

Technische Universität München

Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

AG Proteomik

Identifizierung stresssensitiver Proteine für die Medizin und Lebensmitteltechnologie aus dem Proteom von *Saccharomyces cerevisiae*

Alois Harder

Vollständiger Abdruck der vom Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Prof. Dr. Harun Parlar

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Angelika Görg

2. Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 10.4.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und im Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.4.2001 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 1997 bis Januar 2001 am Institut für Lebensmitteltechnologie und Analytische Chemie (AG Proteomik) der Technischen Universität München - Weihenstephan erstellt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. A. Görg für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Zudem möchte ich Herrn Dr. W. Weiss und Herrn R. Widgruber für Anregungen und Diskussionsbeiträge, sowie der mir jederzeit entgegengebrachte freundschaftliche Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. M. Mann und seinen Mitarbeitern E. Moertz, J. Crawford und L. Jakobsen (University of Odense, Protein Interaktion Laboratoy) möchte ich meinen Dank für die MALDI-TOF-MS Sequenzanalysen der detektierten Proteine aussprechen.

Für die anregenden Diskussionen bezüglich der Hefeaufzucht und die kollegiale Zusammenarbeit möchte ich Herrn Dr. A. Blomberg und Herrn Dr. J. Norbeck (University of Göteborg, Department of General and Marine Micrbiology) danken.

Herrn Prof. Dr. S. J. Fey, Herrn Prof. Dr. P. M. Larsen und A. Nawrocki der Universität Odense (Centre for Proteome Analysis in Life Science) darf ich für diskussionsanregende Beiträge danken.

Allen Mitarbeitern des AG Proteomik, insbesondere Herrn G. Boguth, Herrn C. Obermaier, Herrn O. Drews und Herrn Dr. B. Scheibe danke ich für die freundschaftliche Unterstützung, das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe

Die vorliegende Arbeit wurde mit Mitteln der European Commission (NO, Bi04CT972361) gefördert.

1 Einleitung	1
2 Proteomanalyse der cytoplasmatischen Fraktion von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.1 Kenntnisstand und Grundlagen	4
2.2 Material und Methoden	7
2.2.1 Kultur von <i>S. cerevisiae</i>	7
2.2.1.1 Vergleich verschiedener Nährmedien	8
2.2.1.2 Wachstumskurven von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>boulardii</i>	10
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung	10
2.2.1.4 Bestimmung des Trockengewicht	11
2.2.1.5 Messung der Proteinkonzentration	11
2.2.1.6 Radioaktive Markierung (S35)	12
2.2.1.6.1 Kalibrieren und Quenchen des Szintillationszählers	12
2.2.1.6.2 35S - Absorption der Hefezellen	13
2.2.1.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration durch 35S - Detektion	14
2.2.2 Probenaufbereitung für die für die Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion	14
2.2.2.1 Zellaufschlüsse S35 - markierter Proben	14
2.2.2.1.1 Autolyse, enzymatische Lyse, mechanischer und phys. Aufschluß	15
2.2.2.1.2 Mikroskopische Dokumentation der Aufschlüsse	17
2.2.2.2 Proteinsolubilisierung und Disaggregation	17
2.2.3 Durchführung der zweidimensionalen Elektrophorese	19
2.2.3.1 Isoelektrische Fokussierung	19
2.2.3.2 Äquilibration der IPG - Streifen	23
2.2.3.3 SDS - PAGE	24
2.2.3.4 Proteinvisualisierung	27
2.2.3.4.1 Silberfärbungen	27
2.2.3.4.2 35S - Expositionen	30

2.3 Ergebnis und Diskussion	31
2.3.1 Kultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.3.1.1 Vergleich von Minimal- und Vollmedium	32
2.3.1.2 Bestimmung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit	35
2.3.1.3 Vermehrung, Teilungsrate und Generationszeit	37
2.3.1.4 Messung des Zelltrockengewichtes	39
2.3.1.5 Proteinbestimmung nach Lowry	40
2.3.1.6 Radioaktive Markierung (35S)	42
2.3.1.6.1 Kalibrieren und Quenchen des Szintillationszählers	44
2.3.1.6.2 Berechnung der Zerfallskonstanten	46
2.3.1.6.3 35S - Methioninabsorption der Hefezellen	48
2.3.1.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentration durch 35S - Detektion	49
2.3.1.7 Fazit	51
2.3.2 Probenaufbereitung für die Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion	51
2.3.2.1 Zellaufschluß 35S - markierter Proben	53
2.3.2.1.1 Zellaufschlüsse in der Interferenzkontrastmikroskopie	54
2.3.2.1.2 35S - Quantifizierung des extrahierten Proteins	56
2.3.2.1.3 2D - Elektrophorese der verschiedenen Aufschlüsse	58
2.3.2.2 Proteinsolubilisierung und Disaggregation	61
2.3.2.2.1 Präsolubilisierung 35S - markierter Zellen durch SDS	63
2.3.2.2.2 Computerdensitometrische Gelauswertung	65
2.3.2.3 Fazit	69
2.3.3 Zweidimensionale Elektrophorese des 35S markierten Extrakts	69
2.3.3.1 Optimierung der 1. und 2. Dimension für die Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion von <i>S. cerevisiae</i>	71
2.3.3.2 Proteinvisualisierung	72
2.3.3.3 Fazit	77

3	Proteomanalyse stressinduzierter Proteine aus der cytoplasmatischen Fraktion von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>boulardii</i>	78
3.1	Kenntnisstand und Grundlagen	80
3.1.1	Gefriertrocknung in der Medizin und Lebensmittelindustrie	80
3.1.1.1	Lyophilisierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
3.1.1.2	Lyophilisierung von <i>Saccharomyces boulardii</i>	83
3.1.2	Streßvektoren in der Hefe	85
3.1.2.1	Zelluläre Reaktion auf Gefrieren	87
3.1.2.2	Zelluläre Reaktion auf Lyophilisieren	90
3.1.3	Vorgehensweise	91
3.2	Material und Methoden	92
3.2.1	Stammbeschreibung, Kultur und Ernte der Zellen	92
3.2.2	Optimierung der Streßinduktion	92
3.2.2.1	Gefrierinduktion der Zellen	92
3.2.2.2	Gefriertrocknen der Zellen	93
3.2.2.2.1	Anlagenbeschreibung	94
3.2.2.2.2	Trocknungsparameter	95
3.2.2.2.3	Eutektikum / Kryohydrat	96
3.2.2.2.4	Vitalitätsbestimmung	96
3.2.2.2.5	Restwasserbestimmung	96
3.2.2.3	Interferenzmikroskopie der phänotypischen Streßadaption	97
3.2.3	Probenaufbereitung für die 2D - Elektrophorese	97
3.2.4	Elektrophorese und Proteinvisualisierung	98
3.3	Ergebnisse und Diskussion	99
3.3.1	Stammbeschreibung, Kultur und Ernte der Zellen	99
3.3.2	Optimierung der Streßinduktion	100
3.3.2.1	Gefrieren der Zellen	101

3.3.2.1.1	Einfluß von Gefriergeschwindigkeit und Schutzsubstanzen	101
3.3.2.1.2	Diskussion der streßinduzierten lag - Phasen	105
3.3.2.2	Gefriertrocknen der Zellen	106
3.3.2.2.1	Der kryohydratische / eutektische Punkt	107
3.3.2.2.2	Optimierung der Trocknungsparameter	108
3.3.2.2.3	Erstellung eines Trocknungsprogramms für subletale Induktion	113
3.3.2.3	Interferenzmikroskopie der phänotypischen Streßadaption	115
3.3.2.4	Fazit	116
3.3.3	MALDI - Analyse der detektierten Streßproteine	117
3.3.4	Diskussion der Streßproteine	118
3.3.4.1	Mastergel der detektierten Streßproteine	119
3.3.4.2	Proteinexpression von <i>S. cerevisiae</i> nach Streßinduktion	120
3.3.4.3	Proteinexpression von <i>S. boulardii</i> nach Streßinduktion	121
3.3.4.4	Alkoholdehydrogenase 1 in der Hefe	122
3.3.4.4.1	Kenntnisstand zu ADH1	122
3.3.4.4.2	Regulation von ADH1 nach Streßapplikation	123
3.3.4.5	Die SAICAR - Synthase	125
3.3.4.5.1	YAR015w ein mono,- oder multifunktionales Enzym	126
3.3.4.5.2	Motive und Domänen von 1a48	127
3.3.4.5.3	PUR7 - Regulation nach Streßinduktion	129
3.3.4.6	YDR068w ein Genprodukt mit bisher unbekannter Funktion	131
3.3.4.6.1	Analyse und Crossmatching auffälliger Domänen	131
3.3.4.6.2	YDR068w - "involved in osmostress response of lyophilisation"	133
3.3.4.7	YDR075w eine Serin / Threonin Phosphatase	135
3.3.4.7.1	cAMP Regulation von YDR075w nach Lyophilisieren	135
3.3.4.7.2	Streßadaption von S / T Phosphatasen in höheren Eukaryonten	137
3.3.4.8	Die Proteinkinase PGK1	139
3.3.4.8.1	PGK1 - Kenntnisstand	139
3.3.4.8.2	Bindungsmotive für Streßadaptionen in PGK1	140
3.3.4.8.3	Streßinduzierte PGK - Regulation	142
3.3.4.9	Der Initiationfaktor eIF-5A in <i>S. boulardii</i>	144
3.3.4.9.1	Funktionen der Initiationsfaktoren in der Zelle	144
3.3.4.9.2	Hypusinisierung - eine Streßinduktion	145
3.3.4.10	Fazit, Interaktionsmodell	147

4 Zellwandproteine als Target neuer Antimykotika	149
4.1 Kenntnisstand und Grundlagen	150
4.1.1 Wirkungsweise herkömmlicher Antimykotika	151
4.1.1.1 Polyenderivate	151
4.1.1.2 Imidazolderivate	152
4.1.2 Zellwandaktive Antimykotika	153
4.1.3 Zielsetzung	155
4.2 Material und Methoden	155
4.2.1 Methodische Durchführung der CWP - Isolierung	155
4.2.1.1 Kultur und radioaktive Markierung	155
4.2.1.2 Abtrennung der cytoplasmatischen Fraktion	156
4.2.1.3 Reinigung der Zellwandfraktion	156
4.2.1.4 Substitution von SDS durch CHAPS	156
4.2.1.5 Filtration und Quantifizierung	156
4.2.1.6 Enzymatischer Verdau der Zellwandfragmente	158
4.2.2 Darstellung der Zellwandproteine	159
4.2.2.1 Interferenzkontrast Mikroskopie der einzelnen Isolationsschritte	160
4.2.2.2 Elektrophorese von glucangebundenen CWPs nach Streßinduktion	161
4.3 Ergebnisse und Diskussion	161
4.3.1 Zusammenfassung der methodischen CWP - Extraktion	161
4.3.1.1 Fraktionierung, Reinigung und SDS - Substitution	163
4.3.1.2 Filtration und Quantifizierung	164
4.3.1.2.1 Keratinkontaminationen der Membrane	165
4.3.1.2.2 Ultrafiltration m. reg. Cellulose, CTA und PS	166
4.3.1.3 Enzymatischer Verdau zur Freisetzung der CWPs	169
4.3.1.3.1 Chitinaseverdau	169
4.3.1.3.1.1 Wirkungsspektrum verschiedener Chitinasen	170
4.3.1.3.1.2 Detektion chitingebundener CWPs	172
4.3.1.3.2 Glucanaseverdau	174
4.3.1.3.2.1 2D - PAGE verschiedener 1,3 β - Glucanasen	175
4.3.1.3.2.2 Detektion glucangebundener CWPs	177
4.3.1.4 Fazit	178

4.3.2 Darstellung der CWPs	178
4.3.2.1 Interferenzkontrast Mikroskopie aus den einzelnen Isolationsschritten	178
4.3.2.2 Radioaktive Detektion der CWPs aus dem gesamten Proteom	180
4.3.2.3 Optimierte Trennung der CWP - Fraktion in der 2. Dimension	182
4.3.2.4 MS - Identifikation des CWP - Extrakts	184
4.3.2.4.1 Glucangebundene CWPs	184
4.3.2.4.2 Chitingebundene CWPs	186
4.3.2.4.3 Fazit	187
4.3.2.5 Diskussion und Datenbankrecherche der identifizierten CWP	187
4.3.2.5.1 Modell der CWP Freisetzung	188
4.3.2.5.2 CWP - Datenbankeintrag	189
4.3.2.5.3 Das Grundgerüst der Hefezellwand	190
4.3.2.5.3.1 GPI - Zellwandproteine	191
4.3.2.5.3.2 PIR - Zellwandproteine	192
4.3.2.5.4 YAL018c - ein Target für antimykotische Substanzen	194
4.3.2.5.4.1 YAL018c ein hypothetisches CWP	194
4.3.2.5.4.2 YAL018c - cell wall protein involved in stressresponse of freezing	196
4.3.2.5.4.3 Beschreibung einer neuen Domäne in YAR018c	198
4.3.2.5.5 Fazit	200
5 Zusammenfassung	201
6 Literatur	205

Abkürzungen

AA	Acrylamid
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
Bis	Bisacrylamid
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Anteil Crosslinker (Anteil Bis zum Totalacrylamidanteil)
cpm	counts per minute
CTA	Cellulosetriacetat
CWP	cell wall protein
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
dw	dry weight
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie (electro spray ionisation mass spectrometry)
HMW	high molecular weight
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
IPG - Dalt	zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH- Gradienten
kD	Kilodalton
LMW	low molecular weight
mA	Milliampere
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry)
M_r	relative Molmasse
m/z	Masse/Ladungs-Quotient
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pI	isoelektrischer Punkt
PS	Polyethersulfon
SDS	Natriumdodecylsulfat

T	Anteil Totalacrylamid
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tof	Flugzeit (time of flight)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vh	Voltstunde(n)
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen

1 Einleitung

Die Technik der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese in Kombination mit einer MALDI-TOF - MS Analyse hat sich in den letzten Jahren durch die verbesserte Reproduzierbarkeit und erhöhte Nachweisbarkeit zu einer etablierten Methode für die posttranslationale Expressionsanalyse, der Proteomanalyse entwickelt. Moderne 2-D Elektrophorese Techniken machen es möglich, Probenmengen im Milligrammbereich nach pI und Molekulargewicht zu trennen, neueste MALDI - Massenspektrometer sind heute in der Lage im picomol - Bereich Proteinidentifikationen durchzuführen. Entsprechend diesen methodischen Fortschritten konnte in den letzten 10 Jahren eine Vielfalt von Ergebnissen erzielt werden , die sich in den Erweiterungen von bereits etablierten Proteindatenbanken wie ExPASy oder NCBI zeigen. Besonders bei Modellorganismen wie *E. coli*, *B. subtilis* oder auch *S. cerevisiae* lassen sich aufbauend auf bereits umfangreiche Datensammlungen aus genetischen Experimenten funktionale Bestimmungen von ORFs durchführen.

Von *Saccharomyces cerevisiae*, dessen Proteom in dieser Arbeit untersucht werden soll, ist das Genom 1996 erstmals vollständig sequenziert worden. Die funktionelle Analyse des Hefeproteoms war mit der Trennung und Analyse von "high abundance proteins" vor allem aus dem Gesamtzellysat, in dem leichtlösliche Proteine des Cytoplasma, der Organellen und des Zellkerns enthalten sind, sehr erfolgreich.

Auf Grund der komplexen Natur von Proteinen ist man heute davon abgekommen, ein Protein in einem Forschungsansatz bis in seine letzte Funktion zu beschreiben; man sucht heute nach Proteinfamilien, die in einen bestimmten Zyklus oder für eine bestimmte Induktion, z. B. Streßantworten, Zellzykluskontrolle oder Stoffwechsel involviert sind. In dieser Weise werden speziell multifunktionale Proteine bis zur genauen Funktionsbeschreibung charakterisiert . In den Datenbanken werden hierfür Formulierungen wie "involved in", "strong similaity to", "located in" oder "interacts with" verwendet.

Die Eintragungen in die Datenbanken zeigen, daß eine Vielzahl von Proteinen (29%, Stand Nov. 2000) in der Hefe bis heute gänzlich ohne Funktionsbeschreibung stehen. Diese Proteine werden in der Regel als "protein of unknown funktion" oder als "hypothetical protein" geführt. Die Gründe für die schwierige Funktionsanalyse dieser Proteine sind vielfältig. Niedrige zelluläre Kopienzahl, instabile Modifikationen oder schlechte Löslichkeit bzw. Extrahierbarkeit sind oftmals Ursache für das

Mißlingen einer funktionellen Beschreibung dieser Proteine. Besonders in der medizinischen Forschung sind Zusammenhänge im zellulären Streßmanagement, Targetproteine für medikamentöse Akzeptoren oder "disease related proteins" von größtem Interesse. In vielen dieser Zusammenhänge sind gerade diese "proteins of unknown functions" involviert.

Ziel dieser Arbeit ist es nach Einrichtung der Hefeaufzucht und der radioaktiven Markierung des Hefeproteoms für die zweidimensionale Elektrophorese, streßsensitive Proteine bzgl. den Induktionen Gefrieren und Lyophilisieren zu detektieren. Die Kenntnis von Regulons bzgl. dieser Osmostreßinduktion ist zum einen für die Lebensmittelindustrie bei der Konservierung von Trockenhefestämmen und zum anderen für die medizinische Forschung mit therapeutischen Mikroorganismen, wie sie beispielsweise als *Saccharomyces boulardii* im Perenterol verwendet werden, von wesentlicher Bedeutung.

Des weiteren wird erstmals eine Extraktionsmethode für zellwandgebundene Proteine in der Hefe präsentiert. Es ist bisher noch nicht gelungen, Zellwandproteine (CWPs) in einer reinen Fraktion zu extrahieren und elektrophoretisch zu trennen. Mycotische Zellwandproteine werden von der Pharmaindustrie als Targetproteine für ein selektiv wirkendes Antimykotika gesehen. Ähnlich dem Penicillin, das bekanntermaßen selektiv auf die Zellwand von Prokaryonten wirkt, ist hier bei Verständnis von Aufbau und Organisation der mycotischen Zellwand, ein Target für ein antimycotisches Agens gegeben, das mit geringen Nebenwirkungen gegen mycotische Infekte eingesetzt werden kann.

Die Detektion eines zentralen streßregulierenden Proteins der Zellwand gelingt nach Extraktion, 2D - elektrophoretischer Trennung und MALDI - TOF - MS Analyse aus der glucangebundenen Fraktion der Zellwandproteine. In diesem, bisher noch nicht beschriebenem Protein ("hypothetical protein") konnte eine neue Domäne erstmals in ihrer Funktion beschrieben werden. Die Inhibition bindender Motive dieser Domäne, kann zu einer basalen Störung des zellulären Streßmanagement führen und somit zur Letalität der Zelle im osmotisch veränderlichen Milieu des Körperinneren. Da diese Domäne nur in fungalen Zellen detektiert werden konnte, ist eine hohe Selektivität des entsprechenden Antimycotikas gegeben.

Die übrigen extrahierten Zellwandproteine stehen der weiteren Identifikation und funktionellen Analyse der mycotischen Zellwand zur Verfügung.

2 Proteomanalyse der cytoplasmatischen Fraktion von *Saccharomyces cerevisiae*

Der cytoplasmatische Extrakt bezeichnet ein Zellysate, mit dem Proteine des Cytosols und der Organellen mit einer quantitativen Aufschlußmethode und einer auf den Gewebetyp geeigneten Extraktion, solubilisiert werden [1]. Bei optimierter Anwendung lassen sich z. B. bei *S. cerevisiae* bis zu 2000 Proteine auf einem 2D Elektrophoresegel darstellen und bei entsprechender Induktion der vitalen Zelle eine funktionale Analyse der Proteine durchführen.

Für die Elektrophorese des cytoplasmatischen Extrakts werden die Probenaufbereitung, die Laufbedingungen und die Proteinvisualisierung auf die entsprechenden Anforderungen optimiert. Um Funktionen unbekannter Proteine durch z. B. Up- oder Downregulations, Neuexpressionen oder Proteinmodifikationen nach Induktion auf die vitale Zelle bestimmen zu können, ist es unerlässlich größere Gelserien miteinander zu vergleichen. Um signifikante Zusammenhänge von exprimierten Protein und Induktion aufzeigen zu können, müssen zuvor Proteinkonzentrationen des Extrakts gemessen, Zellzahlen für die entsprechenden Wachstumsphasen bestimmt und Aufschlußmethode bzw. Solubilisierung optimiert werden [2].

Ziel dieses Kapitels ist die Etablierung einer reproduzierbaren und quantitativen Solubilisierung des radioaktiv markierten cytoplasmatischen Extrakts von *Saccharomyces cerevisiae* mit nachfolgender 2D elektrophoretischer Trennung. Folgende Kriterien waren für Aufzucht, Probenaufbereitung und Elektrophorese des cytoplasmatischen Extrakts maßgebend:

- peptonfreie Aufzucht der Zellen
- hohe Reproduzierbarkeit des Zellaufschlusses und der Solubilisierung
- Extraktion und Stabilisierung von hydrophoben und "low abundance" Proteinen
- reduzierte proteolytische Aktivität im Extrakt
- Linearität der Proteinvisualisierung durch Isotopenmarkierung

2.1 Kenntnisstand und Grundlagen

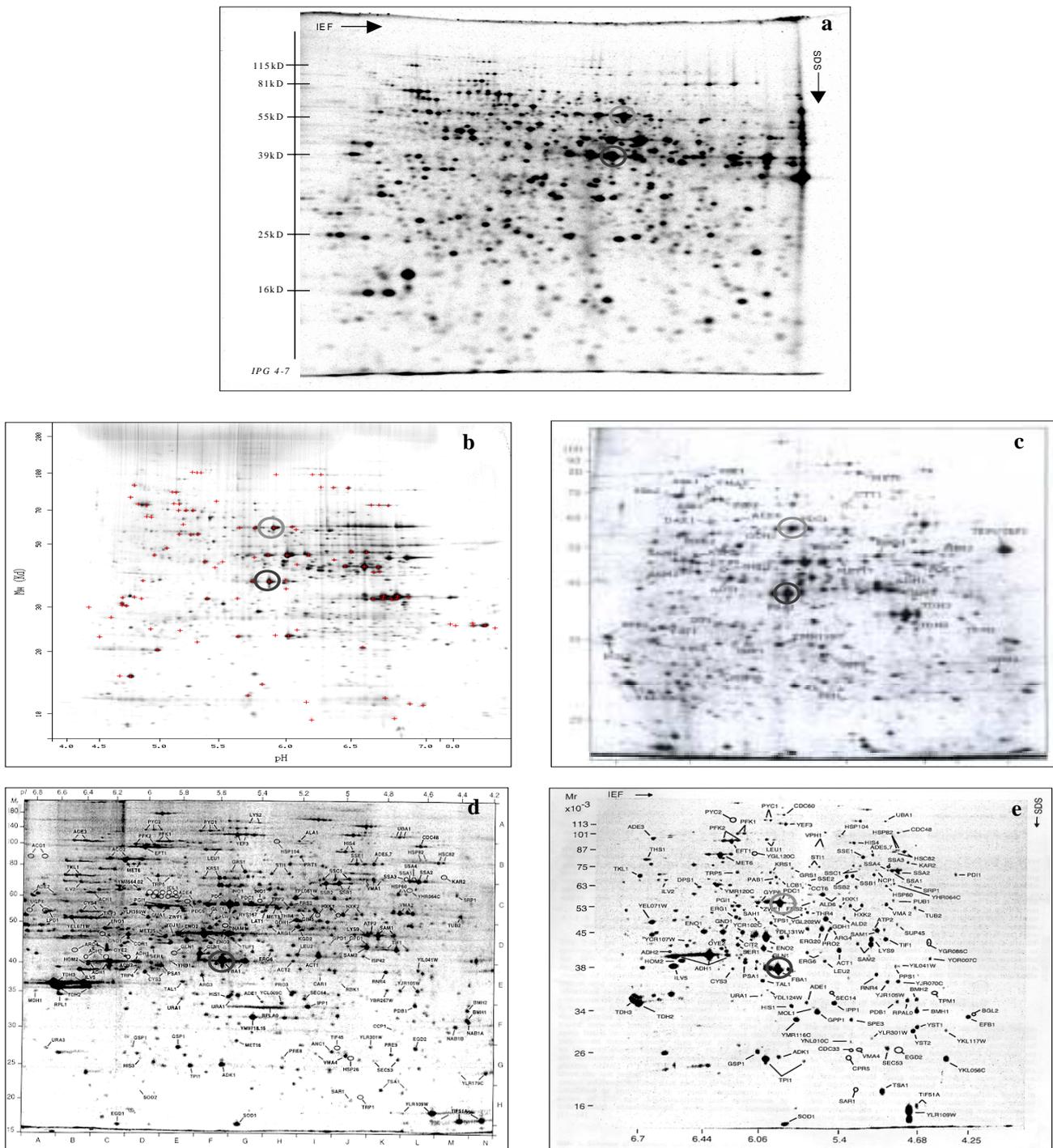


Abb. 1: Vergleich der Mastergel führender mit *S. cerevisiae* arbeitender Arbeitsgruppen.
 (die eingekreisten Spots in den Gelen zeigen identische Proteine auf:
 Fruktosebisphosphataldolase 1 - dunkelgrün; Pyruvatdecarboxylase 1 - hellgrün)

- a) FG Proteomik A. Görg, A. Harder
- b) Expassy database - SwissProt, (www.expasy.ch)
- c) General Biology Göteborg, A. Blomberg
- d) Institut de Biochimie Cellulaires, H. Boucherie,
- e) Proteome - database, J. Garrels (www.proteome.com)

Nachdem 1996 das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* vollständig sequenziert worden war, begannen viele Arbeitsgruppen und entsprechende Datenbanken nach zweidimensionaler elektrophoretischer Trennung des cytoplasmatischen Extrakts funktionale Bestimmungen neuer oder bisher unzureichend beschriebener Proteine durchzuführen (Abb. 1).

Theoretischer pI und Molekulargewichte sämtlicher Proteine konnten bestimmt werden, und durch Vergleich der Aminosäuresequenz von ORFs (open reading frames) zu Proteinen anderer Organismen mit ähnlicher Sequenz (Crossmatching), oder mit Deckungsanalysen (Overlays) von Proteindomänen und Motiven zu bereits identifizierten Proteinen, konnten in relativ kurzer Zeit Proteindatenbanken entstehen, die wesentliche Proteine, wie z. B. die des Energiestoffwechsels oder des Zellzyklus in ihrer Funktion beschreiben und tabellarisieren [3].

Für die Datenbankrecherche sind folgende Adressen verwendet worden:

www.proteome.com

www.genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/

www.expasy.ch

www.ncbi.nlm.nih.gov/

www.sagenet.org/yeast/yeastintro.htm

www.mips.biochem.mpg.de/mips/yeast

<http://weber.u.washington.edu/>

www.proteometrics.com

www.blocks.thrc.org/

www.ncbi.nlm.nih.gov/

Nachdem anfänglich schnelles Wachstum der Proteindatenbanken sind in den letzten zwei Jahren weitere Einträge seltener geworden. Viele Regulons, Proteinmodifikationen oder Signaltransduktionen scheinen in ihrer funktionalen Beschreibung aufwendiger zu sein [4].

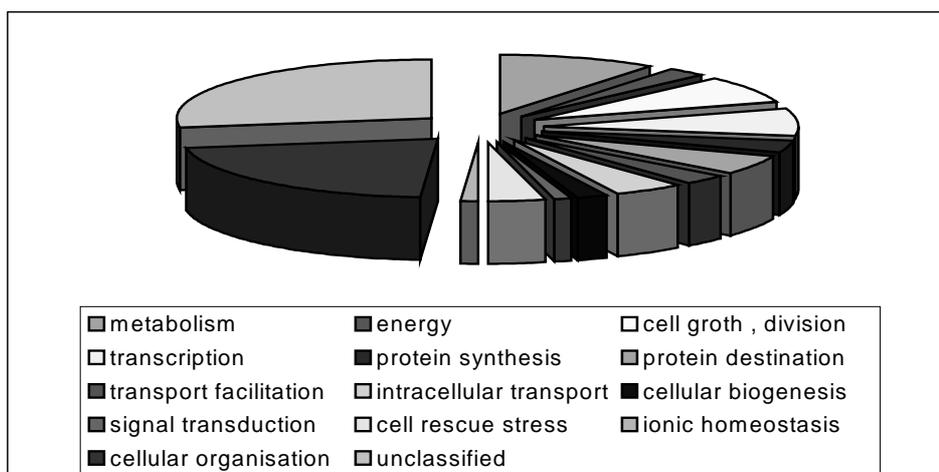


Abb. 2: Klassifizierung der bereits bekannten Proteine von *S. cerevisiae* nach deren Funktionalität (Quelle: www.mips.biochem.mpg.de Stand: Nov. 2000)

Da viele Proteine mehrfache Funktionen ausüben können und diese oft nur in Interaktionen mit anderen Regelkreisläufen erkennbar werden, ist man davon abgekommen, ein einziges Protein bis zur vollständigen Funktionalität zu untersuchen. Man versucht in verschiedenen Ansätzen Informationen über bestimmte Regelkreisläufe und Interaktionen von Proteinen zu sammeln, und fügt diese neue Funktionalität den entsprechenden Proteinen in der Datenbank hinzu [5]. Werden beispielsweise Streßproteine untersucht, können nach Streßinduktion der vitalen Zellen durch Regulation oder Neuexpression Proteine, die in diese Streßantwort involviert sind, bestimmt und identifiziert werden.

Die hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese stellt zusammen mit der Massenspektrometrie (MALDI - MS) eine potente Methode für diese funktionale Analyse bisher unbekannter Proteine dar.

In den Datenbanken führt das dazu, daß verschiedene Kategorien für den Beschreibungsgrad eines Proteins eingeführt werden. Die Übergänge sind fließend, die genaue Kenntnis aller Funktionen der Proteine wird wohl erst bei völligem Verständnis des Organismus vorhanden sein. In der MIPS - Datenbank werden z. B. sechs verschiedene Kategorien für die Proteinbeschreibung verwendet. Der Kenntnisstand für *S. cerevisiae* wurde am 30. Nov. 2000 wie folgt notiert:

- Known Proteins (3303 entries)
- Strong Similarity to Known Protein (237 entries)
- Similarity or Weak Similarity to Known Protein (823 entries)
- Similarity to Unknown Protein (766 entries)
- No Similarity (785 entries)
- Questionable ORFs (448 entries)

In Abb. 2 sind Proteine der Kategorien "questionable ORF" und "no similarity" in der Gruppe der "unclassified" - proteins zusammengefaßt. Proteinfunktionalitäten der Kategorie " similarity to unknown protein" sind Proteine, die in allen Modellorganismen schwer zu bestimmen sind. Tatsächlich hinreichend in ihrer Funktion beschriebene Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* sind etwa 40-50% der 6365 ORFs [6, 7, 8, 9].

Führt man sich vor Augen, daß von nur etwa 30% aller Proteine der mögliche zelluläre Wirkungsort bekannt ist, so erkennt man schnell, daß die funktionale Analyse des Hefeproteoms noch weit von einer Vollendung entfernt ist [10].

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Kultur von *S. cerevisiae*

Die Zellen werden in einer batch - Kultur unter obligat aeroben Bedingungen gezüchtet. Um die gewünschte Reproduzierbarkeit zu erzielen, wird zuerst eine Vorkultur aus den auf Schrägagar gelagerten Zellen hergestellt, die dann als Inokulum für die Hauptkultur verwendet wird. Die Stammbeschreibung von *S. cerevisiae* und *S. boulardii* erfolgt in 3.2.1.

Vorkulturverfahren

Für das Ansetzen der Vorkultur wird mit einer sterilen Impföse (10 µl) Zellmaterial in 30 ml YNB-Nährmedium (300 ml Erlenmeyerkolben) suspendiert und der Erlenmeyerkolben mit einem Silikonkulturstopfen für die aerobe Kultivierung verschlossen. Die Kultur wird bei 30 °C und 172 rpm über Nacht im Rotationsschüttler aerob bebrütet. Für die Ermittlung der Wachstumsphasen wird die Trübung der Nährlösung (optische Dichte) herangezogen und als Transmission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 610$ nm gemessen. Als Reagenzienleerwert für das Photometer dient sterilisiertes YNB- Nährmedium.

Hauptkulturverfahren

Die Hauptkulturen werden mit Hefezellen aus der logarithmisch wachsenden Vorkultur (optische Dichte zwischen 0,5 und 1) angeimpft. Die Impfmenge wird derart bemessen, daß sich in der Hauptkultur eine optische Dichte von 0,1 (entspricht einer Zellzahl von $\sim 1 \times 10^6$ Zellen/ml s. 2.3.1.3) einstellt. Um mögliche Verunreinigungen in der Hauptkultur nachzuweisen, wird von der Vorkultur wie auch von der Hauptkultur ein Sabouraud - Gußplattenabstrich gemacht. Der Abstrich wird im Brutschrank bei 32 °C bebrütet und anschließend im Mikroskop auf Fremdkeime geprüft. Die Hauptkultur wird ebenfalls wie die Vorkultur in der Inkubationshaube auf dem Horizontalschüttler (30 °C, 172 rpm) bebrütet. In Abständen von 30 Minuten wird die optische Dichte ermittelt. Ab einer optischen Dichte von 1,0 muß die zur Messung der Trübung verwendete Hefesuspension verdünnt werden, da bei optischen Dichten über 1,0 verfälschte Ergebnisse durch Beschattungseffekte der Zellen auftreten. Die Nährmedien werden vor Zellinokulation für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Zellernte und Konservierung

Sobald die Hauptkultur die gewünschte optische Dichte erreicht hat, werden 12 ml der Kultur durch Zentrifugieren (7000 rpm, 2 min) geerntet. Das Zellpellet wird in 1 ml sterilem Wasser gewaschen, auf 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei 8000 rpm für 1 min nochmals pelletiert. Durch Bestimmung des Trockengewichtes bzw. der Zellzahl läßt sich das Pellet genau charakterisieren.

Die Lagerung der vitalen Zellen (Inokulum) erfolgt auf Schrägagar unter anaeroben Bedingungen (6 °C). Die Zellen werden alle drei Wochen in YNB - Bouillon revitalisiert.

2.2.1.1 Vergleich verschiedener Nährmedien

Die Hefestämme werden für Revitalisierung und Kontrollabstriche in Sabouraud -, für die elektrophoretischen Trennungen, in YNB- Medium kultiviert.

Für den Vergleich der Proteinexpression bei Verwendung verschiedener Nährmedien werden Zellen zum einen in YNB- Medium und zum anderen in Sabouraud - Bouillon bis zu einer OD von 1,0 kultiviert. Die Zellernte und Konservierung wird wie in 2.3.1, Zellaufschluß bzw. Proteinsolubilisierung wie in 2.3.2 beschrieben, durchgeführt. Der Proteinextrakt aus den Zellen dieser beiden Kulturen wird 2D - elektrophoretisch (IPG 4-7, 4-9) wie in 2.3.3 beschrieben aufgetrennt.

Die Zusammensetzung des *YNB - Mediums* ergibt sich aus dem YNB - Substrat (Difco - Laboratories), einem NaOH / Succinat Puffer, Supplinen und Glucose:

Für die Bereitung des *YNB - Mediums* werden 6,0 g NaOH mit 10 g Succinat in etwa 800 ml dest. Wassers gelöst und filtriert. Mit Succinat bzw. NaOH wird der pH- Wert auf 5,8 titriert und mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Nach dem Abkühlen werden 20 g Glucose, 6,7 g YNB-Substrat zugegeben, dann nochmals filtriert und anschließend bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

YNB-Substrat (hygroskopisches, feinkörniges Substrat)

Gehalt pro Liter:

Vitamine:

Biotin	2 µg
Kalziumpantothenat	400 µg
Folsäure	2 µg
Inosit	2000 µg

Niacin	400 µg
p-Aminobenzoensäure	200 µg
Pyridoxin Hydrochlorid	400 µg
Riboflavin	200 µg
Thiamin Hydrochlorid	400 µg
<i>Spurenelemente:</i>	
Borsäure	500 µg
Kupfersulfat	40 µg
Kaliumjodid	100 µg
Eisenchlorid	200 µg
Mangansulfat	400 µg
Natriummolybdat	200 µg
Zinksulfat	400 µg
<i>Mengenelemente:</i>	
Kaliumdihydrogenphosphat	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Natriumchlorid	0,1 g
Kalziumchlorid	0,1 g
pH-Wert: 4,5	

Sabouraud Medium (grobkörniges, bräunliches Granulat)

Zusammensetzung

20 g/l D (+) Glucose

5,0 g/l Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut)

5,0 g/l Pepton aus Casein (papainisch verdaut)

pH 5,6 bei 25 °C

Konzentration im Kulturmedium: 30 g/l

Das hergestellte YNB - Medium wie auch der Sabouraud - Bouillon (Fertigprodukt - Merck) werden in bidest. Wasser und bei 121 °C für 15 min vor der Inokkulation autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten für die Kontrollabstriche und Schrägagaransätze für die Stammhaltung werden 17 g/l Reinstagar zu den entsprechenden Medien gewogen und durch Kochen gelöst.

2.2.1.2 Wachstumskurven von *Saccharomyces cerevisiae* und *boulardii*

Für die Bestimmung von Wachstumsraten und Verdopplungszeiten werden Wachstumskurven mit den in 2.2.1.1 beschriebenen Kulturbedingungen erstellt. Vitale Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur der Stämme *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces boulardii* werden in einem 30ml Ansatz obligat aerob kultiviert. Das Wachstum der Kultur wird bis zur stationären Phase photometrisch gemessen. Während der ersten und zweiten Generationsphase wird die optische Dichte alle 2 Stunden, während der dritten Generationsphase stündlich und ab der dritten Generationsphase alle 30 Minuten bestimmt.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in den verschiedenen Wachstumsstadien wird die Kultur synchronisiert. Hierzu werden 90 YNB - Agarplatten mit folgender Zusammensetzung gegossen:

6,7 g/l YNB Substrat

20 g/l Glucose

6,0 g/l NaOH

10 g/l Succinat

17 g/l Agar

Aus einer logarithmisch wachsenden Kultur von *S. cerevisiae* (S288c wildtyp) werden Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0,1 in drei 300 ml Erlenmeyerkolben (30 ml YNB - Medium) beimpft. Die drei Ansätze werden zeitgleich in die Inkubationshaube gestellt und aerob bei 30 °C kultiviert (nach 2.2.1).

Nach 40 Minuten wird eine Kultur mit einem 10 µm Sieb steril gefiltert, die zweite Kultur wird 10 Minuten in ein 50 °C heißes Wasserbad gestellt. Die dritte Kultur wird ohne weitere Anwendung unter Standardbedingungen kultiviert. Um die Zellzahl im zeitlichen Verlauf zu bestimmen, werden nach einer OD - Zunahme von 0,1 - 0,3 mit einer sterilen 10 µl Impfschlinge Zellen aus den Hauptkulturen gezogen und auf YNB - Agarplatten vereinzelt. Um zählbare Konzentrationen ausstreichen zu können, werden die Kulturen vorher mit sterilem Medium auf eine OD von 0,2 - 0,4 eingestellt. Die Bestimmung der Lebendzellzahl wird bis zur beginnenden stationären Phase durchgeführt. Nach Inkubation der Agarplatten im Brutschrank bei 32 °C für 64 h werden die Zellen ausgezählt und bei verdünnten Proben mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Die ermittelten Zellzahlen werden im Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

2.2.1.4 Bestimmung des Trockengewichts

Die Kenntnis des Zell Trockengewichts eines geernteten Pellets ist für die Reproduzierbarkeit der extrahierten Proteinmenge unabdingbar.

Zur Ermittlung des Trockengewichts in den einzelnen Wachstumsphasen werden in Abständen von 30 Minuten 1ml Kultur entnommen, zentrifugiert (5 min / 9000 rpm), der Überstand abgezogen und das Eppendorf Tube, dessen Leergewicht zuvor bestimmt worden ist, bei 106 °C im Wärmeschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Zellen werden einer logarithmisch wachsenden Vorkultur von *S. cerevisiae* (S288c wildtyp) entnommen und bis zu einer optischen Dichte von 0,1 angeimpft. Die Bestimmung der Trockengewichte wird bis zu einer Zellkulturdichte von 9,5 durchgeführt.

Das Trockengewicht / ml Kultur wird im Graphen gegen die optische Dichte (610 nm) aufgetragen.

2.2.1.5 Messung der Proteinkonzentration

Um elektrophoretische Trennungen miteinander vergleichen und quantifizieren zu können, muß die auf das Gel zu ladende Proteinmenge bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird der Lowry – Assay - Kit verwendet. Es wird eine Kalibrierkurve erstellt, mit der dann Extinktionen unbekannter Extrakte in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden können. Für die Erstellung der Kalibrierkurve werden BSA (bovine serum albumin)- Lösungen in sechs verschiedene Verdünnungen von 20 – 400 µg/ml hergestellt. Zu 1 ml der Standards (BSA / SDS- Lsg.) werden 1.0 ml Lowry Reagenz pipettiert und 10 min geschüttelt. Nach 20 min Inkubation werden 0,5 ml Folin & Ciocalteus Phenolreagenz zugegeben und die Farbe bei RT 30 min entwickeln lassen. Die entstandene blaue Färbung wird bei einer Wellenlänge von 700 nm im Photometer bestimmt und deren Extinktion gegen die jeweilige Proteinkonzentration im Diagramm aufgetragen.

Für die Kenntnis des Zusammenhangs von Proteinkonzentration, cpm - Wert und Zellwachstum werden radioaktiv markierte Zellen (S288c, Standardkultur siehe 2.2.1.6) mit optischen Dichten von 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 und 9,5 geerntet, gewaschen und nach Standardprotokoll (s. 2.2.2) im SDS -Puffer mit dem Ultraschall aufgeschlossen. Es wird von demselben Extrakt zuerst eine Isotopendetektion, anschließend eine Lowry - Bestimmung durchgeführt. Die Proteinbestimmung dieser Proben nach Lowry wird aus den SDS - Extrakten wie

bei der Aufstellung der Kalibrierkurve durchgeführt. Die szintillatorische ^{35}S -Detektion dieser Proben wird in 2.2.1.6 beschrieben.

Die Kurve der Lowry - Bestimmung wird zusammen in einem Diagramm mit der radioaktiven Proteinbestimmung dargestellt.

2.2.1.6 Radioaktive Markierung (^{35}S)

Um eine ^{35}S - Markierung des Proteoms von *S. cerevisiae* durchführen zu können, muß der Szintillationszähler gequencht und kalibriert, die ^{35}S - Absorption der Zellen gemessen und eine Methode für die Bestimmung der Isotopenkonzentration im Lysepufferextrakt etabliert werden.

Das ^{35}S - Methionin wird bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ im Sicherheitsschrank (Isotopenlabor) gelagert. Die Strahlungskontrolle wird mit einem Geiger - Müller Flächenmeßgerät, die Körperdetektion mit einem Flächenszintillator durchgeführt.

Schwefel - 35 ist ein β - Strahler (167MeV), der in Luftatmosphäre eine Strahlungstiefe von 26 cm, in wäßriger Lösung von 0,32 mm aufweist. Für die szintillatorische Messung ist deshalb auf intensives Trocknen der Proben vor der Messung zu achten. Als Strahlungsprotektion werden Plexiglasschutzgläser (1 -2 cm) verwendet.

Es ist besonders darauf zu achten, daß keine gasförmigen Hydrogensulfide oder Schwefeloxide durch Oxidationen bzw. Erhitzen entstehen, die bei Inhalation nicht absehbare Schäden verursachen.

2.2.1.6.1 Kalibrieren und Quenchen des Szintillationszählers

Für die Darstellung des Zusammenhangs von szintillatorisch bestimmten Counts per minute (cpm) und den entsprechenden μCi - Werten wird aus einer neu determinierten (Herstellerdatierung) ^{35}S - Methionin Charge eine Verdünnungsreihe aufgestellt, indem 3, 5, 10, 15 und 17 μCi auf ein Filterpapier pipetiert werden.

Ausgangscharge: 2 mCi / 133 μl wäßrigen Lösungsmittel

Nachdem bei Raumtemperatur 4 h vorgetrocknet wurde, wird auf jeden Filterstreifen 5 μl Lysepuffer getropft und wiederum 4 h bei RT getrocknet.

Der Szintillationszähler wird mit dem ^{14}C - Lysepufferstandard (s. 2.2.3.1) gequencht, die Software auf ^{35}S - spezifische 167 MeV Strahlungsenergie, einer Meßzeit von 10 Sekunden und einer Mittelwertbestimmung aus drei aufeinanderfolgenden Meßintervallen programmiert.

Die getrockneten ^{35}S - Präparate werden in 5 ml Radiovials gegeben und mit 4,5 ml POPOP - Lösung versetzt. Nach 20 Minuten Inkubation werden die Vials in den Szintillator gegeben und das Programm gestartet. Für die Messungen der Radioaktivität in allen weiteren Proben für diese Arbeit werden folgende Parameter festgelegt:

- Analysevolumen des Lysepufferextrakts: 1 μl
- Trocknungszeit: 4 h bei RT
- Szintillation: Dreifachmessung mit jeweils 10 s Meßzeit
- Strahlungsenergie: 167 MeV (^{35}S Schwefel)

Wertetabelle für die Kalibrierung des Szintillationszählers

μCi S35-Methionin	3	5	10	15	17
$\text{cpm}10^6 / \mu\text{l}$	2,9	4,3	7,2	9,5	10,0

2.2.1.6.2 ^{35}S - Absorption der Hefezellen

Es wird die Abnahme der ^{35}S - Konzentration im zellfreien Überstand des Nährmediums szintillatorisch bestimmt. Dazu wird eine Kultur von S288c nach Standardprotokoll (s. 2.2.1) bis zu einer OD von 0,5 kultiviert. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension werden in drei 10ml Erlenmeyerkolben pipetiert und unter Standardbedingungen (s. 2.2.1.2) inkubiert. Diese drei einzelnen Kulturen werden zeitgleich mit drei verschiedenen Konzentrationen an ^{35}S - Methionin markiert und während einer 1/4 Generationszeit (30min) markiert:

→ 10 $\mu\text{Ci} / 1 \text{ ml}$ → 50 $\mu\text{Ci} / 1 \text{ ml}$ → 100 $\mu\text{Ci} / 1 \text{ ml}$

Zur Bestimmung des freien Methioningehaltes im Kulturmedium wird zu jedem Meßpunkt die Zellsuspension mit 10000 rpm für eine Minute zentrifugiert und anschließend der Überstand durch OD - Messung mit dem Nullwert des zellfreien Mediums verglichen. Für die ^{35}S - Methioninbestimmung wird 1,0 μl zellfreies Medium aus dem Überstand entnommen und nach Standardprozedur (s. 2.2.1.6.1) im Szintillationszähler gemessen. Messungen werden jeweils nach 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten durchgeführt. Es wird ein Graph erstellt, indem die Abnahme des freien ^{35}S - Methionin gegen die Zeit aufgetragen wird.

2.2.1.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration durch ³⁵S - Detektion

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration im Extrakt werden 10 Ansätze (25 ml) nach Standardprotokoll (s. 2.2.1) parallel kultiviert. Die Hauptkulturen werden bei einer OD von 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 und 9,5 für die Dauer einer 1/4 Generationszeit mit 10 μ Ci/ml radioaktiv markiert. Anschließend werden 12 ml der jeweiligen Kulturlösung geerntet, gewaschen und nach Protokoll 2.2.2 mit Ultraschall in SDS - Puffer aufgeschlossen und durch Schütteln bei RT (10 min) extrahiert.

Für die Bestimmung des ³⁵S - markierten Proteins wird 1 μ l aus den Extrakten der verschiedenen Zellstadien entnommen und nach 2.2.1.6 eine szintillatorische Isotopenmessung durchgeführt.

Die Kurve wird zusammen mit dem Graph der Proteinbestimmung nach Lowry für nicht radioaktiv markierte Proben (s.2.2.1.5) dargestellt.

2.2.2 Probenaufbereitung für die Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion

Die Probenaufbereitung für die elektrophoretische Trennung des cytoplasmatischen Extrakts beinhaltet im wesentlichen den Zellaufschluß und die Proteinsolubilisierung. In diesem Kapitel werden diese Schritte für die Extraktion des radioaktiv markierten cytoplasmatischen Extrakts beschrieben.

Es werden verschiedene Zellaufschlüsse (Autolyse, enzymatische Lyse, Grinding, Ultraschall) getestet und Parameter für optimierte Zellaufschlußraten und der Reproduzierbarkeit bestimmt.

Im zweiten Schritt der Probenaufbereitung wird die Solubilisierung und Disaggregation der Proteine durch die Anwendung eines optionalen Schrittes, des Präsolubilisierens in SDS - Puffer, verglichen und ausgewertet.

2.2.2.1 Zellaufschlüsse ³⁵S - markierter Proben

S288c wird in einem Ansatzvolumen von 60 ml nach Standardprotokoll bis zu einer optischen Dichte von 1,0 kultiviert. Dieses Zellvolumen wird mit insgesamt 450 μ Ci (7,5 μ Ci/ml) für 1/4 der Generationszeit (30 min) markiert.

Nach der ³⁵S - Inokulation wird die Zellsuspension in fünf gleiche Ansätze zu 12ml aufgeteilt und bei 7000 rpm für 5 min geerntet. Der Überstand wird sorgfältig abpipettiert und im radioaktiven Sonderabfall entsorgt. Die fünf äquivalenten Pellets

mit einem Trockengewicht von etwa 5 mg und einer Zellzahl von ca. 10^7 Zellen werden nun für den Vergleich der verschiedenen Zellaufschlüsse verwendet.

2.2.2.1.1 Autolyse, enzymatische Lyse, mechanischer und physikalischer Aufschluß

Von den fünf radioaktiv markierten Pellets werden vier für den Vergleich der verschiedenen Aufschlüsse herangezogen, das fünfte wird für die Gesamtproteinmessung verwendet.

Folgende vier Zellaufschlüsse werden verglichen:

- a. Zerreiben der Zellen im Mörser unter Stickstoffkühlung (-196°C)*
- b. Autolyse der Zellen bei Inkubation in Toluol*
- c. Enzymatischer Aufschluß mit einer 1,3 Glucanase*
- d. Zellaufschluß durch Scherkräfte von Ultraschallwellen*

zu a)

Das Pellet wird in 200 µl Standardlysepuffer resuspendiert und in einen mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser pipettiert. Es wird langsam Stickstoff hinzugegeben und anschließend die erstarrte Suspension mit dem Pistill zerrieben. Nachdem der Stickstoff abgedampft ist wird das Zellysate mit 500 µl Standardlysepuffer (s. 2.2.2.2) im Mörser aufgenommen und anschließend in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gesammelt. Die Suspension wird 45 min bei RT geschüttelt, dann mit 14000 rpm zentrifugiert, anschließend der Überstand abpipettiert und mit dem so erhaltenen Proteinextrakt die Szintillationsmessung (siehe 2.2.1.6) durchgeführt.

Zur Bestimmung des Restproteingehalts im Rückstand wird dieser in 1 ml Standardlysepuffer gewaschen und anschließend nochmals zentrifugiert (5 min, 14000 rpm).

Die gereinigten Zellfragmente werden in 700 µl Standardlysepuffer aufgenommen und die radioaktive Messung des Proteingehalts (siehe 2.2.1.6.3) durchgeführt.

Zur Bestimmung dieses Restproteingehalts wird bei allen vier Aufschlüssen (a.- d.) gleich verfahren.

zu b)

Das Zellpellet wird in 200 µl Toluol und 500 µl Standardlysepuffer resuspendiert. Die Suspension wird für 36 h bei 28 °C geschüttelt. Anschließend wird die Suspension mit 14000 rpm zentrifugiert. Aus den nach der Zentrifugation entstandenen

Mischfraktion wird der Extrakt für die radioaktive Messung und die 2D Elektrophorese entnommen. Die pelletierten Zellreste werden wie unter a) beschrieben behandelt.

zu c)

Für den enzymatischen Aufschluß werden 200 units 1,3 Glucanase (Lyticase Sigma L2524 *Arthrobacter luteus* - Isolat) in 200 µl Trispuffer (0,5M Tris/HCl pH 6,8) gelöst. Nach schütteln für 10 min bei 25 °C wird die Enzymlösung auf das Zellpellet pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Suspension mit 500 µl Standardlysepuffer verdünnt und 45 min bei RT geschüttelt. Nach Zentrifugation mit 14000 rpm wird aus dem Überstand die Aktivität bestimmt; mit dem Rückstand wird wie in a) beschrieben verfahren.

zu d)

Das Pellet wird in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und bei gleichzeitiger Eiswasserkühlung (2 °C) mit dem vorgekühlten Ultraschallstab behandelt. Der Aufschluß wird in 15 Intervallen von 1s Agitationszeit durchgeführt. Die Suspension wird mit 500 µl Lysepuffer verdünnt und 45 min bei RT geschüttelt. Der Überstand wird abpipettiert und die 35S - Aktivität gemessen. Mit dem Rückstand wird verfahren wie in a) beschrieben.

Für den Aufschluß mit dem Ultraschallstab ist eine Mindestmenge von 200 µl Suspension nötig um einen quantitativen Zellaufschluß durchführen zu können. Beim Zellaufschluß mit dem Ultraschallstab ist auf folgendes zu beachten:

- es müssen 1,5 ml Gefäße mit konisch zulaufender Form verwendet werden
- das Volumen im Eppendorfgefäß muß zwischen 150 µl und 200 µl betragen
- die Agitationsspitze des Gerätes muß zentrisch plaziert sein und darf die Gefäßwand nicht berühren
- das Gefäß muß während der Agitation in konstanter Position gehalten werden
- der Metallstab muß möglichst tief in die Suspension eintauchen
- tritt ein Schäumen der Probe auf, ist die Probe zu verwerfen
- wird in der Kälte aufgeschlossen muß der Stab und die Suspension vorgekühlt werden
- die Agitationszeit und Leistung muß bzgl. des Zellstadiums und der Zellzahl optimiert werden

Bei den Aufschlüssen durch Autolyse, enzymatischen Verdau und Ultraschall wird die gesamte Prozedur in einem einzigen Eppendorfgefäß durchgeführt. Das Gesamtvolumen aller Ansätze beträgt 700 µl.

Das fünfte Pellet wird ebenfalls in 700 µl Standardlysepuffer resuspendiert und ohne weiteren Aufschluß für die Gesamtaktivitätsbestimmung verwendet.

2.2.2.1.2 Mikroskopische Dokumentation der Aufschlüsse

Für die mikroskopische Dokumentation der Aufschlüsse werden Methyleneblau - Färbungen von den aufgeschlossenen Zellen (S288c) angefertigt.

Nachdem das Lysat der vier verschiedenen Aufschlüsse mit jeweils 1ml bidest. Wasser gewaschen worden ist, wird mit 7000 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 250 µl Methyleneblaulösung (c= 0,4 mg/ml) resuspendiert und 10 min inkubiert. Nach Inkubation werden jeweils 20 µl der vier Lysate auf einen Objektträger pipettiert und mit zweifachem Durchziehen durch eine nichtleuchtende Bunsenbrennerflamme fixiert. Nachdem die überstehende Farblösung abgezogen worden ist, wird das Präparat mit einem Deckglas geschlossen.

Die Präparate werden im Lichtmikroskop bei 1200 - facher Vergrößerung digitalisiert.

2.2.2.2 Proteinsolubilisierung und Disaggregation

Für eine verbesserte Löslichkeit, insbesondere schwerlöslicher Proteine und eine Reduzierung von proteolytischer Aktivität wird im folgenden ein zusätzlicher Schritt in der Probenaufbereitung für die Extraktion der cytoplasmatische Fraktion untersucht, die Präsolubilisierung in SDS.

In einem 250 ml Kulturkolben werden 25 ml YNB - Medium mit Zellen des Stammes S288c nach Standardprotokoll bis zu einer optischen Dichte von 0,5 kultiviert. Aus dem Gesamtansatz werden 14 ml entnommen und mit 320 µCi 35S - Methionin (spez. Aktivität: 22,8 µCi/ml) für 30 min markiert. Nach der Markierung wird der Ansatz in sieben äquivalente Volumina zu 2 ml aufgeteilt, anschließend durch Zentrifugation

(4 min, 7000 rpm) geerntet und mit jeweils 1 ml sterilem bidest. resuspendiert und gewaschen. Nach Zentrifugation wird die Waschlösung im Überstand quantitativ entfernt und die so erhaltenen sieben gleichen Pellets werden für die Solubilisierungen verwendet. Die Proteinsolubilisierung und Disaggregation wird auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt:

- a. drei der oben hergestellten Pellets werden in SDS - Puffer resuspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen, das Zellysat gekocht, gekühlt, mit Lysepuffer verdünnt und anschließend geschüttelt.
- b. weitere drei Pellets werden in Lysepuffer durch Ultraschall aufgeschlossen, verdünnt und anschließend geschüttelt.

Das siebte Pellet wird zur Erfassung des Gesamtproteingehalts ohne Zellaufschluß direkt für die Szintillationszählung verwendet.

zu a. Zu jedem der drei Pellets (jeweils 2,5 mg dw) wird 200 µl heißer SDS - Puffer (95 °C) pipettiert, 2 min im Vortexer resuspendiert und schließlich mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluß wird die Suspension 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend in einem Eiswasserbad auf 10 °C gekühlt. Das Zellysate wird mit 500 µl Lysepuffer verdünnt und die so hergestellten drei äquivalenten Proteinextrakte für jeweils 10 min, 1 h und 24 h auf einem Rotationsschüttler (220 rpm) bei Raumtemperatur geschüttelt.

zu b. Das Pellet wird in 200 µl Lysepuffer gelöst, mit dem Vortexer behandelt (2 min) und anschließend mit Ultraschall unter Eiswasserkühlung (5 °C) aufgeschlossen (s. 2.2.2.1). Das erhaltene Zellysate wird mit 500 µl Lysepuffer verdünnt und die Pellets wie in a) für jeweils drei verschiedene Intervalle (10 min, 1 h, 24 h) bei RT geschüttelt. Die Präparationen a und b werden für jedes Pellet in jeweils einem einzigen 1,5 ml Eppendorf Gefäß durchgeführt. Nach den Extraktionsintervallen werden die Lysate für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert; von dem Überstand wird jeweils 1 µl für die Aktivitätsmessung verwendet. Für die elektrophoretische Trennung werden jeweils 3 Mio cpm auf ein Gel (IPG 4-7) geladen.

Der Rückstand wird nach Abpipettieren des Überstandes einmal mit 1ml Lysepuffer gewaschen und zur radioaktiven Bestimmung des Restproteins in 700µl Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert. Aus dieser Suspension wird 1 µl für die Strahlungsmessung entnommen.

Das siebte Pellet wird ohne einen Zellaufschluß durchzuführen, in 700 µl Lysepuffer aufgenommen und mehrmals gevortext. Aus der Zellsuspension wird 1 µl für die radioaktive Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Standardprotokoll (2.2.1.6.3) verwendet.

Pufferzusammensetzungen: SDS- Puffer: 1% (w/v) SDS; 0.1M TrisHCl, pH 8.8
Standard / Lysepuffer: 7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff,
4% (w/v), CHAPS, 1% (w/v) DTT,
0.5% Pharmalyte 3-10

Die 2D - Gele der verschiedenen Solubilisierungen werden computerdensitometrisch ausgewertet. Es kommt die Software von Pharmacia (ImageMaster) zur Anwendung. Die Image Analyse wird mit identischen Bearbeitungsschritten (Spotselection,

-detektion, -matching) durchgeführt. Nach der Image Analyse wird eine densitometrische Spotbeschreibung und Auswertung der einzelnen Gele durchgeführt.

Folgende Selektionsparameter werden für die Gelbearbeitung gewählt:

- Sensitivity 9850
- Noise 5
- Operator size 11
- Background 88

2.2.3 Durchführung der zweidimensionalen Elektrophorese (IPG - Dalt)

Die hochauflösende 2D Elektrophorese wird eingesetzt, um komplexe Proteingemische in eine weitaus größere Anzahl von Einzelkomponenten aufzutrennen, als dies durch 1D elektrophoretische Trenntechniken möglich ist. Die 2D Elektrophorese mit immobilisierten pH - Gradienten (IPG - Dalt) wird nach der Methode von *Görg et al.* [48, 58, 60] durchgeführt. In der ersten Dimension werden die Proteingemische nach den isoelektrischen Punkten der Gemischbestandteile mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung im immobilisierten pH - Gradienten (IEF - IPG) aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgt die weitere Trennung der Gemischbestandteile nach Molekulargewichten mit der SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE) in einem horizontalen oder vertikalen System.

In der Praxis wird die erste Dimension (IEF) in individuellen IPG - Gelstreifen durchgeführt. Nach Beendigung der IEF erfolgt eine Äquilibration mit SDS - Puffer, d.h. die Proteine werden mit SDS beladen, und die IPG - Streifen zur Durchführung der zweiten Dimension auf die Oberfläche eines horizontalen oder die Oberkante eines vertikalen Gels gebracht.

Um eine hohe Signifikanz und Vergleichbarkeit zu erzielen, wird die elektrophoretische Ausrüstung in der Weise gewählt, daß zu vergleichende Gele in der ersten als auch in der zweiten Dimension parallel aufgetrennt werden können.

2.2.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Gießen der IPG - Gele

Lösungen:

- Acrylamid/Bisacrylamid - Lösung (30% T, 3% C)
- Immobililine - Starterlösungen

(Immobiline pK 3,6, pK 4,6, pK 6,2, pK 7,0, pK 8,5, pK 9,3 als Fertiglösungen)

- Ammoniumpersulfat-Lösung APS - Lösung (40%ig)
- N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin TEMED
- Rehydratisierlösung für die IPG- Gelstreifen

(8 M Harnstoff, 0,5% CHAPS, 0,2% DTT, 0,2% Pharmalyte pH 3 - 10)

Zur Herstellung von 50 ml Rehydratisierlösung 25,0 g Harnstoff in etwa 25 ml dest. Wasser lösen und auf 50 ml auffüllen. Eine Spatelspitze Mischbettionentauscher MB-1 zugeben, 10 min rühren und filtrieren. Zu 48 ml des Filtrats 0,25 ml Pharmalyte und 100 mg DTT geben und mit dest.

Wasser auffüllen. Rehydratisierlösung unmittelbar vor Gebrauch herstellen und nicht über 37 °C erwärmen.

IEF - Gele mit immobilisierten pH - Gradienten werden mit Hilfe eines Mikrogradientenmischers in einer Gießkassette auf GelBond PAGfilm polymerisiert, welche aus zwei Glasplatten besteht, von denen die Deckplatte eine 0,5 mm dicke Silikondichtung trägt. Es werden zwei Immobiline - Starterlösungen benötigt, die unterschiedliche Mengen an Immobilinen und Glycerin enthalten (schwere saure bzw. leichte basische Lösung), um einen Dichtegradienten aufzubauen, der den pH - Gradienten vor der Polymerisation des Geles stabilisiert. Beide Starterlösungen enthalten gleiche Konzentrationen an Acrylamid und Bisacrylamid, wobei deren Konzentration relativ niedrig gehalten wird (4% T, 3% C), um den Molekularsiebeffekt der Matrix gering zu halten. Die pH - Werte der beiden Starterlösungen entsprechen dem Anfangs- und Endpunkt des gewünschten pH - Gradienten. Zur Verbesserung der Polymerisationskinetik werden beide Starterlösungen mit 1N Natronlauge bzw. 1N Essigsäure auf pH 7 titriert. Der Gradientenmischer wird auf einen Magnetrührer gestellt und die Mischkammer mit einem entsprechenden Rührfisch versehen. Das Durchlassventil zwischen Reservoir und Mischkammer sowie die Auslassklemme werden geschlossen.

Die Öffnung des Auslaufschlauches wird in den Spalt am oberen Rand der vorgekühlten Gießkassette eingeführt. Für ein Gel der Größe 190x 250x 0,5 mm² werden je 12 ml der beiden Immobiline - Starterlösungen benötigt. Die saure, schwere Lösung wird in die Mischkammer eingefüllt und der Gradientenmischer eingeschaltet (etwa 500 rpm). Das Durchlassventil wird kurz geöffnet, um den Verbindungstunnel zu entlüften. Eventuell in das Reservoir gelangte Lösung wird wieder in die Mischkammer zurückpipettiert. Nun wird die basische Lösung in das Reservoir pipettiert, die Katalysatoren zugegeben und mit Hilfe eines Spatels vermischt. Nach Öffnen des Durchlassventils und der Auslassklemme wird die

vorgekühlte Gießkassette bis zur Oberkante befüllt. Um den Dichtegradienten ausnivellieren zu lassen, wird die Gießkassette 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird das Gel 60 min bei 50 °C im Trockenschrank auspolymerisiert. Nachdem das Gel auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird es vorsichtig aus der Kassette entnommen und 6 x 15 min in dest. Wasser und 30 min in 2 %-iger Glycerinlösung gewaschen. Anschließend wird es über Nacht in einem staubfreien Schrank mit einem Ventilator getrocknet, die Geloberfläche mit einer Klarsichtfolie abgedeckt, in eine Plastikfolie eingeschweißt und kann bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden (für bis zu 2 Jahre).

Quellen der IPG - Streifen

Lösung (30 ml):

Für die Herstellung der Quelllösung werden 14,4 g Harnstoff und 6,1 g Thioharnstoff in 24,6 ml Wasser gelöst. Eine Spatelspitze Mischbettonenaustauscher zugeben, 10 min rühren und filtrieren. Zu 30 ml des Filtrats werden 120 mg DTT, 300 mg CHAPS und 150 µl Pharmalyte 3-10 gegeben. Die Quelllösung wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und nicht über 37 °C erwärmt.

Die in dieser Weise hergestellten IPG - Streifen werden mit Hilfe einer Papierschneidemaschine in 3 mm breite Einzelstreifen geschnitten und die Schutzfolie abgezogen (Abb. 3).

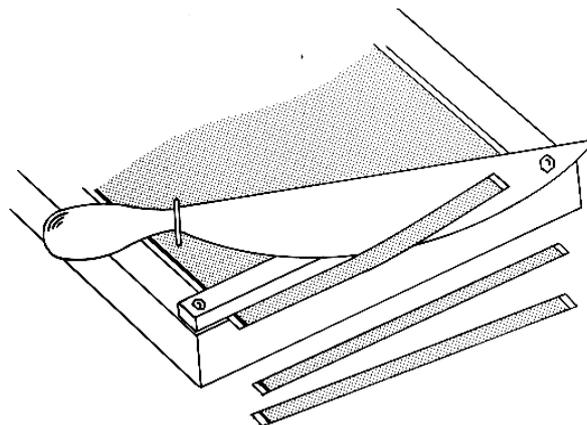


Abb. 3: Schneiden von IPG- Streifen für die isoelektrische Fokussierung

Die Rehydratisierung der IPG - Gelstreifen erfolgt im Reswelling - Tray. Je IPG - Gelstreifen werden 350 µl Quelllösung in eine Rinne des Trays pipettiert, und der Streifen mit der Gelseite nach unten hineingelegt. Es ist darauf zu achten, daß die

Unterseite des Streifen vollständig mit Flüssigkeit benetzt ist. Anschließend wird er mit 1 ml Silikonöl überschichtet und über Nacht im geschlossenen Tray rehydratisiert.

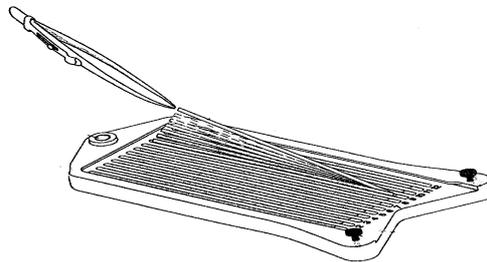


Abb. 4: Rehydratisierung der IPG- Streifen im Reswelling - Tray

Fokussierung der IPG Streifen

Nach dem Öffnen des Reswelling - Trays werden die gequollenen IPG - Gelstreifen herausgenommen und kurz in dest. Wasser eingetaucht, um ein Auskristallisieren des Harnstoffs bei der IEF aufgrund überschüssiger Quelllösung zu verhindern. Danach werden die IPG - Gelstreifen mit der Gelseite nach oben auf ein mit dest. Wasser angefeuchtetes Blatt Filterpapier gelegt und ihre Oberfläche mit einem mit dest. Wasser angefeuchteten Filterpapier abgetupft. Um Volumina bis 160 μ l Extrakt auftragen zu können, wird für die Fokussierung der DryStrip Kit verwendet (Abb. 5).

