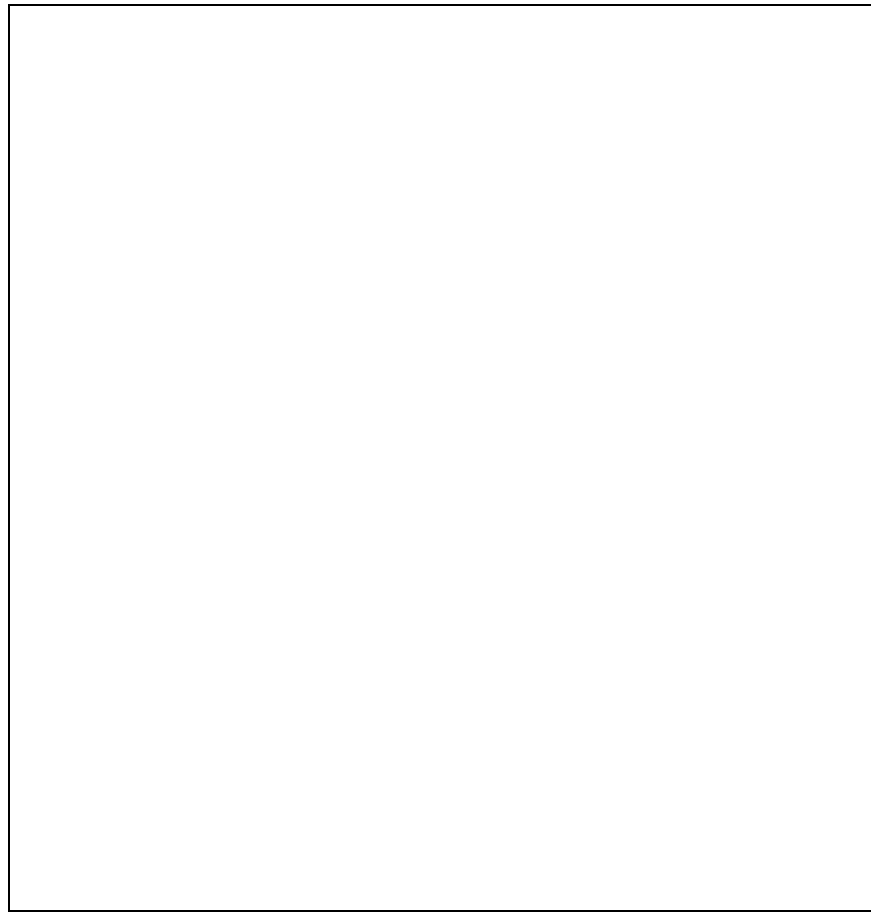


Abb.1.2.: Darstellung eines Modells zur Regulation der eukaryotischen HS-Genexpression. Die schwarzen Pfeile beschreiben den zur HSP Induktion führenden Hauptweg (Quelle: GURLEY und KEY, 1991).

In der Regel bestehen die Gene der Eukaryoten aus Introns und Exons. Nur bei sehr wenigen der bisher untersuchten HS-Gene hat man Introns entdecken können. Wahrscheinlich fehlen Introns in den HS-Genen um ihre schnellst mögliche Expression zu ermöglichen. Darüberhinaus wurde eine durch Hitzeschock induzierte Unterbrechung der Verarbeitung intronhaltiger mRNA-Vorläufer beobachtet. Das führt zur vermehrten bzw. alleinigen Expression der intronfreien HS-Gene (NOVER, 1990).

Bei Eukaryoten gibt es Hinweise auf eine Selbstregulation der HSP Synthese. Durch eine Hemmung der HSP Synthese wirken die gebildeten HSP dem stimulierenden HS-Effekt auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene entgegen (GURLEY und KEY 1991 und dort genannte Zitate). Einen Überblick über die kurz beschriebenen regulatorischen Mechanismen der HSP Genexpression bei Eukaryoten gibt die Abb.1.2.

1.2. Struktur und Funktion der Hitzeschockproteine

Physiologischer Streß führt zu verminderter Synthese der meisten Proteine (HSS=heat shock sensitive proteins). Einige andere Proteine werden vorübergehend vermehrt synthetisiert (HSC=heat shock cognate proteins), und wiederum andere werden vorübergehend neu induziert (HSP=heat shock proteins). Diese Reaktionen sind die wichtigsten Teile der Streß- oder Hitzeschockantwort. Die synthetisierten Proteine werden als Streß- oder Hitzestreßproteine (HSP) bezeichnet. HSP können durch zwei Kriterien definiert werden: (a) eine durch Streß stark erhöhte Synthese und (b) das Vorliegen des HSE im Gen dieser Proteine.

Folgende Eigenschaften sind allen bzw. den meisten HSP gemein: (a) starke Konservierung auch zwischen phylogenetisch entfernten Organismen, (b) saure Proteine mit isoelektrischen Punkten (pI) zwischen 4.7 und 6.7, (c) Isoformen der Haupt-HSP (Codierung durch Multigenfamilien), (d) zum Teil nicht nur streßabhängige Induzierbarkeit, sondern oft auch Kontrolle durch Entwicklungs-signale wie Zellteilungsfaktoren oder sogar konstitutive Synthese, (e) Komplex-bildung der Haupt-HSP mit einer Reihe von Proteinen (siehe Tab. 1.1.).

HSP 60	HSP 70	HSP 90
-λ-Phagen Oberflächenproteinen	-Clathrin-coated Vesikel	-inaktive Steroidhormonrezeptoren
-Rubisco schwere Ketten	-Prepro α-Factor	-Tyrosin-Kinasen
-Cytochrom c	-nucleoläre Proteine	-eIF-2α-Kinase
-F1-ATPase	-IgG schwere Ketten	-Hefe Protein Kinase C
	-p53 Tumor Antigen	-Mikrotubuli (Tubulin)
	-DNA Replikations-Initiations- Komplex	-Mikrofilamente (Actin)
	-Calmodulin	
	-SV40 T-Antigen	
	-Mikrotubuli (β-Internexin)	
	-aktive und inaktive Steroidhormonrezeptoren	

Tab. 1.1.: Die mit HSP Komplexe bildenden Proteine im Überblick (modifiziert nach SCHLESINGER, 1990; ITOH und TASHIMA, 1990).

In Eukaryoten werden verschiedene Klassen von HSP (Produkte verschiedener Multigenfamilien) beschrieben. Nach der Größe ihrer Vertreter unterscheidet man die HSP 110-Familie mit Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 104 bis 110 kD, die HSP 90-Familie (80 - 94 kD), die HSP 70-Multigenfamilie (65-78 kD), die HSP 60-Familie (56-61 kD), die LMW (**l**ow **m**olecular **w**eight) HSP-Familien (12-47 kD) und die Ubiquitin-Familie (8.5 kD).

1.2.1. HSP 110

Die meisten bisher untersuchten eukaryotischen Zellen synthetisieren ein hochmolekulares HSP im Bereich von 100 - 110 kD. Unter nativen Bedingungen bildet HSP 110 etwa 200 kD große Dimere (ITOH und TASHIMA, 1991). Näher untersucht wurden diese Proteine bisher nur bei *Saccharomyces cerevisiae* und Säugern. Bei Hefe ist das entsprechende Protein 104 kD groß, und zum Wachstum unter "normalen" oder Streßbedingungen nicht essentiell. Allerdings scheint HSP 104 zum Erwerb einer Toleranz gegenüber Hitze, Ethanol und anderer Stressoren unentbehrlich zu sein (SANCHEZ und LINDQUIST, 1990). Das HSP 104 aus Hefe besitzt vermutlich zwei Nucleotid-Bindungsstellen (PARSELL et al, 1991). Das homologe Protein der Säuger ist, sowohl in Kontrollzellen als auch in gestreßten Zellen, in Zellkern und Nucleolus lokalisiert. Die Homologie von HSP 110 zwischen Säugetieren und

Hefen bzw. zu anderen Organismen ist bisher nicht untersucht. Das prokaryotische Homolog ist ClpA (NOVER, 1991).

1.2.2. HSP 90

Proteine dieser Klasse variieren in ihrer Größe zwischen 80 und 94 kD; sie sind hauptsächlich im Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Unter nativen Bedingungen bildet HSP 90 etwa 170 - 200 kD große Dimere (ITOH und TASHIMA, 1991). Ein kleiner Teil des cytoplasmatischen HSP 90 akkumuliert während einer Streßphase im Zellkern. HSP 90 ist an Serin- und Threoninresten phosphoryliert (SCHLESINGER, 1990). CSERMERLY und KAHN (1991) beschreiben für HSP 90 aus Säugetieren eine Autophosphorylierung an Serinresten und eine ATP-Bindungsstelle. Die isoelektrischen Punkte der Proteine dieser Klasse liegen zwischen 5.4 und 6.2 (NOVER, 1984). Für HSP 90 ist ein Stokescher Radius von 6.9 nm bestimmt worden (WELCH et al, 1982a). HSP 90 assoziiert mit einer Reihe von zellulären Proteinen wie, z.B. Steroidhormonrezeptoren, verschiedenen Proteinkinasen, mikrofilamentösen und mikrotubulären Netzwerken. Gut untersucht ist die Komplexierung vieler Steroidhormonrezeptoren mit HSP 90. Durch die HSP 90 Assoziation werden die Steroidhormonrezeptoren in ihrer inaktiven Form aufrechterhalten. Fehlt HSP 90, würden die Steroidhormonrezeptoren schon in Abwesenheit des eigentlich aktivierenden Steroidhormons an die DNA binden. Aufgrund dieser Aufrecht-erhaltung der Steroidhormonrezeptoren im inaktiven Zustand (einer ungefalteten Form), bezeichnet man HSP 90 auch als "Chaperon". Die Assoziation des HSP 90 mit mikrofilamentösen und mikrotubulären Netzwerken könnte dem Schutz dieser Strukturen gegen den einwirkenden Streß dienen. Außer den durch Streß induzierten Formen sind konstitutiv vorhandene und durch Entwicklung regulierte Vertreter dieser Klasse beschrieben (LINDQUIST 1988; VIERLING, 1991). Vertebraten haben außer den cytoplasmatischen Formen noch ein Homolog im endoplasmatischen Retikulum. Es wird bei Glucosemangel verstärkt exprimiert und als GRP 94 (glucose regulated protein) bezeichnet. Das htpG Genprodukt aus *E. coli* weist eine 40 %ige Aminosäuresequenzhomologie zum eukaryotischen HSP 90 auf (LINDQUIST, 1988).

1.2.3. HSP 70

HSP 70 ist das in vielen Organismen bisher am gründlichsten untersuchte HSP. Es sind streßinduzierte (HSP 70) und konstitutiv (HSC 70) vorhandene Vertreter bekannt. Mitglieder der HSP 70-Familie sind bei Eukaryoten hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, wurden aber auch im ER, der Mitochondrienmatrix, den Chloroplasten und im Zellkern und Nucleolus beschrieben. HSP 70 und HSC 70 akkumulieren während der Streßphase in Zellkern und Nucleolus. Während der Erholungsphase wandern sie wieder aus (LINDQUIST, 1986). Eine Sequenz von 17 Aminosäureresten wirkt als "targeting" Signal (DANG und LEE, 1988). Wie diese Signalsequenz die reversible Migration des HSP 70 zum Zellkern unterstützt ist bisher nicht verstanden. Es wird vermutet, daß HSP/C 70 im Nucleolus die Präribosomen vor einer Denaturierung während eines Stresses schützt (PELHAM, 1986 und 1990). Das im ER lokalisierte HSP 70 wird auch als BiP (immunoglobulin heavy chain **b**inding **p**rotein) oder GRP 78 (**g**lucose **r**egulated **p**rotein) bezeichnet. Bei *Saccharomyces cerevisiae* sind vier HSP 70-Gengruppen mit acht HSP 70 Genen gefunden worden. Diese HSP 70 Gene weisen untereinander eine 50 - 96 %ige Homologie auf (LINDQUIST und CRAIG, 1988; LINDQUIST, 1986; CRAIG, 1990; VIERLING, 1991). Die isoelektrischen Punkte der HSP 70 Homologe liegen zwischen 4.67 und 6.3 (VIERLING, 1991; NOVER, 1984). Die pI der konstitutiven Vertreter sind etwas saurer (um 5.55) als die der induzierten (5.8-6.3) (PELHAM, 1986). Für Säuger HSP 70 ist ein Stokescher Radius von 4.3 nm bestimmt worden (WELCH et al, 1982a). SADIS et al (1990) fanden für Säuger HSC 70 ein Adsorptionsmaximum bei 279 nm, errechneten ein A_{280} / A_{260} Verhältnis von 1.63, und geben einen Extinktionskoeffizienten ϵ 280 nm (1 mg/ml) von 0.54 an. Das native Protein ist ein mit ADP assoziiertes Dimer $(HSC\ 70 \times ADP)_2$. Bei hohen Temperaturen wurden aber auch inaktive Hexamere $(HSC\ 70)_6$ gefunden. Eine Interaktion mit Substratprotein bewirkt einen schnellen ADP/ATP-Austausch und eine starke ATPase-Aktivität (NOVER, 1991). Das prokaryotische Homolog ist das DnaK Protein (LINDQUIST, 1988). Zur optimalen Funktion benötigt das DnaK-Protein noch ein kleines, etwa 30 kD großes, "Helfer-Protein". Dieses wird als DnaJ bezeichnet (NOVER, 1991). In neueren Arbeiten wurde ein solches "Helfer-Protein" auch für DnaK-Homologe in Mitochondrien und Chloroplasten von Eukaryoten gefunden. SCJ1 in Mitochondrien der Hefe ist das Hefe-Homolog zu DnaJ (BLUMENBERG et al, 1991).

Alle bisher untersuchten HSP 70 Mitglieder binden ATP; sie können mit einer ATP-Affinitätschromatographie isoliert werden und besitzen ATPase-Aktivität (PELHAM, 1990; WELCH und FERAMISCO, 1985). Die am stärksten konservierten Domänen der HSP 70 Homologe wurden in der N-terminalen Hälfte (Aminosäurereste 1-350) gefunden. Mit Hilfe

der Röntgen-Kristallographie zeigte die Arbeitsgruppe um MCKAY daß diese Hälfte ATP bindet. Die dreidimensionale Struktur dieses 44 kD großen ATPase-Fragments des Rinder HSC 70 besteht aus vier Domänen die zwei "Loops" bilden. ATP wird tief an der Basis der Spalte zwischen den "Loops" gebunden (siehe Abb.1.3.).

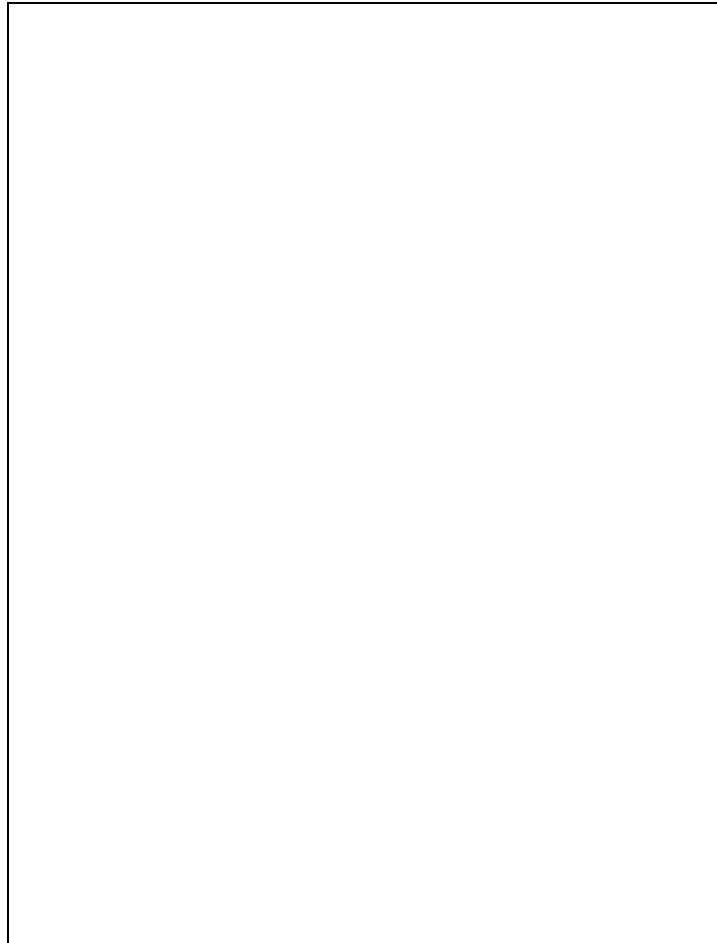


Abb.1.3.: Darstellung der dreidimensionalen Struktur des ATPase-Fragments des Rinder HSC 70. ATP wird tief an der Basis der Spalte zwischen den zwei "Loops" gebunden (Quelle: FLAHERTY et al, 1990).

Das ATPase-Fragment des HSC 70 ähnelt dem des Aktins und der Hexokinase (FLAHERTY et al, 1990). Die N-terminale Hälfte des HSP 70 besitzt auch eine Calmodulin-Bindungsstelle (STEVENSON und CALDERWOOD, 1990).

Nach einer Hypothese von PELHAM (1986) spielen HSP 70 und Homologe eine Rolle bei der ATP-abhängigen Faltung und Rekonstruktion von Proteinen. ROTHMAN und Mitarbeiter zeigten dann *in vitro* eine durch Säuger HSC 70 katalysierte Clathrinabspaltung von "coated" Vesikeln (CHAPPEL et al, 1987). Dabei bindet HSC 70 eine spezifische Konformation der leichten Kette des Clathrins und stimuliert das "uncoating" bei

gleichzeitiger Hydrolyse von ATP. HSP 70 scheint den Transport von Proteinen durch Membranen (ER- wie Mitochondrienmembranen) zu erleichtern (DESHAIES et al, 1988; CHIRICO, et al, 1988). ALDER et al (1990) berichten von einer Poreninduktion durch HSP 70 in künstliche Membranen. HSP 70 könnte so auf den intrazellulären Ionenhaushalt wirken. Eine allgemeinere Funktion der HSP 70 Homologe wird von BECKMANN et al (1990) vorgeschlagen. Sie fanden, daß HSC 70 einen hohen Prozentsatz neusynthetisierter Polypeptide bindet und vermuten eine Erleichterung der korrekten Faltung vieler Proteine. HSP 70 assoziiert auch mit denaturierten Proteinen und verhindert die Bildung größerer, störender Aggregate. Das von HSP 70 gebundene denaturierte Protein wird unter Hydrolyse von ATP wieder freigegeben (PALLEROS et al, 1991; JINN et al, 1989). Die Bindungsinteraktion von HSP 70 und "Substrat" ist bisher erst wenig verstanden. Aufgrund der Divergenz von Domänen in der C-terminalen Hälfte des HSP 70 wird angenommen, daß dies die Substratspezifität bestimmt (VIERLING, 1991). PELHAM (1986) stellt sich eine hydrophobe Interaktion zwischen der C-terminalen Hälfte des HSP 70 und Substrat vor. Die Präsenz von hydrophoben Regionen wird durch die gute Bindung von langkettigen Fettsäuren an HSP 70 bestätigt (GUIDON und HIGHTOWER, 1986). Auf CD-Spektroskopie (circular dichroism) basierende Sekundärstrukturvorhersagen für die C-terminale Hälfte des HSC 70 deuten allerdings auf stark geladene und polare α -Helices (SADIS et al, 1990). Im Groben lassen sich zwei Hauptdomänen der HSP 70 (HSC 70, DnaK, GRP 78) unterscheiden, die N-terminale ATPase Domäne und die C-terminale mit Substrat interagierende Domäne.

1.2.4. HSP 60

Die eukaryotischen HSP 60 Homologe sind kerncodierte in Mitochondrien, Vakuolen und Chloroplasten vorkommende, 56-61 kD große, Proteine. HSP 60 Homologe sind essentielle Bestandteile dieser Kompartimente und auch in Abwesenheit jeglichen Stresses vorhanden. Aufgrund ihrer Hilfsfunktion bei Faltung und Konstruktion verschiedener Proteine wurden Mitglieder dieser Familie als erste HSP als "Chaperons" bezeichnet. Das Chloroplastenhomolog bindet die schwere Kette der Rubisco und ist zur Konstruktion dieses 16meren Enzymkomplexes unentbehrlich (CHENG, et al, 1989). In den Mitochondrien ist HSP 60 an der Konstruktion und Membranverankerung der F_1 ATPase, des Cytochrom c und des Rieske Fe/S Proteins beteiligt. Wie die importierten Vorläufer dieser Proteine von HSP 60 erkannt und gebunden werden ist unbekannt. Die Faltung, Konstruktion und Freigabe des fertigen Proteins sind ATP-abhängige Prozesse. Außer der Faltungshilfe von importierten kerncodierten Vorläuferproteinen, wird vermutet, HSP 60 spiele eine Rolle bei der Faltung mitochondrial und chloroplastidär codierter Proteine (VIERLING, 1991).

GroEL ist das 57 kD große, in *E. coli* gefundene, prokaryotische Homolog zu HSP 60. Es ist zu 56 % identisch mit dem HSP 60 von *S. cerevisiae*. Das native Protein ist aus 14 GroEL Untereinheiten, die mit 14 GroES Untereinheiten assoziiert sind, aufgebaut (NOVER, 1991). GroES ist ein nur 10 kD großes Protein und könnte, ähnlich wie DnaJ für DnaK, ein "Helfer-Protein" für GroEL darstellen. In Mitochondrien von Säugern und Chloroplasten der Erbse wurde ein dem GroES ähnliches 9 kD großes Protein identifiziert (LUBBEN et al, 1990). GroEL/GroES ist bei einer λ -Phageninfektion an der Konstruktion des λ -Phagen beteiligt (VIERLING, 1991).

1.2.5. LMW HSP

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Streßproteinfamilien ist die LMW HSP-Familie (12 - 47 kD) viel variabler in der Anzahl und Struktur ihrer Vertreter. Die Zahl der Vertreter in dieser Familie variiert zwischen 1 in Säugetieren oder Hefe, 4 in *Drosophila* und etwa 20 in Pflanzen (LINDQUIST, 1988; VIERLING, 1991). Außer einem homolog scheinenden 18 kD Antigen, isoliert aus *M. leprae*, sind keine prokaryotischen Homologe gefunden worden (NERLAND et al, 1988). Nur ein relativ kurzes Teilstück von 35-38 Aminosäureresten am C-terminalen Ende ist allen Vertretern der LMW HSP gemeinsam. Daneben finden sich weitere Teilsequenzen die für alle tierischen bzw. pflanzlichen Vertreter oder nur für Chloroplasten bzw. Mitochondrien typisch sind. Die meisten bisher beschriebenen Vertreter der LMW HSP sind streßinduziert und nicht konstitutiv vorhanden. Die pflanzlichen LMW HSP werden vier Multigenfamilien zugeordnet. Zwei codieren für cytoplasmatische Proteine, eine codiert für chloroplastenlokalisierte Proteine und eine weitere codiert für Endomembranproteine (VIERLING, 1991).

Die Funktion der LMW HSP ist unbekannt. Die cytoplasmatischen LMW HSP bilden bis zu ein Megadalton große Aggregate und werden oft auch als Hitzeschockgranula bezeichnet. Ob diese komplexen Aggregate Speicherformen darstellen oder als Ganzes aktiv sind ist umstritten (VIERLING, 1991). NOVER et al (1986) spekulieren, daß Hitzeschockgranula "normale", nicht HS-mRNA binden, schützen und speichern könnte. Eine solche HS-mRNA-Speicherung wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die präferentielle HS-mRNA Translation. Basierend auf der Homologie einiger LMW HSP zu α -B-Kristallin, einem Strukturprotein der Augenlinse, könnten LMW HSP auch Strukturbestandteile gestreßter Zellen sein (LINDQUIST, 1988). In neueren Arbeiten wurde das α -B-Kristallin selbst als HSP identifiziert. Im α -B-Kristallinen des Menschen und der Maus ist in der

Promotorregion ein funktionelles HSE gefunden worden. Das Genprodukt formt auch hier große Aggregate in gestreßten Zellen (KLEMENZ et al, 1991).

1.2.6. Ubiquitin

Das kleinste, am stärksten konservierte, zu den HSP zählende Protein der Eukaryoten, ist Ubiquitin (HSP 8.5) mit nur 76 Aminosäureresten. Bei Prokaryoten wurde bisher kein Ubiquitin oder funktionsähnliches Protein gefunden. Ubiquitin dient im wesentlichen der Markierung abnormaler Proteine die abgebaut werden sollen. Seine Rolle als HSP bei Pilzen, Pflanzen und Tieren deutet darauf hin, daß Streßbedingungen mit einer Störung des Gleichgewichts zwischen der Synthese und dem Abbau kurzlebiger, bzw. der raschen Beseitigung defekter, Proteine einhergehen (NOVER, 1990).

Ubiquitinvorläuferproteine werden durch eine Multigenfamilie von mindestens drei Genklassen im Zellkern codiert. Diese Vorläuferproteine (Ubiquitin-Ribosomen-protein-Komplexe, Polyubiquitin) werden von speziellen Proteasen (UCH = **U**biquitin **C**-terminal **h**ydrolases) zu funktionsfähigen Ubiquitinmonomeren prozessiert. Die Bindung von Ubiquitin an Proteine ist ATP-abhängig und wird in mehreren Schritten durch unterschiedliche Enzyme katalysiert. Diese Enzyme aktivieren Ubiquitin, übertragen es auf ein weiteres Enzym und führen die Konjugation von Ubiquitin an Zielproteine durch. Sie werden als E1 (UBA = **U**biquitin **a**ctivating enzymes), E2 (UBC=**U**biquitin **c**onjugating enzymes) bzw. E3 (UBR=**U**biquitin auxiliary substrate **r**ecognition proteins) bezeichnet. Die Beteiligung von E3-Enzymen führt zu multiubiquitinierten Zielproteinen, die dann durch einen Proteasenkomples verdaut werden können. Wird Ubiquitin nur durch E2-Enzyme auf Proteine übertragen resultieren daraus entweder einfache oder multiple Mono-Ubiquitinierungen, die nicht zur Degradation, sondern zu einer funktionellen Modifizierung der Zielproteine führen. Zwei E2-Enzyme der Hefe (UBC 4 und UBC 5, beide 16 kD groß) sind, wie Ubiquitin selbst, durch Streß induzierbar (JENTSCH et al, 1990 und 1991).

1.3. Die Hitzeschockantwort von *Neurospora crassa*

Die Hitzeschockantwort von *Neurospora* ist schnell und recht kurzlebig. 60 min nach Überführung in eine 45°C-Umgebung hat die Synthese der meisten "normalen" Proteine ein Minimum erreicht, während die Synthese der meisten HSP hier ihr Maximum erreicht. HSP 90 ist das erste nach HS-Behandlung synthetisierte Protein. Es wird schon nach 30 min maximal synthetisiert. Nach dem Erreichen eines Synthesemaximums der HSP nimmt die Syntheserate der "normalen" Proteine, auch unter andauernder HS-Behandlung, wieder zu

und die der HSP wieder ab. 90 min nach Beendigung einer HS-Behandlung (in einer Erholungsphase) ist der "normale" Proteinhaushalt nahezu wiederhergestellt. Eine HS-Antwort wird bei Temperaturen zwischen 40 und 47°C ausgelöst. Die maximale HSP-Synthese ist bei *Neurospora* bei 45°C erreicht. *Neurospora* ist zur Erlangung einer Thermotoleranz fähig (Plesofsky-Vig und BRAMBL, 1985a; ROYCHOWDHURY und KAPOOR, 1990).

Die Hitzeschockantwort von *Neurospora* ist durch eine deutliche Stimulierung von mindestens 11 Proteinen (15 - 99 kD) *in vivo* charakterisiert (detektiert in Autoradiographien eindimensionaler Gelelektrophoresen von S³⁵-Methionin-markierten Gesamtzellextrakten, KAPOOR und LEWIS, 1987). Im hochmolekularen Bereich sind drei Proteinklassen stark stimuliert HSP 99, 81 und 69 (KAPOOR und LEWIS, 1987; PLESOFKY-VIG und BRAMBL, 1985). HSP 81 und 69 sind auch in mit Coomassie brilliant blue gefärbten Gelen sichtbar. Im Bereich zwischen 90 und 100 kD sind zwei weitere schwächer stimulierte HSP beschrieben (KAPOOR und LEWIS, 1987). Die HSP 69, 81 und 99 sind hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert. HSP 69 und 81 sind auch in Mitochondrien- und in Zellkern-Fractionen gefunden worden (CORNELIUS und RENSING, unveröffentlicht; KAPOOR 1983). ROYCHOWDHURY und KAPOOR, (1990) fanden HSP 81 nur in postmitochondrialen Fractionen. Relativ schwach stimuliert sind HSP 56 (mitochondrial und vakuolär, CORNELIUS und RENSING, unveröffentlicht), HSP 48-50 (KAPOOR und LEWIS, 1987), HSP 38-43 (mitochondrial, CORNELIUS und RENSING, 1986; PLESOFKY-VIG und BRAMBL, 1985), HSP 34-36 (mitochondrial, PLESOFKY-VIG und BRAMBL, 1985), HSP 26-30 (mitochondrial, PLESOFKY-VIG und BRAMBL, 1985) und HSP 15-16 (KAPOOR und LEWIS, 1987).

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese (nach O'FARRELL, 1975) konnte HSP 81 in vier Komponenten aufgelöst werden. Durch Gelfiltration wurde ein MW von 610 kD für natives HSP 81 ermittelt. HSP 81 wurde als Glycoprotein identifiziert und scheint das einzige glycosylierte HSP in *Neurospora* zu sein (ROYCHOWDHURY und KAPOOR, 1990). HSP 69 konnte durch 2D-Gelelektrophorese in sieben Komponenten aufgetrennt werden. Vier dieser Proteine sind konstitutiv. Zwei dieser konstitutiven Mitglieder werden nach einer Streßbehandlung verstärkt synthetisiert. Die drei weiteren Mitglieder werden nur nach einer Streßbehandlung induziert (KAPOOR und LEWIS, 1987).

Im Gegensatz zu einigen anderen Organismen zeigt *Neurospora* in Gegenwart von Schwermetallen *per se* (10-20 µM Cd, Zn, Cu, Mn oder Se) keine Veränderung im Proteinsynthespektrum. Bei Vorhandensein von 20 µM Cadmium während einer zusätzlichen Hitzebehandlung werden einige, normalerweise durch Hitzebehandlung

inhibierte Proteine, fortgesetzt synthetisiert. Diese Proteine weisen keine Ähnlichkeit zu den bekannten Metallothioninen auf (KAPOOR, 1986). Ethanolstreß und Kohlenstoffmangel sind Induktoren einer HS-Antwort. Anders als bei der bekannten HS-Antwort, kommt es hier zu vermehrter Akkumulation von HSP 81 (ROYCHOWDHURY und KAPOOR, 1988). Mitglieder der HSP 70 und 90 Familie werden durch 0.1 -0.5 mM Natriumarsenit, 0.5 -2 mM H₂O₂ und 50 -100µM Natriumselenit induziert. Ein HSP 90 wird auch durch weitere oxidativen Streß erzeugende Agentien induziert (KAPOOR und LEWIS, 1987). Ferner wird durch oxidativen Streß in Kombination mit einem HS eine Peroxidase induziert (KAPOOR et al, 1990).