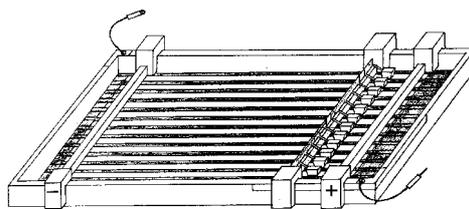


Abb. 5: IEF der IPG-Einzelstreifen im DryStrip Kit

Auf die mit Kerosin benetzte Kühlplatte der Fokussierungskammer wird der Rahmen und die Folie gelegt. Anschließend werden die IPG - Gelstreifen auf der Folie positioniert. Hierbei ist darauf zu achten, daß die sauren Gelenen zur Anode zeigen. Insgesamt werden 12 Streifen parallel fokussiert, wobei 2 Streifen als Randstreifen fungieren. Über eine Brücke werden die konisch zulaufenden Cups mit ihren Cuphaltern in Richtung Anode befestigt, so daß sie dicht mit den Gelstreifen abschließen. Die Probenauftragsmenge pro Cup beträgt 160 μ l. Nun werden zwei 5 mm breite Elektrodenstreifen (aus 1 mm starkem Filterkarton MN 440) auf eine

Länge zurecht geschnitten, die der Gesamtbreite aller nebeneinander liegenden IPG - Gelstreifen entspricht. Diese beiden Elektrodenstreifen werden mit dest. Wasser angefeuchtet, über die kathodischen und anodischen Enden der IPG - Gelstreifen gelegt und leicht angedrückt. Anschließend wird der Kontakt über Elektrodenbrücken hergestellt und der Rahmen mit Silikonöl aufgefüllt, um ein Austrocknen der Geloberfläche und ein Auskristallisieren von Harnstoff zu verhindern. Die Fokussierung findet bei 20 °C (Kryostat) statt, die weiteren Parameter für die IEF sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Parameter für die isoelektrische Fokussierung (IPG 4-7 und 4-9)

pH-Gradient 4 - 7 / 4 - 9 180 mm	Spannung	Stromstärke pro IPG-Gelstreifen	Zeit
Probeneintritt	150	0,05 mA	2 h
	300	0,05 mA	2 h
	1500	0,05 mA	12 h
Fokussierung	3500	0,05 mA	6 h

Σ Voltstunden = 39900 Vh

Nach beendeter IEF werden die IPG - Gelstreifen in einer Klarsichthülle fixiert und, wenn sie nicht sofort benötigt werden, bei -70 °C gelagert.

2.2.3.2 Äquilibration der IPG - Streifen

Äquilibration der IPG- Gelstreifen

Lösungen:

Für die Herstellung des Äquilibrationpuffers werden 36 g Harnstoff; 30 g Glycerin; 2 g SDS und 3,3 ml Trenngelpuffer in dest. Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

Zur Äquilibration (Abb. 6) werden jeweils zwei IPG- Gelstreifen mit 10 ml Äquilibrationpuffer, in dem zuvor 100 mg DTT gelöst wurden, in ein 200 mm langes Reagenzglas überführt, dieses mit Parafilm verschlossen und 15 min auf einem Horizontalschüttler bewegt.

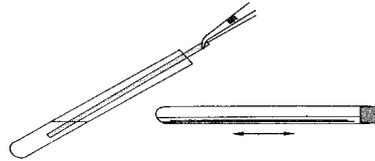


Abb. 6: Äquilibrieren der IPG - Gelstreifen mit DTT und Jodacetamid

Anschließend werden die Streifen in ein weiteres Reagenzglas gegeben, in dem sich 480 mg Jodacetamid gelöst in 10 ml Äquilibratorpuffer befinden und für weitere 15 min geschüttelt. Nun werden die IPG - Gelstreifen in den Tankpuffer getaucht und mit der Längskante auf ein Filterpapierblatt gestellt, um die überschüssige Flüssigkeit abtropfen zu lassen.

2.2.3.3 SDS - PAGE

Herstellung der SDS - Gele

Lösungen:

-Acrylamidlösung (30,8% T; 2,7% C):

300 g Acrylamid und 8 g Bisacrylamid in etwa 500 ml dest. Wasser lösen, mit einer Spatelspitze Mischbettionenaustauscher versetzen, rühren, filtrieren und mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.

-Gelpuffer:

90,83 g Trizma - Base und 2 g SDS in etwa 300 ml dest. Wasser lösen, mit 4N HCl auf pH 8,6 titrieren und mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen.

-Ammoniumpersulfatlösung (APS) (10%):

1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml dest. Wasser lösen.

250 g Glycerin und 250 g bidest. Wasser mischen. Anschließend die Lösung mit 0,001% Bromphenolblau versetzen.

-Gellösung (13% T):

591 ml Acrylamidlösung, 350 ml Gelpuffer, 396 ml dest. Wasser und 70 g Glycerin (p.a.) mischen und kurz vor dem Gießen 7 ml APS- Lösung (10%) und 66 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugeben.

-Glycerinlösung (50%):

-Gelpuffer-gesättigtes 2-Butanol:

20 ml Gelpuffer werden mit 30 ml 2-Butanol vermischt und geschüttelt. Nachdem sich die Phasen wieder getrennt haben, die leichtere 2-Butanolphase abdekantieren und zum Überschichten der Glasplatten verwenden.

Jeweils zwei durch ein Scharnier verbundene Glasplatten bilden eine Gießkassette (Abb. 6), in welcher die 200 x 237 x 1 mm³ großen SDS - Gele hergestellt werden.

Die gesamte Füllhöhe der Kassette kann nicht ausgenutzt werden, da 2 cm für den IPG- Streifen und die Agaroselösung frei bleiben müssen. Daraus ergibt sich eine tatsächliche Gelhöhe von 18 cm.

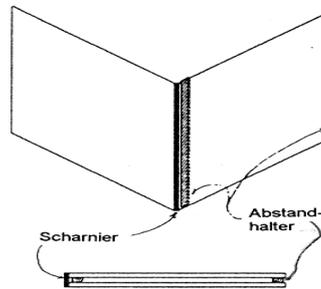


Abb. 6: Aufbau einer Glaskassette zum Gießen der Gele

Insgesamt werden 22 Gießkassetten alternierend mit Klarsichtfolie in die Gießkammer eingeordnet, wobei am linken und rechten Ende je ein Stück Schaumgummimatte die Kassetten abschließt. Sie sollen eine gleichmäßige Druckverteilung über die gesamte Kassettenoberfläche gewährleisten. Beim Schließen der Gießkammer wird die Deckplatte justiert und über Kreuz festgeschraubt. Zuerst wird das Gießreservoir, dessen Auslauf mit einem Trichterschlauch verschlossen ist, mit der Glycerinlösung befüllt. Danach wird die mit Katalysatoren versetzte Gellösung über den Trichter in die Gießkammer (Abb.7) eingefüllt. Anschließend wird der Trichter herausgezogen, wodurch die Gellösung durch die Glycerinlösung unterschichtet wird. Der untere Spiegel der Gellösung reicht dadurch genau bis zur Unterkante der Gießkassetten. Um nach der Polymerisation eine waagerechte Oberkante der Gele zu erhalten, muß jedes Gel mit 1 ml Gelpuffer-gesättigtem 2 - Butanol überschichtet werden. Die anschließende Polymerisation dauert bei Raumtemperatur 12 bis 16 Stunden.

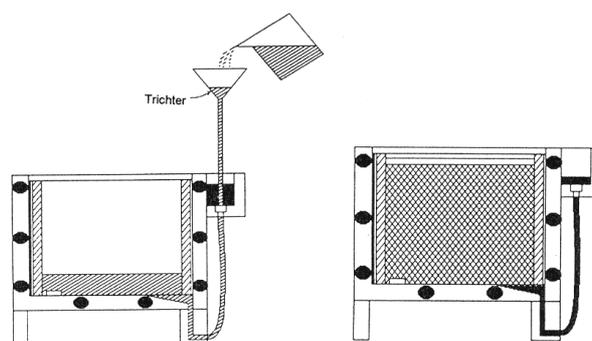


Abb. 7: Einfüllen der Gellösung in die Gießkammer und Unterschichten mit Glycerinlösung

Nach beendeter Polymerisation werden die Glasplatten entnommen und außen gründlich mit dest. Wasser abgewaschen, wobei auch das Butanol von der Geloberkante entfernt wird. Um die noch enthaltene Waschflüssigkeit ablaufen zu lassen, werden die Gießkassetten mit der Oberkante nach unten in ein Drahtgestell gestellt. Die beiden äußeren Gele müssen verworfen werden, da bei ihnen keine gleichmäßige Dicke gewährleistet ist. Nicht sofort benötigte Gele können, in Folie luftdicht verpackt, bis zu zwei Tagen bei 4 °C aufbewahrt werden.

Durchführung der SDS - PAGE im vertikalem System

Lösungen:

-Tankpufferkonzentrat:

19,9 g SDS; 299,6 g Glycin; 58,0 g Trizma - Base in 3 l dest. Wasser lösen. Die Lösung in die Elektrophoresekammer geben und mit 16,9 l dest. Wasser nachspülen, so daß das Gesamtvolumen 19,9 l beträgt.

-Gelpuffer:

18,2 g Trizma - Base und 0,4 g SDS in etwa 80 ml dest. Wasser lösen. Mit 4 N HCl auf pH 8,8 titrieren und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen und filtrieren.

-Agaroselösung:

100 ml Tankpuffer mit 500 mg Agarose und 300 µl Bromphenolblaulösung aufkochen und im Wasserbad auf 80 °C temperieren.

Die Dalt - Elektrophoresekammer wird mit 14 l dest. Wasser befüllt und die Umwälzpumpe eingeschaltet. Anschließend werden 3 l Tankpufferkonzentrat zugegeben und mit 2,9 l dest. Wasser nachgespült, das einem Gesamtflüssigkeitsvolumen von 19,9 l im Tank entspricht. Zur gründlichen Durchmischung sind die Barrierekämme für ca. 1 h hochzuziehen. Den Tankpuffer auf 20 °C temperieren. Die äquilibrierten IPG- Gelstreifen werden nun mit der Gelseite zum Betrachter und der Kathode nach rechts mittels einer Pinzette in die Kassette eingeschoben (Abb.9). Anschließend werden 3 bis 5 ml Agaroselösung in die Kassette gegeben und der Streifen mit einem kleinen Spatel bis zum SDS- Gel geschoben, so daß beide bündig aneinander liegen. Die Agaroselösung erstarrt und fixiert den Streifen.

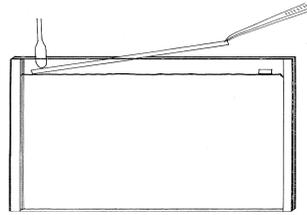


Abb. 9: IPG- Gelstreifen auflegen (zweite Dimension)

Je 7 μl Molekulargewichtsmarker (14 bis 94 kD) werden auf 2 x 5 mm² große Filterpapierstückchen pipettiert, luftgetrocknet und ebenso wie die IPG - Gelstreifen neben diesen in die Gelkassette eingebracht.

Nachdem obiger Arbeitsvorgang mit allen IPG - Gelstreifen durchgeführt worden ist, werden die Kassetten mit dem Scharnier nach unten zwischen die Barrierekämme gesteckt. Der überstehende Tankpuffer wird abgesaugt und der Kammerdeckel geschlossen. Die Proteine werden in vertikaler Laufrichtung aufgetrennt. Die Elektrophoreseparameter betragen für den Probeneintritt (1 h) 80 mA und anschließend 160 mA bei einer Laufzeit von etwa 18 h. Die Stromspannung wird auf einen Setwert von 200 V eingestellt, der aber nicht erreicht wird. Der Lauf ist beendet, wenn die Bromphenolblaufront vollständig aus dem Gel gewandert ist.

Nach Beendigung des Laufs werden die Kassetten herausgenommen, mit dest. Wasser kurz abgespült und mit einem Spatel vorsichtig geöffnet.

Anschließend werden die Agaroseüberschichtung und der IPG - Gelstreifen entfernt und das Gel in eine Glaswanne mit Fixierlösung überführt.

2.2.3.4 Proteinvisualisierung

Nach Abschluß der elektrophoretischen Trennung kommen für die Proteinvisualisierung zwei Methoden zur Anwendung:

- Gele der radioaktiv markierten Proben werden auf einem Filterpapier getrocknet und anschließend mit dem Phosphor - Imager exponiert.
- Gele nicht markierter Proben werden mit Silberfärbungen nach Blum [53] oder Heukeshoven und Dernick [47] visualisiert.

2.2.3.4.1 Silberfärbungen

Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

-Fixierlösung:

400 ml Ethanol mit 100 ml Essigsäure und 500 ml dest. Wasser mischen.

-Inkubationslösung:

300 ml Ethanol; 129 g Natriumacetat- Trihydrat; 20 ml Glutardialdehyd (25%); 2,0 g Natriumthiosulfat- Pentahydrat mischen und mit dest. Wasser auf 1,0 l auffüllen.

-Waschlösung:

300 ml Ethanol mit 50 ml Essigsäure und 650 ml dest. Wasser mischen.

-Silbernitratlösung:

1,0 g Silbernitrat in 1,0 l dest. Wasser lösen und unmittelbar vor Gebrauch 500 µl Formaldehydlösung zugeben.

-Entwickler:

30 g Natriumcarbonat in 1,0 l dest. Wasser lösen. Unmittelbar vor Gebrauch 250 µl Formaldehydlösung (37%) zugeben.

-Stopplösung:

10,0 g Glycin in 1,0 l dest. Wasser lösen.

-Schrumpflösung:

300 g Glycerin und 400 ml Ethanol mit dest. Wasser auf 1,0 l auffüllen.

Tab. 3: Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick, * pro SDS- Gel 0,5 l Lösung

Arbeitsschritt	Reagenz*	Zeit
Fixieren	40% Ethanol 10% Essigsäure	30 min
Sensitivieren	30% Ethanol 7,8% Natriumacetat 0,5% Glutardialdehyd 0,2% Natriumthiosulfat	45 bis 60 min
Waschen	30% Ethanol 5% Essigsäure	90 min oder über Nacht
Waschen	dest. Wasser	6 x 10 min
Imprägnieren	0,1% Silbernitrat 0,02% Formaldehyd	30 min
Waschen	dest. Wasser	2 x 20 s
Entwickeln	3% Natriumcarbonat 0,01% Formaldehyd	1 bis 5 min
Stoppen	1% Glycin	10 min
Waschen	dest. Wasser	2 x 15 min

Die gefärbten Gele werden anschließend mit der Schrumpflösung für ca. 8 bis 10 min geschrumpft und sofort gescannt. Zur Aufbewahrung werden sie in eine Plastikfolie eingeschweißt.

Silberfärbung nach Blum et. al

-Fixierlösung:

400 ml Ethanol mit 100 ml Essigsäure und 500 ml dest. Wasser mischen.

-Waschlösung:

300 ml Ethanol mit 700 ml dest. Wasser mischen.

-Sensibilisierlösung:

0,2 g Natriumthiosulfat mit 1,0 ml dest. Wasser mischen.

-Silbernitratlösung:

2,0 g Silbernitrat in 1,0 l dest. Wasser lösen und unmittelbar vor Gebrauch 250 µl Formaldehyd (37%) hinzufügen.

-Entwickler:

30 g Natriumcarbonat in 1,0 l dest. Wasser lösen. Unmittelbar vor Gebrauch 500 µl Formaldehyd

-Stopplösung:

50 ml Essigsäure mit 950 ml dest. Wasser mischen.

Tab. 4: Silberfärbung nach Blum

Arbeitsschritt	Reagenz*	Zeit
Fixieren	40% Ethanol 10% Essigsäure	60 min
Waschen	30% Ethanol	2 x 20 min
Waschen	dest. Wasser	20 min
Sensitivieren	0,02% Natriumthiosulfat	1 min
Waschen	dest. Wasser	3 x 20 s
Silbern	0,2% Silbernitrat 0,025% Formaldehyd	20 min bei 4 °C
Waschen	dest. Wasser	3 x 20 s
Entwickeln	3% Natriumcarbonat 0,05% Formaldehyd	1 bis 5 min
Waschen	dest. Wasser	20 s
Stoppen	5% Essigsäure	5 min
Waschen	dest. Wasser	3 x 10 min

Nach der Färbung wird das Gel mit der PDQuest Software gescannt und computerdensitometrisch ausgewertet. Zur Lagerung wird es in eine Plastikfolie eingeschweißt oder in Cellophanfolie getrocknet:

Für die Geltrocknung in Cellophanfolie wird das Gel und das Cellophan in eine Lösung bestehen aus 10% (m/v) Glycerin und 30% (v/v) Ethanol für 10 Minuten eingelegt und anschließend in den easy breeze - Rahmen (Hoefler) gespannt. Die Trocknungszeit bei Lufttrocknung beträgt 48 h, bei Ventilationstrocknung 15 h.

2.2.3.4.2 S35 - Expositionen

Nachdem die Elektrophorese abgeschlossen ist, werden die Glaskassetten geöffnet und die Gele faltenfrei auf ein trockenes Filterpapier (Whatman 3, A4) ausgerollt. Die Geloberseite wird mit einer PP - Folie überdeckt und anschließend in den Vakuumtrockner plaziert.

Für die Geltrocknung werden folgende Parameter gewählt:

Vakuum: 0,35 bar

Trocknungstemperatur: 80 °C

Trocknungsdauer: 50 min

Nach Trocknung der Gele werden diese eine bestimmte Zeit (1-3d) in den Imagescreen zur Exposition gelegt. Die exponierten Screens werden mit dem Phosphor - Imager gescannt und mit der ImageMaster Software ausgewertet.

Für die Optimierung der Expositionszeit wird eine 35S - markierte Kultur von S288c bis zu einer optischen Dichte von 1,0 gezüchtet (Markierungsaktivität: 10 µCi/ml).

Die Zellen werden nach der Markierung in vier äquivalente Volumina aufgeteilt und geerntet, aufgeschlossen und solubilisiert (nach 2.2.2).

Mit den vier äquivalenten Extrakten wird im DryStrip System die Fokussierung (IPG 4-7) und im ISO - Dalt (T13%, C2,7%) die SDS - PAGE durchgeführt (s. 2.2.3).

Die Auftragsaktivität beträgt 3,5 cpm pro Gel.

Diese Vierfachansätze werden mit drei verschiedenen Zeitintervallen exponiert und computerdensitometrisch ausgewertet. Expositionsintervalle: 21 h, 27 h und 72 h

2.3 Ergebnis und Diskussion

2.3.1 Kultur von *S. cerevisiae*

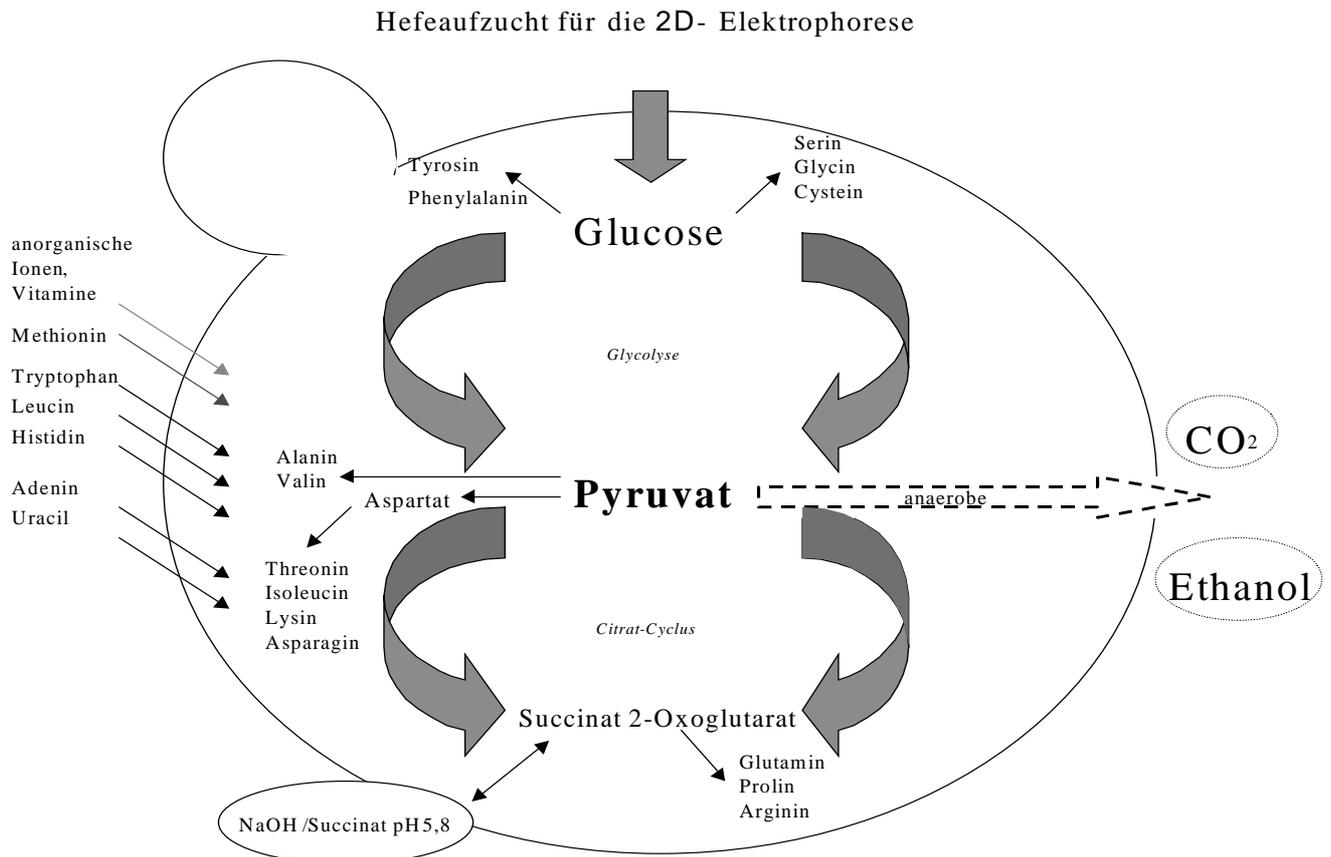


Abb. 10: Überblick über Aufzucht und Aminosäuresynthese von *S. cerevisiae* mit 35 - S Markierung in YNB - Medium

Für die Proteomanalyse stellt die Aufzucht von *Saccharomyces cerevisiae* hohe Anforderungen an die Zellvermehrung [1, 8, 12]. Geringe proteolytische Aktivitäten, genaue Kenntnis der Zellzahl zum Erntezeitpunkt, peptonfreie Medien und optimierte Isotopenmarkierungen sind die Voraussetzung für die Herstellung reproduzierbarer Proteinextrakte.

Um einen besseren Zugriff in der Aufzucht bei z.B. Streßinduktionen (s. 3.3) oder bei der radioaktiven Markierung zu haben, wird in batch - Kulturen und nicht in kontinuierlichen Systemen gezüchtet.

Mit dem Ansatz einer Vorkultur ist gewährleistet, daß die Hauptkultur mit log - Zellen angeimpft wurde, und dadurch bei Kenntnis der Generationszeit die Kultur in einer

definierten Phase und berechenbarer Zellzahl geerntet werden konnte [15]. Abgesehen vom Nährmedium wurden für die Aufzucht optimale Bedingungen für Wachstum und Teilung gewählt, um zum einen zügiges Arbeiten zu ermöglichen und zum anderen einen "stressfreien Standard" mit stressinduzierten Zellen (s. Kap. 3) vergleichen zu können.

2.3.1.1 Vergleich von Minimal- und Vollmedium

Die Anforderungen an ein Nährmedium sollte alle für Wachstum und Vermehrung erforderlichen Substrate (ausgenommen gasförmige) enthalten, sowie einen für den Organismus geeigneten pH - Wert, eine ausreichende Pufferkapazität als auch ein günstiges Ionenmilieu besitzen. Die Konzentration der Substrate ist in der Regel, vor allem in statischen Kulturen, um ein Vielfaches höher als für eine maximale Wachstumsrate erforderlich, um eine hohe Populationsdichte zu erreichen [13].

Man kann zwischen Vollmedien und Minimalmedien unterscheiden. Ein Minimalmedium erfüllt qualitativ die Mindestansprüche eines Organismus. Es besteht bei heterotrophen Organismen in der Regel aus einer mineralischen Nährlösung und einer organischen Kohlenstoffquelle. Ein Vollmedium enthält neben den essentiellen auch viele Verbindungen, die wenig definiert und die der Organismus auch selbst synthetisieren kann. Beispiele für Vollmedien sind Peptone, Malzextrakte, Melasse oder Caseinhydrolysate. Die Wachstumsrate ist in der Regel auf Vollmedien höher als auf Minimalmedien.

Eine weitere Differenzierung der Nährböden stellt die Einteilung in synthetische und komplexe Medien dar. Von synthetischen Medien spricht man, wenn die Zusammensetzung des Substrates genau bekannt ist; bei komplexen Medien sind nur wesentliche Inhaltsstoffe bekannt, nicht jedoch die stöchiometrische und qualitative Zusammensetzung.

Demnach wird das YNB - Substrat zu den synthetischen Minimalmedien und das Sabouraud - Bouillon zu den komplexen Vollmedien gezählt. Beide Medien sind für *Saccharomyces* - Kulturen optimiert und empfohlen [14].

Im folgenden (Abb. 11) sind die Proteintrennungen des Zellysates von *Saccharomyces cerevisiae* bei identischer Probenaufbereitung und Elektrophoresebedingungen, unter Verwendung von verschiedenen Medien (Sabouraud, YNB) zu sehen:

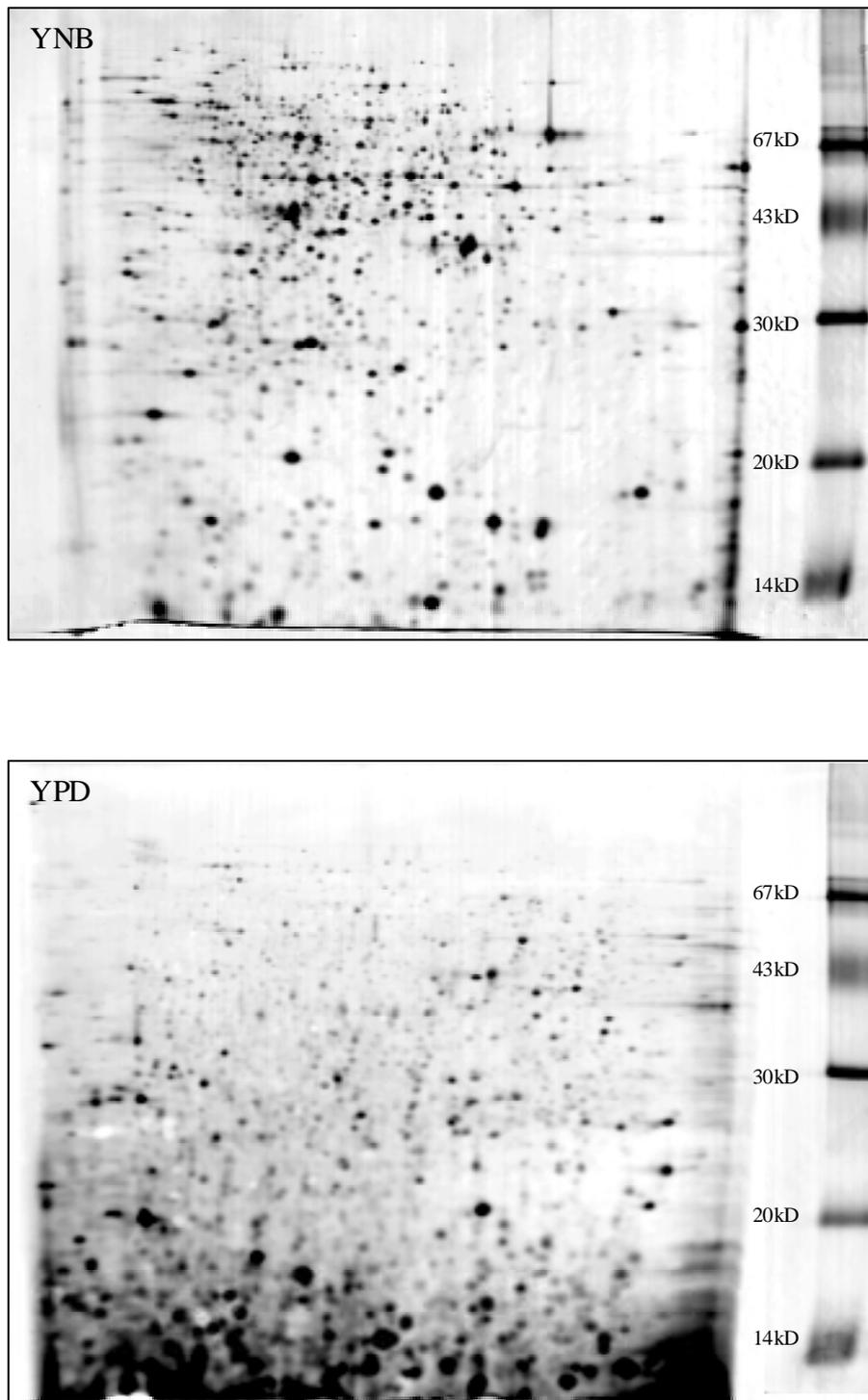


Abb. 11: IPG - Dalt 4-9 *Saccharomyces cerevisiae* S288c.

YNB - Medium (yeast nitrogen base without amino acids) - Minimalmedium

YPD - Medium (Sabouraud - 2% Glucose Boullion) - Komplexmedium

Vergleicht man beide Proteinmuster, so erkennt man grundsätzliche Unterschiede. Zellen, die in definierten synthetischen Medien kultiviert wurden (YNB) zeigen

deutlich mehr Proteine über 67 kD. Auffällig ist die große Vielzahl von Proteinspots unter 14 kD über den ganzen Bereich von pH 4 bis 9 in den "Sabouraud - kultivierten Zellen". Zudem fällt bei genauer Betrachtung eine deutlich größere Vielzahl von schwach angefärbten Spots im Bereich 20 und 43 kD in den YPD - Zellen auf.

Das Fehlen von hochmolekularen Proteinen in Verbindung mit einer hohen Konzentration von niedermolekularen Proteinen deutet auf einen Proteinabbau durch Proteasen hin. Da Zellaufschluß und Proteinsolubilisierung nach identischer Methode durchgeführt wurden, dürfte proteolytische Aktivität in den Sabouraud - kultivierten Zellen vorhanden bzw. wirksam gewesen sein.

Studiert man die Herstellung von Komplexmedien, so findet man, daß hierbei drei verschiedene Arten von Pepton (Bestandteil der meisten Komplexmedien) verwendet werden: papainisch, tryptisch und pankreatisch verdautes Pepton [16]. Es muß angenommen werden, daß durch das Pepton proteinabbauenden Enzyme ins Medium gelangen und nach Zellaufschluß intrazelluläres Protein abbauen. Dieser Proteinabbau ist eindrucksvoll an der Anreicherung von Proteinfragmenten im Bereich unter 14 kD und an dem Verlust der hochmolekularen Proteine zu erkennen. Manche Proteasen scheinen nach Autoklavierung des Medium und Proteinsolubilisierung nur reversibel denaturiert zu werden. Weitere zellfremde Spots können durch, an Hefezellen adhesierenden Peptonreste entstehen.

Da die Genexpression besonders bei kultivierten Zellen sehr substratspezifisch ist, läßt sich die Vielzahl der "low abundance" spots in den Sabouraud - Zellen auf die Substratvielfalt im Komplexmedium zurückführen. Da nicht für alle Organismen synthetische Medien erhältlich sind, sollte in jedem Fall auf Medien, die verdautes Pepton oder andere verdaute Proteinextrakte beinhalten, verzichtet werden.

Die große Vielzahl von "low abundance spots" in den Sabouraud- Zellen sind auf Grund von Schwierigkeiten bei der Auswertung, der Reproduzierbarkeit und der MALDI - Analyse nicht erstrebenswert. Interessieren Proteine, welche nur in geringer Kopienzahl exprimiert werden, so sollten diese durch methodische Auswahl in der Probenaufbereitung selektiv angereichert und diese Fraktion dann elektrophoretisch getrennt werden. Für weitere Versuche wird ausschließlich das YNB - Substrat verwendet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für die Proteomanalyse Komplexmedien auf Grund ihrer variierenden Zusammensetzung, sowie der Anwesenheit von Proteasen, bedingt durch die Peptonherstellung, ungeeignet sind.

2.3.1.2 Bestimmung der Wachstumsrate und Verdopplungszeit

Unter Wachstum versteht man die Zunahme der Zelltrockensubstanz pro Volumen, Kultur und Zeiteinheit, die mit einer Proteinsynthese verbunden ist. Wachstum ist in der Regel mit einer Zellvergrößerung verbunden, kann aber auch mit einer Vermehrung (siehe 2.2.1.3) korreliert sein [13].

Die Wachstumsrate μ gibt die Zahl der Verdopplungen der Zellmasse pro Zeiteinheit an. Das Zeitintervall für die Verdopplung der Zellmasse ist die Verdopplungszeit t_d . Die Entwicklung der Zellmassen in einer wachsenden Kultur lässt sich mit großer Genauigkeit durch die Messung der optischen Dichten bestimmen [15].

Wachstumsraten und Verdopplungszeit sind abhängig von dem verwendeten Stamm, den äußeren Kulturbedingungen und vom Medium. Sollen mehrere elektrophoretische Trennungen von beispielsweise verschiedenen Wachstumsinduktionen verglichen werden, ist eine hohe Reproduzierbarkeit in der Zellaufzucht bzgl. Zellmasse und Wachstumsstadium Voraussetzung.

Die ermittelten Meßwerte der optischen Dichte wurden im logarithmischen Maßstab (y - Achse) gegen die Zeit (x - Achse) aufgetragen.

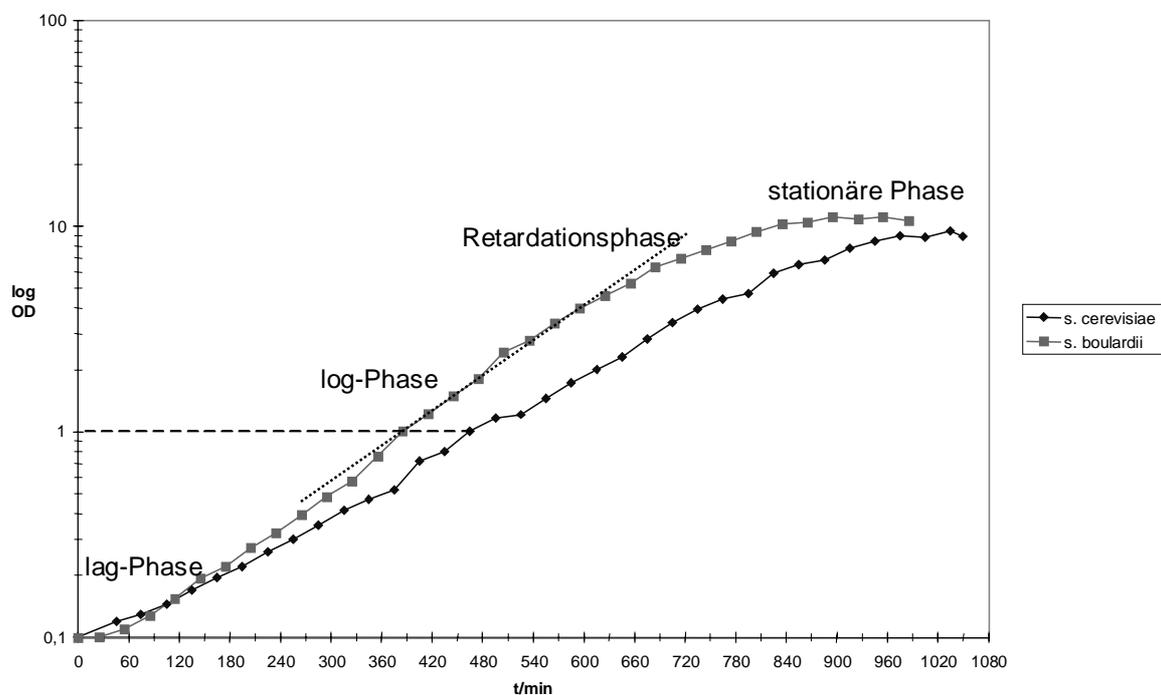


Abb. 12: Wachstumskurven von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces boulardii* in YNB-Nährmedium bei 30 °C

Die Wachstumskurve kann in fünf Phasen (lag - Phase, log - Phase, Retardationsphase, stationäre Phase und Absterbephase) eingeteilt werden [13]. In der ersten Phase des Wachstums einer Kultur ist das System noch nicht im Fließgleichgewicht. Die Syntheseprozesse, die in ihrer Gesamtheit das Wachstum bedingen, zeigen oft verschiedene Kinetiken. Diese Phase wird als Anlaufphase oder lag - Phase bezeichnet. Nach einer bestimmten Zeit haben die Syntheseleistungen in der Zelle einen konstanten Wert erreicht, Hefemasse und Zellzahl nehmen pro Zeiteinheit um einen konstanten Faktor k zu. Die Kultur befindet sich in der logarithmischen oder exponentiellen Phase des Wachstums (log - Phase). Der Steigungsgrad der Trendlinie ist ein Maß für die Wachstumsrate μ . Für *Saccharomyces cerevisiae* errechnet sich daraus eine Wachstumsrate von $\mu = 0,052 \text{ min}^{-1}$ und bei *Saccharomyces boulardii* eine Wachstumsrate von $\mu = 0,069 \text{ min}^{-1}$ in ihrer logarithmischen Phase. Mit diesen Werten läßt sich die Verdopplungsrate t_D berechnen [24]. Für *Saccharomyces cerevisiae* ergibt sich eine Verdopplungszeit t_D von 133,3 min und für *Saccharomyces boulardii* für 100,4 min. In der Literatur [13] ist *Saccharomyces cerevisiae* mit einer größten Verdopplungszeit von ca. 120 min angegeben. Man erkennt daraus, daß die Wachstumsbedingungen in dieser Kultur annähernd optimal waren. Eine Erhöhung der Wachstumsraten ließe sich wahrscheinlich nur noch durch die Verwendung eines komplexen Vollmediums erzielen.

Mit fortschreitendem Wachstum nimmt die Konzentration der Substrate in der Nährlösung ab, der pH - Wert verändert sich, wachstumshemmende Stoffe häufen sich an und die Sauerstoffkonzentration im Medium sinkt unter einen kritischen Wert. Diese veränderten Außenbedingungen bewirken eine Veränderung in der Wachstumsrate. Dieser Abschnitt wird Retardationsphase oder Phase der negativen Beschleunigung genannt. Sie geht in die stationäre Phase über. In dieser Phase bleibt die Gesamtkeimzahl konstant, weil keine Zellteilungen mehr stattfinden oder weil nur soviel neue Zellen entstehen wie alte Zellen lysieren.

Es folgt die Absterbephase, die aus zwei Gründen nicht ohne weiteres sichtbar ist: a) Hefen bilden keine Toxine wie Bakterien, die zum Absterben führen, sondern sie bilden Sporen und erzeugen so eine Schutzschicht; b) Das Zellwachstum wurde anhand der Trübung ermittelt. Die optische Dichte erfaßt nur die Anzahl der Zellen. Eine Unterscheidung von lebenden und abgestorbenen Zellen kann nur mit Hilfe eines Vitalitätstests bestimmt werden. Eine Absterbephase ist bei Hefereinkulturen in

der Regel nicht oder nur nach mehreren Monaten nachweisbar [13]. Bei *Saccharomyces cerevisiae* dauert die lag-Phase ungefähr 60 min, die anschließende log-Phase ungefähr 14 h und die Retardationsphase etwa 2 h. Nach insgesamt 17 h ist die stationäre Phase erreicht. Bei *Saccharomyces boulardii* dauert die lag-Phase bei dem verwendeten Kulturprotokoll ca. 120 min, die log-Phase ungefähr 10 h und die Retardationsphase etwa 3 h. Nach insgesamt 15 h beginnt hier die stationäre Phase (s. Abb. 12).

Die längere lag-Phase von *Saccharomyces boulardii* und damit der Schnittpunkt der beiden Kurven kann auf den unterschiedlichen Lagerungszustand der beiden Stämme zurückzuführen. Während der Animpfung äquivalenter Zellzahlen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces boulardii*, lagen bei *Saccharomyces boulardii* weniger teilungsbereite Zellen vor. Da *Saccharomyces boulardii* jedoch eine kürzere Verdopplungszeit t_D hat, schneiden sich die beiden Wachstumskurven nach etwa zwei Stunden. Durch die kürzere Generationszeit beginnt bei *Saccharomyces boulardii* die stationäre Phase schon nach ungefähr 15 Stunden, während *Saccharomyces cerevisiae* den Sättigungsgrad erst nach 17 Stunden erreicht.

2.3.1.3 Vermehrung, Teilungsrate und Generationszeit

Die Vermehrung der Organismen wird gemessen als Zunahme der Organismenzahl pro Volumeneinheit. Die Teilungsrate ist die Zahl der Verdopplung der Zell- oder Organismenzahl pro Zeiteinheit. Das Zeitintervall für die Verdopplung der Zellzahl ist die Generationszeit g . Mit der Kenntnis der Generationszeit des Wildtyps kann die Zellzahlzunahme in der Kultur bestimmt werden, und somit bei den verschiedenen Ansätzen reproduzierbare Erntezeitpunkte festgelegt werden. Die Bestimmung der Lebendzellzahl stellt die wesentlich exaktere Methode für die Beschreibung von Phasenzuständen in einer Kultur dar und läßt somit höhere Reproduzierbarkeit in der Zellaufzucht erwarten [15].

Nachteilig für die Proteomanalyse wirkt sich die Erfassung von nur lebenden Zellen, sowie das relativ zeitaufwendige Verfahren des Plattengießens mit anschließender Bebrütung und Auszählung aus. Es empfiehlt sich daher den Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Lebendzellzahl in den einzelnen Stadien zu bestimmen, um dann ausgehend von einer OD-Messung auf die entsprechende Zellzahl schließen zu können. Die Generationszeit g läßt sich nach der Synchronisation einer Kultur durch graphische Auswertung des Diagramms ermitteln.

Die Synchronisation der Hefekultur wurde zum einen mit einer Membranfiltration und zum anderen durch einen Hitzeschock erreicht. Für *S. cerevisiae* ergibt sich hieraus eine Generationszeit von etwa 120 Minuten (Abb. 13). Nach etwa 420 min hat die Kultur eine OD von 1,0 erreicht, die Zellzahl beträgt in diesem Stadium etwa 10^7 Zellen/ml.

Zellzahl
 10^6 Zellen / ml

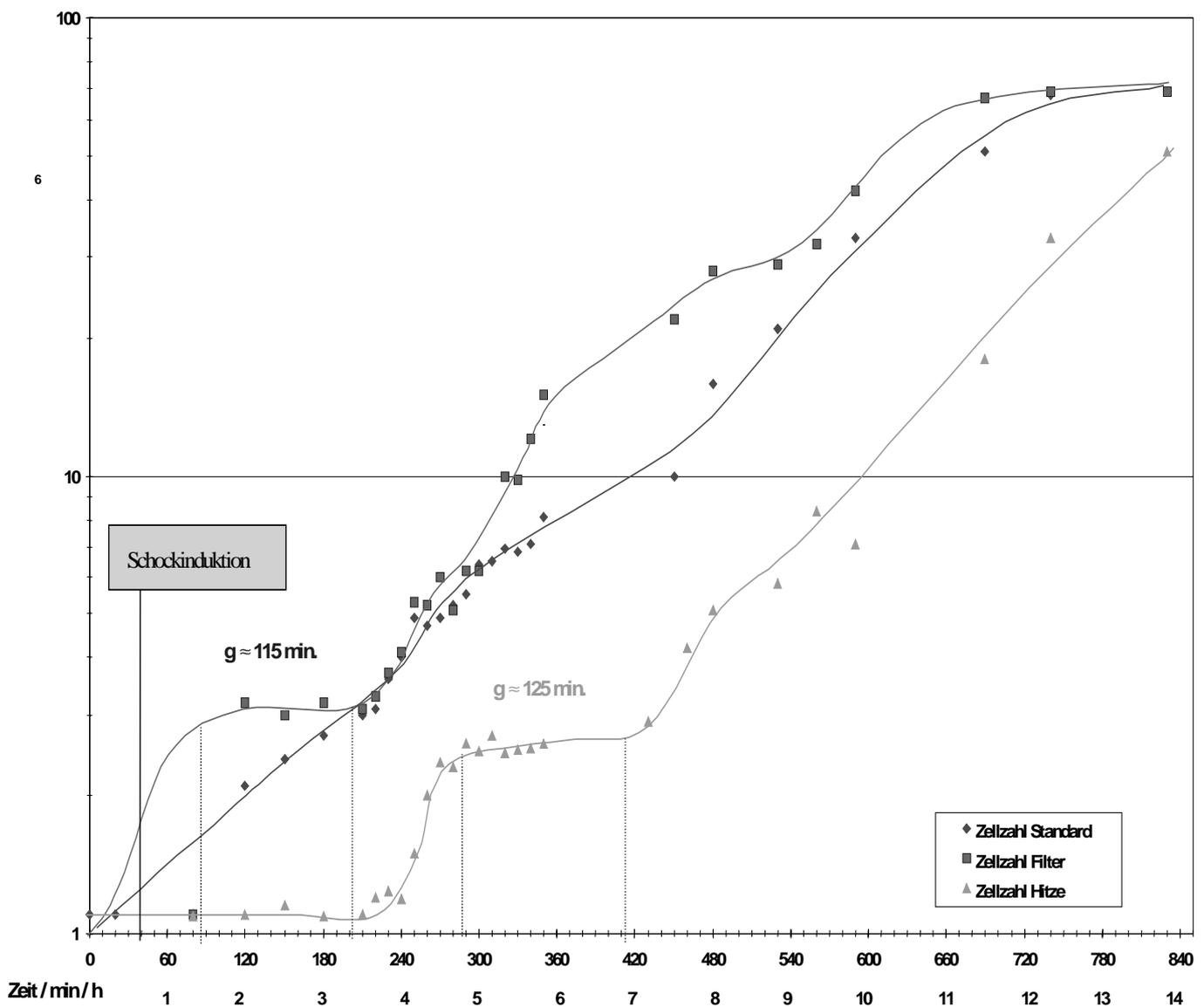


Abb. 13: Synchronisation der Kultur von *S. cerevisiae* S288c durch Membranfiltration und Hitzeschock, für die Bestimmung der Generationszeit [g]

2.3.1.4 Messung des Zellrockengewichts

Ein wichtiger Kontrollschritt zur Überprüfung der Aufzuchtqualität stellt die Bestimmung des Trockengewichts dar. Durch diese schnelle Methode werden gleiche Massen als Ausgangsgewicht gewährleistet. Ein Nachteil dieser Methode ist ihre Ungenauigkeit. Vergleicht man die Trockengewichtsbestimmung mit der Messung der optischen Dichte oder der Zellzahlbestimmung, so muß beachtet werden, daß die Bestimmung des Trockengewichts zwar schnell durchgeführt werden kann, aber nur als überprüfender Hinweis für die Größenordnung eingesetzt werden sollte.

Die Zusammensetzung des Trockengewichtes in der Hefe variiert in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium. Die Trockensubstanz in *S. cerevisiae* besteht zu etwa 50 - 60% aus Proteinen, 30% aus Zellwandanteil, den Rest stellen intramolekulare Makromoleküle. Das Verhältnis von exprimiertem Protein zu Zellmasse ist nur in der logarithmischen Wachstumsphase konstant [17].

Wird eine extrahierte Proteinkonzentration in Abhängigkeit zum Trockengewicht angegeben, so muß bei lag - Phasen bzw. stationären Zellen die veränderte Proportionalität berücksichtigt werden.

Ein Beispiel für die Berechnung der Proteinkonzentration im Lysepufferextrakt unter Einbeziehung des Wachstumsstadiums, der Aufschlußmethode und der Zellmasse ist im Abschnitt der "*Proteinbestimmung*" beschrieben.

Der Graph (Abb. 14) zeigt über eine lange Wachstumsphase (OD 0,8 - 8,0) eine direkte Proportionalität von optischer Dichte und Trockengewicht. Ab einer OD von etwa 8 nimmt das Trockengewicht exponentiell zum Wachstum zu. Wie L. Heleen et. al. [18] beschreiben, nimmt in der retardierenden Phase die Zellwandsynthese der Hefen zu, um äußere Streßfaktoren besser adaptieren zu können. Diese Zellwandsynthese kann die exponentielle Zunahme des Trockengewichtes in der retardierenden und stationären Phase des Zellwachstums begründen.

Für die Probenaufbereitung zur Elektrophorese wurden ausschließlich logarithmisch wachsende Zellen mit optischen Dichten von 0,5 bis 1,5 verwendet. Wie die Kurve zeigt, ist in diesem Intervall das Trockengewicht direkt proportional zum Wachstum der Zellen. Die Trockengewichtsbestimmung diente als erste Abschätzung für den Kulturverlauf.

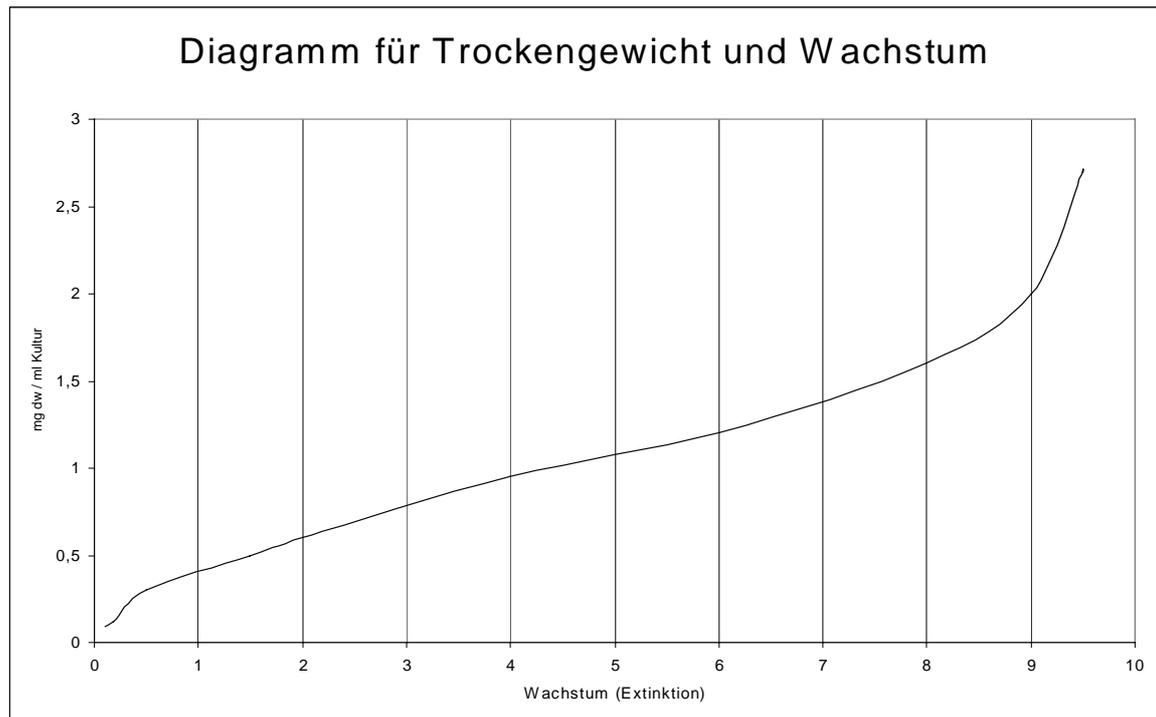


Abb. 14: Darstellung des Trockengewichtes in den verschiedenen Wachstumsstadien von *Saccharomyces cerevisiae* (S288c); Trocknung bei 106 °C bis zur Gewichtskonstanz.

2.3.1.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Mit dem Lowry - Kit ist eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration von etwa 50 - 400 µg Protein /ml Extrakt möglich [19]. Es wurde die Extinktion nach Reaktion von Peptiden mit einer stabilisierten Kupfer (II) - lösung im basischen Milieu gemessen. Es entsteht ein bläulicher Kupfersalzkomplex, dessen Konzentration bei einer Wellenlänge von 610 nm bestimmt wurde.

Da auch Harnstoff eine Peptidgruppe enthält, und somit einen Kupferkomplex bildet, wird die Proteinsolubilisierung und Bestimmung im SDS - Puffer durchgeführt. Im folgenden sind Nachteile und Vorteile der colorimetrischen Bestimmung im Vergleich zu einer Isotopenmessung, mit der ebenfalls eine Proteinkonzentrationsmessung durchgeführt werden kann, zusammengefaßt.

Nachteile:

- die Kalibrierung erfolgt in der Regel mit BSA - Proben
- es gibt viele störende Substanzen wie z.B. Harnstoff oder Tris - Base, so daß eine Bestimmung aus dem Lysepufferextrakt nicht möglich ist.

- Es werden relativ große Volumina (mind. 700 µl) Probenlösung für die photometrische Messung benötigt (Verdünnungen sind nur bei konzentrierten Extrakten möglich)
- die Probe steht nach der colorimetrischen Messung nicht mehr zur Verfügung
- der Nachweis ist nur im linearen Bereich der Kalibrierkurve anwendbar

Vorteile:

- relativ schnelle Möglichkeit der Proteinkonzentrationsmessung
- es werden keine toxischen oder radioaktiven Substanzen bzw. Detektionsgeräte benötigt
- es lassen sich problemlos eine größere Anzahl von Proben in relativ kurzer Zeit messen

können die Proben nicht radioaktiv markiert werden, ist die colorimetrische Proteindetektion die einzige derzeit zur Verfügung stehende Methode

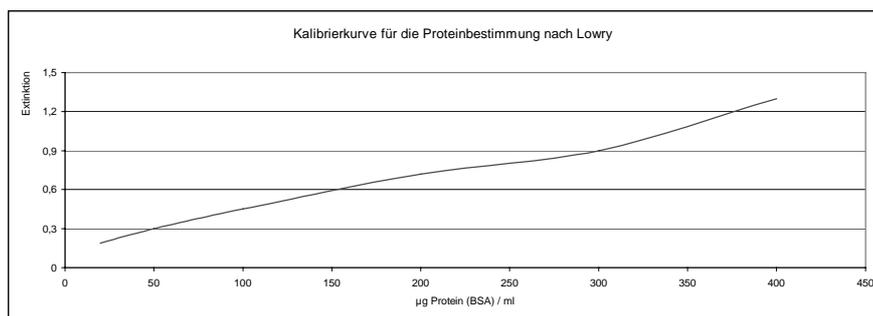


Abb. 15: BSA - Kalibrierkurve für die Lowry - Proteinbestimmung

Beispielrechnung zur Proteinauftragsmenge:

Es sollen die elektrophoretischen Trennungen eines radioaktiv markierten Extraktes (Erntezeitpunkt: OD 1,0; spez. Aktivität 10 µCi/ml; 30 min Markierungszeit), bei analytischem Auftrag verglichen werden. Für diesen Versuch sollen 60 µg Protein auf das Gel geladen werden. Zu berechnen ist das jeweilige Auftragsvolumen nach einer Proteinkonzentrationsmessung mit der Lowry - Reaktion und alternativ einer Isotopendetektion (n. Abb. 18).

1. Berechnung des Auftragsvolumen nach der Lowry - Reaktion:

Extrahierte Proteinkonzentration bei einer OD von 1,0: 470 µg Protein, gelöst in 200 µl SDS - Puffer (Abb.18)

Nach Verdünnung mit 500 µl Lysepuffer (1+2,5) erhält man eine Konzentration von 0,67 µg/µl Lysepuffer

Um 60 µg auf das Gel zu laden sind **89,5 µl** des Lysepufferextraktes notwendig.

2. Berechnung des Auftragsvolumen nach 35S - Detektion:

Bei einer OD von 1,0 zeigt der SDS - Extrakt einen Wert von 25000 cpm/µl, dies entspricht einer Proteinkonzentration von 400 µg / 200 µl SDS - Extrakt (Abb.18)

Nach Verdünnung mit 500 µl Lysepuffer ergibt sich eine Konzentration des Lysepufferextraktes von 0,57 µg/µl Lysepuffer

Für den Auftrag von 60 µg Protein sind demnach **105 µl** Applikationsvolumen nötig

Anmerkung:

Da beiden Proben gleiche Kultur-, Aufschluß- und Solubilisierungsparameter zu Grunde liegen, sollten auch gleiche Proteinkonzentrationen in den einzelnen Wachstumsstadien und folglich gleiche Auftragsvolumina zu erwarten sein.

Die Abweichungen (0,67 µg/µl Lowry - 0,57 µg/µl Isotopendetektion) läßt sich durch folgende Faktoren erklären:

- erhöhte Extinktionswerte durch den Einfluß störender Substanzen wie SDS, Zellwandreste oder Proteinaggregationen
- wie in Abb. 17 zu erkennen ist, kann die Zelle während einer Markierungszeit von 30 min auch 35S-Konzentrationen von 50 bzw. 100 µCi/ml absorbieren; das läßt auf eine nicht quantitative Markierung des Proteoms bei einer spez. Aktivität von 10 µCi/ml schließen.

Vergleicht man die Abweichungen dieser Detektionsmethoden, so erscheinen beide Verfahren für die Proteinkonzentrationsmessung des SDS - Extraktes geeignet. Wurde mit markierten Proben gearbeitet kommt zur Bestimmung der Auftragsmenge ausschließlich die Isotopendetektion zur Anwendung, da hierbei nur 1 µl benötigt wird und daher die Probe weiter verwendet werden konnte; für die Lowrydetektion sind 700 µl Extrakt nötig (s. 2.2.1.5).

2.3.1.6 Radioaktive Markierung (35S)

Die Einführung der Isotopenmessung spielt in der Entwicklung der biologischen Wissenschaften eine entscheidende Rolle. Diese Methode findet beispielsweise Anwendung bei Untersuchungen von Stoffwechselwegen, DNA - Replikationen, bei der Entwicklung von Radioimmunoassays oder auch bei der Aufklärung von Proteinbiosynthesewegen.

Immanente Vorteile der Radiographie sind deren hohe Empfindlichkeit, die Möglichkeit der in vivo-Untersuchung von Organismen und die Erstellung von Autoradiogrammen durch Verwendung geeigneter Detektoren [20].

Nachteile ergeben sich aus den strengen Sicherheitsvorschriften, den oftmals aufwendigen Kalibrierungen und Standardisierungen, der Strahlungsinteraktion auf chemischen Reaktionsgeschwindigkeiten oder DNA - Mutationen und den erhöhten Preisen für Meßgeräte und Substanzen.

Für diese Arbeit steht ein bereits eingerichtetes Radionuklidlabor mit Flüssigkeitszintillator und Geiger – Müller - Zählrohr für die Flächendekontamination zur Verfügung.

Höchste Reproduzierbarkeit beim radioaktiven Markieren ist unbedingte Voraussetzung, um später sinnvolle Auswertungen der Autoradiogramme durchführen zu können. Daher müssen zuerst folgende Parameter optimiert und standardisiert werden:

- Qualität und Eignung der radioaktiven Substanz
- Berechnung der Zerfallskonstanten von ^{35}S - Methionin
- Kalibrierung des Flüssigkeits - Scintillators
- Bestimmung der cellulären Absorption im zeitlichen Verlauf
- Quenchen von Interferenzen

Für die Markierung des Hefeproteoms wird ^{35}S - Schwefel, gebunden in Methionin verwendet. Da Schwefel Bestandteil in nahezu allen Proteinen ist und als energiereiche Verbindung von allen zellulären Organismen in relativ kurzer Zeit absorbiert wird, hat sich diese Aminosäure für das Markieren von Hefezellen etabliert. Die Alternative, ^{35}S - Cystein wird nur mit organischen Additiven angeboten, welche Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese haben könnten; für diese Arbeit wird deshalb ausschließlich ^{35}S - Methionin (J237 - Met, Pharmacia) verwendet [15].

Für die Proteomanalyse läßt sich die Isotopenmessung für die Erstellung von Autoradiogrammen und für die Messung der Proteinkonzentrationen in den verschiedenen Extrakten einsetzen.

Durch die Linearität über nahezu 5 Zehnerpotenzen der radioaktiven Exposition bei Verwendung von Phosphor - imaging - screens ist ein computerdensitometrisches Quantifizieren einzelner Proteine aus dem 2D - Gel möglich.

Mit der Messung der Proteinkonzentration mittels ^{35}S - Detektion sind wesentlich höhere Genauigkeiten erzielbar, da nach dem Quenchen keine störenden Substanzen das Ergebnis verfälschen. Mit der Verwendung radioaktiv markierter Proben können beispielsweise nach der ^{35}S - Detektion eine genau definierte cpm - Anzahl auf das Gel geladen werden und somit mehrere Gele mit identischen Proteinmengen verglichen werden.

Durch colorimetrische Bestimmungen der Proteinkonzentration wie zum Beispiel mit nach der Bradford - Reaktion oder dem Lowry - Kit stören eine Vielzahl von proteinsolubilisierenden Substanzen wie zum Beispiel Harnstoff, Thioharnstoff oder Tris - Base. Zudem sind Proben mit denen eine colorimetrische Proteinbestimmung durchgeführt wurde, nicht mehr für die elektrophoretische Bestimmung brauchbar.

In dieser Arbeit wird die radioaktive Markierung vorwiegend für die Detektion von neuen Proteinfractionen aus dem Hefeproteom und für Messung der auf das Gel geladenen Proteinmenge verwendet.

2.3.1.6.1 Kalibrieren und Quenchen des Szintillationszählers

Für eine Strahlungsdetektion in Flüssigkeiten stehen Geräte wie Geiger - Müller - Zähler, Proportionalitätszählrohre, Ionisationskammern oder Szintillationszähler zur Verfügung.

Grundsätzlich lassen sich die verschiedenen Geräte nach ihrer Detektionsweise einteilen. In Geräten wie dem Szintillationszähler, macht man sich die Eigenschaft der Strahlung, bestimmte fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome) anzuregen, zu Nutze. Hierbei wird das bei der Szintillation ausgesandte Licht mittels eines Photomultipliers aufgefangen, der den Photonenimpuls in ein elektrisches Signal umwandelt, dessen Größe der Energie dem des ursprünglichen radioaktiven Zerfalls proportional ist. Diese direkte Korrelation der Energie des ursprünglichen radioaktiven Zerfalls zum elektrischen Signal stellt einen besonderen Vorteil der Szintillatoren gegenüber etwa den Geiger - Müller - Zählern dar, weil durch die Szintillation ein Verstärkungseffekt erreicht werden kann und zudem auch mehrere Isotope in einer Probe analysiert werden können [20].

Ein weiterer Vorteil, gerade für einen weiche β - Strahler wie dem ^{35}S - Schwefelisotop, ist die deutlich geringere Abklingzeit der Fluoreszenz gegenüber der Totzeit in einem Geiger - Müller - Zählrohr.

Der Nachteil bei der Szintillationsmethode liegt im Quenchen (Unterdrücken von Störeinflüssen). Es gibt drei Mechanismen des Quenchen: das optische Quenchen, das Farbquenchen und das chemische Quenchen.

Die beiden ersten Störungen treten nur bei gefärbten Extrakten oder Interferenzen in der optischen Signalbildung auf.

Die am schwierigsten zu umgehende Form des Quenchens ist das chemische Quenchen, bei der einer der Energieübergänge zwischen Lösungsmittel, Flouorchrom und Szintillationsdetektor durch eine Komponente in der Probe gestört wird.

Da ^{35}S - Schwefel mit einer Halbwertszeit von nur 87,4 Tagen keinen zufriedenstellenden Standard darstellt, wird hierfür ^{14}C - Standard in $1\ \mu\text{l}$ Lysepuffer gelöst und in gleicher Weise präpariert wie zukünftig sämtliche ^{35}S - Proben analysiert werden. Dieser zeitstabile externe ^{14}C - Standard mit "Lysepufferkontamination" wird vor jeder Messung für die Kalibrierung des Szintillationszählers verwendet.

Bei der Aufbereitung zur Messung des markierten Proteins gibt es zwei grundsätzliche Möglichkeiten. Zum einen kann durch vorangehende Wasch - und Präzipitationsschritte die ausgefällte Proteinmenge gemessen werden; hierbei wird ausschließlich markiertes Protein bestimmt. Zum anderen kann die Gesamtradioaktivität nach Zellaufschluß und Proteinsolubilisierung ohne eingeschobene Präzipitation gemessen werden. Hier wird zu dem exprimierten zellulärem Protein auch das im Cytoplasma eingelagerte ^{35}S - Methionin detektiert [15].

In dieser Arbeit wird ausschließlich die zweite Methode angewandt, da durch die zehnstufige "Präzipitationsmethode" Proteinverluste entstehen, die reproduzierbares Arbeiten erschweren.

Um die Umrechnungen der vom Szintillationszählers gemessenen cpm - Werte auf entsprechende Curie - Werte durchführen zu können, wird dieser Zusammenhang graphisch dargestellt.

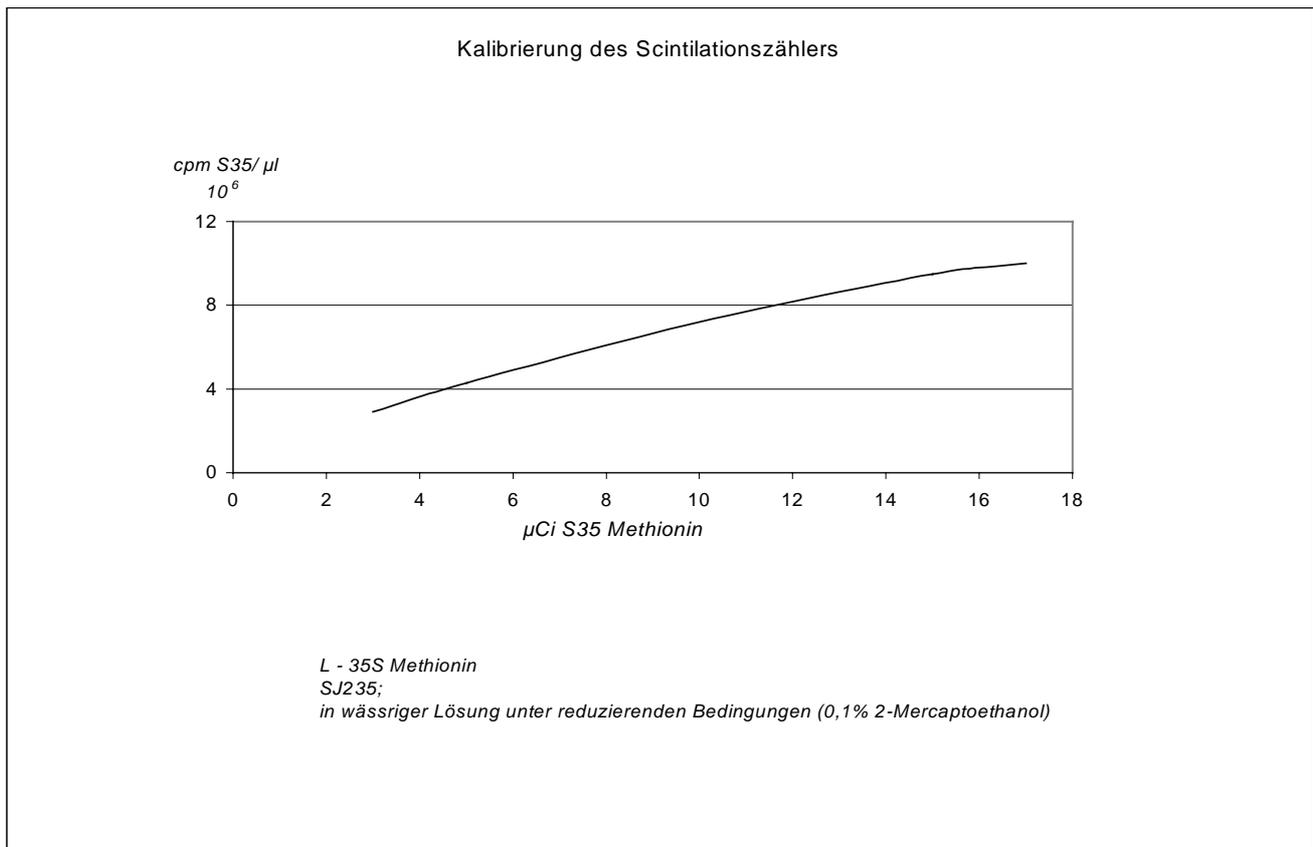


Abb. 16: Graphische Darstellung des Zusammenhangs von szintillatorisch detektierten counts per minute (cpm) und der Strahlungsaktivität in μCi .

2.3.1.6.2 Berechnung der Zerfallskonstanten

Radioaktive Zerfälle sind spontane Prozesse und verlaufen mit einer für die einzelnen Strahlungsquellen charakteristischen Geschwindigkeit. Die Zahl der Atome, die zu einem beliebigen Zeitpunkt zerfallen wird, ist jeweils der Zahl der vorhandenen Atome des Isotops zu diesem Zeitpunkt proportional. Wendet man die Gesetze des radioaktiven Zerfalles an, so läßt sich bei Kenntnis der Zerfallskonstanten λ die Aktivität des ^{35}S - Methionin zu jeder Zeit berechnen. Diese Konstante ist für jedes radioaktive Isotop charakteristisch und wird als der Anteil des Isotops der pro Zeiteinheit (t^{-1}) zerfällt, definiert [20].

Aus der Halbwertszeit von 87,2 Tagen (d) für Schwefel 35, ergibt sich für λ ein Wert von $0,000795 \text{ d}^{-1}$.

Berechnungsbeispiel:

Es sollen 10 ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur mit 50 μCi ^{35}S - Methionin markiert werden. Die ^{35}S - Charge ist vor 10 Tagen vom Anbieter auf eine Aktivität von 2 mCi / 133 μl ($= 7,4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$) Lösungsmittel determiniert worden. Gesucht wird das benötigte ^{35}S Methionin- Volumen.

$$t = 10 \text{ d} \quad \lambda = 0,000795 \text{ d}^{-1} \quad N_0 = 7,4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$$

nach Umformung und Einsetzen in: $N_t = N_0 e^{-\lambda t}$

Es ergibt sich eine aktuelle Aktivität des ^{35}S -Methionin von 1,848 mCi ($= 6,8 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$)

Für die Berechnung des zu verwendeten Volumens für die Markierung legt man die 133 μl , in welchen bei Aktivitätsdetermination 2 mCi Methionin gelöst waren, zu Grunde. Sollen nun 10 ml Kultur mit 50 μCi markiert werden, so wird bei einer Restaktivität von 1,85 mCi / 133 μl ein Volumen von **3,6 μl** ^{35}S - Methionin benötigt. Die spezifische Aktivität im Kulturkolben beträgt in diesem Fall 5 $\mu\text{Ci/ml}$.

Um zu jeder beliebigen Zeit die Aktivität des gelagerten ^{35}S einfach bestimmen zu können, wurde der Zerfallsfaktor in Abhängigkeit von der Zeit (Tage, Wochen) berechnet (Tab.5).

Zur Bestimmung der aktuellen Aktivität der Charge wird der zu diesem Zeitpunkt gültige Faktor aus der Tabelle entnommen und mit der Ausgangsaktivität multipliziert.

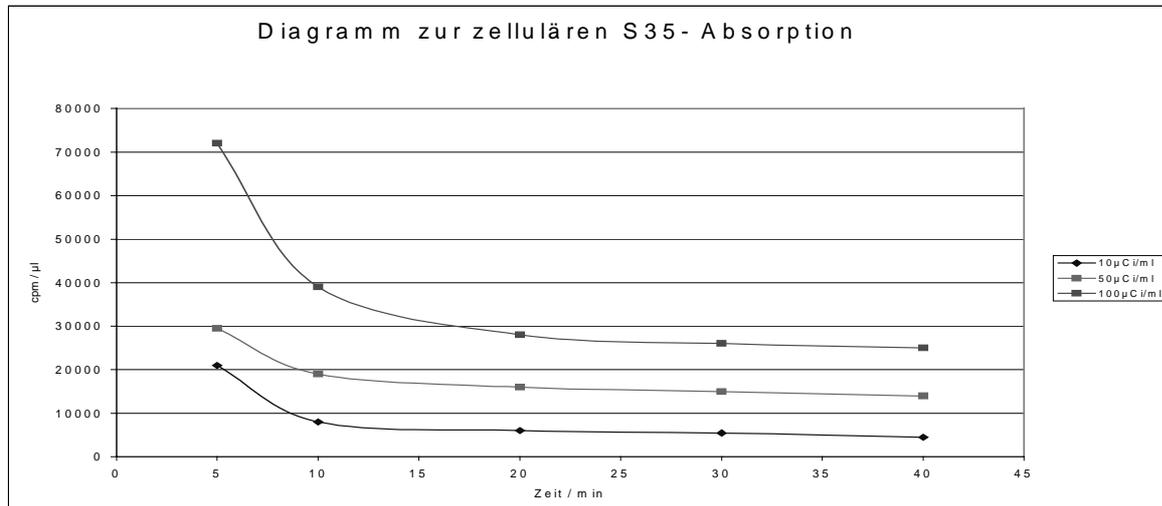
Tab. 5: ^{35}S - Zerfallsfaktoren Tage

	0	1	2	3	4	5	6
0	1,000	0,992	0,984	0,976	0,969	0,961	0,954
1	0,946	0,939	0,931	0,924	0,916	0,909	0,902
2	0,895	0,888	0,881	0,874	0,867	0,860	0,853
3	0,847	0,840	0,833	0,827	0,820	0,814	0,807
4	0,801	0,795	0,788	0,782	0,776	0,770	0,764
5	0,758	0,752	0,746	0,740	0,734	0,728	0,722
6	0,717	0,711	0,705	0,700	0,694	0,689	0,683
7	0,678	0,673	0,667	0,662	0,657	0,652	0,646
8	0,641	0,636	0,631	0,626	0,621	0,616	0,612
9	0,607	0,602	0,597	0,592	0,588	0,583	0,579
10	0,574	0,569	0,565	0,560	0,556	0,552	0,547
11	0,543	0,539	0,534	0,530	0,526	0,522	0,518
12	0,514	0,510	0,506	0,502	0,498	0,494	0,490

Wochen

2.3.1.6.3 35S - Methioninabsorption der Hefezellen

Der Versuch zur Bestimmung der 35S - Absorption in Abhängigkeit von der Zeit und dem Zellstadium ist unerlässlich für die Bewertung der Restkonzentration (Entsorgung) sowie der Bemessung der Markierungszeit. Einen Zusammenhang von Aktivität, 35S - Absorption und Expositionsdauer der Gele läßt sich hier erstmals



darstellen.

Abb. 17: Graph für die 35S - Methioninabnahme im Kulturmedium mit logarithmisch wachsenden Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* (S288c) bei Markierung mit drei verschiedenen Aktivitäten: 10 $\mu\text{Ci/ml}$, 50 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 $\mu\text{Ci/ml}$

Der Graph zeigt, daß die 35S - Aufnahme von logarithmisch wachsenden Zellen bei Aktivitäten von 10 bis 100 $\mu\text{Ci/ml}$ in den ersten 15 Minuten abgeschlossen ist. Eine Markierungszeit von länger als 30 Minuten (1/4 Generationszeit) ist demnach nicht erforderlich.

Es werden folgende Restaktivitäten im zellfreien Kulturmedium gemessen:

Tab. 6: Messung der Restaktivität mit 100, 50 und 10 $\mu\text{Ci/ml}$ nach 40 min Markierungsdauer.

spez. Impfaktivität (cpm/ μl)	spez. Restaktivität (cpm/ μl)	Gehalt an Restaktivität (%)
72000 (\equiv 100 $\mu\text{Ci/ml}$)	26000	36
30000 (\equiv 50 $\mu\text{Ci/ml}$)	14000	46
21000 (\equiv 10 $\mu\text{Ci/ml}$)	4500	21

Die Tabelle zeigt, daß bei einer Markierungsaktivität von 10 $\mu\text{Ci/ml}$ (\equiv 21000 cpm/ μl) prozentual die geringste Aktivität im zellfreien Medium verbleibt, woraus die prozentual größte 35S - Aufnahme der Zellen gefolgert werden muß.

Für weitere Experimente wurde ausschließlich mit einer ^{35}S - Aktivität von $10\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ für die Zeitdauer von 30 Minuten gelabelt. Hierbei verbleiben für die Entsorgung geringste Mengen an Aktivität ($4500\ \text{cpm}/\mu\text{l}$) im Kulturmedium, zudem wurden in den Gelexponaten nach dem Scannen ein Sättigungsgrad der "high abundance spots" erreicht (s. 2.3.3.2).

Eine Begründung dafür, daß bei gleicher Zellkonzentration verschiedenen ^{35}S Aktivitäten aufgenommen wurden ($40000\ \text{cpm} - 15000\ \text{cpm}$), kann an einer schlechteren Aufnahmefähigkeit von verdünnten Methioninkonzentrationen aus dem Kulturmedium liegen.

Es ist bekannt, daß Hefezellen größere Mengen von Methionin und anderen Aminosäuren in kurzer Zeit aufnehmen können und im Cytoplasma bzw. der Vakuole speichern; ist der Bedarf an dieser Aminosäure gedeckt wird die Absorption dieser Substanz verringert, um intrazelluläre Gleichgewichte zu erhalten [77].

2.3.1.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentration durch ^{35}S - Detektion

Die radioaktive Bestimmung der Proteinkonzentration zeichnet sich gegenüber anderen Proteinbestimmungsmethoden durch folgende Vorteile aus:

- größere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit
- $1\ \mu\text{l}$ des Proteinextraktes ist für die Messung ausreichend
- ^{35}S - Detektionen lassen Proteinnachweise im μg - Bereich zu
- im Gegensatz zu colorimetrischen Bestimmungen haben radioaktive Bestimmungsmethoden einen linearen Verlauf
- es läßt sich nach entsprechender Probenaufbereitung auch *nicht* solubilisiertes Protein z. B. in den Zellwänden detektieren

Der Graph Abb.18 zeigt den Verlauf des nach Standardprozedur (2.3.2) aus dem cytoplasmatischen Extrakt solubilisierte markierte Protein in Abhängigkeit vom Zellwachstum (brauner Graph).

Die blaue Kurve beschreibt aus gleichem Experiment die Proteinmessung mit dem Lowry - Kit (s. 2.3.1.5).

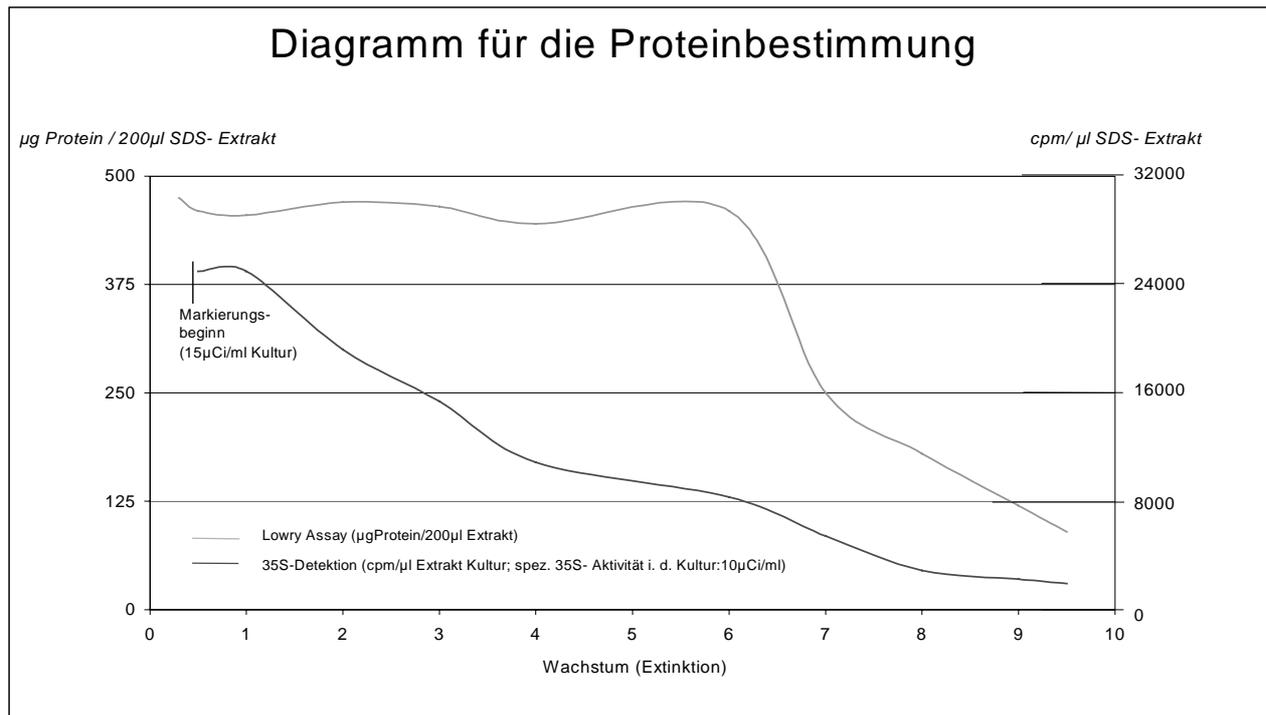


Abb. 18: Darstellung des Verlaufs der Proteinbestimmung aus dem gleichen SDS - Lysat des cytoplasmatischen Extrakts von *S. cerevisiae* durch

- szintillatorische 35S - Detektion (braun)
- und durch colorimetrische Messung mit dem Lowry Assay (blau)

Die Proteinbestimmung der radioaktiv markierten Zellen zeigt einen nahezu linearen Verlauf, der mit Zunahme des Zellwachstums abnimmt. Bei Extinktionswerten von 8 bis 9 beginnt die retardierende Phase, in der sich die Expression der meisten Stoffwechselproteine verringert, da Substrate wie Glucose und Supplemente reduziert sind. Wie in der Literatur beschrieben verhält sich die Proteinexpression in logarithmisch wachsenden Zellen proportional zum Zellwachstum [13], das sich in einer Steigungsgerade darstellen würde. Die konstante Abnahme des extrahierten Proteins in den Wachstumsphasen von OD 2 - 8 Kulturverlauf kann auf geringere Zellaufschlußraten bei zunehmender Zellkonzentration zurückzuführen sein. Im Bereich von 0,5 - 1,5 OD ist die extrahierbare Proteinkonzentration dem Zellwachstum nahezu konstant.

Die Tatsache, daß die beiden Kurven nicht parallel verlaufen und sich dadurch auch kein wachstumsunabhängiger Umrechnungsfaktor von cpm - auf Lowry - Konzentration bestimmen läßt, liegt zum einen an den Störfaktoren des Lowry Kits

und zum anderen an der zunehmenden Differenz von markierten zu nicht markierten Zellen mit zunehmenden Zellkonzentrationen.

Die zu erwartende Parallelität der Kurven ist bis zu einer OD von 1,5 erkennbar, bei höheren Zell - bzw Proteinkonzentrationen machen sich zum einen die Nachteile und Ungenauigkeiten von colorimetrischen Bestimmungen im Vergleich zu Isotopendetektion bemerkbar. Der wachstumsunabhängige Umrechnungsfaktor von cpm nach $\mu\text{g Protein} / \mu\text{l}$ bis zu einer OD von etwa 4 hat den Wert 0,0188 $\mu\text{g cpm} / \mu\text{l}$. Mißt man beispielsweise eine Aktivität des Extrakts von 25000 cpm/ μl so errechnet sich daraus nach Multiplikation mit dem Faktor eine Proteinkonzentration von 470 $\mu\text{g Protein} / 200 \mu\text{l SDS - Extrakt}$.

2.3.1.7 Fazit

Für die reproduzierbare und quantitative Extraktion des cytoplasmatischen Extrakts von *Saccharomyces cerevisiae* ist es unerlässlich den Wachstumsverlauf, die Zellzahl, das Trockengewicht und die extrahierte Proteinmenge zum Erntezeitpunkt genau zu kennen. Die Kenntnis der zellulären 35S - Methionin Absorption im zeitlichen Verlauf, sowie die Detektion des markierten Proteins sind Voraussetzung für eine elektrophoretische Trennung des radioaktiv markierten Proteoms. Zur Minimierung des proteolytischen haben sich definierte synthetische Medien als überlegen herausgestellt.

2.3.2 Probenaufbereitung für die Extraktion des cytoplasmatischen Extrakts

Die Probenaufbereitung für die Elektrophorese umfaßt zwei wesentliche Schritte, den Zellaufschluß und die Proteinsolubilisierung. Sollen reproduzierbare Aufbereitungen mit quantitativen Aufschlußraten erzielt werden, muß der Zellaufschluß wie auch die Proteinsolubilisierung auf die verschiedenen Zelltypen bzw. Anwendungen optimiert werden.

Hinsichtlich des Probenmaterials werden vier grundsätzliche Zelltypen unterschieden, welche entsprechende Aufschlußmethoden erfordern [29]:

- tierische Gewebeproben
- pflanzliche Gewebezellen
- Körperflüssigkeiten
- einzellige Organismen, lose Zellverbände

Zudem sollte die Aufbereitungsmethode unter Berücksichtigung von Besonderheiten der Probe, wie z.B. proteolytische Aktivitäten, Zellwandaufbau, Proteinmodifikationen oder Ionenkonzentrationen durchgeführt werden [24].

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten die Probenaufbereitung durchzuführen. Zum einen kann der cytoplasmatische Extrakt, zum anderen kann eine bestimmte Proteinfraction isoliert werden.

Der cytoplasmatischen Extrakt enthält Proteine des Cytosols, vieler Organellen und surfaciale Proteine [6]. Um dieses Zellysat zu extrahieren empfiehlt sich die Anwendung von intensiven Zellaufschlußmethoden wie Ultraschall, Grinding, Glass Beading oder Druckzellen. Für diese Zellaufschlüsse werden erhöhte Energiemengen in den Extrakt übertragen, die zu einer Erhitzung des Lysats führen. Um Proteinmodifikationen durch Erhitzung zu vermeiden, muß bei diesen Aufschlußmethoden entsprechend gekühlt werden. Die Bereitung des "cytoplasmatischen Extrakts" solubilisiert einen großen Teil der exprimierten Proteine und wird von den meisten Arbeitsgruppen bearbeitet.

Eine Fraktionierung oder die Extraktion von Proteinen, welche nicht im cytoplasmatischen Extrakt gelöst sind, stellt einen ungleich höheren Anspruch an die Probenaufbereitung dar und ist in der Regel mehrstufig. Der Einsatz von "weichen" Aufschlußmethoden wie der Osmolyse, die Autolyse, den enzymatischen Aufschluß oder einer Detergenzlyse ist in diesem Fall besser geeignet, da hierbei die Zellstrukturen selektiv getrennt werden und so für weitere Fraktionierungen verwendet werden können.

Die Solubilisierung und Disaggregation der Proteine findet in der Regel durch den Lysepuffer statt, der sich aus einem Chaotrop (z.B. Harnstoff, Thioharnstoff, Guanidin), einem Reduktionsmittel (z.B. DTT, TBP) einem Detergenz (z.B. CHAPS, NP40) und Ampholyten (z.B. Pharmalyte 3 - 10) zusammensetzt. Alternativ zu streng denaturierenden Bedingungen (z. B. 9 M Harnstoff) können auch Lysepuffer verwendet werden, die bei etwa 4 molaren Harnstoffkonzentrationen eine native Aufbereitung zulassen; dabei bleiben Proteinkonformationen in der Regel erhalten oder reversibel faltbar, enzymatische Aktivitäten können nach elektrophoretischer Trennung bestimmt werden [25, 26]. Es gibt zu diesen grundlegenden Aufbereitungsschritten (Zellaufschluß, Proteinsolubilisierung) weitere optionale Aufarbeitungen wie Präzipitationen (TCA, Ethanol / Aceton), Detergenzsolubilisierungen (SDS, Desoxycholat), Membranfiltrationen,

fraktionierende Zentrifugation oder Dialysen. Bei bestimmten Proben kann der Einsatz von Proteaseinhibitoren oder DNAsen bzw. RNAsen zur Verbesserung der elektrophoretischen Trennung beitragen [30].

In diesem Abschnitt werden verschiedene Zellaufschlüsse und Proteinsolubilisierungen für die funktionale Analyse von Stressproteinen aus dem "cytoplasmatischen Extrakt" (s. Kapitel 3) und für die Aufbereitung neuer Proteinfractionen (s. Kapitel 4) durchgeführt und graphisch ausgewertet. Folgende Kriterien finden bei der Durchführung besondere Beachtung:

- höchste Reproduzierbarkeit
- maximale Anzahl von extrahierten Proteinen, besonders hydrophober Proteine
- minimaler proteolytischer Abbau
- kompakte Durchführung
- hohe Selektivität in den verschiedenen Fraktionen

2.3.2.1 Zellaufschluß 35S - markierter Proben

Um die genaue Konzentration des extrahierten Proteins in Abhängigkeit zu dem angewandten Aufschluß bestimmen zu können, wurden die Zellen radioaktiv markiert und das extrahierte Protein anschließend im Szintillationszähler bestimmt (s. 2.3.1.6.4). Diese Methode der Proteinquantifizierung ist im Vergleich zu colorimetrischen Proteinbestimmungen (Lowry , Bradford) weitgehend frei von störenden Einflüssen und somit für die exakte Dokumentation des Aufschlußergebnisses besser geeignet.

Für die elektrophoretische Trennung des "cytoplasmatischen Extrakt" ist nicht nur die extrahierte Proteingesamtmenge, sondern zudem die Zahl der trennbaren Proteine entscheidend.

Um die Qualität des Aufschlusses bzgl. verschiedener Proteingruppen auswerten zu können, wurde exakt die gleiche Proteinkonzentrationen (3 Mio cpm) aus den verschiedenen Aufschlüssen auf das Gel geladen und mit identischen Expositionszeiten (38 h) visualisiert.

Durch das Auftragen von äquivalenten Proteinkonzentrationen aus den verschiedenen Aufschlüssen läßt sich nach Gelauswertung genaue Aussage über die Abhängigkeit von Zellaufschluß und extrahierter Proteinfraction machen.

2.3.2.1.1 Zellaufschlüsse in der Interferenzkontrastmikroskopie

Es werden eine große Vielzahl von physikalischen, chemischen, enzymatischen und mechanischen Zellaufschlüssen in Abhängigkeit von den aufzuschließenden Zellen bzw. dem Verwendungszweck durchgeführt.

Folgende Geräte bzw. Methoden haben sich heute etabliert [16]:

- Druckzellen (Frenchpress, Gaulin Homogenizer, Eaton Press),
- Schwingmühlen,
- enzymatische Lyse (Cellulasen, Pektinasen, Glucanasen, Lysozym),
- Glas bead Homogenisierungen (DynoMill, PS Potter),
- Autolysen,
- Detergenzlysen (SDS, Desoxycholate),
- Osmolysen,
- Zerreiben (flüssigen Stickstoff, Glas- Quarzgranulat),
- Ultraschallwellen,
- Gefrier - Tauzyklen

Stehen bei großindustrieller Anwendung meist wirtschaftliche Aspekte im Vordergrund, so ist für die Proteomanalyse eine hohe Reproduzierbarkeit, geringe Proteinmodifikationen und eine quantitative Lyse der verschiedenen Proteinfractionen entscheidend. Für diese Anforderungen wurden das Grinding, der enzymatische Aufschluß, die Autolyse und der Ultraschallaufschluß verglichen, wobei die enzymatische Lyse und die Autolyse zu den sanften, Grinding und Ultraschallaufschluß zu den intensiven Aufschlußmethoden gezählt werden:

1. *Grinding*

Der Zellaufschluß durch Zerreiben der bei -196 °C gefrorenen Zellen wurde mit Mörser und Pistill durchgeführt [31]. Die Methylenblaufärbung färbt selektiv das Cytoplasma, die Zellwand bleibt farblos .

In Abb. 19a sind intakte Zellen neben homogenisierten Zellen zu erkennen; diese Tatsache läßt bereits einen ersten Hinweis auf die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu, da das Verhältnis von intakten Zellen zu aufgeschlossenen durch das manuelle Zermahlen nicht konstant gehalten werden kann.

2. *enzymatischer Aufschluß*

Die Struktur der Hefezellwand besteht aus 1,3 - und 1,6 - glycosidisch verknüpftem Glucan. Als dritter Bestandteil ist Chitin nachgewiesen worden [32]. Die genaue Sekundärstruktur ist noch nicht geklärt [18]. Es sind mehrere zellwandlytische

Enzyme z.B. Lyticase (Arthrobacter luteus Isolat, Sigma), N-Acety- β -D-glucosaminidase (Roche), β -endo-chitinase (Fluka) eingesetzt worden [16].

Abb. 19b zeigt die Bildung von kleineren Zellverbänden nach dem Zellwandverdau mit der Lyticase. Die farblose Zellwand ist bereits verdaut, es entstehen Protoplasten, die durch die hydrophile Oberfläche der Cytoplasmamembran kleine Zellverbände bilden; die "leeren" Zellen in den Aggregaten können durch Platzen der Cytoplasmamembran auf Grund von mechanischem oder osmotischem Einfluß entstehen [32].

3. Autolyse

Die Inkubation von Hefezellen in Toluol verhindert bakterielles Wachstum und permeabilisiert gleichzeitig die Plasmamembran der Zelle. Intrazelluläre Hydrolasen gelangen durch die Plasmamembran in den periplasmatischen Raum und beginnen die Zellwand abzubauen. Es entsteht bei Verwendung von isotonischer Inkubationslösung ein intakter Protoplast [16].

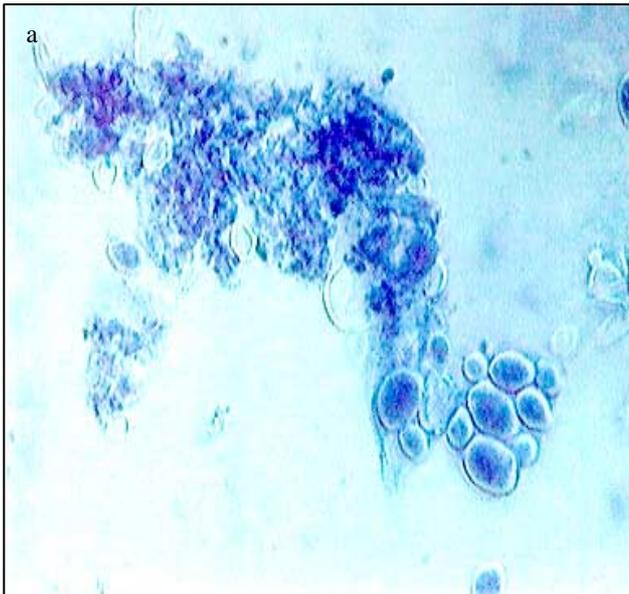
Wie auch bei den Protoplasten der enzymatischen Lyse aggregieren die hydrophilen Oberflächen der Cytoplasmamembran zu länglichen Zellverbänden. Durch die lange Inkubation (36 h) in der hyperosmotischen Lösung (Toluol - Lysepuffergemisch) verliert die Zelle Wasser; der Protoplast erscheint kleiner und nicht mehr rundlich. Die Autolyse der Zellwand ist quantitativ und ohne Zellaufbruch. Werden die Zellen nun in eine hyperosmotische Lösung wie zum Beispiel den Lysepuffer gegeben, platzen die Protoplasten und geben den cytoplasmatischen Extrakt frei [33].

4. Ultraschall

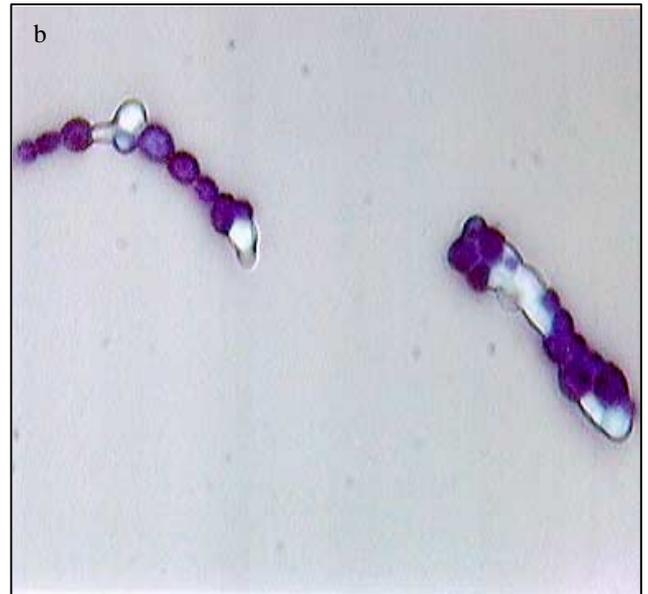
Der Ultraschall wird zu den physikalischen Zellaufschlußmethoden gezählt. Abhängig vom Zelltyp können Agitationszeit, Zyklenzahl und Leistungsabgabe eingestellt werden [31].

In der Abb. 19d lassen sich geöffnete "weiße" Zellen von den intakten "blaugefärbten" mit weißer Zellwand unterscheiden. Die Wirkungen der Ultraschallwellen auf die aufgebrochenen Zellen sind an der Oberfläche der aufgebrochenen Zellen zu erkennen. Die "weißen" Zellen stellen nur noch die Zellwand von *S. cerevisiae* dar. Die Plasmamembran ist zerstört und das Cytoplasma der Zelle entfließen. Es wurde mit dieser Methode eine Aufschlußrate von etwa 30% erreicht.

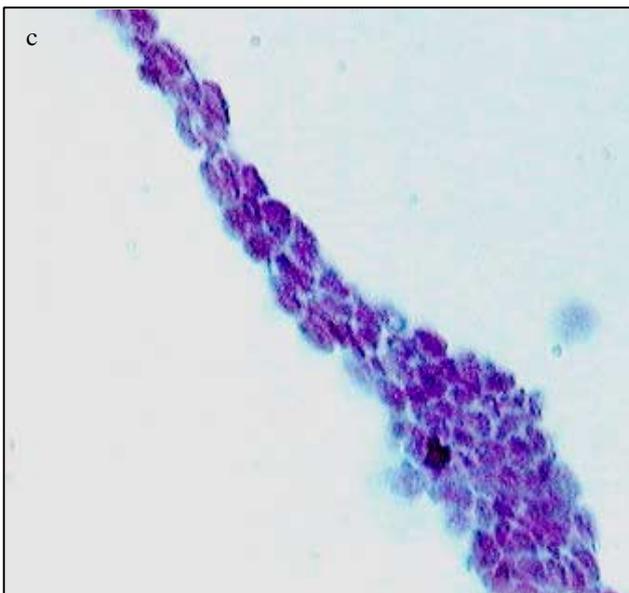
Grinding



enzymatischer Aufschluß



Autolyse



Ultraschall

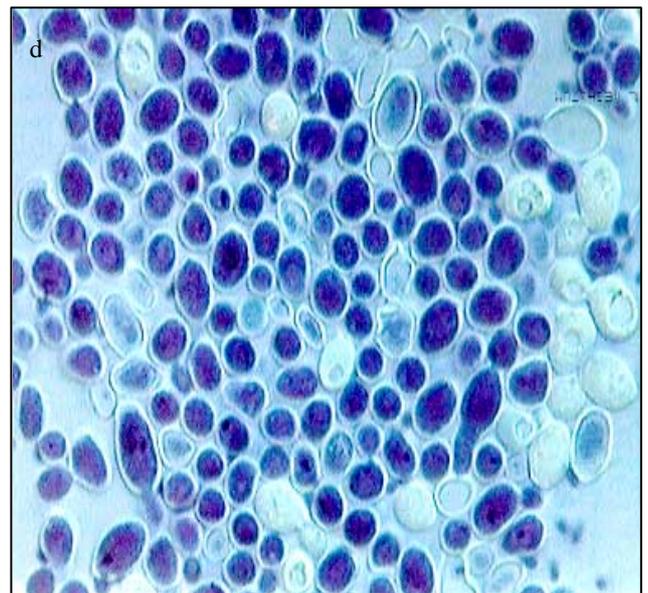


Abb. 19: Lichtmikroskopische Darstellung von *Saccharomyces cerevisiae* (Wildtyp S288c) nach verschiedenen Zellaufschlüssen: Grinding, enzymatische Lyse, Autolyse, Ultraschall; Methylenblaufärbung bei 1200facher Vergrößerung

2.3.2.1.2 35S - Quantifizierung des extrahierten Proteins

Da für die vier verschiedenen Aufschlüsse gleiche Zellmassen, 35S - Aktivitäten und bei der Solubilisierung gleiche Volumina verwendet wurden, ist die Aktivität im Extrakt und im Rückstand, welcher intakte Zellen und Zellreste enthält, ein Maß für

die Effizienz des Aufschlusses. Es kann hierbei aber nur eine Aussage über die extrahierte Proteinmenge getroffen werden, nicht aber über Art und Vielfalt der extrahierten Proteine. Folgende Aktivitäten in den Extrakten wurden gemessen:

Tab. 6: Aktivitätsmessung des extrahierten Proteins nach verschiedenen Zellaufschlüssen. Die Auftragsmenge pro Gel (IPG 4-7) beträgt 3 Mio cpm.

Aufschluß	Zerreiben in Stickstoff	Autolyse in Toluol	enzymatischer Aufschluß	Aufschluß mit Ultraschall
Aktivität / μl	22724 cpm	50044 cpm	93277 cpm	51012 cpm
Auftragsmenge 3 Mio counts	132 μl	60 μl	32 μl	59 μl

Die Aktivitätsmessung der markierten Zellen nach der Ernte ohne Zellaufschluß ergaben 94833 cpm/ μl . In der folgenden Graphik ist gelöstes Protein, welches als Extrakt auf das Gel geladen wird mit dem im Rückstand befindlichen Protein, das verworfen wurde, verglichen.

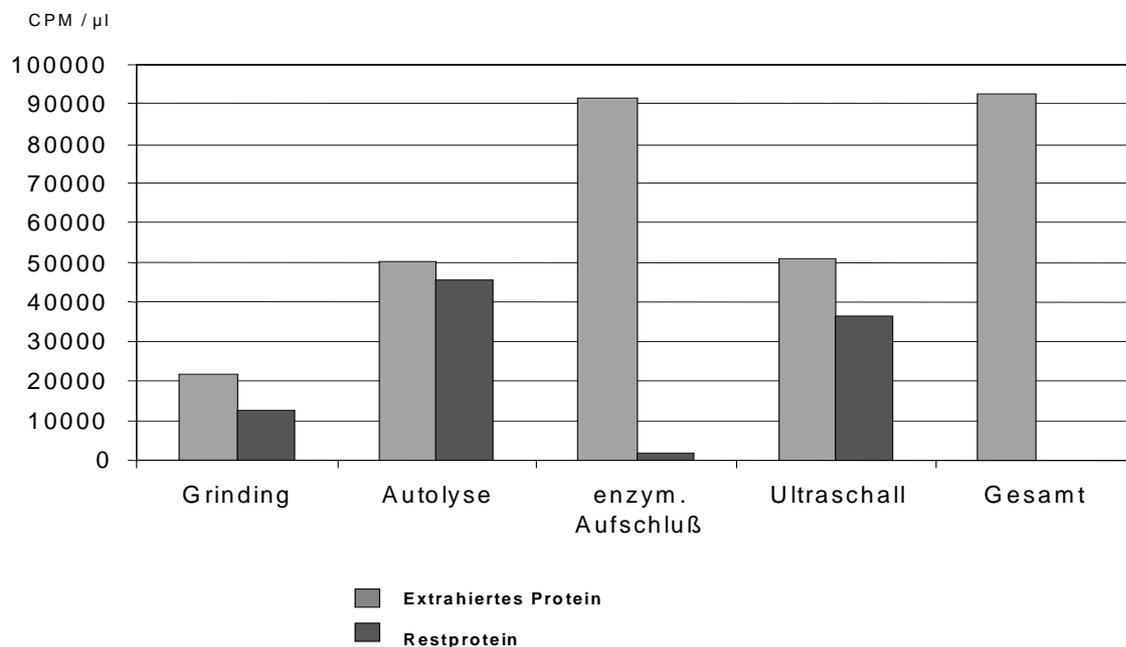


Abb. 20: Gegenüberstellung von extrahiertem und nicht solubilisiertem Protein in Abhängigkeit von der Zellaufschlußmethode

Die Auswertung der Graphik zeigt, daß nach Addition der Aktivitäten von extrahiertem Protein und den Aktivitäten des im Rückstand befindlichen Restproteins, im Aufschluß durch Grinding mit nur etwa 34000 cpm/ μl (Gesamtaktivität: 94833 cpm/ μl)

nahezu 2/3 der Gesamtproteinmenge verloren ging. Ein wesentlicher Grund hierfür dürfte in der hohe Proteinaffinität des keramischen Mörsermaterials liegen; zudem kann dieser Aufschluß nicht in einem einzigen Gefäß durchgeführt werden.

Die Autolyse, wie auch der Ultraschallaufschluß zeigten geringere Proteinverluste; bei dem Ultraschallaufschluß können kleinere Proteinverluste (4000 - 8000 cpm/ μ l) durch Adhäsionen am Ultraschallstab entstehen. Etwa 40-50% des Gesamtproteins konnte freigesetzt werden.

Der enzymatische Zellaufschluß zeigte nach Inkubation mit der Lyticase (Sigma) eine nahezu quantitative Freisetzung des gesamten Proteins von *S. cerevisiae*. Bei Zentrifugation der lysierten Zellen konnten im Zentrifugengefäß kaum Lysereste detektiert werden.

2.3.2.1.3 2D- Elektrophorese der verschiedenen Aufschlüsse

Betrachtet man den verschiedenartigen Aufbau zellumgebender Membranen (Murein, Cellulose, Pektine, Glucane, Chitin, Phospholipide), die beispielsweise im Fall der Hefezellwand bis zu 30% ihres Trockengewichtes ausmachen kann [32] und nimmt man die Aussage zur Kenntnis, daß bis zu 80% der zellulären Proteine in einer Weise membrangebunden sind [11], so läßt sich die Bedeutung des Zellaufschlusses für die Proteomanalyse erahnen. Des weiteren werden speziell bei der Wahl von intensiven Zellaufschlußmethoden (Ultraschall, Grinding, Glasbeading) zelluläre Kompartimente zerstört und dabei intrazelluläre Proteasen freigesetzt. Diese Endo- und Exopeptidasen spalten Proteine an spezifischen Stellen; eine funktionale Proteinanalyse oder Identifizierung ist mit Proteinabbauprodukten nicht mehr möglich [34].

Wie auch Forster et al bei der Vorstellung seines neuen "high pressure - Systems" feststellte, ist auf Grund der Vielfältigkeit der verschiedenen Gewebe und Anwendungen die Entwicklung des "Homogenizers" für alle Proben, der mit Aufschlußraten bis zu 100% unter Vermeidung von Proteinmodifikationen arbeitet, auch in weiter Zukunft nicht zu erwarten [31].

1. Grinding

Das Zerreiben der Probe mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff oder Silikagranulat wird oftmals bei dem Aufschluß pflanzlicher Gewebe und Zellen angewendet [16]. Vergleicht man die entsprechende elektrophoretische Trennung, so fällt auf, daß kaum proteolytische Abbauprodukte im niedermolekularen Bereich vorhanden sind (Abb. 21). Allerdings erkennt man auch, daß viele "low abundance spots" im Vergleich zum Ultraschallaufschluß nicht solubilisiert wurden; leichtlösliche, cytosolische Proteine, wie z. B. die Fruktosebisphosphataldolase 1 (FBA1) wurden dagegen in sehr hohen Konzentrationen freigesetzt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine unvollständige Freisetzung membrangebundener Proteine durch diese Aufschlußmethode.

2. Enzymatischer Aufschluß

Nachdem bei der scintillatorischen Messung des extrahierten Proteins beim enzymatischen Verdau, ein nahezu vollständiger Zellaufschluß angenommen werden mußte, waren große Erwartungen in das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung gesetzt worden, die sich aber leider nicht erfüllten. Im unteren Abschnitt des Gels (Abb. 21) sind die Produkte eines nahezu vollständigen proteolytischen Abbaus zu erkennen [27]. Die wenigen nicht abgebauten Proteine könnten zelleigene Proteasen oder zelluläre Proteaseinhibitoren sein. Als Grund für die starken Proteaseaktivitäten können zelluläre Proteasen der Hefe, die während der nativen Inkubationsphase durch das lytische Enzym aktiv waren, oder aber zellfremde Proteasen, die durch Kontaminationen des Enzyms in den Extrakt gelangten sein könnten, genannt werden. Nach hartnäckiger Nachfragen beim Hersteller wurden die Aktivitätsdaten des Enzyms Zymolase / Lyticase übersendet:

Hauptaktivität: β -1,3- glucan laminaripentaohydrolase 200000 u/g

Nebenaktivitäten: β -1,3glucanase ~150000 u/g

Protease ~15000 u/g

Mannanase ~1,50000 u/g

DNase, RNase, Xylanase, Phosphatase, Amlase n. nachweisbar

Auf Grund dieser Angaben und der dargestellten Ergebnisse muß trotz bekannter vakuolärer Proteasen der Hefe [30] angenommen werden, daß der auf dem Gel erkennbare proteolytische Abbau primär aus Kontaminationen des lytischen Enzyms stammt.

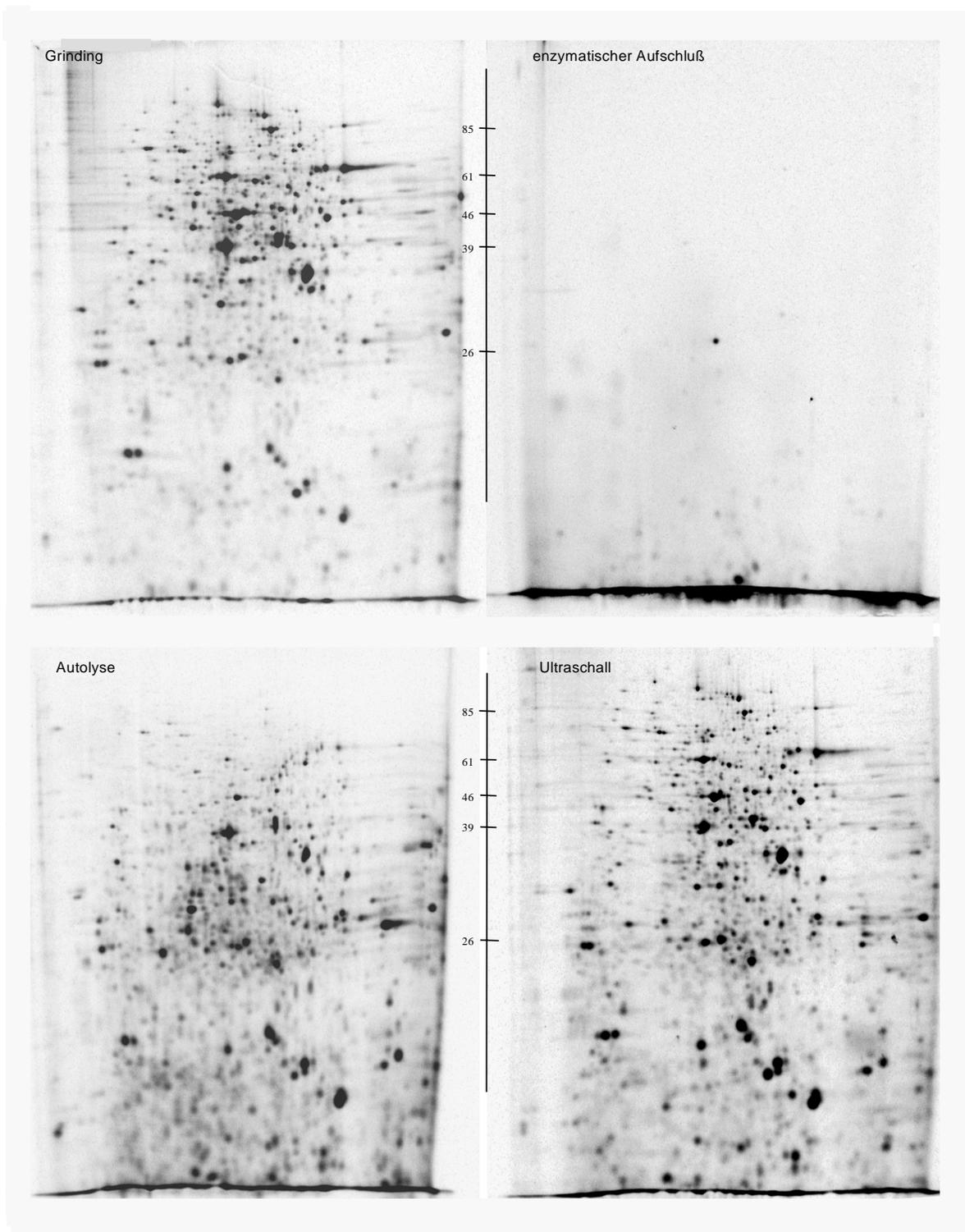


Abb. 21: Vergleich vier verschiedener Zellaufschlüsse des "cytoplasmatischen Extrakts" von *Saccharomyces cerevisiae*. Die 2D elektrophoretische Trennung wurde in der 1. Dimension auf einem IPG 4-9, in der 2. Dimension auf einem T13%, C2,7% SDS - PAGE durchgeführt. Die Zellen wurden mit 10 μCi / ml ^{35}S -Methionin markiert und 54 h exponiert Auftrag: 3mio cpm

3. Autolyse

Die elektrophoretische Trennung der durch Toluolinkubation induzierten Autolyse zeigt im Bereich von 15 - 45KD eine Vielzahl extrahierter Proteine, vor allem von "low abundance proteins" (Abb. 21). Im hochmolekularem Bereich sind jedoch nur wenig Spots erkennbar. Nach B. Hazel et al besitzen Hefen eine ungewöhnlich hohe Vielfalt an aggressiven Proteasen. Diese Proteasen sind vorwiegend in der Vakuole der Zelle lokalisiert und werden durch Zellyse unter nativen Bedingungen in ihrer aktiven Form freigesetzt. Folgende, für die intensive proteolytische Aktivität der Hefe verantwortlichen vakuolären Proteasen, sind bekannt [34]:

Carboxypeptidas Y (PRC1)	Proteinase A (PEP4)
Proteinase B (PRB1)	Amino-peptidase Y (APY1)
Carboxypeptidase S (CPS1)	Amino-peptidase I (APE1)
Dipeptidylamino-peptidase B (DAP2)	

Der beginnende Abbau läßt sich im Gel deutlich an dem Fehlen der hochmolekularen Proteine im pH - Bereich von 5 - 7 und dem KD - Bereich von 60 - 120 erkennen (V-Form).

4. Ultraschall

Bei den mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen sind weder proteolytischer Abbau, noch das Fehlen von bestimmten Proteingruppen, wie z. B. der "low abundant proteins" oder aber hochmolekularer Proteine bis 180 kD zu erkennen.

Insgesamt betrachtet ist der Zellaufschluß für den "cytoplasmatischen Extrakts" der Hefe mit dem Ultraschalleinsatz am besten geeignet. Es wurden nicht nur die größte Anzahl an Proteinen solubilisiert, ein weiterer Vorteil ist auch die Kompaktheit dieser Methode, die ein reproduzierbares Arbeiten ermöglicht. Für weitere Zellaufschlüsse zum "cytoplasmatischen Extrakts" wurde ausschließlich Ultraschall verwendet.

Eine Autolyse der Zelle könnte bei nativem Arbeiten Anwendung finden und die enzymatische Lyse, bei Verwendung eines proteasefreien Enzyms, beispielsweise für eine Präfraktionierung der Organellen eingesetzt werden.

2.3.2.2 Proteinsolubilisierung und Disaggregation

Für die Proteinsolubilisierung und Disaggregation wird in der Probenaufbereitung für die Elektrophorese der "Lysepuffer" verwendet [29]. Dieser beinhaltet ein Chaotrop, wie z.B. Harnstoff, Thioharnstoff oder Guanidin, ein Detergenz (z.B. CHAPS, Triton,

Desoxycholat), ein Reduktionsmittel wie z.B. Dithiotreitol, Tributylphosphin, Dithioerytol und Ampholyte wie beispielsweise Pharmalyte 3 - 10.

Harnstoff in Konzentrationen von 8 - 9M spaltet Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine. Es entstehen stabilisierte denaturierte Polypeptide die sich auf Grund ihres isoelektrischen Punktes elektrophoretisch trennen lassen.

Disulfidbrückenbindungen der nativen Proteine werden durch SH - Gruppen des DTT reduziert; es entstehen lineare Peptide die durch Chaotrop und Detergenz stabilisiert werden. CHAPS gehört zu den zwitterionischen Detergenzien. Den hydrophoben Teil bildet ein Steroidkörper, die hydrophile Gruppe besteht aus einer tertiäre Ammoniumgruppe und einem Sulfonatrest. Detergenzien werden für die Disaggregation der denaturierten Proteine verwendet, da speziell hochmolekulare Proteine zu Aggregatbildung neigen. Neben CHAPS können amphotere, anionische und kationische Detergenzien verwendet werden die verschiedene kritische Micellenkonzentrationen (CMC) und Proteinaffinitäten aufweisen. Ampholyte sind amphotere Substanzen, die den Probeneintritt der Proteine in die erste Dimension der Elektrophorese verbessern [36].

Die nun nach Solubilisierung in Lysepuffer reduzierten, disaggregierten und denaturierten Polypeptide werden jetzt für die isoelektrische Fokussierung auf das Gel geladen.

Für die Extraktion des cytoplasmatischen Extrakts wird ein Lysepuffer folgender Zusammensetzung verwendet:

7M Harnstoff	2M Thioharnstoff
4% CHAPS	1% DTT
0,5% Pharmalyte	

Die Verwendung von einem Chaotropengemisch (Harnstoff / Thioharnstoff) extrahiert nach Rabilloud [36] zudem einen höheren Anteil an hochmolekularen Proteinen. Eine Erklärung hierfür kann in dem mehr hydrophoben Charakter des Thioharnstoffs gesehen werden. Das Schwefelatom des Thioharnstoffs bildet keine Wasserstoffbrückenbindungen aus und hat somit höhere Affinitäten zu den hochmolekularen Proteinen.

Das Resuspendieren der Probe in Lysepuffer und anschließendem Zellaufschluß in demselben hat sich als Standardaufbereitung etabliert [2, 8, 16].

Zu dieser "Standardaufbereitungsmethode" sind zusätzliche Schritte in der Probenaufbereitung möglich und oftmals notwendig.

Ziel zusätzlicher Schritte in der Solubilisierung können beispielsweise eine selektive Extraktion bestimmter Proteinfractionen [29], oder aber auch die Erhöhung der Reproduzierbarkeit bzw. der qualitativen Optimierung der Proteinextraktion zum Ziel haben.

Nachteilig können sich manche mehrstufige Methoden wie z. B. Dialysen oder Präzipitationen auswirken, die reproduzierbares Arbeiten erschweren. Eine optionale Anwendung in der Proteinsolubilisierung, die nun im folgenden beschrieben wird, ist das Resuspendieren und Kochen der Probe in SDS - Puffer.

2.3.2.2.1 Präsolubilisierung 35S- markierter Zellen durch SDS

Beim Präsolubilisieren in Natriumdodecylsulfat- Puffer (SDS - Puffer) wird das Pellet nicht in Lysepuffer sondern in SDS - Puffer resuspendiert. Nachdem der Zellaufschluß (Ultraschall) durchgeführt worden ist, wurde der Extrakt fünf Minuten gekocht, anschließend auf Raumtemperatur gekühlt und schließlich mit Lysepuffer verdünnt. Die maximale SDS- Konzentration für die Elektrophorese liegt bei 0,25% SDS im aufzutragenden Extrakt [29]. Wird diese Konzentration überschritten, treten Störungen bei der isoelektrischen Fokussierung durch eine SDS bedingte Maskierung des Proteins auf.

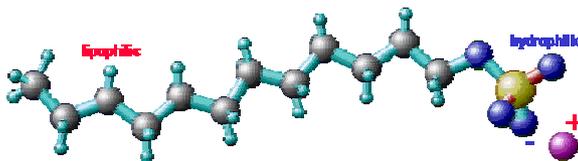


Abb. 22: Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Präsolubilisierung des Extrakts [37].

Natriumdodecylsulfat (Abb. 22) ist die einzige bisher bekannte Substanz, die durch ihre typische hydrophile und hydrophobe Polarisierung mit allen Proteinen in Wechselwirkung treten kann [29]. Der Zellaufschluß und ein Präsolubilisieren in heißem SDS wird im folgenden für die Optimierung der Proteinsolubilisierung untersucht.

Das Resuspendieren der geernteten Zellen in heißem SDS - Puffer, der Ultraschallaufschluß bei 90 °C und das anschließende Kochen (5 min) und Extrahieren der Suspension wurde mit der Standardmethode (Ultraschallaufschluß bei 5 °C in Lysepuffer, Extraktion) verglichen [25].

Bei Hefen sind intensive proteolytische Aktivitäten nachgewiesen worden [27], deren höchste Abbauraten in einem Temperaturintervall von 15 °C - 50 °C liegen.

Der Zellaufschluß und das Kochen in heißem SDS läßt höchste Proteinlöslichkeit und Denaturierung bzw. Inaktivierung der Proteasen erwarten. Zudem läßt sich eine Proteinbestimmung z.B. nach Lowry nur im SDS - Extrakt nicht aber im Lysepufferextrakt durchführen.

Die Aufzucht der Zellen, radioaktive Markierung und Zellaufschluß (Ultraschall) wurden nach Standardprotokoll (s. 2.2.1, 2.2.2) durchgeführt.

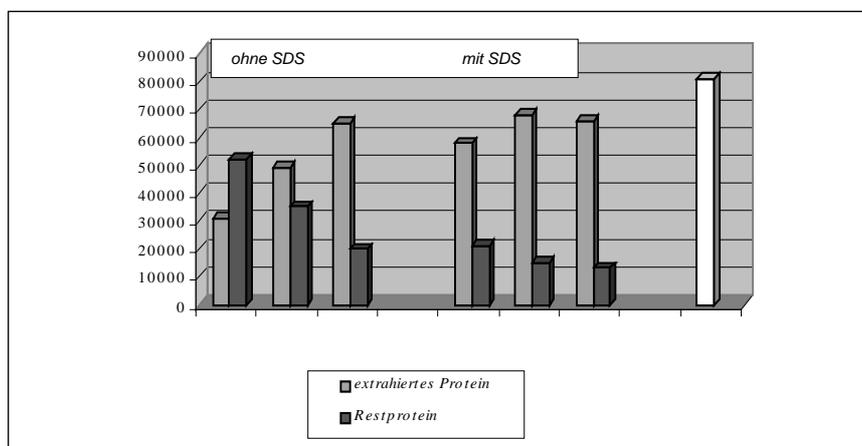


Abb. 22: Isotopenmessung des extrahierten Proteins mit und ohne SDS - Präsolubilisierung in Abhängigkeit von der Extraktionszeit

Die Abb. 22 zeigt die Proteinextraktion in Abhängigkeit von der Präsolubilisierung und der Extraktionszeit. Werden Restprotein des Rückstandes und extrahiertes Protein addiert, so ergibt sich bei allen Versuchsreihen eine Gesamtproteinmenge von etwa 80000 cpm / μ l, woraus sich eine hohe Signifikanz dieses Versuches für die Ergebnisdiskussion ergibt.

Wertet man die scintillatorische Messung des extrahierten Proteins bei den verschiedenen Extraktionszeiten (Abb. 22, Tab. 6) aus, so ist festzustellen, daß bei einer Präsolubilisierung in heißem SDS mit anschließendem Kochen der Suspension, die extrahierte Proteinkonzentration weitgehend unabhängig von der Extraktionszeit ist. Um mit der Standardextraktion ähnliche Proteinquantitäten zu extrahieren, mußte 24 Stunden bei RT geschüttelt werden.

2.3.2.2.2 Computerdensitometrische Gelauswertung

Um eine qualitative Aussage über die extrahierten Proteine machen zu können, wurde bei identischen Aufzucht- und Zellaufschußbedingungen der cytoplasmatischen Extrakt mit den oben beschriebenen Solubilisierungsmethoden 3×10^6 cpm (Tab. 6) auf einem IPG 4 - 7 elektrophoretisch getrennt (Abb. 24).

Tab. 6: Extraktionszeiten und Auftragsmengen der präsolubilierten bzw. nicht präsolubilierten Extrakte

Extraktionszeit	ohne Präsolubilisierung			mit Präsolubilisierung		
	10 min	1 h	24 h	10 min	1 h	24 h
extrahiertes Protein/ μ l	31000 cpm	49000 cpm	65000cpm	58000 cpm	67000 cpm	66000 cpm
Restprotein/ μ l	52000 cpm	35000 cpm	20000 cpm	21000 cpm	15000 cpm	12000 cpm
Auftragsmenge 3 mio counts	97 μl	61 μl	46 μl	51 μl	44 μl	45 μl

Proteinaktivitätsmessung des unbehandelten Zellpellets: 78000 cpm / μ l

Vergleicht man die "Standardextraktionsmethode" in den verschiedenen Extraktionszeiten (10 min, 1 h, 24 h), so lassen sich Übereinstimmungen mit der Isotopendetektion (Abb. 22) erkennen.

Nach 10 min Extraktionszeit ist quantitativ wenig Protein extrahiert (~37% des Gesamtproteins). Die qualitative Analyse nach computerdensitometrischer Spotdetektion (Abb. 25) ergibt im Vergleich zu präsolubilierten Extraktion mit gleicher Extraktionszeit nur an 15% der detektierten Spots (398 \rightarrow 2043).

Betrachtet man die Trennung der "Standardextraktion" nach 24 h, bei der nun quantitativ (63000 cpm / μ l) wie auch qualitativ (1788 spots) eine zufriedenstellende Extraktionen zu erwarten wäre, so sind hier Ähnlichkeiten zu der Trennung nach autolytischem oder enzymatischen Zellaufschluß (Abb. 21) unverkennbar. Eine große Anzahl an niedermolekularen Proteinen mit charakteristischem Aussehen deuten auf proteolytischen Abbau hin.

Wertet man die scintillatorische Messung des extrahierten Proteins bei den verschiedenen Extraktionszeiten (Abb. 22) aus, so ist festzustellen, daß bei einer Präsolubilisierung in heißem SDS mit anschließendem Kochen der Suspension die

extrahierte Proteinkonzentration weitgehend unabhängig von der Extraktionszeit ist. Um mit der Standardextraktion ähnliche Proteinquantitäten zu extrahieren, mußte 24 Stunden bei RT geschüttelt werden.

Bei der 2D- elektrophoretischen Trennung mit Präsolubilisation und 24 h Extraktionszeit sind typische Carbamylierungsketten, die bei einer Erwärmung von harnstoffhaltigen Extrakten über 38 °C entstehen können, erkennbar [28]:

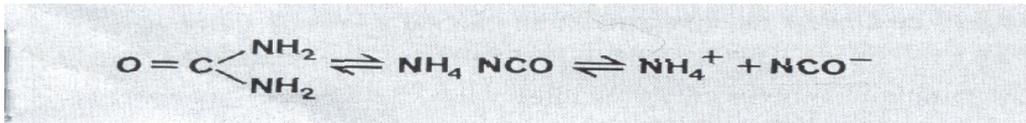


Abb. 23: temperaturabhängige Gleichgewichtsreaktion, die bei Cyanatbildung (>38°C) zur Carbamylierung von Proteinen im Lysepufferextrakt führt

Diese Carbamylierungen wurden mehrmals, auch unabhängig von einer SDS - Präsolubilisierung, bei langen Extraktionszeiten (24 h) beobachtet. Langes Schütteln im Laborschüttler bei RT führte wahrscheinlich hierbei zu Erwärmung und zu derartigen Proteinmodifikationen.

Durch die Präsolubilisierung in SDS kann auf lange Extraktionsintervalle, in denen Modifikationen der Proteine entstehen können, verzichtet werden; zelluläre Protease werden durch stark denaturierende Bedingungen inaktiviert und die Proteinlöslichkeit ist durch ein Kochen in SDS maximiert. Die Probenaufbereitung des "cytoplasmatischen Extrakts" von *S. cerevisiae* gewinnt durch diese Präsolubilisierung an Reproduzierbarkeit; die Entstehung von Proteinmodifikationen ist minimiert.

Für weitere Versuchen wird die Proteinextraktion nach dem Resuspendieren der Zellen in heißem SDS und 10 minütigem Kochen nach Ultraschallaufschluß, mit einem Extraktionsintervall von 40 min bei RT durchgeführt.

	ohne SDS - kochen			mit SDS - kochen		
Extraktionszeit	10 min	1 h	24 h	10 min	1 h	24 h
Image Analysis						
Spotdetektion	398	1233	1788	2043	1992	1688

Tab. 7: Ergebnistabelle der computerdensitometrischen Spotdetektion von Abb. 25

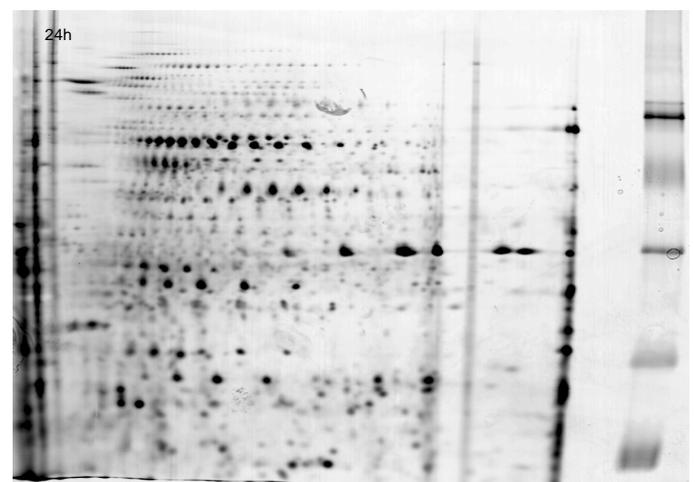
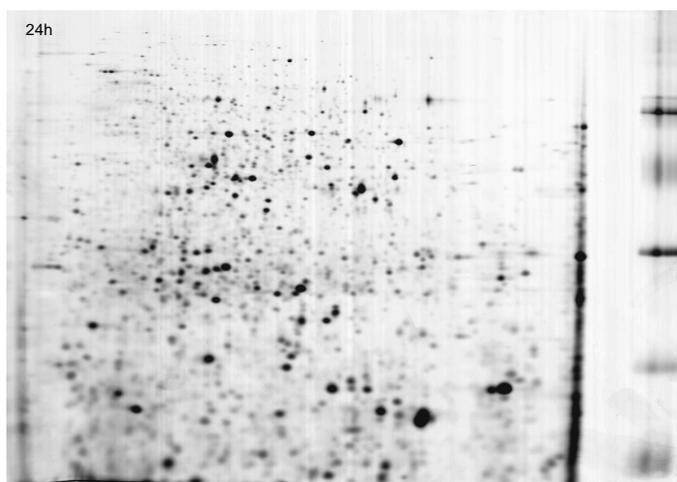
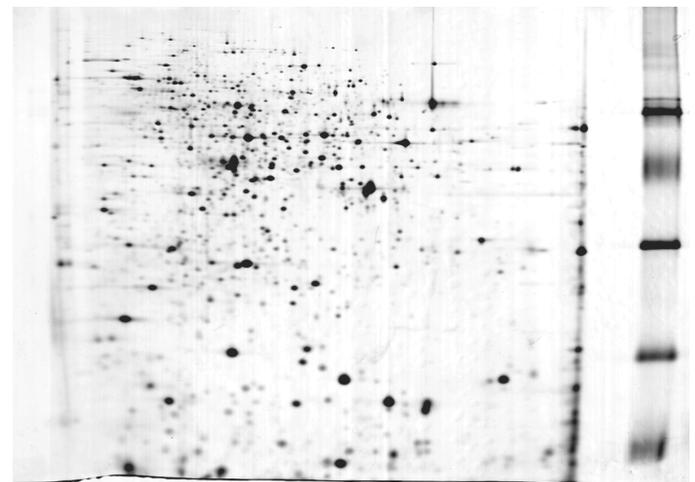
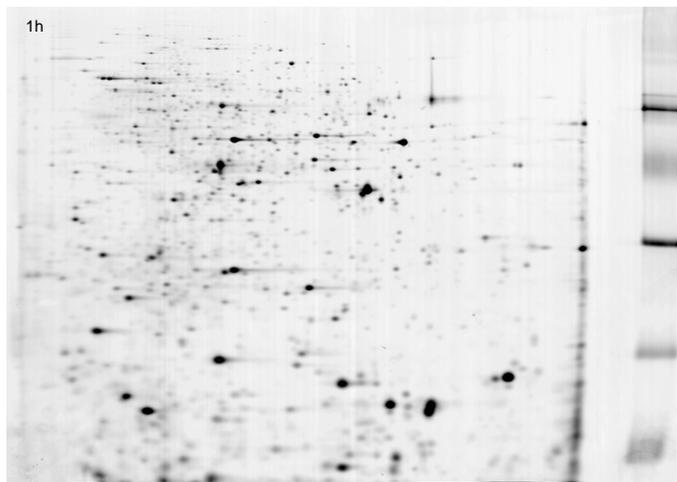
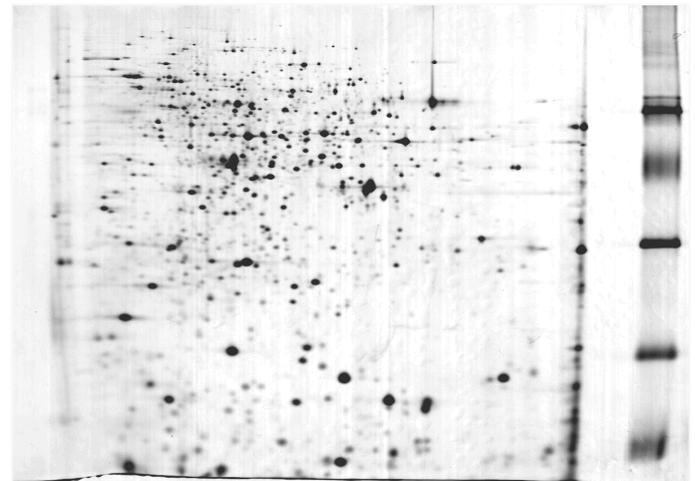
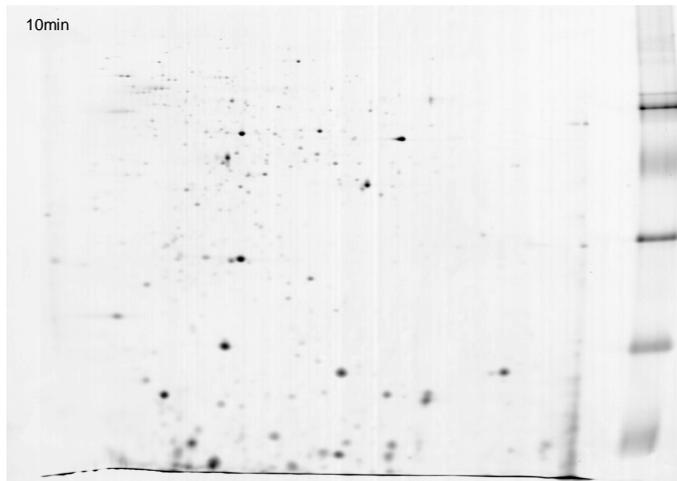
*ohne Präsolubilisierung**mit Präsolubilisierung*

Abb. 24: Vergleich von Proteinsolubilisierungen mit und ohne SDS- Präsolubilisierung bei verschiedenen Extraktionszeiten (10 min, 1 h und 24 h). 2D - elektrophoretische Trennung des cytoplasmatischen Extrakts von *S. cerevisiae* (S288c) auf IPG 4-7

ohne Präsolubilisierung

mit Präsolubilisierung

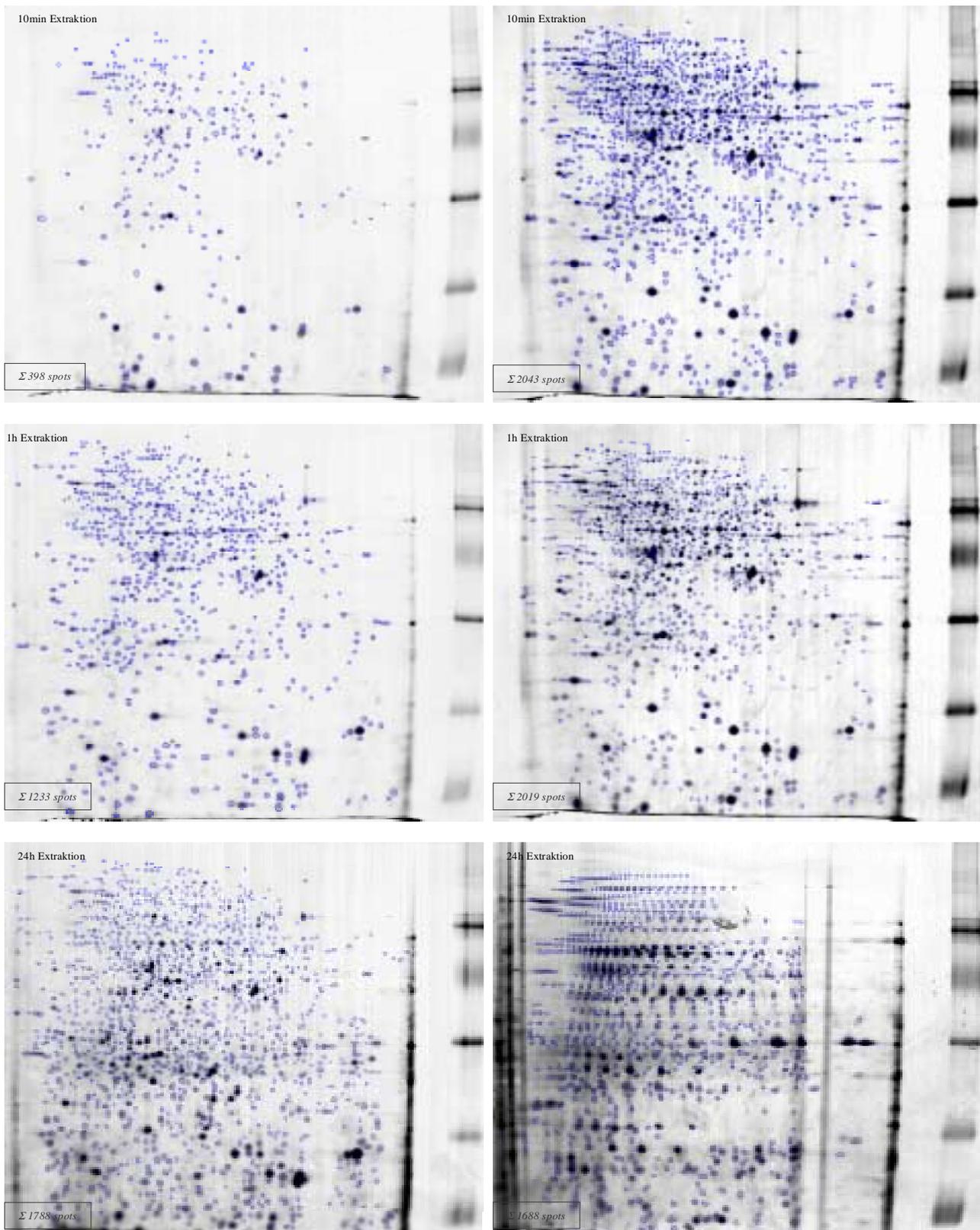


Abb. 25: Computerdenistometrische Spotdetektion verschiedener SDS - Proteinsolubilisierungen und Extraktionszeiten, Gele siehe Abb. 24

2.3.2.3 Fazit

Wertet man die Analysen (quantitative Isotopendetektion, computerdensitometrische Gelauswertung, elektrophoretische Trennung) der verschiedenen Extraktionen aus, so ist unter Berücksichtigung der Reproduzierbarkeit, der proteolytischen Aktivität von *S. cerevisiae* und der Extraktionsqualität der optionale Schritt des Präsolubilisierens in SDS eine deutliche Verbesserung der Proteinextraktion in *Saccharomyces cerevisiae*.