HSP 38-43 könnte ein durch Entwicklungssignale reguliertes HSP sein. In nichtgestreßten Zellen wird es 18 h nach Inokulation gefunden. Nach einem HS findet man es auch in 12-13 h alten Kulturen (KAPOOR, 1986).

1.4. Allgemeines zur Proteinisolierung

Die Isolierung eines bestimmten Proteins aus einem Rohhomogenat kann nur durch eine Kombination verschiedener Isolierungstechniken bewältigt werden. Jede einzelne Isolierungstechnik bewirkt eine Trennung von Proteinen mit gleichen physikalischen oder chemischen Eigenschaften. Durch die Kombination mehrerer Techniken ist es möglich eine Proteinart zu isolieren. Zur Entwicklung einer Isolierungsmethode ist es also unerlässlich möglichst viele physikochemische und biospezifische Eigenschaften des zu isolierenden Proteins zu kennen. Zur Identifizierung des zu isolierenden Proteins und zur Abschätzung des Reinigungsgrades der einzelnen Isolierungsmethoden ist die Entwicklung eines effizienten Nachweisverfahrens wichtig. Bei der Isolierung von Enzymen mit bekannter Funktion bedient man sich in der Regel eines Enzymtests.

Die bekannten Isolierungstechniken lassen sich grob in zwei Kategorien einteilen: (a) Trennung aufgrund unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens mit hoher Kapazität und (b) den hoch auflösenden, chromatographischen Trenntechniken mit begrenzter Kapazität.

Trennungen aufgrund unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens werden in der Regel am Anfang einer Aufreinigung, wenn der Anteil des interessierenden Proteins noch weniger als 1 % des Gesamtproteins ausmacht, angewandt. Sie haben eine hohe Kapazität aber eine geringe Auflösung und werden zur Entfernung unerwünschter Komponenten eingesetzt. Wichtigste Methoden sind die Hitzefällung, isoelektrische Fällung, Salzfällung, Polyethylenglycolfällung sowie Nukleinsäurefällung mit Protaminsulfat. Mit den erwähnten

Methoden sind in günstigen Fällen bis zu zehnfache Anreicherungen des gewünschten Proteins in einem Schritt möglich.

Die hoch auflösenden Techniken haben eine begrenzte Kapazität. Im Bereich der präparativen Proteinisolierung sind hierher gehörende Methoden vorwiegend chromatographische. In der Regel werden mehrere, aufgrund verschiedener Moleküleigenschaften trennende, Methoden sukzessiv angewandt, um ein ausreichend reines Protein zu bekommen. Die folgende Tabelle (Tab. 1.2.) gibt einen Überblick über die am häufigsten angewandten Methoden, sowie deren Trenneigenschaften, die Anforderungen an die zu trennende Probe und der Änderung der Proben- bzw. Fraktionszusammensetzung nach erfolgter Trennung. In dieser Arbeit angewandte Trennmethode werden im Methodenteil näher erläutert.

Im Allgemeinen werden die groben wenig spezifischen Techniken wie Nucleinsäure- und Proteinfällungen als erste Schritte bei Proteinaufreinigung durchgeführt. Sie werden gefolgt von den hoch auflösenden Trennmethode. Aufgrund der relativ hohen Kapazität wird hier die Ionenaustauschchromatographie früh eingesetzt, während eine Affinitätschromatographie mit nur geringer Kapazität und hoher Spezifität erst spät zum Einsatz kommt. Eine Gelfiltration kommt ebenfalls als einer der letzten Reinigungsschritte zum Einsatz. Abb. 1.4. ist das Ergebnis einer Literaturstudie vieler Proteinreinigungen. Sie zeigt die Häufigkeit einer Technik in Bezug auf ihre Anwendungsposition im Reinigungsprotokoll der verschiedenen Arbeiten.

Methode	Trennungsparameter	Zusammensetzung der Proben	Änderung der Zusammensetzung der Probe (Fraktion)
Salzfällung	Löslichkeitsverhalten	>1 mg/ml	geringes Volumen, hohe Konzentration, hohe Ionenstärke (I)
Gelfiltration	Molekulargewicht und Form	geringes Volumen	Verdünnung und Pufferwechsel
Ionenaustauscher	Nettoladung	niedrige I und korrekter pH	hohe I
Affinitätschromatographie	Biospezifische Interaktionen	niedrige I, spezifische Bindungsvoraussetzungen	Aufkonzentration und Pufferwechsel
HIC (hydrophobic interaction chromatography)	relative Hydrophobizität	hohe I	niedrige I oder pH Änderung
RPC (reversed phase chromatography)	relative Hydrophobizität	geringes Volumen	organische Lösemittel
Chromatographische Fokussierung	Nettoladung, isoelektrischer Punkt	niedrige I	Ampholine, pH nahe am pl

Tab. 1.2: Tabellarische Darstellung der am häufigsten angewandten Trennmethode sowie deren Trenneigenschaften, der Anforderungen an die zu trennende Probe und der Änderung der Proben- bzw. Fraktionszusammensetzung nach erfolgter Trennung.

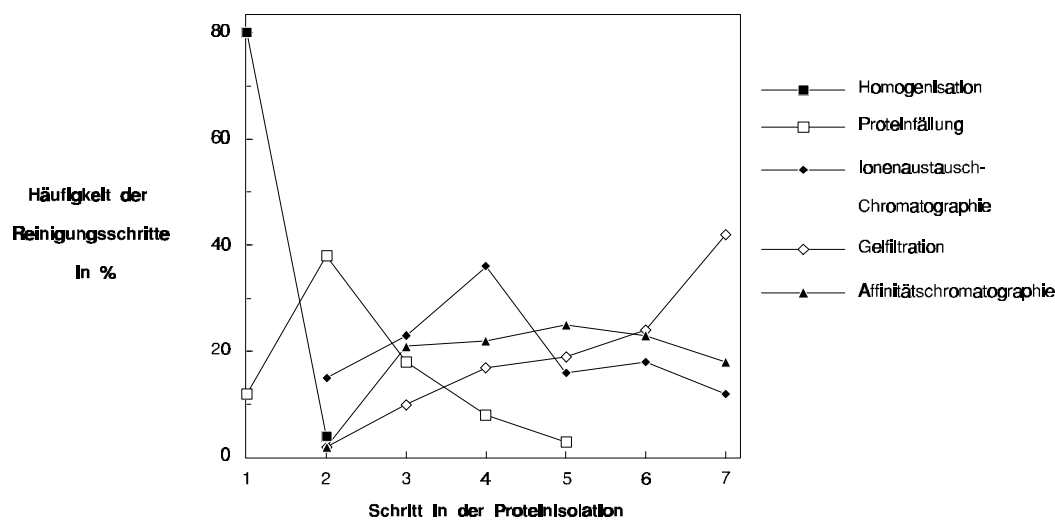


Abb. 1.4.: Darstellung einer Analyse sukzessiver Methoden bei der Proteinisolation. Die verschiedenen Techniken sind als Funktionen ihrer Position in den Reinigungsprotokollen wiedergegeben (Quelle: JANSON und RYDEN, 1989)

1.5. Allgemeines zur Immunantwort

Die Immunantwort ist die Reaktion der Organismen auf Fremdstoffe im Körper. Die Immunantwort der Säugetiere läßt sich in die Zell-vermittelte und die humorale Immunantwort unterteilen. Die Zell-vermittelte Immunantwort ist die unspezifische Reaktion auf Fremdstoffe (z.B. Phagozytose durch Macrophagen, Lyse durch T-Killerzellen). Wichtigster Teil der humoralen Immunantwort sind die Antikörper (Ak) produzierenden B-Lymphozyten und deren Stimulation durch T-Helferzellen. Die humorale Immunantwort ist spezifisch gegen die als fremd erkannten Moleküle (Erkennung durch Ak) gerichtet und wird durch einen späteren erneuten Kontakt stark stimuliert.

Die Antikörperbildung beruht - nach der klonalen Selektionstheorie von BURNET (1959) - auf der zufälligen, Antigen (Ag)-unabhängigen, Vorfertigung von Ak und der anschließenden selektiven Vermehrung der "passenden" Ak. Ag werden durch solche zufällig "passenden" Ak auf der Oberfläche von B-Lymphozyten erkannt, gebunden und in die B-Zelle aufgenommen. In lytischen Kompartimenten der Zelle erfolgt eine Degradation des Ag. Teile des degradierten Ag werden nun, gebunden an MHC (**m**ajor **h**istocompatibility **c**omplex)-classII Proteine¹, auf der B-Zelloberfläche präsentiert. An diesen MHC-classII-Protein-Ag-Teil-Komplex binden nun T-Helfer-zellen mit dem T-Zellrezeptor. Dieser B-Zell- zu T-Helferzellkontakt löst eine Reaktionskaskade aus an der die **I**nter**l**eukine IL 4 und IL 5 beteiligt sind. Es resultiert eine B-Zell-Proliferation und deren Differenzierung zu Plasma- (Ak sekretierende Zellen) und Gedächtniszellen (spielen eine wichtige Rolle bei einem sekundären Ag-Kontakt).

Antikörper werden in 5 Klassen eingeteilt. Sie bestehen aus einer oder mehreren Einheiten mit Y-förmiger Struktur. Jede Y-Einheit besteht aus vier Polypeptidketten - jeweils zwei identische leichte (25 kD, 220 Aminosäurereste) und schwere Ketten (50 kD, 440 Aminosäurereste). Diese Polypeptide sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jede Y-Einheit hat zwei identische Ag-Bindungsstellen an den "Armenden" des Y. Diese können sich aufgrund einer Gelenkregion im Mittelteil flexibel die Abständen zweier Ag anpassen. Die Fc-Domäne bildet den "Fußteil" der Y-Einheit, mit ihm sind die Ak gegebenenfalls in Membranen verankert.

¹ Ob diese Bindung direkt zwischen dem degradierten Ag und MHC classII zustande kommt, oder von einem anderen Protein vermittelt wird, ist strittig. VANBUSKIRK et al (1989) liefern Hinweise, da ein solches vermittelndes Protein ein Mitglied der HSP 70 Familie ist. Auch NOVER (1991) berichtet von einem solchen HSP 70.

Die Bildung des Ag-Ak-Komplexes beruht auf ionischen, hydrophilen bzw. hydrophoben und van-der-Waals Wechselwirkungen. All diese Interaktionen oder Bindungen sind reversibel und nicht kovalent.

Monoklonale Ak (KÖHLER und MILSTEIN, 1975) sind eine Ak-Art gegen nur ein Epitop eines Ag, da nur eine B-Zelle (und eine B-Zelle generiert nur eine Ak-Art) mit einer Myelomzelle zum Hydridom fusioniert wurde. Polyklonale Ak sind immer eine Reihe verschiedener Ak-Arten (da von vielen B-Zellen generiert) gegen ein oder mehrere Epitope eines Ag.

Proteine sind in der Regel gute Ag. Um *per se* immunogen zu sein, müssen sie möglichst groß (>15 kD) und dem Ak produzierenden Tier möglichst fremd sein. Um bei den zu immunisierenden Tieren die Immunantwort anzuregen, werden die Ag gelöst in Adjuvantien injiziert. Adjuvantien setzen sich aus zwei Komponenten zusammen. Die erste Komponente besteht beim bekanntesten Adjuvans (Freund's komplettes Adjuvans) aus speziellen Mineralölen. Sie bilden mit der wässrigen Ag-Lösung eine Emulsion, eine Art "Depot", aus der das Ag nur langsam entweichen kann und so vor einem schnellen Katabolismus durch das Tier geschützt ist. Die zweite Komponente besteht aus LPS (Lipopolysaccharide) verschiedener Bakterien oder aus ganzen abgetöteten Bakterien. Diese bewirken durch eine Erhöhung des Lymphokingehaltes (z.B. IL 4 und IL 5) eine vermehrte Proliferation und Differenzierung der B-Zellen. Es resultiert also eine unspezifische Stimulierung der Immunantwort.

1.6. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist: mit den begrenzten Mitteln der Universität, und den im Labor vorhandenen Trenntechniken, Methoden zur Isolierung von HSP aus *Neurospora crassa* zu entwickeln. Die größte Aufmerksamkeit galt hierbei dem cytoplasmatischem HSP 70. Für ein weiteres cytoplasmatisches HSP, das HSP 81, wurde ebenfalls versucht, geeignete Isolierungsmethoden zu finden. Primärer Zweck und Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung von HSP 70 und der Einsatz des selben als Antigen in der Kaninchenimmunisierung zur Herstellung polyklonaler Antikörper gegen HSP 70. Struktur- und Funktionsuntersuchungen des isolierten HSP 70 sind interessante Ansatzpunkte einer weiteren Anwendung.

Der Einsatz polyklonaler Antikörper gegen HSP 70 von *Neurospora* könnte qualitative (Affinität im Vergleich zu HSP 70 anderer Organismen) und exakte quantitative Aussagen über das Antigen unter verschiedenen Versuchsbedingungen ermöglichen. Versuche mit

z.B. Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörpern könnten Lokalisation und eventuelle Translokationen des HSP 70 in den Zellen aufklären.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Der Versuchsorganismus *Neurospora crassa*

Neurospora crassa (roter Brot- oder Bäckerschimmel) ist ein eukaryotischer, haploider Organismus. Er gehört zur Klasse der Ascomyceten. Der recht anspruchslose aerobe Stoffwechsel des heterotrophen Pilzes benötigt neben einer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nur noch wenige Salze, Spurenelemente und als einziges Vitamin: Biotin.

Das vegetative System besteht aus den verzweigten, vielkernigen Hyphen, die in ihrer Gesamtheit als Myzel bezeichnet werden. Die Hyphen werden durch Septen mit Zentralporus in Segmente unterteilt. Dies gestattet die Zirkulation des Zellinhaltes durch das gesamte Myzel.

Neurospora kann sich vegetativ und sexuell vermehren. Die vegetative Vermehrung kann durch Myzelfragmentierung oder Sporenbildung erfolgen. Man unterscheidet zwei Sorten asexueller Sporen. Die Makrokonidien entstehen aus Lufthyphen, an deren Spitzen sich die Septen schließen und mit Zellwänden umgeben. Die kleineren Mikrokonidien werden in geringeren Mengen erst zu später Wachstumsphase gebildet. Über den sexuellen Vermehrungszyklus entstehen die Ascosporen. Ascosporen enthalten neukombinierte Erbsubstanz. Hyphen kommen in zwei Paarungstypen, *A* und *a*, vor. Die Paarungstypen werden durch zwei Allele eines Gens bestimmt.

Für alle Versuche dieser Arbeit ist die *bd A* (*band A*, FGSC No. 1858) Mutante von *Neurospora crassa* als Versuchsorganismus genutzt worden. Sie zeigt auch unter konstanten Versuchsbedingungen (Dauerdunkel) eine circadiane Rhythmik der Sporulation (*banding*).

2.2. Kultivierung von *Neurospora crassa*

2.2.1. Konidiengewinnung

HOROWITZ-Konidiationsmedium wurde nach Vorschrift hergestellt (HOROWITZ, 1947, siehe Anhang 6.1.), in Fernbachkolben eingefüllt (100 ml) und autoklaviert. Nach Erkalten und Erstarren des Mediums wurden die Kolben mit 10⁹-Konidien angeimpft und für 3-5 Tage in den Brutschrank (28°C, Dauerlicht) überführt. Nachdem die gesamte Oberfläche des Nährmediums mit den orange-roten Konidien überwachsen war, wurden die Konidien mit sterilem Leitungswasser suspendiert, durch sterile Glaswolle gefiltert und gesammelt. Die

Bestimmung der Konidienzahl erfolgte durch Messung der Absorption bei 480 nm gegen Leitungswasser als Referenz. Die Konidien suspension wurde so verdünnt, daß der Extinktionswert zwischen 0.1 und 0.7 lag. Berechnungsgrundlage bildete folgende Formel:

$$2.55 \times 10^9 \times OD_{480\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konidien/ml}$$

Die Konidien suspension wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäße portioniert und bei -20°C gelagert.

2.2.2. Flüssigkultur

Für die Flüssigkultur wurde LL-Medium verwendet. Es besteht aus 2 % Saccharose und 2 % Vogelsalz 50 x (VOGEL, 1956) mit erhöhter Calciumkonzentration (1 mM) in entmineralisiertem Wasser (siehe Anhang 6.1.).

Zur Fernbachkolben-Schüttelkultur wurden je 1 l LL-Medium in Fernbachkolben autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 3×10^9 Konidien angeimpft. Die Kolben wurden dann für 21 - 24 h in den Brutschrank (28°C, Dauerlicht, Schüttler) überführt.

Zur Herstellung einer Flüssigkultur in Plastikpetrischalen (90 mm) wurden 20 ml autoklaviertes LL-Medium in Petrischalen gegeben, und mit 1.5×10^8 Konidien beimpft. Anschließend wurde die Kultur für 24 - 36 h in den Brutschrank (28°C, Dauerlicht) überführt.

2.3. Hitzeschockinduktion und Proteinmarkierung mit S³⁵-Methionin

Zur Induktion der Hitzeschockantwort wurden die Kulturen aus 2.2.2. in ein auf 45°C vorgeheiztes Wasserbad überführt. Die Kontrollkulturen wurden für die Zeit der Hitzeschockinduktion bei den Wachstumsbedingungen aus 2.2.2. belassen. Nach etwa 15 min (Petrischalen) bzw. 30 min (Fernbachkolben) sind 45°C auch im Kulturgefäß erreicht. Nach einer weiteren Stunde bei 45°C läßt sich die Synthese der Hitzeschockproteine bei *Neurospora* nicht weiter steigern (PLESOFSKY-VIG und BRAMBL, 1985). Die Kulturen wurden dann zur weiteren Behandlung aus dem Wasserbad genommen.

Beim Reinigungsversuch mit radioaktiv markierten Proteinen wurde *Neurospora* zur Hitzeschockinduktion aus den großen Petrischalen (90 mm) in kleine Petrischalen (45 mm, 3 ml Medium, auf 45°C vorgewärmt) umgesetzt. Nach kurzer Äquilibrationszeit wurden 3.1 MBq (85 µCi) S³⁵-Methionin pro Petrischale zugegeben und eine Stunde lang bei 45°C markiert. Die Kontrollkulturen wurden unter den Wachstumsbedingungen aus 2.2.2. ebenfalls eine Stunde markiert.

Der Einbau von S³⁵-Methionin wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. 2-5 µl der zu untersuchenden Proben wurden auf Wathman Filterpapier aufgetragen, getrocknet, 3 mal 5 min mit 10 % TCA (Trichloressigsäure w/v) gewaschen, erneut getrocknet und anschließend in 5 ml Szintillationsbechern mit 3 ml Szintillationslösung (Quickszint 402, Fa. Zinsser Analytic) überführt. Zur Lösung der gefällten Proteine wurde kurz geschüttelt, die Lösung noch 3 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann die Radioaktivität im Szintillationszähler (Beckman LS 8000) gemessen.

2.4. Zellaufschluß und Gewinnung der cytoplasmatischen Fraktion

Die Flüssigkulturen aus 2.2.2. wurden über eine Porzellannutsche mit eingelegtem Papierrundfilter (Schleicher & Schüll, Weißband Nr. 585) gefiltert, mit bidestilliertem Wasser gewaschen und das gewonnene Myzel in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das Myzel der Fernbachkolbenkulturen wurde nun in einen vorgekühlten, flüssigen Stickstoff enthaltenden Mörser überführt und bis zur vollständigen Pulverisierung, unter mehrmaliger Zugabe flüssigen Stickstoffs, gemörsert. Anschließend wurde das pulverisierte Myzel in SS 34-Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 30 ml Puffer A (plus 1 mM PMFS) versetzt. Nach dem Auftauen des pulverisierten Myzels wurden die SS 34 - Zentrifugenröhrchen noch 5 min auf dem Vortexer vermischt, nun 2 h bei 48000 x g⁻¹ zentrifugiert (Sorvall RC 28 S, SS 34) und der Überstand anschließend durch einen Membranfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 595) filtriert.

Das Myzel der Petrischalenkulturen wurde im 2 ml Handhomogenisator unter Zugabe von Puffer A (plus 1 mM PMSF) aufgeschlossen, 1 h bei 100000 x g⁻¹ zentrifugiert (Kontron TGA-75, SW-60) und der Überstand anschließend durch einen Membranfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 595) filtriert.

Die so gewonnenen Überstände werden im folgenden als cytoplasmatische Rohfraktion K (=Kontrolle) bzw. HS (=Hitzeschock) oder kurz als S-100-Roh-K bzw. HS bezeichnet.

Lösungen:

Puffer A: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

2.5. Konzentrierung und Aufbereitung der Proteinextrakte

2.5.1. Proteinfällung mit Ammoniumsulfat (AS)

Zur Aufkonzentrierung der Proteinlösungen aus den Fernbachkolbenkulturen wurde optional eine Fällung mit Ammoniumsulfat (AS, Serva) durchgeführt. Die Fällung von Proteinen mit AS ist ein Dehydratationsprozeß. Beim Lösen des AS wird eine große Anzahl von Wassermolekülen pro AS-Molekül gebunden. Je mehr AS der Lösung zugesetzt wird, desto weniger Wasser steht für die Wechselwirkung mit den Proteinen zur Verfügung. An einem bestimmten Punkt ist nicht mehr genug Wasser vorhanden, um die Proteine in Lösung zu halten. Sie fallen daher aus.

Das Volumen der Proteinlösung wurde gemessen und mit festem AS im Verhältnis 383 g/l versetzt, um eine AS-Sättigung von 50 % in der Lösung zu erreichen. Das eingewogene AS wurde sehr langsam zugegeben, um ein gleichmäßiges Lösen zu gewährleisten und ein Denaturieren der Proteine zu verhindern. Nach vollständigem Lösen des AS wurde die Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Proteinniederschlag 20 min bei 10000 x g⁻¹ pelletiert (Sorvall RC 28 S, SS 34), der Überstand abdekantiert und das Pellet in Puffer A resuspendiert.

2.5.2. Proteinfällung mit Polyethylenglycol (PEG)

Als Alternative zur Proteinpräzipitation mit AS wurde eine Fällung mit Polyethylenglycol (PEG, MW 5600-7000, Janssen Chemica, Art. Nr. 19.228.22) nach INGHAM (1984) durchgeführt. PEG ist, im Gegensatz zum negativ geladenem AS, ein nichtionisches Polymer. Eine auf die PEG-Fällung folgende DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie wird durch Rest-PEG im Niederschlag nicht gestört.

PEG wurde als 50 % Vorratslösung (w/v) in bidestiliertem Wasser angesetzt. Zu fällende Proteinlösungen wurden mit dieser Vorratslösung im Verhältnis 1:1 vermischt, um eine PEG-Konzentration von 25 % in der Proteinlösung zu erreichen. Nach Zugabe des PEG

wurden die Ansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Ansätze wurden dann 30 min bei 16000 x g⁻¹ zentrifugiert (Sorvall RC 28S, SS 34) und in Puffer A resuspendiert.

2.5.3. Dialyse

Zur Senkung der Ionenkonzentrationen bzw. zur Entfernung niedermolekularer Substanzen aus Probenlösungen verschiedener Reinigungsschritte, wurde die Dialyse angewandt. Die semipermeable Membran des Dialyseschlauches kann von Substanzen geringen Molekulargewichtes durchquert werden. Große Moleküle wie Proteine werden zurückgehalten. Durch das Herausdiffundieren der kleinen Moleküle aus dem Dialyseschlauch wird die Ionenstärke der Proteinlösung verringert. Dieser Vorgang setzt sich solange fort, bis die Ionenkonzentration innerhalb und außerhalb der Membran ausgeglichen ist.

Zur Durchführung der Dialyse wurde die Proteinlösung in einen vorbehandelten Dialyseschlauch gefüllt, der an beiden Enden mit einem Knoten verschlossen wurde. Der geschlossene Schlauch wurde für 8 - 12 h in ein großes Volumen einer kalten Pufferlösung mit niedriger Ionenstärke (oder bidestilliertes Wasser) gehängt und langsam gerührt. Die Pufferlösung wurde während dieser Zeit in der Regel zweimal erneuert.

Dialyseschlauch: (Visking, Typ: 20/32) Wandstärke 0.02 mm, Durchmesser 16 mm, Ausschlußgrenze 12 - 14 kD, Porengröße 1.5-3 nm.

Vorbehandlung der Dialyseschläuche: Die zur Verwendung vorgesehenen Dialyseschläuche wurden 10 min in 0.1 M EDTA - Lösung gekocht. Die Lösung wurde abdekantiert, die Schläuche einmal mit bidestilliertem Wasser gespült, und anschließend 3 x 10 min mit bidestilliertem Wasser gekocht.

2.5.4. Lyophilisation

Proteinlösungen können sehr schonend durch Gefriertrocknung aufkonzentriert werden. Das wässrige Lösungsmittel der gefrorenen Proteinlösung wird im Ölpumpenvakuum über die Kühlfalle abgezogen. Das Vakuum sollte so stark sein, daß die Proben durch die Verdunstungskälte gefroren bleiben. Der Nachteil dieser Methode ist, daß mit den Proteinen auch in der Lösung enthaltene Salze konzentriert werden.

2.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) ist wenig zeitaufwendig und wird, im Gegensatz zur recht störanfälligen Proteinbestimmung nach LOWRY (1951), durch

Pufferchemikalien und reduzierende Substanzen wenig gestört. Bei der Aufreinigung von Proteinen eignet sich die Bradford-Methode gut zur Ermittlung von Proteinkonzentrationen in den Eluaten der verschiedenen Säulen, die so ohne Zeitverlust weiterverarbeitet werden können. Durch Detergentien wie z.B. SDS wird die Bradford-Methode bei Konzentrationen oberhalb 0.1 % gestört. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration einer in Elektrophoreseprobenpuffer gelösten Probe ist daher die Proteinbestimmung nach NEUHOFF (1979) anzuwenden.

2.6.1. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurden 10 µl Probelösung mit 1.5 ml Farbstofflösung in Halbmikroküvetten vermischt und 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen den Blankwert gemessen. Der Extinktionswert des Blankwertes (Farbstofflösung plus proteinfreien Puffer) liegt mit ca. 0.6 Extinktionseinheiten relativ hoch, was aber keinen Einfluß auf die Bestimmung hat. Der Proteingehalt wurde anhand einer Protein-Eichkuve ermittelt. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 0.1 bis 5 mg aufgenommen. Zur besseren Absicherung der Meßwerte wurden zwei- bis dreifache Bestimmungen durchgeführt. Bei der Bradford-Methode werden nur Proteine mit einer relativen Molekülmasse von mehr als 3000 erfaßt (SEDMAK und GROSSBERG, 1977).

Lösungen und Material:

Farbstofflösung: -0.1 g Coomassie brilliant blue G250 in 50 ml 95 % Ethanol (vergällt) (v/v) lösen,
-100 ml 85 % Phosphorsäure zugeben
-auf 1 l mit bidestiliertem H₂O auffüllen und durch einen Faltenfilter filtern.

Coomassie brilliant blue G 250 (Serva, Art.Nr. CI42655)

2.6.2. Proteinbestimmung nach NEUHOFF (1979)

Zur Proteinbestimmung wurden 5 µl der Probelösung auf 1 x 1 cm große Felder der Celluloseacetatfolie pipettiert. Nach vollständiger Trocknung der aufgetragenen Proben, wurde die Folie 5 min auf dem Schüttler gefärbt. Anschließend wurde sukzessiv in gebrauchtem und neuem Entfärber je 5 min entfärbt bis der Folienhintergrund keine Färbung mehr aufwies. Nach erneuter Trocknung der Folie wurden die markierten Felder ausgeschnitten und in je ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Danach wurden die Folienstücke mit je 1 ml **Dimethylsulfoxid** (DMSO) versetzt und bis zur vollständigen Auflösung der Folienstücke unter gelegentlichem vortexen stehen gelassen. Darauf wurde in Glasküvetten die Extinktion gegen DMSO plus entfärbtem Folienstück (Blankwert) bei 630

nm im Photometer gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer Protein-Eichkurve ermittelt. Die Eichkurve wurde mit BSA im Bereich 0.1 bis 5 mg aufgenommen. Zur besseren Absicherung der Meßwerte wurden zwei bis dreifache Bestimmungen durchgeführt.

Lösungen und Material:

Färber: 0.5 % Amidoschwarz 10 B in Methanol(vergällt)/Eisessig (99.8 %) (9/1)

Entfärber: Methanol (vergällt)/Eisessig (99.8 %) (9/1)

Amidoschwarz 10 B (Serva, Art.Nr. CI 20470)

Dimethylsulfoxid (Merck, Art.Nr. 16743)

Celluloseacetatfolie: Satorius 50 K (Art.Nr. SM 2911200)

2.7. Chromatographische Reinigung der HSP

2.7.1. DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie

Ionenaustausch ist der reversible Austausch von Ionen in Lösung mit elektrostatisch an einen unlöslichen Träger gebundenen Ionen. Der von mir benutzte DEAE-Anionenaustauscher (Fractogel[®] TSK DEAE 650 (M), Merck Art.Nr. 14989) ist ein inertes Trägermaterial (Vinyl-Polymere) an das kovalent positiv geladene **Di-ethyl-amino-ethyl** Gruppen gebunden sind (siehe Abb. 2.1.). Für die Isolierung und Trennung geladener Verbindungen müssen Bedingungen gefunden werden bei denen einige Verbindungen an die Austauschermatrix binden und andere nicht.



Abb. 2.1.: Struktur des verwendeten schwach basischen DEAE-Anionenaustauschers (Fractogel[®] TSK DEAE 650 (M), Merck Art.Nr. 14989). Die Diethylaminoethylgruppen sind über Etherbindungen mit Hydroxylgruppen der Polyvinylmatrix verknüpft (Quelle: Merck Produktinformation).

Proteine tragen positive und negative Ladungen. Die Nettoladung der Proteine ist stark vom vorliegenden pH-Wert abhängig. Durch eine Erhöhung des pH-Wertes kann man innerhalb gewisser Grenzen eine negativere Nettoladung der Proteine erreichen (siehe Abb. 2.2.) und so eine festere Bindung an einen Anionenaustauscher bewirken. Bei Proteintrennungen mit Anionenaustauschern sollte der pH-Wert der Eluenten eine oder zwei pH-Einheiten höher als der isoelektrische Punkt (pI-Wert) des zu isolierenden Proteins liegen. Bei einem pI von

4.7 - 6.3 der meisten HSP (NOVER, 1984) liegt man mit dem gewählten pH-Wert von 7.5 gut im erwähnten Bereich.