Durch die Präsolubilisierung in SDS kann auf lange Extraktintervalle, in denen Modifikationen der Proteine entstehen können, verzichtet werden; zelluläre Protease werden durch stark denaturierende Bedingungen inaktiviert und die Proteinlöslichkeit ist durch ein Kochen in SDS maximiert. Die Probenaufbereitung des cytoplasmatischen Extrakts von *S. cerevisiae* gewinnt durch diese Präsolubilisierung an Reproduzierbarkeit.

2.3.3 Zweidimensionale Elektrophorese des 35S markierten Extrakts

Aufgrund ihres sehr hohen Auflösungsvermögens haben sich 2D elektrophoretische Verfahren zur Trennung von Proteinen in weiten Bereichen analytischer und präparativer Anwendungen als optimale Methode etabliert. Vor allem in der Biochemie, Molekularbiologie, in klinischer und forensischer Medizin sowie der Differenzierung von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren hat sich die Elektrophorese durch hohe Reproduzierbarkeit bei Verwendung immobilisierter pH-Gradienten nach Görg [21, 23, 58, 84, 114] und die Auftrennung von nanomol - Konzentrationen als zentrales Instrument in der Proteomanalyse erwiesen [21].

Den elektrophoretischen Trennmethoden liegen die zwei wichtigsten physikalisch - chemischen Eigenschaften der Proteine, Molekülgröße und Ladungszustand, zugrunde.

Die Elektrophorese beschreibt die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit direkt proportional zur Nettoladung der Teilchen und zur anliegenden Feldstärke sowie reziprok proportional zur Reibung im umgebenden Medium.

Die Elektrophorese in einem pH - Gradienten bezeichnet man als isoelektrische Fokussierung. Bei einer Auftrennung in einem pH - Gradienten wandert ein Protein so weit, bis es die Stelle im Gelstreifen erreicht hat, an dem der pH - Wert des IPG - Strips dem pI des Proteins entspricht, d.h. die Nettoladung des Proteins gleich Null

ist. Auf das Molekül wirkt keine Kraft mehr ein, wodurch es sich nicht mehr bewegen kann, es "fokussiert" an dieser Position [22].

Bei der SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE) umlagert Natriumdodecylsulfat (SDS) die Polypeptidketten und verleiht ihnen so eine stark negative Ladung. Die ursprüngliche Ladung wird um ein Vielfaches übertroffen und eine elektrophoretische Trennung der Polypeptide erfolgt nun ausschließlich aufgrund der Siebwirkung der Polyacrylamid - Matrix, das heißt nach Größe bzw. Molekulargewicht. Kleinere Proteine wandern durch den geringeren Widerstand schneller als größere Proteine.

Bei der als IPG - Dalt bezeichneten Technik nach der Methode von Görg et al. [122, 134, 139, 140] werden zur isoelektrischen Fokussierung Gele mit immobilisierten pH - Gradienten verwendet. PH - Gradienten lassen sich durch Trägerampholyte oder durch Immobiline erzeugen. Trägerampholyte [21] sind ein heterogenes Gemisch von niedermolekularen (600 - 900 Da) Oligoamino- Oligocarbonsäuren mit eng benachbarten isoelektrischen Punkten, die sich durch hohe Löslichkeit sowie Pufferkapazität und gute Leitfähigkeit an ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt auszeichnen [134] . Der pH- Gradient bildet sich nach Anlegen eines elektrisches Feldes aus, indem sich die Trägerampholyte entsprechend ihres isoelektrischen Punkts zwischen Anode und Kathode anordnen, wodurch zwischen den Elektroden ein steigender pH- Gradient erzeugt wird. Die durch Trägerampholyte erzeugten pH- Gradienten weisen jedoch eine Reihe von Nachteilen auf, von denen die Instabilität des Gradienten der schwerwiegendste ist.

Eine graduelle Verschiebung des pH - Gradienten in Richtung Kathode (Kathodendrift [23] und das Plateau- Phänomen [21, 26] führen dazu, daß mit der Trägerampholyt -IEF keine zeitunabhängigen Fokussierungsmuster erhalten werden können. Dies sorgt für Probleme im Zusammenhang mit der Reproduzierbarkeit der Trennungen, besonders bei basischen Proteinen mit $pI > 7,5$. Zudem variieren die Trägerampholytgemische chargenabhängig in der Zusammensetzung, da selbst unter identischen Synthesebedingungen unterschiedliche Trägerampholyte entstehen. Durch die Einführung immobilisierter pH - Gradienten (IPG) [122, 139] konnten diese Probleme weitgehend gelöst werden. Ein immobilisierter pH- Gradient wird durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren und Acrylamidderivaten mit puffernden Gruppen, den Immobilinen, erzeugt. Das reaktive Ende ($CH_2=CH-$) wird mit Acrylamid fest in der Matrix verankert, während das puffernde Ende R für den

entsprechenden pH - Wert sorgt. Immobiline sind also im Gegensatz zu den Trägerampholyten keine amphoteren Substanzen, sondern in Abhängigkeit des Restes R eine schwache Säure oder eine schwache Base mit definiertem pK - Wert. Immobilisierte pH - Gradienten sind von Anfang an kovalent an die Acrylamidmatrix gebunden und werden nicht erst durch das Anlegen einer Spannung aufgebaut. Derartige Gele stellt man mit Hilfe der Gradienten- Gießtechnik durch Mischen von zwei Immobilinlösungen im Gradientenmischer her [21, 22].

Der so erhaltene pH - Gradient ist zeitstabil, so daß keine Kathodendrift auftritt. Erstmals ist somit eine echte Gleichgewichtsfokussierung aller Proteine möglich, d. h. nach Erreichen eines Endpunktes findet keine Verschiebung mehr statt [114]. Die Trennungen sind sehr gut reproduzierbar und mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar, da für die Erzeugung des pH - Gradienten nur maximal neun chemisch genau definierte Immobiline benötigt werden.

Die IEF erfolgt in einzelnen IPG - Gelstreifen, die aus den Gelen zugeschnitten werden, in einer Flachbettelektrophoresekammer. Nach beendeter IEF werden die IPG- Gelstreifen mit SDS - Puffer äquilibriert und in der zweiten Dimension (SDS - PAGE) auf die Oberkante eines vertikalen SDS - Gels aufgebracht und eine SDS - PAGE nach Görg et al. [22] durchgeführt .

2.3.3.1 Optimierung der 1. Und 2. Dimension für die Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion von *S. cerevisiae*

Zum Probenauftrag für die isoelektrische Fokussierung wurde der DryStrip Kit verwendet, da dieser Probenauftragsmengen von bis zu 160 µl ermöglicht. Um ausreichend Protein auf das Gel zu laden, kann mit diesem Kit ein größeres Extraktvolumen aufgetragen werden, das für die Auftrennung der in niedriger Konzentration vorliegenden Zellwandproteine (Kap. 3) unabdingbar ist. Ein weiterer Vorteil des DryStrip Kits ist die Fokussierung unter Öl, die ein Austrocknen bzw. eine Oxidation der IPG - Streifen und der Proteine bei langen Fokussierungszeiten verhindert [2].

Für die Fokussierung des cytoplasmatischen Extrakts wurden IPG- Strips mit pH-Bereichen von 4 - 7 verwendet. Der Gradient 4 - 7 wird von anderen Gruppen als Standardgradient im Hefeproteomanalyse [6, 8, 11] verwendet, "high abundance spots" sind aus diesen Trennungen bereits identifiziert und lassen sich durch Literaturvergleich den eigenen Trennungen zuordnen [23]; die Verwendung von

basischeren Gradienten läßt nach Kenntnis der theoretischen pI - Werte des sequenzierten Genoms von *S. cerevisiae* [11] neue Erkenntnisse erwarten.

Um einen Überblick der Proteinverteilung in neuen Fraktionen zu erhalten (Kap. 3), oder Enzyme auf deren Reinheit zu prüfen (Kap. 3) wurde der Gradient 4 - 9 verwendet.

Der Probeneintritt in der ersten Dimension wurde auf 4 Stunden verlängert, um ein Präzipitieren der Proteine durch einen langsameren Probeneintritt zu verhindern [20, 21, 114].

Bei einer großen Probenauftragsmenge entsteht in der aufgetragenen Probenlösung ein Konzentrationsgefälle, da die Proteine einerseits durch die angelegte Spannung nach unten Richtung Geloberfläche wandern, andererseits aber nicht schnell genug in das IPG- Gel einwandern können. Niedrige Spannungen (~50 V, 4 h) beim Probeneintritt wirkt zudem einer Proteinpräzipitation an der Auftragsstelle entgegen, die anderenfalls nicht fokusierbar wären [48, 114].

Um die Vergleichbarkeit der Trennungen zu erhöhen, wurde die SDS - PAGE mit dem vertikalen System durchgeführt [48, 58]. Nur so ist es möglich 10 Gele zeitgleich unter identischen Bedingungen laufen zu lassen. Die zweite Dimension wurde während der ersten Stunde ebenfalls mit reduzierter Stromstärke, 80 mA anstatt 160 mA, gestartet, um hochmolekularen Proteinen die Einwanderung in das Gel zu erleichtern [21, 58, 114]

Für eine weitere methodische Diskussion der in dieser Weise durchgeführten Elektrophorese, wird auf weiterführende Literatur von Görg et al. verwiesen [21, 22, 23, 26].

2.3.3.2 Proteinvisualisierung

In dieser Arbeit wurden für nicht radioaktiv markierte Extrakte Silberfärbungen, für ^{35}S - markierte Proben Radioexponate auf Phosphorimaging - Screens erstellt. Silberfärbungen haben im Vergleich zu anderen Färbemethoden wie Coomassie Brilliant Blue, Amido Black, Fast Green oder Ponceau mit einer Nachweisgrenze im ng - Bereich, Protein die höchste Sensitivität und werden für eine MALDI - MS Identifikation der Proteine benötigt [2].

Für Geldokumentation werden Silberfärbungen nach dem Protokoll von Heukeshoven und Dernick [47], für MALDI - MS Identifikationen nach dem Protokoll von Blum [53] durchgeführt. Die Heukeshoven Färbung arbeitet mit Glutardialdehyd

und Glycin, das zwar intensive Spottfärbungen ergibt, aber sich bei der MALDI - Identifikation störend auswirkt; in der Blumfärbung wird nur mit Thiosulfat sensitiviert und an Stelle des Glycins mit Essigsäure die Entwicklung gestoppt.

Beide Methoden, Silberfärbung wie radiographische Detektion sind nach derzeitigem Wissensstand diejenigen Proteinvisualisierungen mit höchster Sensitivität. Als Nachteil von Silberfärbungen gegenüber radiographischen Detektionen ist das Fehlen der Linearität anzusprechen; dagegen können bei der radioaktiven Markierung nur Proteine, die während der Markierungszeit synthetisiert wurden, und im Fall der ^{35}S - Markierung nur schwefelhaltige Proteine visualisiert werden [2].

Ein entscheidender Faktor bei der Visualisierung von Autoradiogrammen ist die Expositionszeit. Hierzu wurden in einem Vierfachansatz drei verschiedene Expositionszeiten (21 h, 27 h und 72 h) einer 2D elektrophoretischen Trennung des cytoplasmatischen Extrakts von *Saccharomyces cerevisiae* untersucht.

Wertet man die Exponate (Abb. 26, 27, 28) aus, so stellt man deutliche Übereinstimmung im Gesamtproteinmuster aller Ansätze fest.

Mit zunehmender Expositionszeit fallen in manchen Spots "weiße Flecken" auf. Diese Flecken entstehen bei einer Übersättigung der Imagescreen und führen zu Artefakten bei einer anschließenden computerdensitometrischen Gelauswertung. Diese beginnende Übersättigung kann als Kriterium für die Expositionsdauer verwandt werden.

Demnach ist die Spotvisualisierung dann optimiert, wenn sich bei "high abundance proteins" diese Artefaktbildung andeutet. In der Praxis wurde durch das Erstellen mehrerer Exponate eines Gels die optimierte Expositionszeit bestimmt und dieses Exponat dann eingescannt und bearbeitet. In diesem Fall (Auftragsmenge 3,5 Mio cpm, IPG 4-7), cytoplasmatischen Extrakt) liegt das zu erwartende Expositionsoptimum im Intervall von 25 und 30 h.

Expositionszeit: 21 Stunden

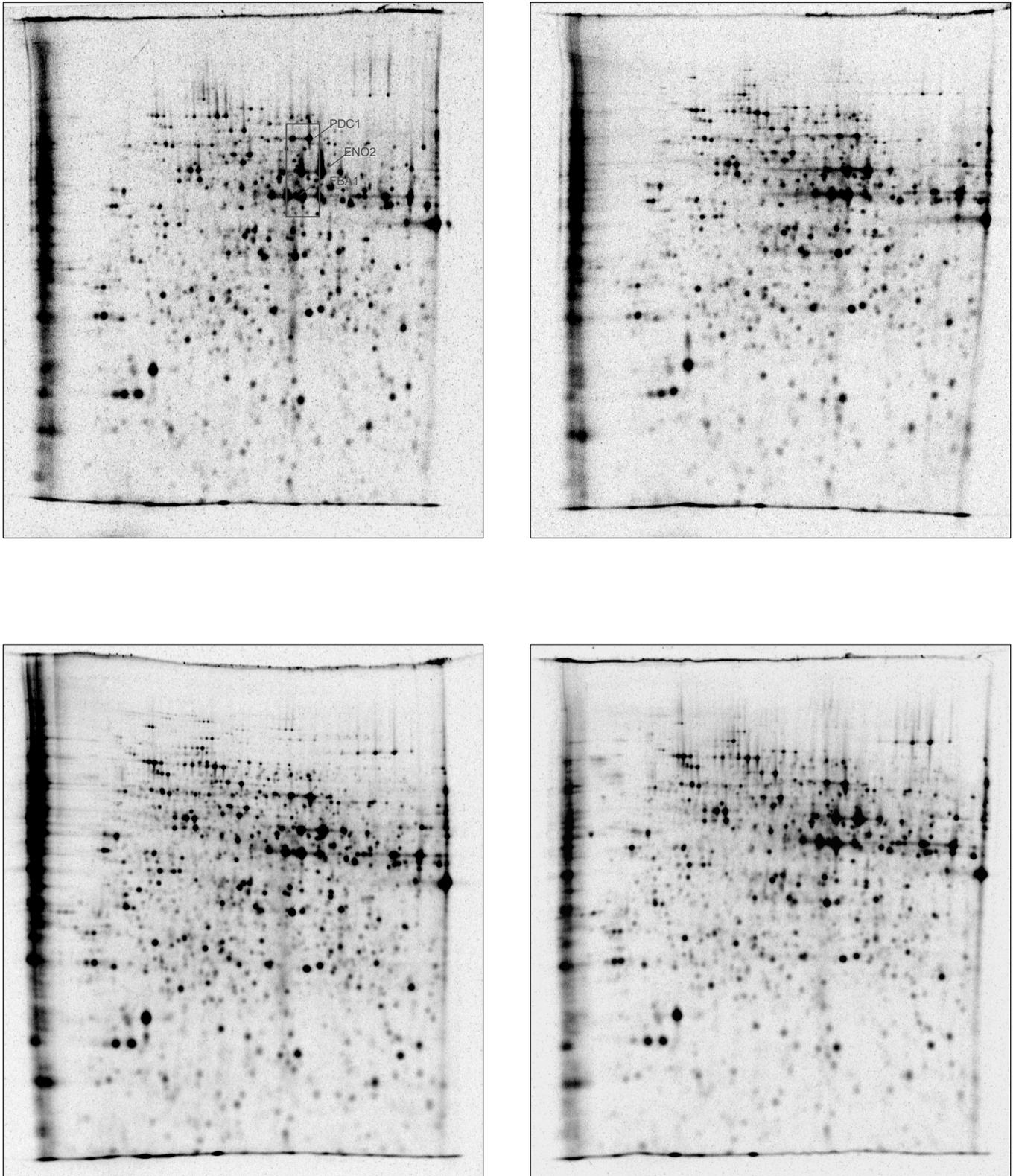


Abb. 26: Reproduzierbarkeit der Proteinvisualisierung und 2D elektrophoretischen Trennung 35S - Methionin markiertes Proteom von *Saccharomyces cerevisiae* IPG 4-7 Expositionszeit: 21 h, Auftragsaktivität: 3,5 Mio. cpm; (Vierfachansatz);

Expositionszeit: 27 Stunden

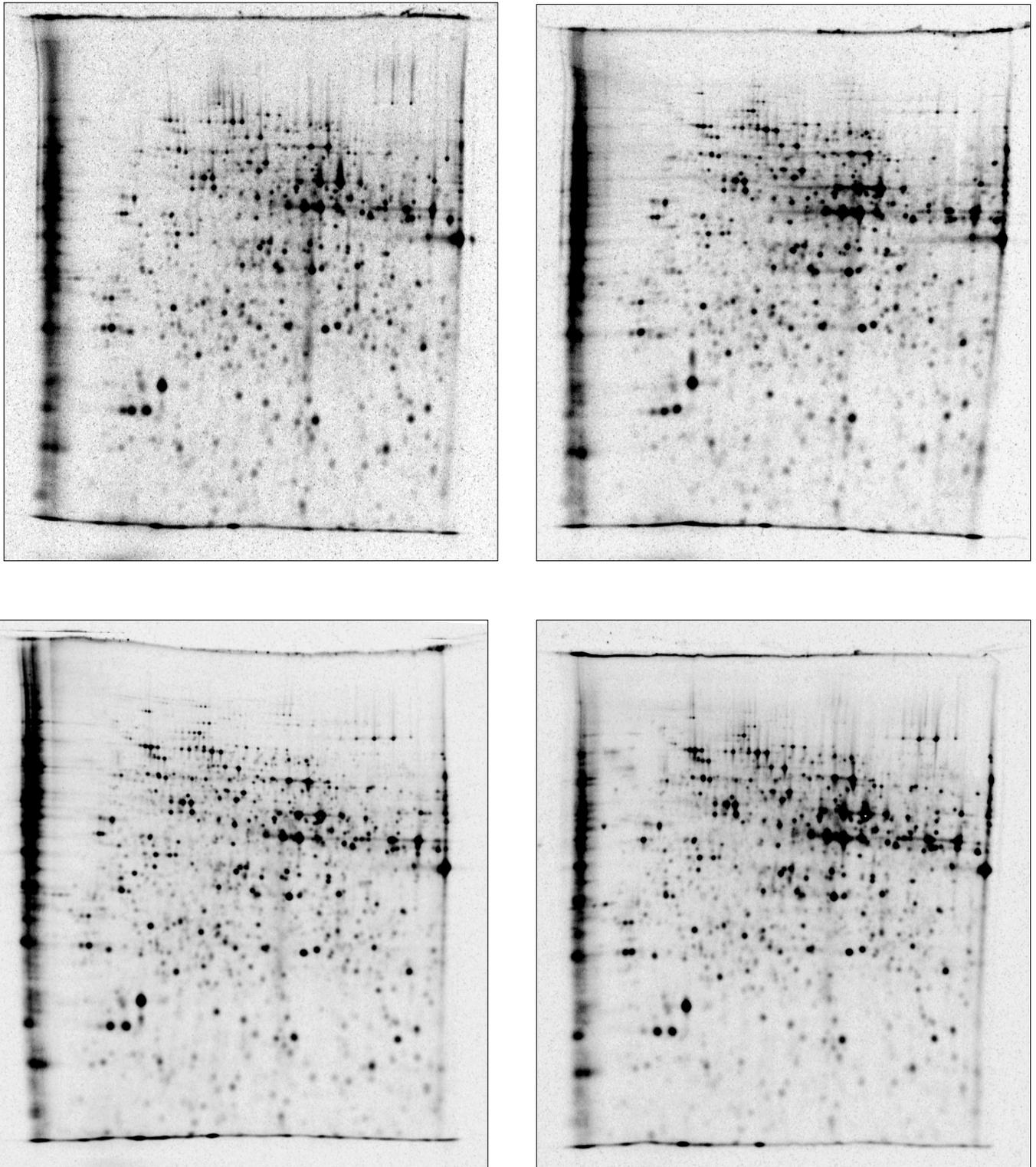


Abb. 27: Reproduzierbarkeit der Proteinvisualisierung und 2D elektrophoretischen Trennung
35S - Methionin markiertes Proteom von *Saccharomyces cerevisiae* (S288c) IPG 4-7
Expositionszeit: 27 h Auftragsaktivität: 3 Mio. cpm (Vierfachansatz)

Expositionszeit: 72 Stunden

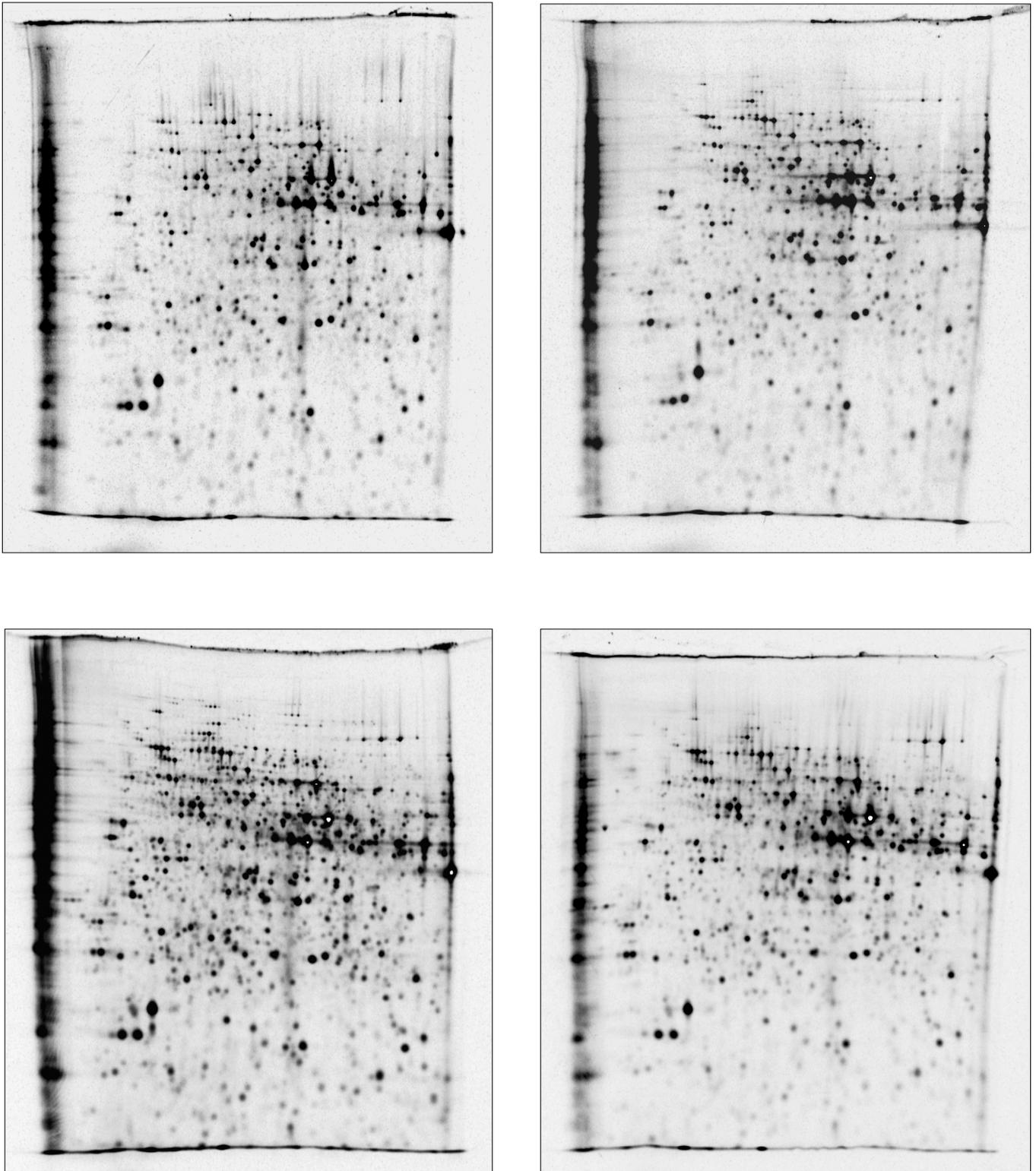


Abb. 28: Reproduzierbarkeit der Proteinvisualisierung und 2D elektrophoretischen Trennung
35S - Methionin markiertes Proteom von *Saccharomyces cerevisiae* (S288c) IPG 4-7
Expositionszeit: 72 h, Auftragsaktivität: 3 Mio. cpm; (Vierfachansatz)

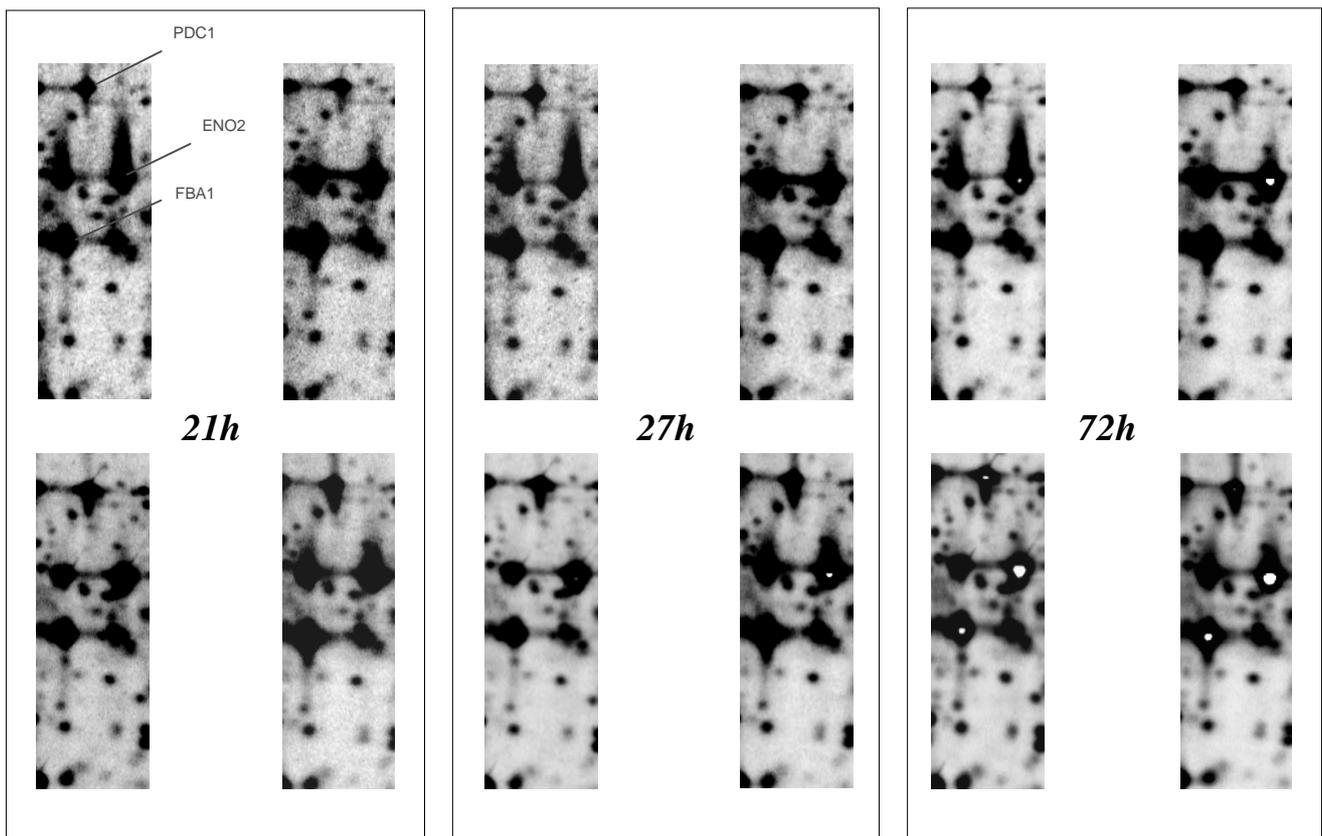


Abb. 29: Übersicht zur Optimierung der Expositionszeiten bei 3 mio cpm Auftragsaktivität des cytoplasmatischen Extrakts von *S. cerevisiae*: Expositionszeiten: 21 h, 27 h und 72 h

2.3.3.3 Fazit

Mit der Verwendung von immobilisierte pH - Gradienten in der ersten Dimension nach Görg et al. [21] ist es gelungen, die ³⁵S markierte cytoplasmatische Fraktion von *Saccharomyces cerevisiae* mit hoher Reproduzierbarkeit besonders der schwerlöslichen Proteine, zweidimensional elektrophoretisch zu trennen.

Für die Bestimmung der Expositionszeit ³⁵S - markierter Extrakte werden als Marker der Sättigungsgrad von "high abundance spots" verwendet. Bei einer Auftragsaktivität von 3×10^6 cpm beträgt die Expositionszeit der Phosphorimaging - Screens etwa 25 Stunden.

3 Proteomanalyse stressinduzierter Proteine aus der cytoplasmatischen Fraktion von *Saccharomyces cerevisiae* und *boulardii*

Bei der Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion werden hauptsächlich Proteine des Cytoplasma und der Organellen solubilisiert. Mit Bestimmung von Regulons dieser Proteine lassen sich bei entsprechender Signifikanz beispielsweise Stoffwechselwege beschreiben, cytokinetische Bestimmungen durchführen, Syntheseleistungen oder auch streßsensitive Proteine bestimmen [15].

Die Physiologie der wichtigen Stoffwechselwege wie beispielsweise die der Glycolyse, des Citratzyklus, des Fettsäurezyklus oder des Pentosephosphatzyklus sind in ihrem Mechanismus, einschließlich der enzymatischen Regulationen durch traditionelle biochemische Methoden, eingehend beschrieben [35, 39]. Auch die Cytokinese wurde in den letzten Jahren exemplarisch an *Saccharomyces pombe* dargestellt [40].

Die Antwort von Zellen auf äußere Induktionen ist dagegen noch sehr wenig verstanden. Obwohl viele Arbeitsgruppen dieses Thema bearbeiten, gelingt die genaue Beschreibung eines "Streßproteins" nach spezifischer Funktion in den wenigsten Fällen; noch schwieriger gestaltet sich die Dokumentation von Wechselwirkungen der Streßproteine oder die Darstellung eines Regelkreises für das Streßmanagement in der Zelle [41].

Bedenkt man daß der Organismus auf Schockinduktionen innerhalb weniger Sekunden reagieren muß, so läßt sich die Vielzahl der parallel ablaufenden Reaktionen bei einer Streßadaption erahnen.

Ein einsichtiges und oft beschriebenes Beispiel für diese komplexe Antwort von Streßinduktionen ist die Downregulation der physiologischen Stoffwechsellzyme; dies bedingt zwar die Reduktion des Stoffwechsels und der Teilungsrate, ist aber nicht direkt in das Streßmanagement involviert. Aber auch bei bereits hinreichend beschriebenen Streßproteinen stellt man fest, daß viele dieser Proteine in die Antwort verschiedener Induktionen involviert sind [41].

So wird zum Beispiel das HSP60 (heat shock protein 60 kD) nicht nur bei Hitzeschock in erhöhtem Maße exprimiert, sondern auch bei Kälteschock und oxidativen Streß [42].

Auf Grund der großen Komplexität ist man vor allem bei der Beschreibung von streßsensitiven Proteinen davon abgekommen ein einziges Protein bis in die genaueste biochemische Charakterisierung zu untersuchen; man sammelt vielmehr Informationen zu verschiedenen Proteinen, die ausgehend von einer bestimmten Induktion in deren Antwort involviert sind.

Einen der wenigen bekannten Zusammenhänge im Streßmanagement von *Saccharomyces cerevisiae* zeigt die folgende Graphik, die im wesentlichen auf Arbeiten von Mager et al. zurückgeht [43].

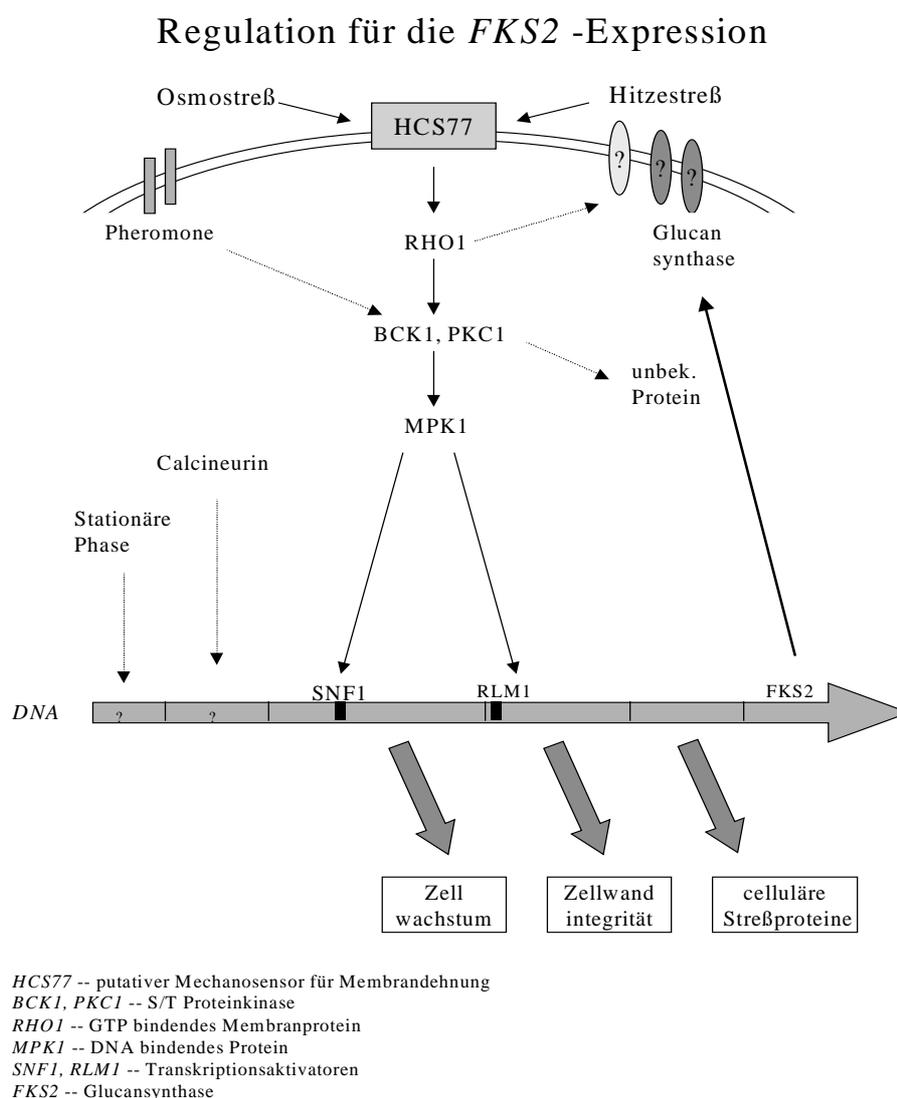


Abb. 30: Darstellung eines positiven Regelkreislaufes in *S. cerevisiae* nach Streßinduktion von Hitze- oder Osmoschock. Die Streßadaption führt zu einer regulierten Glucansynthese, die eine Verstärkung der Zellwand zur Folge hat.

Der Zyklus zeigt das integrale Zellwandprotein HSC77 als Sensor für Veränderungen in der Zellwand. Die Signaltransduktion zur DNA erfolgt dann im Cytoplasma durch Proteinkinasen (BCK1, PKC1) und einem aktivierten DNA-bindenden Protein (MPK1), das an eine Promotersequenz (SNF1) bindet. Unter der Kontrolle dieses Promoters steht unter anderem das FKS2 Gen, das für die Expression einer Glucansynthase codiert. Mit der Synthese von 1,3 Glucan, welches der Hauptbestandteil in der Zellwand ist, wird der mechanische Schutz der Zelle verbessert, der den Organismus vor Hitze - und Osmostreß schützt.

Ziel in diesem Kapitel ist es, an den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) und *Saccharomyces boulardii* (Wirkstoff des Medikamentes Perenterol) die Streßapplikation der Gefriertrocknung zu optimieren und bisher unbekannte streßsensitive Proteine bzgl. dieser Induktionen zu detektieren und in ihrer Funktion zu beschreiben.

3.1 Kenntnisstand und Grundlagen

Es ist bekannt, daß bestimmte Streßproteine wesentliche Funktionen in Heilungsvorgängen oder bei der Immunabwehr inne haben. Als Beispiel sei hierfür die HSP82 Induktion bei Krebs [45] oder nach Kenward et al. die Interaktion von Chaperonen der HSP60 - Familie mit dem Prion PrPc, welches nach Konformationsänderung die bovine spongiforme Encephalopathy (BSE) auslöst, genannt [44]. Im folgenden wird die Anwendung der Gefriertrocknung in Medizin und Lebensmittelindustrie beschrieben, und die bisherigen Kenntnisse dieser Streßinduktion auf die Hefezelle dargestellt.

3.1.1 Gefriertrocknung in der Medizin und Lebensmittelindustrie

Die industrielle Herstellung von Lebensmitteln bedingt zwangsläufig größere Zeitspannen für die Verteilung an den Endverbraucher. Darüber hinaus werden Lebensmittel auf Vorrat gehalten, so daß vorbeugenden Maßnahmen zu ihrer Haltbarmachung große Bedeutung zukommt. Die heute angewandten Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln haben in letzter Zeit ein Höchstmaß an Sicherheit und Schonung der Lebensmittel erreicht. Naturgemäß kommt es aber nach wie vor bei einzelnen Lebensmittelinhaltsstoffen zu Veränderungen, die sich je nach der Art des angewandten Verfahrens auf Qualität bzw. Haltbarkeitsdauer auswirken. Heute werden verschiedene Methoden der Konservierung verwendet, die

durch Temperatur- oder pH - Veränderung, durch Einwirkung von flüssigen oder gasförmigen Substanzen, durch Wasserentzug oder auch durch Einwirkung von Hochdruck, biologische Abbauvorgänge unterbinden oder reduzieren sollen [50].

Das produktschonendste aber auch kostenintensivste Verfahren ist die Gefriertrocknung. Diese Methode wird vorwiegend in der Medizin, z.B. für die vitale Konservierung von therapeutischen Organismen oder aber für die Konservierung von Nahrungsmitteln in der Luft- und Raumfahrt verwendet. Eine weitere Anwendung der Lyophilisierung ist die Produktion von Trockenhefe für die Teigwaren - und Weinindustrie [52].

Bisherige Trocknungsverfahren wie z.B. Walzentrocknung oder Sprühtrocknung werden, vor allem bei wertvollen oder sehr empfindlichen Produkten, immer mehr von der Gefriertrocknung verdrängt. Die Forschung auf diesem Gebiet wurde in den USA stark von der Regierung gefördert, die vor allem daran interessiert war, hochwertige, und gewichtssparende Fertiggerichte für den Flugverkehr und die Raumfahrt zu erhalten [51].

In der Medizin ist die optimierte Lyophilisation die geeignetste Möglichkeit, vitale therapeutisch genutzte Gewebezellen oder Organismen ohne Nebeneffekte für den Patienten zu konservieren und somit überhaupt anwendbar zu machen [86].

Das Gefrieren wie auch das Lyophilisieren stellt eine Streßinduktion für die vitalen Zellen dar. Von einer Streßinduktion auf Organismen wird dann gesprochen, wenn die Kultur ihre maximale Teilungsrage nicht erreicht [43]. Die Induktion des Lyophilisierens wie auch des Gefrierens stellt eine Form des Osmoschocks dar, da in beiden Fällen der Zelle Wasser entzogen wird.

Es sind bisher noch keine Streßproteine oder deren Regulons in der Hefe bekannt, die spezifisch auf eine Gefrierinduktion bzw. Gefriertrocknungsinduktion exprimiert werden [10, 11]. Das Streßmanagement in einer vitalen Zelle wird ausschließlich durch Neuexpression und Up - bzw. Downregulierung bestimmter Proteine kontrolliert, die dann in weiteren Kaskaden die Zelle auf eine entsprechende Streßinduktion einstellen.

Der Begriff Gefriertrocknung bedeutet Wasserentzug aus gefrorenem Material. Die Trocknung erfolgt dabei unter Umgehung des flüssigen Aggregatzustandes, durch Sublimation.

Grundsätzlich gilt es, den Wasserdampfpartialdruck, der sich temperaturabhängig über dem Eis einstellt und im Gleichgewichtszustand zum Sättigungsdampfdruck steht, zu senken. Wenn dies geschieht, werden jeweils so viele Wassermoleküle aus dem Eis sublimiert, bis der zur entsprechenden Eistemperatur gehörige Sättigungsdampfdruck wieder erreicht ist. Wird der freigesetzte Wasserdampf in einem geschlossenen System z.B. durch Festfrieren an tiefgekühlten Flächen (Eiskondensatoren) ständig gebunden, dann entweicht dem Produkt so lange Wasserdampf, bis die Produkttemperatur der Stellflächentemperatur im Eiskondensatorraum entspricht [46, 49].

Unter atmosphärischen Bedingungen würde dieser Vorgang jedoch extrem langsam vor sich gehen, weil die Luft der freien Diffusion von Wassermolekülen einen erheblichen Widerstand entgegensetzt. Durch Anlegen eines Vakuums kommt es zu einem weitgehend ungehinderten Massenstrom von Wasserdampf aus dem Eis zum Eiskondensator. Wegen des ständigen Entzugs von Verdampfungswärme sinkt jedoch die Temperatur im Produkt ab, und als Folge davon erniedrigt sich auch der Sättigungsdampfdruck. Es verlassen jetzt weniger Wassermoleküle das Eis und der Trocknungsprozeß verlangsamt sich erheblich [46, 49].

Wird dem Prozeß nun von außen Wärmeenergie in genau der Menge, wie sie durch die Verdampfung ständig verlorengelht, wieder zugeführt, dann läuft die Entwässerung bei konstanter Temperatur in unverminderter Geschwindigkeit weiter. Das Ziel der Gefriertrocknung ist, ein sehr leicht wasserlösliches Produkt zu erhalten, das nach Zugabe von Wasser die Eigenschaften des Ausgangsgutes unverändert aufweist. Da die Trocknung in gefrorenem Zustand bei sehr niedrigen Temperaturen erfolgt, gelingt es z.B. Proteine zu trocknen, die wasserlöslich bleiben und ihre Funktion weitgehend erhalten. Auch die meisten übrigen chemischen Verbindungen bleiben qualitativ und quantitativ unverändert.

Durch die Gefriertrocknung werden biologische Proben in eine Trockenform überführt, bei der chemische und enzymatische Veränderungen weitgehend umgangen werden können.

Bei Optimierung der Trocknungsparameter lassen sich in vielen Fällen Produkte erhalten, in denen sich nach Rehydrierung wieder ursprüngliche enzymatische Eigenschaften nachweisen lassen. Werden Schutzsubstanzen verwendet und bleibt ein bestimmter Restwassergehalt erhalten, lassen sich sogar ganze Zellen mit hohen Vitalitätsraten auf diese Weise konservieren.

3.1.1.1 Lyophilisierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Backhefeindustrie mit einem geschätzten weltweiten Umsatz von über zwei Milliarden US - Dollar, produziert mehr als zwei Millionen Tonnen Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), pro Jahr (basierend auf einem Trockengewicht von 30%). Aufgrund des Bevölkerungswachstums, der Industrialisierung und der dadurch bedingten Veränderungen der Ernährungsgewohnheiten beträgt die jährliche Zuwachsrate der Hefeproduktion ungefähr 4%. Etwa 80% der Hefe wird flüssig oder als gepreßte Frischhefewürfel verkauft, der Rest als aktive Trockenhefe. Der Verbrauch an Trockenhefe wird vermutlich in den nächsten Jahren weiter ansteigen, da sie wesentliche Vorteile in Bezug auf Lagerung, Transportfähigkeit und verlängerter Haltbarkeit bietet. Ebenso bestehen Möglichkeiten die Trockenhefe in speziellen Backverfahren mit gefrorenen Teigen einzusetzen, welche eine Prozeßautomatisierung und bessere Wirtschaftlichkeit in Aussicht stellen [41].

Optimale physiologische Bedingungen mit kürzesten Generationszeiten bietet eine aerobe Kultur in einem Vollmedium, welches bei einem pH von 5,8 und 30 °C eine ausreichende Menge einfach spaltbarer Zucker wie Glucose, Fructose oder Mannose bereitstellt. Unter diesen Bedingungen hat *Saccharomyces cerevisiae* die kürzeste Generationszeit, während sie nur geringe Streßantworten zeigt. Außerhalb dieser optimalen Bedingungen wird eine Vielzahl von Streßproteinen exprimiert [41].

Die Ergebnisse können im Fall der Bäckerhefe durch eine optimierte Trocknung zu erhöhten Vitalitätsraten und somit höherer Aktivität, oder im Einklang mit der öffentlichen Meinung durch gezielte Mutation mit detektierten "Streßresistenzgenen" oder deren Regulons zu einem robusteren Hefestamm führen. Ein streßtoleranter Stamm hätte längere Lagerungszeiten bei vergleichbarer Vitalität, zudem könnten Kosten bei der industriellen Hefeproduktion gespart werden, da ein osmotoleranter Stamm auch bei suboptimalen Wachstumsbedingungen (hohe Restsalzwerte in Substratboullion, Verunreinigungen der Melasse) wachsen würde.

3.1.1.2 Lyophilisierung von *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii ist wie *Saccharomyces cerevisiae* eine weitere Unterart in der Familie der Saccharomycetales. Sie produziert weder Ascosporen, noch nutzt sie Galactose als Kohlenstoffquelle. Des weiteren führt *Saccharomyces boulardii* im Vergleich zu *Saccharomyces cerevisiae* eine veränderte Sauerstoffnutzung und

Fermentation durch [86]. *Saccharomyces boulardii* hat eine ungewöhnlich hohe Wachstumstemperatur von 37 °C und wird therapeutisch verwendet [52].

S. boulardii der als Wirkstoff im Medikament Perenterol TM in lyophilisierter Form breite Anwendung bei verschiedenen Darmerkrankungen findet, kann seine Wirkung nur dann entfalten, wenn die Zellen in aktiver Form das Target, das Duodenum erreichen [87].

Hat man Kenntnis über die Streßproteine, welche die Zellen resistenter gegenüber der Induktion des Gefrierens oder Gefriertrocknens werden lassen, so kann in einem zweiten Schritt durch Genadditionen oder Gentransfer dieser "Streßgene" ein für diese Induktion robusterer Stamm gezüchtet werden, der nach der Lyophilisierung höhere Vitalitätsraten aufweist und so im Duodenum mit höherer Aktivität seine therapeutische Wirkung entfalten kann. Des weiteren sind durch Optimierung der Trocknungsparameter und der Streßtoleranz von *S. boulardii* längere Lagerungszeiten des Medikaments bei vergleichbarer Aktivität möglich.

Gentechnische Veränderungen an therapeutisch verwendeten Organismen oder Geweben sind heute bereits etabliert und gesellschaftlich weitgehend akzeptiert.

Im folgenden wird in einem ersten Schritt für die Bestimmung der streßsensitiven Proteine in *S. cerevisiae* und *S. boulardii* bzgl. gefrieren und gefriertrocknen, die Streßinduktion auf eine subletale Kultur optimiert.

Durch Vergleich des Proteoms von streßfreien und streßinduzierten Hefen unter sonst identischen Bedingungen lassen sich streßsensitive Proteine durch deren „down regulation“ oder „over expression“ bestimmen. Man hat festgestellt, daß einige Operons selektiv auf bestimmte Streßinduktionen aktiviert werden; diese direkte Regulation des Operons stellt einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem exprimierten Protein und der angewandten Streßinduktion dar und wird als zusätzlicher Spot auf dem Gel sichtbar.

Diese Streßproteine können anschließend z.B. mittels MALDI - TOF/MS identifiziert und somit Rückschlüsse auf das entsprechende Gen gezogen werden. Durch gezielte gentechnische Veränderungen wie z.B. „knock out“ Mutationen können dann neue Regulationsmechanismen in der Physiologie der Zelle gefunden werden, die durch „cross matching“ zu höheren Eukaryonten wie z. B. auch den Menschen übertragen werden können.

3.1.2 Streßvektoren in der Hefe

Werden lebende Zellen einem plötzlichen Temperaturanstieg ausgesetzt, so reagieren sie - vom einfachsten Bakterium bis zur hoch entwickelten Nervenzelle - mit einer vermehrten Produktion bestimmter Proteine, die sie vor einem Schaden bewahren. Als Wissenschaftler dieses Phänomen zum ersten Mal beobachteten, nannten sie es Heat Shock Response. Nachfolgende Studien [42] ergaben, daß die gleichen Reaktionen auftraten, wenn die Zellen anderen Streßsituationen wie z.B. toxischen Metallen, Alkohol oder metabolischen Giften ausgesetzt wurden. Deshalb wird heutzutage dieses Phänomen allgemein als Streßantwort und die exprimierten Proteine als Streßproteine bezeichnet [42, 43, 45, 54].

Während der Erforschung der Struktur und Funktion der Streßproteine haben Biologen erkannt, daß sie weit mehr als schützende Substanzen sind. Viele dieser Streßproteine sind zudem in metabolische Prozesse der Zelle integriert, andere steuern beispielsweise die Aktivitäten von Substanzen, die das Zellwachstum und die Zellteilung regulieren. Untersuchungen ergaben, daß viele dieser exprimierten Streßproteine in verschiedenen Organismen große Ähnlichkeiten zeigten. So hatte beispielsweise ein bestimmtes hitzesensitives Protein in den verschiedenen Organismen immer ein Molekulargewicht von ca. 70000 Dalton und wurde daher HSP70 (heat shock protein) genannt [41, 42].

Folgend Graphik zeigt das HSP - regulierte "self assembly" der Zelle nach Streßinduktion. Proteine wie z. B. HSP70, die die Rekonformierung von Faltungsartefakten unterstützen, werden Chaperone genannt.

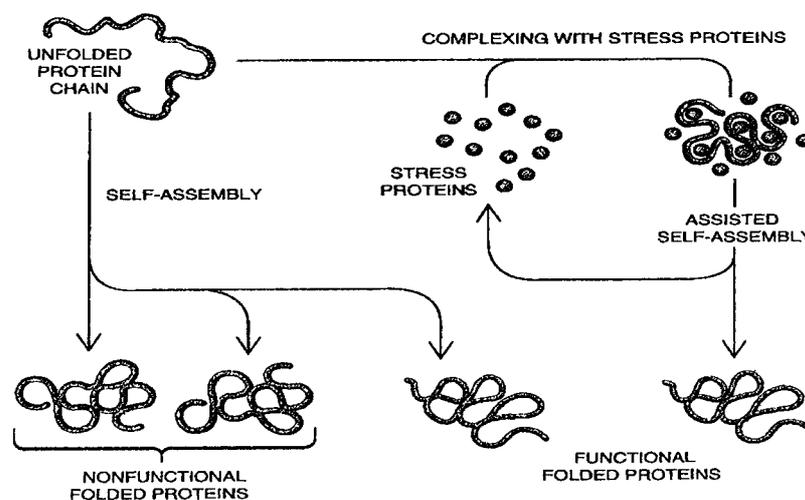


Abb. 31: Steuerung der Proteinfaltung durch deren Primärstruktur und durch Streßproteine [41]

Diese Chaperone sind auch in logarithmisch wachsenden Zellen exprimiert und fallen zum Beispiel durch eine "Overexpression" bei Hitzestress auf.

Die meisten Proteine der HSP70 - Familie weisen bestimmte Eigenschaften, wie beispielsweise eine hohe Affinität zu Adenosintriphosphat [41] auf. Stressproteine der HSP70 Familie sind ein prominentes Beispiel für die Komplexität der cellulären Antworten auf eine bestimmte Stressinduktion.

Es werden fünf wesentliche Stressinduktionen unterschieden (s. Abb. 32); die Stressantwort der Zelle lässt sich in eine spezifische und generelle Stressadaptation unterteilen.

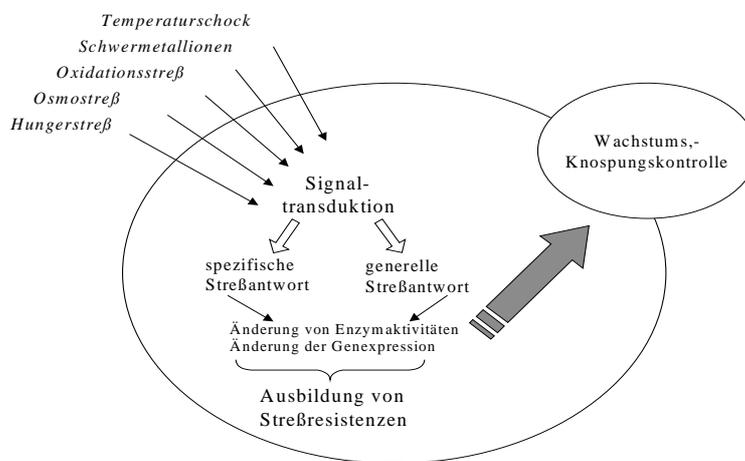


Abb. 32: Übersicht über die Mechanismen der Stressadaptation in *S. cerevisiae*

Generelle Stressantworten stellen sich in der Regel durch Wachstumsregulationen, Stoffwechselreduktion oder Veränderungen in der Zellintegrität dar.

Spezifische Stressantworten zeigen sich in der Expression bestimmter Proteine in Abhängigkeit von der Stressinduktion. Die Bestimmung solcher Proteine oder deren Regulon stellt eine hohe Herausforderung an die Analysentechnik dar, gibt aber bei erfolgreicher Detektion oftmals Antwort auf Schlüsselreaktionen z.B. bei Krankheitsverläufen oder in der Regulation des Immunsystems höherer Eukaryonten [41, 44, 45, 54].

Es werden in *Saccharomyces cerevisiae* mindestens drei transkriptionale stressregulierende Elemente, unterschieden: HSE (heat - shock element), STRE (stress - response - element) und ARE (AP-1 responsive element). Die Zusammenhänge sind in Abb. 33 dargestellt [41].

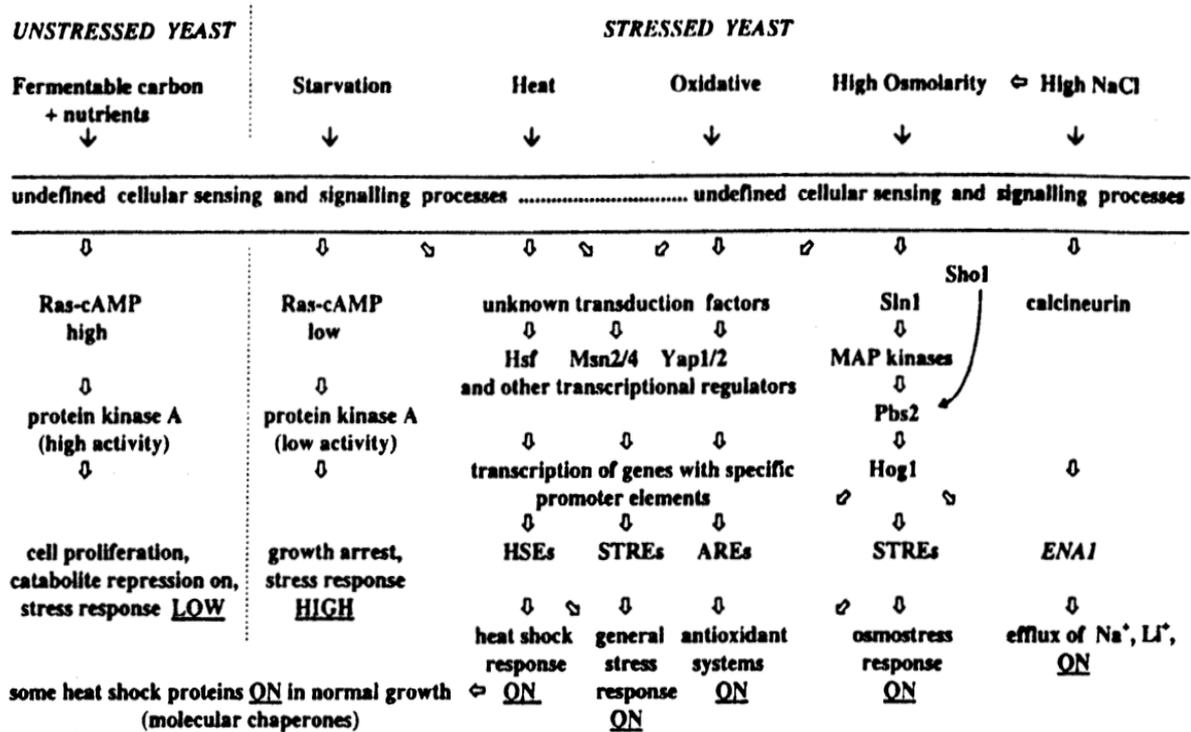


Abb. 33: Vereinfachte Zusammenfassung bekannter Interaktionen von streßinvolvierten Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae* [41]

Gene, die HSE Promoter Sequenzen enthalten, werden in der Regel bei geringer Streßinduktion exprimiert; deren Produkte sind sowohl bei normalem Zellwachstum und Zellentwicklung als auch bei der Streßerholung von Bedeutung; diejenigen Gene, welche unter STRE - Kontrolle stehen, werden in der Regel bei subletalen Streßbedingungen exprimiert; ARE kontrollierte Gene haben wahrscheinlich eine Funktion bei oxidativem Streß [42].

Im folgenden werden zwei Formen des Osmostreß genauer untersucht und verglichen: das Gefrieren und das Gefriertrocknen. Bisherige Untersuchungen mit Osmoschockinduktionen beschränkten sich hauptsächlich auf Inkubation des Organismus in hyper - und hypotonischen Lösungen wie bei Blomberg [9] dargestellt ist.

3.1.2.1 Zelluläre Reaktionen auf Gefrieren

Beim Gefrieren wird der Zelle Wasser entzogen, worauf die Zelle mit einer entsprechenden Streßantwort reagiert. Es ist jedoch bekannt, daß isolierte Proteine, Nukleinsäuren und intakte Zellen nichtgefrierbares Wasser enthalten, sogenanntes Kristallwasser. Es entspricht ca. 5% des gesamten Wassergehalts in lebenden

Systemen. Untersuchungen [55] ergaben, daß viele physikalische Eigenschaften, metabolische Prozesse und sogar die Lebensfähigkeit von mindestens einigen intakten Zellen relativ unberührt blieben, solange der Wassergehalt über 5% lag.

Um die Schutzmechanismen innerhalb der Zellen während des Gefrierens besser zu verstehen, wurden genauere Untersuchungen durchgeführt. Diese ergaben, daß die Überlebensfähigkeit der Zellen vor allem durch Zugabe von Schutzlösungen gesteigert werden kann. Eine Schutzlösung, die an der Oberfläche der Proteine adhäsiviert, führt zu einer Proteinstabilisierung im nativen Zustand. Dies kann mit der Gibbs – Helmholtzschen - Gleichung

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta s$$

erklärt werden. Nach dieser Gleichung setzt sich die freie Enthalpie ΔG zusammen aus der Reaktionsenthalpie ΔH und dem Entropieglied $T \cdot \Delta s$. Eine organische Reaktion läuft nur dann freiwillig ab, wenn $\Delta G < 0$ wird. Dieses kann bei konstantem ΔH einerseits mit einem Anstieg der Temperatur T oder einer Zunahme der Entropie Δs erreicht werden. Eine Adhäsion von Molekülen an der Oberfläche des Proteins bzw. der Zelle (Glucose, Lactose, Glycerin) wirkt als Gefrierschutz auf die entsprechenden Proteine bzw. Zellen, da die Dehydrierung durch die Adhäsion dieser Moleküle bei Erhaltung der Entropie an der Oberfläche kompensiert wird [56]. Werden Substanzen mit hoher Proteinaffinität wie z.B. Harnstoff zugegeben, kann eine Erhöhung der Entropie und der damit verbundenen thermodynamischen Stabilisierung nur durch die Freisetzung von intramolekular gebundenem Wasser (Kristallwasser) erreicht werden, welches durch Harnstoff substituiert wird. Die dadurch bedingte Auffaltung und Umfaltung (Harnstoffeinlagerung) hat die Denaturierung des Proteins zur Folge; die spezifische Funktion des Proteins in der Zelle bzw. an der Zelloberfläche geht verloren. Werden demnach Substanzen mit hoher Proteinaffinität (z.B. Harnstoff) vitalen Zellen zugegeben, werden diese durch Denaturierung ihrer surfacalen bzw. intrazellulären Proteine geschädigt, was zu erhöhten Letalitätsraten beim Gefrieren führt.

Ob eine Schutzlösung bindend oder adhäsierend auf das Protein wirkt, hängt jedoch bei einigen Lösungen zudem von der Temperatur ab. Dimethylsulfoxid, welches hydrophobe und hydrophile Gruppen enthält, wirkt beispielsweise bei niedrigen Temperaturen als Gefrierschutz und bei hohen Temperaturen denaturierend. Dies

kann dadurch erklärt werden, daß bei hohen Temperaturen die hydrophoben Wechselwirkungen und bei niedrigen Temperaturen Wasserstoffbrückenbindungen stärker hervortreten. Beim Gefrieren befindet sich Dimethylsulfoxid demnach mehr in der wäßrigen Phase und wird nur adhäsiv an der Oberfläche gebunden, was zu einer Stabilisierung des Proteins führt [9, 53, 54, 55].

Als osmotische Barriere fungiert in der Zelle hauptsächlich die Phospholipid-Doppelschicht. Durch Verschmelzung, Phasentrennungen, Kristallbildung und Fragmentierung erhöht sich die Permeabilität der Membran und wasserlösliche Stoffe, die im Cytosol der Zelle gelöst, treten während des Einfrierens durch undichte Stellen der Membran in das Nährmedium; intrazelluläres Wasser folgt dem osmotischen Gradienten.

Zudem können thermotrophe Phasenübergänge zu Phasentrennungen innerhalb der Phospholipide führen. Schutzmittel wie Prolin und Glycerin stabilisieren die Phospholipid-Doppelschicht durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die freie C=O-Gruppe der Phospholipide befindet sich genau an der Schnittstelle zwischen dem hydrophoben und dem hydrophilen Bereich. Dies erhöht die Ladungsdichte im Bereich der Kopfgruppe und verhindert so durch elektrostatische Kräfte die Verschmelzung der Phospholipid-Doppelschicht [56]. Dies deutet auf einen weiteren Mechanismus des Gefrierschutzes von Glycin, Lactose oder Prolin hin.

Der genaue physikalische Mechanismus beim Gefrieren von Zellen ist noch nicht verstanden. Bekannt ist jedoch, daß er sich aus vier getrennten Reaktionen zusammensetzt:

- a) Wasser wird als Eis entfernt,
- b) hoch- und niedermolekulare Lösungen werden konzentriert,
- c) das Zellvolumen verringert sich und
- d) die Lösung kristallisiert aus.

Jede einzelne Reaktion kann als Basis der Streßinduktion fungieren. Da außer der Präzipitation alle Reaktionen temperaturabhängig sind, finden sie während des Gefrierens der Hefezellen simultan statt. Dadurch wird die Darstellung von Regelkreisläufen für die Streßantwort des Gefrierens sehr komplex und schwer verständlich.

3.1.2.2 Zelluläre Reaktion auf Lyophilisieren

Es wird bis heute kontrovers diskutiert, inwieweit die Streßvektoren des Gefrierens und Dehydratisierens (luftgetrocknet oder gefriergetrocknet) von biologischem Material identisch sind. Die Übereinstimmung der Vektoren scheint verständlich, da sowohl beim Gefrieren als auch beim Trocknen dem System Wasser entzogen wird. Es gibt jedoch auch Anzeichen, daß diese Ähnlichkeit der Prozesse nur oberflächlich ist. Crowe et al. [55] bezeichnet die Streßvektoren Gefrieren und Trocknen als vollkommen unterschiedlich und damit auch die entsprechende Zellantwort. Sie stellen in ihrer Veröffentlichung fest, daß in Abhängigkeit von der Trocknungsintensität nicht nur das freie Wasser, sondern auch das gebundene Wasser aus den Zellen entfernt wird. Somit scheint es verständlich, daß bei der Lyophilisierung andere Streßvektoren zu erwarten sind als beim Gefrieren. Untersuchungen ergaben, daß sobald der Wassergehalt unter 5% fiel – das entspricht dem nicht gefrierbaren Wasser – sich die physikalischen Eigenschaften der biologischen Teilchen in den Zellen veränderten. Proteine werden meistens durch extreme Dehydratisierung irreversibel denaturiert wie am Beispiel der Phosphofruktokinase gezeigt worden ist. Dieses tetramere Enzym zerfällt bei der Trocknung in seine Untereinheiten, wodurch es irreversibel denaturiert wird. Versuche, bei denen das Enzym mit und ohne Schutzlösung getrocknet und anschließend rehydratisiert wurde, ergaben folgendes Ergebnis:

Ohne Schutzlösung denaturiert das Enzym schon nach teilweiser Trocknung; nach Zugabe der Schutzlösung (z.B. Prolin) konnte dem Enzym jedoch wesentlich mehr Wasser entzogen werden bis es zu einer irreversiblen Denaturierung kam.

Der Einsatz von Schutzsubstanzen beim Lyophilisieren scheint demnach die gleiche Wirkung wie beim Gefrieren zu haben – die Moleküle binden nur an der Oberfläche und stabilisieren so das Protein. Im Gegensatz dazu wurde die Enzymaktivität jedoch vollkommen erhalten, wenn es in Gegenwart von Trehalose getrocknet wurde. Der Schutzmechanismus beim Gefrieren basiert hier auf umfassenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH - Gruppen der Trehalose und den polaren Resten im Protein, welche die Struktur des getrockneten Proteins ähnlich der Anordnung vor der Dehydratisierung erhalten. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollkommen verstanden [55].

Untersuchungen von Beker [46, 49] haben ergeben, daß getrocknete Organismen nach Rehydrierung streßtolanter gegenüber Temperatur - und

Druckveränderungen sind, als jene aus logarithmisch wachsenden Kulturen. Wird *Saccharomyces cerevisiae* beispielsweise bis zu einem Wassergehalt von 15 bis 20% gefriergetrocknet, so ergeben sich relativ hohe Vitalitätsraten. Hefezellen, die nur noch 12 bis 13% Wasser enthielten, waren nicht für die Lagerung geeignet, während Zellen mit einem Wassergehalt von 8 bis 10% für eine auffallend lange Zeit überlebensfähig waren [42, 44, 46, 49]. Soll beim Lyophilisieren die Vitalität der Zellen erhalten bleiben, scheinen die angewandten Trocknungsparameter von entscheidender Bedeutung zu sein.

3.1.3 Vorgehensweise

Für die Hefekultur, den Zellaufschluß und die Proteinextraktion der "cytoplasmatischen Fraktion" werden die Ergebnisse aus Kapitel 2 zu Grunde gelegt.

- eine hohe Reproduzierbarkeit in den vergleichenden Gelserien zu erreichen,
- eine geeignete Proteinmenge auf das Gel zu laden,
- geringe proteolytische Aktivität während der Streßinduktion
- eine möglichst quantitative Extraktion der im Gesamtextrakt löslichen Proteine zu erhalten.

Für die Detektion neuer Streßproteine wird wie folgt vorgegangen:

- ➔ Optimierung auf subletale Streßinduktion
- ➔ Vergleich Standard - Schockinduktion
- ➔ Elektrophoretische Trennung (s. 2.2.3)
- ➔ Computerdensitometrische Gelauswertung
- ➔ MALDI - TOF/MS Identifikation der streßsensitiven Proteine
- ➔ Diskussion der detektierten Streßproteine

Die Optimierung der Streßinduktion stellt einen wesentlichen Teil der Detektion neuer Streßproteine dar. Um signifikante Zusammenhänge zwischen Streßinduktion und Proteinexpression zu finden, ist die Optimierung auf eine subletale Streßinduktion unabdingbar.

Ist die Streßinduktion der Zellen abgeschlossen, werden die streßinduzierten wie auch die streßfreien Zellen nach gleichen Bedingungen (2.2.2) aufgeschlossen und deren Proteine solubilisiert. Nach 2D - Elektrophorese werden die Gele gescannt, computerdensitometrisch ausgewertet, streßsensitive Proteine detektiert und anschließend mit MALDI - TOF identifiziert. Die identifizierten Proteine werden in Zusammenhang zu bereits bekannten Streßregulons und Operons der Hefe gebracht und für den Eintrag in die Proteindatenbanken vorgeschlagen.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Stammbeschreibung, Kultur und Ernte der Zellen

Die Untersuchungen werden mit zwei verschiedenen Hefestämmen durchgeführt:

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wildtyp, S288c	DSMZ 4246
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Wildtyp	Perenterol C

Die Aktivierung der auf YNB - Schrägagarkulturen bei 6 °C gelagerten Stämme erfolgt monatlich in Sabouraud- 2% Glucose- Bouillon (Vollmedium). Die Kultur der Zellen erfolgt nach dem in 2.2.1 etablierten Verfahren.

Bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C und einer Schüttelfrequenz von 172 rpm wird mit logarithmisch wachsenden Zellen der Vorkultur bis zu einer OD von 0,1 (1×10^6 Zellen/ml) inokuliert.

Die Hauptkultur (30 ml Kultur/ 300 ml Erlenmeyerkolben) wird bei einer OD_{610nm} von 1,0 durch Zentrifugation (1 min, 7000 rpm) geerntet; 12 ml dieser Kultur, welche einem Trockengewicht (s. Kap. 2.3.1.4) von etwa 5mg und einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen entspricht, wird in ein ml bidest. Wasser gewaschen mit der Gefrierschutzsubstanz resuspendiert (s. 2.3.2) und nun die Streßinduktion durchgeführt.

Die streßfreie Fraktion wird unmittelbar nach dem Ernten der Probenaufbereitung zugeführt.

3.2.2 Optimierung der Streßinduktion

3.2.2.1 Gefrierinduktion der Zellen

Pro Zentrifugegefäß (5 mg dw) werden 105 µl Schutzlösung zugegeben und resuspendiert. Das entspricht einem Hefezellen/Schutzmittelverhältnis von etwa 50 mg/ ml. Die Inhalte von jeweils vier Zentrifugegefäßen mit einer optischen Dichte von 1,0 werden in ein Kryogegefäß pipettiert und mit einem Deckel verschlossen. Somit befinden sich 20 mg Trockenmasse in einem Kryogegefäß.

In zwei Parallelansätzen werden die beiden Stämme in vier verschiedenen Gefrierschutzmitteln resuspendiert und bei drei verschiedenen Einfriergeschwindigkeiten (0,11 °C/s; 0,19 °C/s; 0,95 °C/s) für 18 h gefroren.

Jeweils ein Kryogefäß pro Hefeart und Einfriergeschwindigkeit wird mit einem Temperaturmeßfühler versehen. Zur Ermittlung der Einfriergeschwindigkeiten wird ein Reagenzglas, in dem sich 1 ml Wasser und ein Thermometer befinden, eingefroren und die Temperatur alle 15 s abgelesen.

Nach dem Auftauen wird ein Probensatz zum Zellaufschluß für die Elektrophorese verwendet, der zweite Probensatz zur Vitalitätsbestimmung benutzt und ein Temperatur - Zeit - Graph erstellt.

Schutzmittel

Als Schutzkolloide kommen folgende Flüssigkeiten zur Anwendung:

- YNB-Nährmedium (2% Glucose)
- Kondensmilch (10% Fettgehalt, 17% fettfreie Milchtrockenmasse),
- Glycerin (20%ig)
- Lactoselösung (20%ig)

Vitalitätsbestimmung

Nach dem Gefrieren werden die Hefezellen in 2 ml YNB-Nährmedium suspendiert. 10 µl dieser Suspension werden in 30 ml YNB-Nährmedium pipettiert und bei optimalen Wachstumsbedingungen aerob bebrütet. Die optische Dichte wird in Abständen von 30 min gemessen und daraus eine Temperatur - Zeit - Kurve erstellt. Außerdem wird zur Kontrolle auf Fremdkeime ein YNB - Gußplattenabstrich vorgenommen.

3.2.2.2 Gefriertrocknen der Zellen

Für die Gefriertrocknung werden die Hefen wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben kultiviert und wie in 3.2.2.1 beschrieben vorgefroren. Der Eiskondensatorraum des Gefriertrockners wird auf eine Temperatur von -20 °C vorgekühlt. Nun werden die Kryogefäße aus der Gefriertruhe bzw. dem Stickstoff entnommen und offen auf die beheizbare Stellfläche gegeben. Der sterile Gefriertrockner wird verschlossen und der Druck auf 2,389 mbar (entspricht -11 °C) abgesenkt. Um subletale Trocknungsbedingungen bestimmen zu können, wird der Einfluß der Einfriergeschwindigkeit und des Schutzmittels durch Animpfen der streßinduzierten Zellen in YNB - Medium und Messen der lag - Phasen gemessen. Für die

Restwasserbestimmung (s. Kap. 3.2.2.2.5) und die elektrophoretische Trennung wird die Gefriertrocknung analog durchgeführt.

3.2.2.2.1 Anlagenbeschreibung

Die Gefriertrocknungsanlage BETA 1-8K (Abb. 34) ist eine leistungsfähige, universell verwendbare Labor- und Technikumsanlage zur Gefriertrocknung von festem oder flüssigem Ausgangsgut.



Abb. 34: computergesteuerte Gefriertrocknungsanlage BETA 1-8K der Fa. Christ

In der Anlage können alle zur Gefriertrocknung erforderlichen Verfahrensschritte durchgeführt werden:

- Einfrieren der Produkte nach beliebig vorgewählten Zeit- und Temperaturgrenzwerten
- Gefriertrocknung (Sublimation) der Produkte nach beliebig vorgewählten Zeit-, Temperatur- und Druckgrenzwerten
- Nachtrocknen der Produkte bei beliebig vorgewählten Zeit- und Temperaturgrenzwerten und hohem Endvakuum zur Entfernung des kapillar und molekular gebundenen Wassers

Das Gefrieren und Trocknen des Guts erfolgt wahlweise innerhalb oder außerhalb des Eiskondensatorraums (Abb. 35) der Anlage in Kryogefäßen. Diese wurden nach den Erfordernissen selbst entwickelt und gebaut. Die Kryogefäße müssen autoklavierbar, gefrierbar (-196 °C), abschließbar und für ein Volumen von etwa 450 µl geeignet sein. Zudem müssen die Temperaturfühler des Gefriertrockners befestigt werden können und die Standfestigkeit der Gefäße gesichert sein. Mit Hilfe

von Produktmeßfühlern, welche in die Proben eingefroren werden, kann die Temperatur innerhalb der Proben kontrolliert werden. Die optimale Gefriertrocknungstemperatur ist vom eutektischen Punkt des Gefrierguts abhängig.



Abb. 35: Eiskondensatorraum des Gefriertrockners, beheizbare Stellfläche, Kryogefäße und Produktmessfühler

3.2.2.2 Trocknungsparameter

Die Gefriertrocknung wird in folgende drei Abschnitte eingeteilt: Vortrocknung, Haupttrocknung und Nachtrocknung. Die einzelnen Trocknungsabschnitte sind abgeschlossen, sobald die Produkttemperatur die Temperatur der Stellfläche erreicht hat. Die Parameter, die für den jeweiligen Trocknungsabschnitt konstant gehalten werden, sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 8: Trocknungsparameter für die Lyophilisierung

	Vortrocknung	Haupttrocknung	Nachtrocknung
Temperatur des Eiskondensators	-50 °C	-50 °C	-50 °C
Temperatur im Innenraum	-11 °C	-11 °C	-67 °C
Temperatur der Stellfläche	-11 °C/5 °C	10 °C	20 °C
Druck	2,389 mbar	2,389 mbar	0,040 mbar

Nach 6 h Vortrocknung wird die Stellflächentemperatur von -11 °C auf 5 °C erhöht. Sobald die Vortrocknung abgeschlossen ist, werden pro Einfriergeschwindigkeit und Hefestamm Proben entnommen. Für die sich anschließende Haupttrocknung wird die Stellflächentemperatur auf 10 °C erhöht. Nach Beendigung der Haupttrocknung

werden erneut pro Einfriergeschwindigkeit und Hefestamm Proben entnommen. Zur Nachrocknung wird die Stellflächentemperatur auf 20 °C erhöht und das maximale Vakuum von 0,040 mbar angelegt. Die Eiskondensatortemperatur ist während des gesamten Trocknungsprozesses konstant. Die Temperatur im Innenraum entspricht dem angelegten Druck. Für die Vor-, Haupt- und Nachrocknung werden verschiedene Trocknungsintervalle (Tab. 9) getestet.

Tabelle 9: Trocknungsintervalle zur Optimierung der Gefriertrocknung

Versuchsnr.	Vortrocknung	Haupttrocknung	Nachrocknung
1	12 Stunden	14 Stunden	10 Stunden
2	9 Stunden	12 Stunden	4 Stunden
3	12 Stunden	10 Stunden	-

3.2.2.2.3 Eutektikum/Kryohydrat

Zur Bestimmung des eutektischen bzw. kryohydratischen Punkts wird 1 ml Suspension (Hefezellen plus Schutzmittel) in dem Verhältnis 105 µl / 5 mg dw (s. 3.2.2.1), hergestellt und in ein Reagenzglas überführt. Diese Suspension wird in einem gekühlten Methanolbad (-29 °C) gefroren und die Temperatur in Intervallen von 15 Sekunden bis zum Erreichen von 24 °C gemessen.

2.3.2.2.4 Vitalitätsbestimmung

Ebenso wie nach dem Gefrieren der Hefezellen werden nun die getrockneten Zellen beider Stämme in 2 ml Nährmedium suspendiert. 10 µl dieser Suspension werden in 30 ml Nährmedium pipettiert. Bei optimalen Wachstumsbedingungen (30 °C und 172 rpm) wird die Kultur im Inkubator aerob bebrütet und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte gemessen. Auch hier wird wiederum ein YNB - Gußplattenabstrich zur Überprüfung der Kulturreinheit vorgenommen.

3.2.2.2.5 Restwasserbestimmung

Für die Restwasserbestimmung wird jeweils am Ende eines Trocknungsabschnitts eine Spatelspitze Probe entnommen und gewogen (1 - 2 mg). Der Restwassergehalt wird mit der Karl- Fischer- Methode (Meßbereich 0,1 – 7,0 Volumenprozent Wasser) bestimmt.

Das Lösungsmittel (400 µl Pyridin) wird in einer Glasflasche vorgelegt und mit einem KF- Titriermittel auf der Basis von Diethylenglykolmonomethylether bis zu einem Farbumschlag von farblos auf gelb titriert. Mit einem Spatel wird die feste Probe zugesetzt und erneut bis zu einem Farbumschlag von farblos auf gelb titriert. Das Volumen der verbrauchten Reagenzlösung wird abgelesen und mit dem probenspezifischen Faktor verrechnet.

3.2.2.3 Interferenzmikroskopie der phänotypischen Streßadaption

Es werden von *Saccharomyces boulardii* drei Präparate für die Interferenzmikroskopie angefertigt:

- aus streßfreien Zellen
- aus Zellen nach Gefrierinduktion (0,95 °C/s Einfriergeschwindigkeit)
- aus Zellen nach Lyophilisierungsinduktion (ohne Nachrocknung der Zellen)

Die Methylenblaufärbung der Zellen wird wie folgt durchgeführt:

20 µl der in sterilem Wasser resuspendierten Zellen werden auf einen Objektträger pipettiert, und durch doppeltes Ziehen über der nicht leuchtenden Bunsenbrennerflamme fixiert. Anschließend werden 10 µl Metylenblaulösung (20 µg/ml) auf den Objektträger getropft und vier Minuten inkubieren lassen.

Nachdem die überschüssige Farblösung abgesaugt worden ist, wird mit einem Deckglas das Präparat geschlossen. Die Präparate werden mit 1200 facher Vergrößerung im Lichtmikroskop betrachtet und photographiert (Okular 10 fach).

3.2.3 Probenaufbereitung für die 2D - Elektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung werden drei Induktionen, die aus der gleichen batch - Kultur geerntet werden, verglichen:

- gefrorene Zellen
- gefriergetrocknete Zellen
- Zellen ohne Streßinduktion

Zellaufschluß und Proteinsolubilisierung werden nach dem in Kap 2.3.2 definiertem Protokoll durchgeführt. Sämtliche Angaben, wie Proteinkonzentrationen, Zellaufschußbedingungen, Extraktionszeiten oder Auftragsmengen können hieraus entnommen werden.

Die gefrorenen, die lyophilisierten und die streißfreien Hefezellen (20 mg dw) werden jeweils in 500 µl SDS - Puffer resuspendiert und anschließend auf 4 Eppendorf Gefäße verteilt, so daß sich in jedem Gefäß die gleiche Menge von ca. 5 mg Trockenmasse befindet. Anschließend werden die Suspensionen mit SDS - Puffer auf 200 µl aufgefüllt, auf 95 °C erhitzt und mit dem Ultraschallstab aufgeschlossen. Das Zellysat wird in SDS - Puffer gekocht und nach Abkühlung mit Lysepuffer verdünnt. Nach Extraktion durch Schütteln (RT, 40 min) wird mit 15000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand auf das Gel geladen.

3.2.4 Elektrophorese und Proteinvisualisierung

Um eine größtmögliche Signifikanz und Vergleichbarkeit zu erzielen, werden die elektrophoretischen Bedingungen in der Weise gewählt, daß zu vergleichende Gele in der ersten als auch in der zweiten Dimension parallel aufgetrennt werden können. Für die Analyse der cytoplasmatischen Fraktion werden fünf verschiedene Induktionen und zwei verschiedene Stämme (Tab. 10) in einem Lauf zuerst nach isoelektrischen Punkt und dann nach Molekulargewicht getrennt.

Tabelle 10: Probenanordnung während der Elektrophorese der cytoplasmatischen Fraktion

Proben Nr.	Hefeart	Schockinduktion
1	<i>Saccharomyces boulardii</i>	ohne
2	<i>Saccharomyces boulardii</i>	-23 °C gefrieren
3	<i>Saccharomyces boulardii</i>	-196 °C gefrieren
4	<i>Saccharomyces boulardii</i>	-23 °C und getrocknet
5	<i>Saccharomyces boulardii</i>	-196 °C und getrocknet
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ohne
7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-23 °C gefrieren
8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-196 °C gefrieren
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-23 °C und getrocknet
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-196 °C und getrocknet

Es werden jeweils zwei Gele für jeden Stamm und jede Streißinduktion angefertigt; die isoelektrische Fokussierung und SDS - PAGE wird nach Kapitel 2.3.3 durchgeführt. Es wird im Reswellingtray mit Thioharnstoff- / Harnstofflösung gequollen. Die Auftragsmenge im Dry - strip - System beträgt 80 µl Proteinextrakt.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Abschnitt wird die in 2.2 optimierte Probenaufbereitung für die cytoplasmatische Fraktion der Hefe angewandt und zu einer Bestimmung von bisher unbekanntem Proteinfunktionen führen. Es sind bisher noch keine Streßproteine, bzgl. der Induktionen des Lyophilisieren bekannt [10, 11].

Hierbei wird das Proteom der Hefe nach den Schockinduktionen Gefrieren und Lyophilisieren bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces boulardii* mit streßfreien Zellen der beiden Stämme verglichen.

Mit der Methode der hochauflösenden 2D - Elektrophorese sollen signifikante Veränderungen der Proteinexpressionen nach Streßinduktion beschrieben werden. Das Kapitel gliedert sich im wesentlichen in drei Abschnitte: die Optimierung der Streßparameter auf Subletalität, die Auswertung der mit Hilfe der Elektrophorese erstellten Proteinmuster und die funktionale Diskussion der detektierten Streßproteine mit Datenbankrecherche.

3.3.1 Stammbeschreibung, Kultur und Ernte der Zellen

Saccharomyces cerevisiae und *Saccharomyces boulardii* sind phänotypisch ähnliche Hefen und wachsen beide in gleichem Medium. Auf YNB - Gußplatten bildet *Saccharomyces cerevisiae* weiß- bräunliche, *Saccharomyces boulardii* hellere weiße Kolonien.

Der Hefestamm *Saccharomyces boulardii* wurde aus dem Medikament Perenterol™ isoliert [52]. *Saccharomyces cerevisiae* (S288c, Wildtyp) stammt aus der Deutschen Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen (DSZM).

Die Hefekulturen wurden anaerob auf Schrägagar in Reagenzgläsern bei 6 °C gelagert und alle drei bis sechs Wochen in YNB - Medium revitalisiert. Gewöhnlich werden Hefen in YPD - Medium bei -70 °C aufbewahrt, da in dieser Arbeit die Streßvektoren von Gefrieren und Trocknen untersucht werden sollen, stellt das Lagern bei -70 °C bereits eine Streßinduktion dar, die hier vermieden werden sollte.

Maximale Wachstumsraten bei gleichzeitig höchster Reproduzierbarkeit sind für die Bestimmung von Streßproteinen wesentlich, da kurze Generationszeiten Indikator für streßfreie Bedingungen darstellen, die für den Vergleich mit streßinduzierten Fraktionen Voraussetzung sind [6].

Die Ernte wird in der logarithmischen Phase (OD von 1,0) durchgeführt. In diesem Stadium, in welchem die Zellen kürzeste Teilungsraten aufweisen (s. Kap 2.2.1.3) ist eine schnelle Anpassung an eine Streßinduktion zu erwarten; zudem wird in dieser Phase die höchste Anzahl von Proteinen im Verhältnis zum Gesamttrockengewicht [56] exprimiert. Die geernteten Zellen (12 ml Nährboullion) entsprechen einem Trockengewicht pro Pellet von etwa 5 mg und einer Gesamtzellzahl von 1×10^7 Zellen/ml.

Nach der Zentrifugation werden die Zellen für etwa 10s in sterilem dest. Wasser gewaschen, um die Salze des YNB - Substrats vollständig zu entfernen. Dies bedeutet zwar einen zusätzlichen Streß für die Hefezellen, der aber durch die Gleichbehandlung und die sehr kurze Induktionszeit keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression der verschiedenen Fraktionen darstellt.

Auf den Waschschrift kann nicht verzichtet werden, da sich die Salze und Mediumreste störend auf die Elektrophorese auswirken würden. Bei einer Zellernte durch Filtration mit z.B. einer 5 kD Polyethersulfonmembran, welche ohne einen anschließenden Waschschrift auskommt, ist die Reproduzierbarkeit zu gering.

3.3.2 Optimierung der Streßinduktion

Um Letalitätsfaktoren zu finden, die bei der Gefriertrocknung von Hefen zu niedrigen Überlebensraten führen, wurden zunächst in einer Reihe von Vorversuchen die „äußeren“, verfahrenstechnisch beeinflussbaren, Prozeßparameter untersucht. Nach Festlegen einer optimierten Arbeitsweise können dann durch zahlreiche, stets gleich ablaufende Gefriertrocknungen „innere“, durch den physiologischen Zustand der Zellen bedingte, Einflußgrößen erkannt werden.

Die Gefriertrocknung wurde in der Weise optimiert, daß der Streß für die Zellen subletal ist. Würde der Streß derart intensiviert, daß nur noch wenige Zellen vital sind, können die Zellen nicht mehr auf den Streß reagieren, und es könnten keine Streßadaptionen in der Proteinexpression mehr erkannt werden.

Eine Gefrierschutzsubstanz, die den Zellen vor der Schockinduktion zugegeben wurde, soll die Zellen stabilisieren und dazu beitragen, daß die Hefen das Gefrieren und die Gefriertrocknung als vitale Zellen überstehen.

Hierzu wurden die Gefriertrocknungsintervalle so optimiert, daß den Zellen möglichst viel Wasser entzogen wurde und ihre Konsistenz pulverförmig war.

3.3.2.1 Gefrieren der Zellen

3.3.2.1.1 Einfluß von Gefriergeschwindigkeit und Schutzsubstanzen

Das Gefrieren der Hefesuspensionen kann unter ungünstigen Bedingungen zum Absterben der meisten Zellen führen.

Hohe Überlebensraten nach der Gefriertrocknung sind nur dann zu erwarten, wenn der Wärmeentzug beim Gefrieren der Hefen derart gesteuert wird, daß zu Beginn der nachfolgenden Entwässerung eine möglichst hohe Anzahl lebensfähiger Zellen zur Verfügung steht [46, 49]. Daher wurde zunächst der Einfluß der Einfriereschwindigkeit und der Gefrierschutzsubstanz auf die Vitalität der Zellen untersucht.

Schnelles Gefrieren führt zu kleineren Eiskristallen, die das Gefüge schonen, die aber beim Trocknen feinste Poren und Kapillaren mit vergrößertem Dampfströmungswiderstand entstehen lassen.

Große Eiskristalle bilden sich beim langsamen Gefrieren, und sie ermöglichen eine erhöhte Trocknungsgeschwindigkeit. Von Nachteil ist jedoch, daß sie Zellen zerstören und bei Proteinen starke Denaturierungserscheinungen verursachen können [50].

Die Optimierung der Gefrierparameter mußte aber in jedem Fall für jeden Organismus empirisch gefunden werden, da die Zellen bzw. Gewebe durch ihren zellulären Aufbau unterschiedlich an die einzelnen Streßadaptionen angepaßt sind. Für das Gefrieren wurden Einfriereschwindigkeit, Gefriertemperatur und Einfluß verschiedener Schutzsubstanzen optimiert.

Zur Ermittlung der Einfriereschwindigkeiten wurde die Temperaturabnahme beim Gefrieren gegenüber der Zeit aufgetragen (Abb. 36). Die maximalen Gefriertemperaturen betrugen -23 °C , -72 °C und -196 °C .

Die Einfriereschwindigkeiten ergeben sich aus der jeweiligen Steigung der ermittelten Kurven:

- Einfriertemperatur (-23 °C): $0,11\text{ °C/s}$
- Einfriertemperatur (-72 °C): $0,19\text{ °C/s}$
- flüssiger Stickstoff (-196 °C): $0,95\text{ °C/s}$

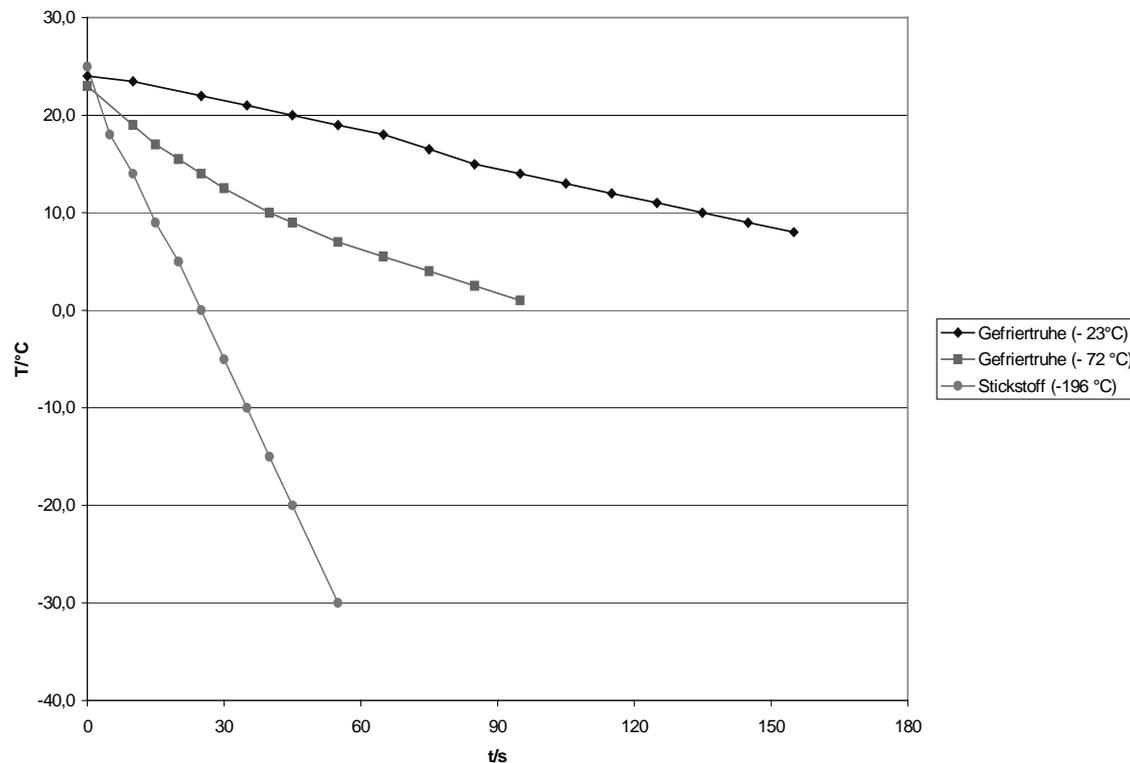


Abb. 36: Temperaturabnahme von 1 ml Wasser in den Gefriertruhen und Stickstoff gegenüber der Zeit

Um den Einfluß von Gefrierschutzsubstanzen auf die Überlebensrate der Hefezellen festzustellen, wurden einer äquivalenten Zellzahl von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces boulardii* vier verschiedene Schutzsubstanzen (Medium, Glycerin, Kondensmilch und Lactose) zugegeben.

Anschließend werden diese acht Zellsuspensionen mit drei Einfriergeschwindigkeiten gefroren. Die gefrorenen Zellen werden am nächsten Tag aufgetaut und ihre Vitalität durch Animpfen in YNB- Medium bestimmt.

Die Wachstumskurven von *Saccharomyces cerevisiae* und *boulardii* in Abhängigkeit von den Gefrierschutzsubstanzen Glucose, Glycerin, Kondensmilch und Lactose in den drei Einfriergeschwindigkeiten 0,11 °C/s, 0,19 °C/s und 0,95 °C/s sind in den Abbildungen 37 und 38 graphisch dargestellt.

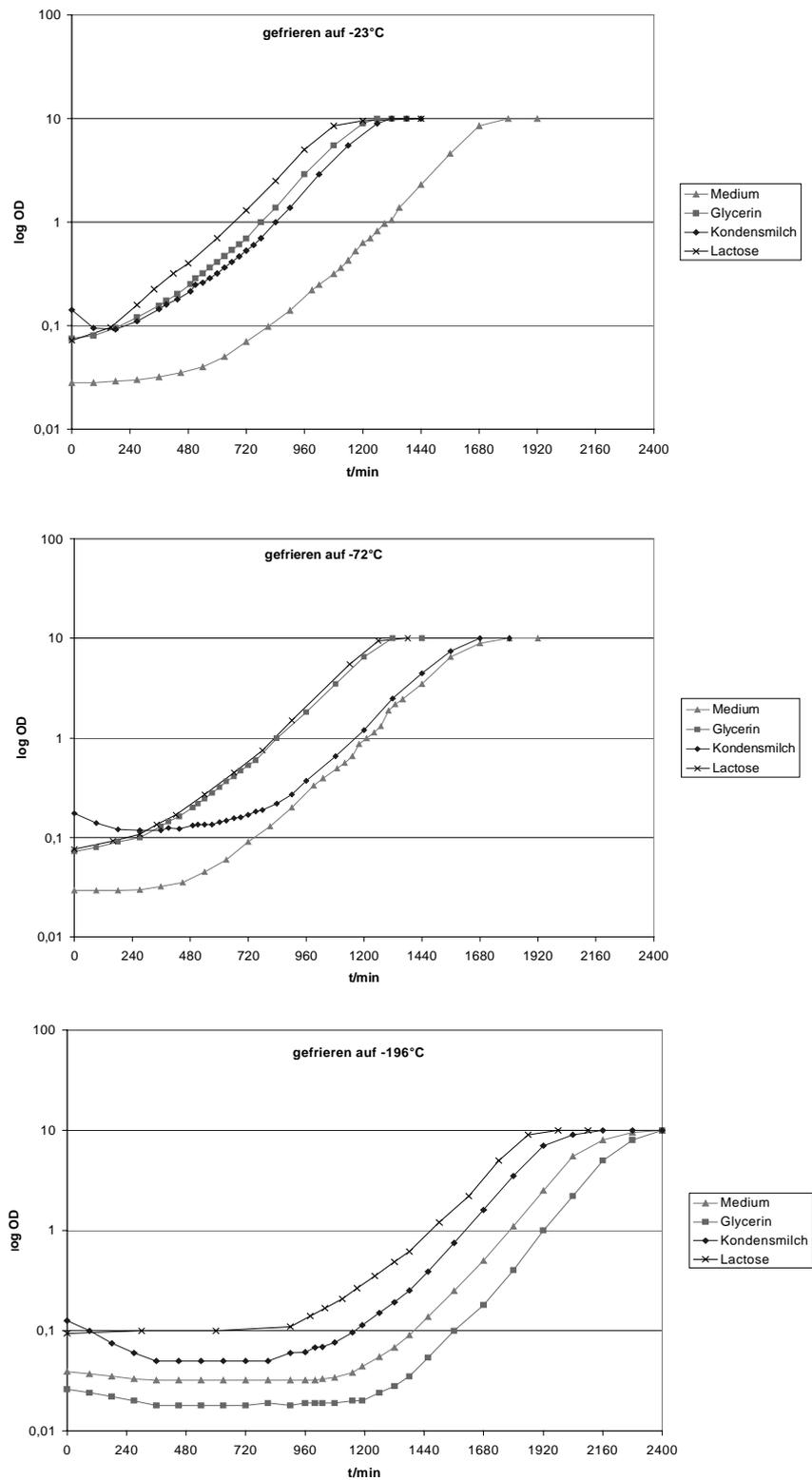
Saccharomyces cerevisiae

Abb. 37: Wachstumskurven von *Saccharomyces cerevisiae* nach Gefrieren über Nacht mit drei verschieden Einfriereschwindigkeiten 0,11 °C/s (-23 °C); 0,19 °C/s (-72 °C); 0,95 °C/s (-196 °C) und vier Gefrierschutzsubstanzen

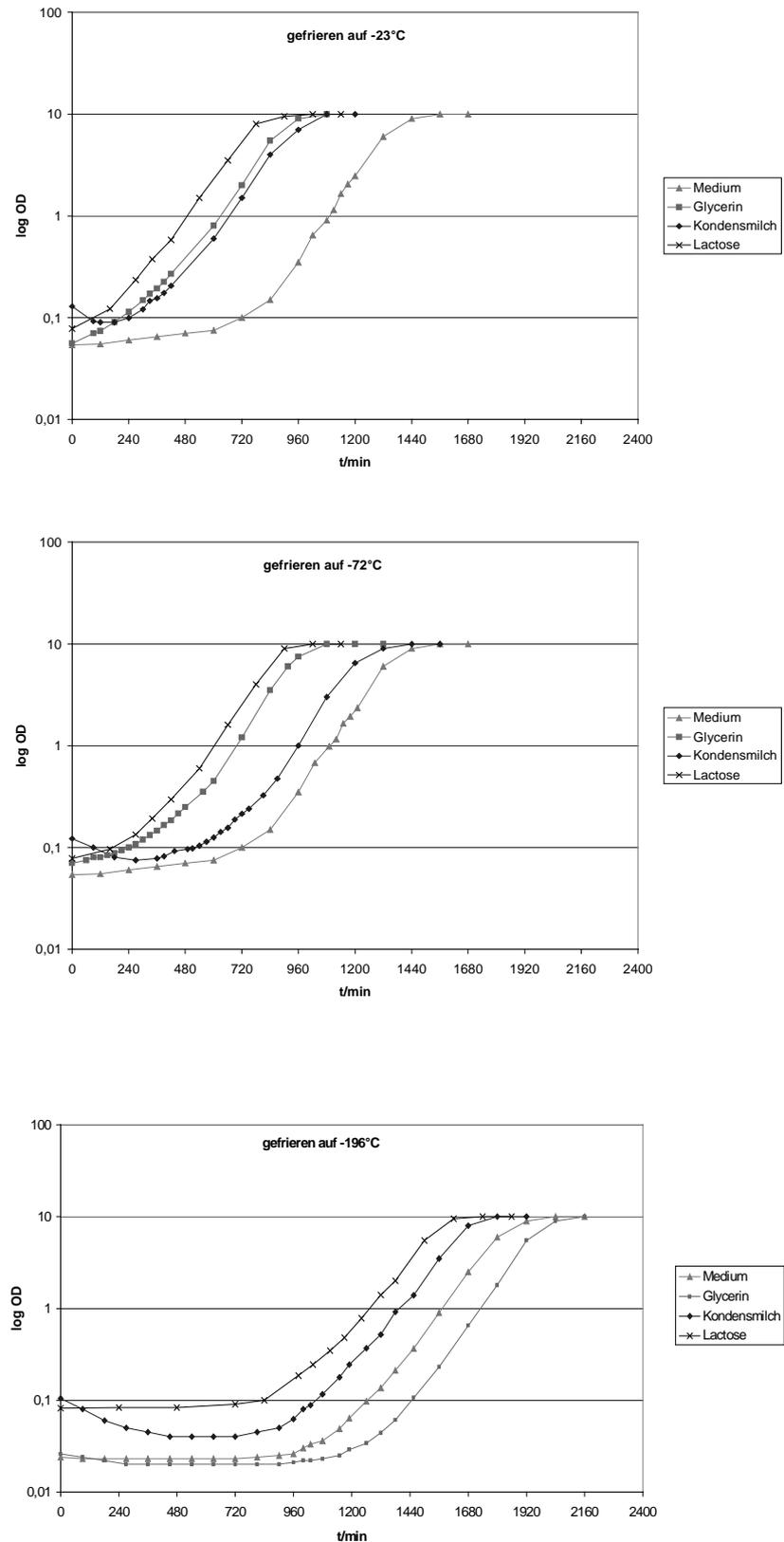
Saccharomyces boulardii

Abb. 38: Wachstumskurven nach *Saccharomyces boulardii* nach Gefrieren über Nacht mit drei verschiedenen Einfriergeschwindigkeiten (0,11 °C/s (-23 °C); 0,19 °C/s (-72 °C); 0,95 °C/s (-196 °C)) mit vier Gefrierschutzsubstanzen

3.3.2.1.2 Diskussion der streßinduzierten lag- Phasen

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten Streßadaptionen in Organismen zu messen. Die erste besteht darin die Zellen nach Streßinduktion auf Agarplatten zu impfen, einen geeigneten Zeitraum zu bebrüten und die vitalen Zellen mit einem Parallelansatz ohne Streßinduktion auszuzählen. Hierbei kann nur die Überlebensrate der Zellen bestimmt werden, nicht aber deren Streßzustand. Die zweite aufwendigere Möglichkeit besteht darin, die Zellen nach Schockinduktion in Flüssigmedium anzupflegen und deren lag - Phase zu bestimmen. Aus der Länge der lag - Phasen (Tab. 11) lassen sich Überlebensrate und Streßzustand der Zelle ablesen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die kürzesten lag- Phasen und damit schonendstes Gefrieren bei beiden Stämmen mit geringen Einfriergeschwindigkeiten (0,11 °C/s und 0,19 °C/s) bzw. geringen Gefriertemperaturen gemessen wurden. Überblickend stellt man fest, daß niemals alle Zellen bei den angewandten Streßinduktionen abgetötet wurden. Sehr wohl variiert aber die Überlebensrate bzw. die Streßadaption. *Saccharomyces boulardii* scheint allgemein resistenter gegenüber der Streßinduktion Gefrieren zu sein als *Saccharomyces cerevisiae*. Flüssiger Stickstoff mit einer Einfriergeschwindigkeit von 0,95 °C/s führt bei beiden Hefen zu einer erheblichen Verlängerung der lag - Phase. Die Wirkung der Gefrierschutzmittel ist bei beiden Hefearten identisch. Den besten Schutz vor letalen Gefrierschäden bietet unabhängig von der Einfriergeschwindigkeit und im Vergleich zu den anderen Gefrierschutzsubstanzen Lactose. Glycerin wirkt bei den langsamen Einfriergeschwindigkeiten ähnlich wie Lactose. Bei einer hohen Einfriergeschwindigkeit bietet Glycerin jedoch keinen besseren Schutz als Kondensmilch und Nährmedium. Sterile Kondensmilch wird neuerdings von den großen Stammarchiven wie der American Type and Culture Collection (ATCC) und der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) für die Lagerung der Organismen bei -20 °C getestet und verwendet.

Die auffällige Abnahme der optischen Dichte nach dem Animpfen bei den Versuchen mit Kondensmilch als Gefrierschutzsubstanz kann mit einem Abbau der Kondensmilch, welche anfängliche Trübung induziert, durch die Hefezellen erklärt werden. Die Verringerung der optischen Dichte bei den anderen Gefrierschutzsubstanzen bei einer schnellen Einfriergeschwindigkeit liegt sehr wahrscheinlich an einer Veränderung des Phänotyps der Hefe.

Eine vergleichende Probe ohne Schutzsubstanz läßt sich ohne intensives Waschen der Zellen, welches bereits einer potentiellen Schockinduktion gleichkäme, nicht herstellen, da Glucosereste aus dem Medium auch nach dem Ernten an den Zellen adhäsieren.

Um den Einfluß der Einfriergeschwindigkeit und der Schutzsubstanzen auf die Streßadaption der Zellen zu verdeutlichen, sind in Tab. 11 die lag - Phasen der Wachstumskurven aufgezeigt.

Tab. 11: Zusammenfassung der lag- Phasen von *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.) und *Saccharomyces boulardii* (S.b.) nach der Streßinduktion Gefrieren

Gefrierschutz- lösung/ Streßinduktion	Medium		Glycerin		Kondensmilch		Lactose	
	S.c.	S.b.	S.c.	S.b.	S.c.	S.b.	S.c.	S.b.
gefrieren auf -23 °C	800 min	900 min	400 min	200 min	400 min	300 min	120 min	120 min
gefrieren auf -72 °C	600 min	900 min	400 min	500 min	900 min	800 min	300 min	200 min
gefrieren auf -196 °C	1100 min	1000 min	1200 min	1200 min	1000 min	900 min	900 min	800 min

Die längste lag - Phase und damit die höchste Schädigung der Kultur wurde bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces boulardii* (Abb. 37 und 38) bei Gefrieren mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) und der Schutzsubstanz Glycerin gemessen: 1200 min = 20 h.

Die kürzeste lag-Phase und somit höchste Vitalität wurde bei der Verwendung von Lactose und einer Einfriergeschwindigkeit von 0,11 °C/s (-23 °C) gemessen: 120 min = 2 h. Diese großen Unterschiede in der Streßadaption lassen die komplexen physiologischen Reaktionen für die Streßbewältigung erahnen.

3.2.2.2 Gefriertrocknen der Zellen

Aufbauend auf den aus den Gefrierversuchen gewonnenen Ergebnissen wurden die Gefriertrocknungsversuche mit Lactose als Schutzmittel durchgeführt. Für die Trocknungsversuche wurde zudem auf die Einfriergeschwindigkeit von 0,19 °C/s (-72 °C) verzichtet, da sie keine wesentlichen Unterschiede bei den lag- Phasen im Vergleich zur langsameren Einfriergeschwindigkeit von 0,11 °C (-23 °C) aufwies.

3.3.2.2.1 Der kryohydratische / eutektische Punkt

Um sicherzustellen, daß die Proben während der Trocknung nicht auftauen, wurde die optimale Trocknungstemperatur 10 °C unterhalb des eutektischen bzw. des kryohydratischen Punkts der Proben gewählt. Der eutektische Punkt beschreibt diejenige Temperatur in einem Mehrkomponentensystem, in der sich gleichzeitig Kristalle von den einzelnen Komponenten in einem dichten mikrokristallinen Gemenge bilden [56]. In diesem Punkt ist eine durch Kristallbildung freigesetzte Wärme meßbar. Die ermittelten Werte zur Bestimmung des kryohydratischen Punktes ist in Abbildung 39 graphisch dargestellt.

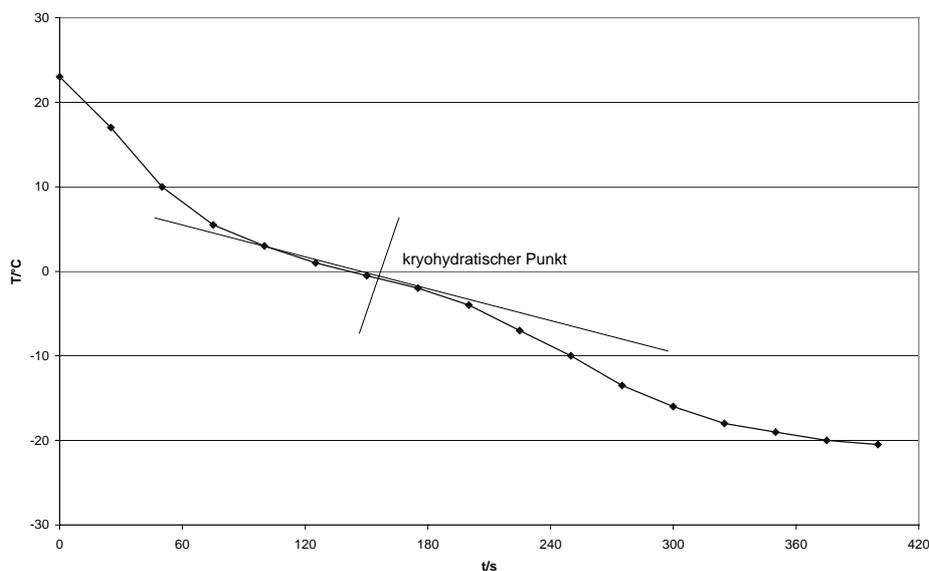


Abb. 39: Graphische Bestimmung des eutektischen Punkts der Hefezellen- Lactose- Suspension

In dem besonderen Fall eines wäßrigen Mehrkomponentensystems (z.B. $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{Cl}/\text{Fettsäuren}$) spricht man anstelle des eutektischen Punkts vom kryohydratischen Punkt [56]. Durch die Bestimmung des Wendepunkts in der Zeit-Temperatur - Kurve kann der genaue kryohydratische Punkt eines Mehrkomponentensystems bestimmt werden. Abb. 39 ergibt sich ein kryohydratischer Punkt der Hefezellen- Lactose- Suspension von -1 °C. Daher wird für die folgenden Trocknungsversuche eine Gefriertrocknungstemperatur von -11 °C gewählt.

Zur Optimierung der Trocknungsparameter werden verschiedene Trocknungsintervalle (Tab. 11) getestet und die Konsistenz der Proben nach jedem Trocknungsabschnitt verglichen. Zudem wird die Vitalität und Streßadaptation im Wachstumsversuch durch Messen der lag- Phase bestimmt.

3.3.2.2 Optimierung der Trocknungsparameter

Erste Trocknungsoptimierung

Beim Trocknungsversuch Nr. 1 wurde eine Vortrocknungsdauer von 12 Stunden, eine Haupttrocknungsdauer von 14 Stunden und eine Nachtrocknungsdauer von 10 Stunden angewandt. Das Ende des jeweiligen Trocknungsabschnitts ist erreicht, wenn die Produkttemperatur der Stellflächentemperatur im Eiskondensatorraum entspricht. Die Konsistenz der getrockneten Hefezellen ist nach der Vortrocknung noch leicht feucht und zäh, nach der Haupttrocknung waren die Proben jedoch schon sehr trocken und teilweise bildete sich am Kryogefäß eine Kruste.

Nach der Nachtrocknung war das Ergebnis ebenfalls ein trockenes, aber hartes Pulver. Die Resuspendierbarkeit war nach allen drei Trocknungsabschnitten gut. Die nach jedem Trocknungsabschnitt folgende Vitalitätsbestimmung ist in Abb. 40 graphisch dargestellt.

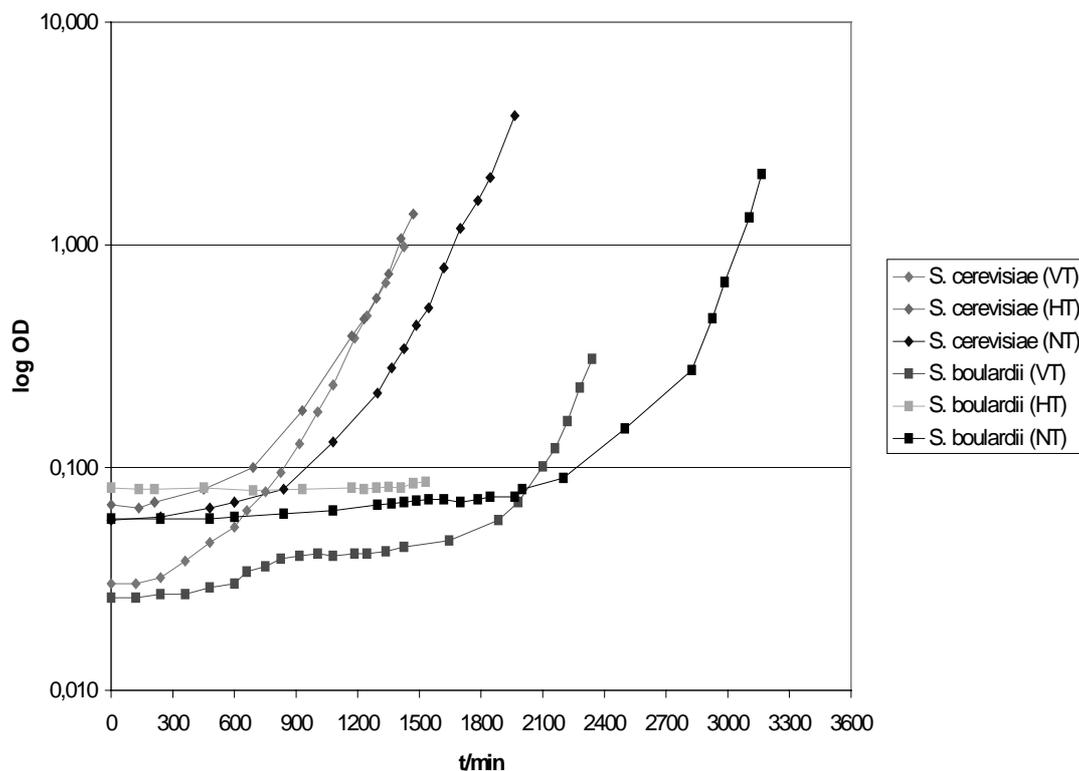


Abb. 40: Vitalitätsbestimmung nach Vortrocknung (VT), Haupttrocknung (HT) und Nachtrocknung (NT) von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces boulardii* mit Lactose als Gefrierschutzmittel und einer Einfriergeschwindigkeit von 0,11 °C (-23 °C)

Die Trocknungsparameter und Eigenschaften der Hefen aus dem ersten Trocknungsversuch sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 12: Eigenschaften und lag- Phasen der getrockneten Proben nach den jeweiligen Trocknungsabschnitten und Trocknungsparameter der ersten Trocknungsoptimierung

	Vortrocknung	Haupttrocknung	Nachtrocknung
Stellflächentemperatur	-10 °C	10 °C	20 °C
Dauer	12 h	14 h	10 h
Konsistenz	zäh, klebrig	trockenes am Glas klebendes Pulver	hartes, trockenes Pulver
Löslichkeit	gut	gut	gut
lag- Phase <i>S. cerevisiae</i>	10 bis 15 h	10 bis 15 h	15 bis 20 h
lag- Phase <i>S. boulardii</i>	30 bis 35 h	-	40 –45 h

Die Zellen beider Stämme waren nach allen Trocknungsphasen, bis auf die Zellen von *S. boulardii* nach der Haupttrocknung, vital. Die Letalität dieser Zellen kann nur auf einen Verfahrensfehler zurückzuführen sein, da Zellen aus der Nachtrocknung noch vital waren. Das Trocknungsprodukt war nach der Vortrocknung von zäher und viskoser Konsistenz und nach der Haupttrocknung zwar trocken, aber nur noch schwer homogenisierbar. Auffällig ist, daß *Saccharomyces boulardii* durch die Trocknung wesentlich stärker geschwächt wurde als *Saccharomyces cerevisiae*.

Zweite Trocknungsoptimierung

Beim zweiten Trocknungsversuch wurde die Stellflächentemperatur während der Vortrocknung von -10 °C auf 5 °C erhöht, um der Probe mehr Energie zuzuführen und um damit mehr freies Wasser zu entfernen. Die Vortrocknungsdauer wurde von 12 h auf 9 h, die Haupttrocknungsdauer von 14 h auf 12 h und die Nachtrocknungsdauer von 10 h auf 4 h verkürzt. Die Haupt- und Nachtrocknungszeiten wurden verkürzt, da das Endprodukt nach dem ersten Optimierungsversuch nur schwer homogenisierbar und sehr verkrustet war. Diesmal wurden in drei Parallelansätzen beide Hefen mit zwei Einfriergeschwindigkeiten für die Trocknung gewählt. Die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung sind in Abb. 41 für *Saccharomyces cerevisiae* und in Abb. 42 für *Saccharomyces boulardii* dargestellt.

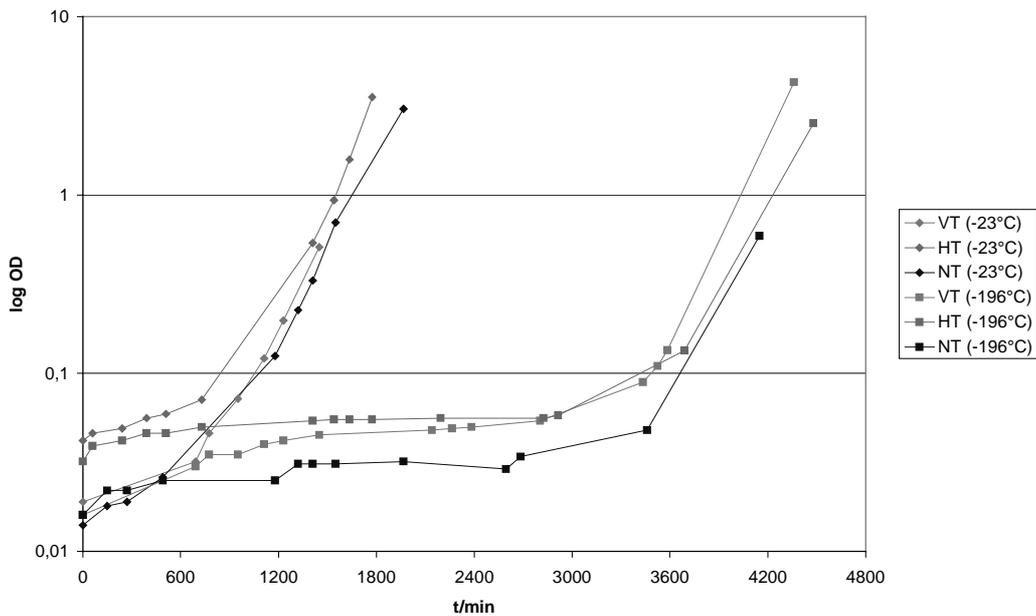
Saccharomyces cerevisiae

Abb. 41: Zweite Trocknungsoptimierung: Vitalitätsbestimmung nach Vortrocknung (VT), Haupttrocknung (HT) und Nachtrocknung (NT) von *Saccharomyces cerevisiae* mit Lactose als Gefrierschutzmittel und zwei verschiedenen Einfriergeschwindigkeiten 0,11 °C/s (-23 °C) und 0,95 °C/s (-196 °C)

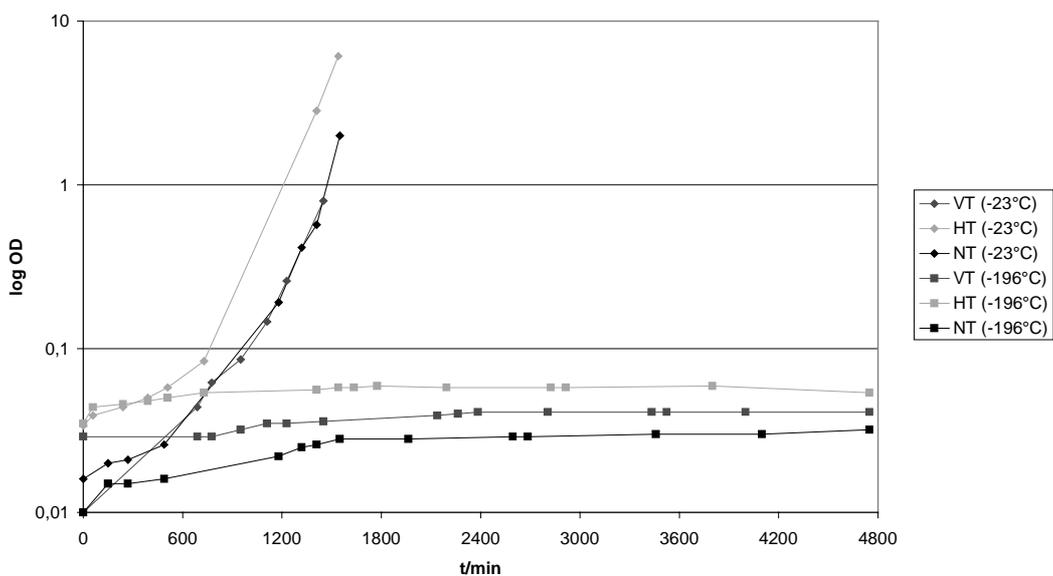
Saccharomyces boulardii

Abb. 42: Zweite Trocknungsoptimierung: Vitalitätsbestimmung nach Vortrocknung (VT), Haupttrocknung (HT) und Nachtrocknung (NT) von *Saccharomyces boulardii* mit Lactose als Gefrierschutzmittel und zwei verschiedenen Einfriergeschwindigkeiten 0,11 °C/s (-23 °C) und 0,95 °C/s (-196 °C)

Die Trocknungsparameter und Eigenschaften der Hefen aus der zweiten Trocknungsoptimierung sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 13: Eigenschaften und lag- Phasen der getrockneten Proben nach den jeweiligen Trocknungsabschnitten und Trocknungsparameter der zweiten Trocknungsoptimierung

	Vortrocknung	Haupttrocknung	Nachtrocknung
Stellflächentemperatur	-10 °C, nach 6 h auf 5 °C erhöht	10 °C	20 °C
Dauer	9 h	12 h	4 h
Konsistenz	feucht	trocken, kristallin	trocken, verkrustet
Löslichkeit	gut	gut	schlecht
lag- Phasen bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (gefrieren auf -23 °C)	10 h	10 h	10 h
lag- Phasen bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (gefrieren auf -196 °C)	60 h	60 h	60 h
lag- Phasen bei <i>Saccharomyces boulardii</i> (gefrieren auf -23 °C)	10 h	10 h	10 h
lag- Phasen bei <i>Saccharomyces boulardii</i> (gefrieren auf -196 °C)	nach 80 Stunden abgebrochen		

Die Konsistenz beider Proben nach der Vortrocknung war feucht. Nach der Haupttrocknung zeigten die Hefen eine sehr unterschiedliche Konsistenz von feucht über trocken bis kristallin. Am Ende der Nachtrocknung waren die Proben beider Stämme trocken, aber teilweise sehr verkrustet. Die Resuspendierung im Medium war anfangs nur schlecht möglich. Nach kurzem Vortexen ließen sich die Proben jedoch gut lösen.

Auffällig war, daß die lag- Phasen der Hefen nach der Vor-, Haupt- und Nachtrocknung identisch waren. Die Einfriereschwindigkeit hatte hierbei den

größeren Einfluß auf die Vitalität der Zellen. Bei *Saccharomyces cerevisiae* verlängerte sich die lag - Phase durch die höhere Einfriergeschwindigkeit um 50 Stunden und bei *Saccharomyces boulardii* wurde der Versuch der Vitalitätsbestimmung nach 80 Stunden abgebrochen, da sich keine Zunahme der optischen Dichte erkennen ließ; sämtliche Zellen waren letal.

Dritte Trocknungsoptimierung

Beim Trocknungsversuch Nr. 3 wurde die Vortrocknungsdauer wieder um 3 Stunden auf 12 Stunden verlängert, da die Proben beim vorherigen Versuch noch feucht waren. Die Haupttrocknungszeit wurde von 12 Stunden auf 10 Stunden verkürzt. Wie bei der zweiten Trocknungsoptimierung wurden in drei Parallelansätzen beide Hefen mit zwei Einfriergeschwindigkeiten gefroren und getrocknet. Eine Vitalitätsbestimmung wurde hier nicht durchgeführt.

Die Eigenschaften und Trocknungsparameter sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 14: Eigenschaften und lag- Phasen der getrockneten Proben nach den jeweiligen Trocknungsabschnitten und Trocknungsparametern der dritten Trocknungsoptimierung

	Vortrocknung	Haupttrocknung	Nachtrocknung
Stellflächentemperatur	-10 °C	+10 °C	+20 °C
Trocknungsdauer	12 h	10 h	18 h
Konsistenz	schaumig, aber feucht	trockenes, lockeres homogenes Pulver	hart, verkrustet
Löslichkeit	sehr gut	sehr gut	sehr gut

Diesmal bildeten sich während der Vortrocknung Schäume. Die Konsistenz dieser Schäume war nach der Vortrocknung noch etwas feucht und zäh, aber nach der Haupttrocknung ergab sich ein homogenes lockeres Pulver, welches sich leicht im Medium resuspendieren ließ. Für die weitere Probenaufbereitung zur 2D -Elektrophorese wurden die Proben direkt nach der Haupttrocknung verwendet, da eine intensive Nachtrocknung *Saccharomyces boulardii* bei tiefen Gefriertemperaturen bis zur vollkommenen Letalität schädigt.

3.3.2.2.3 Erstellung eines Trocknungsprogramms für subletale Induktion

Das auf Subletalität und maximalen Wasserentzug optimierte Programm ist in folgendem Trocknungsdiagramm zusammengefaßt.

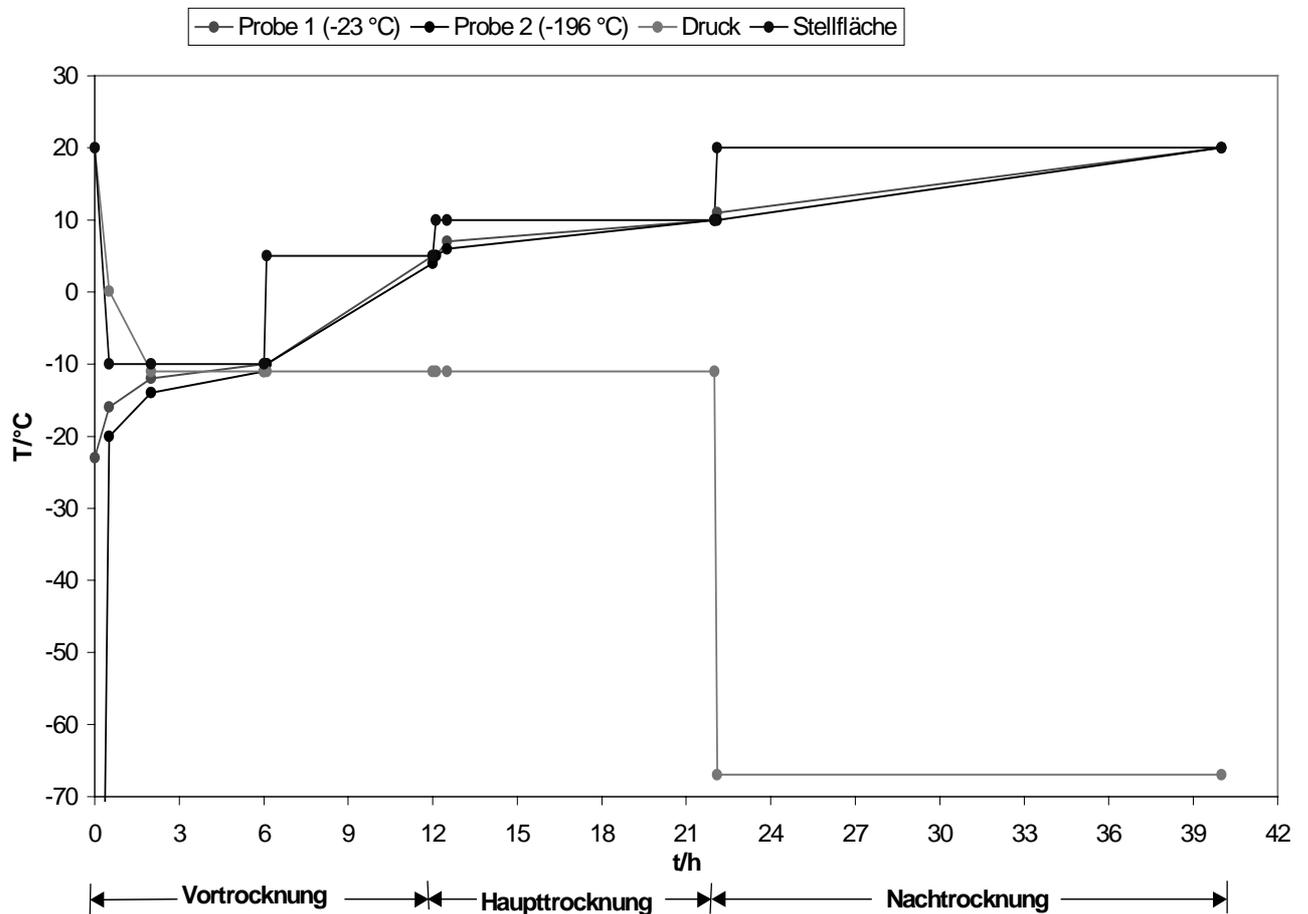


Abb. 43: Trocknungsdiagramm des optimierten Trocknungsverlaufs mit folgenden Trocknungsparametern: Probe 1 mit einer Einfriergeschwindigkeit von 0,11 °C/s (-23 °C), Probe 2 mit einer Einfriergeschwindigkeit von 0,95 °C/s (-196 °C), Druck- und Stellflächentemperaturverlauf im Eiskondensatorraum

Da das gefrorene Wasser bei der Gefriertrocknung unter Umgehung des flüssigen Aggregatzustands verdampft bzw. sublimiert, müssen Temperatur und Druck während des Gefrierens unterhalb des Tripelpunkts ($T = 0,0098 \text{ °C}$ und $p = 6,108 \text{ mbar}$) liegen, in dem alle drei Aggregatzustände nebeneinander möglich sind.

Das Dampfdruckverhalten des Eises ist temperaturabhängig. Die Gefriertrocknung findet als Verdampfungstrocknung immer im Vakuum statt, wobei die Sublimationstemperatur nach dem Dampfdruckverhalten, welches temperaturabhängig ist, durch die Höhe des Vakuums bestimmt wird. So entspricht beispielsweise ein Druck von 2,380 mbar einer Temperatur von -11 °C [50]. Sobald die Produkttemperatur der Stellflächentemperatur im Eiskondensatorraum entsprach, war die Trocknung in dem jeweiligen Trocknungsabschnitt abgeschlossen und die Temperatur der Stellfläche wurde erhöht.