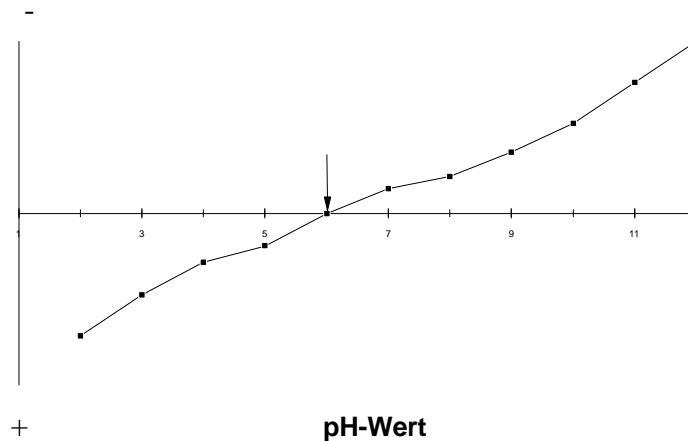


Abb. 2.2.: Einfluß des pH-Werts auf die Nettoladung eines Proteins. Der Pfeil bezeichnet den isoelektrischen Punkt des dargestellten Proteins (Quelle: COOPER, 1980).

Zur DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie wurde eine Glassäule (2.6 x 40 cm, Pharmacia) 11 cm hoch gepackt. Das Gelbettvolumen betrug 58.4 ml. Äquilibrationpuffer ist Puffer A. Zur Elution gebundener Proteine wurden lineare NaCl- Gradienten (0.02 - 0.5 M NaCl) und NaCl- Stufengradienten (0.02/0.9/0.14/0.3 M NaCl) in Puffer A verwendet. Die Elution wurde über die Extinktion bei 280 nm (Detektor Zweikanalmonitor UV-2, Pharmacia) verfolgt und auf dem Schreiber (Servogor, Metrawatt/Nürnberg) festgehalten. Das Elutions-volumen des linearen Gradienten entsprach mit 2 x 200 ml dem achtfachen Gelbettvolumen. Das Fraktionsvolumen betrug 5 ml, es wurden 85 Fraktionen gesammelt (Fraktionssammler Frac-300, Pharmacia). Mit den verschiedenen NaCl-Konzentrationen des Stufengradienten wurde eluiert bis der resultierende Peak wieder Basislinienniveau erreichte. Die Eluate während der Peaks wurden gesammelt. Sie werden im folgenden als DEAE-0.9, DEAE-0.14 und DEAE-0.3 bezeichnet. Die Fließgeschwindigkeit betrug beim Probenauftrag 1 ml pro min. Zur Elution wurde sie verdoppelt. Die unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten machen Sinn, da eine Proteinadsorption langsamer geschieht als eine Desorption. Nach jeder abgeschlossenen Elution muß mit dem zweifachen Gelbettvolumen 2 M NaCl (Puffer A2) gewaschen werden, um alle noch an der Säule verbliebenen Ionen durch Cl⁻ zu ersetzen. Zur Lagerung der Säule wurde diese mit dem einfachen Gelbettvolumen 0.02 % NaN₃ in Puffer A (Puffer A3) zur Konservierung gespült, um bakterielle Aktivität zu verhindern. Die gesammelten Fraktionen wurden dialysiert, lyophilisiert und gelelektrophoretisch untersucht.

Als Alternative zum Fractogel[®] TSK DEAE 650 (M) wurde auch mit einem neuen DEAE-Anionenaustauscher der Firma Merck (Fractogel[®] EMD DEAE 650 (M), Art.Nr. 16883) chromatographiert. Bei Ionenaustauschern der EMD-Klasse sind die Austauschergruppen nicht starr auf der Matrixoberfläche fixiert, sondern an flexiblen Polymerketten gebunden, und daher frei im Raum beweglich. Dadurch sollen bessere Proteinbindungseigenschaften des Materials erreicht worden sein.

Lösungen:

Äquilibriumspuffer (Puffer A): 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

Elutionspuffer (Puffer A1): Puffer A + zur Elution benötigte Menge an NaCl

Waschpuffer (Puffer A2): Puffer A + 2 M NaCl

Konservierungspuffer (Puffer A3): Puffer A + 0.02 % NaN₃

2.7.2. Hydroxylapatit-Chromatographie

Hydroxylapatit ist ein Calciumphosphat [(Ca₅(PO₄)₃OH)₂]. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Ca²⁺- und PO₄⁻ Gruppen des Hydroxylapatits und Proteinen stellen die wichtigste Art der Proteinadsorption an die Matrix dar. Die relativen Bindungsaffinitäten verschiedener Proteine sind Funktionen ihrer Oberflächenladungsdichte und des Ladung-zu-Masse Verhältnisses.

Zur Chromatographie wurden die Proteine in Äquilibriumspuffer (Puffer B) an die äquilibrierte Matrix adsorbiert und mit steigender Kaliumphosphat-Konzentration eluiert (linearer Gradient von 0.1 auf 0.3 M steigend, pH 7.5, Puffer B1). Die maximale Beladungskapazität liegt zwischen 1 und 5 mg Protein pro ml Gelbettvolumens. Mit 0.5 M Kaliumphosphatpuffer (Puffer B2) wurde die Matrix nach der Elution von allem adsorbierten Material befreit und war nach Äquilibriumspuffer zu erneuter Beladung vorbereitet.

Hydroxylapatit (Bio-Gel HT Hydroxylapatite (BioRad Art.Nr. 130-0150) wurde in einer Glassäule (Pharmacia, 1.5 x 40 cm) 14 cm hoch gepackt. Das entspricht einem Gelbettvolumen von rund 25 ml. Die Flußrate betrug bei allen Auftrags-, Wasch- und Elutionsschritten 50 ml/h (zwei Säulenvolumen pro Stunde). Das Elutionsvolumen des linearen Gradienten entsprach mit 2 x 100 ml dem achtfachen Gelbettvolumen. Das Fraktionsvolumen betrug 2.5 ml, es wurden 85 Fraktionen gesammelt (chromatographische Anlage wie in 2.7.1.). Die gesammelten Fraktionen wurden dialysiert, lyophilisiert und gelelektrophoretisch analysiert.

Lösungen:

Äquilibriumspuffer (Puffer B): 10 mM KH₂PO₄ / K₂HPO₄, pH 7.5

Elutionspuffer (Puffer B1): Puffer B mit höherer PO₄ Konzentration

Waschpuffer (Puffer B2): Puffer B mit 0.4 M PO_4 -Konzentration

2.7.3. Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Methode zur Trennung von Makromolekülen aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte bzw. unterschiedlicher Stokescher Radien. Für die Gelfiltration verwendete Materialien bestehen aus kleinen porösen Kügelchen. Die Porengröße bestimmt den optimalen Trennbereich bzw. die Ausschlußgrenze des Materials. Ein Molekül, dessen Stokescher Radius gleich groß oder größer als der Porendurchmesser ist, wird nicht in die Gelkügelchen diffundieren; man sagt, es wird ausgeschlossen. Die Ausschlußgrenze eines Gels ist das Molekulargewicht des kleinsten Moleküls, das gerade nicht mehr in die Gelmatrix einzudringen vermag. Anstelle der genaueren Stokeschen Radien werden oft die leichter erhältlichen Molekulargewichte benutzt. Sie sind jedoch nur ein ungenaues Maß für die Stokeschen Radien. Gelfiltrationsmaterialien haben immer eine niedrigere Ausschlußgrenze für lineare Moleküle als für globuläre Moleküle.

Wird eine Mischung verschieden großer Moleküle auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, so können die größeren Moleküle nur schwer in die Poren hineindiffundieren und werden ohne oder mit nur geringem Widerstand eluiert. Die kleinen Moleküle diffundieren dagegen in die Poren hinein und werden länger in der Säule zurückgehalten. Ihre Retardierung hängt davon ab, wie lange sie sich innerhalb der Gelporen aufhalten. Die Verweildauer in den Gelporen ist eine Funktion der Molekülgröße und des Porendurchmessers.

Zur Gelfiltration wurden zwei Materialien mit verschiedenen Ausschlußgrenzen verwendet. Fractogel[®] TSK HW-55 (S) (Art.Nr. 14980) der Firma Merck schließt Moleküle über 1000 kD aus. Die Ausschlußgrenze des Bio-Gel P-100 (Art.Nr. 150-4170) der Firma Bio-Rad liegt bei 100 kD. Die Polyvinylmatrix des Fractogel TSK HW-55 ist im Gegensatz zur Polyacrylamidmatrix der Bio-Gel P-100 sehr druckstabil. Beide Materialien wurden in Plexiglassäulen (1 x 60 cm, Pharmacia) 55 cm hoch gepackt. Das entspricht einem Gelbettvolumen von 43 ml (=Gesamtvolumen (V_t)). Das mit Blue Dextran (MW 2000 kD) bestimmte Ausschlußvolumen (V_0) der Fractogel TSK HW-55-Säule betrug 17 ml, für die Bio-Gel P 100- Säule errechnete sich ein V_0 von 11 ml. Das Probenauftragsvolumen betrug 1-2 ml. Die Probe wurde direkt auf das Gelbett aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit bei beiden Säulen betrug 4 ml/h. Auftrags-, Wasch- und Elutionspuffer waren identisch (Puffer C: 50 mM Tris-HCL pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 20 mM β -Mercaptoethanol). Es wurden 28 Fraktionen a 2 ml gesammelt (chromatographische Anlage wie in 2.7.1.).

Aufgrund der Retentionszeit verschiedener Markerproteine kann man die Molekulargewichte der eluierten Proteine aus dem Probengemisch bestimmen. Die relativen Mobilitäten der Proteine sind proportional zum Logarithmus ihrer Molekülmassen bzw. ihrer Stokeschen Radien. Markerproteine waren Blue Dextran (2000 kD), β -Amylase (200 kD), Alkoholdehydrogenase (150 kD), BSA (67 kD), Carbonic anhydrase (30 kD) und Cytochrom C (12.4 kD). Die einzelnen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Lösungen:

Puffer C: 50 mM Tris-HCL pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM β -Mercaptoethanol

2.7.4. Affinitätschromatographie mit ATP-Agarose

Bei vielen Proteinaufreinigungen ist der letzte Schritt eine Affinitätschromatographie. Im Gegensatz zu den konventionellen Reinigungsmethoden, welche von relativ geringen physikochemischen Unterschieden der Proteineigenschaften abhängen, wird bei der Affinitätschromatographie die wesentlichste und spezifischste Eigenschaft des zu isolierenden Proteins, nämlich seine biologische Funktion, ausgenutzt. Es resultiert ein sehr hoher Reinigungseffekt. Die Aufgabe der meisten Makromoleküle im Organismus läßt sich in zwei Teilbereiche aufgliedern: (1) die Erkennung anderer Moleküle und (2) eine auf diese Erkennung folgende biochemische Reaktion. Grundlage der Affinitätschromatographie ist die kovalente Bindung der zu erkennenden Moleküle (Liganden) an eine unlösliche, feste Matrix, wie z.B. Agarose-Partikel. Wird eine Mischung mit dem zu isolierenden Makromolekül auf eine mit dieser Matrix gefüllten Säule aufgetragen, so wird der weitaus überwiegende Teil der Moleküle keine Affinität zum gebundenen Liganden zeigen und die Säule ungehindert durchqueren. Das zu isolierende Makromolekül jedoch erkennt die Liganden und bindet an sie. Nun werden die Eigenschaften der Elutionslösung so verändert, daß die gebundenen Makromoleküle von den Liganden abdissoziieren. Sie werden dann in hochgereinigter Form mit der Elutionslösung ausgewaschen. Mögliche Moleküle für die Wahl des Liganden sind Substrat-Analoga, Effektoren, Cofaktoren oder das Enzymsubstrat selbst.

Mitglieder der HSP 70-Familie haben eine hohe Affinität zu ATP. Diese Eigenschaft führte zur Entwicklung einer schnellen Reinigungsmethode für HSP 70 aus Säugetierzellkulturen (WELCH und FERAMISCO, 1985). Da es eine ganze Reihe von Proteinen mit hoher Affinität zu ATP gibt, kann man mit ATP-Affinitätschromatographie allein keinen ausreichenden Reinigungseffekt erzielen. Daher wurden hier die über DEAE-Anionenaustauschchromatographie vorgereinigten, HSP 70 enthaltende Fraktionen aus 2.7.1. weitergereinigt.

Die ATP-Affinitätschromatographie wurde mit ATP-Agarose von Sigma (Art.Nr. A 2767) durchgeführt. 1.6 μmol ATP pro ml sind bei diesem Produkt über das C⁸-Atom des Purin-Ringes an einen 9 atomigen Spacer gekoppelt und dieser ist an die Agarose-Matrix gebunden (siehe Abb. 2.3.).



Abb. 2.3.: Darstellung der Struktur von ATP-Agarose (Sigma, A 2767). Bei diesem Produkt ist ATP über das C⁸-Atom des Purin-Ringes an einen 9 atomigen Spacer gekoppelt der an die Agarose-Matrix gebunden ist.

1 ml Minisäulen wurden mit den DEAE-Fraktionen aus 2.7.1. (HSP 70 enthaltend) bzw. den Rohhomogenaten aus 2.4., die gegen Puffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) dialysiert wurden, beladen. Dann wurde mit 3 ml Puffer D1 (Puffer A plus 0.6 M NaCl) gewaschen, um unspezifisch gebundenes Material von der Säule zu spülen. Nun wurde mit 3 ml Puffer A der hohe Salzgehalt ausgewaschen und anschließend mit 2 ml Puffer D2 (Puffer A plus 10 mM ATP) spezifisch gebundene Proteine eluiert. Zur Elution kann auch ein Puffer mit 10 mM EDTA anstelle von 10 mM Mg/ATP eingesetzt werden. EDTA komplexiert die zur ATP-Bindung unentbehrlichen divalenten Metallionen.

Bei einer weiteren ATP-Agarose der Fa. Sigma (Art.Nr. A 4793) ist ein 22atomiger Spacer über verschiedene Hydroxylgruppen der Ribose mit ATP gekoppelt und an die Agarose-Matrix gebunden. Diese wurde ebenfalls zur Affinitätschromatographie benutzt. CSERMELY und KAHN (1991) berichten über eine dem HSP 70 ähnliche ATP-Bindungsstelle bei HSP 90 aus Ratten-Leber. Sie zeigten eine Bindung des HSP 90 an diese ATP-Agarose. HSP 90 besitzt die höchste ATP-Affinität in Gegenwart von Mn²⁺. 1 ml Minisäulen wurden mit den DEAE-Fraktionen aus 2.7.1. (HSP 90 enthaltend), die gegen Puffer D3 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MnCl₂) dialysiert wurden, beladen. Dann wurde mit 3 ml Puffer D4 (Puffer C3 plus 0.6 M NaCl) gewaschen und anschließend mit 3 ml Puffer D3 gespült. Spezifisch gebundene Proteine wurden nun mit 2 ml Puffer D5 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM EDTA) eluiert.

Die gewonnenen HSP 70 bzw. HSP 90 enthaltenden Fraktionen wurden über Nacht gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Lösungen:

Puffer A: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

Puffer D1: Puffer A plus 0.6 M NaCl

Puffer D2: Puffer A plus 10 mM ATP

Puffer D3: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MnCl₂

Puffer D4: Puffer D3 plus 0.6 M NaCl

Puffer D5: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM EDTA

2.8. Gelelektrophoretische Trennmethode

Elektrophorese stellt eine der wichtigsten Methoden zur Charakterisierung von Proteinen und anderen Makromolekülen dar. Das Prinzip der Methode beruht auf der Tatsache, daß Makromoleküle wie Proteine Ladungen tragen und in einem elektrischen Feld wandern können.

2.8.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)

Eines der am häufigsten verwendeten Elektrophoresesysteme ist die SDS-PAGE nach einer von LAEMMLI (1970) entwickelten Arbeitsvorschrift. Mit der SDS-PAGE werden Proteine ausschließlich auf der Basis ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die unterschiedlichen Eigenladungen von Proteinen effektiv überdeckt. Es entstehen Anionen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit. SDS besteht aus einer 12atomigen Kohlenwasserstoffkette mit einer SO₄-Gruppe. Die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten des SDS treten mit den hydrophoben Regionen entlang der Polypeptidkette in Wechselwirkung. Die negativ geladenen Sulfatgruppen werden nach außen gerichtet. Zusätzlich werden durch SDS Formunterschiede der Moleküle (Sekundär- und Tertiärstruktur) ausgeglichen, indem alle Moleküle gleichförmig gestreckt werden. Disulfidbrückenbindungen bleiben in Gegenwart von SDS erhalten, Wasserstoffbrückenbindungen werden gespalten. Zur vollständigen Auflösung der Tertiärstruktur werden reduzierende Thiolreagenzien (β-Mercapto-ethanol oder Dithiothreitol) zur Probe hinzu gegeben. Bei der Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel sind die relativen Mobilitäten dieser SDS-Protein-Komplexe proportional zum Logarithmus ihrer Molekülmassen. Mit Hilfe von parallel aufgetrennten

Markerproteinen lassen sich über eine Eichkurve die Molekulargewichte der Probenproteinbanden ermitteln.

Als Markerproteine wurden drei verschiedene Markergemische der Firma Sigma eingesetzt; SDS-6H (high molecular weight standard mixture): Myosin (205 kD), β -Galactosidase (116 kD), Phosphorylase b (97.4 kD), BSA (66 kD), Albumin (45 kD), Carbonic anhydrase (29 kD); SDS-7 (Dalton Mark VI^R): BSA (66 kD), Albumin (45 kD), Glycerinaldehyd-3-phosphat (36 kD), Carbonic anhydrase (29 kD), Trypsinogen (24 kD), Trypsin Inhibitor (20.1 kD), α -Lactalbumin (14.2 kD); SDS-7B (prestained SDS molecular weight standard mixture): α_2 -Macroglobulin (180 kD), β -Galactosidase (116 kD), Fructose-6-phosphat-Kinase (84 kD), Pyruvat-Kinase (58 kD), Fumarase (48.5 kD), Lactic dehydrogenase (36.5 kD), Triosephosphat Isomerase (26.6 kD).

Bei der SDS-PAGE wird das von ORNSTEIN (1964) und DAVIS (1964) entwickelte diskontinuierliches Gelsystem verwendet. Die Diskontinuität im Gel bezieht sich auf drei Parameter: (1) Engporiges Trenngel, weitporiges Sammelgel, (2) pH 8.8 im Trenngel, pH 6.8 in Sammelgel, (3) 0.375 molares Tris im Trenngel, 0.125 molares Tris im Sammelgel. Im Sammelgel des diskontinuierlichen Gelsystems erreicht man zu Beginn der elektrophoretischen Trennung eine Aufkonzentrierung der Proteinbanden. Diese Aufkonzentrierung führt dann zu schärferen Banden im Trenngel.

Es wurde das Kammersystem der Fa. Renner (Dannstadt) verwendet. Die Gelabmessungen waren 17 x 15 x 0.1 cm. Die Gele bestanden aus Sammel- und Trenngel ohne SDS im Gel. In das Sammelgel wurden mit einem Kamm Auftragstaschen einpolymerisiert.

2.8.1.1. Herstellung der verwendeten Geltypen

Polyacrylamid-Gele wurden aus Acrylamid (AA), N,N-Methylen-bis-acrylamid (BA), Tetramethylen-diamin (TEMED), bidestilliertes Wasser, Tris-HCl-Puffer und Ammoniumperoxydisulfat (AP) hergestellt. In Wasser bildet AP freie Radikale, die auf Acrylamid übertragen werden. Das "aktivierte" Acrylamid reagiert, unter Bildung einer langen Kette, in der gleichen Weise mit weiteren Acrylamid-Molekülen. Diese Ketten besitzen jedoch nicht die Fähigkeit zur Kreuzvernetzung. Zur Verknüpfung der Ketten untereinander wird BA zugefügt. BA kann man sich als zwei Acrylamid-Moleküle, die an ihren nicht reaktiven Enden miteinander verbunden wurden, vorstellen. Die Poren im entstehenden Netzwerk können durch den Acrylamidgehalt oder durch den Grad der Vernetzung (BA-Gehalt) bestimmt werden. TEMED dient bei der Gelbildung als Katalysator.

Vorratslösungen:

- a. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
- b. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
- c. Acrylamid 30.0 %/Bisacrylamid 0.8% (AA/BA)
- d. Ammoniumperoxodisulfat 10% (AP)
- e. Tetramethylethylenediamin (TEMED) (Fertiglösung von Serva , Art.Nr.)
- f. Überschichtungslösung: 0.1% SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.8
- g. Abdichter: 1% Agaroselösung

Zwei Glasplatten mit 1 mm starken Spacern wurden mit 1% Agaroselösung abgedichtet. Die angegebenen Lösungen wurden gut vermischt und zwischen die zwei vorbereiteten Glasplatten pipettiert. Dann wurde das Trenngel mit Überschichtungslösung überschichtet und bis zur vollständigen Polymerisation bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der Überschichter sorgte für eine gerade, glatte Geloberfläche.

Zusammensetzung eines 10%igen Trenngels:

	10%
AA/BA	5.3 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	4 ml
H ₂ O	6.7 ml
AP	32 ml
TEMED	16 ml

Zur Herstellung der Gradientengele wurde das Polyacrylamid langsam aus einem Gradientenmischer zwischen die Glasplatten eingebracht. Der Gradient wurde aus zwei Lösungen mit 7,5% und 15% Acrylamid hergestellt. Die Gradientenmischer-kammer mit dem Ausfluß enthielt die 15%ige Acrylamidlösung.

Zusammensetzung eines 7.5 - 15 %igen Trenngels

	7,5%	15%
AA/BA	2 ml	4 ml
1.5 M Tris-HCl, pH8.8	2 ml	2 ml
H ₂ O	4 ml	2 ml
AP	16 µl	16µl
TEMED	8 µl	8 µl

Bevor das Sammelgel auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen werden konnte, mußte der Überschichter von der Trenngeloberfläche entfernt werden. Nun wurde die Trenngeloberfläche mit bidestiliertem Wasser gespült, ein Probenkamm (für 10, 15 oder 20 Taschen) zwischen den Glasplatten angebracht und das Sammelgel mit einer Pasteur-Pipette aufgetragen.

Zusammensetzung eines 5%igen Sammelgels:

	5%
AA/BA	0.8 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.2 ml
H ₂ O	2.9 ml
AP	20 µl
TEMED	10 µl

2.8.1.2. Probenaufbereitung

Zur elektrophoretischen Trennung müssen die Proben in 1x Elektrophoreseprobenpuffer gelöst vorliegen. Lyophilisate wurden direkt in 1x Probenpuffer aufgenommen. Proben in wässriger Lösung wurden mit 3x Probenpuffer versetzt, bis die entsprechende Konzentration erreicht ist (2 Teile wässrige Probe plus 1 Teil 3x Probenpuffer).

Die in 2.5.1 geschilderte Funktion von SDS und β -Mercaptoethanol im Probenpuffer wurden durch 5 minütiges Kochen der Proben noch verstärkt. Bildete sich nach dem Abkühlen der Proben ein Niederschlag, wurde dieser durch 5 min Zentrifugation (5000 x g¹) in der Biofuge pelletiert.

Wurde der Proteingehalt erst nach der Probenaufnahme in Probenpuffer bestimmt, kam die Proteinbestimmung nach NEUHOFF (siehe 2.6.2) zur Anwendung.

Vorratslösungen:

h. 3x Probenpuffer (10% Glycerin 87%, 3% β - Mercaptoethanol, 9% SDS, 3.5% 0.5 M Tris-HCl , pH 6.8)

2.8.1.3. Elektrophorese

Die Gele aus 2.8.1.1. wurden in die Elektrophoreseeinheit (vertikale Doppelkammer, Fa. Renner/Dannstadt) eingesetzt und mit den Proben aus 2.8.1.2 sowie den Markerproteinen beladen. In eventuell freie Probentaschen wurde 1x Probenpuffer aufgefüllt. Für einen gleichmäßigen Verlauf der Gelfront sollten alle Probentaschen identische Volumina an 1x Probenpuffer beinhalten. Auf die Proben- bzw. Marker-lösungen wurde noch etwas 0.1 % Bromphenolblaulösung zur Lauffrontmarkierung gegeben und die Taschen vorsichtig mit Laufpuffer aufgefüllt. Nun wurden obere und untere Elektrodenkammer mit Laufpuffer gefüllt. Nach ca. fünf Stunden Laufzeit bei 190 Volt und 35 mA pro Gel war die Elektrophorese beendet.

Vorratslösungen:

- i. 10x Laufpuffer (14.4% Glycin, 3% Tris-Base, 1% SDS, pH 8.5)
- k. 0.1%ige Bromphenolblaulösung

2.8.2. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach O´FARREL (1975)

Unter einer zweidimensionalen Gelelektrophorese versteht man die Auftrennung eines Substanzgemisches im elektrischen Feld, die nacheinander unter zwei verschiedenen Trennbedingungen durchgeführt wird. Bei der 2D-PAGE nach O´FARREL (1975) wurden eine isoelektrische Fokussierung mit einer SDS-PAGE kombiniert. Die isoelektrische Fokussierung wurde in Glasröhrchen durchgeführt und die Rundgele anschließend in eine Flachgel-Apparatur überführt. Durch SDS-PAGE wurden die fokussierten Proteine nun aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte getrennt.

2.8.2.1. Isoelektrische Fokussierung (IF)

Alle Proteine sind Ampholyte, d.h. sie besitzen positiv und negativ geladene Gruppen. Ihre Gesamtladung setzt sich aus der Summe ihrer positiven und negativen Ladungen zusammen und hängt vom pH-Wert der Umgebung ab (siehe 2.7.1. und Abb. 2.2.). Als isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins bezeichnet man den pH-Wert, bei dem das Protein genauso viele positive wie negative Ladungen besitzt.

Die IF bewirkt eine Trennung aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte. Im Prinzip ist sie eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten. Erreichen die Proteine den pH-Wert ihres pI im pH-Gradienten, so tragen sie keine Nettoladungen mehr und hören auf weiterzuwandern. Sie fokussieren an diesem Punkt.

2.8.2.2. Herstellung der Rundgele für die isoelektrische Fokussierung

Durch die Verwendung synthetischer, niedermolekularer Polyampholyte (aliphatische Polyamino-polycarbonsäuren) erhält man einen stabilen pH-Gradienten. Die Ampholyte wurden in die Acrylamidmatrix eingebettet und decken je nach Zusammensetzung einen bestimmten pH-Wertebereich ab.

Die Rundgele wurden in Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 3 mm gegossen. Vor dem Gießen der Gele wurden die Röhrchen zur Silikonisierung in eine Silikonöllösung

getaucht und anschließend bei 100-150° C senkrecht stehend im Heißluftofen getrocknet. Die abgekühlten Röhren wurden dann an einem Ende mit Parafilm verschlossen. Nun wurde die Gellösung bis ca. 1.5 cm unterhalb des oberen Randes in die Röhren eingefüllt und mit 20 µl 2D-Überschichtungslösung (c) überschichtet. Nachdem die Rundgele auspolymerisiert waren wurde der Überschichter entfernt, die Gele nun mit 20 µl Lyse-Puffer (b) überschichtet und dieser mit bidestiliertem Wasser abgedeckt. Nach einer Stunde wurde der Parafilm durch eine Dialysemembran ersetzt und die Überschichtung mit Lyse-Puffer erneuert. Nachdem die Röhren in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt waren, wurde die Anodenkammer (positiv, untere Kammer) mit Anodenpuffer und die Kathodenkammer (negativ, obere Kammer) mit Kathodenpuffer gefüllt. Zur Ausbildung des pH-Gradienten wurde nun nach folgendem Schema vorfokussiert: a.) 15 min bei 200 V, b.) 30 min bei 300 V und c.) 30 min bei 400 V. Nach der Vorfokussierung wurde die Kathodenkammer geleert, und der Lyse-Puffer entfernt.

Vorratslösungen:

- a. Acrylamid 28.4%/Bisacrylamid 1.6% (2D-AA/BA)
- b. Lyse-Puffer: 9.5 M Harnstoff, 2% NP-40, 4% Ampholyt pH 5-7, 1% Ampholyt pH 2-11, 5% β-Mercaptoethanol
- c. 2D-Überschichtungslösung: 8 M Harnstoff
- d. Probenüberschichtungslösung: 9 M Harnstoff, 2% NP-40, 2.5% β-Mercaptoethanol, 2% Ampholyt pH 5-7, 0.5% Ampholyt pH 2-11
- e. 10% NP-40
- f. Anodenpuffer: 0.01 M Phosphorsäure
- g. Kathodenpuffer: 0.02% NaOH

10 ml Gellösung für ca. 8 Rundgele (80 x 3 mm):

Harnstoff	5.5 g
2D-AA/BA	1.33 ml
10% NP-40	2 ml
bidestiliertes Wasser	1.97 ml
Ampholyt pH 5-7	0.4 ml
Ampholyt pH 2-11	0.1 ml
10% AP	10 µl
TEMED	7.5 µl

2.8.2.3. Probenaufbereitung

10 µl wässrige Probenlösung wurde mit 5 mg Harnstoff und 50 µl Lyse-Puffer versetzt, in die Röhrchen aus 2.8.2.2 einpipettiert und mit 10 µl Probenüberschichtungslösung überschichtet.

2.8.2.4. Fokussierung

Nach Auftrag von Proben und Probenüberschichter, wurde die Kathodenkammer erneut mit Kathodenpuffer gefüllt. Eventuell vorhandene Luftblasen am unteren Ende der Röhrchen wurden entfernt. Nach 20 Stunden bei 500 V war die Fokussierung beendet. Die Rundgele wurden dann mit Hilfe einer wassergefüllten Spritze aus den Röhrchen in eine mit SDS-Probenpuffer gefüllte Petrischale gepresst.

2.8.2.5. Die zweite Dimension

Die 15 min in SDS-Probenpuffer äquilibrierten Rundgele wurden dann auf 3 mm dicke Flachgele aus 2.8.1.1 mit nur einer Probentasche übertragen. Mit einem Spatel wurden die Rundgele luftblasenfrei zwischen die Glasplatten auf das Sammelgel gedrückt und die Probentasche mit Markerproteinen gefüllt. Die weitere Durchführung der zweiten Dimension war die gleiche wie die der SDS-PAGE aus 2.8.1.

2.8.3. Fixierung, Färbung und Trocknung der Gele

2.8.3.1. Coomassie brilliant blue-Färbung

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Flachgele aus 2.8.1.3 bzw. 2.8.2.5 oder die Rundgele aus 2.8.2.4 für 30 min in der Färbelösung fixiert und gefärbt. Anschließend wurde 5-24 h lang entfärbt, wobei der verbrauchte Entfärber mehrere Male durch frischen ersetzt wurde. Die untere Nachweisgrenze der Proteinfärbung mit Coomassie brilliant blue liegt bei 0.1-0.5 µg Protein pro Bande.