Der Temperaturverlauf der bei unterschiedlichen Einfriergeschwindigkeiten (0,11 °C/s und 0,95 °C/s) eingefrorenen Proben unterschied sich nur in der Anfangsphase. Nachdem die Proben die Gefriertrocknungstemperatur von -11 °C erreicht hatten, verliefen die Kurven nahezu identisch.

Der Bestimmung des Restwassergehalts wurden die getrockneten Zellen aus dem optimierten Trocknungsprogramm (dritte Trocknungsoptimierung) zugrunde gelegt. Der Restwassergehalt wurde jeweils nach der Vor-, Haupt- und Nachtrocknung ermittelt, um die Reproduzierbarkeit des Trocknungsverlaufs zu überprüfen. Dabei wurden folgende Ergebnisse (Tab. 15) ermittelt:

Tabelle 15: Bestimmung des Restwassergehalts nach der Karl- Fischer- Methode von *Saccharomyces cerevisiae*

Einfriergeschwindigkeit	0,11 °C/s (-23 °C)	0,95 °C/s (-196 °C)
Vortrocknung	4,0%	5,0%
Haupttrocknung	1,26%	1,06%
Nachtrocknung	0,795%	0,66%

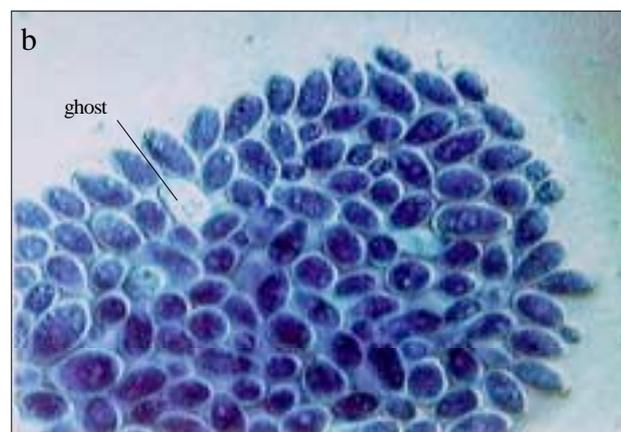
Die Entfernung des freien Wassers ist schon nach der Vortrocknung abgeschlossen. Bei der Haupttrocknung wird so viel gebundenes Wasser entfernt, daß die Vitalität der Zellen nicht beeinflußt wird.

Ein Restwassergehalt von 0,66% führt bei *Saccharomyces boulardii* in Kombination mit der Einfriergeschwindigkeit von 0,95 °C/s (-196 °C) zur Letalität aller Zellen.

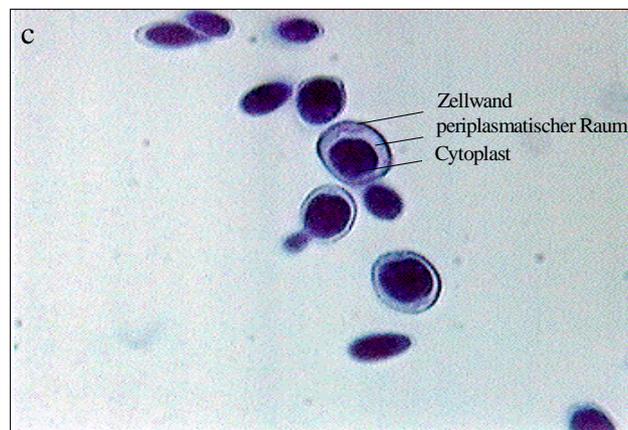
3.3.2.3 Interferenzmikroskopie der phänotypischen Stressadaptation



streßfrei



gefroren mit -196°C



lyophilisiert

Abb. 44: Methylenbau gefärbte Präparate (1200x):

- logarithmisch wachsende Zellen von *S. cerevisiae*,
- schockgefrorene Zellen (Einfriergeschwindigkeit $0,95^{\circ}\text{C/s}$)
- gefrieretrocknete Zellen

Das verwendete Methylenblau färbt selektiv den Protoplast [39]; die Zellwand ist als farbloser Umriß erkennbar.

In Abb. 44a sind Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur von *S. cerevisiae* (Wildtyp S288c) abgebildet. Man erkennt die Vermehrung durch Zellteilung; ein Knospungszyklus zur Abschnürung einer Tochterzelle dauert bei *S. cerevisiae* unter den beschriebenen Kulturbedingungen etwa 2 h. Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* sind in der Regel kugelförmig; liegen für die Zellteilung günstige Bedingungen vor, werden Paarungsfaktoren (α , α - mating pheromones) freigesetzt, welche die Zellen polarisieren. Der Phänotyp dieser polarisierten Zellen weist jetzt eine längliche Form auf, die nach Al Capps als Shmoos bezeichnet werden [77, 78]. Abb. b zeigt auf $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefrorene Zellen. Das Präparat wurde unmittelbar nach dem Auftauen des Pellets angefertigt. Die Zellen haben sich zu größeren dreidimensionalen Aggregaten verklumpt. Durch Eiskristallbildung sind einige Zellen zerstört worden, das Cytoplasma (blau) dieser Zelle ist absent. Im Bild sind diese Zellen an dem Umriß der nicht gefärbten Zellwand erkennbar. Diese Fragmente werden auch als "ghosts" bezeichnet.

Das dritte Bild c) zeigt die Zellen nach Anwendung der optimierten Lyophilisation. Die Zellwand von *S. cerevisiae* stellt weitgehend eine rigide Struktur dar, die für Form und Integrität in der Zelle steht [100]. Als osmotische Barriere fungiert fast ausschließlich die Cytoplasmamembran [39]. Im Bild läßt sich die Dehydrierung durch ein "Schrumpfen" des Cytoplasmas erkennen, der unter isotonischen Bedingungen abgerundete Protoplast weist nun "Schrumpfungen" auf; der periplasmatische Raum vergrößert sich.

3.3.2.4 Fazit

Um eine signifikante zelluläre Streßantwort bzgl. des Lyophilisierens detektieren zu können, wurde die subletale Streßinduktion durch Messen von lag - Phasen der streßinduzierten Zellen ermittelt. Für die 2D elektrophoretischen Untersuchungen wurde auf eine Nachrocknungsphase, in der das Hydratwasser der Zelle entfernt wird, verzichtet, da diese Trocknungsbedingungen bei einer Einfriertemperatur von $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu Letalität von *S. boulardii* führt. Die Zellen wurden bis zu einem Restwassergehalt von 1 - 1,2% getrocknet; um sicherzustellen, daß die Proben während der Trocknung nicht auftauen, wurde die optimale Trocknungstemperatur $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ unterhalb des kryohydratischen Punkts der Proben gewählt. Als

Gefrierschutzsubstanz wurde Lactose verwendet, da diese Substanz zu bestem Zellschutz führte und zudem kein Substrat für die Zellen darstellt.

3.3.3 MALDI - Analyse der detektierten Streßproteine

Die mittels IPG- Dalt aufgetrennten Proteinspots werden ausgestanzt und stehen sowohl für die klassische Edman- Sequenzierung und Aminosäureanalyse, als auch für hochsensitive massenspektrometrische Methoden (z.B. MALDI-, ESI - MS) zur Verfügung. Für die Identifizierung mit MALDI-TOF/MS wird die Analytprobe nach tryptischen Verdau mit einer bestimmten Matrix (z.B. α -Cyano-4-hydroxymethylsäure) gemischt. Nach der Verdunstung des Lösungsmittels erfolgt eine Cokristallisation von Matrix und Analyt. Die kristalline Oberfläche der so präparierten Probe wird im Hochvakuum des Massenspektrometers mit einem Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Dabei werden neben Matrixmolekülen auch Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt, ionisiert und die entstandenen negativen oder positiven Ionen durch eine entsprechend polarisierte Beschleunigungselektrode, die ein elektrostatisches Feld erzeugt, in Richtung des Analysators beschleunigt. Bei den eingesetzten Massenanalysatoren handelt es sich um Flugzeitmassenspektrometer (TOF, *engl.* time of flight), bei denen die Massenbestimmung über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit erfolgt, die zwischen dem Start der Ionen bis zum Eintreffen am Detektor vergeht.

Nach der Beschleunigung der gebildeten Ionen durchlaufen diese eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem Masse/Ladungs - Verhältnis aufgetrennt werden. Da die erzeugten Probenionen vornehmlich nur einfach geladen sind, lassen sich die resultierenden Spektren relativ einfach interpretieren [61]. Die Kalibrierung erfolgt mit Referenzsubstanzen, die den entsprechenden Matrices bereits beigemischt sind.

Der mit der 2D - Elektrophorese aufgetrennte Proteinextrakt und die so erhaltenen Proteinspots werden aus dem Gel ausgestanzt und direkt im Gel tryptisch verdaut. Der so erhaltene Peptidmix wird mit Hilfe von MALDI - TOF/MS auf seine Massenverteilung hin untersucht, was für jedes Ausgangsprotein zu einer typischen Peptid - Massenverteilung ("peptid mass finger print") führt, die mit Hilfe von Suchmaschinen innerhalb von Datenbanken zur schnellen Identifizierung des Spots führen kann. Diese Proteindatenbanken können weltweit über das Internet abgefragt werden.

Es wurden insgesamt 6 signifikante Änderungen in der Proteinexpression durch Streßinduktion bei der elektrophoretischen Auftrennung der cytoplasmatische Fraktion gefunden (Tab. 16; Abb. 44 - 46). Die Spots wurden aus dem entsprechenden Gel gestanzt und zur Identifikation in das Labor von Prof. Dr. Matthias Mann (University of Southern Denmark, Odense) geschickt. Die Ergebnisse der MALDI - TOF MS - Analyse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 16: Funktion und Charakterisierung der identifizierten Spots

Blow up	ID-Nr. Swissprot.	Funktion	Charakterisierung	Open reading frame	MW/pi	Modifikationen
A	P00330	Alkohol Dehydrogenase	anaerobe NADH Synthese	ADH1 YOL086c	36,7/6,7	N-terminale Acetylierung
B	P00650	Phosphoglycerat Kinase	Enzym der Glycolyse	PGK1 YCR015w	44,6/7,7	Acetylierung
C	P32345	Sein / Threonin Phosphatase	Zellstruktur	PPH3 YDR075w	35,2/4,9	unbekannt
C	P64858	unbekannt	unbekannte Funktion	YDR068w DOS1	35,9/4,4	unbekannt
D	P27616	Phosphoribosyl-Amidoimidazol Succinocarboxamid-Synthase	Purin - biosynthese	PUR7 YAR015w	34,6/5,8	Acetylierung
E	P23301	Initiationfactor	unbekannte Funktion	eIF5 YEL034w	16,9/4,6	Phosphorylierung

3.3.4 Diskussion der Streßproteine

Die Detektion der Streßproteine stützt sich auf die computerdensitometrische Auswertung der 2D- Gelexpositionen der verschiedenen Streßinduktionen; für die Diskussion und Funktionsanalyse derselben wurden folgende Proteindatenbanken herangezogen:

www.expasy.ch,

www.proteome.com

www.mips.biochem.mpg.de/mips/yeast

<http://protomap.stanford.edu/Amion/Cluster>

www.domo.dk/rt

www.genome.ad.jp/dbget-bin/

www.ncbi.nlm.nih.gov:80

<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>

www.ebi.ac.uk/interpro/I

3.3.4.1 Mastergel der detektierten Streßproteine

pH 4

pH 7

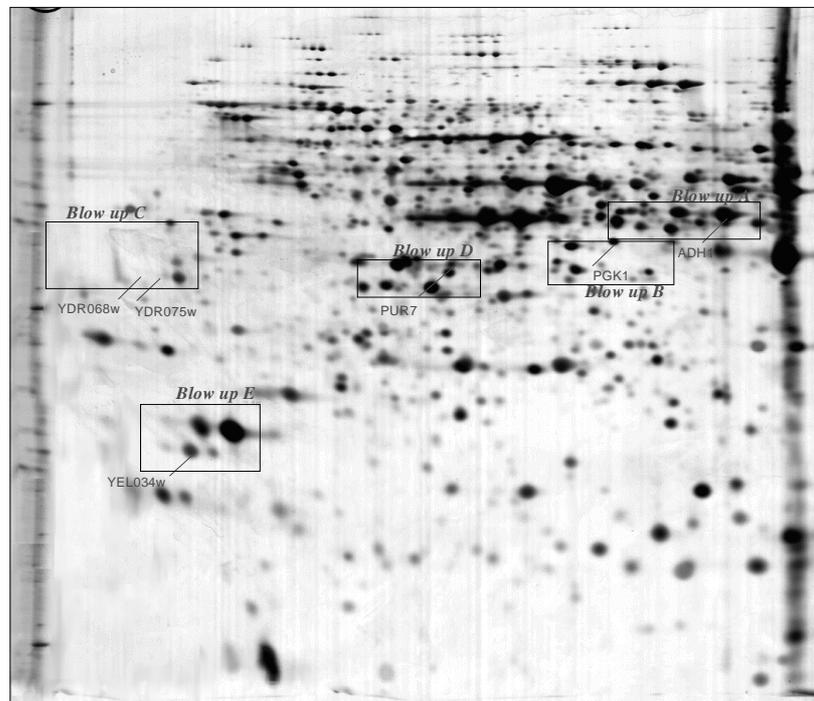


Abb. 44: Mastergel der detektierten Streßproteine;
Übersicht der gefundenen streßregulierten Proteine (blow ups
A - E) nach Induktion von Gefrieren und Lyophilisieren
Gelauswahl: *Saccharomyces boulardii* - streßinduziert
2D Elektrophorese: 1. Dim: IPG 4-7, 2.Dim: SDS - PAGE T13,

Das Mastergel der Streßproteine zeigt eine Übersicht der identifizierten Streßproteine bei der angewendeten Streßinduktion des Gefrierens und Lyophilisierens.

Es sind fünf blow ups markiert, in denen das streßregulierte Protein mit roter Farbe gekennzeichnet ist. Die Regulation dieser detektierten Proteine wird in folgenden Abbildungen in einer vergleichenden Auswertungen in Abhängigkeit zu den verschiedenen Streßinduktionen dargestellt: **Abb. 49 (blow up A)** **Abb. 53 (blow up B)**
Abb. 54 (blow up C) **Abb. 61 (blow up D)**
Abb. 63 (blow up E)

Das Mastergel ist die elektrophoretische Trennung einer streßinduzierten **cytoplasmatischen Fraktion** von *Saccharomyces boulardii*. Es sind daher nicht alle regulierten Streßproteine auf diesem Gel darstellbar.

3.3.4.2 Proteinexpression von *S. cerevisiae* nach Streßinduktion

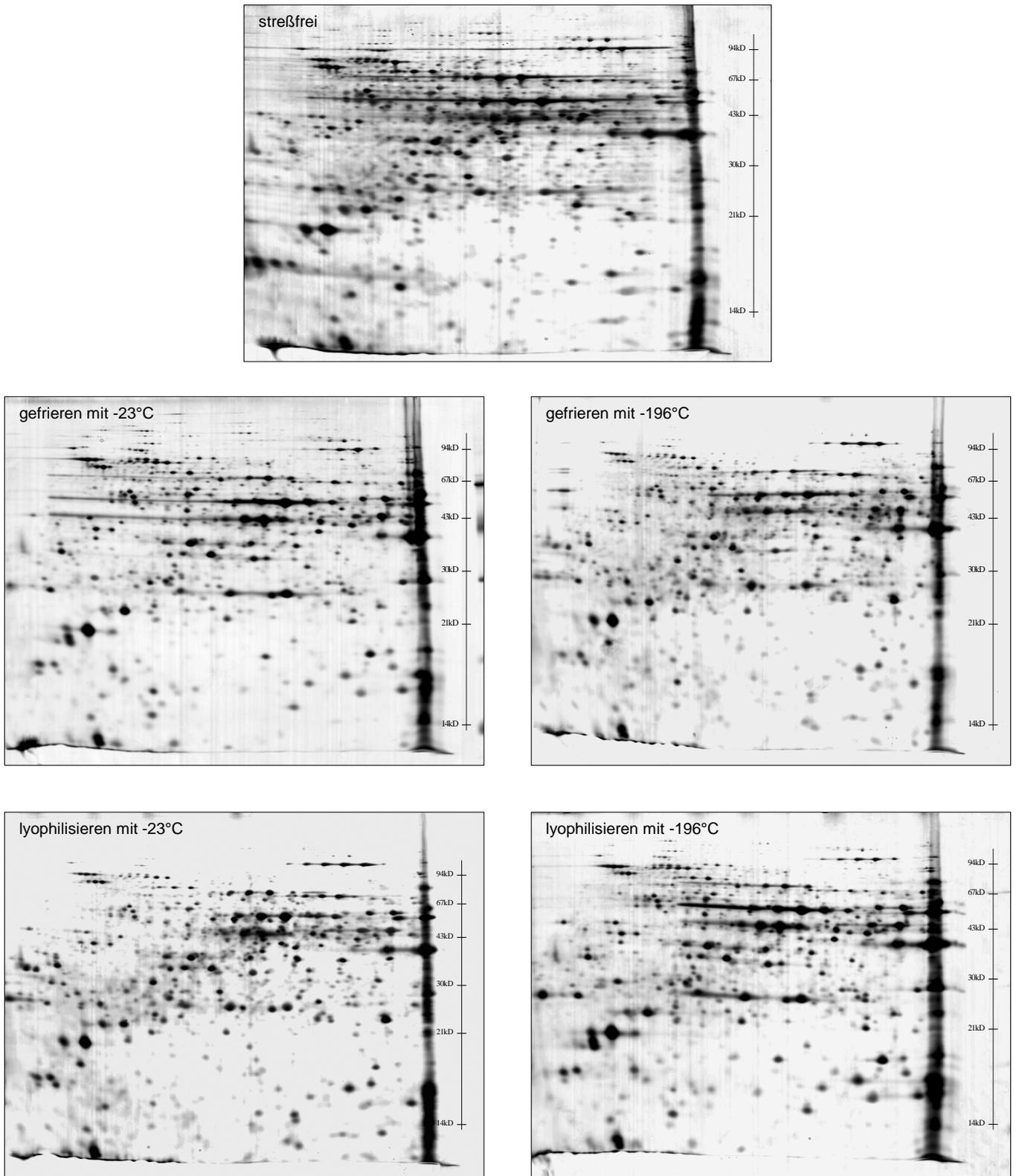


Abb. 45: Übersicht zur Proteinexpression von *Saccharomyces cerevisiae*; Vergleich von logarithmisch wachsenden und streßinduzierten Zellen.

2D - Elektrophorese: IPG 4-7; T=13%, C=2,7%

3.3.4.3 Proteinexpression von *S. boulardii* nach Streßinduktion

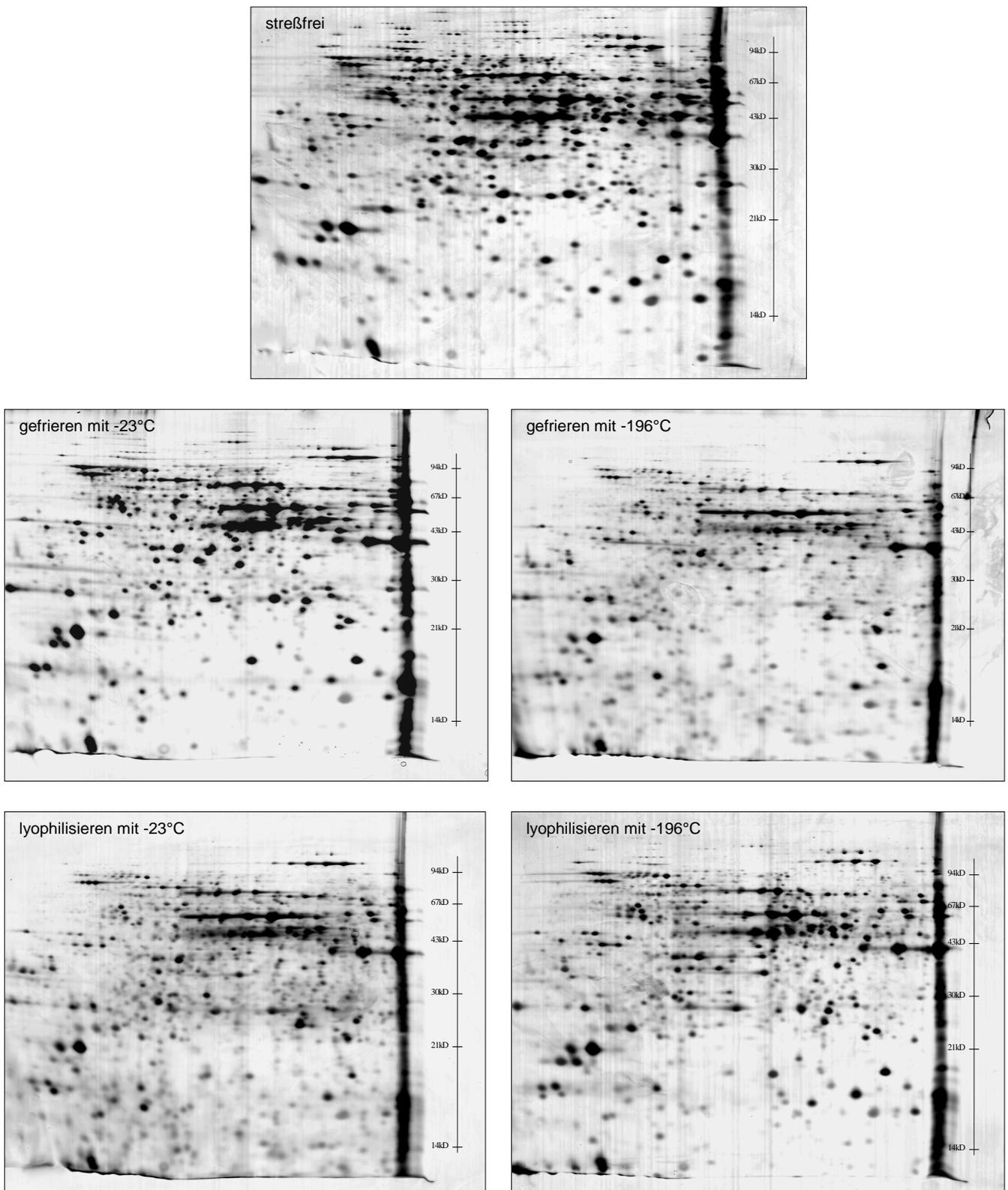


Abb. 46: Übersicht zur Proteinexpression von *Saccharomyces boulardii*; Vergleich von logarithmisch wachsenden und streßinduzierten Zellen.

2D Elektrophorese: IPG 4-7; T=13%, C=2,7%

3.3.4.4 Alkoholdehydrogenase 1 in der Hefe

Das ADH1 Genprodukt hat im nativen Zustand einen pI von 6,7 und ein Molekulargewicht von 36,7 kD. Die Identifizierung von ADH1 als streßreguliertes Protein ist in Abb. 49 (blow up A) beschrieben.

Wie man bereits an der Zuordnung einer funktionellen Beschriftung (ADH1) zu der entsprechenden systematischen Genbeschreibung (YOL086c) erkennen kann, ist eine genaue Funktion dieses Genprodukts, nämlich die der Alkoholdehydrogenase 1 bereits bekannt.

3.3.4.4.1 Kenntnisstand zu ADH1

Die Alkoholdehydrogenase 1 katalysiert die Reduktion des Nicotinamid- Adenin- Dinucleotid (NAD⁺) zum NADH bei gleichzeitiger Oxidation des Ethanols in sein Keton bzw. Aldehyd [39]:

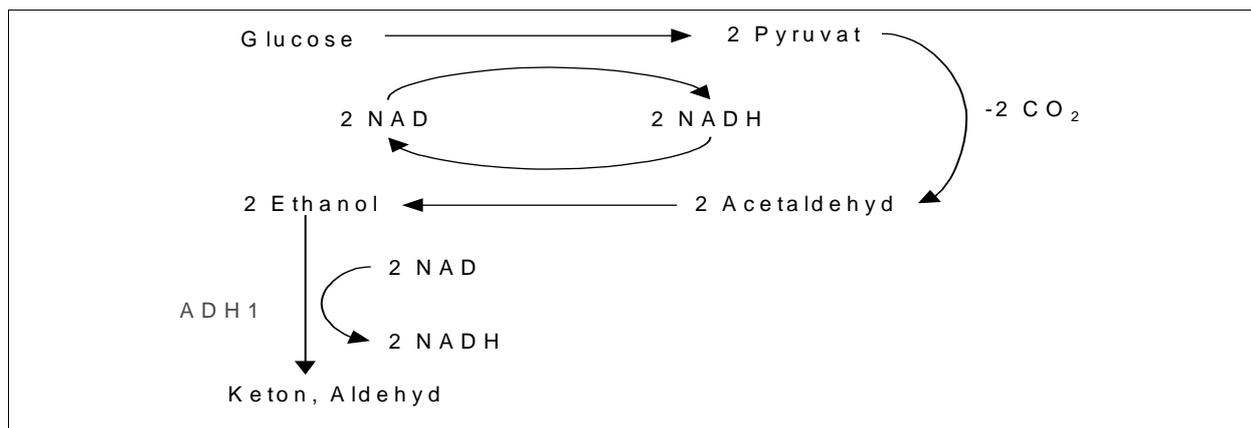


Abb. 47: Ausschnitt aus dem Kohlenstoffkreislauf in *Saccharomyces cerevisiae*: Ethanoloxidation

Dabei wird also bei intrazellulärer Erhöhung der Ethanolkonzentration durch Katalyse mit ADH1 Ethanol unter Synthese von Reduktionsäquivalenten oxidiert. Die Oxidation erfolgt durch Übertragen von Hydridionen auf das NAD⁺, wobei das energiereiche NADH entsteht, das dann beispielsweise für die oxidative Phosphorylierung in die Mitochondrien geschleust und dort für die Phosphorylierung des Adenosindiphosphats verwendet wird.

Die Reaktion des ADH1 ist im Cytosol lokalisiert und stellt einen wesentlichen Schritt im Energie- und Kohlenstoff - Stoffwechsel der Zelle dar. Weiterhin bekannt sind Tertiär- und Quartärstruktur des Enzyms, die durch Röntgenkristallographiespektrometrie von [63] dargestellt wurde Abb. 48. Wie aus der 3D Struktur ersichtlich ist, gehört ADH1 zu den seltenen Zinkproteinen.

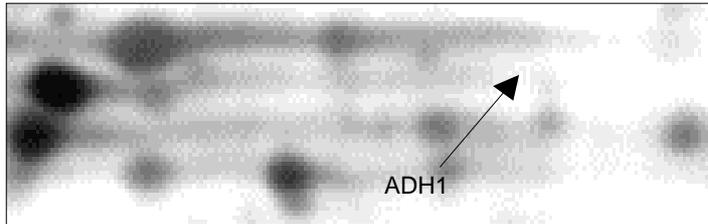


Abb. 48: 3D - Struktur der Alkoholdehydrogenase 1 (ADH1)

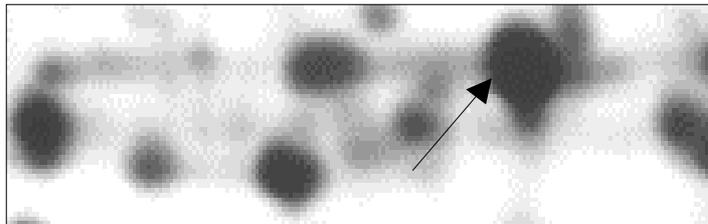
Es besitzt zwei sterische Zentren, die durch das Zink als Zentralatom konfiguriert sind. Zinkproteine bilden typische Konformationen (Zinkfinger) die hohe und sehr spezifische DNA - Bindungsaffinitäten zeigen [64]. Es sind vier weitere Alkoholdehydrogenasen bekannt (ADH2, ADH3, ADH4, ADH5), die eine ähnliche Tertiärstruktur zeigen und in dieselbe Reaktion involviert sind. Genaue funktionelle Zuordnungen der verschiedenen Alkoholdehydrogenasen innerhalb dieses Reaktionskomplexes sind bisher noch nicht gelungen. „Knock out“ Mutationen von jeweils einem der fünf Isoenzyme führen nur im Fall der ADH1 zu einer Letalität, die anderen Mutanten zeigen eine deutliche Sensibilisierung gegenüber Formaldehyd und Streßinduktionen [62, 65]. Die wichtige Frage nach der Regulation und Expressionskontrolle dieses Proteins ist nicht beantwortet.

3.3.4.4.2 Regulation von ADH1 nach Streßapplikation

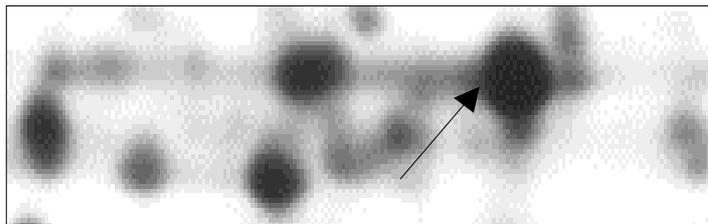
Die Auswertung des blow up A (Abb. 49) läßt eine Neuexpression von ADH1 bei der Schockinduktion des Gefrierens und Lyophilisierens mit beiden Einfriergeschwindigkeiten feststellen. Zum einen könnte eine Substratregulierung durch Ethanol am aktiven Zentrum des Enzyms oder eine Regulierung an einer allosterischen Untereinheit des Enzyms vorliegen. Beide Möglichkeiten, wenn sie sich nicht in einer pH oder Molekulargewichtsänderung darstellen, können im 2D Gel nicht erkannt werden. Die Tatsache, daß ADH1 in großen Mengen bei Streßinduktion synthetisiert wird, läßt auf eine Konzentrationserhöhung des Substrats Ethanol bei Streßapplikation schließen. Dies stimmt mit dem experimentellen Ablauf überein, da für die streßinduzierten Fraktionen die Zellen aus der aeroben Kultur geerntet werden und zu 20 mg Pellets konzentriert werden. In der Phase des Gefrierens wie auch des Lyophilisierens liegen anaerobe Bedingungen vor, in denen die Hefe Glucose nicht in der oxidativen Phosphorylierung veratmet, sondern unter Ethanolproduktion anaerob vergärt.

Blow up A Alkoholdehydrogenase ADH1 (s. Mastergel Abb.44)

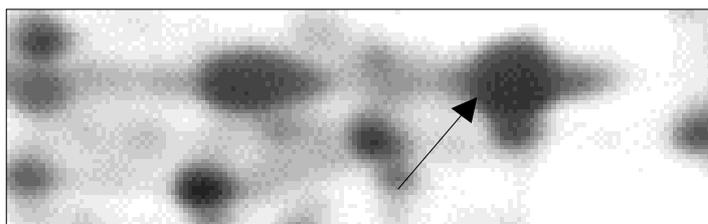
log wachsend



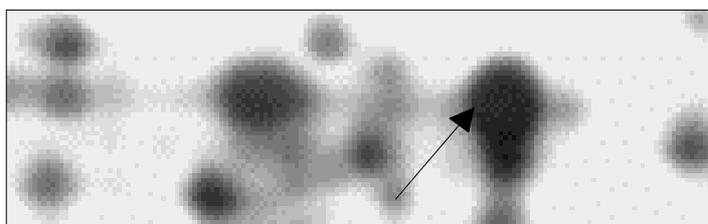
gefrieren auf -23°C



gefrieren auf -196°C



lyophilisieren mit -23°C



lyophilisieren mit -196°C

Abb. 49: Blow up **A**; Regulation der Alkoholdehydrogenase 1 (ADH1) in *Saccharomyces cerevisiae* beim Gefrieren auf -23 °C bzw. -196 °C und bei der Lyophilisierung mit Starttemperaturen von -23 °C bzw. -196 °C

Die Darstellung dieses signifikanten Zusammenhangs zwischen Streßadaption und spezifischer Proteinexpression läßt für die weitere Auswertung der Proteinregulation bezüglich der Streßinduktion des Gefrierens und Lyophilisierens neue Antworten erwarten.

Norbeck et al. [66] beschreiben, daß nach Osmostreß (Shift von 0,7 M nach 1,4 M NaCl) von *Saccharomyces cerevisiae* auch Zellen in der aeroben Kultur mit einer erhöhten ADH1-Expression reagieren.

Nimmt man diese Aussage in dieser Arbeit auf, so muß auf eine zusätzliche transkriptionische Regulierung des ADH1 bezüglich einer Streßinduktion geschlossen werden.

Ein weiterer Anhaltspunkt für die streßinduzierte Expression sind neben dem DNA - bindenden Zinkfingermotiv, das an die TATA - box des ADH1 - Operons bindende Protein TBP das auch Bindungssequenzen für typische Streßproteine enthält [67].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Expression des ADH1 bei Schockinduktion signifikant die Anpassung der aeroben Kultur unter Standardbedingungen zu anaeroben Bedingungen während der Schockinduktion dokumentiert.

Des weiteren kann auf eine regulatorische Funktion von ADH1 auf Transkriptionsebene bei Applikation von Osmoschock geschlossen werden.

In Hinblick auf die sechs identifizierten Proteine, fallen die drei Kinasen und Phosphatasen auf, die bekanntermaßen häufig regulatorische Funktionen innehaben. Es wäre denkbar, daß auch ADH1 durch die NAD bindende Domäne mit dieser allosterischen Untereinheit über Phosphatbindung regulatorisch wirkt.

3.3.4.5 Die SAICAR - Synthase

Die Hauptfunktion von ADE1 (YAR015w, PUR7, 1a48) ist bereits umfangreich beschrieben, da bei ihrer selektiven Hemmung eine Wachstumsinhibition des Organismus erwartet wird. Ihre Identifikation als streßsensitives Protein ist in Abb. 53 dargestellt.

ADE1 besitzt einen pI von 5,6 und ein Molekulargewicht von 34500 Dalton (im 2D - Gel). In der nativen Form liegt es als Monomer vor. Die bisher identifizierte Funktion ist eine Phosphoribosylamidoimidazol- succinocarboxyamidsynthase (SAICAR - Synthase) [68].

3.3.4.5.1 YAR015w - ein mono- oder multifunktionales Enzym

In der Reaktion als SAICAR - Synthase katalysiert es den siebten Schritt in der de novo Purinbiosynthese (rote Kennzeichnung):

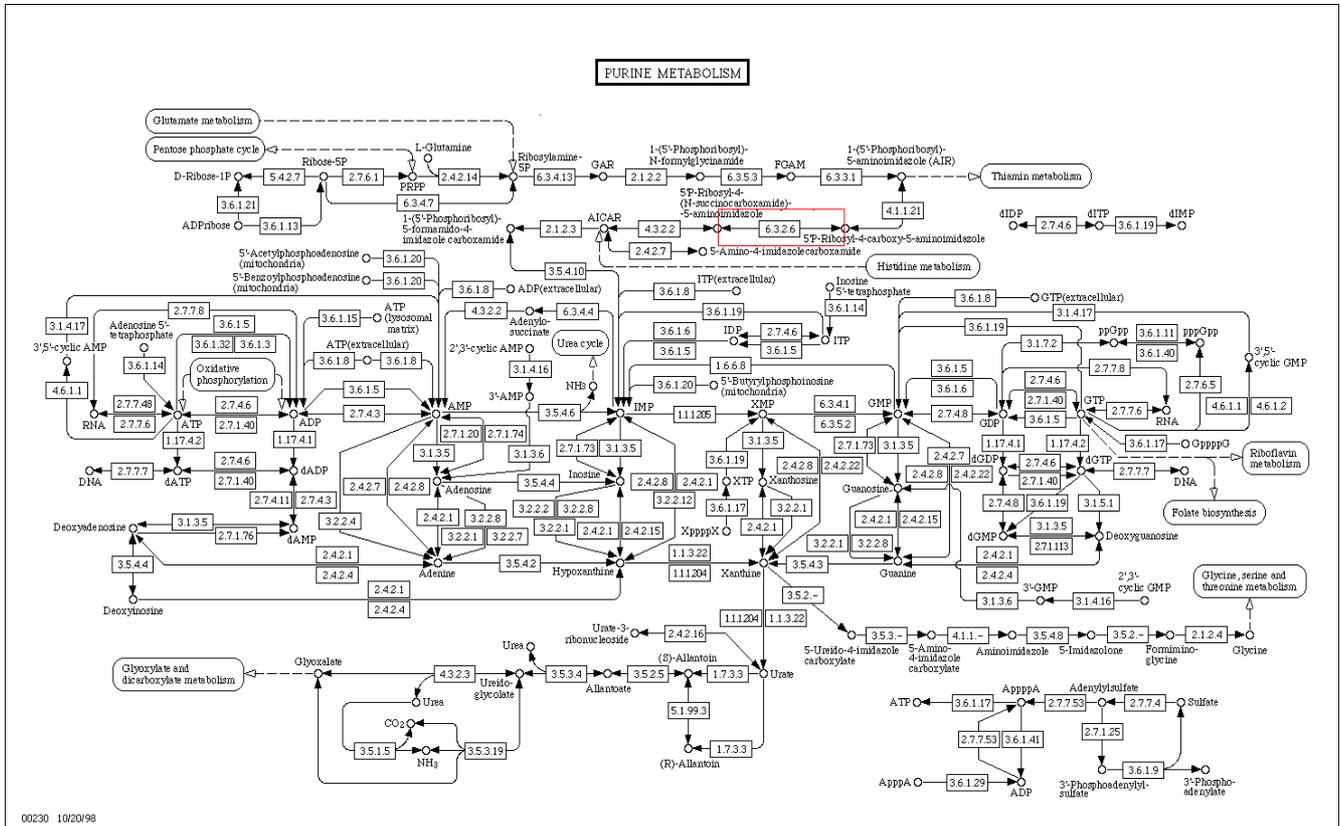


Abb. 50: Purinmetabolismus; P.6326 (rot) beschreibt die enzymatische Katalyse von P- ribosyl aminoimidazolsuccinatcarboxyamid durch die SAICAR - Synthase

Die Transkription von ADE1 wie auch von ADE17 und ADE5, 7 ist bei Oxidationsstreß und bei Zellaufzucht in YPD (Vollmedium) reduziert. Bei Aufzucht in Vollmedium liegt ADE1 in 8700 Kopien pro Zelle, bei Aufzucht in Minimalmedium (YNB) in 14000 und bei Ethanolmedium in 27000 Kopien pro Zelle vor. Die entsprechende mRNA liegt in der logarithmischen Phase in 4 Kopien pro Zelle (YPD - Medium) vor, ein ADE 1 Nullmutant ist vital [71].

Die SAICAR - Synthase ist bisher als monofunktionales Enzym, das in der Purinbiosynthese die Reaktion von ATP, L- aspartat und 1-(5-Phosphoribosyl)-5-amino-4-carboxyimidazolals nach ADP, Orthophosphat und 1-(5-Phosphoribosyl)-5-amino-4-(N-succinocarboxamid)-imidazol katalysiert, bekannt [70].

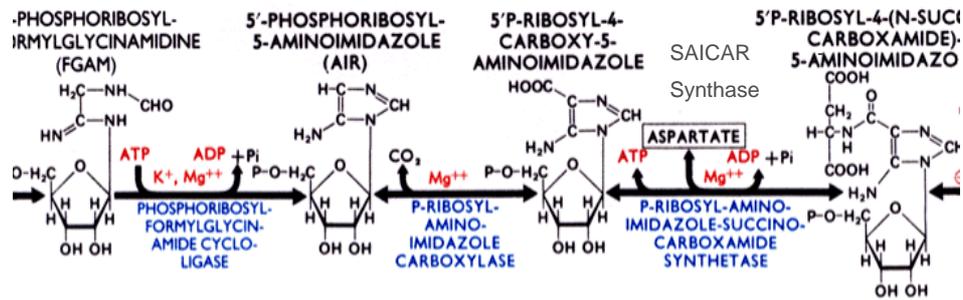


Abb. 51: Katalyse der SAICAR- Synthase (grün) in der de novo Synthese des Purins

3.3.4.5.2 Motive und Domänen von 1a48

Eine Proteindomäne kann man als eine Grundeinheit einer Proteinstruktur betrachten. Das Innere einer Domäne besteht weitgehend aus mehreren miteinander verwobenen β - Faltblätter und α - Helices.

Diese regelmäßigen Sekundärstrukturen sind begünstigt, weil sie vielfache Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Skelettatomen erlaubt. Dies ist für die Verfestigung des inneren der Domäne wesentlich, in dem Wasser für die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den polaren Carbonyl - Sauerstoffen oder Amidwasserstoffen der Peptidgruppe nicht zur Verfügung steht.

Da es nur eine begrenzte Anzahl von Möglichkeiten gibt, β - Faltblätter und α - Helices zu einer globulären Struktur zu vereinen, kommen bestimmte Kombinationen dieser Strukturelemente wiederholt im Inneren vieler auch nicht verwandter Proteine vor. Diese definierten Strukturelemente werden als Motive bezeichnet.

1998 ist es Levdikov et al. [72] gelungen, die dreidimensionale Struktur nach Kristallisation der SAICAR - Synthase zu bestimmen. Es ist somit das neben der Adenylsuccinatsynthase zweite Enzym der Purinsynthese, von welchem die 3D - Struktur bekannt ist.

Das Enzym ist ein Monomer mit drei Domänen. Die ersten beiden Domänen bestehen aus antiparallelen β - Faltblättern, die dritte Domäne besteht aus zwei α - Helices. 1a48 besitzt einen breiten Spalt zwischen den drei beschriebenen Domänen, der durch zwei Sulfationen aufgespannt ist. Nachdem man bisher von einem monofunktionalen Enzym ausgegangen war, scheint dieser Spalt zu dem

wahrscheinlichen ATP - bindenden Motive weitere "Interdomains" zu enthalten, die weitere Funktionen des Enzyms offenbaren könnten.

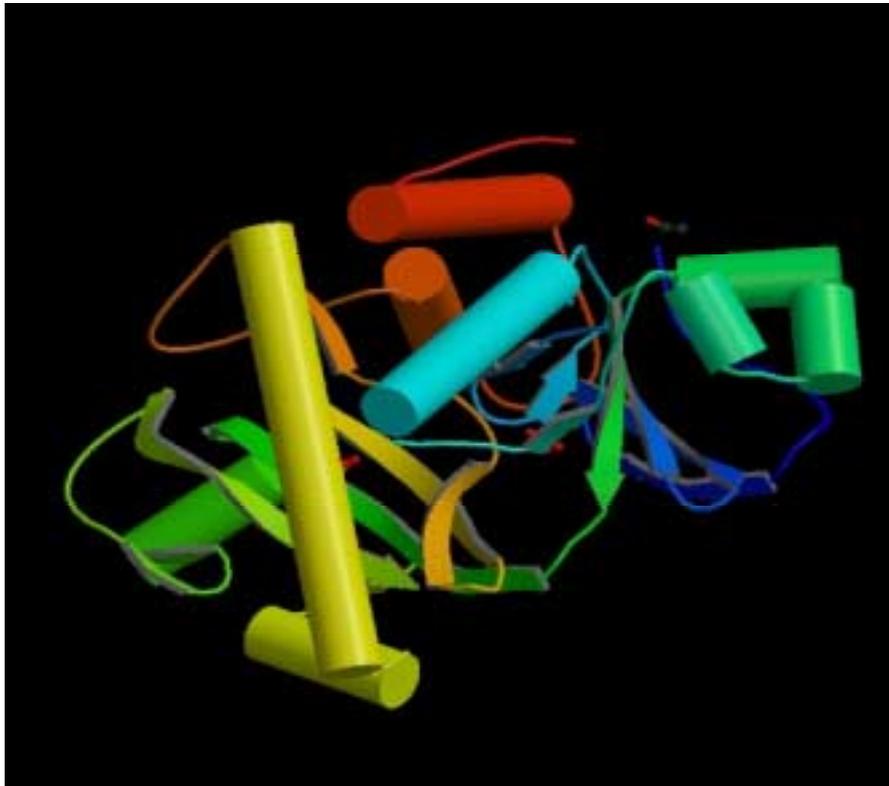


Abb. 52: 3D - Struktur von SAICAR - Synthase in *S.cerevisiae*

So ist bereits eine Phosphoribosyl - aminoimidazol-carboxylase Aktivität basierend auf einer Primärstrukturanalysen des Enzyms vermutet worden.

Codierung für die aa- Sequenzanalyse der Proteine:

A-Ala-Alanin	M-Met-Methionin
C-Cys-Cystein	N-asn-asparaginsäure
D-asp-asparaginsäure	P-Pro-Prolin
E-Glu-Glutaminsäure	Q-Glu-Glutamin
F-Phe-Phenylalanin	R-Arg-Arginin
G-Gly-Glycin	S-Ser-Serin
H-His-Histidin	T-Thr-Threonin
I-Ile-Isoleucin	V-Val-Valin
K-Lys-Lysin	W-Trp-Tryptophan
L-Leu-Leucin	Y-Tyr-Tyrosin

Primär- und Sekundärsequenz von 1a48

```

1 MSITKTELDG ILPLVARGKV RDIYVDAGT LLFVATDRIS AYDVIMENSI
  SS TT SSEE EE SS EEEEE BTTE EEEEE S E ETTEE SS

51 PEKGILLTKL SEFWFKFLSN DVRNHLVDIA PGKTIFDYLP AKLSEPKYKT
  TTHHHHHHHH HHHHHHHTTT T B B TTTTGGGGTT GGGGTHHHHH

101 QLEDRSLLVH KHKLIPLEVI VRGYITGSAW KEYVKTGTVH GLKQPQGLKE
  HHTTSEEEEE EE SEEE EESB HHHH HHHHHHSEET TEE S T

151 SQEFPEPIFT PSTKAEQGEH DENISPAQas ELVGEDLSRR VAELAVKLYS
  T B SS EE B B HHHH HHTHHHHHHH HHHHHHHHHH

201 KCKDYAKEKG IIIADTKFEF GIDEKTNEII LVDEVLT PDS SRFWNGasYK
  HHHHHHHHHT EEE EEEE E EEETTTEEE E S S TTT EEEEESTTTT

251 VGESQDSYDK QFLRDWLTAN KLNGVNGVKM PQDIVDRTRA KYIEAYETLT
  TTS TTT HHHHHHHHHT TTTT SS HHHHHHHH HHHHHHHHHH

301 GSKWSH

```

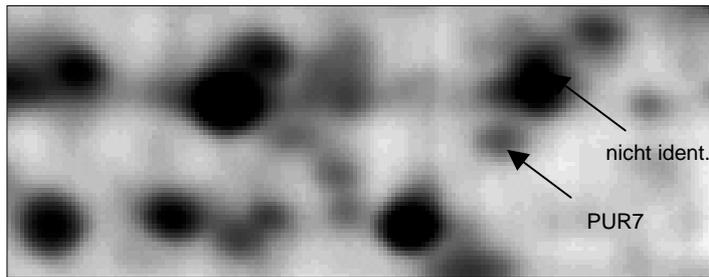
Vergleicht man die Domänen von PUR7 der Hefe mit dem äquivalenten Polypeptid anderer Organismen so fallen große Übereinstimmungen der Domänen auf. Obwohl die SAICAR - Synthase der Hefe als monofunktionales Enzym beschrieben ist, so ist dasselbe Enzym in *rattus novigicus* und *homo sapiens* als multifunktionales Polypeptid (Lyase, Ligase, Purinbiosynthese, Decarboxylase, Regulation) klassifiziert [68, 11].

3.3.4.5.3 PUR7 - Regulation nach Streßinduktion

2D - elektrophoretische Trennungen Abb. 53 ergeben, daß die PUR7 Expression im Vergleich zur logarithmisch wachsenden Kultur bei Streßinduktion von Gefrieren und Lyophilisieren mit einer Starttemperatur von -23 °C überexprimiert, bei der Induktion des Gefrierens und Lyophilisierens mit der Starttemperatur von -196 °C aber downreguliert ist. Hieraus wird deutlich, daß die Regulation der SAICAR -Synthase nicht von der Art der Streßinduktion abhängig ist; sondern von der initialen Gefriereschwindigkeit. Vergleicht man die Streßintensität der verschiedenen Gefriereschwindigkeiten, indem man die lag - Phasen der streßinduzierten Zellen auswertet (Tab.11) so stellt man fest, daß hohe Einfriereschwindigkeiten (lag -196 °C = 60 h; lag -23 °C = 10 h) in *S. cerevisiae* eine erhöhte Streßinduktion darstellen.

Das Purin wie auch das Pyrimidin bilden das Gerüst der Basen, welche in der Weise hauptsächlich für die Nucleinsäuresynthese verwendet werden, die bei der Zellteilung in erhöhten Maße benötigt wird [69, 88]. Die Downregulation dieses Enzyms wäre die logische Folge nach einer subletalen Streßinduktion, da in diesem Zustand weitere Zellteilungen nicht mehr durchgeführt werden können.

Blow up D SAICAR - Synthase (s. Mastergel Abb. 44)



streßfrei

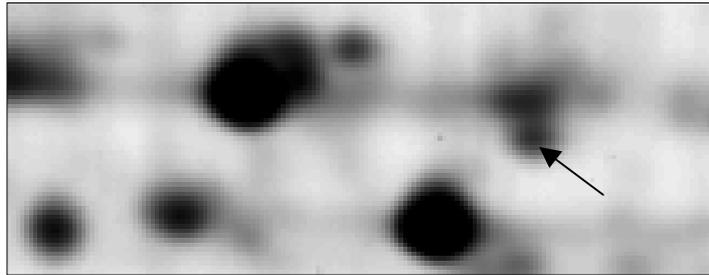
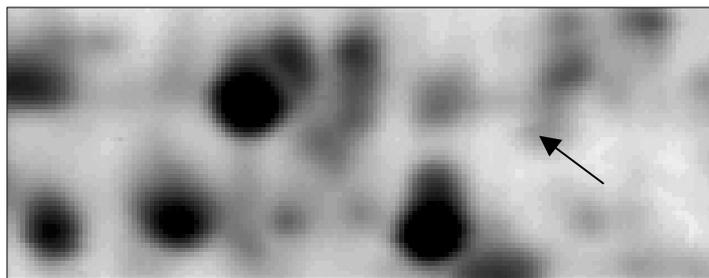
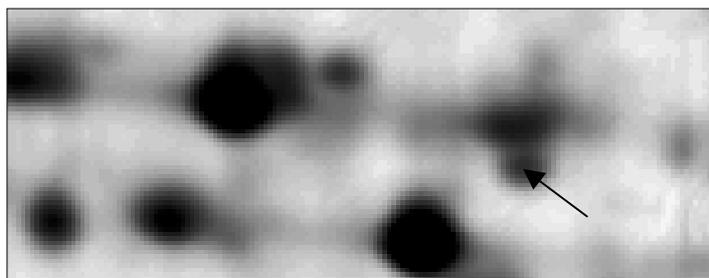
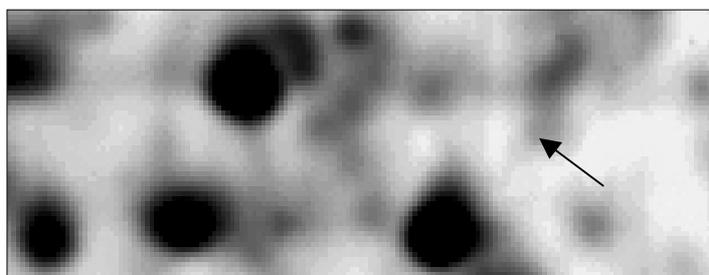
Gefrieren bei $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefrieren bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ Lyophilisieren bei $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ Lyophilisieren bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$

Abb. 53: PUR7 Blow up D; Regulation der SAICAR - Synthase nach Streßinduktion von Gefrieren und Lyophilisieren mit Starttemperaturen von $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die Überexpression von PUR7 bei niedrigen Gefriereschwindigkeiten ist ein weiteres Indiz für eine zusätzliche regulatorische Funktion von PUR7 im Zusammenhang mit dem Stressmanagement der Zelle.

Führt man sich vor Augen, daß Purin aber nicht nur für die Synthese von DNA und RNA benötigt wird, sondern zum Beispiel im cyclischen AMP (Signalmolekül), im ATP (Energieträger) oder als Bindungspartner mit anderen Enzymen für eine Coenzymbildung fungiert, so muß angenommen werden, daß PUR7 auch in der Hefe nicht nur die SAICAR - Reaktion katalysiert [71].

Argumente für eine Multifunktionalität von PUR7 (zusammenfassend):

- Interdomains mit bisher ungeklärten Bindungsmotiven
- Purinbiosynthese ist neben der Nucleisäuresynthese an die cAMP-, ATP- und Coenzymbildung gekoppelt
- nachgewiesene Multifunktionalität des homologen Enzyms höherer Eukaryonten
- Overexpression bei $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$, Downregulation bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefriereschwindigkeit

Durch die bereits nachgewiesene ATP bindende Domäne und der Möglichkeit der direkten Kontrolle der Purinsynthese, ist hier mit dem PUR 7 Genprodukt eine zentrale Regulation des ATP - Haushaltes und einer stresspezifischen Signalmolekülbildung der Zelle gegeben.

3.3.4.6 YDR068w - ein Genprodukt mit bisher unbekannter Funktion

YDR068 (DOS1, P64858) ist ein Protein mit bisher unbekannter Funktion. Es hat einen theoretischen pI 4,4 und ein Molekulargewicht von 35,9 kD. Ein YDR068 Nullmutant ist vital [73]. Die Auswertung der 2D - elektrophoretischen Trennung dieses Proteins ist in Abbildung 54 dargestellt.

3.3.4.6.1 Analyse und Crossmatching auffälliger Domänen

Die Proteinprimärsequenz ergibt sich wie folgt:

```

10          20          30          40          50          60
MEFFYEEQVA | CIEDDKISNS | HTKETGSTEN | TENNELQSRD | DKTNEAFQKL | EEEV NKRYEK
          70          80          90          100          110          120
TTSAFKKLVI | EKDDGIEINL | PISNETTETA | QKYLKLLDEN | IHSVESLAQS | YWSKMKTKNF

```

```

      130      140      150      160      170      180
      |      |      |      |      |      |
WSGFSSFDNA AENDSNDKDE NSKENEIAVG GNRTEAELRT LSKDKSVYLD NKMDLQLDPF

      190      200      210      220      230      240
      |      |      |      |      |      |
DVDEKTEEIC SILQGDKDIS KLMNDIVPHK ISYKDFWHIY FLQRNKILDK ESKRKEILSK

      250      260      270      280      290      300
      |      |      |      |      |      |
KEKETEEKEV EWDDEEEEEED DDKVEAVADN KSKGETKVAV SQEGLKDVSD HVGLANKDES

      310
      |
KDDDDDDDDWE

```

Es sind zwei Domänen auffällig, eine aus fünf Aminosäuren (AS) bestehende Polyglu Sequenz (255 - 259) und eine aus sieben AS bestehende Polyasp Sequenz. Beide Domänen konnten bisher keinem bestimmten Bindungsmotiv zugeordnet werden. Durch Crossmatchen konnte eine Homologie (32% Übereinstimmung) zu dem Protein FLJ10276 (homo sapiens) gefunden werden [11].

ORIGIN homo sapiens

1 maegedvgww rswlqqsyqa vkeksseale fmkrdlteft qvvqhdtact iastasvke

61 klategssga tekmmkglsd flgvisdtfa pspdktidcd vitlmgtpsg taepydgtka

121 rlyslqsdpa tycnepdgpp elfdawlsqf cleekkgeis ellvgpsir alytkmvpas

181 vshsefwhry fykvhqleqe qarrdalkqr aeqsiseepg weeeeeelmg ispispkeak

241 vpvakistfp egepgqspc eenlvtsvep paevtpeess esislvtqia npatapearv

301 lpkdlsqkll easleeqgla vdvgetgpcsp pihspltpa ghtggpeprp parvetlree

361 aptdlrvfel nsdsgkstps nngkksstd isedwekdfd ldmtееevqm alskvdasge

421 ledvewedwe

Die Funktion des im Cytoplasma lokalisierte Protein des Menschen ist ebenfalls nicht bekannt. Es ist 111 AS länger und zeigt eine ähnliche Domäne bestehend aus akkumulierenden Glutaminsäuren im (221- 227AS) wie YDR068w in *S. cerevisiae*.

Crossmatching von *S. cerevisiae* (Sc) mit *homo sapiens* (Hs):

Identities = 35/111 (32%) Similarities = 61/111 (55%) Gaps = 7/111 (6%)

Sc 154 TEAELRTLKDKSVYLDNK-----

Hs 118 TEA L+L D+ Y+ D L F++EK EI +L G I L +V

Sc 173 MDLQLDPFDVDEKTEEICSLQGDKDISKLMNDIV

Hs 207 F++ EK EI +L G I L +V

Sc 208 PHKISYKDFWHIYFLQRNKILDKESKRKEILSKKEKETEEKEVEWDDEEEEE

Hs 178 P +S+ +FWHYF+++ L++ E R++ L++ +++ +EW++ EEEE

3.3.4.6.2 YDR068w- "involved in osmostreß response lyophilisation"

In den blow ups der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Abb. 54) ist eine Neuexpression der YDR068w bei Lyophilisierung zu erkennen. Bei den Induktionen des Gefrierens oder aber in der streßfreien Fraktion ist dieses Protein nicht exprimiert.

Dieses Ergebnis bestätigt zum einen die erfolgreiche Optimierung der subletalen Streßinduktion, da genügend Zellen auch bei der zweiten Streßinduktion (Lyophilisierung) vital waren, um derart intensiv (s. Spotquantitäten in Abb. 54) auf die Streßinduktion zu antworten. Es ist hiermit gezeigt, daß die Streßantwort der Zelle bzgl. der Osmostreß Gefrieren und Gefriertrocknen nicht identisch sind.

Dem Protein YDR068w (DOS1, DOS2, P54858) kann somit eine erste funktionale Beschreibung gegeben werden:

YDR068w: involved in osmostreß response of lyophilisation

Blow up C von YDR075w und YDR068w (s. Mastergel Abb.44)

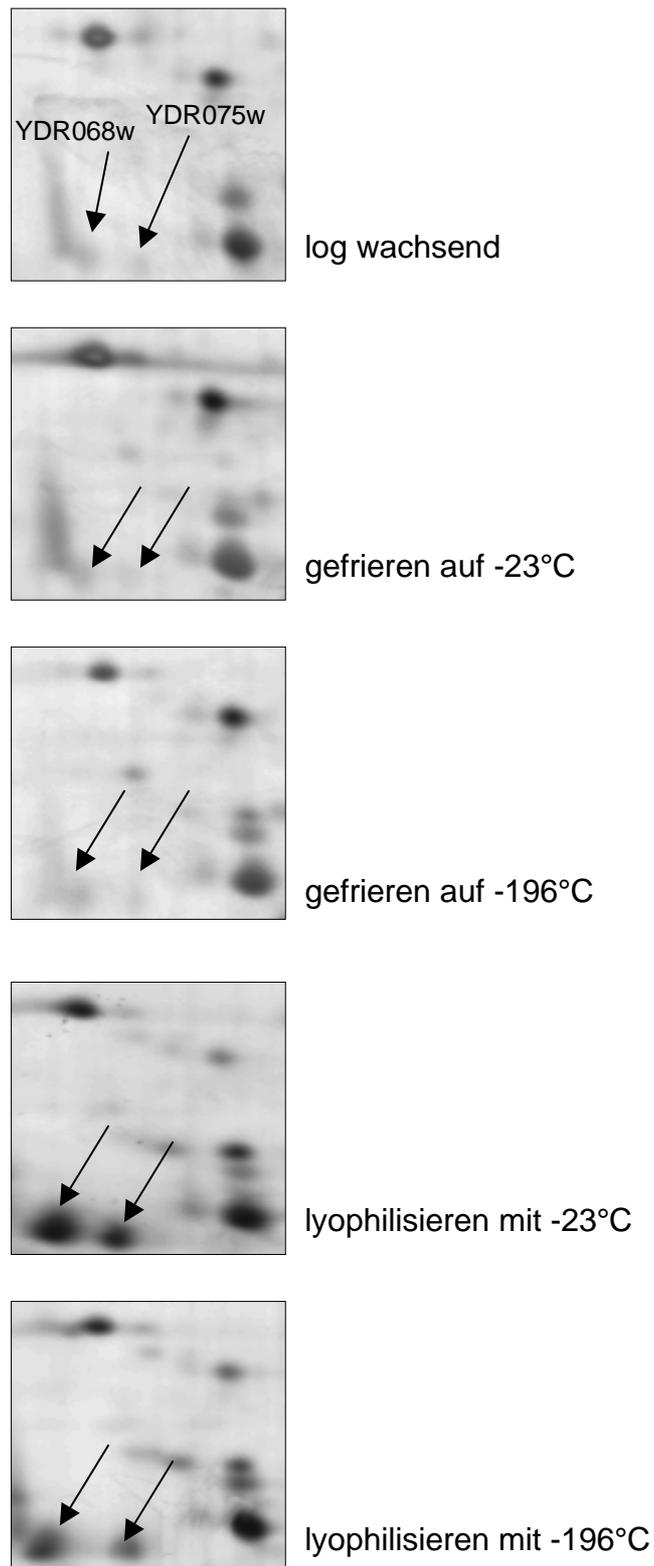


Abb. 54: Blow up C; Proteinexpression von YDR068w und YDR075w in logarithmisch wachsenden und streßinduzierten Zellen

3.3.4.7 YDR075w - eine Serin / Threonin Phosphatase

YDR075w codiert für eine Serin / Threonin Phosphatase (S / T Phosphatase). Der pI von 4,9 und das Molekulargewicht von 35,2 kD im nativen Zustand sind bekannt. Das entsprechende Gen in *S. cerevisiae* befindet sich auf dem IV. Chromosom im rechten Arm an der 75. Position (vom Centromer aus) im Watson - Strand [7]. YDR075w ist in Abb. 54 dargestellt.

3.3.4.7.1 cAMP Regulation von YDR075w nach Lyophilisierung

Phosphatasen sind Enzyme, die eine kovalent gebundene Phosphatgruppe von einem organischen Molekül entfernen. Sie sind somit der Antagonisten zu den Kinasen, welche Proteine wie auch andere organische Moleküle der Zelle phosphorylieren (s. 3.3.4.7). Es sind bis heute vier Familien der S/T- Phosphatasen bekannt, die Proteinphosphatase I, IIA, IIB und IIC. Die Zuordnung von YDR075w zu einer dieser Familien ist noch nicht eindeutig geklärt. Bis auf IIC, welche relativ selten vorkommt und zu den anderen drei S/T Phosphatasen nicht verwandt ist, besitzen alle drei Familien eine homologe katalytische Untereinheit, die mit mindestens einer weiteren regulatorischen Untereinheit verbunden ist [75]. Die S/T - Phosphatasen I ist bei der Antwort auf cAMP von großer Bedeutung, Phosphatase IIA hat ein sehr breites Wirkungsspektrum und ist wahrscheinlich hauptsächlich dafür verantwortlich, viele der durch Serin / Threoninkinasen katalysierten Phosphorylierungen rückgängig zu machen; sie ist zudem maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. S/T- Phosphatase IIB wird durch Calciumionen aktiviert und kommt z.B. als Calcineurin bei höheren Eukaryonten im Gehirn besonders häufig vor. Phosphatasen sind multifunktionelle Enzyme, die auch familienübergreifende Funktionen besitzen können [77].

Im folgenden wird der S/T Phosphatase YDR075w eine regulatorische Funktion unterstellt, da diese in logarithmisch wachsenden Zellen nicht, und nach Streßinduktion nur in geringer Kopienzahl exprimiert wird (s. Abb. 54).

Enzyme der S/T Phosphatasefamilie I sind wie oben bereits erwähnt, fast ausschließlich in die intrazelluläre Regulationen durch die Steuerung des indirekten Auf- bzw. Abbau von cAMP im Zusammenspiel mit der entsprechenden Kinasen involviert [74].

cAMP wurde 1959 als intrazellulärer Mediator hormoneller Vorgänge identifiziert. Seither konnte es in allen untersuchten pro- und eukaryontischen Zellen als

intrazelluläres Signalmolekül nachgewiesen werden. Für die direkte Regulation der cAMP - Konzentration ist die Adenylylcyclase und eine cAMP - Phosphodiesterase verantwortlich.

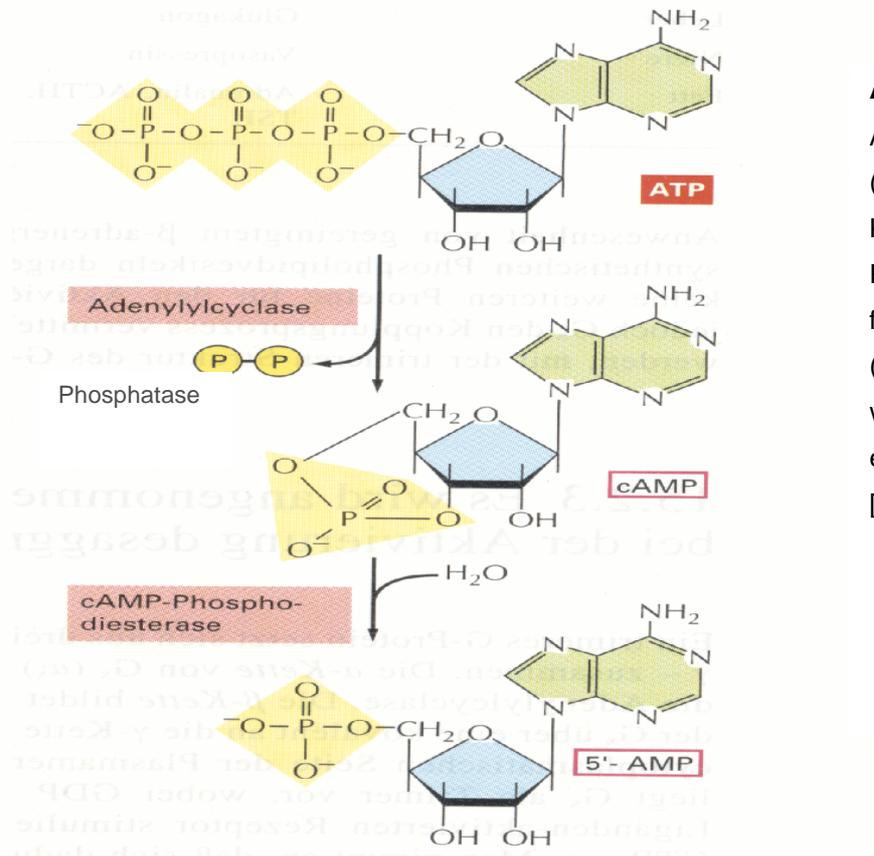


Abb. 55: Synthese und Abbau von cyclischem AMP (cAMP). Durch die Katalyse einer S/T Pyrophosphatase, die das freiwerdende Pyrophosphat (P-P) hydrolytisch spaltet wird die cAMP Synthese zu einem irreversiblen Prozeß [77].

Eine Erhöhung der cAMP Konzentration führt in der Regel zu einer Aktivierung der Transkription spezifischer Gene. Am Beispiel der Sezernierung des Peptidhormones Somatostantin höherer Eukaryontenzellen, ist gezeigt worden, daß cAMP das für dieses Hormon codierende Gen einschaltet. Die Regulator - Region des Somatostantin - Gens enthält eine kurze DNA - Sequenz (CRE, *cAMP response element*), die auch in der Regulator - Region anderer cAMP- abhängiger Gene nachgewiesen wurden. Sie wird von einem einzigen spezifischen Regulatorprotein, dem CRE - binding protein (CREB), erkannt. Wenn in diesem Fall eine bestimmte Kinase einen einzigen Serinrest von CREB phosphoryliert, wird CREB aktiviert und fördert die Transkription der betreffenden Gene; die Phosphorylierung stimuliert also die transkriptionsfördernde Aktivität von CREB, ohne seine DNA bindende Eigenschaft zu beeinträchtigen. Wird der betreffende Serinrest mutiert, so ist CREB

inaktiv und es erfolgt bei einem cAMP Anstieg nicht mehr die entsprechende Genexpression [77].

Durch die selektive Expression von YDR075w bei Lyophilisierung (siehe 2D blow up C, Abb. 54) liegt die Vermutung nahe, daß diese Serin / Threonin Phosphatase ein Aktivierung von steßspezifischen Transkriptionsfaktoren durch Dephosphorylierung induziert.

3.3.4.7.2 Streßadaption von S / T Phosphatasen in höheren Eukaryonten

Ein bereits gut untersuchter Regelkreis ist der Calcium (II) Ionen stimulierte Prozeß der Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung bei höheren Eukaryonten. Hier wirken die Ca^{2+} / Calmodulin- abhängigen S/T - Proteinkinase / Phosphatase (CaM - Kinasen / Phosphatasen) indirekt auf die Ausschüttung von Catecholamine wie Dopamin, Noradrenalin oder Adrenalin. Bei höheren Eukaryonten sind Induktionen für die Ausschüttung der Catecholamine Angst oder Streßsituationen, Signalüberträger sind in der Regel Nervenzellen, Effektoren sind Muskelzellen [77].

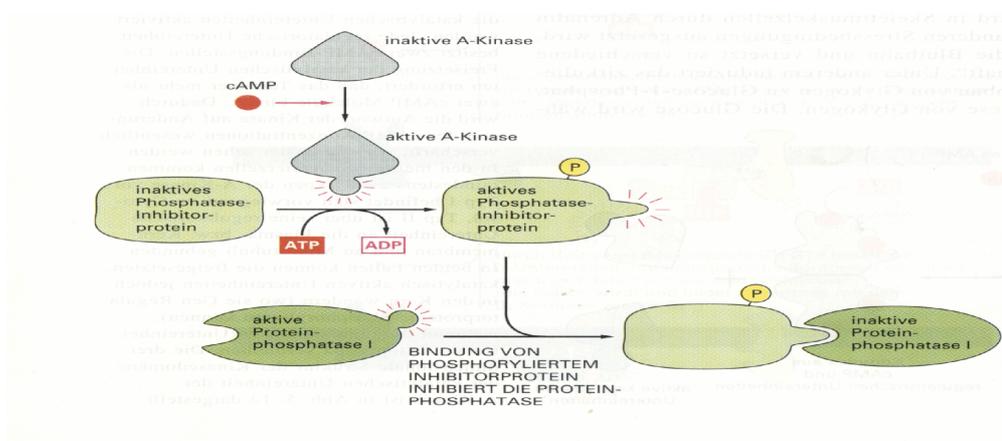


Abb.56: Interaktion von cAMP und einer Phosphatase 1 am Beispiel der Regulierung des Glycogenstoffwechsels höherer Eukaryonten cAMP S / T Proteinphosphatase 1

Die Aktivität jedes Proteins, das über Phosphorylierung reguliert wird, hängt zu jedem Zeitpunkt vom Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen ab. Eine Phosphatase 1 entfernt beispielsweise den aktivierenden Phosphatrest von CREB, wodurch dessen - durch einen cAMP - Anstieg hervorgerufene-transkriptionsaktivierende Wirkung ausgestellt wird. In Skelettmuskelzellen höherer Eukaryonten dephosphoryliert die Phosphatase 1 alle drei Schlüsselenzyme des Glycogenstoffwechsels, die in ihrer phosphorylierten, aktiven Form den Abbau von

Glycogen fördern und im Zusammenspiel mit Calcium(II) zu einer Adrenalinausschüttung bei Streß- oder Angstzuständen führen kann. Obwohl in niederen Eukaryonten wie Hefen keine Adrenalinsynthese zu erwarten ist, liegt der Schluß nahe, daß analog zu höherer Eukaryonten die S/T - Phosphatase YDR075w in *S. cerevisiae* auch eine streßregulierende Funktion inne hat [77].

3.3.4.8 Die Proteinkinase PGK1

Für die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1, P00560, YCR012w, YCR12w) sind bereits mehrere Funktionen bekannt; eine wesentliche Funktion ist deren Katalyse des zweiten Schrittes der Glycolyse. Die 2D - elektrophoretische Trennung von PGK1 und ihre Identifizierung als Streßprotein ist in Abb. 61 dargestellt. Homologe sind in allen lebenden Organismen exprimiert, wesentliche Domänen (zwei 6-stranded parallele β - Faltblätter, umgeben von mehreren α - Helices) sind während der Evolution dieses Proteins artenübergreifend erhalten geblieben. Das native Protein hat einen pI von 4,8 und ein Molekulargewicht von 44,6 kD. Mutationen im PGK - Gen kann bei höheren Eukaryonten zu chronischen Krankheiten wie Anämien oder Rhabdomyosen führen [80].

3.3.4.8.1 PGK1 - Kenntnisstand

Die Phosphoglyceratkinase 1 katalysiert den zweiten Schritt in der Glycolyse, die reversible Konversion von 1,3 Diphospho-D-glycerat und ADP zu 3-Phospho-D-glycerat und ATP. Dieser Reaktionsschritt stellt einen wesentlichen Schritt in der Generation von ATP für die Zelle dar. Das Enzym ist ein Monomer, das sich mit zwei fast äquivalenten Domänen, die mit den C- und N terminalen Resten von PGK1 interagieren, darstellt. Die rot markierte Sequenz zeigt die Interdomäne von PGK1 [77].

Die AS - Primärsequenz besteht aus 415 Aminosäuren;

SQ SEQUENCE 415 AS; 44607 MW; 9E4E591546A82F40 CRC64;

```
SLSSKLSVQD LDLKDKRVFI RVDFNVPLDG KKITSNQRIV asLPTIKYVL
EHHPRYVVLA SHLGRPNGER NEKYS LAPVA KELOSLIGKD VTFLNDCVGP
EVEasVKasA PGSVILLENL RYHIEEEGSR KVDGQKVKas KEDVQKFRHE
LSSLADVYIN DAFGTAHRAH SSMVGF DLPQ RasGF LLEKE LKYFGKALEN
PTRPFLAILG GAKVADKIQL IDNLLDKVDS IIGGGMAFT FKKVLENTEI
GDSIFDKAGA EIVPKLMEKA KAKGVEVVLP VDFIADAFS ADANTKTVTD
KEGIPAGWQG LDNGPESRKL FasTVAKAKT IVWNGPPGVF EFEKFasGTK
ALLDEVVKSS asGNTVIIGG GDTATVAKKY GVTDKISHVS TGGGasLELL
```

EGKELPGVAF LSEKK

Proteinkinasen, die in eukaryontischen Zellen Proteine phosphorylieren, sind Antagonisten zu den Proteinphosphatasen, die Proteine dephosphorylieren. Sie gehören zu einer großen Enzymfamilie, die alle eine ähnliche 250 AS lange Domäne besitzen. Vergleicht man die Anzahl der Unterschiede in der Aminosäuresequenz der verschiedenen Kinasen, so läßt sich ein phylogenetischer Stammbaum ableiten, der mit großer Sicherheit das Muster von Genduplikationen und Mutationen des entsprechenden "Urgens" darstellt. Ein solcher Stammbaum zur Evolution der Proteinkinasen ist in der folgender Abbildung dargestellt.

Es ist auffallend, wie vielfältig Proteinkinasen in ihrer Funktion sein können; beginnend von zellulärer Signalübertragung, intrazelluläre Signalverstärkung, Zellzykluskontrolle oder auch transmembraner Signalübertragung.

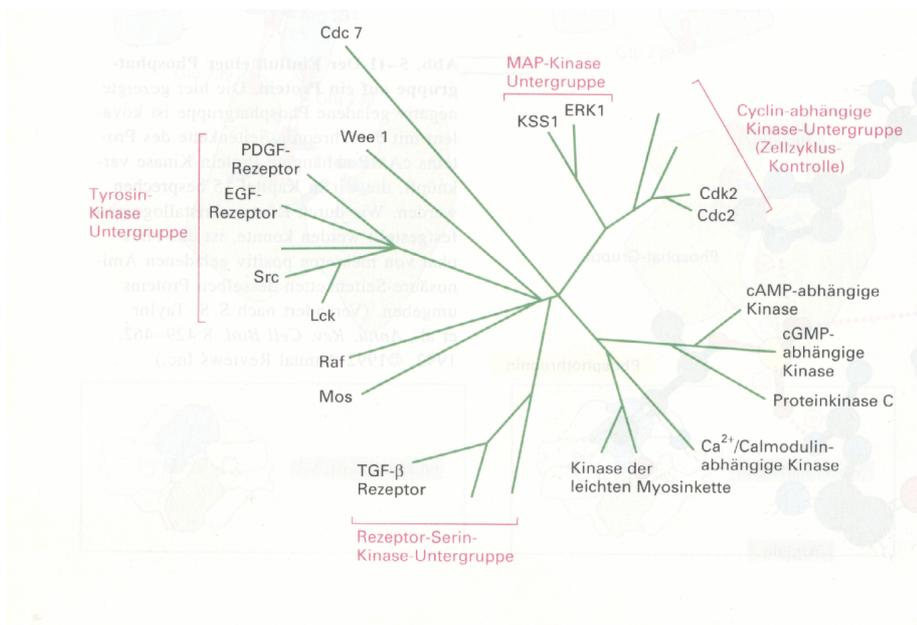


Abb. 57: Übersicht über die phylogenetische Entwicklung der Kinasen. Die Funktionsvielfalt der Kinasen reicht von zellulärer Signalübertragung, intrazelluläre Signalverstärkung bis zur Zellzykluskontrolle oder auch transmembraner Signalübertragung [77].

Die wesentliche Reaktion, die von einer Proteinkinase katalysiert wird, ist in Abb. 57 dargestellt. Eine Phosphatgruppe wird von einem ATP - Molekül zur Hydroxylgruppe einer Serin- oder Tyrosinseitenkette eines Proteins übertragen. Diese Reaktion ist wegen des hohen Betrages an abgegebener freier Energie (Spaltung der Phosphat - Phosphatbindung des ATP) nicht unmittelbar umkehrbar. Dennoch können Phosphorylierungen, die von Proteinkinasen katalysiert wurden aufgehoben werden. Protein - Phosphatasen können selektiv oder auch relativ unspezifisch Phosphatgruppen von Proteinen wieder entfernen [77].

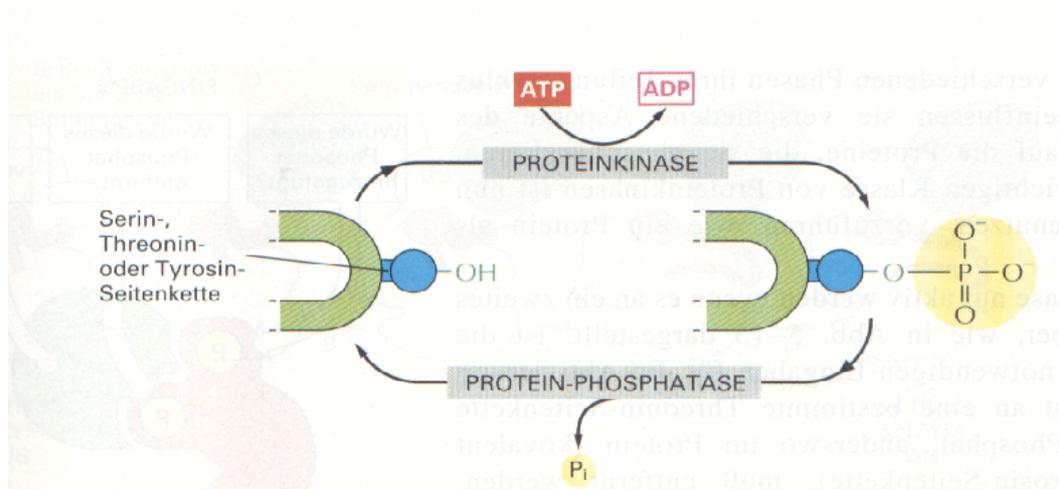


Abb. 58: Interaktion von S/T Proteinkinasen und Proteinphosphatasen am Beispiel der Phosphorylierung einer Serin, Threonin oder Tyrosin - Seitenkette des Proteins [77].

Das Ausmaß der Phosphorylierung in der Zelle zum Zwecke des Energiegewinnung oder der Signaltransduktion hängt von der relativen Aktivität der Kinasen und Phosphatasen zu dem entsprechenden Zeitpunkt ab.

Proteinkinasen werden heute auch als der Mikrochip der Zelle bezeichnet; dabei versucht man der Aktionsgeschwindigkeit, der Funktionsvielfalt und dem Speichervermögen dieser Biomoleküle Rechnung zu tragen .

3.3.4.8.2 Bindungsmotive für Streßadaptionen in PGK1

PGK1 setzt sich aus zwei Domänen und einer Interdomäne zusammen. Die erste Domäne streckt sich vom Serin bis zum Leucin (186AS), die folgende Interdomäne ist sechs AS lang (schwarz), die zweite Domäne reicht vom Leucin bis zum Alanin (207AS, blau). Beide Domänen zeigen große Übereinstimmung in der Primärsequenz; Bindungsmotive der Interdomäne wie auch des Restfragments (Glycin - Arginin 12 AS) sind nicht bekannt. Die Phosphoglyceratkinase zeigt neun verschiedene Bindungsmotive (ausgeschlossen der Interdomäne und des Restfragments) von denen die Motive 1 - 4 in der N - terminalen Domäne, das fünfte teilweise in die Interdomäne , und die Motive 6 - 9 in der C - terminalen Domäne lokalisiert sind. Das Motiv sieben beinhaltet die substratbindende Region (1,3 Diphosphoglycerat), das Motiv drei die Phosphatbindungsschleife. Die Zuordnung der anderen Motive ist bisher noch widersprüchlich [82].

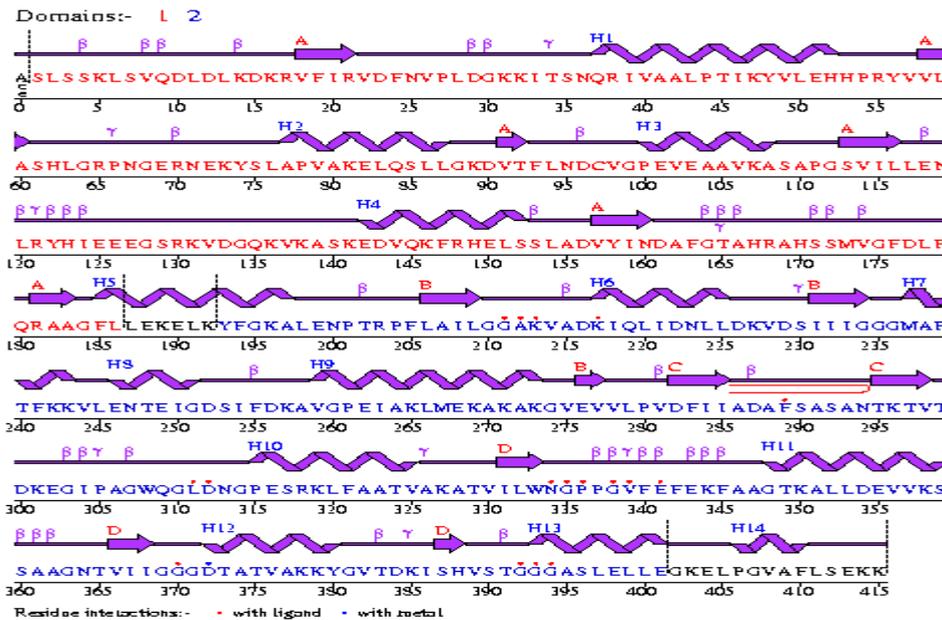


Abb. 59: Primär- und Sekundärstruktur von PGK1; die erste Domäne geht von der 2. bis 186 as, die zweite Domäne erstreckt sich von der 193 bis zur 401as [82].

Die Sekundärstruktur in der 3D - Graphik (Abb. 60) zeigt die Phosphatbindung des ATP (schwarz), die Substratbindung (rot) und ein Magnesium (II)- ion (grün) das die C- und N- terminale Domäne der Kinase aufspannt. Die Motive ergeben sich zu 14 Helices und 11 Strands, wobei die n - terminale Domäne zwei parallele β - Faltblätter aufweist, in denen sechs Strands liegen [79].

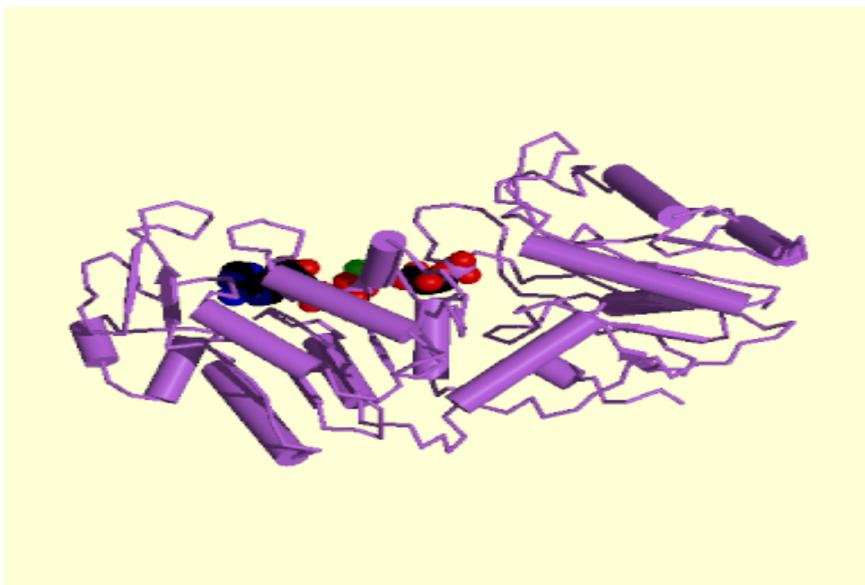
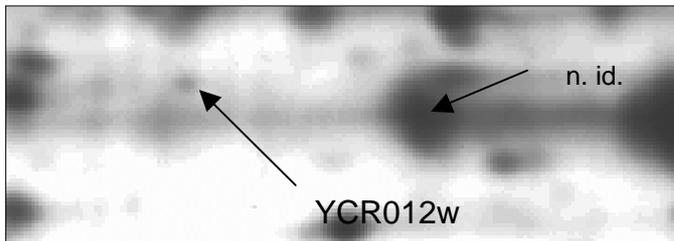


Abb. 60: Röntgenkristallographische Aufnahme der nativen Phosphoglyceratkinase; [79].

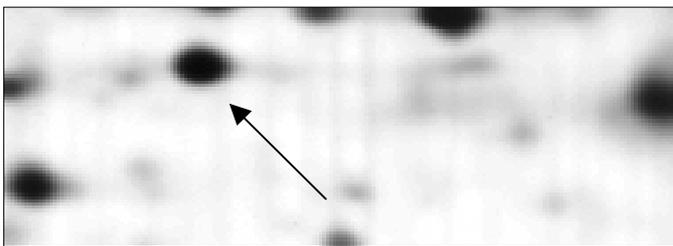
- schwarz: ATP - Bindung;
- rot: 1,3 Diphosphoglycerat,
- grün: Magnesium (II) ion;

3.3.4.8.3 Streßinduzierte PGK 1 - Regulation

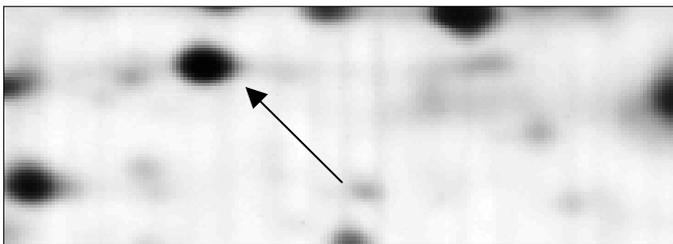
Blow up B von PGK1 (s. Mastergel Abb.44)



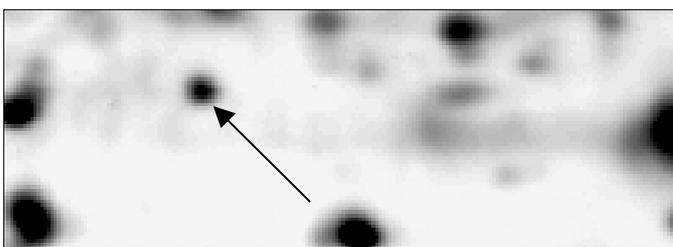
streßfrei



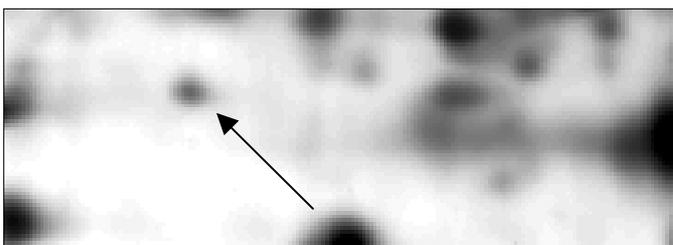
gefrieren auf $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$



gefrieren auf $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$



lyophilisieren mit $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$



lyophilisieren mit $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$

Abb. 61: Blow up B; Regulation der Phosphoglyceratkinase PGK1 nach Sreßinduktion des Gefrierens und Lyophilisierens mit verschiedenen Einfriergeschwindigkeiten

Die Blow ups (Abb. 61) zeigen im Vergleich zur streßfreien Kultur eine deutliche up - Regulation von PGK1 nach dem Gefrieren der Zellen. Diese Up - Regulation ist sowohl bei einer Einfriertemperatur bis $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ als auch bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefriertemperatur erkennbar. Bei der folgenden Induktion des Trocknens der Zellen ist eine Down- Regulation der PGK1 zu erkennen, die Copyzahl der PGK1 liegt aber weiterhin deutlich höher als in der logarithmisch wachsenden Kultur. Da PGK1 in logarithmisch wachsenden Zellen in der Glycolyse die Umsetzung von 1,3 Diphosphoglycerat unter ATP - Bildung katalysiert, war die Expression in der aeroben logarithmisch wachsenden Kultur zu erwarten [78]. Die Up - Regulation von YCR012w nach der Gefrierinduktion läßt einmal schließen, daß für das Streßmanagement der Zelle ATP benötigt wird. Das unterstreicht auch die Downregulation von YCR012w bei der nachfolgenden Trocknung der Zellen; während der Gefrierinduktion scheint die wesentliche Streßadaption der Zelle abgeschlossen zu sein, so daß bei einer folgenden Streßinduktion (Trocknung der Zellen) kein weiteres ATP aus der Glycolyse benötigt zu werden scheint. Zum anderen muß aus der Tatsache daß bei der Streßinduktion des Gefrierens YCR012w in erhöhtem Maß exprimiert wird, auf eine zusätzliche signalsensorische Funktion bzgl. der Streßinduktion dieses Proteins geschlossen werden. Da die Zellen für die Streßinduktion aus dem glucosehaltigen YNB - Medium entnommen wurden, steht den Zellen für die Dauer der Streßinduktion (Gefrieren der Zellen 14 h, Lyophilisieren 40 h) kein Substrat (Glucose) für die Glycolyse zur Verfügung, das eine Up - Regulation PGK1 bei den anaeroben Bedingungen der Streßadaption begründen könnte. Diese signalsensorische Funktion von PGK1 bzgl. der Streßadaption kann durch eines der sieben bisher noch nicht determinierten Motive von YCR012w reguliert sein. Der bisherige Eintrag zu YCR012w in den Proteindatenbanken [80]

- **CATALYTIC ACTIVITY:** $\text{ATP} + 3\text{-PHOSPHO-D-GLYCERATE} = \text{ADP} + 3\text{-PHOSPHO-D-GLYCEROYL PHOSPHATE}$.
- **PATHWAY:** SECOND STEP IN THE SECOND PHAsE OF GLYCOLYSIS.
- **SUBUNIT:** MONOMER.
- **SIMILARITY:** BELONGS TO THE PHOSPHOGLYCERATE KINAsE FAMILY.
- **CAUTION:** THERE ARE CONFLICTS WITH THE SEQUENCE STORED IN PDB.

kann nun erweitert werden durch die Funktionsbeschreibung

involved in regulation of streßresponse

3.3.4.9 Der Initiationsfaktor eIF-5A in *S. boulardii*

Der Initiationfaktor HYP2 (eIF-5A, eIF-4D, TIF51A, YEL034w, P23301) hat im nativen Zustand ein Molekulargewicht von 16,9 kD und einen pI von 4.6. In *S. cerevisiae* codieren zwei Gene für eIF-5A, die bei Parallelmutation zu einer Wachstumsinhibition der Zellen führen. Die genaue Funktion wie auch Interaktionen und Regulationen von eIF-5a sind nicht bekannt. Die elektrophoretische Trennung (Abb. 63) zeigt, daß eIF-5A in *Saccharomyces boulardii* bei Streßinduktion in deutlich höherer Kopienzahl exprimiert wird als in *S. cerevisiae*. Als zelluläre Modifikationen ist eine Acetylierung, eine Phosphorylierung und eine Hypusinylierung bekannt [82].

3.3.4.9.1 Funktionen der Initiationsfaktoren in der Zelle

Eukaryontenzellen senken die Gesamtgeschwindigkeit ihrer Proteinsynthese als Antwort auf verschiedene Außenbedingungen wie z.B. Infektionen, Mangel an Substrat, Streßinduktionen oder auch den Eintritt in die M- Phase des Zellzyklus.

An dieser Regulation der Proteinbiosynthese scheinen Initiationsfaktoren maßgeblich beteiligt zu sein.

Die Funktionsweise von eIF-2 Initiationsfaktor ist bereits bekannt [77]:

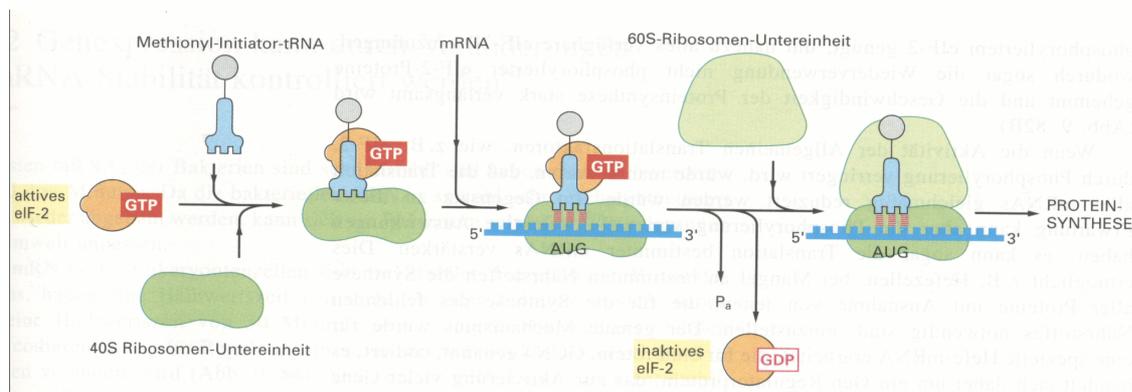


Abb. 62: Regulation der selektiven Proteinbiosynthese am Beispiel von eIF- 2 mit GTP als aktivierendes Signalmolekül [77].

eIF-2 bildet einen Komplex mit GTP und vermittelt die Bindung der Methionyl-Initiator tRNA an die kleine Ribosomen - Untereinheit, die sich dann an die 5'- Cap-Struktur der mRNA heftet und ihre Suche an der mRNA beginnt. Nach dem Erkennen eines AUG - Codons wird das gebundene GTP durch das eIF-2-Protein zu

GDP hydrolysiert, was zu einer Konformationsänderung im Protein führt, wodurch es von der kleinen Ribosomen Untereinheit entlassen wird. Dann verbinden sich die Ribosomenuntereinheiten und bilden zusammen ein komplettes Ribosom, das die Proteinsynthese startet. Für die Freisetzung des GDP wird das Guaninnucleotid releasing Protein eIF-2Bb benötigt, welches wieder ein neues GTP bindet, und so das eIF-2 wieder verwendet werden kann.

Wenn die Aktivität der allgemeinen Initiationsfaktoren wie die der eIF2 Familie durch Phosphorylierung verringert wird, würde man erwarten, daß die Translation aller mRNAs gleichmäßig reduziert werden würde. Im Gegensatz zu dieser Erwartung kann aber die Phosphorylierung von eIF-2 selektive Auswirkungen haben. In der Hefe (S288c) wurde nachgewiesen, daß bei Mangel an bestimmten Nährstoffen die Synthese aller Proteine mit Ausnahme von jenen, die für die Synthese des fehlenden Nährstoffes notwendig sind, eingestellt wird.

Der genaue Mechanismus wurde für eine Hefe mRNA erarbeitet, die für das GCN4 Protein codiert. Bei GCN4 handelt es sich um ein Gen - Regulatorprotein, das in einem komplexen Regulationsmechanismus nach einer Phosphorylierung von eIF2 zu dem Anstieg der GCN4 - Proteinsynthese führt, das dann entsprechender exogener oder endogener Signale bestimmte Proteinexpressionen induziert [77].

3.3.4.9.2 Hypusinisierung - eine Streßinduktion

Der Initiationsfaktor eIF-5a in der Hefe ist ein relativ kleines Protein (156 AS) dessen Rolle in der Initiierung der Proteinbiosynthese noch nicht geklärt ist. Eine sehr interessante Besonderheit dieses Proteins ist dessen Modifizierung mit einer Hypusin Gruppe. eIF-5A ist das bisher einzig bekannte eukaryontische Protein mit dieser Modifizierung. Hypusinisierungen konnten bisher nur im Archebakterium *Sulfolobus acidocaldarius* und in *Methanococcus jannaschii* gefunden werden.

Dort ist die Sekundärstruktur des Proteins sehr ähnlich, es wird daher eine ähnliche Funktion dieses Proteins in den Archebakterien vermutet [82, 83]. Die Hypusinisierung ist eine posttranslationale Modifikation, die durch die Übertragung einer Butylaminogruppe von Spermidin auf die epsilon - Aminogruppe des Lysins einhergeht. In der folgenden Primärsequenz ist die Hypusinisierungsstelle rot markiert: Position 50, AS - Lysin:

```

      10          20          30          40          50          60
SDEEHTFETA DAGSSATYPM QCSALRKNGF VVIKSRPCKI VDMSTSKTIGK HGHAKVHLVA
                                     Hypusin - Modifikationsstelle
      70          80          90          100         110         120
IDIFTGKKLE DLSPSTHNME VPVVKRNEYQ LLDIDDGFLS LMNMDGDTKD DVKAPEGELG

      130          140          150          156
DSLQTAFDEG KDLMVTIISA MGEEasISFK EasRTD

```

Die elektrophoretischen Trennungen von *S. cerevisiae* und *S. boulardii*, zeigen Regulationen von eIF-5 in Abhängigkeit des Stammes und der Streßinduktion (Abb. 63). Die MALDI - Analyse beider Spots resultierte in gleichem Identifikationsergebnis: eIF-5.

Wie A. Kang et al in ihrer Studie über die Hypusinisierung von eIF5 fanden, wird eIF5 von zwei nahezu homologen Genen codiert, dem TIF51A und TIF51B. Jedes Gen exprimiert ein hypusiniertes isoelektrisches Isoform, das eIF-5Aa (mehr sauer) und das eIF-5Ab (mehr basisch) [83]. Mit der hochauflösenden zweidimensionalen Elektrophorese lassen sich diese beiden isoformen Proteine trennen und in ihrer Funktionalität beschreiben (Abb. 63):

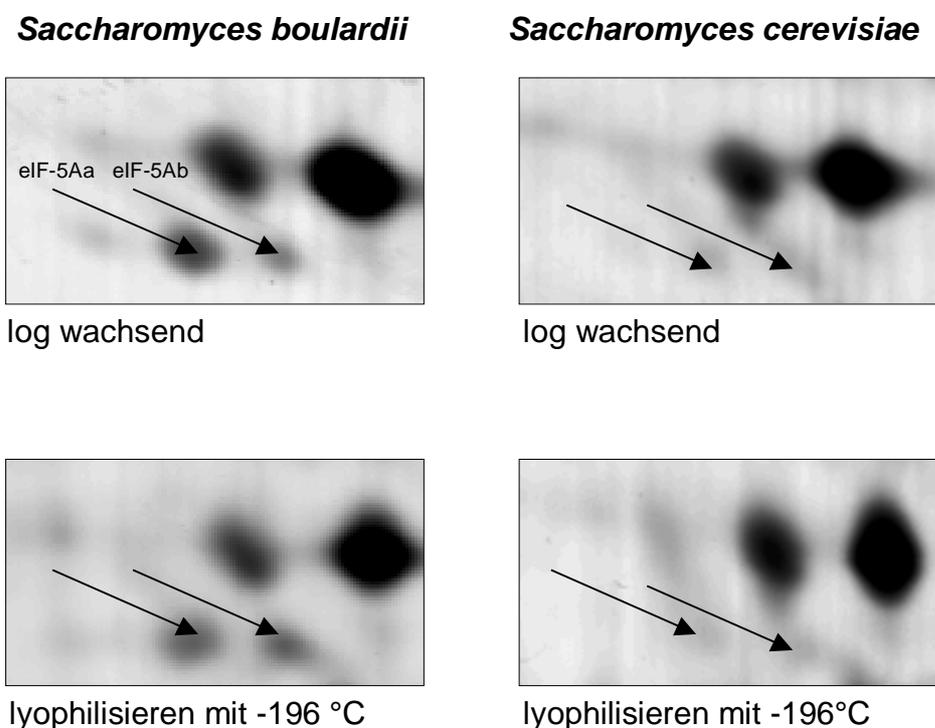


Abb. 63: Blow up E von eIF-5A in den Hefen *S. boulardii* und *S. cerevisiae* (S288c wildtyp) in logarithmisch wachsenden Zellen und nach Streßinduktion des Lyophilisierens. eIF-5Ab stellt das aus eIF-5Aa durch Serinphosphorylierung entstandene Isoform dar

Kang et al. konnten nach Immunoprecipitation von ^{32}P markierten Zellysat mit eIF-5Aa spezifischen Antibodies zudem zeigen, daß nach Phosphoprotein - Phosphatase Behandlung von eIF-5Aa eine Serinphosphorylierung von eIF-5Ab stattfindet, bei dem dann das mehr saure eIF5-Aa entsteht [83]. Da hier nach MALDI - MS Identifikation beider Spots das gleiche Protein detektiert wurde (eIF-5A), muß es sich hier um eine in vivo Phosphorylierung diese Proteins handeln.

Die elektrophoretischen Trennungen (Abb. 63) zeigen, daß unter vergleichbaren Bedingungen der Initiationsfaktor eIF-5A bei streßfreien und bei lyophilisierten Zellen in *S. boulardii* mit höheren Kopienzahlen als bei *S. cerevisiae* exprimiert wird.

Wie aus den lag - Phasen von *S. boulardii* und *cerevisiae* zu sehen ist, reagieren beide *Saccharomyces* - Stämme unterschiedlich auf die (Abb. 41, 42) Streßinduktion des Lyophilisierens und Gefrierens. Ein Grund hierfür kann die höhere Konzentration des Initiationsfaktors sein, der auf DNA - Ebene selektiv die Expression spezifischer Streßprotein induziert.

In wieweit die sehr seltene Hypusinisierung dieses Proteins in die Expressionsregulation der Streßadaption eingreift, kann nur erahnt werden, da eine signifikante pI oder Molekulargewichtsänderung durch die Addition der Butylaminogruppe nicht zu erwarten ist.

Weitere signifikante Proteinregulationen in der cytoplasmatischen Fraktion von *Saccharomyces cerevisiae* und *boulardii* nach Streßinduktion des Gefrierens und Lyophilisierens konnten nicht detektiert werden.

3.3.4.10 Fazit , Interaktionsmodell

Nach 2D - Elektrophorese der cytoplasmatischen Fraktion von *Saccharomyces cerevisiae* und *boulardii* wurden sechs streßsensitive Proteine bzgl. der Induktion des Gefrierens und Lyophilisierens erstmals detektiert, identifiziert und in ihrer Streßantwort beschrieben. Dabei konnten Unterschiede bei der Streßantwort in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit bzw. Einfriertemperatur und dem Hefestamm detektiert werden.

Aus den Erkenntnissen der computerdensitometrischen Gelauswertung (Abb. 49, 53, 54, 61, 63) und der Datenbankrecherche zu den detektierten Streßproteinen wurde ein Modell, welches die Zusammenhänge und Interaktionen der Hefezelle bei dieser Streßinduktion darstellt, entworfen.

Gestrichelte Linien weisen in der Graphik auf erstmals beschriebene Zusammenhänge aus dieser Arbeit hin, durchgezogene Linien zeigen bereits mehrfach beschriebene Interaktionen auf. In der Legende sind die neuen Funktionsbeschreibungen kursiv markiert.

Da nur die cytoplasmatische Fraktion und ein pH - Bereich von 4-7 elektrophoretisch untersucht wurde, stellt diese Graphik nur einen Ausschnitt aus dem geschlossenen Regelkreis der Streßadaptation von Gefrieren und Lyophilisieren in der Hefe dar.

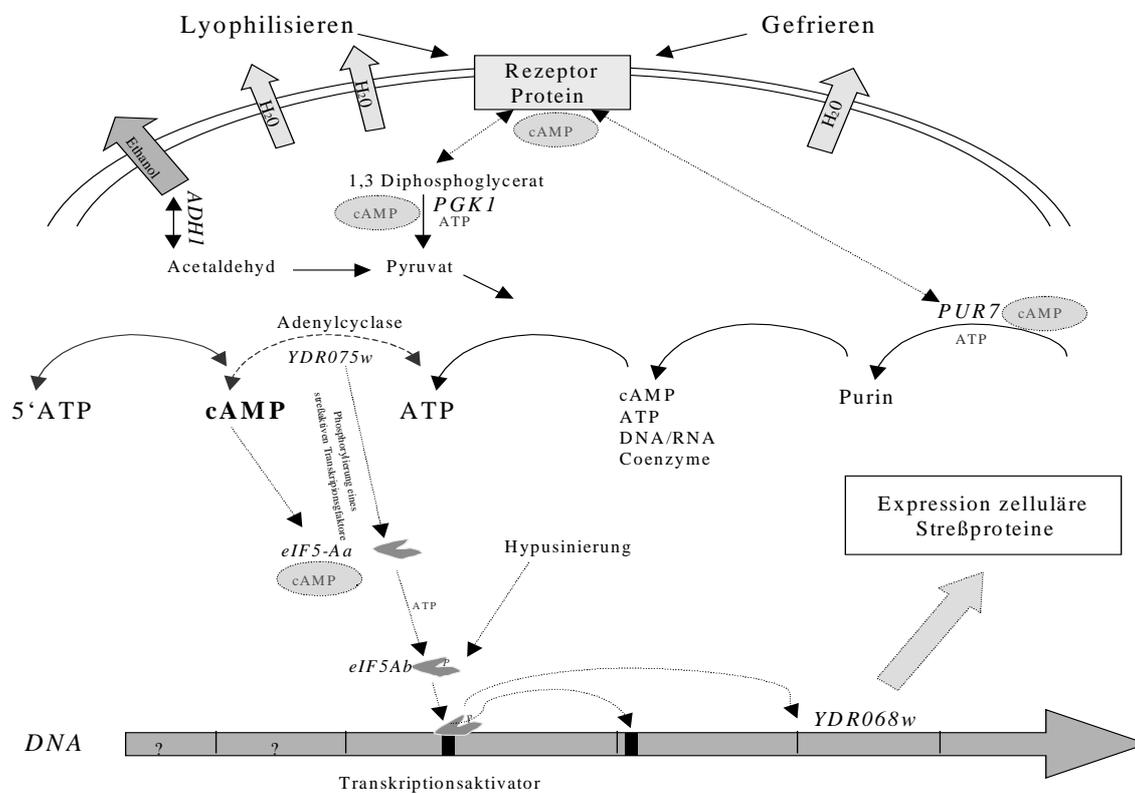


Abb. 64: Modell für das Streßmanagement nach Osmostreß des Gefrierens und Lyophilisierens in *Saccharomyces cerevisiae* und *bouldarii*
 cAMP--cyclisches Adenosinmonophosphat (Signaltransduktion)
 ATP-- Adenosintriphosphat (Energieträger)
 ADH1-- Alkoholdehydrogenase 1, *Up-Regulation nach Streßinduktion*
 PGK1-- Phosphoglyceratkinase, *Overexpression bei Osmostreß des Gefrierens und Lyophilisierens*
 PUR7-- SAICAR- Synthase, *Expression bei langsamer Streßinduktion* (Einfriergeschwindigkeit von 11°C/s)
 eIF5Aa-- Initiationsfaktor, *verstärkt in S. bouldarii exprimiert*
 eIF5Ab-- phosphorylierter Initiationsfaktor, *erhöhte Expression bei Lyophilisierung in S. bouldarii*
 YDR068w-- *Streßsensitives Protein involviert in der Streßantwort auf Lyophilisierung*
 YDR075w-- Serin / Threonin Phosphatase, *Up - Regulation bei Streßinduktion der Lyophilisierung*

4 Zellwandproteine als Target neuer Antimycotika

Durch die Einzigartigkeit der Zellwandstruktur der Mycomycota ist hier ein hochselektives Target für eine therapeutische Anwendung gegen Pilzinfektionen gegeben. Wird ein spezifisch auf die Zellwand wirkendes Agens gefunden, ist eine ähnliche Wirkungsweise wie die des *Penicillins* zu erwarten, das bekanntermaßen selektiv auf die Bakterienzellwand wirkt.

Die Zellwand der Mycota ist eine komplexe, vielschichtige Struktur, in der amorphe, granuläre und fibrilläre Komponenten miteinander wechselwirken. Die Synthese der Zellwand ist, wie auch deren Regulation und deren sensorische Eigenschaften nur unzureichend bekannt [89, 105].

Die Zellwand gewährt Formerhaltung wie auch Protektion gegen osmotischen Streß. Sie setzt sich im wesentlichen aus drei Makromolekülen, dem Glucan, dem Chitin und den Mannoproteinen zusammen. Etwa 25 - 30% des Zellrockengewichtes ist auf die Zellwand zurückzuführen, wobei sich die Verteilung mit etwa 55% β 1,3-Glucan, 40% Zellwandprotein, 2% Chitin und 2% 1,6-Glucan darstellt [94, 97, 98, 109].

Unter den verschiedenen Zellwandkomponenten scheint das Chitin und das 1,3 Glucan eine wesentliche Rolle für die Zellintegrität und Streßresistenz darzustellen. Eine Inhibition im Stoffwechsel dieser Polymere sollte zur sofortigen Lyse der Zelle führen. Eine besondere Rolle für die Pathogenität von Mycota scheint das Chitin zu spielen, das nach Untersuchungen von A. Cassone bei *C. albicans* zur Infektiosität und Invasivität der Zellen beiträgt [89, 95, 110].

Da sämtliche mycotische Zellwände große Ähnlichkeiten in Struktur und Organisation aufweisen, werden fast alle Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* oder *Candida albicans* Stämmen durchgeführt. Durch Proteinstrukturanalysen sind derzeit 35 Proteine bekannt, die in der Zellwand lokalisiert sind. Es werden wesentlich mehr zellwandgebundenen Proteine vermutet, die an der Synthese oder Regulation der Zellwand beteiligt sind. Die genaue Funktion bzw. ihre Regulation sind nur in wenigen Fällen bekannt. Auf Grund der schlechten Solubilisierungseigenschaften der Zellwandproteine (CWPs) ist es bisher nicht gelungen, eine reine Fraktion von CWPs z. B. für die Elektrophorese zu extrahieren [10, 11].

In dieser Arbeit wird erstmals eine Methode für die Extraktion von mycotischen Zellwandproteinen am Beispiel von *S. cerevisiae* präsentiert.

4.1 Kenntnisstand und Grundlagen

Da die botanische Klassifizierung der Pilze , z. B. in Sproß- und Fadenpilze, sich bei der medizinischen Bewertung nicht bewährt hat, wird in der medizinischen Mikrobiologie eine Einteilung in Hefen, Schimmelpilze, Dermatopyten und dimorphe Pilze bevorzugt. Pilze können den Menschen durch Abgabe von Mycotoxinen (z.B. Aflatoxin), durch Sensibilisierung oder durch progressive Infektionen (Mykosen) schädigen [90, 96].

Etwa 200 der über 250000 Arten der Mycomycota sind als Infektionserreger menschen- oder tierpathogen. Unter diesen wiederum ist nur ein kleiner Prozentsatz obligat pathogen (Dermatopyten sowie Histoplasma, Coccidioides-, Paracoccidioides- und Blastomyces Arten). Die meisten sind sog. Opportunisten, d.h. diese sind nur unter bestimmten Voraussetzungen , wie z.B. Resistenzschwäche, pathogen (z.B. Candida, Aspergillus, Mucorazeen).

Trotz der scheinbar geringen Zahl hochpathogener mycotischer Erreger stellen Pilzinfektionen bis heute ein großes Problem dar. Vorwiegend in Krankenhäusern treten oft sogar tödlich verlaufende Pilzinfektionen auf. Wird ein Patient beispielsweise mit Penicillin behandelt, wird dessen endogene Bakterienflora selektiv minimiert. Der geschwächte Patient ist nun einer aufkeimenden endogenen Pilzflora oder einer exogenen Pilzsporeninfection ausgesetzt, die durch körpereigene Gleichgewichte wie z.B. das der Darmflora nicht mehr regulierbar sind. Die wichtigsten Krankheiten, die durch Pilzinfektion hervorgerufen werden sind:

Cryptococcose, Aspergillose, Mucormycose, südamerikanische Blastomycose, Histoplasmanamycose, Epidermphytie und Candidiasis [92, 99, 112, 123].

Wie aus aktuellen Auswertungen von mycotischen Infektionen in Krankenhäusern bekannt wurde, vervielfachte sich die Zahl der Infekte in den letzten 10 - 20 Jahren; es wird zudem davon ausgegangen, daß eine Vielzahl von tödlichen mycotischen Infekten auf Fehldiagnosen bzw. nicht erkannte mycotische Infekte, zurückzuführen sind. Als Gründe für die zunehmende Pilzinfektionen wird die erhöhte Zahl an künstlichen Organtransplantationen, die hohe Mutationsrate der fungalen Erreger und das Fehlen selektiv wirkender Antimycotika angegeben [92, 93 ,132].

4.1.1 Wirkungsweise herkömmlicher Antimykotika

Derzeit stehen zwei Substanzklassen mit antimykotischer Wirkung zur Verfügung:

→ Polyenderivate

→ Imidazolderivate

Pharmakodynamik

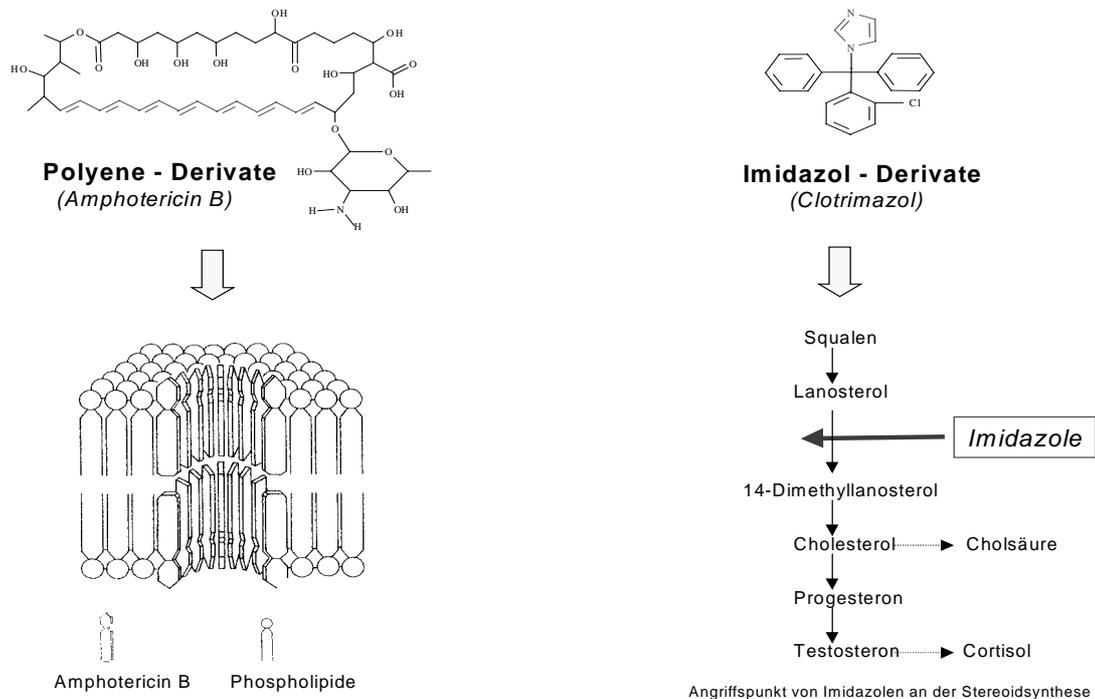


Abb. 65: Pharmkodynamik von Poly- und Imidazolderivaten [91, 97, 126].

4.1.1.1 Polyenderivate

Die Gruppe der Polyenantibiotika umfaßt eine Reihe von Verbindungen, deren gemeinsames Kennzeichen ein System aus 4 - 7 konjugierten Doppelbindungen ist, die entweder in einem Laktoring enthalten sind (*Amphotericin B*, *Nystatin*, *Natamycin*) oder in einer aliphatischen Seitenkette (*Pecilocin*). Der relativ große Anteil des aliphatischen Restes machen das Molekül lipophil und dadurch schlecht absorptiv für den Patienten; durch das große konjugierte System sind diese Substanzen empfindlich gegen Licht und Oxidationsmittel, weshalb ihre Haltbarkeit stark begrenzt ist. Polyenantibiotika wirken, indem ihr lipophiler Anteil mit Sterinen der Cytoplasmamembran reagiert [92, 93]. Man vermutet, daß diese sich derart in der Membran anordnen, daß die hydrophilen Reste mehrerer Moleküle wassergefüllte Kanäle durch die ganze Cytoplasmamembran bilden und in der

Weise, daß die Zelle osmotisch gestört wird. Dieser Mechanismus könnte die relativ selektive Wirkung auf Pilze, aber auch auf tierische bzw. menschliche Zellen erklären. Bakterien, deren Zellmembran keine Stearine enthalten, sind gegen Polyenantibiotika unempfindlich. Da die Cytoplasmamembran von menschlichen und fungalen Zellen nahezu identisch aufgebaut ist, sind Nebenwirkungen bei Polyenantibiotika die Konsequenz.

Am Beispiel des *Amphotericin B*, welches heute das am meisten verwendete Medikament gegen mycotische Infekte ist, soll die Problematik bei der Anwendung dieses Antimykotika dargestellt werden:

Gastrointestinale Beschwerden	+++	T
Herzrhythmusstörungen	+	T
Thrombophlebitis	++	T
Zentrale und periphere Neuropathie (Schmerzen, Paresen, Sehstörungen, Schwindel)	(+)	T
Nierenschäden (Azotämie, Azidose, Nephrokalzinose)	+++	T
Leberfunktionsstörungen	(+)	T
Anämie	+++	T
Arzneimittelfieber, Schüttelfrost	+++	A
Exantheme	(+)	A

A = patientenabhängig T = patientenunabhängig
 + = selten auftretend ++ = gehäuft auftretend +++ = regelmäßig auftretend

Tab. 17: Nebenwirkungen einer systemischen Amphotericin B - Behandlung [90, 92]

4.1.1.2 Imidazolderivate

Imidazolderivate wie z.B. Bifonazol, Clotrimazol, Econazol oder Tioconazol besitzen als Wirkstoffgruppe einen unsubstituierten Imidazolring, der über eine N-C- Bindung an das Restmolekül gebunden ist. Die Imidazol - Antimykotika sind Breitspektrumantimykotika, deren Wirkungsspektrum Hefen, Schimmelpilze, Dermatophyten und dimorphe Pilze sowie grampositive Bakterien umfaßt. Die Wirkung beruht einmal auf einer Hemmung der Umwandlung von Lanosterol zu Ergosterol, einem wichtigen Bestandteil der Cytoplasmamembran und z. T. wohl auch auf einer direkten Cytoplasmamembranschädigung, die zu einer Permeabilitätsänderung führt. Die Wirkung der Imidazole ist fungistatisch bis fungizid.

Da das Target wiederum die Cytoplasmamembran ist, treten ähnlich wie bei den Polyenantimykotika eine Vielzahl von Nebenwirkungen auf, die von Oligospermie bis hin zu tödlich verlaufenden Leberschädigungen reichen. Polyen-, wie auch Imidazolantimykotika können in der Regel nur stationär und intravenös verabreicht werden [57, 89, 109].

4.1.2 Zellwandaktive Antimykotika

Bereits 1985 gab es Versuche von Yamaguchi et al. [91], mit dem Aculeacin A eine zellwandaktive Substanz zu präsentieren. Echinocandin B und Papulacandin waren weitere Versuche das Wachstum von *Saccharomyces*- und *Candidastämmen* zu inhibieren. Die Ergebnisse wurden durch elektronenmikroskopische Studien der Zellwände bzw. durch die Analyse der Glucan-, Chitin- und Mannanzusammensetzung der Zellwand erhalten.

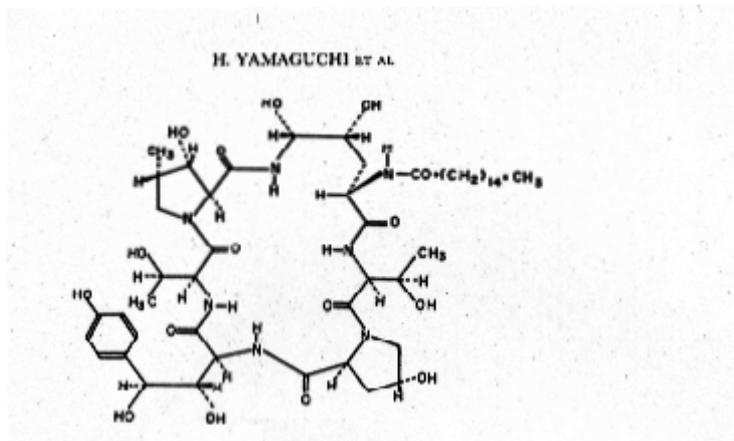


Abb. 66: Struktur von Aculeacin A. Aculeacin A ist eine antimykotisch wirksame Substanz, die aus *Aspergillus aculeatus* isoliert wird. Sie setzt sich aus einem hydrophilen cyclischen Hexapeptid zusammen, das im Fall des Aculeacin A mit einem Palmitinsäurerest und im Falle des Echinocandin B mit einem Linolensäure peptidisch verknüpft ist.

Nach Aculeacininkubation der Zellen wurde ein veränderter Phänotyp, sowie veränderte Zellwandzusammensetzung beobachtet. Die genaue Wirkungsweise von Aculeacin wie auch von Echinocandin B oder Papulacandin ist nicht bekannt. Die Tatsache, daß derzeit fast ausschließlich Amphotericin B bei Pilzinfekten verwendet wird, deutet auf die begrenzte Wirkung bzw. Anwendbarkeit dieser Substanzen hin.

Ein weiterer Ansatz, die mycotische Zellwand als Target für Antimykotika zu nutzen wurde vor kurzen von W. Tanner et al. publiziert [92, 102]. Mannoproteine, die vorwiegend an der Oberfläche der Zellwand lokalisiert sind, entstehen durch Glycosylierungsreaktionen aus ihren Monomeren. Es stellte sich heraus, daß Protein-O- Glycosylierungen nur in Pilzen, nicht aber in Säugerzellen vorkommen. Die O- Mannosyltransferase katalysiert den Transfer der Mannose von Dol- P- Man zu

Serin oder Threoninresten aus dem sekretorischen Stoffwechsel; die Reaktion findet im ER statt. Es wurde eine Nullmutante der O- Mannosyltransferase (PMT1) eines *S. cerevisiae* Wildtyps erzeugt, der jedoch nicht letal war. Es stellte sich heraus, daß weitere PMT - Gene im Genom auf verschiedenen Chromosomen vorhanden sind (PMT1 - 6), die unter logarithmisch wachsenden Zellen alle exprimiert sind. Nach mehreren Knockout - Versuchen fand man, daß die Triple- Knockout- Mutante PMT2PMT3PMT4 und PMT1PMT2PMT4 letal und PMT1PMT2PMT3 extrem osmotisch instabil ist [96, 100, 103].

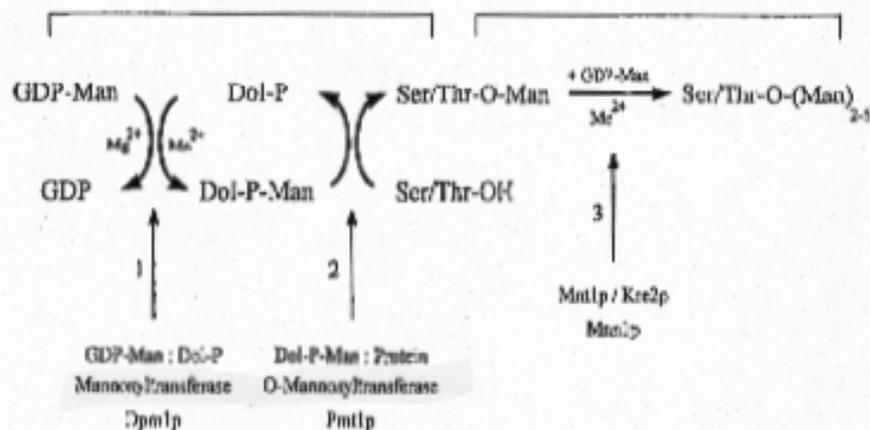


Abb. 67: O- Glycosylierung in Hefen. Die Synthese von Dol-P-Man (Dolichoylphosphat Mannose) findet in den meisten eukaryontischen Zellen statt (Reaktion 1). Die Katalyse von Mannan mit Serin- oder Threoninresten durch die O- Mannosyltransferase (Reaktion 2) zu zellwandintegrierten Mannoproteinen, wurde bisher nur in mycotischen Zellen nachgewiesen. In einer Folgereaktion (Reaktion 3) werden im Golgiapparat weitere Mannosemoleküle an die Kohlenhydratkette gefügt.

Es muß vermutet werden , daß diese O- Mannosylierung des Serins oder Threonins von wesentlich mehr Regulationsmechanismen gesteuert wird als durch PMT - Genprodukte. Die Einflußnahme in diese Regulationsmechanismen durch inhibitorische Substanzen könnte zu der gewünschten Letalität oder osmotischen Instabilität der Zelle, und damit zu einem selektiv wirksamen Antimykotikum führen. Dazu müßten aber Regulierungsmechanismen und funktionale Zusammenhänge des mycotischen Zellwandstoffwechsel bekannt sein [89].

Ein wesentlicher Grund für den begrenzten Erfolg in der Antimykotikaforschung ist die Tatsache, daß Organisation, Physiologie und Regulation der mycotischen Zellwand nicht oder nur unzureichend verstanden sind. Integrale, surfaciale und regulatorische Zellwandproteine wie z.B. Glucanasen, Chitinasen oder Glycosidasen

wirken zusammen und regulieren nach Einfluß exogener und endogener Induktionen die Formation und Struktur der Zellwand.

Obwohl die mycotische Zellwand keine direkte osmotische Barriere für anorganische Ionen darstellt, scheint eine Schwächung der Zellwand oftmals zu einer osmotischen Sensibilisierung zu führen [96, 104].

4.1.3 Zielsetzung

Eine sehr geeignete Methode für die Untersuchung der Interaktionen von Zellwandproteinen stellt die zweidimensionale Elektrophorese in Kombination mit der massenspektroskopischen Sequenzanalyse dar. Da mycotische Zellwandproteine nicht in der cytoplasmatischen Fraktion solubilisiert sind, und es bisher noch nicht gelungen ist, Zellwandproteine in einer reinen Fraktion zu extrahieren, waren derartige Untersuchungen bisher nicht möglich.

Im folgenden wird erstmals die Extraktion und Fraktionierung von mycotischen Zellwandproteinen beschrieben. Zudem wird eine funktionale Analyse dieser Zellwandproteine für die Eignung als Target für antimycotisch wirksames Target durchgeführt.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Methodische Durchführung der CWP Isolierung

Die CWP - Extraktion wird in der Weise durchgeführt, daß zuerst die Proteine der cytoplasmatischen Fraktion quantitativ entfernt werden, dann die Zellwandfragmente von noch intakten Zellen getrennt werden und nach Quantifizierung der Zellwandproteine ein zellwandlytischer Verdau der Fragmente durchgeführt wird.

4.2.1.1 Kultur und radioaktive Markierung

Für die Extraktion der Zellwandproteine wird ausschließlich der Wildtyp S288c des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Kultur und Aufzucht werden wie in Kap 2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Hat die Hauptkultur eine optische Dichte von 1,0 (1×10^7 Zellen/ ml) erreicht, wird für die CWP- Extraktion anstelle von mit $10\mu\text{Ci/ml}$ mit $12\mu\text{Ci/ml}$ radioaktiv markiert. Nach dem Ernten (12 ml) steht ein vitales Zellpellet mit etwa 5 mg Trockengewicht für die Fraktionierung zur Verfügung. Die gesamte Extraktion wird in einem sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäß durchgeführt.

Es ist sinnvoll bei radioaktiv markierten Proben mit mindestens einem Doppelansatz zu arbeiten, um den Glucanase- und Chitinaseverdau parallel durchführen zu können. Bei nicht radioaktiv markierten Proben wurde mit einem Vierfachansatz gearbeitet, da zwei Proben für die photometrische Quantifizierung benötigt werden.

4.2.1.2 Abtrennen der cytoplasmatischen Fraktion

Für die Abtrennung der cytoplasmatischen Fraktion wird das Zellpellet in 200 µl heißem (95 °C) SDS - Puffer suspendiert. Die Suspension wird mit dem Ultraschallstab bei einer Agitationszeit von 1 s in 15 Zyklen behandelt (Durchführung des Ultraschallaufschlusses siehe 2.2.2). Nach Kochen (95 °C, 5 min) wird die Suspension im Eiswasserbad auf 15 °C abgekühlt und anschließend mit 500 µl Lysepuffer verdünnt. Die Lösung wird 20 min bei RT geschüttelt und sofort zentrifugiert (14000 rpm, 5 min). Der Überstand wird quantitativ abpipettiert und verworfen.

4.2.1.3 Reinigung der Zellwandfraktion

Der Rückstand wird im Vortexer (5min Agitationszeit) in 500µl Lysepuffer resuspendiert. Die Lösung wird zentrifugiert (14000 rpm, 5 min) und der Überstand sorgfältig abgezogen. Der Rückstand wird in 200 µl SDS - Puffer gelöst und mit dem vorgekühlten Ultraschallstab (4 °C) bei einer Agitationszeit von 1s mit 15 Zyklen behandelt. Die Suspension wird 5 min gekocht (95 °C), dann im Eiswasserbad auf 15 °C gekühlt, und mit 14000 rpm für 10 min zentrifugiert.

4.2.1.4 Substitution von SDS durch CHAPS

Der Überstand wird sorgfältig abgezogen und das trockene Pellet in 500 µl Lysepuffer resuspendiert. Im Horizontalschüttler wird bei 25 °C mit aktivierter Ventilation 45 min geschüttelt. Es wird nun zentrifugiert (10 min, 14000 rpm), der Überstand verworfen und der Rückstand in 200 µl Lysepuffer resuspendiert.

4.2.1.5 Filtration und Quantifizierung

Vorversuch zur Optimierung der Membranfiltration

Es werden 400 µl PP - Whatmansieb (Porengröße 10 µm) mit 0,8 µm Polyethersulfon- regenerierte Cellulose-, und Cellulosetriacetatmembran der Hersteller MembraPure, Schleicher & Schüll und Renner bestückt, und bei 121 °C für

20 min autoklaviert. Die Membranen der Hersteller unterscheiden sich in Membranstärke, Membranfläche, Feuchtigkeitsgehalt, Absättigungsgrad und Stabilität. In diese Whatmansiebe werden nun 200 µl Zellwandprotein - Lysepuffersuspension pipettiert und bei 14000 rpm für 5min filtriert. Die Filtrate der drei Membranen werden dann je zweimal in 200 µl Lysepuffer gewaschen, dann quantifiziert und nun mit Chitinase verdaut. Anschließend werden die drei Extrakte 2D - elektrophoretisch aufgetrennt und schließlich ausgewertet.

Für die weitere Optimierung der Filtration werden Polyethersulfon,- reg. Cellulose- und Cellulose-triacetatmembranen des Herstellers Schleicher & Schüll verwendet. Um Proteinaffinitäten der Filter zu bestimmen werden die Membranen nach Filtration des radioaktiv markierten Extrakts jeweils in ein Szintillationsfläschchen gegeben und eine Isotopenbestimmung durchgeführt (s. Kap. 2.2.1.6). Zudem werden die Aktivitäten des Filtrats bestimmt. Für die optimierte Durchführung der CWP-Extraktion kommt ausschließlich die Polyethersulfonmembran von Schleicher & Schüll zur Anwendung. Hierfür wird das Whatmansieb mit der Polyethersulfonmembran ausgekleidet, autoklaviert, mit 200 µl Zellwandextrakt befüllt, bei 14000 rpm für 5 min filtriert und zweimal mit 200 µl Lysepuffer gewaschen (s. Vorversuch).

Für die Quantifizierung bei radioaktiv markierten Proben wird 1 µl entnommen und nach 2.2.1.6.3 scintillatorisch bestimmt. Bei nicht radioaktiv markierten Proben wird der Extrakt auf 700 µl mit Lysepuffer verdünnt und nun eine photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen den Lysepufferleerwert durchgeführt. Für die Trennung radioaktiv markierter CWP- Extrakte hat sich als Auftragsaktivität ein Wert von 2,5 Millionen cpm für die 2D PAGE als optimal erwiesen (s. Kap. 2.2.3.4.2). Bei nicht radioaktiv markierten Proben muß mindestens im Parallellansatz gearbeitet werden, da der für die Photometrie verdünnte Extrakt nicht weiter verwendbar ist.

Die photometrische Bestimmung wird wie in Kap. 2.2.1.5 beschrieben, durchgeführt. Die Zellwandsuspension wird zentrifugiert (14000 rpm, 10 min) und der Überstand quantitativ entfernt.

4.2.1.6 Enzymatischer Verdau der Zellwandfragmente

Vorversuch zur Optimierung des enzymatischen Verdau

Es werden folgende fünf Enzyme (drei Chitinasen, zwei Glucanasen) zweidimensional elektrophoretisch (IPG 4-9) getrennt und für den Zellwandverdau von *S. cerevisiae* geprüft:

- Chitinase (Fluka): braunes Granulat, 2 u/100 µg
- Chitinase (Calbiochem): β -1,4 glycosidisch aktiv, flüssig farblos, 2 u/100 µl
- Chitinase (Roche): N- Acetyl- β -D-Glucosaminidase, flüssig farblos, 2 u/100 µl
- Glucanase (Sigma): 1,3-Glucanase, weißes hygroskopisches Granulat, 1,5 u/100 µg
- Glucanase (Interspex): 1,3 β -Glucanase, weißes Pulver, 2,5 u/100 µg

2D - Elektrophorese (IPG 4 - 9) mit folgenden Extrakten werden im Doppelversuch durchgeführt und computerdensitometrisch ausgewertet:

- Fünf Enzyme s.o., gelöst in 200 µl Lysepuffer, Auftragsmenge 1,5 units
- Fünf radioaktiv markierte Zellwandextrakte verdaut mit den oben beschriebenen Enzymen
- Fünf nicht markierte Extrakten mit den substratfreien Enzymen Glucanase (Interspex) und Chitinase (Roche).
- Vier markierte Zellwandextrakte, verdaut mit der Glucanase (Interspex) und Chitinase (Roche)

Auf Grund starker Kontaminationen der übrigen Enzyme (s. 4.3.1.3) kommt für den Chitinverdau ausschließlich die Chitinase (Roche) und für den Glucanverdau die Glucanase (Interspex) zur Anwendung.

N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (Chitinase) - Verdau (bezogen auf 5mg dw)

Die Zellwandreste werden in 20 µl TrispufferC resuspendiert. In die Lösung werden 15 mU Chitinase (Roche) gewogen und 75 min bei 25 °C geschüttelt. Anschließend wird mit 180 µl Lysepuffer verdünnt und 1 h bei 25 °C geschüttelt; die Suspension wird zentrifugiert (15 min 14000 rpm) und der Überstand auf das IPG - Gel geladen.