Vorratslösungen:

Färbelösung: Coomassie brilliant blue R250 0.2 % in Methanol (vergällt) / Eisessig (99.8 %) / entmineralisiertes Wasser (5/1/4)

Entfärbelösung: Methanol (vergällt) / Eisessig (99.8 %) / entmineralisiertes Wasser (2/1/7)

Waren Proteinbanden aus dem Gel für Immunisierungsversuche vorgesehen, wurde nach folgendem Schema (HARLOW und LANE, 1988) gefärbt. Die Gele wurden nach dem Lauf in entmineralisiertem Wasser gewaschen und anschließend 20 min im Färber (0.1 % Coomassie brilliant blue R250 in Wasser) gefärbt. Zur Hintergrundentfärbung wurde das Gel in entmineralisiertem Wasser gewaschen. Nach dem Erscheinen der Banden wurden sie mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur Injektion vorbereitet.

2.8.3.2. Silberfärbung

Zum Nachweis sehr geringer Proteinmengen pro Bande wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze liegt zwischen 1-10 ng Protein pro Bande. Zur Silberfärbung von Proteinen sind eine Vielzahl verschiedener Rezepte bekannt. Eine einfache Variante stellt die Silberfärbung nach einem Rezept von HEUKESHOVEN (1985) dar.

Nach dem Gellauf wurde das Gel 3-12 h in 30 % Ethanol / 10 % Essigsäure (99.8 %) fixiert. Anschließend sukzessiv mit 30 % Ethanol und entmineralisiertem Wasser je 30 min gewaschen. Dann wurde das Gel in eine 0.1 % AgNO_3 Lösung überführt. Nach 30 min wurde das Gel kurz in entmineralisiertem Wasser gespült, und in 2.5 % Na_2CO_3 / 0.02 % Formaldehyd entwickelt. Nach mehreren Minuten erschienen die Proteinbanden. Bei beginnender Hintergrundverdunkelung wurde die Entwicklung durch Überführung des Gels in 1% Essigsäure gestoppt.

2.8.3.3. Trocknung der Gele

Nach vollständiger Entfärbung des Hintergrundes der Gele aus 2.8.3.1 wurden die Gele für 5 min in einer 5 % Glycerollösung inkubiert, und zur Aufbewahrung zwischen zwei Zellophanfolien (Einmachzellophan) oder auf Wathman-Filterpapier im Vakuum bei 80 °C getrocknet. Gele aus 2.8.4. wurden grundsätzlich auf Wathman-Filterpapier getrocknet.

2.8.4. Diphenyloxazol (PPO) Fluorographie

Durch eine PPO-Behandlung von Gelen mit radioaktiv markierten Proben nach BONNER und LASKEY (1974) erreicht man durch die Umsetzung der radioaktiven Strahlung in Fluoreszenzstrahlung eine Verstärkung der Schwärzungen auf dem Röntgenfilm. PPO beinhaltet delokalisierte Elektronensysteme deren Elektronen, angeregt durch die radioaktive Strahlung, in höhere Energieniveaus versetzt werden. Beim Rückfall in ein niedrigeres Energieniveau wird Licht emittiert (Fluoreszenz).

Nach der Elektrophorese bzw. nach der Färbung wurde das Gel in Entfärber äquilibriert (30 min). Anschließend sukzessiv in gebrauchtem und frischem DMSO je 30 min inkubiert. Darauf wurde das Gel in ein PPO/DMSO Bad überführt (45 min), abschließend 30 min unter fließendem Leitungswasser gespült und auf Wathman-Filterpapier getrocknet. Die getrockneten PPO-verstärkten Gele wurden bei Rotlicht auf einen Röntgenfilm (Kodak, X-Omat AR 5) aufgelegt und bei -80°C ein bis mehrere Tage in einer lichtundurchlässigen Kassette exponiert. Danach wurden die Filme bei Rotlicht entwickelt (1-3 min Entwicklerbad, 5 min Stoppbad, 5 min Fixierbad, 5 min Wasserbad) und getrocknet .

Lösungen:

Entfärbelösung: Methanol (vergällt) / Eisessig (99.8 %) / entmineralisiert Wasser (2/1/7)

DMSO: Dimethylsulfoxid (Riedel de Haen)

PPO/DMSO: 22 % PPO in DMSO

Entwickler: Entwickler/entmineralisiertes Wasser (1/5)

Stoppbad: 10 % Essigsäure in entmineralisiertem Wasser

Fixierer: 1 Packet Fixiersalz in 1 l entmineralisiertem Wasser

2.9. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen (Western Blotting)

Zum elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blotting, BURNETTE, 1981) wurden Proteine, wie in 2.8. beschrieben, gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Verwendung von vorgefärbten Markerproteinen (Sigma SDS 7b siehe 2.8.1.) ermöglicht eine gute Blotkontrolle. Das Gel wurde nach der Elektrophorese 20 min in Blotpuffer äquilibriert. In einem Blotpufferbad wurde ein "Sandwich" in folgender Reihenfolge luftblasenfrei gebildet:

Kathodenplatte (-)
Scotch-Brite (Schwamm)
Whatman-Filter (3 MM)
Polyacrylamidgel
Nitrocellulosemembran
Whatman-Filter (3 MM)
Scotch-Brite (Schwamm)
Anodenplatte (+)

Das so gebildete "Sandwich" wurde in einem "Blotting-Tank" (BioRad) installiert (vom Gel (-) nach Nitrocellulose (+)) und der Elektrotransfer der Proteine etwa 20 h bei konstanter Stromstärke (100 mA) durchgeführt.

Material und Lösungen:

Blotpuffer (Elektrodenpuffer): 25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 20 % Methanol (vergällt) pH 8.3

Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, 0.45 µm; Art.Nr. BA 85)

Filterpapier (Whatman)

Blot-Kammer

2.10. Immunologische Methoden

2.10.1. Aufbereitung der Antigene

Zwei Kaninchen wurden mit HSC 69 immunisiert. Zu diesem Zwecke wurde die gesamte Endfraktion (ATP-Elutionsfraktionen) einer Aufarbeitung gegen bides-tiliertes Wasser dialysiert, das Dialysat in 1.5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert (etwa 40 µg Protein pro Aliquot) und lyophilisiert. Pro Injektion (für zwei Kaninchen und je zwei Injektionsstellen) wurde ein Aliquot in 0.5 ml PBS pH 7.2 aufgenommen und mit 1.5 ml Freund'schen Adjuvans vermischt.

2.10.2. Immunisierung der Kaninchen

Die Kaninchen wurden nach folgendem Schema immunisiert (dabei wurde die Antigenmischung an zwei verschiedenen Stellen der Rückenregion subcutan injiziert). Eine Woche nach Entnahme von etwa 20 ml Blut (zur Gewinnung des Präimmunserums) wurde 5 Wochen lang in wöchentlichem Abstand Antigen in vollständigem Freund'schen Adjuvans gespritzt. Zwei Wochen nach der letzten primären Injektion wurden 10 ml Blut entnommen und das gewonnene Serum durch Western- und Dot-Blotting auf die Anwesenheit spezifischer Antikörper überprüft. In wöchentlichem Abstand kann nun bis zu je 20 ml Blut entnommen werden. Nimmt der Titer spezifischer Antikörper im Serum ab, kann durch sekundäre Antigeninjektion eine erneute Ak-Bildung stimuliert werden. Bei sekundären Injektionen wird das Antigen in unvollständigen Freund'schen Adjuvans injiziert.

2.10.3. Gewinnung und Aufbereitung der Seren (Gesamt-IgG-Reinigung)

Den Kaninchen wurde Blut über die Marginalvene des Ohres entnommen. Vor der Blutentnahme wurde der Bereich über der Marginalvene vorsichtig rasiert. Sind die Venen sehr klein kann man den rasierten Bereich mit etwas Toluol einreiben. Die Venen verdicken sich dann. Wenn möglich sollte eine Behandlung mit Toluol vermieden und der rasierte Bereich nur mit absolutem Ethanol sterilisiert werden. Mit einem sterilen Skalpell wurde die Vene 1-2 mm längs angeschnitten. Waren 20 ml Blut in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt, wurde ein Tupfer auf den Einschnitt gepresst bis die Blutung aufhörte. Wurde das Ohr mit Toluol behandelt, muß es zur Entfernung restlichen Toluols kräftig mit Wasser gewaschen werden. Ein wenig Flüssigsprühverband (Flint) unterstützt den Heilungsprozeß und beugt einer erneuten Blutung der Einschnittstelle vor.

2.10.3.1. Serumaufreinigung nach HURN und CHANTLER (1980)

Bevor Protein G Minisäulen zur IgG Aufreinigung zur Verfügung standen, wurden die Antikörper nach einer von HURN und CHANTLER (1980) beschriebenen Vorschrift angereichert.

Nach einstündiger Gerinnungszeit bei Raumtemperatur wurde das Blut zur vollständigen Agglutination für ca. 6 h (oder über Nacht) in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Nach der Gerinnung wurden verbleibende Erythrozyten durch Zentrifugation (1000 x g⁻¹, 30 min) entfernt. Anschließend wurde der Überstand (Präimmunserum bzw. Antiserum) abgenommen und vorsichtig mit 0.1 N NaOH auf pH 8.5 eingestellt. Pro 10 ml Antiserum wurden nun 35 ml 0.4%ige Rivanollösung aus einem Scheidetrichter langsam ins rührende Serum geträufelt. Der sich bildende Niederschlag (ausgefällte Lipoproteine) wurde pelletiert (8000 x g⁻¹, 30 min). Dann wurde der die Immunglobuline enthaltende Überstand abgenommen und zur Entfärbung mit 1g Aktivkohle pro 100 ml Serum versetzt. Die Aktivkohle wurde nach 10 min rühren durch Filtration (Faltenfilter) entfernt. Anschließend folgte eine 50%ige Ammoniumsulfatfällung mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (77%). Das Serum wurde tropfenweise mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung aus einem Scheidetrichter versetzt. Zur Präzipitation wurde das Serum nun für ca. 6 h (oder über Nacht) kalt gestellt (4°C). Dann wurde der Niederschlag durch Zentrifugation (5000 x g⁻¹, 30 min) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde, im halben Volumen des ursprünglichen Serumvolumens, in PBS (**P**hosphat **b**uffered **s**aline) aufgenommen. Zur Entfernung des restlichen Ammoniumsulfates wurde das Serum

über Nacht gegen PBS dialysiert. Zur Kontrolle der Dialyse kann man etwas Serum in eine BaCl₂-Lösung tropfen. Ein Niederschlag deutet auf Restsulfat hin und macht erneute Dialyse notwendig. Nach der Dialyse wurde eine Volumen- und Proteinbestimmung durchgeführt. Das Antiserum war so zur weiteren Verwendung vorbereitet. Präimmunserum wurde je nach Proteingehalt in kleinere Fraktionen aliquotiert und lyophilisiert.

Lösungen:

-0.4%ige Rivanollösung

-77%ige Ammoniumsulfatlösung (gesättigte Ammoniumsulfatlösung.)

-Phosphat buffered saline (8 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1.15 g Na₂HPO₄ pro Liter, pH 7.2)

2.10.3.2. IgG Reinigung durch Protein G-Agarose Affinitätschromatographie

Protein G-Agarose enthält etwa 2.5 mg immobilisiertes Protein G pro ml Gel, welches ca. 15-20 mg IgG zu binden vermag. Protein G ist, wie auch Protein A, ein bakterielles Protein mit Fc-Affinität (Fc = Fußregion der Ig), zeichnet sich jedoch durch eine wesentlich höhere Affinität aus.

Zur IgG-Aufreinigung wurden 250 µl Rohserum (mit 250 µl Waschpuffer verdünnt) bzw. 500 µl nach HURN und CHANTLER (1980) gereinigtes Serum auf die mit Waschpuffer äquilibrierte Protein G-Agarosesäule aufgetragen. Darauf wurde mit 3 ml Waschpuffer gespült und anschließend mit 3 ml Elutionspuffer spezifisch gebundene IgG eluiert. Die saure Elutionsfraktion wurde dann mit 0.5 N NaOH neutralisiert. Nach der letzten IgG Elution wurde die Säule immer mit Konservierungspuffer gespült. Die Säulen wurden mit überstehendem Konservierungspuffer bei 4 °C gelagert.

Lösungen:

Waschpuffer: 20 mM Na₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH 7.0; 0.02 % NaN₃

Elutionspuffer: 0.1 M Glycin pH 2.7; 0.02 % NaN₃

Konservierungspuffer: 30 % Ethanol (abs.) in Waschpuffer

2.10.4. Immunologischer Antigennachweis auf Dot- und Western Blots

Im Dot-Blot wurden die Probenlösungen, in denen Antigen nachgewiesen werden sollte, in verschiedenen Konzentrationen auf Nitrocellulosestreifen (Schleicher und Schüll, BA 85) aufgetragen und getrocknet. Diese Dot-Blots, wie auch die Western Blots aus 2.9., wurden zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen zunächst 15 min in PBS/Tween20 und

dann 15 min in PBS/Gelatine geschüttelt. Nun wurden die Blots für 1 h in mit PBS/Tween20 1:10000 verdünnte primäre Antikörperlösung (hergestellte Präimmun- bzw. Antiserum IgG-Fraktion) bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden die Blots sukzessiv dreimal mit PBS/Tween20 jeweils 5 min gewaschen und anschließend 15 min erneut mit PBS/Gelatine blockiert. Die Blots wurden darauf in Anti-Kaninchen-IgG (1:500 verdünnt), an die das Enzym Peroxidase kovalent gekoppelt ist, 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneut 3 Waschschrte mit PBS/Tween20. Die Enzymreaktion wurde durch Inkubation in einer frisch hergestellten Lösung aus PBS/Tween20, die pro 50 ml 25 mg DAB (**D**iaminobenzidin, Sigma Art.Nr. D 5637) sowie 50 µl H₂O₂ (30 % Perhydrol, Merck) enthielt, durchgeführt. Nach Beendigung der Peroxidase-katalysierten Farbreaktion wurde die Nitrocellulose in entmineralisiertem Wasser gewaschen und getrocknet.

Lösungen:

PBS: 0.8 % NaCl, 0.02 % KH₂PO₄, 0.115 % Na₂HPO₄, pH 7.2.

PBS/Tween20: 0.05 % Tween20 in PBS.

PBS/Gelatine: 1 % Gelatine in PBS.

Peroxidasereaktionslösung: 25 mg DAB und 50 µl H₂O₂ pro 50 ml PBS/Tween20.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ernte des Myzels und Zellaufschluß

Die mit 3×10^9 Konidien angeimpften 11 Fernbachkolbenkultur lieferte nach 21 - 24 stündigem Wachstum 28 - 32 g Feuchtgewicht Myzel nach "normalen" Wachstumsbedingungen, und 26 - 30 g Feuchtgewicht Myzel nach HS-Bedingungen. Die unterschiedlichen Ertragsmengen könnten Resultat einer Wachstumsinhibition durch die HS-Bedingungen sein. Aber auch eine Inokulation etwas unterschiedlicher Konidien suspensionen oder unterschiedlich gute Entfernung vom Medium (beim "abnutschen") sind nicht auszuschließen. Eine Wachstumsinhibition durch HS-Bedingungen wird auch von PLESOFKY-VIG und BRAMBL (1985 b) berichtet.

Die Homogenisation der Myzelien lieferte cytoplasmatische Fraktionen mit Proteinausbeuten (Gesamtproteinbestimmung nach NEUHOFF et al, 1979) von 15 - 21 mg pro g Feuchtgewicht K-Myzel und 14 - 20 mg pro g Feuchtgewicht HS-Myzel. Die etwas geringere Proteinausbeute des HS-Myzels könnte auf eine geringere Gesamtproteinkonzentration in den HS-Zellen zurückzuführen sein, da die Synthese der meisten "normalen" Proteine inhibiert wird und nur HSP verstärkt synthetisiert werden. Sie könnten aber auch auf unterschiedlich gutem Zellaufschluß beruhen, da sich die Homogenisation mit dem Mörser nur schlecht standardisieren läßt. Aber auch hier ist eine unterschiedlich gute Entfernung vom Medium nicht auszuschließen. Die Trockengewichte wurden nicht bestimmt.

3.2. Proteinmuster der cytoplasmatischen Fraktion hitzestresser und ungestresser Zellen von *Neurospora crassa*

Die cytoplasmatische Fraktion von *Neurospora* enthält hauptsächlich drei HSP die in Autoradiographien (S^{35} -Methionin-Markierung) von 10%igen, eindimensionalen SDS-PAGE Gelen gut zu erkennen sind. Es sind die hochmolekularen HSP 99, 81 und 69 (Abb. 3.1. Spur D und F). HSP 81 ist auch in Coomassie brilliant blue gefärbten Gelen gut zu erkennen, HSP 99 und 69 nur sehr schlecht (Abb. 3.1. Spur B). Ein weiteres etwa 34 kD großes, induziertes Protein scheint nur in sehr kleinen Mengen exprimiert zu werden (Abb. 3.1. Spur D). Viele kleine HSP besitzen kein, oder nur wenig Methionin, so daß die scheinbar geringere Menge des 34 kD Proteins vielleicht auch auf eine schlechte S^{35} -Methionin-Markierbarkeit zurückzuführen ist.

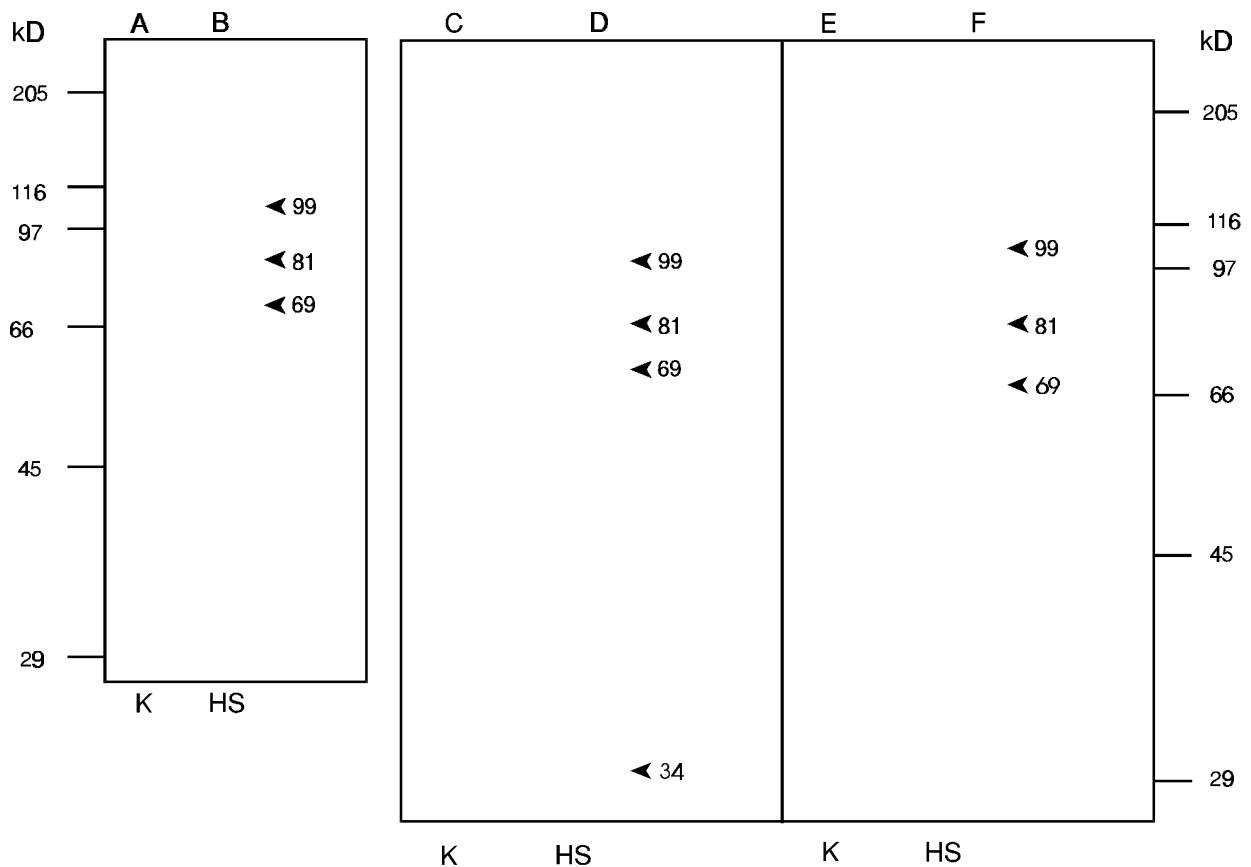


Abb. 3.1.: Eindimensionale Gelelektrophoreseprofile von Proteinen der cytoplasmatischen Fraktion hitzestresser (HS=21 h 28°C und 1 h 45°C) und ungestresser Zellen (K=22 h 28°C) von *Neurospora crassa*. A, B: 18 und 21 µg Protein pro Spur, Coomassie brilliant blue gefärbt. C, D: Fluorogramm (40 h exponiert) der Spuren A und B, 100000 cpm pro Spur. E, F: Fluorogramm (60 h exponiert), 10 µg Protein pro Spur, 55 und 45000 cpm pro Spur.

Versuche, die Haupt-HSP der S-100-Roh-K- bzw. HS-Fraktion durch zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'FARRELL in ihre Komponenten aufzulösen, lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.2.1. ATP-Affinitätschromatographie der K und HS-Rohextrakte

Um zu überprüfen, welche cytoplasmatischen Proteine eine ATP-Affinität aufweisen, wurden die S-100-Roh-K- und HS-Fractionen mit der ATP-Agarose chromatografiert und die ATP-Eluate durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert.

Das eindimensionale SDS-PAGE Gel (Abb. 3.2 A) zeigt, daß mehrere cytoplasmatische Proteine ATP-Affinität besitzen. Stärkste Affinität zeigen zwei Proteine im 70 kD-Bereich, von denen das größere durch die HS-Behandlung verstärkt synthetisiert (HSP 69) und das kleinere inhibiert wird. Die Synthese einiger weiterer ATP-affiner Proteine scheint unter

HS-Bedingungen inhibiert zu sein oder die HS-Bedingungen induzieren eine Art Verlust der ATP-Affinität dieser Proteine. Unter HS-Bedingungen verstärkt synthetisierte Proteine, außer dem HSP 69, fallen nicht auf.

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese konnte HSP 69 der ATP-Eluate in sieben Komponenten aufgetrennt werden (Abb. 3.2. C). Drei dieser Komponenten scheinen durch die HS-Behandlung induziert zu sein (schwarze Pfeile in Abb. 3.2. C). Die vier weiteren sind konstitutiv (helle Pfeile in Abb. 3.2. B und C) vorhanden. Zwei der vier konstitutiven Komponenten zeigen nach HS-Behandlung eine verstärkte Synthese. Diese Zusammensetzung des HSP 70 von *Neurospora* wird auch von KAPOOR und LEWIS (1987, siehe Kap. 1.3) berichtet. Die sieben HSP 69 Komponenten haben isoelektrische Punkte (pI) zwischen 5.7 und 6.4, wobei die induzierten Komponenten höhere pI (um 6.3) besitzen. Ein basischerer pI der induzierten HSP 69 Komponenten wird auch von PELHAM (1986) berichtet.

Die gelelektrophoretische Analyse der ATP-bindenden Proteine in der K- und HS-Fraktion (Abb. 3.2. A) scheint auf eine geringere Menge an markierten Proteinen in der HS-Fraktion hinzudeuten. Durch cpm- und Gesamtproteinbestimmung (Tab. 3.1.), bzw. durch deren Verhältnis zueinander (Ratio cpm % / Protein %, aufgetragenes Material = 100 %), erkennt man eine andere Verteilung (Abb.3.3.). Die cpm- und Gesamtproteinwerte des HS-ATP-Eluates liegen im Vergleich zum K-ATP-Eluat um 134 % und 57 % höher. Das Verhältnis von cpm zu Gesamtprotein (Ratio cpm/Protein) des HS-ATP-Eluates liegt 49 % höher als im K-ATP-Eluat. Dieser drastische Anstieg der radioaktiven Markierung in dem HS-Rohextrakt-ATP-Eluat ist sicher auf die verstärkte Synthese des HSP 69 zurückzuführen, dessen hohe ATP-Affinität bekannt ist (siehe Kap. 1.3.). Berücksichtigt man, daß bei einer eventuellen Überbeladung der ATP-Agarose nicht alles potentiell bindende Protein tatsächlich gebunden wird, kann man sagen, daß nach einer HS-Behandlung etwa 3.5 % Protein des Gesamtproteins im Cytoplasma ATP binden. Gegenüber 2.21 % bei Kontrollzellen ist dies eine Erhöhung um etwa 60 %.

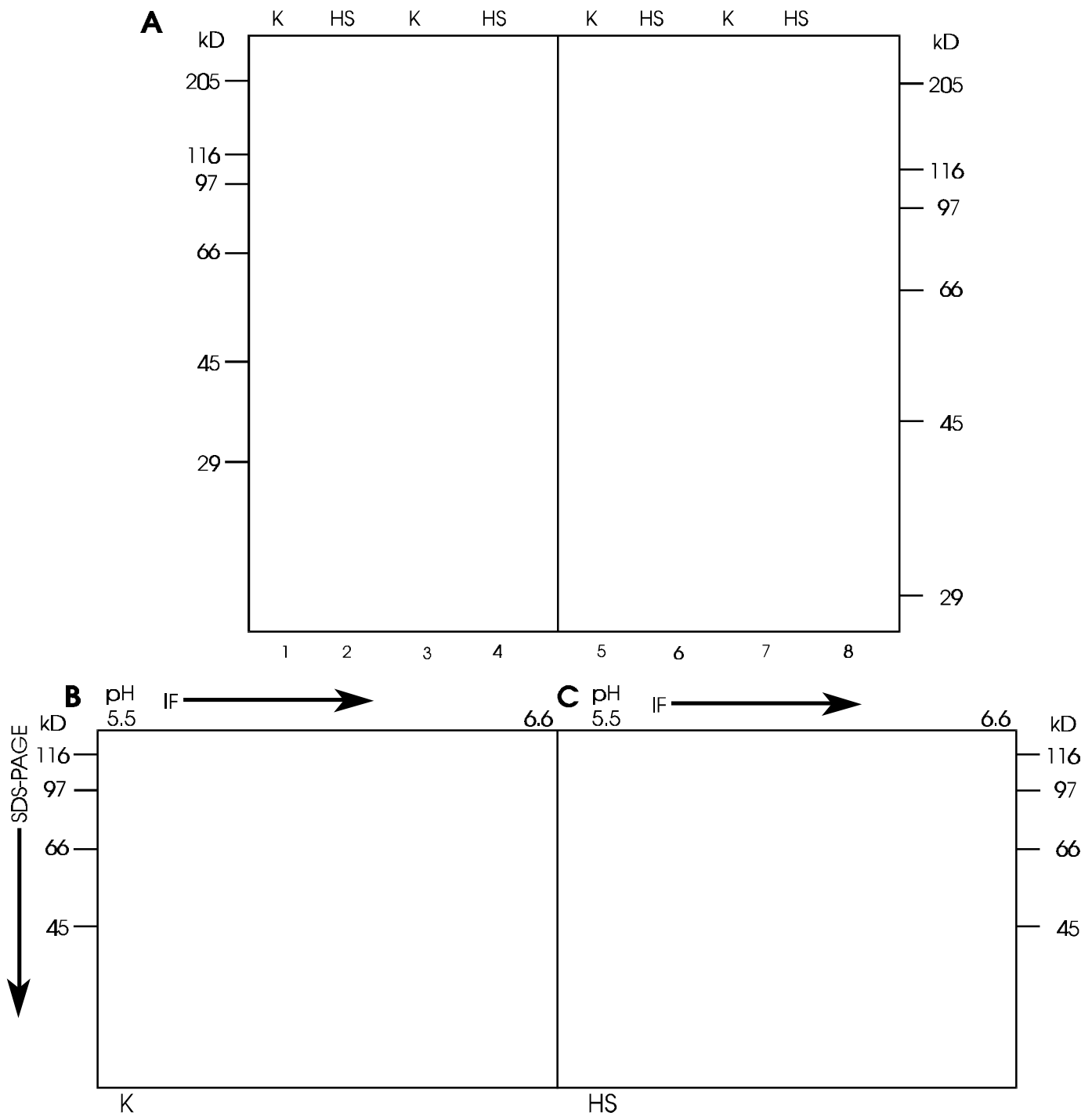


Abb. 3.2.: Ein- und zweidimensionale gelelektrophoretische Analyse der ATP-Eluate der ATP-Affinitätschromatographie von cytoplasmatischen K und HS Rohextrakten (S 100 Roh K und HS). A: Spur 1: K, 19 µg Protein, 2: HS, 15 µg Protein, 3: K 30µg Protein, 4: HS, 30 µg Protein, 1, 2, 3 und 4 Coomassie brilliant blue gefärbt; Spur 5 und 6: Fluorogramme der Spuren 1 und 2, 50000 cpm/Spur, Spur 7 und 8: Fluorogramme der Spuren 3 und 4, 80 und 100000 cpm pro Spur; B: Fluorogramm der zweidimensionalen Gelelektrophorese vom K-ATP-Eluat (12 µg Protein, 30000 cpm), die hellen Pfeile bezeichnen die konstitutiven HSC 69), C: Fluorogramm der zweidimensionalen Gelelektrophorese vom HS-ATP-Eluat (36 µg Protein, 100000 cpm, helle Pfeile kennzeichnen HSC 69, schwarze Pfeile HSP 69).

	Auftrag	ATP
--	---------	-----

cpm				
	ges.	%	ges.	%
Roh K	19068000	100	207800	1,09
Roh HS	13519500	100	345000	2,55
Protein				
	µg ges.	%	µg ges.	%
Roh K	3525	100	78	2,21
Roh HS	3000	100	104	3,47

Tab. 3.1.: Bestimmung der Radioaktivität (cpm) und Gesamtproteinmenge (Protein) in den S 100 Roh K und HS ATP-Eluaten der ATP-Affinitätschromatographie.



Abb.3.3.: Vergleich der prozentualen cpm- und Gesamtproteinwerte (aus Tab. 3.1.), und deren Verhältnis zueinander (Ratio cpm % / Protein %), der an ATP-Agarose spezifisch bindenden Proteine aus den cytoplasmatischen K und HS-Rohextrakten (S 100 Roh K und HS).

3.3. Aufreinigung und Isolierung von HSP aus *Neurospora crassa*

In Anlehnung an Isolierungen von HSP aus Säugern (WELCH und FERAMISCO, 1982b und 1985; ITOH et al, 1990) und Pflanzen (WILKINSON et al, 1990) wurde eine Methode zur Isolierung von HSP 69 aus *Neurospora* entwickelt. Ferner wurde versucht, auch für HSP 81 eine Isolierungsmethode zu entwickeln. Das in Abb. 3.4. dargestellte, empirisch entwickelte Isolierungsschema für HSP 69 (und 81) zeigt die sukzessiv angewandten Methoden im Überblick.

Homogenisation (Mörser, Homogenisator)

Zentrifugation (2 h 48000 (große Mengen) bzw. 1 h 100000 $\times g^{-1}$ (kleine Mengen))
S 100 Roh K und HS

(50 % Ammoniumsulfatfällung - Dialyse - optional)

DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie

0.09 - 0.14 M NaCl-Eluat
DEAE 0.14

0.14 - 0.3 M NaCl-Eluat
DEAE 0.3

**Affinitätschromatographie mit der ATP-
Agarose**

(*Affinitätschromatographie mit der ATP-
Agarose*)

(*Gelfiltration -optional*)

Hydroxylapatit-Chromatographie

Gelfiltration

HSC 69

HSP 81

Abb. 3.4.: Isolierungsschema für die cytoplasmatischen HSC 69 (und HSP 81) aus
Extrakten von *Neurospora* .

3.3.1. Proteinfällung

Proteine der cytoplasmatischen Fraktionen aus den Fernbachkolbenkulturen wurden mit 383 g AS / l (50 % AS-Sättigung) gefällt. Alternativ zur AS-Fällung wurde eine Proteinfällung mit PEG untersucht. Die Proteinausbeute einer 25 % PEG-Fällung (w/v) der Probenlösungen war niedriger als die der 50 % AS-Fällung. Auch nach weiterer Erhöhung der PEG-Konzentration wurde die Proteinausbeute der 50 % AS-Fällung nicht erreicht. Daher wurde eine PEG-Fällung nicht angewandt. Eine Anreicherung der HSP bei einer bestimmten AS- oder PEG-Konzentration gelang nicht. Die Protein-Fällung diente also nur zur Aufkonzentrierung der Proteine aus großen Volumina und war vor allem wichtig für die Versuche, bei denen die Rohextrakte über eine Gelfiltration nach Ihrer Größe fraktioniert werden sollten. Bei den späteren Versuchen, in denen der erste Reinigungsschritt die Anionenaustausch-Chromatographie darstellte, wurde kein geringes Probenvolumen benötigt und auf eine Konzentrierung durch Proteinfällung verzichtet.

3.3.2. Gelfiltration der Rohextrakte

In gemeinsamen Versuchen mit H. CIESLA wurde versucht die AS-gefällten Rohextrakte über eine Gelfiltration nach ihrer Größe zu fraktionieren. Die Proteine wurden zwar in den ihrem MW entsprechenden Fraktionen angereichert, waren aber auch in vielen anderen Fraktionen stark vertreten (CIESLA, 1991). Eine Sammlung der entsprechenden angereicherten Fraktionen zur Weiterverarbeitung, hätte zwangsläufig einen großen Verlust erwünschter Proteine bedeutet. Die relativ schlechte Größenfraktionierung und der Nachteil der geringen Kapazität machen eine Gelfiltration als ersten Reinigungsschritt unbrauchbar. Stattdessen wurde nun die Anionenaustausch-Chromatographie mit relativ hoher Kapazität eingesetzt. Eine Aufkonzentrierung des Gesamtproteins durch AS-Fällung wurde dadurch überflüssig.

3.3.3. DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie

Der erste erfolgreich eingesetzte chromatographische Reinigungsschritt war eine Ionenaustausch-Chromatographie mit dem schwach basischen DEAE-Anionenaustauscher Fractogel[®] TSK DEAE 650 (M) der Fa. Merck (siehe Kap. 2.7.1.). Aufgrund der sauren pI der HSP ist ein Anionenaustausch dem Kationenaustausch vorzuziehen. Die HSP weisen bei physiologischen pH-Werten eine negative Nettoladung auf und binden gut an die DEAE-Matrix. Um eine gute Bindung der HSP an Kationenaustauscher zu erwirken, müßte der pH-Wert des Bindungspuffers bei 3 liegen. Die pH-Abhängigkeit der Nettoladung von Proteinen ist in Abb. 2.2. (Kap. 2.7.1) dargestellt.

Alternativ zum Fractogel[®] TSK DEAE 650 (M) wurde ein weiterer Anionenaustauscher der Fa. Merck (Fractogel[®] EMD DEAE 650 (M)) verwendet. Die Versuche mit diesem Anionenaustauscher führten zu keiner weiteren Verbesserung der Trennung. Bindungs- und Elutionsverhalten der Proteine waren bei beiden Anionenaustauschern nahezu identisch.

Zum Anionenaustausch wurde die DEAE-Säule (11 x 2.6 cm, 58 ml Gelbettvolumen) mit 50 ml (80 mg Gesamtprotein) S-100-Roh-K bzw. -HS beladen. Nach dem Durchlauf der Proteine, die keine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial eingehen, wurde zur Ermittlung der Elutionseigenschaften der gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (0.02-0.5 M NaCl) eluiert (Abb.3.5. A). Die Fraktionen wurden gesammelt und gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 3.5.B). HSP 69 eluiert bei 0.09 - 0.14 (Fraktionen 12 - 20) und HSP 81 bei 0.14 - 0.3 M NaCl-Konzentration (Fraktionen 20 - 33). Da die HSP schon mit relativ niedrigen NaCl-Konzentrationen eluiert werden konnten, hätte ein etwas

enger gefaßter linearer NaCl-Gradient (z.B. 0.08 - 0.28 M NaCl) sicher eine bessere Fraktionierung geliefert.

Zur genaueren Überprüfung der Elutionseigenschaften der HSP wurde eine DEAE-Chromatographie mit S^{35} -Methionin-markierten Proben in Minisäulen (3 ml Gelbettvolumen) durchgeführt. Die Minisäulen wurden mit 3 ml (5 mg Gesamtprotein) S-100-Roh-K und -HS beladen. Nach dem Durchlauf der nicht bindenden Proteine wurden die gebundenen Proteine sukzessiv mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0.02, 0.09, 0.14, 0.3 M NaCl) eluiert und die einzelnen Fraktionen gelelektrophoretisch analysiert. In Abb. 3.6. A ist das Coomassie brilliant blue gefärbte Gel der Fraktionen dargestellt. Abb. 3.6. B zeigt das Fluorogramm des Gels aus A.

Das Fluorogramm in Abb. 3.6. B zeigt, daß die hochmolekularen HSP 99, 81 und 69 unter den gewählten Bedingungen gut an den Anionenaustauscher binden und viele andere, unerwünschte, schwach oder nicht markierte Proteine nicht binden (ungeb. in Abb. 3.6. B im Vergleich zu Abb. 3.6. A). In der ersten Elutionsfraktion (0.09 M NaCl) des Fluorogramms ist ein geringer Teil der HSP 99 und 81 und ein etwas größerer Anteil HSP 69 zu erkennen. Das mit Coomassie brilliant blue gefärbte Gel zeigt viele unerwünschte Proteine in dieser Fraktion. Die 0.09 M NaCl-Fraktion wurde verworfen. Die 0.14 M NaCl Fraktion beinhaltet den größten Teil der HSP (Abb. 3.6. B) und den geringsten Anteil anderer Proteine (Abb. 3.6. A). Das kleine, etwa 34 kD große HSP ist ebenfalls in dieser Fraktion vertreten (heller Pfeil in Abb. 3.6. C). In der 0.3 M NaCl Fraktion ist nur ein geringer Teil der HSP (Abb. 3.6. B), aber ein recht großer Teil anderer, vorwiegend unter 50 kD großer, Proteine vorhanden (Abb. 3.6. A). Unter den HSP in der 0.3 M NaCl Fraktion ist der Anteil der HSP 99 und 81 am größten. Desweiteren fallen in dieser Fraktion zwei um 220 kD große Proteine (helle Pfeile in Abb. 3.6. C) auf, die in keiner Kontrollfraktion zu erkennen sind. HSP in diesem MW-Bereich sind bisher weder für *Neurospora* noch für andere Organismen beschrieben. Ob es sich hierbei um neue HSP handelt, werden weitere Versuche klären müssen. Von einem sehr großen HSP in Säugerzellen, einem 170 kD GRP, wird in einer neueren Arbeit berichtet (NOVER, 1991 und dort zitierte Literatur).

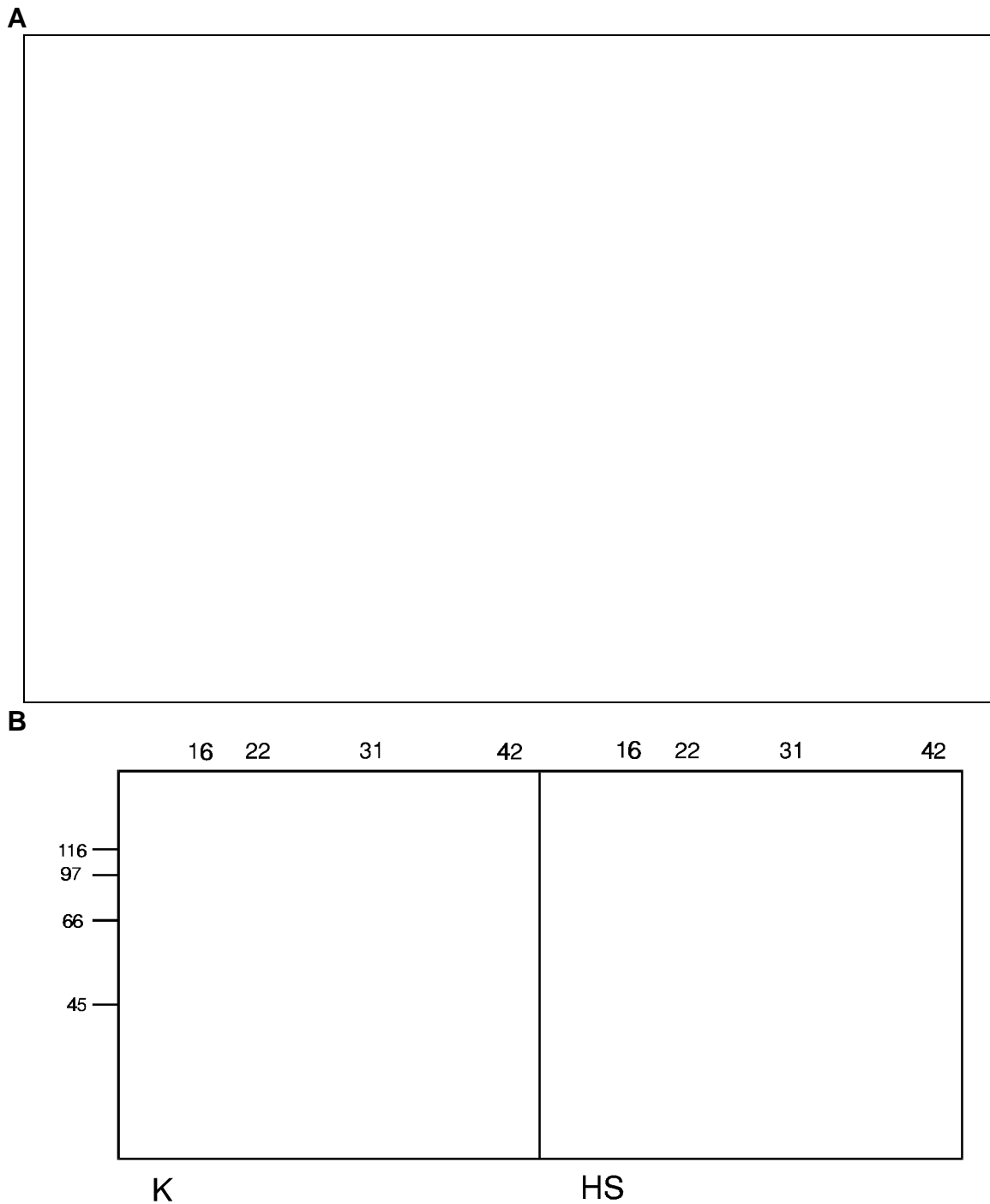


Abb. 3.5.:A: Chromatogramm der anionischen Austauschchromatographie. Die Fractogel EMD DEAE-650 Säule (2.6 x 11 cm) wurde mit 50 ml (80 mg Gesamtprotein) S-100-Roh-K bzw. -HS beladen. Nach Durchlauf der Proteine, die keine Wechselwirkung mit der Säule eingehen, wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (0.02-0.5 M NaCl) eluiert. B: Gelelektrophoretische Auftrennung jeder dritten Elutionsfraktion der Gradientenläufe K und HS aus A (10 % SDS-PAGE, Coomassie brilliant blue-Färbung, aufgetragen wurden Aliquots jeder dritten Elutionsfraktion ohne Proteinbestimmung). In den HS-Fractionen 12-20 (0.09-0.14 M NaCl, Maximum in Fraktion 16) kann man HSP 69 erkennen. HSP 99 und 81 sind in den Fraktionen 20 - 33 (0.14 - 0.3 M NaCl, Maximum in Fraktion 25) vertreten.

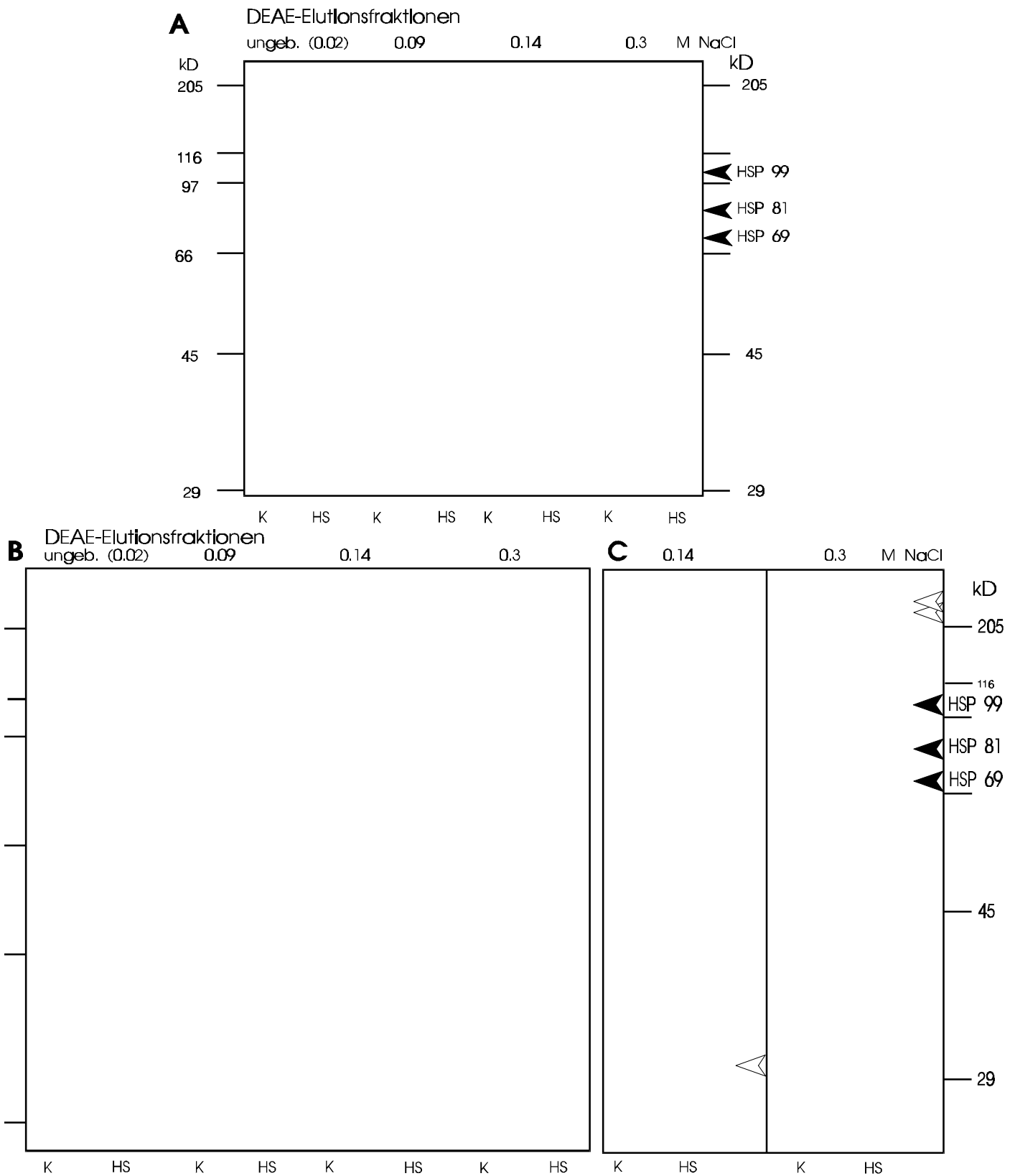


Abb. 3.6.: Gelelektrophoretische Analyse der Elutionsfraktionen des NaCl-Stufengradienten der DEAE-Minisäulen. A: Coomassie brilliant blue gefärbtes 10 %iges Gel, 10 µg Protein pro Spur. B: Fluorogramm des Gel aus A. C: Fluorogramm, K und HS 0.14 und 0.3 M NaCl DEAE Fraktionen, 100000 cpm pro Spur.

In späteren Versuchen wurde die NaCl-Konzentration aller Elutionsfraktionen um 0.02 M NaCl erniedrigt. Dadurch wurde wahrscheinlich der Anteil der HSP in der ersten und der HSP 99 und 81 Anteil der zweiten Fraktion erniedrigt. In der zweiten Elutionsfraktion (0.12 M NaCl) wäre somit der Hauptteil der HSP 69 und in der dritten Elutionsfraktion (0.28 M NaCl) der Hauptteil an HSP 99 und 81.

Geht man davon aus, daß unter HS-Bedingungen größtenteils nur HSP neusynthetisiert werden, läßt sich die Quantität der Radioaktivität in den markierten Proben nahezu mit der HSP-Quantität gleichsetzen. Um die Menge an HSP bzw. markierten Proteinen im Vergleich zum Gesamtprotein der einzelnen Fraktionen genauer abschätzen zu können, wurde eine cpm- und Proteinbestimmung der Elutionsfraktionen des Stufengradienten durchgeführt (Tab. 3.2. A) und deren Verhältnis zueinander betrachtet (Abb. 3.7.).

Auftrag	ungeb.		0.09 M NaCl		0.14 M NaCl		0.3 M NaCl			
cpm										
	gesamt	%	gesamt	%	gesamt	%	gesamt	%	gesamt	%
K	31780000	100	4645200	14,62	10661400	33,55	6535000	20,56	3895000	12,26
HS	22532500	100	1967400	8,73	5968200	26,49	7425000	32,95	2480000	11,01
Protein										
	µg ges.	%	µg ges.	%	µg ges.	%	µg ges.	%	µg ges.	%
K	5875	100	807,5	13,74	1620	27,57	650	11,06	1205	20,51
HS	5000	100	682,5	13,65	1410	28,20	535	10,70	1160	23,20

Tab. 3.2.: Verteilung der Radioaktivität (cpm) und Gesamtproteinmenge (Protein) auf die Elutionsfraktionen des Stufengradienten der DEAE-Minisäulen (in Prozent bezogen auf aufgetragenes Material).

Zur besseren Übersicht wurden die tabellarisch dargestellten Meßwerte (bzw. deren Prozentangaben) in ein Balkendiagramm umgesetzt (Abb. 3.7.). Das Balkendiagramm zeigt für die K- und HS-DEAE-Elutionsfraktionen die prozentuale Verteilung der Radioaktivität (cpm), des Gesamtproteingehaltes (Protein) und deren Verhältnis zueinander (Ratio cpm % / Gesamtprotein % , aufgetragenes Material = 100 %).

Abb. 3.7. zeigt eine etwas schlechtere Bindung der markierten K-Proteine an die DEAE-Matrix (85 %) im Vergleich zu den markierten HS-Proteinen (91 %). Die markierten K-Proteine lassen sich mit geringeren NaCl-Konzentrationen eluieren. Mit 0.09 M NaCl werden bereits 34 % der markierten K-Proteine, aber erst 26 % der markierten HS-Proteine ausgewaschen. Desweiteren bestätigen die Meßwerte die aus der gelelektrophoretischen Analyse abgeleitete Verteilung der HSP. Die 0.14 M NaCl Fraktion (HS) hat das höchste cpm zu Gesamtprotein-Verhältnis, was einer starken HSP-Anreicherung entspricht. In den

0.09 M NaCl Fraktionen (K und HS) ist zwar auch ein erheblicher Teil an Radioaktivität vorhanden, aber auch der Gesamtproteinanteil ist groß, was ein kleines Verhältnis zur Folge hat und also keine HSP-Anreicherung darstellt. Außerdem zeigte die gelelektrophoretische Analyse, daß die markierten Proteine dieser Fraktion keine HSP sind. Der Anteil markierter Proteine in der 0.3 M NaCl Fraktion ist nur noch sehr gering, allerdings sind die markierten Proteine zum größten Teil HSP 99 und 81. Die 0.3 M NaCl Fraktion enthält relativ viel Gesamtprotein. Dieses sind fast ausschließlich Proteine unter 50 kD (Abb. 3.6. A).

Aus der 0.14 M NaCl HS-Fraktion wurde das in dieser Fraktion angereicherte HSP bzw. HSC 69 isoliert (Kap. 3.4.). Für ein weiteres HSP, das HSP 81 aus der 0.3 M NaCl HS-Fraktion, wurde ebenfalls versucht eine Aufreinigungsmethode zu entwickeln (Kap. 3.5.).

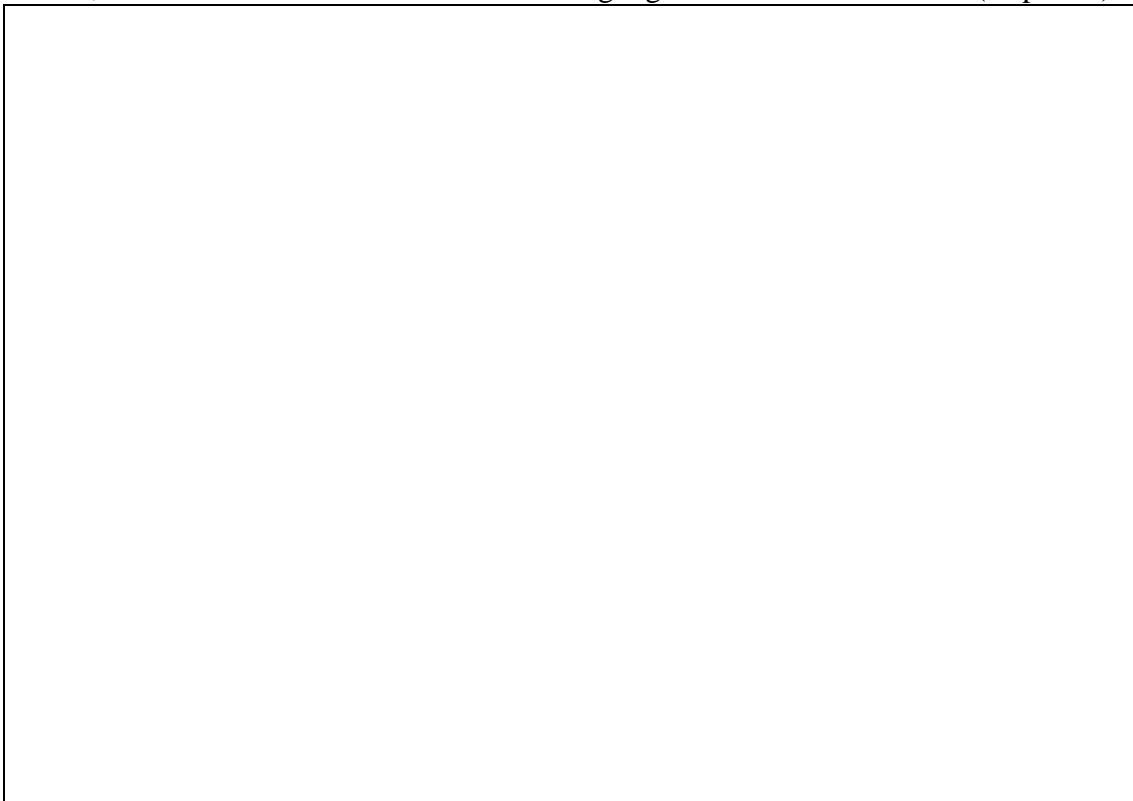


Abb. 3.7.: Das Balkendiagramm zeigt, für die DEAE-Elutionsfraktionen, die prozentuale Verteilung der Radioaktivität (cpm), des Gesamtproteingehaltes (Protein) und deren Verhältnis zueinander (Ratio cpm/Protein).

3.4. Isolierung von HSC 69 aus *Neurospora crassa*

3.4.1. Gelfiltration der HSC 69 enthaltenden DEAE-Fractionen

In gemeinsamen Versuchen mit H. CIESLA wurde versucht, die HSP 69 enthaltenden DEAE-Fractionen (in diesen Versuchen wurde die 0.1 M NaCl-Fraktion eines Stufengradienten, die noch stark mit unerwünschten Proteinen verunreinigt war) durch die Gelfiltration weiter zu reinigen, um die Säulen zur ATP-Affinitätschromatographie mit möglichst wenig anderen, eventuell auch ATP-affinen Proteinen, zu belasten. Die gelelektrophoretisch analysierten Fractionen zeigten aber auch hier eine nur schlechte Fractionierung der Proteine nach ihrer Größe. Im Vergleich zur Gelfiltration mit den Rohextrakten (Kap. 3.3.2.) ist die Verschleppung in andere, dem MW der Proteine nicht entsprechende, Fractionen allerdings schon geringer, der Reinigungseffekt größer geworden (CIESLA, 1991).

Spätere Versuche, in denen die HSP 69 enthaltenden DEAE-Fractionen aus 3.3.3. direkt auf die Säulen zur ATP-Affinitätschromatographie aufgetragen wurden, zeigten eine gute Reinigung des HSP 69 und machten eine weitere Vorreinigung mit der Gelfiltration überflüssig.

3.4.2. Affinitätschromatographie mit der ATP-Agarose

Bei den anfänglichen Isolierungsversuchen (in Zusammenarbeit mit H. CIESLA) mit der ATP-Agarose wurden $36000 \times g^{-1}$ Überstände zur HSP-Isolierung verwendet. Diese Fractionen könnten noch geringfügig mit Membranfragmenten verunreinigt gewesen sein. In den ATP-Eluaten der $36000 \times g^{-1}$ DEAE 0.14 bzw. DEAE 0.3 K und HS Fractionen befand sich außer dem HSC 70 hauptsächlich ein weiteres Protein (Abb. 3.8.). Bei diesem etwa 120 kD großen Protein könnte es sich um eine Plasmamembran ATPase handeln. Eine solche, annähernd gleich große, ATPase in *Neurospora crassa* wird von BOWMAN et al (1981) beschrieben. Zwei in geringerer Menge, in den 0.14 M NaCl DEAE ATP-Elutions-Fractionen, vorhandene etwa 34 und 90 kD große Proteine könnten ebenfalls HSP sein. Für HSP 81 aus Säugerzellen ist eine ATP-Bindungsstelle beschrieben (CSERMELY und KAHN, 1991). Von den kleinen HSP ist eine starke Phosphorylierung bekannt, so daß auch diese eine Affinität zur ATP-Agarose besitzen könnten. In den späteren Isolierungen mit $100000 \times g^{-1}$ -Überständen waren die etwa 120, 90 und 34 kD Proteine nicht mehr oder nur noch in Spuren vorhanden (Abb. 3.10. A und B).

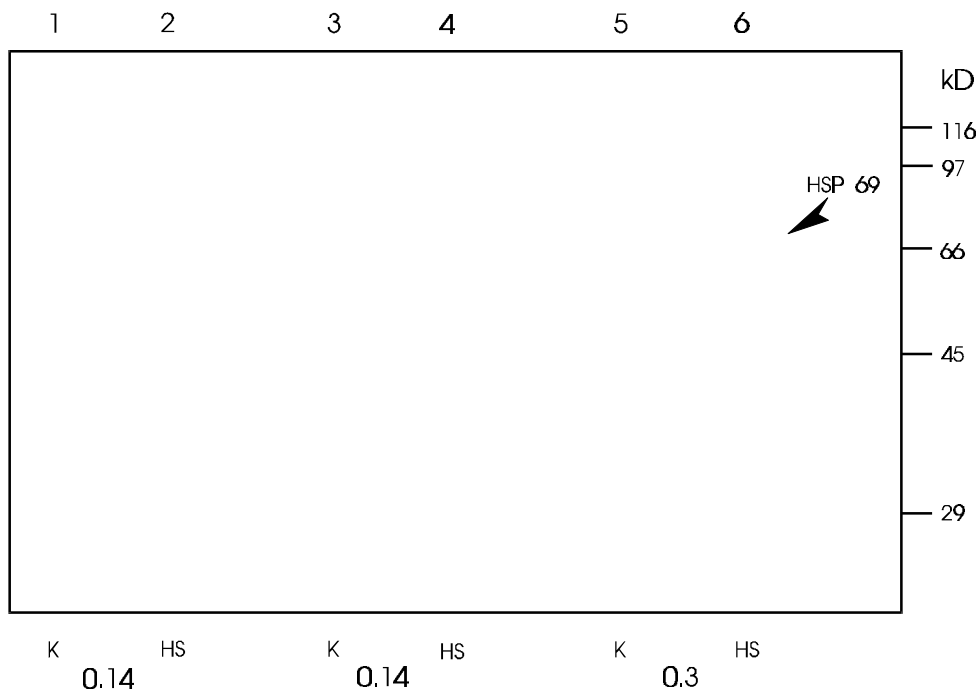


Abb. 3.8.: Darstellung der gelelektrophoretischen Trennung von ATP-Eluaten der $36000 \times g^{-1}$ DEAE 0.14 bzw. DEAE 0.3 K und HS Fraktionen (7.5 - 15 % SDS-PAGE, Coomassie brilliant blue Färbung).

Bei einem weiteren Isolierungsversuch mit den $36000 \times g^{-1}$ -Überständen (ohne einen NaCl-Waschschritt nach dem Probenauftrag) wurden außer HSP 69 und den 34, 90 und 120 kD großen Proteinen noch weitere Proteine mitisoliert. Diese binden unspezifisch an die Agarosematrix oder besitzen auch eine gewisse Affinität zum ATP-Liganden der Agarosematrix (Abb. 3.9.). Interessant sind hier einige Proteine, die nur oder verstärkt in den HS-Fractionen auftreten. In dem ATP-Eluat der 0.3-DEAE-HS-Fraktion sind diese Proteine etwa 190, 56, und 50 kD groß. Etwas schwächer sind diese Proteine auch in der 0.14-DEAE-HS-Fraktion zu erkennen. Bei diesen Proteinen könnte es sich um HSP handeln. HSP mit MW von etwa 56 und 50 sind schon für *Neurospora* beschrieben (KAPOOR und LEWIS, 1987, siehe Kap. 1.3.). Ein etwa 190 kD HSP ist bisher weder bei *Neurospora* noch bei anderen Organismen beschrieben. In neueren Arbeiten wird allerdings von einem 170 kD GRP in Säugerzellen berichtet (NOVER, 1991). In den gelelektrophoretisch analysierten Rohextrakten sind diese vermeintlichen HSP eventuell schlecht zu erkennen, da sie nur in relativ geringen Mengen vorhanden sind oder vielleicht von anderen nicht HSP Proteinen überdeckt werden. In den Fluorogrammen der, mit NaCl-Waschschritt, ATP-Affinitäts-gereinigten gelelektrophoretischen Analysen der $100000 \times g^{-1}$ -Überstände von Rohextrakten (Abb. 3.2. A) und den DEAE-0.14 und -0.3 M NaCl - Fraktionen (Abb. 3.10. B) sind einige dieser Proteine ebenfalls noch in Spuren als

Verunreinigungen enthalten (auf den Fotos der Filme nicht oder nur sehr schlecht zu erkennen).

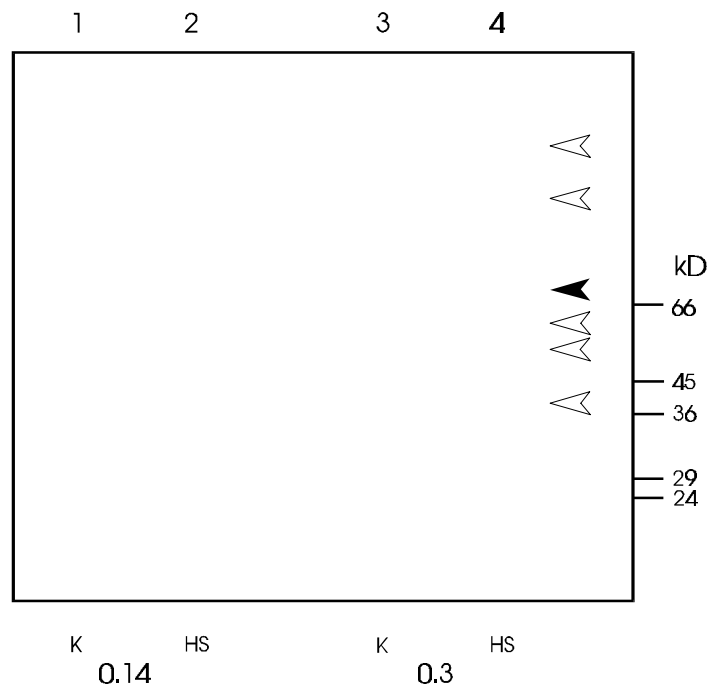


Abb. 3.9.: Darstellung der gelelektrophoretischen Trennung von ATP-Eluaten der $36000 \times g^{-1}$ DEAE 0.14 und 0.3 K und HS-Fractionen ohne NaCl-Waschschrift nach dem Probenauftrag. DEAE 0.14 (Spur 1, 2) und DEAE 0.3 (Spur 3, 4) K und HS (Coomassie Brilliant blue gefärbt, 7.5-15% SDS-PAGE). Interessant sind hier einige Proteine, welche nur in den HS-Fractionen auftreten (Besprechung im Text).

Spätere Versuche mit der ATP-Agarose (Durchführung wie in Kap. 2.7.4. beschrieben) führten dann zur relativ sauberen Isolierung des HSC 70 (Abb. 3.10. A). Durch einen Reinigungsversuch mit radioaktiv markiertem Material wurde die Reinheit der ATP-Eluate der $100000 \times g^{-1}$ DEAE 0.14 bzw. DEAE 0.3 K und HS Fractionen bestätigt. Andere, hier unerwünschte Proteine, wie die etwa 120 und 90 kD großen Proteine, sind im Gegensatz zum HSC 70 nur in Spuren zu erkennen (Abb. 3.10. A).

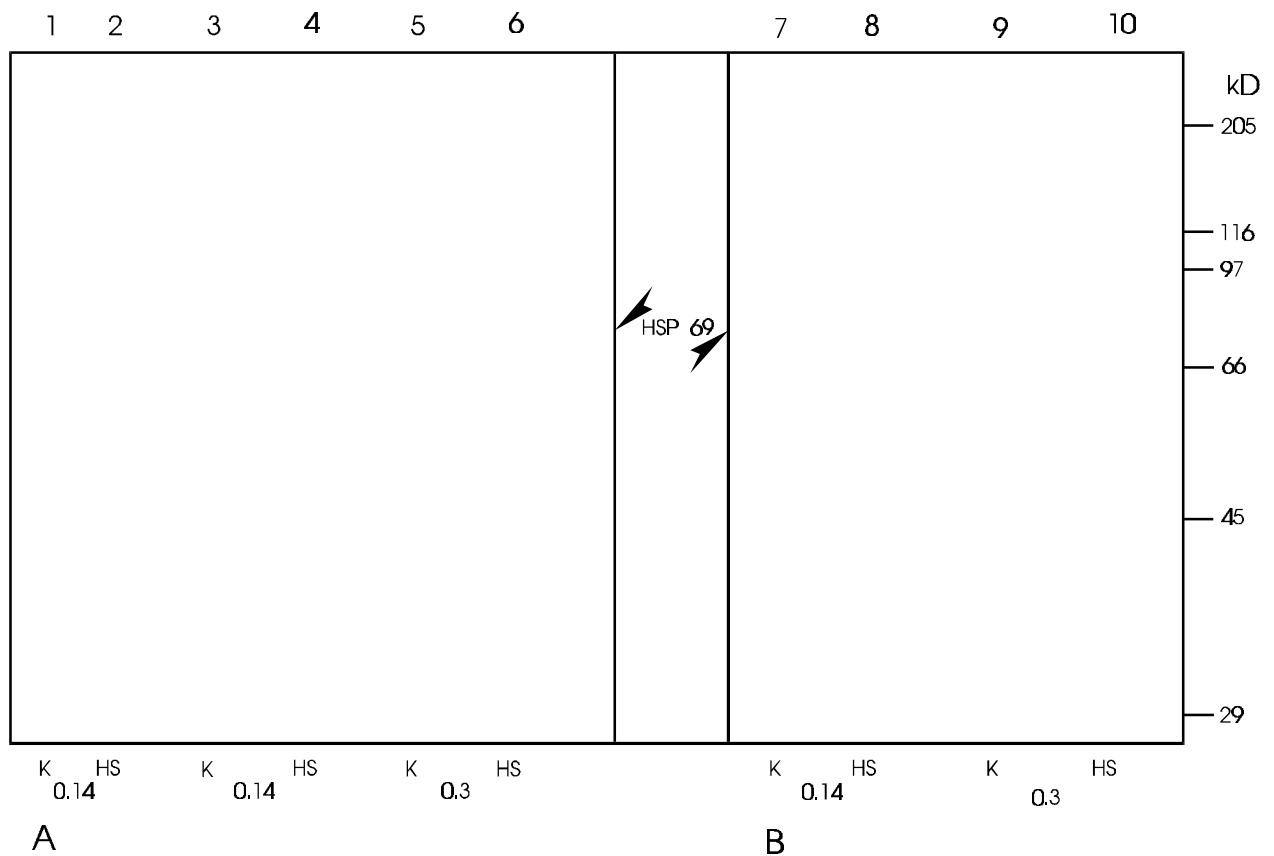


Abb. 3.10.: Darstellung der gelelektrophoretischen Trennung von ATP-Eluaten der $100000 \times g^{-1}$ DEAE 0.14 und 0.3 K und HS-Fractionen. A: Spur 1: K DEAE 0.14, 10 μg Protein, 2: HS DEAE 0.14, 10 μg Protein, 3: K DEAE 0.14, 30 μg Protein, 4: HS DEAE 0.3, 30 μg Protein, 5: K DEAE 0.3, 10 μg Protein, 6: HS DEAE 0.3, 10 μg Protein; alle 10 % SDS-PAGE, Coomassie Färbung. B: Spur 7: K DEAE 0.14, 30000 cpm, 8: HS DEAE 0.14, 30000 cpm, 9: K DEAE 0.3., 20000 cpm, 10: HS DEAE 0.3, 20000 cpm; Fluorogramme der Spuren 1,2 und 4,5 (60 h exponiert).

Die Bestimmung der cpm- und Gesamtproteinwerte (Tab. 3.3. und Abb. 3.11.) zeigt höhere cpm- und Gesamtproteinwerte in den HS-Fractionen. Ein Vergleich der cpm zu Gesamtproteinverhältnisse (cpm % / Protein %) ist in Abb. 3.11. dargestellt, ein hohes Verhältnis deutet auf einen hohen HSP-Anteil hin. Das höchste cpm zu Gesamtproteinverhältnis liegt im HS-DEAE-0.14-ATP-Eluat vor. In der auf die ATP-Agarose aufgetragenen HS-DEAE-0.14-Fraktion befanden sich etwa 26 % der Gesamtradioaktivität und etwa 9 % der Gesamtproteinmenge vom Ausgangsmaterial. 1.7 % der Radioaktivität und 20 % Protein dieser Fraktion banden an die ATP-Agarose, bezogen auf das Ausgangsmaterial sind dieses etwa 0.44 % cpm und 1.7 % Protein. Unter Berücksichtigung einer eventueller Überbeladung der ATP-Agarose, bei der nicht alles potentiell bindende Protein tatsächlich gebunden werden konnte, und bei geringen Mengen an nicht-HSC 69 im Eluat, kann man sagen, daß diese etwa 1.7 % Protein (bzw. 0.44 % cpm) der Anteil von HSC 69 am Gesamtprotein (bzw. an der Gesamtradioaktivität) im

Cytoplasma ist. Vorausgesetzt, die ATP-Agarose aus den Versuchen in 3.2.1. waren ebenfalls nicht überladen, beträgt der Anteil von ATP-bindenden Proteinen an Gesamtprotein des Cytoplasmas etwa 3.5 % (Tab. 3.1. und Abb. 3.3.). Etwa 48 % davon wären dann HSC 69.

	Auftrag		ATP	
	cpm			
	ges.	%	ges.	%
0.14 K	5228000	16,45	52320	0,16
0.14 HS	5940000	26,36	100080	0,44
0.3 K	3116000	9,8	27720	0,09
0.3 HS	1984000	8,8	29640	0,13
	Protein			
	µg ges.	%	µg ges.	%
0.14 K	520	8,8	76,8	1,3
0.14 HS	428	8,56	86,52	1,73
0.3 K	964	16,4	33,36	0,57
0.3 HS	928	18,56	69,6	1,4

Tab. 3.3.: Bestimmung der cpm- und Gesamtproteinwerte der K und HS DEAE 0.14 und 0.3 M NaCl Fraktion-ATP-Eluate der ATP-Affinitätschromatographie.

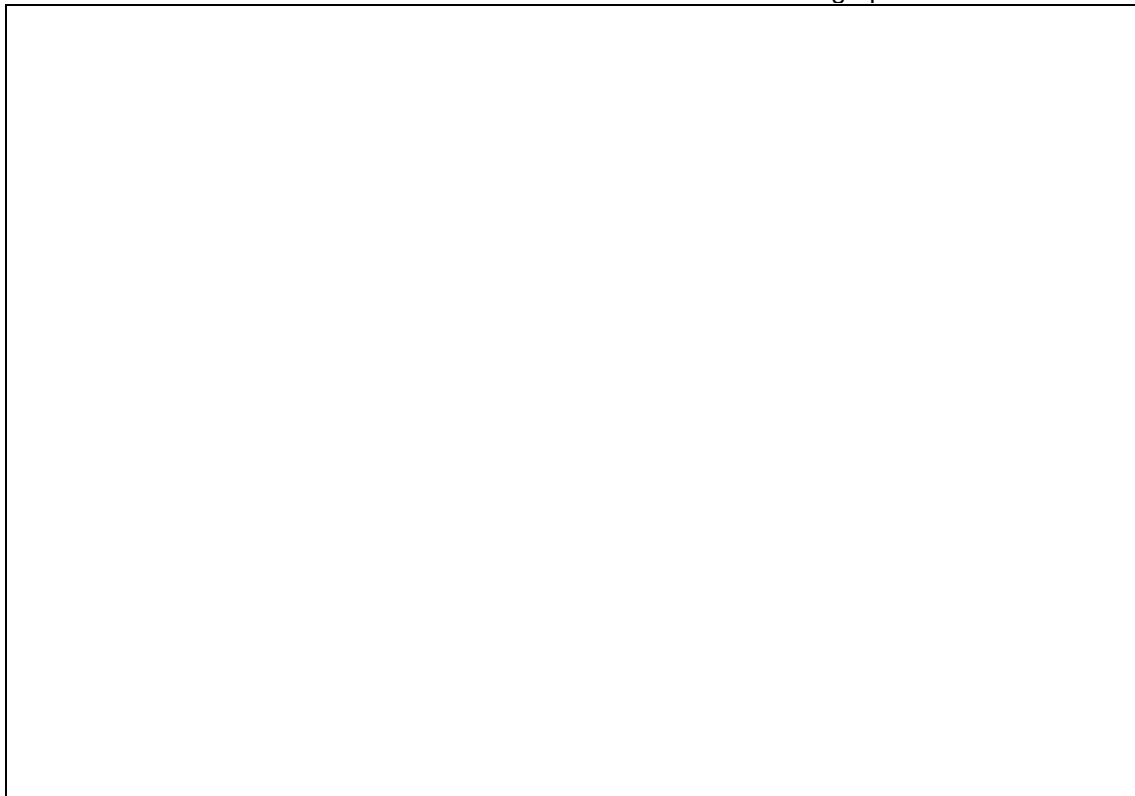


Abb. 3.11.: Darstellung der cpm- und Gesamtproteinwerte, und deren Verhältnis zueinander, der ATP-Eluate von K und HS DEAE 0.14 und 0.3 - Fraktionen.

Die zweidimensionale Analyse der ATP-Eluate der $100000 \times g^{-1}$ -DEAE-0.14-K und -HS-Fraktionen zeigt eine Auftrennung des isolierten HSP 69 in zwei Komponenten (Abb. 3.12. A und B). Bei dem isolierten HSP 69 handelt es sich um zwei konstitutiv vorhandene Mitglieder der HSP 70-Familie. Durch die HS-Behandlung wird eines verstärkt synthetisiert. Aufgrund dieser Zusammensetzung des isolierten Proteins kann man eher von einem HSC 69, als von einem HSP 69 sprechen. Die induzierten HSP 69 Komponenten (Abb. 3.2. C) müssen in einer anderen DEAE-Elutionsfraktion vorhanden sein. Bei *Neurospora* wurden also unter nativen Bedingungen die konstitutiven von den induzierten HSP 69 Komponenten getrennt. Für Säuger ist unter nativen Bedingungen eine nur schlechte Trennung der konstitutiven von den induzierten Komponenten beschrieben (WELCH und FERAMISCO, 1985). Die HSC 69 Fraktion wurde zur Kaninchenimmunisierung eingesetzt.

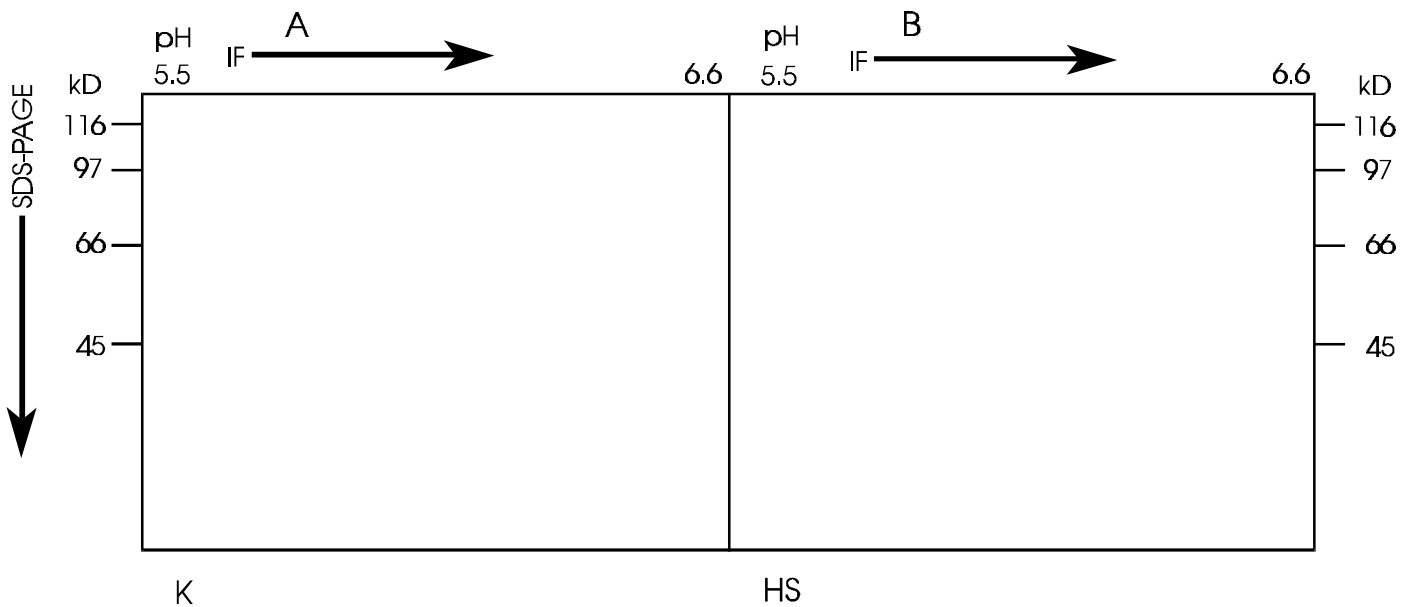


Abb. 3.12.: Darstellung des Fluorogramms der zweidimensionalen gelelektrophoretischen Trennung von ATP-Eluaten der radioaktiv markierten $100000 \times g^{-1}$ DEAE 0.14-K und HS-Fraktionen. A: DEAE 0.14 -K-Fraktion, $5.7 \mu g$ Protein, 7000 cpm (9 Tage exponiert), B: DEAE 0.14-HS-Fraktion, $20 \mu g$ Protein, 20000 cpm (40 h exponiert).

3.5. Aufreinigung des HSP 81 aus *Neurospora crassa*

3.5.1. Affinitätschromatographie mit der ATP-Agarose

Eine weitere Aufreinigung des HSP 81 aus einer HSP 81 enthaltenden DEAE 0.28 M NaCl -Fraktion eines Stufengradienten (über ATP-Affinitätschromatographie) ist nicht gelungen. Reinigungsversuche mit der zur Isolierung von HSP 69 eingesetzten ATP-Agarose (A 2767, Fa. Sigma) und Mg^{2+} , sind in Kap. 3.4.2. (Abb. 3.8. und 3.9.) dargestellt. HSP 81 wurde nicht oder nur in Spuren an die ATP-Agarose gebunden. CSERMELY und KAHN (1991) zeigten die beste Bindung von HSP 90 aus Säugern an ATP-Agarose (Fa. Sigma, A 4793) in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen. Auch eine Chromatographie unter diesen Bedingungen zeigte keine bessere Bindung von HSP 81 an ATP-Agarose (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine eventuelle Bindung von HSP 90 in Gegenwart von Ca^{++} wurde nicht überprüft. Eine Bindung von Säuger HSP 90 an ATP-Agarose in Gegenwart von Ca^{++} wird ebenfalls von CSERMELY und KAHN (1991) berichtet.

Die fehlende Bindung von HSP 81 an ATP-Agarose ist eventuell auf die Präsenz von HSP 70 in den aufgetragenen Fraktionen zurückzuführen. Die Gegenwart des sehr stark ATP-affinen HSP 70 könnte die Bindung des eventuell nur schwach ATP-affinen HSP 81 verhindern, indem es die potentiellen Bindungsstellen viel schneller und effizienter besetzt, wie HSP 81 dies tut. Eine eventuelle Bindung von HSP 81 an ATP-Agarose in Abwesenheit des HSP 69 könnte man überprüfen, indem man die Fraktion der ungebundenen Proteine (enthält HSP 81, aber nur wenig HSP 69 welches ja an ATP-Agarose bindet) erneut auf die ATP-Agarose aufträgt. Eventuell muß der Vorgang zur vollständigen Entfernung von HSP 69 mehrere Male wiederholt werden. Versuche von ROYCHOWDHURY und KAPOOR, (1990) eine Bindung von P^{32} -ATP an gereinigtes HSP 81 aus *Neurospora* nachzuweisen, führten ebenfalls zu negativen Ergebnissen.

3.5.2. Hydroxylapatit-Chromatographie der HSP 81 enthaltenden DEAE-Fraktion

Die HSP 81 enthaltenden DEAE-Elutions-Fraktionen des NaCl-Gradientenlaufs aus Kap. 3.2.3. (Fraktionen 20 - 33, 0.14 - 0.23 M NaCl, 55 ml, 38 mg Gesamtprotein) wurden in einem zweiten Schritt mit der Hydroxylapatit-Chromatographie weiter gereinigt. Die Hydroxylapatit-Chromatographie ist ebenfalls eine Art Ionenaustausch-Chromatographie, wobei hier jedoch Anionen (binden an Ca^{++}) und Kationen (binden an PO_4^-) mit der Matrix wechselwirken können. Nach dem Durchlauf der Proteine, die keine Wechselwirkung mit der Säule eingehen, wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Kaliumphosphat Gradienten (0.01 - 0.3 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4) eluiert (Abb. 3.13. A) und die resultierenden Fraktionen gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 3.13. B). Die gelelektrophoretische Analyse zeigt die Elution des HSP 81 in den Fraktionen 25 - 50 (0.11 - 0.2 M Kaliumphosphat). Das Elutionsmaximum liegt bei Fraktion 41 (0.185 M Kaliumphosphat). Dieses Maximum ist auch im Chromatogramm zu erkennen (Pfeil in Abb. 3.13. A). Da HSP 81 schon mit relativ niedrigen Kaliumphosphat-Konzentrationen eluiert werden konnte, hätte ein etwas enger gefaßter linearer Gradient (z.B. 0.1 - 0.21 M NaCl) sicher eine bessere Fraktionierung geliefert.

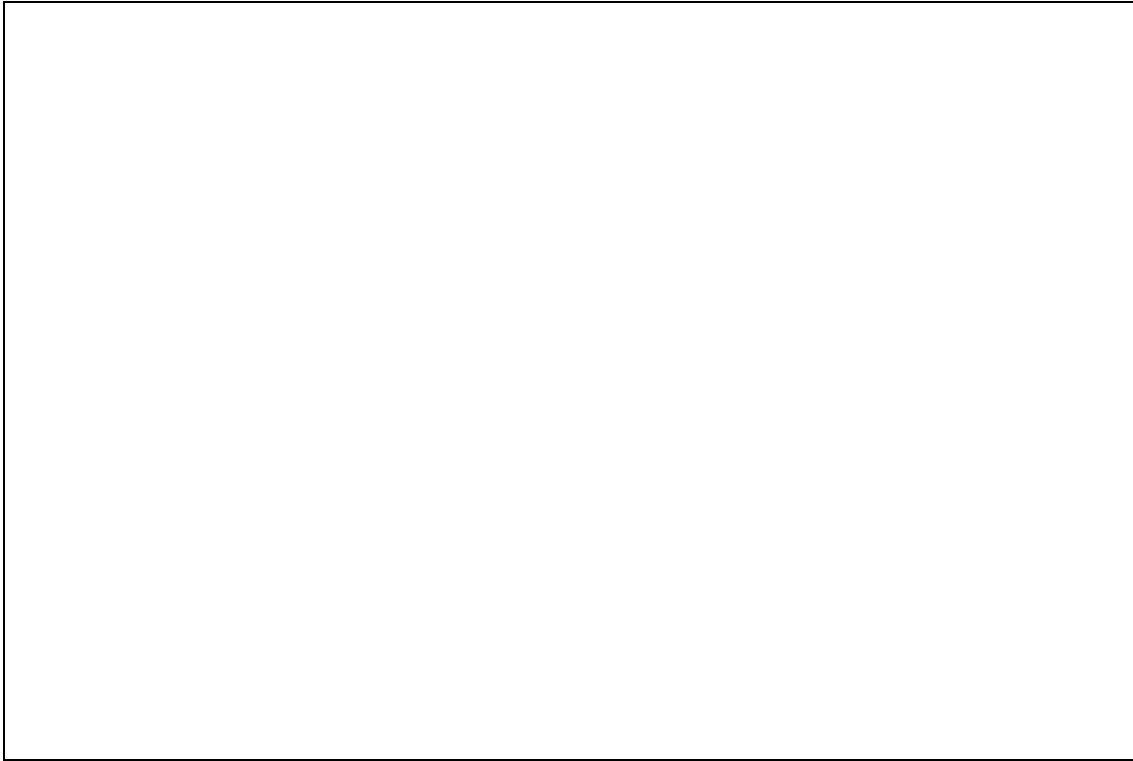
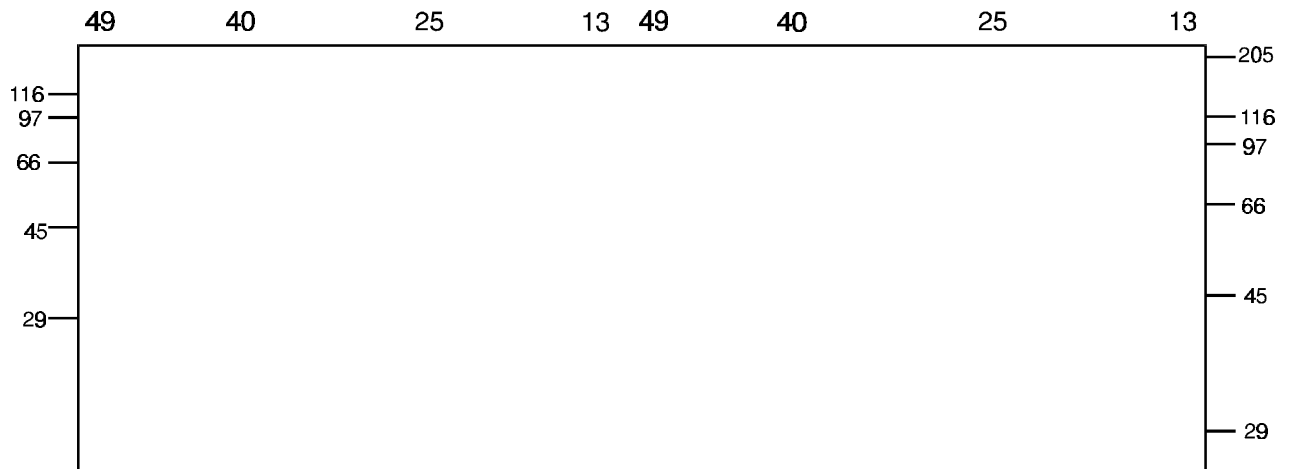
A**B****K****HS**

Abb. 3.13.: A: Chromatogramm der Hydroxylapatit-Chromatographie. Die Bio-Gel HT Säule (1.5 x 11 cm) wurde mit den vereinigten HSP 81 enthaltenden DEAE-Fraktionen 20 - 33 (0.14 - 0.23 M NaCl, 55 ml, 38 mg Gesamtprotein) aus Kap. 3.3.3. beladen. Nach dem Durchlauf der Proteine, die keine Wechselwirkung mit der Säule eingehen, wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Kaliumphosphat Gradienten (0.01 - 0.3 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4) eluiert. Der Pfeil deutet auf das HSP 81 Maximum. B: Gelelektrophoretische Analyse der Hydroxylapatit-Elutions-Fraktionen (K und HS). HSP 81 ist in den HS - Fraktionen 25 - 50 (0.11-0.19 M Kaliumphosphat, Maximum in Fraktion 41) zu erkennen (10 % SDS-PAGE, Coomassie brilliant blue gefärbt, aufgetragen wurden identische Aliquots jeder dritten Fraktion ohne Proteinbestimmung).

3.5.3. Gelfiltration der HSP 81 enthaltenden Hydroxylapatit-Fractionen

Zur Gelfiltration nach der Hydroxylapatit-Chromatographie bieten sich die Fraktionen 40 - 50 des linearen 0.01 - 0.3 M Kaliumphosphat-Gradienten an. In diesen Fraktionen ist HSP 81 schon am stärksten vertreten, und ein weiterer Reinigungseffekt wäre hier am größten. Aufgrund einer Verwechslung von Fraktionen habe ich die Gelfiltration mit den Fraktionen 20 - 40 durchgeführt (Abb. 3.14. A). Erneute Gelfiltration mit den besser geeigneten Fraktionen wurde bisher nicht durchgeführt. Vor dem Probenauftrag wurden die Hydroxylapatit-Fractionen vereinigt (HS: 24 ml, 14 mg Gesamtprotein, K: 28 ml, 8 mg Gesamtprotein), zur Einengung lyophilisiert, und in 2 ml Puffer C aufgenommen. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht (Abb. 3.14. B).

Das Chromatogramm der Gelfiltration (Abb. 3.14. A) zeigt nur einen einzigen Peak mit einem Maximum der optischen Dichte (bei 280 nm) nach einer Retentionszeit von 375 min, welche einem Molekulargewicht von etwa 100 kD entspricht. Der zweite kleinere Peak des Chromatogramms wird vermutlich durch niedermolekulare Peptide, bzw. durch freie Aminosäuren hervorgerufen. In der gelelektrophoretischen Analyse der Fraktionen (Abb. 3.14. B) ist mit beginnender Retardierung aufgetragener Moleküle ein im SDS-PAGE etwa 35 kD großes Protein zu erkennen. Unter nativen Trennbedingungen scheint dieses Protein sehr große Komplexe zu bilden. HSP 81 beginnt nach 300 min (Fraktion 4) zu Retardieren. Diese anfängliche Retentionszeit entspricht einem MW von etwa 200 kD, und könnte auf HSP 81-Dimere hindeuten. Eine etwa 200 kD oder größere native Form des HSP 81 ist sowohl für *Neurospora* (Kap. 1.3.) sowie eine Reihe anderer Organismen (Kap. 1.2.2.) beschrieben. Der Hauptanteil HSP 81 retardiert jedoch bei Retentionszeiten für Moleküle um 100 kD. Die Abtrennung von Molekülen unter 100 kD ist nicht gut gelungen. Bis auf Fraktion 4 sind in allen Fraktionen noch viele kleinere Moleküle vorhanden. Zum Teil könnte dieses an einer Komplexierung der kleineren Moleküle zu höhermolekularen Aggregaten liegen. Sicher aber läßt sich die Gelfiltration noch weiter optimieren (z.B. durch eine längere Trennstrecke, geringeres Auftragsvolumen, geringere Fließgeschwindigkeit) und könnte eine bessere Fraktionierung liefern.

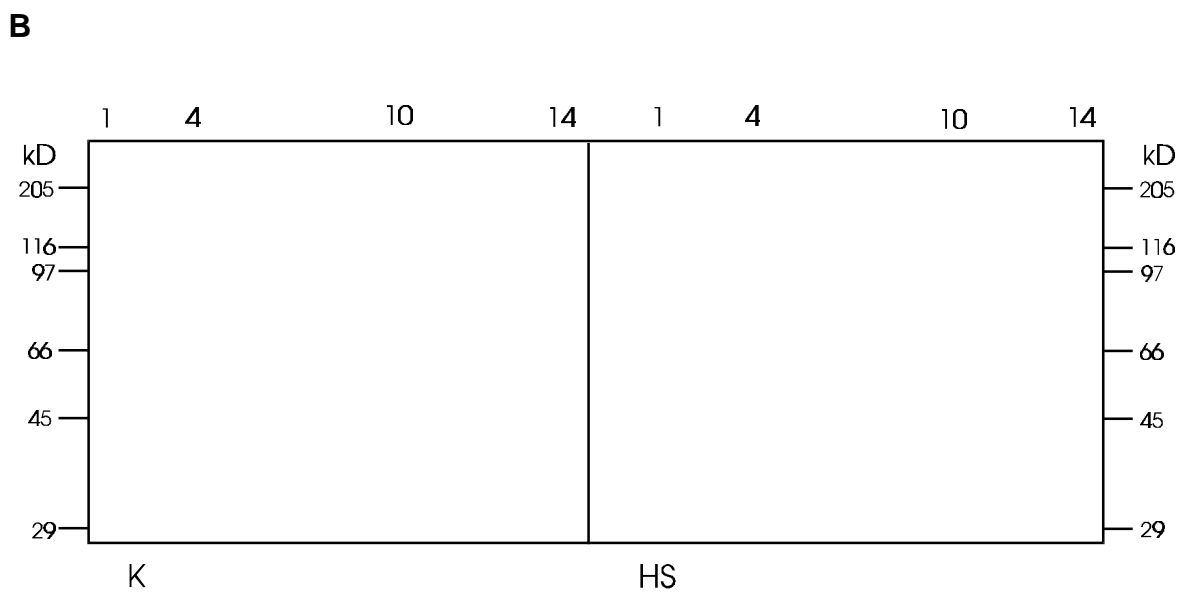
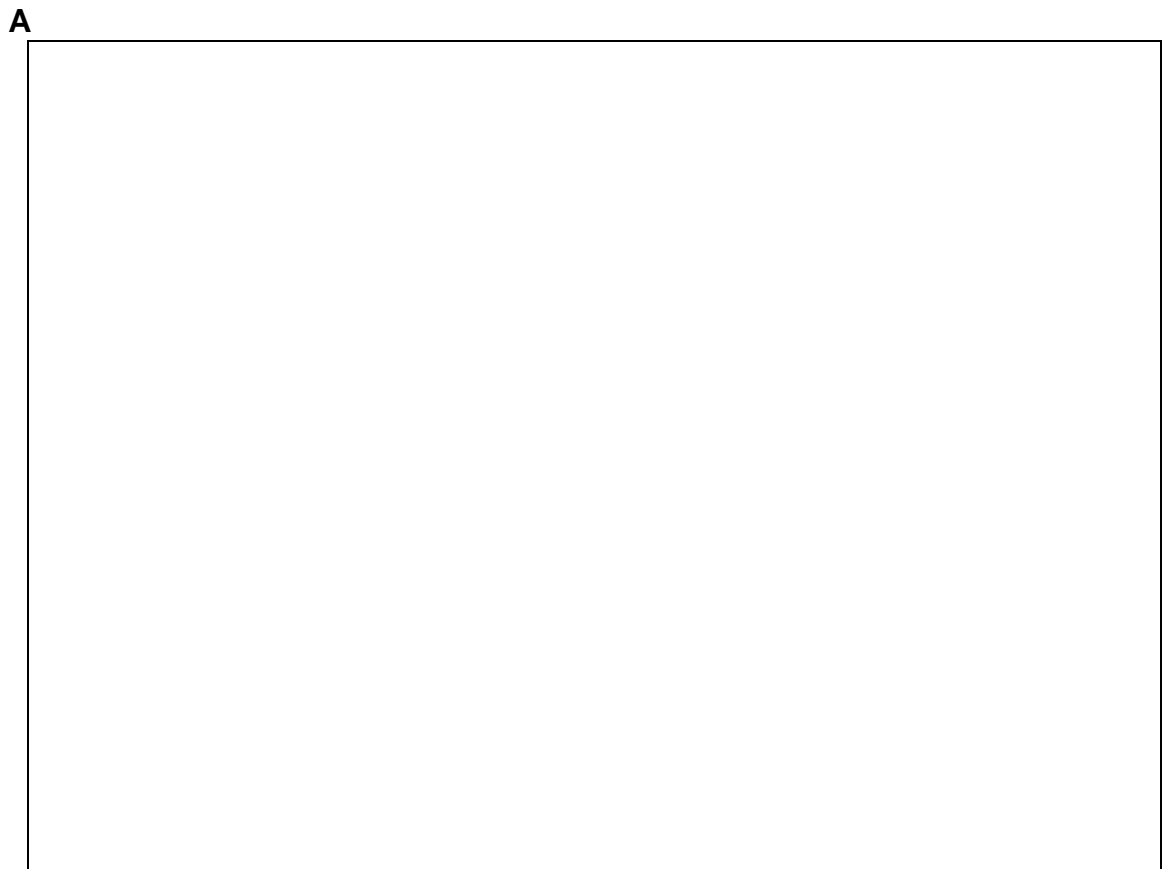


Abb. 3.14.: A: Chromatogramm der Gelfiltration der HSP 81 enthaltenden Fraktionen (20 - 40) der Hydroxylapatit - Chromatographie. Es wurden 14 Fraktionen (je 1.33 ml, 20 min) zwischen 240 und 520 min Retentionszeit gesammelt. B: Gelelektrophoretische Analyse der Gelfiltrationsfraktionen 1 - 14 (10 % SDS-PAGE, Coomassie brilliant blue gefärbt, aufgetragen wurden identische Aliquots jeder Fraktion ohne Proteinbestimmung).

3.6. Ca⁺⁺-Freisetzung aus isolierten Vakuolen von *Neurospora* durch isoliertes HSC 69 aus *Neurospora*

Eine Funktion der HSP 70 ist die Erleichterung des Transportes von Proteinen durch Membranen, indem diese durch HSP 70 in einer membrangängigen Konformation aufrechterhalten werden (Kap. 1.2.3.). Eine Translokation von Proteinen durch Membranen geht oft mit der Freisetzung niedermolekularer Substanzen einher. Wenn z.B. das Diphtherietoxin Membranen passiert, werden monovalente Kationen freigesetzt (ALDER et al, 1990 und dort zitierte Literatur). Außer einer Freisetzung von Substanzen aus Vesikeln, kann auch eine Leitfähigkeitsveränderung der Membran als Messgröße einer Insertion von Proteinen dienen. ALDER et al (1990) beschreiben eine durch Säuger HSP 70 induzierte Freisetzung von Calcein (MW 623) aus Vesikeln künstlicher Membranen und führen dieses auf eine Poreninduktion durch HSP 70 zurück

In einem ersten, gemeinsam mit G. GEBAUER durchgeführten, Vorversuch, wurde eine mögliche Freisetzung von Ca⁺⁺ aus isolierten Vakuolen von *Neurospora* durch isoliertes HSC 69 aus *Neurospora* untersucht (Abb. 3.16). Die Ca⁺⁺-Konzentration wurde durch eine Fluoreszenzänderung des Fura-2-Fluoreszenzfarbstoffs bestimmt, die durch die Ca⁺⁺-Bindung an Fura-2 hervorgerufen wird. Die Methoden zur Ca⁺⁺-Messung sowie zur Vakuolenisolierung sind in CORNELIUS et al (1989) beschrieben.

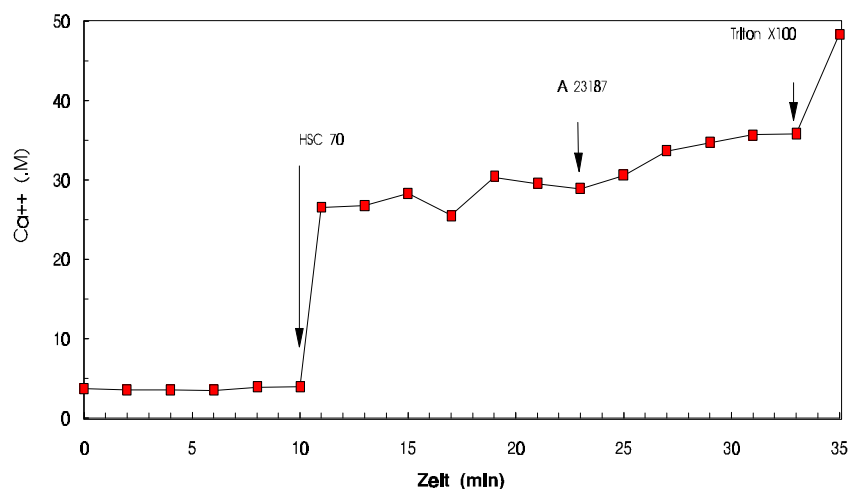


Abb. 3.15.: Ca⁺⁺ -Freisetzung aus isolierten Vakuolen von *Neurospora* durch isolierte HSC 69 von *Neurospora*. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Zugabe der genannten Substanzen.

Der extravakuoläre Ca^{++} -Gehalt in der Fura-2 enthaltenden Messküvette wurde über 10 min alle 2 min bestimmt, dann wurde HSC 69 (30 μg) zugegeben und eine Minute später erneut Ca^{++} gemessen. Es resultierte eine Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration um 23 μM , in den darauffolgenden 14 min stieg der Ca^{++} -Gehalt nur noch um etwa 4 μM weiter an. 40 % (9.2 μM) des drastischen Anstiegs der Ca^{++} -Konzentration sind wahrscheinlich auf einen direkten Ca^{++} -Eintrag zurückzuführen. Um diesen Betrag wurde der Ca^{++} -Gehalt in einer anderen Messküvette (Kontrolle ohne Vakuolen) nach Zugabe einer zweiten HSC 69 Probe erhöht. Durch sukzessive Zugabe von Bromo-A 23187 (einem Ca^{++} -Ionophor) bzw. Triton X100 (Detergens, Zerstört die Vakuolen), 25 bzw. 34 min nach Versuchsbeginn, konnte der extravakuoläre Ca^{++} -Gehalt noch weiter um 5 bzw. 13 μM gesteigert werden.

Weitere Versuche zur Verifizierung dieses Ergebnisses stehen noch aus. Beispielsweise wurde die Ca^{++} -Konzentration in der zugegebenen HSC 69 Probe nicht direkt in dieser, sondern in einer, zwar identisch gewonnenen, zweiten Probe bestimmt. Auch die Überprüfung, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf HSC 69 in der Probe zurückzuführen sind oder, ob eine in der Probe vorhandene Verunreinigung dafür verantwortlich ist, steht noch aus. Da HSC 69 auch aus Kontrollzellen isoliert werden kann, wäre der Vergleich der Ca^{++} -Freisetzung durch HSC 69 aus Kontrollzellen mit dem aus HS-behandelten Zellen interessant.

3.7. Charakterisierung der polyklonalen Antikörper gegen HSC 69

3.7.1. Aufbereitung der Seren (Gesamt-IgG-Reinigung)

Die gelelektrophoretische Analyse der anfänglichen, nach einer Methode von HURN und CHANTLER (1980), aus den Seren gewonnenen Gesamt-IgG-Fraktion zeigte noch gewisse Verunreinigungen mit nicht-IgG-Proteinen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die gelelektrophoretische Analyse der Fraktionen, die aus der Gesamt-IgG-Reinigung durch eine Protein G-Agarose Affinitätschromatographie resultierten, zeigt keine Restverunreinigung mit nicht-IgG-Proteinen (Abb. 3.16. A und B). Die Abb. 3.16. zeigt die aufgetragenen Rohseren (Spur 1), die nicht an die Protein G-Säulen bindende und Fremdprotein enthaltende, ausgewaschene Fraktion (Spur 2) sowie die Elutionsfraktion mit dem spezifisch an die Protein G-Agarose Säule bindenden IgG (Spur 3). In A und B sind identische Fraktionen aufgetragen. A zeigt die gelelektrophoretische Trennung unter nicht reduzierenden (ohne Mercaptoethanol), und B unter reduzierenden (mit Mercaptoethanol)

Bedingungen. IgG bestehen aus zwei schweren (je 50 kD) und zwei leichten (je 25 kD) Ketten. Die schweren Ketten sind über zwei Disulfidbrückenbindungen relativ fest miteinander verbunden. An jeder schweren Kette ist über eine weitere Disulfidbrückenbindung eine der leichten Ketten gebunden. Durch reduzierende Agenzien, wie Mercaptoethanol im Elektrophoreseprobenpuffer, werden die Disulfidbrücken - durch eine vollständig oder teilweise Reduktion der Schwefelreste zu Thiol-Gruppen - gespalten. Die IgG liegen dann nur noch in Form ihrer Untereinheiten, den schweren und leichten Ketten vor. Die schweren Ketten werden unter Umständen nicht immer vollständig voneinander getrennt. In Gegenwart von Mercaptoethanol (Abb. 3.16. B, Spur 3) wurden die gespaltenen IgG in zwei sichtbare Banden, etwa 100 kD (einige noch verbundene schwere Ketten) und etwa 50 kD (getrennte schwere Ketten) aufgetrennt. Eine dritte 25 kD Bande (getrennte leichte Ketten) ist mit der Lauffront aus dem Gel gelaufen. Die gelelektrophoretische Trennung ohne Mercaptoethanol zeigt die intakten IgG in einer 150 kD Bande (Abb. 3.16. A, Spur 3).

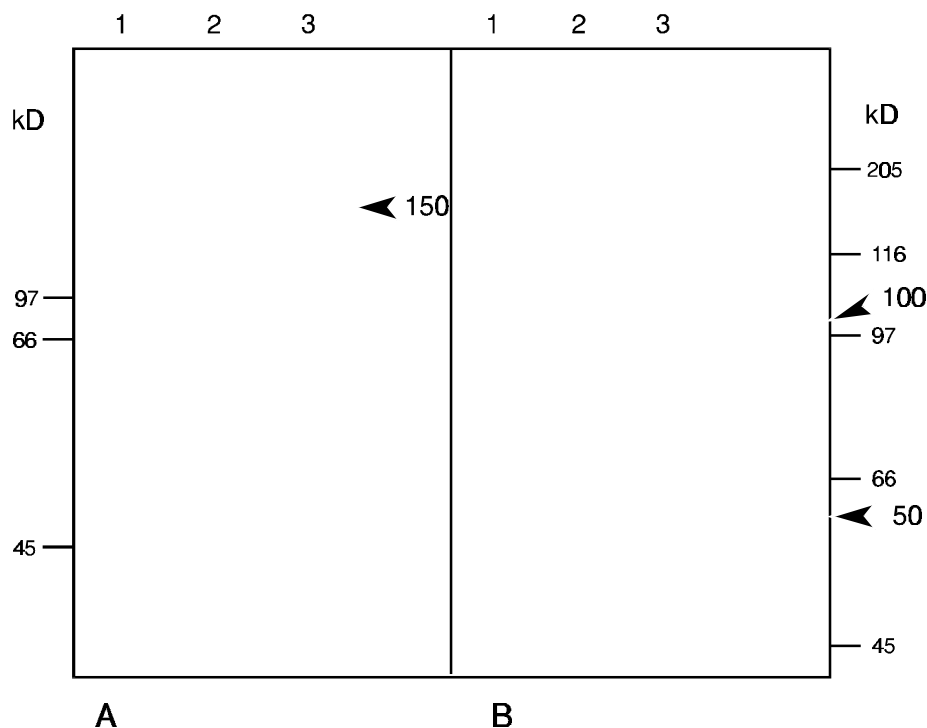


Abb. 3.16.: Gelelektrophoretische Überprüfung der IgG Aufreinigung mit der Protein G-Agarose Säule (Coomassie brilliant blue gefärbt). A: Spur 1: Präimmenserum unbehandelt, 2: nicht an Protein G bindende Fraktion, 3: Eluat der an Protein G-Agarose gebundenen Proteine (30 µg Protein pro Spur, Gellauf unter nicht reduzierenden Bedingungen, ohne Mercaptoethanol). B: wie A (Gellauf unter reduzierenden Bedingungen, mit Mercaptoethanol).

3.7.2. Immunologischer Antigennachweis auf Dot- und Western Blots

Durch den immunologischen Antigennachweis auf Dot- und Western Blots wurden spezifische Ak gegen HSC 69 in den Antiseren nachgewiesen. Zum Antigennachweis auf Dot-Blots wurden cytoplasmatische K und HS Rohfraktionen (S 100 Roh K und HS) sowie isoliertes HSC 69 in verschiedenen Konzentrationen auf Nitrocellulose aufgetragen. Zum Antigennachweis auf Western-Blots wurden S 100 Roh K und HS Fraktionen, 20 µg pro Spur, gelelektrophoretisch getrennt und durch Westernblotting auf Nitrocellulose übertragen.

In einer ersten Kontrolle wurde überprüft, ob unspezifische Bindungen zwischen dem sekundären Ak und Proteinen aus *Neurospora* auftreten. Dazu wurden die Dot- bzw. Western-Blots zunächst mit einer Gelatinelösung geblockt und anschließend 45 min mit sekundärem Ak (1:500 verdünnt.) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den anschließenden Waschschritten wurden die gebundenen sekundären Ak durch Peroxidasereaktion sichtbar gemacht (Abb. 3.17. und 3.18. K). In einer zweiten Kontrolle wurde überprüft, ob unspezifische Bindungen zwischen den "normal" vorhandenen Ak (Ak der Präimmunseren) mit *Neurospora* -Proteinen auftreten. Hierzu wurden die Blots nach dem Blockschritt, 1 h mit der Gesamt-IgG-Fraktion des Präimmunserums (1:10000 verdünnt.) inkubiert, anschließend 45 min mit dem sekundärem Ak (1:500 verdünnt.) dekoriert und die spezifisch gebundenen Ak durch Peroxidasereaktion sichtbar gemacht (Abb. 3.17. und 3.18. Prä). Zum Nachweis spezifischer Ak gegen HSC 69 wurden die Blots nach dem Blockschritt, 1 h mit der Gesamt-IgG-Fraktion des Antiserums (1:10000 verdünnt.) inkubiert, anschließend ebenfalls 45 min mit dem sekundärem Ak (1:500 verdünnt.) dekoriert und die spezifisch gebundenen Ak durch Peroxidasereaktion sichtbar gemacht (Abb. 3.17. und 3.18. Anti).

Der sekundäre Ak sowie die Ak des Präimmunserums zeigen eine recht starke unspezifische Bindung an einige *Neurospora* -Proteine. Diese unspezifischen Kreuzreaktionen sind sowohl in den Dot-Blots der K- und HS-Rohhomogenate (Abb. 3.17. K und Prä), als auch in den Western Blots der gelelektrophoretisch getrennten K- und HS-Rohhomogenate (Abb. 3.18. K und Prä) zu erkennen. Einige Ak des Präimmunserums zeigen sogar eine schwache Kreuzreaktion mit dem HSC 69 in den Western Blots der gelelektrophoretisch getrennten K- und HS-Rohhomogenate (Pfeil in Abb. 3.18. Prä). Dennoch kann man auch schon in diesen ersten Blots erkennen, daß spezifische Ak gegen HSC 69 gebildet wurden. In Abb. 3.18. Anti, dem Immunoblot mit der Gesamt-IgG-Fraktion des Antiserums, erkennt man die

durch die Peroxidasereaktion erfolgte Färbung der Cellulose im Bereich des HSC 69. Die Färbung ist hier deutlich stärker, als im Immunoblot mit der Gesamt-IgG-Fraktion des Präimmunerums (Abb. 3.18. Prä). Sie ist also nicht auf unspezifische Kreuzreaktionen zurückzuführen. Auf den Dot-Blots mit dem isolierten HSC 69, das nicht mit dem sekundärem Ak (Abb. 3.17. K) oder den Ak des Präimmunerums (Abb. 3.17. Prä) kreuzreagiert, erkennt man ebenfalls eine positive Peroxidasereaktion (Abb. 3.17. Anti). HSC 69 wurde hier mit einer unteren Nachweisgrenze von weniger als 12 ng nachgewiesen.

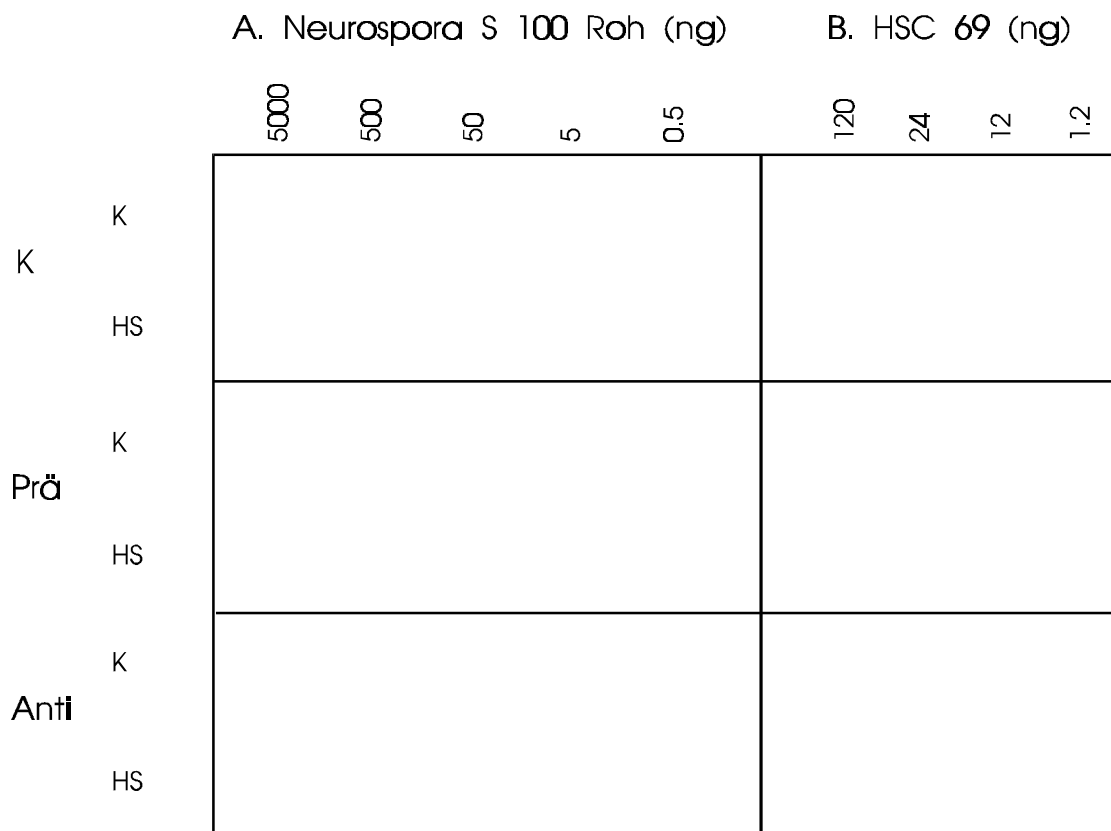


Abb. 3.17.: Immunologischer Antigennachweis auf Dot-Blots durch Peroxidasereaktion. In A wurden verschiedene Konzentrationen (wie in ng angegeben) K und HS Rohextrakt (S 100 K und HS) aufgetragen und in B wurden verschiedene Konzentrationen isoliertes HSC 69 aufgetragen. K: Kontrolle, kein primärer Ak, 45 min sekundärer Ak.; Prä: Kontrolle, 1 h primärer Ak (IgG-Fraktion des Präimmunerums), 45 min sekundärer Ak; Anti: 1 h primärer Ak (IgG-Fraktion des Antiserums), 45 min sekundärer Ak.

Die auftretenden, unerwünschten Kreuzreaktionen könnte man eventuell durch die Wahl eines effizienteren Blocking-Reagenz weiter unterdrücken (z.B. werden mit Magermilchpulver bessere Ergebnisse erzielt (HARLOW und LANE, 1988)). Eine noch bessere Art der Blockierung unspezifischer Ak wäre die Präzipitation dieser Ak mit einem *Neurospora* -K-Rohhomogenat, aus dem durch mehrmalige ATP-Agarose-

Affinitätschromatographie HSC 69 entfernt wurde. Würde HSC 69 in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, könnte es an eine unlösliche Matrix gekoppelt werden. Durch eine Affinitätschromatographie könnte man dann die spezifisch gegen HSC 69 gerichteten Ak abtrennen und hätte so unspezifisch kreuzreagierende Ak des Antiserums eliminiert.

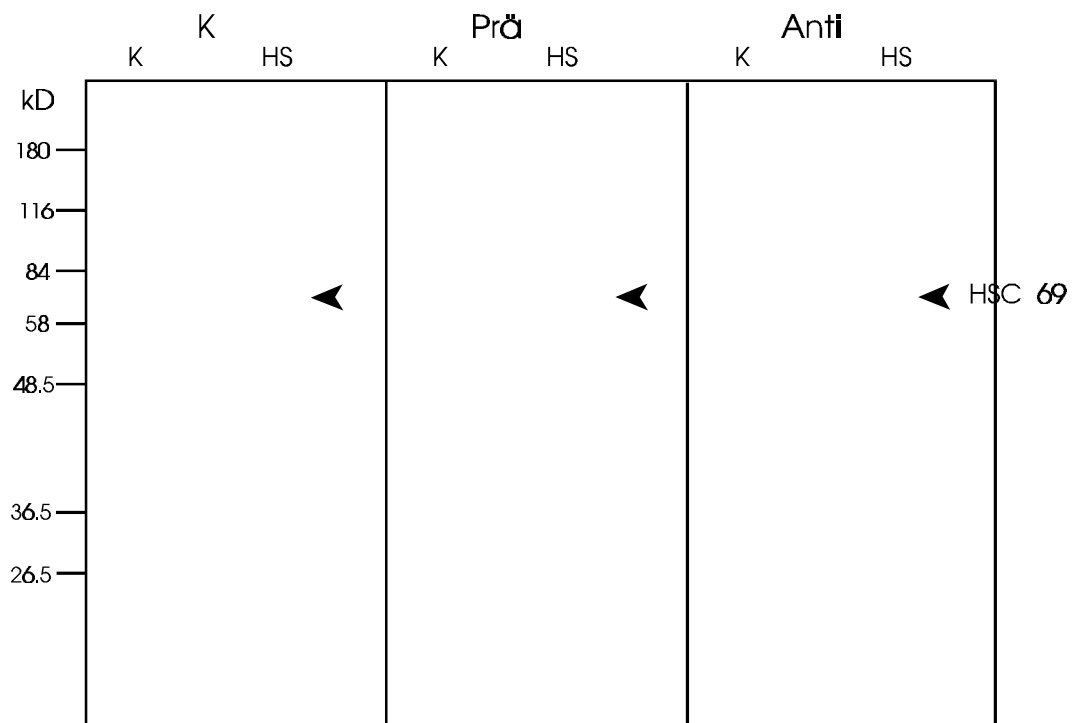


Abb. 3.18.: Immunologischer Antigennachweis auf Western Blots durch Peroxidasereaktion. K und HS Rohextrakte (S-100-Roh, 20 µg pro Spur) wurden gelelektrophoretisch getrennt, und im Western Blot auf Nitrocellulose übertragen. K: Kontrolle, kein primärer Ak, 45 min sekundärer Ak.; Prä: Kontrolle, 1 h primärer Ak (IgG-Fraktion des Präimmunserums), 45 min sekundärer Ak; Anti: 1 h primärer Ak (IgG-Fraktion des Antiserums), 45 min sekundärer Ak.

4.1. Erhöhung des ATP- 4. DISKUSSION bindenden Proteinanteils in hitzegeschockten Extrakten

Durch eine ATP-Agarose-Affinitätschromatographie mit den K und HS Rohextrakten (Kap. 3.2.1.) konnte eine 60 %ige Steigerung des ATP-bindenden Proteinanteils des Cytoplasmas der hitzegeschockten Rohextrakte gegenüber den Kontrolleextrakten gezeigt werden.

Die drastische Erhöhung des Anteils an ATP-affinen Proteinen in hitzegeschockten Zellextrakten ist sicherlich zum größten Teil auf die starke Synthesesteigerung des HSP 70 zurückzuführen. NOVER berichtet von einer Synthesesteigerung des HSP/C 70 um 20 % (NOVER 1992, persönliche Mitteilung). Die hohe ATP-Affinität des HSP/C 70 ist bekannt. Viele Funktionen des HSP/C 70 sind ATP-abhängig (Kap. 1.2.3.). Aber auch viele andere HSP nutzen zur Ausführung ihrer Funktion die durch Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie (Kap. 1.2) und könnten daher eine Bindungsaffinität zu ATP aufweisen. Der Transport, die Faltung und Zusammenlagerung von Proteinen, die durch die als "Chaperons" bezeichneten Proteine durchgeführt wird (Abb. 4.1.), sind alle ATP-verbrauchende Prozesse. Sie laufen in jeder Zelle auch unter "normalen" Bedingungen ab. NEUPERT et al (1990) postulieren den Verbrauch von etwa 100 ATP-Molekülen für den vollständigen Faltungsprozess eines Proteins. Unter HS-Bedingungen werden die "Chaperons" verstärkt synthetisiert. Folglich erhöht sich auch der Anteil der ATP-bindenden Proteine in den HS-behandelten Zellen.

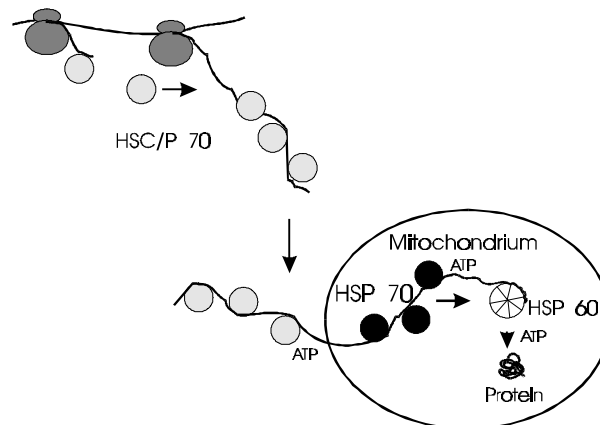


Abb. 4.1.: Darstellung eines hypothetischen Modells zur "Chaperon"-Kooperation bei der Bindung neusynthetisierter Proteine, deren Transport, Import in Mitochondrien und deren Faltung und Konstruktion zum fertig prozessierten Protein. Die Freigabe der an die Chaperons gebundenen Polypeptide ist ATP-abhängig. Es wird ATP zu ADP + Pi hydrolysiert (modifiziert nach NEUPERT et al 1990).

4.2. Konzentrierung der HSP

Aufgrund fehlender Detektionsmöglichkeiten (Enzymtest, Antikörper) gelang es bei einer bestimmten AS-Konzentration nicht, die zu isolierenden HSP aus unmarkierten Proteinlösungen gezielt auszufällen, um so schon im ersten Schritt eine Anreicherung zu erreichen. Das Coomassie brilliant blue gefärbte Gel der Auftrennung resuspendierter AS-Pellets (20, 40, 50, 70, 100 % AS-gesättigt, nicht abgebildet) zeigte in allen Fraktionen ein nahezu identisches Proteinbandenmuster (siehe CIESLA, 1991). JINN et al (1989) beschreiben eine starke Anreicherung der HSP in der 70 - 100 % AS-gesättigten Fraktion bei Sojabohnenextrakten. Erste Vorversuche mit einer S^{35} -Methionin-markierten Proteinlösung zeigten bei *Neurospora* ebenfalls eine Anreicherung der HSP in der 70 - 100 % AS-gesättigten Fraktion.

Auch mit der PEG-Fällung wurde keine Anreicherung der HSP in einer bestimmten Fraktion (10, 20, 30, 40, 50 % PEG w/v) erreicht. Die hohe PEG-Konzentration hatte den Nachteil einer sehr hohen Viskosität, so daß der Niederschlag relativ lange bei hohen Umdrehungen pelletiert werden mußte. Eine PEG-Fällung anstelle der AS-Fällung hätte eine Dialyse vor dem Anionenaustauscher ersparen können, da PEG ungeladen ist und im Gegensatz zum AS eine Anionenaustausch-Chromatographie nicht stört.

Da durch AS und PEG-Fällung keine Anreicherung der HSP bei einer bestimmten Konzentration erreicht worden ist, wurde die Möglichkeit der Ausfällung unerwünschter Proteine durch Hitze untersucht. JINN et al (1989) berichten von einer relativen Hitzestabilität der Haupt-HSP der Soja-Bohne. Erste Vorversuche zeigten, daß HSP im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen auch bei *Neurospora* relativ hitzestabil sind. Eine S-100-Roh-HS-Fraktion wurde 30 min bei 65°C bzw. 98°C erhitzt und der Proteinniederschlag pelletiert (17000 x g⁻¹). Abb. 4.2. zeigt das gelelektrophoretische Proteinbandenmuster der Proteine im Überstand. Bei 65 und sogar bei 98°C ist ein Protein im 90 kD Bereich zu erkennen. Ob es sich hierbei um HSP 81 handelt, müssen detailliertere Versuche mit radioaktiv markierten Proteinen zeigen. Sollte sich die Hitzestabilität der HSP bei Versuchen mit markierten Proteinen bestätigen, wäre eine Hitzefällung eine gute Methode zur Vorreinigung.

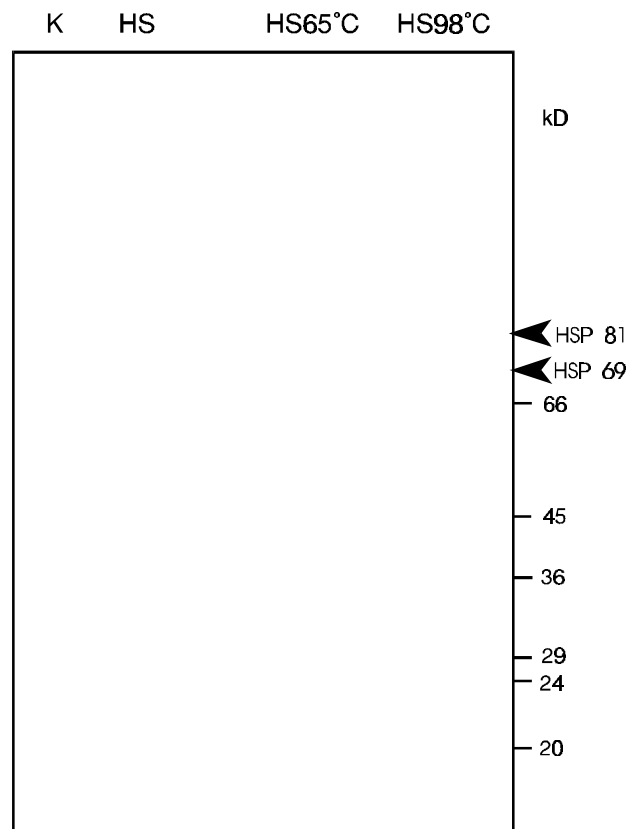


Abb. 4.2.: Darstellung des gelelektrophoretisches Proteinbandenmusters (Coomassie brilliant blue gefärbt) von S-100-Roh-HS Fraktionen vor und nach Hitzebehandlung. K: Kontrollfraktion unbehandelt, HS: Hitzeschockfraktion unbehandelt, HS65°C: Hitzeschockfraktion 30 min 65°C, 17000 x g⁻¹ Überstand, HS98°C: Hitzeschockfraktion 30 min 98°C, 17000 x g⁻¹ Überstand).

4.3. Isolierung des HSC 69

In Anlehnung an eine von WELCH und FERAMISCO (1985) entwickelte Isolierungsmethode wurde HSC 69 in zwei Schritten isoliert. Einer DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie folgte eine Affinitätschromatographie mit ATP-Agarose. Die bei der DEAE-Chromatographie zur Elution des Hauptanteils des HSC 69 nötige NaCl-Konzentration stimmte im wesentlichen mit denen ähnlicher Reinigungen überein (WELCH und FERAMISCO, 1985; WILKINSON et al, 1990). Die Fraktionen mit dem Hauptteil des HSC 69 wurden in der erstmals von LEE und JOHANSSON (1977) angewandten ATP-Agarose-Affinitätschromatographie weitergereinigt. Diesem zweiten Reinigungsschritt kommt der größere Trennerfolg zu. Eine Affinitätschromatographie erlaubt Trennungen aufgrund biospezifischer Aktivität. Nachteile der Affinitätschromatographie mit der ATP-Agarose sind deren recht geringe Kapazität und die nur begrenzte Haltbarkeit bei recht hohem Preis.

HSP 70 hat eine hydrophobe C-terminale Dömaäne (Kap. 1.2.3.), so daß man durch eine HIC (**h**ydrophobic **i**nteraction **ch**romatography) oder RPC (**r**eversed **p**hase **ch**romatography) eventuell einen guten Reinigungseffekt erzielen könnte.

Eine Isolierung der induzierten HSP 69 Komponenten wäre vorteilhafter gewesen. Die induzierten Komponenten sind allerdings in nur geringerer Menge vorhanden, so daß dieses mit chromatographischen Methoden sicher schwerer fällt. Eventuell befinden sich die induzierten HSP 69 Komponenten in der 0.3 DEAE-ATP-Agarose-Elutionsfraktion. Da die induzierten HSP 69 Komponenten einen basischeren pI besitzen, haben sie bei pH 7.5 (pH der Anionenaustausch-Chromatographie) eine stärkere negative Nettoladung wie die konstitutiven HSC 69, binden stärker als diese an die DEAE-Matrix und eluieren erst bei höherer Ionenstärke des Eluenten.

Antikörper gegen ein induziertes HSP würden schon in Dot- und Western Blots auf den Streßzustand einer Zelle schließen lassen. Mit Ak gegen die konstitutiven Komponenten kann man erst durch einen quantitativen Vergleich zwischen Kontrollzellen und den gestreßten Zellen auf den Streßzustand der Zelle schließen.

4.4. Aufreinigung des HSP 81

Einige Vorversuche zur Reinigung des HSP 81 beschreiben Möglichkeiten zu dessen Isolierung. DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie, Hydroxylapatit-Chromatographie und Gelfiltration wurden hier in sukzessiver Folge eingesetzt. Der bisher erzielte Reinigungseffekt ist jedoch noch gering. Desweiteren wurde eine Isolierung des HSP 81 durch ATP-Agarose-Affinitätschromatographie, ähnlich der des HSC 69, untersucht. Es konnte keine Bindung des HSP 81 an ATP-Agarose beobachtet werden. Folglich war auch keine Reinigung über ATP-Affinitätschromatographie möglich. Aussichtsreich schien eine solche Isolierung aufgrund einer für Säuger HSP 90 beschriebenen ATP-Bindungsstelle (CSERMELY und KAHN, 1991). Eine Affinitätschromatographie mit Concanavalin-A-Agarose (einem Zucker bindenden Lektin gebunden an Agarose), die an die Hydroxylapatit-Chromatographie anschließt, könnte einen guten Reinigungseffekt haben, da HSP 81 als Glycoprotein beschrieben wurde (ROYCHOWDHURY und KAPOOR 1990). Eine erfolgreiche Reinigung mit Con-A-Affinitätschromatographie ist für Säuger GRP 94 beschrieben (KANG und WELCH, 1991).

4.5. Ca⁺⁺-Freisetzung aus isolierten Vakuolen von *Neurospora* durch isoliertes HSC 69 aus *Neurospora*

Die anscheinend durch HSC 69 stimulierte Ca⁺⁺-Freisetzung aus Vakuolen von *Neurospora* könnte, wie für andere Kationen von ALDER et al (1990) beschrieben, auf einem unspezifischem "auslecken" von Ca⁺⁺ bei der Interaktion von HSC 69 mit Membranen beruhen. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration nach einem HS, also nach "natürlicher" Erhöhung der HSC 70 Konzentration, ist für *Neurospora* und eine Reihe anderer Organismen beschrieben (CORNELIUS et al, 1989; DRUMMOND et al 1986, und dort zitierte Literatur). Die Ca⁺⁺-Freisetzung könnte also ein negativer Nebeneffekt einer erhöhten Proteintransportrate, vermittelt durch eine Reihe von HSP (u.a. von HSC 70), während eines HS sein. Für HSP 70 (STEVENSON und CALDERWOOD, 1990), HSP 26 und 90 (Evans und Tomasovic, 1990) wurde eine hoch konservierte Calmodulin-Bindungsstelle beschrieben. Bei der Assoziation dieser HSP mit Calmodulin könnte es sich um einen Mechanismus zur Entfernung bzw. zur Bindung oder Speicherung des freiwerdenden, in hohen Konzentration für die Zelle toxischen, Ca⁺⁺ handeln.

4.6. Herstellung polyklonaler Ak gegen HSC 69

Isoliertes HSC 69 stellte ein recht gutes Antigen in der Kaninchenimmunisierung dar. Schon 7 Wochen nach der ersten Primärinjektion waren spezifische Ak gegen HSC 69 vorhanden. Allerdings wurden auch einige unspezifisch kreuzreagierende Ak, zusätzlich zu den ohnehin schon vorhandenen, gebildet.

Die zu Anfang der Arbeit betrachtete Möglichkeit der Verwendung von Banden bzw. Spots aus ein- bzw. zweidimensionalen Gelen zur Immunisierung von Kaninchen, hätte eventuell einen besseren Erfolg erbracht. Die Reinheit eines gelelektrophoretisch getrennten Proteins ist bisher mit den herkömmlichen chromatographischen Reinigungsmethoden nicht zu übertreffen. Eine hohe Reinheit des Antigens ist zur Vermeidung von unspezifischen Ak bei der Herstellung polyklonaler Ak sehr wichtig. Aufgrund mangelnder Erfahrung wurde eine solche Art der Immunisierung bislang nicht durchgeführt, obwohl die Isolierung des HSC 69 bzw. sogar des HSP 69 sicher einfacher durchzuführen gewesen wäre. Die Immunisierung mit in Acrylamid eingeschlossenen Proteinen hätte sogar einige weitere Vorteile gehabt. Der Acrylamideinschluß der Ag unterstützt die Depotwirkung der Ölkomponente des Adjuvans, woraus eine noch langsamere und gleichmäßigere Ag-Abgabe resultiert hätte, welche förderlich auf die Ak-Bildung wirkt (DUNBAR, 1987; HARLOW und LANE, 1988).

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Durch eine ATP-Agarose-Affinitätschromatographie mit den K und HS Rohextrakten konnte eine 60 %ige Steigerung des ATP-bindenden Proteinanteils des Cytoplasmas der hitzegeschockten Rohextrakte gegenüber den Kontrolleextrakten gezeigt werden.

Diese Arbeit beschreibt die Isolierung des HSC 69 aus *Neurospora crassa* und damit in Verbindung stehende Vorversuche. In Anlehnung an eine von WELCH und FERAMISCO (1985) entwickelte Isolierungsmethode wurde HSC 69 in zwei Schritten isoliert. Einer DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie folgte eine Affinitätschromatographie mit ATP-Agarose. Ausgehend von 60 g Feuchtgewicht HS-Myzel konnten pro Isolierungsgang 0.8 mg HSC 69 isoliert werden.

Vorversuche zur Reinigung des HSP 81 beschreiben Möglichkeiten zu dessen Isolierung. DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie, Hydroxylapatit-Chromatographie und Gelfiltration wurden hier in sukzessiver Folge eingesetzt. Eine Reinigung des HSP 81 über ATP-Agarose-Affinitätschromatographie wurde untersucht und als nicht geeignet erkannt.

In ersten Vorversuchen wurde in Zusammenarbeit mit G. GEBAUER eine mögliche Freisetzung von Ca^{++} aus isolierten Vakuolen von *Neurospora* durch isoliertes HSC 69 aus *Neurospora* untersucht. Diese ersten Versuche zeigen eine deutliche Stimulierung der Ca^{++} -Freisetzung, wobei jedoch noch weitere Versuche zur Bestätigung dieses Ergebnisses ausstehen.

Isoliertes HSC 69 wurde als Antigen zur Herstellung polyklonaler Antikörper in der Kaninchenimmunisierung eingesetzt. Die resultierenden HSC 69-Antikörper wurden in ersten Immunoblots auf ihre Spezifität hin geprüft und zeigen eine recht hohe Affinität zum HSC 69. In Dot-Blots konnte HSC 69 mit einer unteren Nachweisgrenze von weniger als 12 ng nachgewiesen werden.

Inwiefern sich die hergestellten HSC 69-Ak zu einer exakten Quantifizierung (z.B. im ELISA= enzyme linked immunosorbent assay) des unter verschiedenen Streßbedingungen und experimentellen Fragestellungen vermehrt gebildeten HSC 69 einsetzen lassen, werden weitere Versuche zeigen müssen. Zur Entwicklung eines solchen Testansatzes ist es wichtig, die unspezifisch kreuzreagierenden Ak des Antiserums zu blockieren oder zu beseitigen (Kap. 3.7.2.). Mit Ak gegen ein konstitutives HSP lassen sich Aussagen über den Streßzustand (durch eine Quantifizierung des konstitutiven HSP) einer Zelle nur im

Vergleich mit Kontrollzellen machen, was den experimentellen Aufwand eines solchen Tests erhöht. Mit Ak gegen ein induziertes HSP lassen sich solche Aussagen einerseits durch bloße Anwesenheit des HSP (in einer ja-nein-Antwort) schon in Dot- oder Western Blots machen, andererseits kann bei einer exakten Quantifizierung im ELISA auf ein Vergleich mit Kontrollzellen verzichtet werden (in diesen ist ja kein induzierbares HSP vorhanden). Besonders gut geeignete Kandidaten zur Herstellung von Ak gegen ein solches induziertes HSP, sind HSP von denen keine konstitutiven Vertreter bekannt sind. Dafür würden einige Mitglieder der LMW-HSP-Familie in Frage kommen. Von den LMW-HSP wurden bisher nur induzierte Vertreter beschrieben.

Die Herstellung monoklonaler Ak gegen ein induziertes HSP stellt die beste Möglichkeit dar, wirklich monospezifische Ak, ohne jegliche Kreuzreaktionen, zu erhalten. Da monoklonale Ak nur von Klonen einer einzigen mit einer Myelomzelle fusionierten (und daher potentiell unsterblichen) B-Zelle produziert werden, ist die Monospezifität und Art der Ak sichergestellt. Bei der Entwicklung eines toxikologischen Testsystem zur Proteindegradation bzw. Proteintoxizität ist der Einsatz von monoklonalen Ak gegen induzierte HSP die Methode der Wahl.

6. ANHANG

6.1. Zusammensetzung der Kulturmedien

Konidiationsmedium nach HOROWITZ (1947)

complete salts 5 x	20 %	200 ml/l
Glycerin (87%)	2 %	18.5 ml/l
Casein-Hydrolysat	0.05 %	0.5 g/l
Hefeextrakt	0.5 %	5 g/l
Malzextrakt	0.5 %	5 g/l
Agar	1.5 %	1.5 g/l
Biotinlsg.	0.01 %	0.1 ml/l

Complete salts 5 x:

K-Tartrat	2.5 %	25 g/l
Na-Nitrat	2 %	20 g/l
KH ₂ PO ₄	0.5 %	5 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.25 %	2.5 g/l
NaCl	0.05 %	0.5 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.05 %	0.5 g/l

Biotinlösung:

5 mg Biotin wurden in 100 ml 50 % Ethanol (abs.) gelöst und bei 4°C gelagert.

Medium für die Flüssigkultur nach VOGEL (1965)

Na-Citrat x 5 H ₂ O	15 %	150 g/l
KH ₂ PO ₄	25 %	250 g/l
NH ₂ NO ₃	10 %	100 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 %	10 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.735 %	7.35 g/l
Biotinlsg. (siehe 2.2.1.)	0.5 %	5 ml/l
Spurenelementlsg.	0.5 %	5 ml/l

Spurenelementelösung:

Citronensäure x H ₂ O	5 %	5 g/100 ml
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	5 %	5 g/100 ml
Fe(NH ₄)SO ₄ x 6 H ₂ O	1 %	1 g/100 ml
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.25 %	0.25 g/100 ml
MnSO ₄ x H ₂ O	0.05 %	0.05 g/100 ml
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.05 %	0.05 g/100 ml
H ₃ BO ₃	0.05 %	0.05 g/100 ml

6.2. Abkürzungen

und Einheiten sofern sie vom SI-System abweichen

AA	Acrylamid
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Ammoniumsulfat
BA	N,N'-Methylenbisacrylamid
BIP	Ig heavy chain binding protein
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
°C	Temperatur [K] - 273.15
cpm	Impulse pro Minute
DEAE	Di-ethyl-amino-ethyl
DMSO	Di-methyl-sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-diamino-tetra-essigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fc	Fußregion der Ig
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GRP	glucose regulated protein
h	Stunde
HS	Hitzeschock
HSC	konstitutive HSP
HSE	Hitzeschockelement
HSF	Hitzeschock(transkriptions)faktor
HSP	Hitzeschockprotein(e)
HSS	hitzesensitive Proteine
I	Ionenstärke
IF	isoelektrische Fokussierung
Ig(G)	Immunglobulin (G)
IL	Interleukin(e)
kD	kilo-Dalton
LL	Dauerlicht
LMW	low molecular weight
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	molecular weight
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PPO	Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylen-diamin
Tris	Tris-hydroxy-methyl-amino-methan

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ALDER, G.M., AUSTEN, B.M., BASHFORD, C.L. MEHLERT, A., PASTERNAK, C.A.; 1990. Heat shock proteins induce pores in membranes. *Bioscience Reports* **10**: 509-18.
- ANATHAN, J., GOLDBERG, A.L., VOELLMY, R.; 1986. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* **232**: 522
- BECKMANN, R.P., MIZZEN, L.A., WELCH, W.J.; 1990. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* **248**: 850-54.
- BLUMENBERG, H. et al; 1991. *Nature* **349**: 627-630.
- BONNER, W.M., LASKEY, R.A.; 1974. A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**: 83-88.
- BOWMAN, B.J.; BLASCO, F., SLAYMAN, C.W.; 1981. Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**: 12343-49.
- 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.
- BURNET, F.M.; 1959. The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, London.
- 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.
- CHAPPELL, T.G., KONFORTI, B.B., SCHMID, S.L., ROTHMAN, J.E.; 1987. The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J. Biol. Chem.* **262**: 764-51.
- CHENG, M.Y., HARTL, F.U., MARTIN, J., POLLOCK, R.A., KALOUSEK, F., NEUPERT, W., HALLBERG, E.M., HALLBERG, R.L., HORWICH, A.L.; 1989. Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* **337**: 620-25.
- CHIRICO, W.J.; WATERS, M.G.; BLOBEL, G.; 1988. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**: 805-10
- CIESLA, H.; 1991. Entwicklung von Methoden zur Isolierung von Hitzeschockproteinen aus *Neurospora crassa*. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- CORNELIUS, G.; RENSING, L.; unveröffentlicht. Heat shock protein kinetics and distribution in different cytoplasmic fractions of *Neurospora crassa*.
- CORNELIUS, G., GEBAUER, G., TECHEL, D.; 1989. Inositol trisphosphate induces calcium release from *Neurospora crassa* vacuoles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **162**: 852-56.
- CRAIG, E.; 1990. Regulation and function of the HSP 70 multigene family of *Saccharomyces cerevisia*. in MORIMOTO, R.I. et al; 1990.
- CSERMELY, P, KAHN, R.C; 1991. The 90-kDa heat shock protein (hsp-90) possesses an ATP binding site and autophosphorylating activity. *J. Biol. Chem.* **266**: 4943-50.

- DANG, C.V., LEE, W.M.F.; 1988. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, C-myb, N-myc, p53, HSP 70, and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.* **264**: 18019-23.
- DAVIS, B.J.; 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-27.
- DESHAIES, R.J.; KOCH, B.D.; WERNER-WASHBURNE, M.; CRAIG, E.A.; SCHEKMAN, R.; 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**: 800-805.
- DRUMMOND, I.A.S., MCCLURE, S.A., POENIE, M., TSIEN, R.Y., STEINHARDT, R.A.; 1986. Large changes in intracellular pH and calcium observed during heat shock are not responsible for the induction of heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1767-75.
- DUNBAR, B.S.; 1987. Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press, New York.
- FLAHERTY, K.M., DELUCA-FLAHERTY, C., MCKAY, D.B.; 1990. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**: 623-28.
- GOFF, S.A., GOLDBERG, A.L.; 1985. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of lon and other heat shock genes. *Cell* **41**: 587.
- GROSS, C.A., STRAUS, D.B., ERICKSON, J.W., YURA, T.; 1990. The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli*. in MORIMOTO, R.I. et al; 1990.
- GUIDON, P.T.; HIGHTOWER, L.E.; 1986. Purification and initial characterization of the 71-kilodalton rat heat-shock protein and its cognate as fatty acid binding protein. *Biochemistry* **25**: 3231-39.
- GURLEY, W.B., KEY, J.L.; 1991. Transcriptional regulation of the heat-shock response: A plant perspective. *Biochemistry* **30**: 1-12.
- HARLOW, E.; SPUR, D.; 1988. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory
- HEUKESHOVEN, J.; 1985. Vereinfachte und universelle Methode zur Silber-Färbung von Proteinen in PAGE: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. *Electrophoresis* **6**: 103-12.
- HOROWITZ, N.H.; 1947. Methionine synthesis in *Neurospora*. The isolation of cystathionine. *J. Biol. Chem.* **171**: 255-264.
- HURN, B.A.L, CHANTLER, S.M.; 1980. Production of reagent antibodies. *Methods in Enzymology* **70**:104-42.
- INGHAM, K.C.; 1984. Protein precipitation with Polyethylen Glycol. *Methods in Enzymology* **104**: 351-56.
- ITOH, H.; TOYOSHIMA, I.; MIZUNUMA, H.; KOBAYASHI, R.; TASHIMA, Y.; 1990. Three-step purification method and characterization of the bovine brain 90-kDa heat shock protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 290-96
- ITOH, H, TASHIMA, Y.; 1991. The stress (heat shock) proteins. *Int. J. Biochem.* **23**: 1185-91
- JENTSCH, S.; SEUFERT, W.; SOMMER, T.; REINS, H.A.; 1990. Ubiquitin-conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *TIBS* **15**: 195-98.
- JENTSCH, S., SEUFERT, W., HAUSER, H-P.; 1991. Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**: 127-39.

- JINN, T.L., YEH, Y.C., CHEN, Y.M., LIN, C.Y.; 1989. Stabilization of soluble proteins in vitro by heat shock proteins-enriched Ammonium sulfate fraction from Soybean seedling. *Plant Cell Physiol.* **30**: 463-69.
- KANG, H.S. und WELCH, W.J.; 1991. Characterization and purification of the 94-kDa glucose-regulated protein. *J. Biol. Chem.* **266**: 5643-49.
- KAPOOR, M.; 1983. A study of heat-shock response in *Neurospora crassa*. *Int. J. Biochem.* **15**: 639-49.
- KAPOOR, M.; 1986. A study of the effect of heat shock and metal ions on protein synthesis in *Neurospora crassa* cells. *Int. J. Biochem.* **18**: 15-29.
- KAPOOR, M.; LEWIS, J.; 1987. Alteration of the protein synthesis pattern in *Neurospora crassa* cells by hyperthermal and oxydative stress. *Can. J. Microbiol.* **33**: 162-68.
- KAPOOR, M., SREENIVASAN, G.M., GOEL, N., LEWIS, J.; 1990. Development of thermotolerance in *Neurospora crassa* by heat shock and other stresses eliciting peroxidase induction. *J. Bacteriol.* **172**: 2798-801.
- KLEMENZ, R., 1991. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**: 3652-56.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C.; 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- LEE, C.-Y., JOHANSSON, C.-J.; 1977. Purification of cofactor-dependent enzymes by affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **77**: 90-102.
- LINDQUIST, S.; 1986. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 1151-91.
- LINDQUIST, S., CRAIG, E.A.; 1988. The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **22**: 631-77.
- LAEMMLI, U.K.; 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-85.
- LUBBEN, T.H., GATENBY, A.A., DONALDSON, G.K., LORIMER, G.H., VIITANEN, P.V.; 1990. Identification of a groES-like chaperonin in mitochondria that facilitates protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7683-87.
- MORIMOTO, R.I., TISSIERES, A., GEORGOPOULOS, C. (eds.); 1990. Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- NERLAND, A.H., MUSTAFA, A.S., SWEETSER, D., GODAL, T., YOUNG, R.A.; 1988. A protein antigen of *Mycobacterium leprae* is related to a family of small heat shock proteins. *J. Bact.* **170**: 5919-21.
- NEUHOFF, V., PHILIPP, K., ZIMMER, H.G., MESECKE, S.; 1979. A simple, versatile, sensitive and volumeindependent method for quantitative protein determination which is dependent of other external influences. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360**: 1657-70.
- NEUPERT, W., HARTL, F.-U., CRAIG, E.A., PFANNER, N.; 1990. How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? *Cell* **63**: 447-50.
- NIEDZWIECKI, A., KONGPACHITH, A.M., FLEMING, J.E.; 1991. Aging affects expression of 70-kDa heat shock proteins in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **266**: 9332-38.

- NOVER, L. (eds.); 1984. Heat shock response of eukaryotic cells. Springer-Verlag, Heidelberg.
- NOVER, L., SCHARF, K-D., NEUMANN, D.; 1986. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1298-308.
- NOVER, L.; 1987. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 130.
- NOVER, L.; 1990. Molekulare Zellbiologie der Hitzestressantwort, Teil 1 und 2. *Naturwissenschaften* **77**: 310-16 und 359-65.
- NOVER, L.; 1991. HSFs and HSPs - a stressful program on transcription factors and chaperones (Stress proteins and the heat shock response, Cold spring harbour meeting review). *The New Biologist* **3**: 855-59.
- O'FARRELL, P.; 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **259**: 4007-21.
- ORNSTEIN, L.; 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 321-49.
- PALLEROS, D.R., WELCH, W.J., FINK, A.L.; 1991. Interaction of hsp70 with unfolded protein: Effects on temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5719-23.
- PARKER, C.S., TOPOL, J.; 1984. *Cell* **37**: 273-83.
- PARSELL, D.A., SANCHEZ, Y., STITZEL, J.D., LINDQUIST, S.; 1991. HSP 104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* **353**: 270-73.
- PELHAM, H.R.B.; 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* HSP 70 heat shock gene. *Cell* **30**: 517.
- PELHAM, H.R.B.; 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**: 959-61.
- PELHAM, H.R.B.; 1990. Functions of the HSP 70 protein family: an overview. in MORIMOTO, R.I. et al; 1990.
- PERISIC, O., XIAO, H, LIS, J.T.; 1989. Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to Head-to-Head and Tail-to Tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell* **59**: 797.
- PLESOFSKY-VIG, N., BRAMBL, R.; 1985a. Heat shock response of *Neurospora crassa*: Protein synthesis and induced thermotolerance. *J. Bacteriol.* **162**: 1083-91.
- PLESOFSKY-VIG, N., BRAMBL, R.; 1985b. The heat shock response of fungi. *Experimental Mycol.* **9**: 187-94.
- RITOSSA, F.; 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP by *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-73.
- ROYCHOWDHURY, H.S.; KAPOOR, M.; 1988. Ethanol and carbon-source starvation enhance the accumulation of HSP 80. *Can. J. Microbiol.* **34**: 162-68.
- ROYCHOWDHURY, H.S.; KAPOOR, M.; 1990. Heat shock response in *Neurospora crassa*: purification and some properties of HSP 80. *Biochem. Cell Biol.* **68**: 1218-21.
- SANCHEZ, Y., LINDQUIST, S.; 1990. HSP 104 is required for thermotolerance. *Science* **248**: 1112-15.

- SCHLESINGER, M.J., TISSIERES, A., ASHBURNER, M.; 1982. Heat shock proteins: from bacteria to man. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- SCHLESINGER, M.J.; 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **265**: 12111-14.
- SEDMAN, J.J., GROSSBERG, S.E.; 1977. *Anal. Biochem.* **72**: 544-552.
- SORGER, P.K., NELSON, H.C.M.; 1989. Trimerisation of a Yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* **59**: 807.
- STEVENSON, M.A., 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.
- TISSIERES, A., MITCHEL, H.K., TRACY, U.M.; 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**: 389-98.
- TRENT, J.D., OSIPIUK, J., PINKAU, T.; 1990. Acquired thermotolerance and heat shock in the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus* sp. strain B12. *J. Bacteriol.* **172**: 1478-84.
- VANBUSKIRK, A., CRUMP, B.L., MARGOLIASH, E., PIERCE, S.K.; 1989. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP 70 heat shock protein family. *J. Exp. Med.* **170**: 1799-809.
- VIERLING, E.; 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* **42**: 579-620.
- VOGEL, H.J.; 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium M). *Microbiol. Genetics Bulletin* **13**: 42-43.
- WELCH, W.J., GARRELS, J.I., FERAMISCO, J.R.; 1982a. The mammalian stress proteins. in SCHLESINGER, M.J. et al; 1982.
- WELCH, W.J.; FERAMISCO, J.R.; 1982b. Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **257**: 14949-59.
- WELCH, W.J., FERAMISCO, J.R.; 1985. Rapid purification of mammalian 70,000-Dalton stress proteins: Affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1229-37.
- WILKINSON, M.C.; WHEATLEY, P.A.; SMITH, C.J.; LAIDMAN, D.L.; 1990. Higher plant heat-shock protein 70: Purification and immunological analysis. *Phytochemistry* **29**: 3073-80.
- WU, C.; 1984. *Nature* **311**: 81-84.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Bremen, im Januar 1992

Franco Fracella

Danke

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ludger Rensing für die Überlassung des Themas, das stete Interesse am Verlauf dieser Arbeit, sowie für die Möglichkeit der freien und selbstständigen Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Saadat Mohsenzadeh danke ich für die Einführung in die grundlegenden Arbeitsmethoden, für seine Anleitung und Hilfe bei der Durchführung immunologischer Arbeitsmethoden, für seine ständige Diskussionsbereitschaft, für konstruktive Denkanstöße und sein motivierendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Der gesamten AG Rensing danke ich für die kollegiale Unterstützung und das gute Arbeitsklima.