β 1,3-Glucanase - Verdau (bezogen auf 5mg dw)

Die Zellwandreste werden in 20 µl TrispufferG gelöst. In die Suspension werden 10mU Glucanase (Interspex) gewogen und 45 min bei 25 °C geschüttelt. Nun wird die Lösung mit 180 µl Lysepuffer verdünnt und 1h bei 25 °C geschüttelt. Nach der Extraktion wird die Suspension zentrifugiert (15 min, 14000 rpm) und der Überstand 2D - elektrophoretisch getrennt.

Pufferzusammensetzungen:

SDS- Puffer: 1% (w/v) SDS; 0.1M TrisHCl, pH 8.8

Lysepuffer: 7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) DTT, 0.5% Pharmalyte 3-10

TrispufferC: 0.6% (w/v) DTT, 0.8% (w/v) TrisHCl, pH 4.5

TrispufferG: 0.6% (w/v) DTT, 0.8% (w/v) TrisHCl, pH 7.5

Chitinase: N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, DiploAH gereinigt, proteasefrei, Roche

Glucanase: β -1.3-Glucanase, lyophilisiert, proteasefrei, Interspex products

4.2.2 Darstellung der Zellwandproteine

Die 2D - Elektrophorese für die Zellwandproteine wird in der ersten wie auch in der zweiten Dimension nach Kap. 2.2.3 durchgeführt.

Um eine Spreizung der hochmolekularen Zellwandproteine in der 2. Dimension zu erreichen, wird die SDS - PAGE einer chitingebundenen CWP- Fraktion Dimension in folgender Weise durchgeführt:

Tab. 18: Laufbedingung für die zweite Dimension zur verbesserten Auftrennung hochmolekularer Proteine

	Zeit	Stromstärke IST	Spannung SET
Probeneintritt	1 h	80 mA	200 V
1. Trennungsphase	18 h	160 mA	200 V
<i>Quantitativer Tankpufferwechsel Gesamtvolumen 19,9l für 10 Vertikalgele)</i>			
Akkomodationsphase	30 min	120 mA	200 V
2. Trennungsphase	24 h	155 mA	200 V

Die Zusammensetzung des Tankpuffers für die 2. Trennungsphase entspricht der der ersten Phase.

Der in seiner Ionenkapazität verbrauchte Tankpuffer wird mit der Wasserstrahlpumpe nach der ersten Trennphase abgesaugt und die Kammer sofort wieder befüllt, um eine Austrocknung der Gele zu vermeiden.

4.2.2.1 Interferenzkontrast Mikroskopie der einzelnen Isolationsschritte

Es werden aus vier Phasen der Extraktionsprozedur mikroskopische Interferenzkontrastpräparate angefertigt:

- logarithmisch wachsende Zellen von *S. cerevisiae* (S288c) auf YNB - Medium mit 1200facher Vergrößerung (s. 2.2.1), Methylenblaufärbung
- in SDS solubilisierte und mit Ultraschall aufgeschlossene Zellen (s. 2.2.2), Methylenblaufärbung
- Filtrat der Zellwandfragmente aus Polyethersulfonmembran bei 1200 facher Vergrößerung (s. 4.3.1.2), Methylenblaufärbung
- Präparat nach Chitinaseverdau der Zellwandfragmente mit 800 facher Vergrößerung (s. 4.3.1.3.1), Lowry- Färbung

Zur Aufbereitung der methylenblaugefärbten Präparate wird die in 2.2.1.5 beschriebene Prozedur bis in die entsprechende Phase durchgeführt, dann werden 20 µl entnommen, gevortext (20 s, 60 W) und schließlich auf einen Objektträger pipettiert. Die weitere Methylenblaufärbung wird wie in Kap. 2.3.1.5 beschrieben, durchgeführt. Die Präparation für die Mikroskopie der lowrygefärbten Extrakte wird wie folgt durchgeführt:

Nachdem 15 µg Chitinase (Roche) zu den in 20 µl TrispufferC gelösten Zellwandfragmenten gegeben wurden, werden 0,1 µg kristallines SDS zugegeben und 2 min bei 25 °C gevortext. Zu 20 µl dieser Suspension werden 20 µl Lowry Reagenz pipettiert und 10 min bei 25 °C geschüttelt.

Nach 20 min Inkubation in ruhender Lage wird 0,1 ml Folin & Ciocalteus Phenol zugegeben und die blaue Färbung bei 25 °C unter leichtem Schütteln 30 min entwickeln lassen.

20 µl der gefärbten Suspension werden auf einen Objektträger pipettiert und langsam unter ständiger mikroskopischer Kontrolle bis zum Auskristalisieren im Inkubationsschrank (60 °C) erwärmt. Nach vollständiger Kristallisation werden Deckgläser mit Wachsfüßen angefertigt und damit vorsichtig das Präparat bedeckt.

4.2.2.2 2D - Elektrophorese von glucangebundenen CWPs nach Streßinduktion

Es wird *S. cerevisiae* (Wildtype S288C) nach Standardbedingungen in für 5 mg Trockengewicht (10 - facher Ansatz) bis zu einer OD von 1,0 kultiviert (s. Kap. 2.2.1). Für die Streßinduktion der vitalen Zellen wird das ausgearbeitete Protokoll von Kapitel 3 angewandt, in dem schockgefrorene Zellen (-196 °C) , mit -23 °C gefrorenen Zellen und lyophilisierte Zellen mit dem streßfreien Wildtyp verglichen werden.

Nach dieser subletalen Streßinduktion werden die im Parallelansatz geführten Proben sofort in 200 µl heißen SDS - Puffer resuspendiert und mit dem Ultraschall (1 s, 15 Zyklen) aufgeschlossen. Anschließend werden die Schritte 4.2.1.2 bis 4.2.1.6 der CWP - Präparation durchgeführt. Die extrahierten CWPs werden nun auf einen IPG 4-9 (Auftragsvolumen 140 µl) in der ersten Dimension und auf ein Vertikalgel (T13, C 2,7) in der zweiten Dimension aufgetrennt.

4.2.2.3 MS - Identifikation des CWP - Extrakts

Für die Identifikation der chitin - und glucangebundenen Zellwandproteine wird die in 2.2.1 beschriebene Aufzucht und Extraktion durchgeführt, mit der Änderung, daß keine radioaktive Markierung, sondern eine Silberfärbung für die Proteinvisualisierung (2.2.3.4.1) zur Anwendung kommt. Nach Färbung und computerdensitometrischer Image Analyse werden detektierte Spots keratinfrei ausgestanzt, in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und im Labor von Prof. Dr. Matthias Mann (University of Odense) mittels MALDI - MS Analyse zur identifiziert.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Zusammenfassung der methodischen CWP - Extraktion

Es ist bisher nicht gelungen, Zellwandproteine der Hefe in einer reinen Fraktion zu extrahieren und elektrophoretisch zu trennen und zu identifizieren. Gründe hierfür mögen die schlechte Löslichkeit oder häufige Modifikationen insbesondere die der Proteinglycosylierung sein [92, 116].

Im folgenden ist eine Extraktionsmethode beschrieben, mit der es erstmals gelang, mycotische Zellwandproteine für die 2D Elektrophorese zu extrahieren.

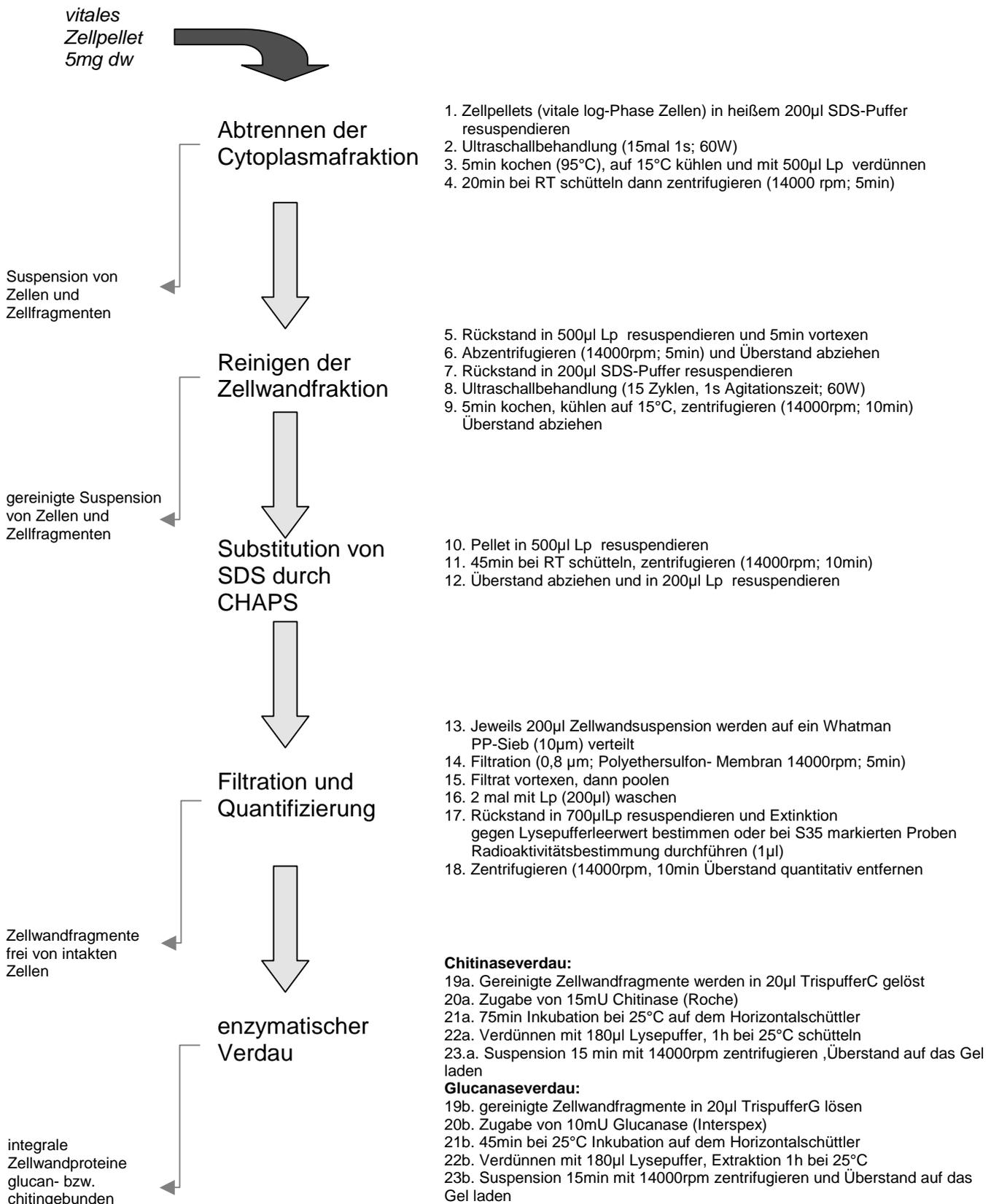


Abb. 68: Zusammenfassende Darstellung der Extraktionsmethode von mycotischen Zellwandproteinen

4.3.1.1 Fraktionierung, Reinigung und SDS - Substitution

Nachdem vitale Pellets mit 5 mg dw kultiviert wurden, besteht der erste Schritt darin, eine möglichst vollständige Entfernung der leicht löslichen Proteine des Cytosols und der Organellen zu erreichen. Zellwandproteine können höchstwahrscheinlich auf Grund ihrer niedrigen Kopienzahl pro Zelle und der schlechten Löslichkeit, nicht in der cytoplasmatischen Fraktion der Zelle detektiert werden. Die Proteine der abgetrennten Fraktion sind im folgendem Gel dargestellt.

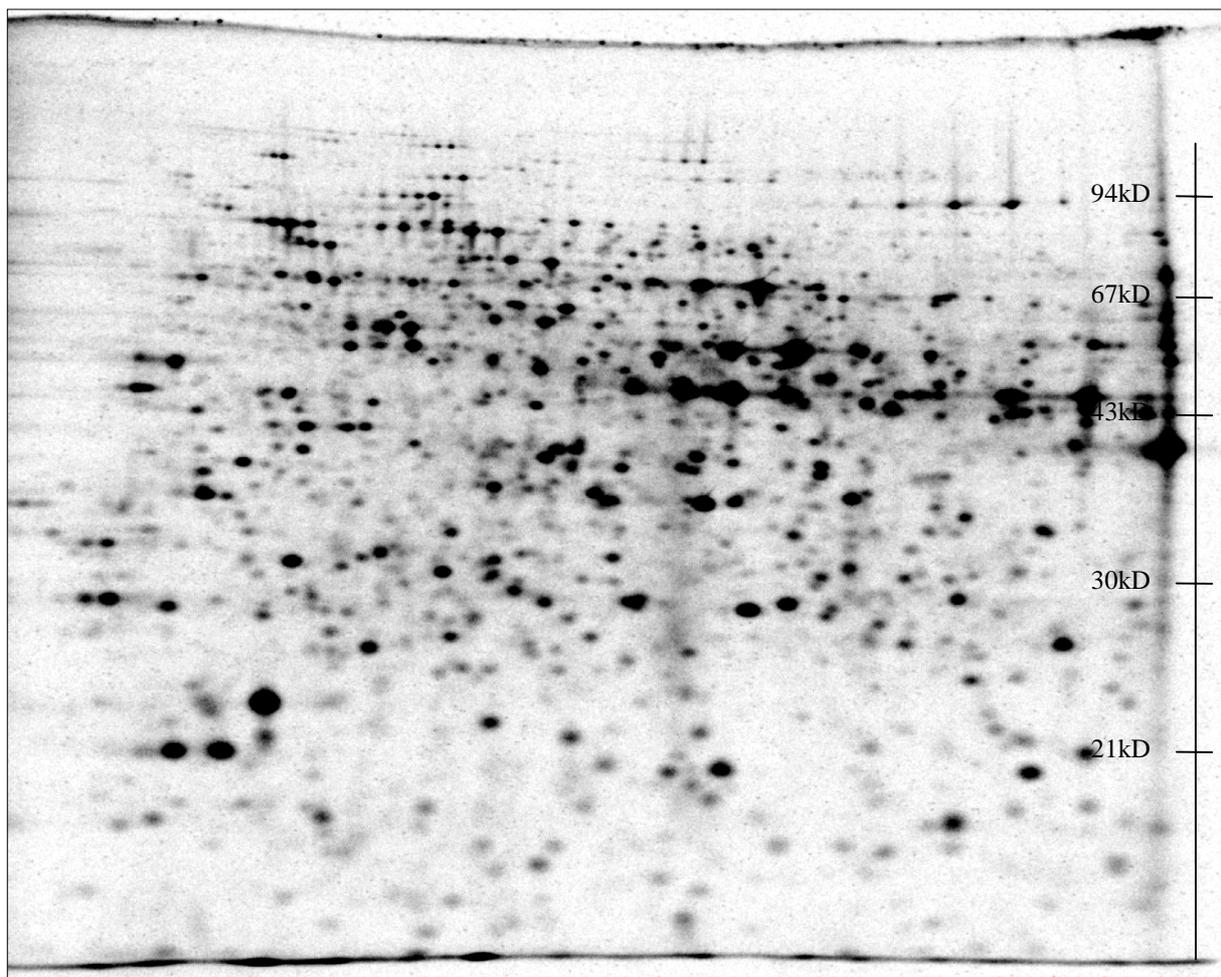


Abb. 69: Elektrophoretische Trennung der im ersten Schritt der CWP- Extraktion entfernten Proteine des Cytosols und der Organellen. ^{35}S - Methionin markierter Extrakt; IPG 4 - 7; Auftragsmenge 2,5 Mio cpm.

Wie im Kap. 2.2.2 gezeigt wurde, führt die erstmalige Ultraschallbehandlung unter den beschriebenen Bedingungen zu einem Zellaufschluß von etwa 40%. Um eine quantitative Entfernung der cytoplasmatischen Fraktion zu erreichen, wurde der Vorgang des Zellaufschlusses und der Proteinsolubilisierung (mit SDS und Lysepuffer) mehrfach wiederholt (s. Abb. 68).

Die Substitution von SDS wird nötig, da Konzentrationen von über 0,25% SDS im aufzutragendem Extrakt die isoelektrische Fokussierung stören. SDS ist ein starkes anionisches Detergenz, das als einzige Substanz eine Affinität zu allen gelösten Proteinen zeigt [29, 36]. Es eignet sich daher im besonderen für die quantitative Entfernung der gelösten cytoplasmatischen Proteine.

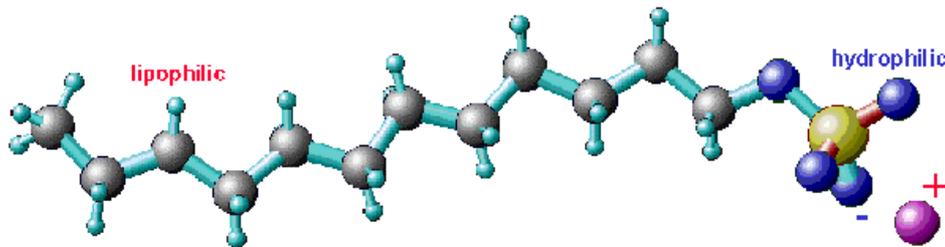


Abb. 70: Strukturformel des anionischen Detergenz, Natriumdodecylsulfat (SDS).

4.3.1.2 Ultrafiltration und Quantifizierung

Die Filtration stellte einen entscheidenden Schritt in der Präparation dar, da ohne erfolgreiche Filtration trotz mehrmaligem waschen, sich ausschließlich "high abundant - proteins" hauptsächlich der Glycolyse und der Mitochondrien auf dem Gel zeigten. Das Gelmuster war nahezu identisch mit der in Abb. 69 gezeigten Exposition.

Hefezellen besitzen entsprechend ihrem Alter und ihrem Wachstumsstadium unterschiedliche Stabilität und Integrität bezüglich äußerer Einwirkungen. Es scheint, daß trotz mehrmaligen Zellaufschlußintervallen (SDS - kochen, Ultraschallbehandlungen) einige besonders robuste Zellen intakt geblieben waren, und diese dann im folgenden Schritt, nach Zugabe der zellwandaktiven Enzyme 1,3 β -Glucanase bzw Chitinase, lysiert wurden. Dabei wurden deren leicht lösliche Proteine des Cytoplasmas freigesetzt und schwerlösliche Proteine der Zellwand fielen aus [105, 113, 115]. Ein Grund für das geringe Löslichkeitsprodukt von Zellwandproteinen kann ihr hoher Modifizierungsgrad (Glycosilierung) sein [109, 111, 112].

Diese schlechte Löslichkeit von Zellwandproteinen konnte im Versuch tatsächlich gemessen werden. Bei der Zugabe von nur 5mU leichtlöslicher nicht markierter 1,3 Glucanase zu dem radioaktiv markiertem Extrakt von CWPs, fiel die CWP - Aktivität im solubilisierten Überstand um 15 - 30%. Es scheinen für Proteine, ähnliche Zusammenhänge wie beim Löslichkeitsprodukt anorganischer Ionen, zu gelten.

Um vor dem zellwandlytischen Verdau sämtliche noch intakten Zellen aus dem Extrakt zu entfernen, wurde die Suspension mit einer 0,8 µm Membran gefiltert. Da derartige Membranen für Volumina bis 200 µl und Zentrifugationsgeschwindigkeiten bis 14000 rpm nicht auf dem Markt erhältlich sind, wurden ausgehend von einem 400 µl Whatman Polypropylensieb (10 µm Porengröße), 0,8 µm Membrane verschiedener Hersteller und Materialzusammensetzungen in das Whatmansieb steril eingepaßt und das Filtrat des zellwandverdauten Extrakts nach elektrophoretischer Trennung auf Eignung geprüft.

Da sich die Hersteller bzgl. Proteinaffinitäten und Reinigungsgrad der Membranen stark widersprechen, und eine Absättigung der Membran mit leichtlöslichem Albumin wegen Ausfällen der CWPs nicht möglich war, wurden in der oben beschriebenen Weise neun verschiedene Membranen getestet.

4.3.1.2.1 Keratinkontaminationen der Membranen

Da nach Filtrationen mit Cellulose-, Cellulosetriacetat- und Polyethersulfonmembranen von Renner und MembraPure keine Zellwandproteine, sondern hauptsächlich Keratinproteine elektrophoretisch nachgewiesen wurden (s. Abb. 71), sind im weiteren ausschließlich Membrane von Schleicher & Schüll verwendet worden.

Die Abwesenheit der CWPs nach Filtration mit Renner und MembraPure Membranen kann auf zu große Proteinaffinitäten der verschiedentlich chemisch stabilisierten Membranen zurückzuführen sein. Hohe Keratinkonzentrationen in Membranen können beispielsweise durch Unsauberkeiten in deren Herstellung entstehen.

Im folgenden ist ein typisches Gel nach Filtration mit Membranen von MembraPure oder Renner dargestellt.

Die Identifikation der Proteine mittels MALDI - MS ergab, daß es sich um Cytokeratin der K1- und K2- Gruppe handelt. Diese Keratinkontaminationen werden durch die Gene KTR10 bis KTR19 im Fall der K1 - Familie, und KTR1 bis KTR9 exprimiert.

K1 - Keratin haben gewöhnlich epidermalen Ursprung , K2 - Keratine stammen meist aus Haaren [116, 129, 133].

Abbildung 71 zeigt das typische 2D - Muster der Keratinkontaminationen.

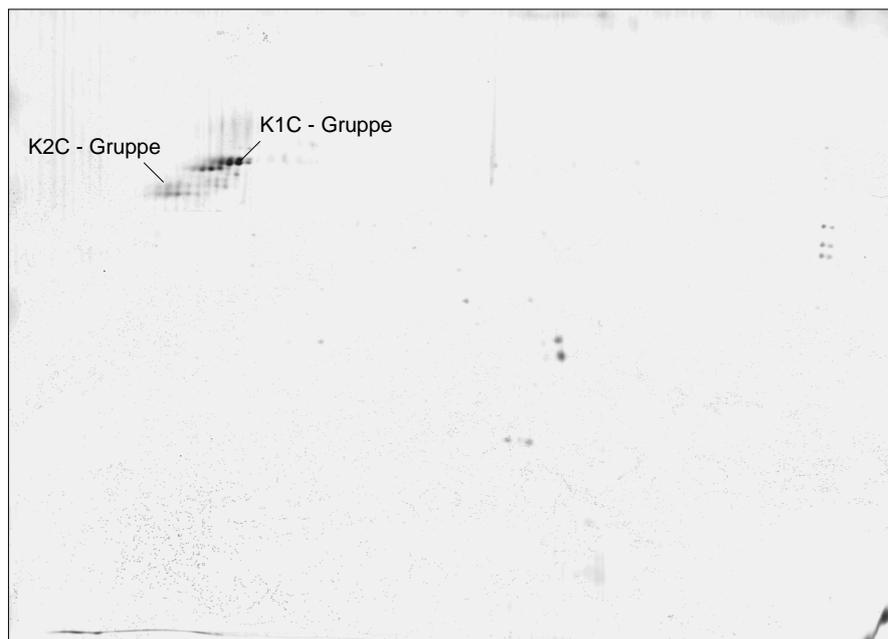


Abb. 71: Keratinkontamination nach Filtration der chitinaseverdauten CWP - Fraktion mit einer Polyethersulfonmembran (0,8 µm) von MembraPure. 2D Elektrophorese: IPG 4 - 9;

4.3.1.2.2 Ultrafiltration mit regenerierter Cellulose-, Cellosetriacetat- und Polyethersulfon

Die Membrane von Schleicher & Schüll sind glyceringetränkt und zeigten im Vergleich zu den beiden anderen Herstellern relativ hohe Stabilität bei der Ultrafiltration der Zellwandfraktion; nach 2D - elektrophoretischer Trennung waren nur geringe Keratinkontaminationen auf den Gelen nachweisbar.

Die cpm - Werte der scintillatorischen Isotopenbestimmung der Membrane und des Filtrats sind in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 20: Szintillationsmessung der Membran und des Filtrats verschiedener Ultrafiltrationen (S &S)

	cpm / Filtrat	cpm / Filter	Färbung	Konsistenz
reg. Cellulose	3080	30900	farblos	labil
Polyethersulfon	12400	18800	bräunlich	stabil
Cellulosetriacetat	5690	26600	gelblich	bedingt stabil

Da zu diesem Zeitpunkt die Zellwandproteine noch nicht durch enzymatischen Verdau freigesetzt worden sind, läßt sich alleine durch die cpm - Messung der

Membranen keine Aussage machen, ob die Aktivität der Membran aus Proteinen noch intakter Zellen oder aus integralen CWP der Zellwandfragmente stammt.

Die Isotopendetektion des Filtrats gibt erste Anhaltspunkte für eine Eignung der Membran. Die hohen Aktivitäten im Filtrat nach Polyethersulfonfiltration lassen eine quantitative Filtration der CWP - Fragmente vermuten; möglich wäre aber auch eine "Verunreinigung" durch cytoplasmatische Proteine.

Die Membranen von Schleicher & Schüll zeigen eine hohe Stabilität bei der Ultrafiltration der Zellwandfraktion.

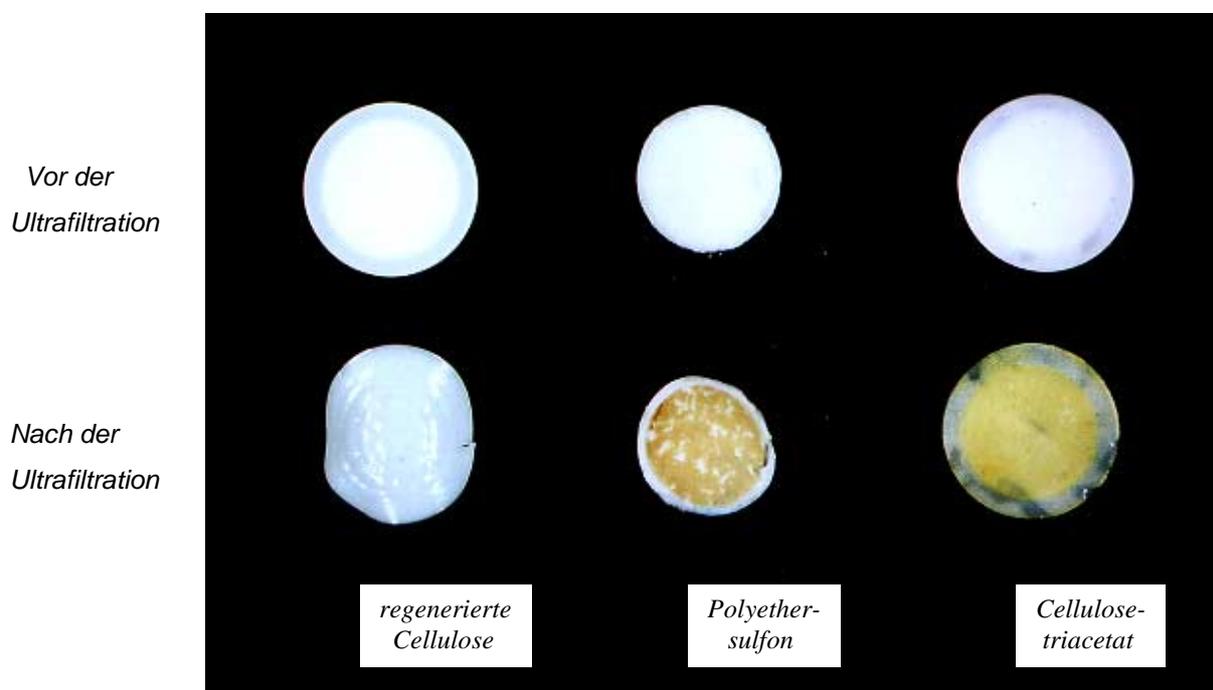


Abb. 72: Ultrafiltrationsmembranen aus regenerierte Cellulose, Polyethersulfon und Cellulose-triacetat (Hersteller Schleicher & Schüll)

Die Stabilität der Membran ist ein weiteres wesentliches Kriterium für die Reproduzierbarkeit der Filtration. Während die Membranen aus Cellulose nach der Filtration zum Einreißen neigen, behält die Polyethersulfonmembran ihre Anfangsstabilität nahezu bei. Die bräunliche bzw. gelbliche Färbung der Membrane (PS und CTA) läßt auf die Filtration weiterer, für die Elektrophorese möglicherweise störender Substanzen schließen.

Einen endgültigen Aufschluß über den Filtrationserfolg gibt eine 2D elektrophoretische Trennung, der in diesem Fall mit Chitinase verdauten Zellwandfragmente (Abb. 73).

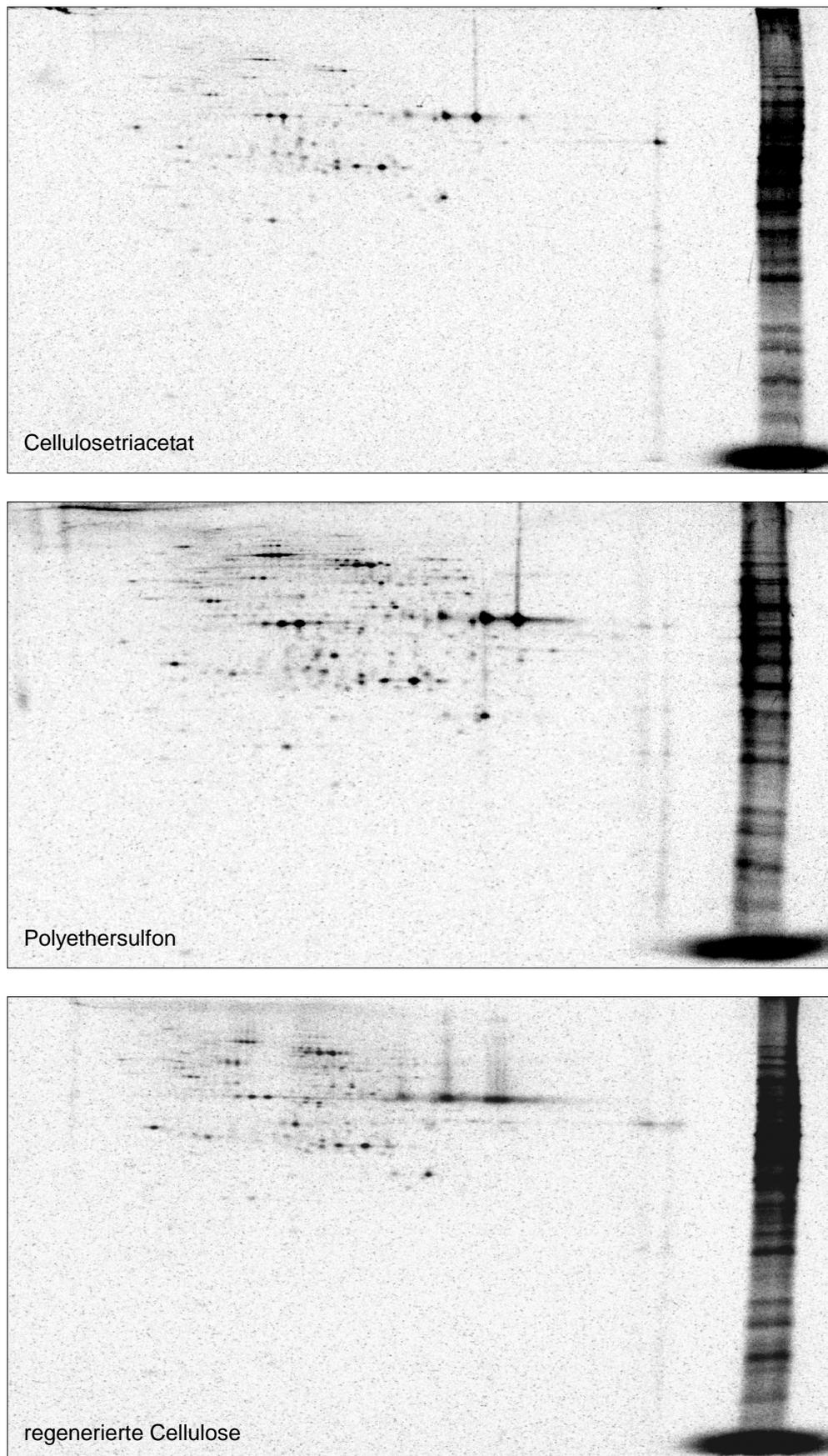


Abb. 73: 2D - Elektrophoretische Trennung (IPG 4 - 9, m. radioaktiver Marker) von ^{35}S - markierten CWP nach Chitinaseverdau bei Ultrafiltration mit reg. Cellulose -, Polyethersulfon - und Cellulosetriacetatmembran

Bei Vergleich der drei Gele erkennt man, daß bei allen drei Filtrationen, eine quantitative Entfernung cytosolischer Proteine erfolgt ist (vgl. 4.3.1.1). Deutlich erkennbar ist auch die unterschiedliche Proteinmenge im Filtrat, die dann im enzymatischen Verdau freigesetzt werden konnte. Da bei allen Filtrationen Membranen gleicher Porengröße (0,8 µm) und zudem gleiche Zellausgangsmengen (5 mg dw) verwendet wurden, muß der Grund in unterschiedlichen CWP - Affinitäten der Membrane gesucht werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Polyethersulfonmembran geringste Bindungsaffinitäten zu Zellwandproteinfragmenten, regenerierte Cellulose - und Cellulose-triacetatmembranen dagegen erhöhte Affinitäten aufzeigen. Die computerdensitometrische Auswertung der elektrophoretischen Trennungen decken sich somit mit der cpm - Messung des Filtrats vor dem enzymatischen Verdau. Der radioaktive Molekulargewichtsmarker wurde aus der cytosolischen Fraktion hergestellt. Die Auftragsmenge pro Gel betrug 2,5 Mio cpm für den CWP - Extrakt und 1,5 Mio cpm für den Marker. Für die optimierte Filtration weiterer CWP - Fraktionen wurde ausschließlich die Polyethersulfonmembran von Schleicher & Schüll verwendet.

4.3.1.3 Enzymatischer Verdau zur Freisetzung der CWPs

Für die Optimierung des enzymatischen Verdau wurden drei Chitinasen und zwei Glucanasen getestet. Da die Hersteller keine näheren Angaben über Proteaseaktivitäten, Kontaminationen und substratspezifische Aktivitätsangaben bei diesen Enzymen machen, wurden die verschiedenen Enzyme auf Eignung für den Verdau der Zellwandfragmente getestet.

4.3.1.3.1 Chitinaseverdau

Obwohl die genaue Struktur der mycotischen Zellwand noch nicht bekannt ist, wurde in neueren Veröffentlichungen die Bedeutung des Chitins für die Vernetzung der verschiedenen Zellwandkomponenten besonders hervorgehoben [96, 120, 124]. Der Anteil des Chitins an der Zellwandstruktur beträgt nur etwa 2%, kann aber nach einer Chitinsyntheseinhibition zu stark veränderten Phänotypen oder auch zur Letalität der Zelle führen, wodurch der mycotische Chitinsynthesekomplex der Hefe ein wertvolles Target für ein Antimykotika darstellt.

In der CWP - Extraktionsprozedur wurde die Chitinase, wie auch die parallel eingesetzte Glucanase, für die Lyse der gereinigten Zellwandfragmente verwendet. Das Enzym setzt im besonderen integrale Zellwandproteine durch den Verdau der Zellwandfragmente frei. Die Lyse der Zellwandfragmente beruht im Fall der Chitinase von Roche (N-Acetyl- β -D-glucosaminidase) auf folgender Reaktion:

GluNAc β 1 \rightarrow 2 Man	keine Spaltung von	GluNAc β 1 \rightarrow 4 Man
GluNAc β 1 \rightarrow 3 Gal	folgenden Bindungen:	GluNAc β 1 \rightarrow 6 Man
GluNAc β 1 \rightarrow 6 Gal		

O - modifizierte Glucane können nur teilweise gespalten werden.

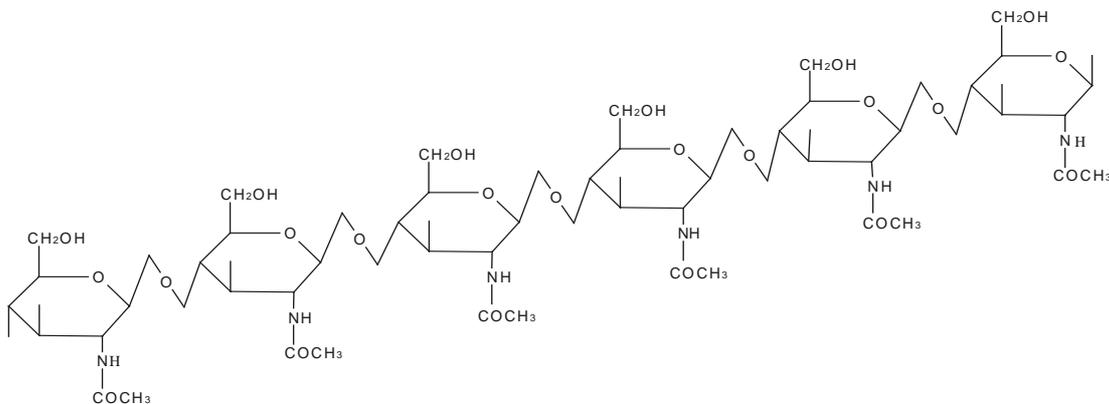


Abb. 74: Struktur des nicht substituierten Chitins, Bestandteil der Zellwand von *S. cerevisiae* und Target der N-Acetyl- β -D-glucosaminidase.

4.3.1.3.1 Wirkungsspektren verschiedener Chitinasen

Im folgenden wurden drei substratfreie Chitinasen verschiedener Anbieter und lytischer Eigenschaften für die Eignung zur Freisetzung der CWPs aus den gereinigten Zellwandfragmenten geprüft. Nach Herstellerangaben zeigen alle drei Enzyme Chitinaseaktivität und eignen sich für die Lyse von Hefezellen.

Angaben über genaue Aktivitäten bzw. Kontaminationsbeschreibungen waren nur für die Chitinase von Roche erhältlich. Diese Chitinase ist eine N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, welche aus der Kultur von *Diplococcus pneumoniae* durch Ultrazentrifugation mit anschließenden Reinigungsschritten gewonnen wird. Diese Chitinase ist frei von α und β - Galaktosidase, α und β - Mannosidase, α und β - Glucosidase und α - Fruktosidase. Des weiteren konnte laut Herstellerangaben keine Proteaseaktivität (nach der Methode von Twining et. al.) nachgewiesen werden [120, 124].

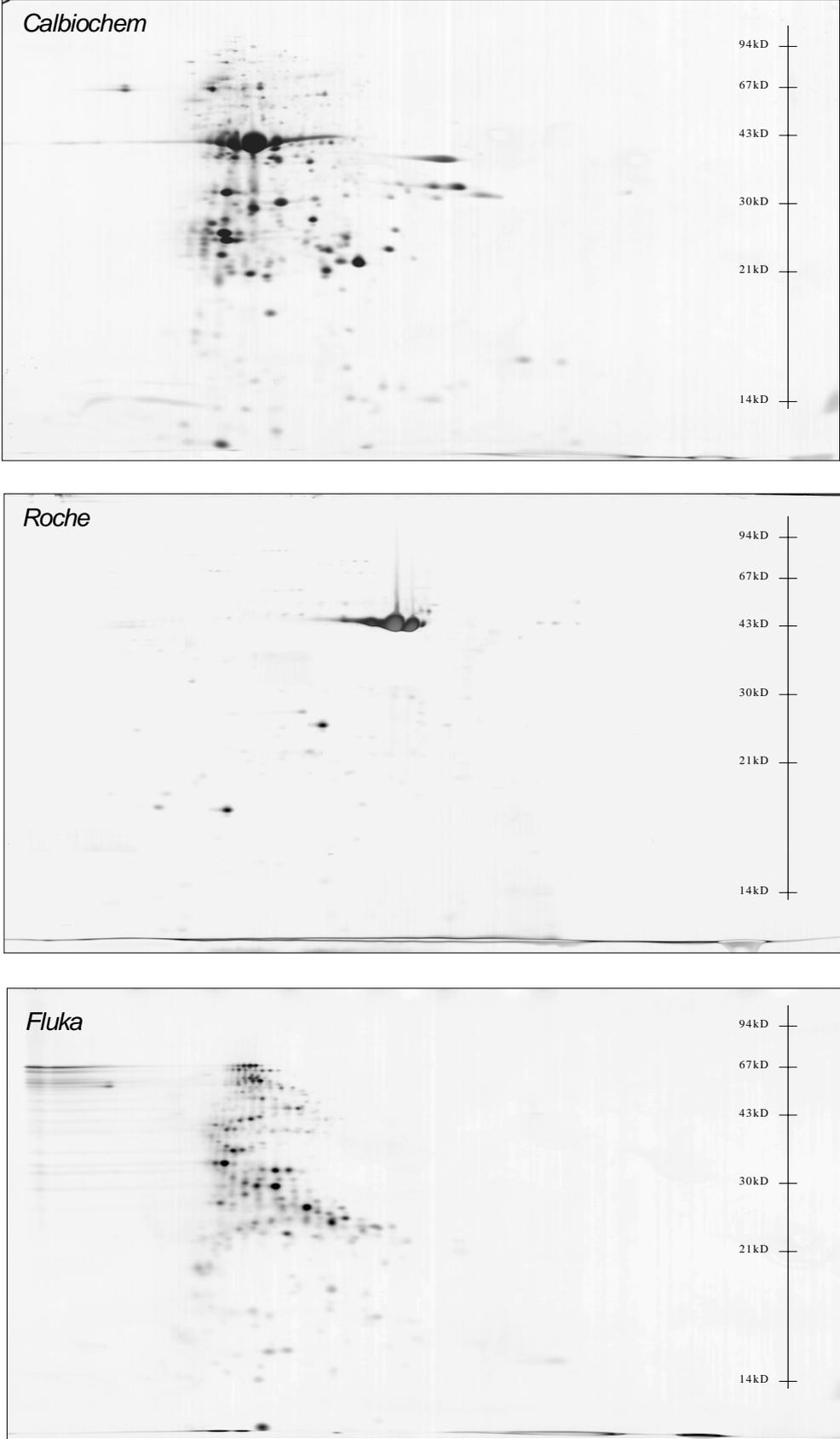


Abb. 75: 2D - Elektrophoretische Trennung (IPG 4 - 9) der Chitinasen von Calbiochem, Roche und Fluka; Auftragsmenge 1,5 units.

4.3.1.3.1.2 Detektion chitingebundener CWPs

Für die Detektion chitingebundener (Abb. 76), und glucangebundener (s. Abb. 78) Zellwandproteine wurden das substratfreie Enzym, die silbergefärbte elektrophoretische Trennung der CWP - Fraktion und die ³⁵S - markierte Fraktion gegenübergestellt und computerdensitometrisch ausgewertet.

Nach Auswertung der Gele können Zellwandproteine der Hefe, von Spots der Acetylglucosaminidase und von Keratinverunreinigungen im silbergefärbten Gel unterschieden werden, da nur Zellwandproteine radiokativ markiert sind. Die Zuordnung der Spots im silbergefärbten Gel wird notwendig, da eine MALDI - TOF Identifizierung aus dem radioaktiven Exponat nicht gelingt.

Die Acetylglucosaminidase zeigt in ihrer substratfreien Form nach einer elektrophoretischen Trennung (IPG 4 - 9) im wesentlichen sechs Proteinspots, die im Radiogram nicht detektiert wurden. Zudem konnten Keratinkontaminationen bestimmt werden (s. Abb. 72) , die weder im substratfreien Enzym, noch im radioaktiv markierten Exponat detektiert wurden. Eine ähnliche Keratinanreicherung im silbergefärbten Gel konnte bei der Extraktion der glucangebundenen Zellwandproteine beobachtet werden (Abb. 78).

Diese Keratine mußten demnach im Verlauf der Zellaufzucht, der CWP - Präparation oder der Silberfärbung eingebracht worden sein.

Im chitinaseverdauten Extrakt wurden aus dem Radiogram 46 Zellwandproteine von *Saccharomyces cerevisiae* detektiert, von denen vier massenspektrometrisch identifiziert wurden (s. Tab. 22).

Aus dem glucanaseverdauten Extrakt wurden 87 Zellwandproteine detektiert (Abb. 78), von denen sieben mit MALDI - TOF identifiziert wurden (s. Tab. 21).

Die extrahierten Zellwandproteine aus der chitinverdauten, wie auch aus der glucanverdauten Fraktion besitzen Molekulargewichte zwischen 30 - 120 kD und liegen in einem pI Bereich von etwa 5 - 7.

Im folgenden (Abb. 76) ist die zweidimensionale elektrophoretische Trennung (IPG 4-9) der substratfreien Chitinase (Roche), die durch den Chitinaseverdau freigesetzten Zellwandproteine (Silberfärbung) und die radioaktiv markierte Fraktion der CWPs dargestellt.

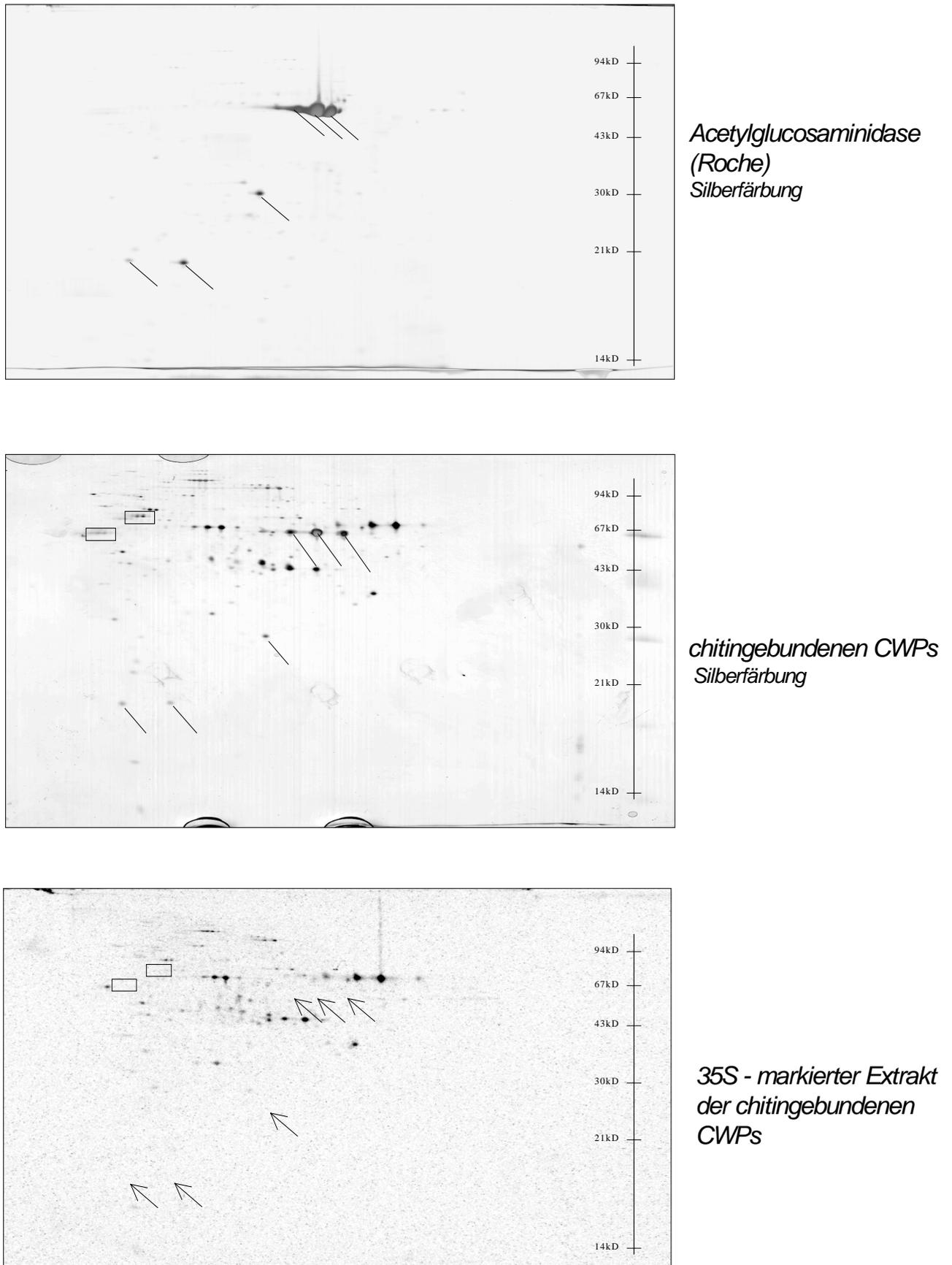


Abb. 76: Darstellung der 2D elektrophoretischen Trennungen (IPG 4 - 9) von substratfreier Chitinase (Roche), silbergefärbter chitinaseverdauter CWPs und dem entsprechenden 35S - Methionin markierten Extrakt. Proteine der Chitinase sind mit Strichen / Pfeilen angedeutet, Keratinspots sind durch Umrandungen markiert.

4.3.1.3.2 Glucanaseverdau

Die Glucanase von Sigma ist als Lyticase / Zymolase (*Arthrobacter luteus* - Isolat) auf dem Markt. Die Aktivität dieses Enzyms ist mit 20000 units/g angegeben. Die wesentliche Aktivität dieses Enzyms ist eine β -1,3- Glucan -laminaripentaohydrolase, welche lineare Glucanpolymere an deren 1-3 Bindungen hydrolisiert.

Neben der β -1,3 - Glucan- laminaripentaohydrolase können Nebenaktivitäten von β -1,3 Glucanase (ca. 1,5 - 100000 units/g), Proteasen (ca. 1,5 - 10000 units/g) und Mannanasen (ca. 1,5 -100000 units/g) enthalten sein. Amylase, Xylanase und Phosphatase können in Spuren vorhanden sein, DNase und RNase wurden nicht nachgewiesen. Aktivatoren dieser Reaktion sind freie SH - Gruppen organischer Moleküle wie Cystein, DTT oder Inkubationsbedingungen bei einem pH von 6,5 und 35 °C.

Auch nach vorschriftsmäßiger Anwendung konnten mit diesem Enzym keine CWPs elektrophoretisch nachgewiesen werden. Grund hierfür ist wahrscheinlich die sehr hohe Proteasekontamination (bis zu 10000 units/g) im Rohenzym, welche einen unmittelbaren Abbau der freigesetzten CWPs bedingen würde (s. Kap. 2.3.2.1).

Die Glucanase von Interspex (San Mateo, USA) ist die wohl weltweit einzige kommerziell erhältliche proteasefreie β - 1,3 Glucanase. Das Enzym wird von einem *E. coli* Stamm produziert, der ein rekombinantes β - 1,3 Glucanasegen eines *Arthrobacter* - Stammes trägt. Das Enzym besitzt eine sehr hohe Aktivität (Lyse von 0,6 Mio Zellen/min bei einem pH von 7,5 und 25 °C), zudem sind keine Nucleinsäuren, RNase- oder DNaseaktivitäten oder Fremdenzyme nachweisbar. Optimale Inkubationsbedingungen stellen reduzierendes Milieu, monobasische Puffer (pH 7,5), eine Temperatur von 25 °C und ein auf die Zellmasse angepasstes Verdauungsintervall dar.

Im folgenden sind die 2D - elektrophoretischen Trennungen der substratfreien Glucanasen von Sigma (Enzymgemisch) und Interspex (Monoenzym) auf einem IPG 4 - 9 dargestellt. Die Enzyme wurden nach den Empfehlungen des Herstellers solubilisiert, dann mit Lysepuffer denaturiert und auf das Gel geladen (Auftragsmenge 1,5 u).

4.3.1.3.2.1 2D - PAGE verschiedener 1,3 β -Glucanasen



Abb.77: 2D - Elektrophoretische Trennung (IPG 4 - 9) der Glucanasen von Sigma und Interspex; Auftragsmenge 1,5 units

Obwohl John et al. für die quantitative Lyse von Hefezellen, Lyseenzyme bestehend aus verschiedenen Komponenten (Mannanase, Chitinase, Glucanasen) empfiehlt, scheinen gerade diese Enzyme auch stark mit Proteasen kontaminiert zu sein [97]. Da John weniger an einer Expressionsanalyse als vielmehr an der quantitativen Freisetzung des Protoplasten interessiert war, wurden Proteaseaktivitäten der lytischen Enzyme nicht untersucht. Als wesentliches Target für die enzymatische Zellwandlyse, fand auch er die β - 1,3 Glucanstruktur der Mycota, deren enzymatischer Spaltung höchste Skleroplastenbildung zur Folge hatte.

Asenio et. al., der eine Methode für die Extraktion recombinanter 60nm Proteinpartikel (VLPs, virus like particles) nach enzymatischer Lyse aus dem Cytosol der Hefe fand, konnte einen Zusammenhang von proteolytischer Aktivität und Enzymgemischen feststellen [94, 111]. Bei der Verwendung eines "crude lytic enzyme complex" konnten trotz einer Zellaufschlußrate von 50% und der Verwendung von Proteaseinhibitoren wie PMSF, Quecksilberchlorid oder Aprotinin keine VPLs extrahiert werden. Erst nach mehrstufiger Reinigung und Trennung des proteolytischen und zellwandlytischen Komplex war bei 17% Zellaufschlußrate die Extraktion der VLP erfolgreich.

Ähnliche Erkenntnisse wurden auch bei der oben beschriebenen Extraktion der glucan-, bzw chitingebundenen CWPs gewonnen. Bei Verwendung von Enzymgemischen, oder nicht mehrfach gereinigten Präparaten wie z.B. der Lyticase von Sigma, konnten keine CWPs elektrophoretisch nachgewiesen werden.

Die elektrophoretische Trennung der substratfreien Lyticase zeigt viele Proteine im Bereich von 25 bis 60 kD. Viele Proteasekomplexe, wie Aminopeptidase 1 (APE1), Carboxypeptidase S (CPS1), Proteinase A (PEP4) oder Dipeptidylaminopeptidase B (DAP2) sind bereits gut beschrieben und weisen organismusübergreifend Molekülgewichte von 35-70 kD und isoelektrische Punkte von pI 5 - 8 auf [27, 34]. Da viele der aufgetrennten Proteine des Sigma - Präparates in diesem Bereich liegen, liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei unter anderen um aktive Proteasen handelt.

Für die Extraktion der glucangebundenen CWPs wurde ausschließlich die proteasefreie β - 1,3 Glucanase von Interspex verwendet. Die weiteren Proteine des Interspex- Präparates (s. Abb. 77) könnten beispielsweise proteolytisch inaktive Enzyme sein, die zum Glucanasekomplex der Hefe gehören.

4.3.1.3.2.2 Detektion glucangebundener CWPs

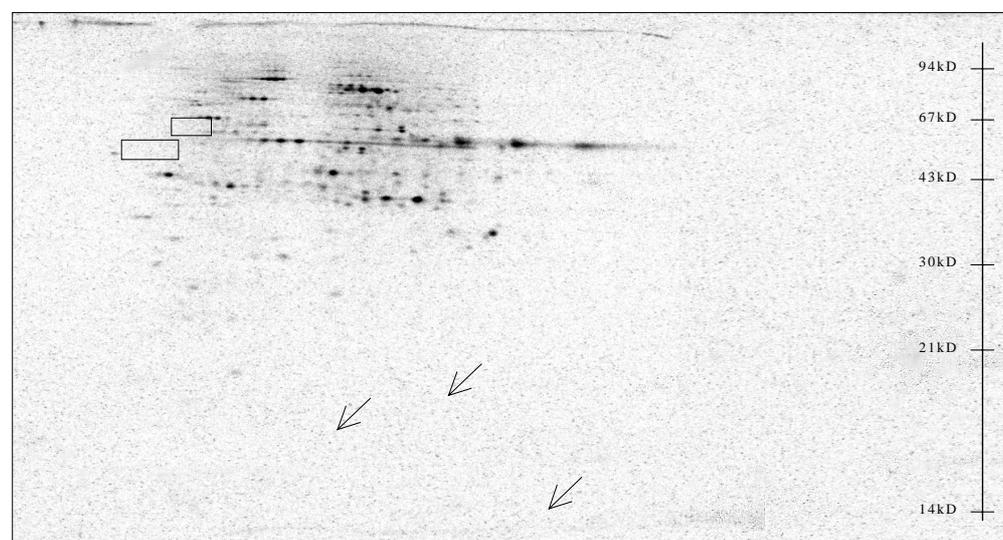
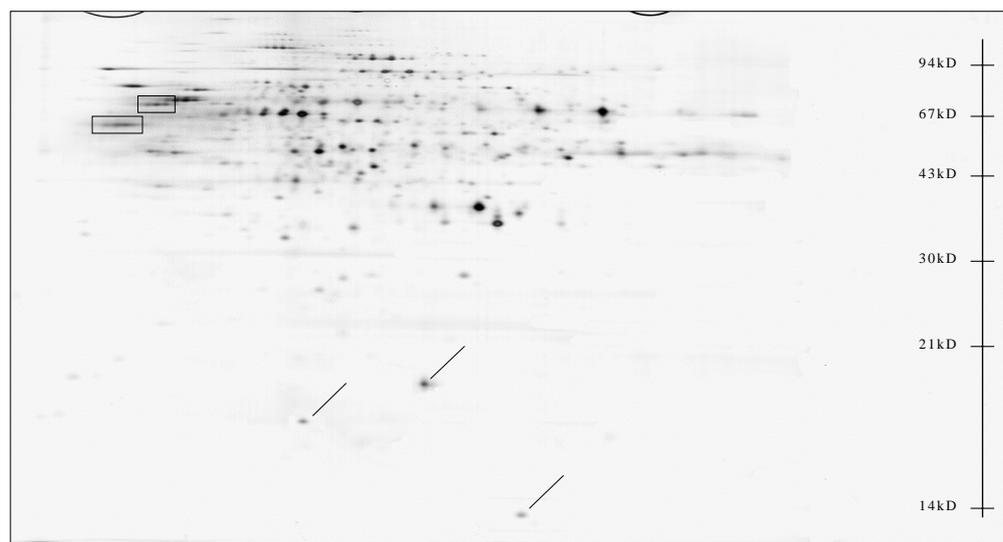
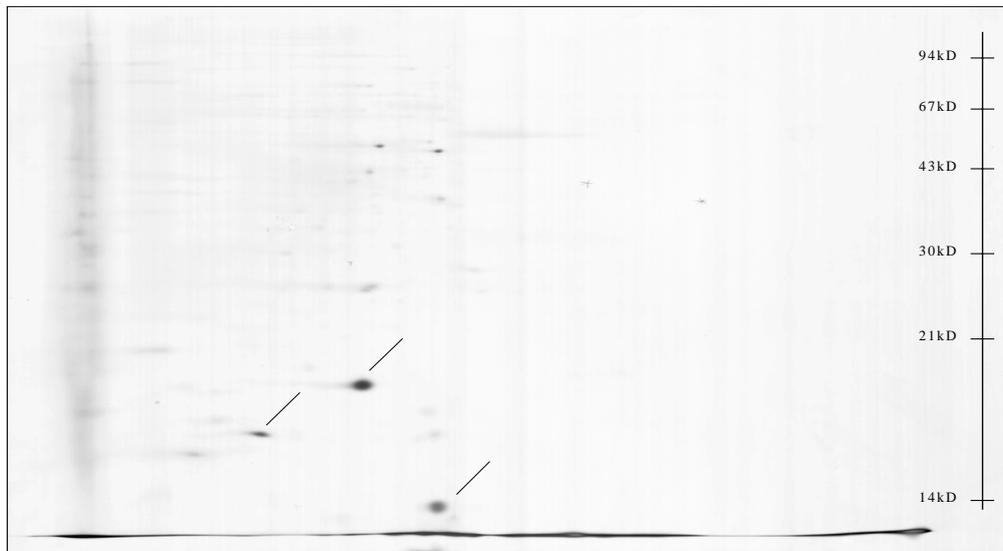


Abb. 78: Vergleich der 2D - elektrophoretischen Trennungen (IPG 4 - 9) von substratfreien Glucanase (Interspex), silbergefärbter glucanverdauter CWPs und dem entsprechenden 35 S - Methionin markierten Extrakt. Proteine der Glucanase sind mit Strichen / Pfeilen angedeutet, Keratinspots sind durch

4.3.1.4 Fazit

Für die Trennung durch Ultrafiltration von intakten Zellen und Zellwandfragmenten, hat sich die Polyethersulfonmembran (0,8 µm) bzgl. Proteinbindungsaffinität und Stabilität als am geeignetsten erwiesen. Nach Wirkungsanalyse von fünf verschiedenen zellwandlytischen Enzymen haben sich die β -1,3 Glucanase von Interspex und die Acetylglucosaminidase von Roche als geeignet für die Freisetzung der CWPs in *S. cerevisiae* erwiesen. Im chitinaseverdauten Extrakt konnten aus dem Radiogramm 46 Zellwandproteine detektiert werden, von denen vier massenspektrometrisch identifiziert wurden (s. Tab. 22). In dem glucanaseverdauten Extrakt wurden 87 Zellwandproteine detektiert (Abb. 78), von denen sieben mit MALDI - TOF identifiziert wurden (s. Tab. 21).

4.3.2 Darstellung der CWPs

Um die Zellwandproteine der Hefe aus dem gesamten Proteom detektieren und fraktionieren zu können, wurden mehrere Präparate für die Interferenzkontrastmikroskopie angefertigt und radioaktive Isotopendetektion in den einzelnen Isolationsschritten durchgeführt. Für eine verbesserte Darstellung der CWPs wurden modifizierte Bedingungen in der elektrophoretischen Trennung angewendet.

4.3.2.1 Interferenzkontrast Mikroskopie aus den einzelnen Isolationsschritten

Für die Detektion der Zellwandproteine wurden Präparate für die Interferenzkontrastmikroskopie von den einzelnen Isolationsschritten angefertigt.

Die erste Aufnahme (Abb. 79a) wurde aus vitalen geernteten Zellen der logarithmisch wachsenden Kultur durchgeführt, die in dieser Weise am Beginn der Extraktionsprozedur verwendet wurden. Die Aufnahme zeigt ungefärbte intakte Zellen, die teilweise im Knospungsprozeß begriffen sind. Im mikroskopischen Präparat (1200x) können pulsierende Vakuole und Stärkegranula deutlich zugeordnet werden.

Die zweite Aufnahme (1000x) zeigt die Zellen nach Ultraschallaufschluß in SDS - Puffer (Abb. 79b). Das Präparat wurde Methylenblau gefärbt, wodurch selektiv das Cytoplasma, nicht aber die Zellwand gefärbt wurde. Auf dem Photo lassen sich geöffnete Zellen (weiß), von geschlossenen (blau) deutlich unterscheiden. In den noch intakten blaugefärbten Zellen läßt sich bei genauer Betrachtung die ungefärbte

umschließende Zellwand der Hefezelle vom blaugefärbten Inneren, dem Cytoplasma unterscheiden. Die weißen geöffneten Zellen stellen leere Zellhülsen dar, in denen das blaugefärbte Cytoplasma ausgelaufen ist, und die ungefärbte Zellwand die Form der ursprünglichen Zelle andeutet. An den leeren Zellhülsen sind deutlich die mechanische Agitation der Ultraschallwellen zu erkennen. Für die weitere Extraktion der Zellwandproteine müssen diese Zellhülsen von den geschlossenen Zellwänden und dem ausgelaufenen Cytoplasma getrennt und angereichert werden.

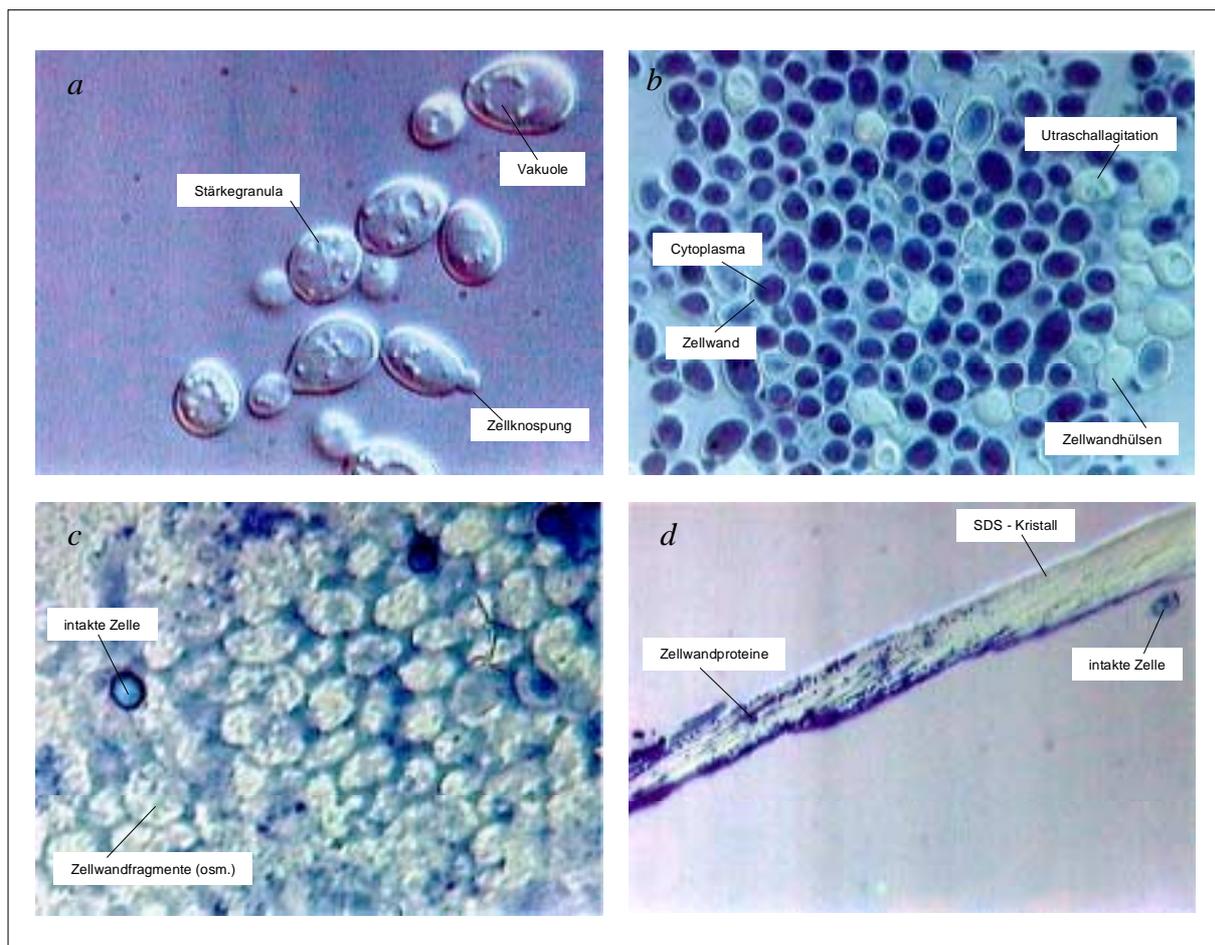


Abb. 79: Interferenzkontrast - Mikroskopie der wesentlichen Isolationsschritte

- log - Phase Zellen, kultiviert auf Glucose synthetischen Medium (ungefärbt, Interferenzkontrast)
- mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen, Zellwandfragmente sind farblos (Methylenblau - Cytosolfärbung)
- Ultrafiltration des Extrakts, gereinigte CW -Fragmente ohne intakte Zellen (Methylenblau - Cytosolfärbung)
- verdaute Zellwandfragmente, Freisetzung der CWPs (Lowry Färbung an SDS - Kristallen)

In der dritten Abbildung (c) sind die Zellen nach der Ultrafiltration durch die Polyethersulfonmembran ($0,8 \mu\text{m}$) und mehrfachen Waschschrinen bei 1200x Vergrößerung dargestellt. Man erkennt eine deutliche Anreicherung der ungefärbten Zellwandfragmente; nur noch wenige kleine intakte Zellen (Blaufärbung) sind in dieser Fraktion vorhanden . Durch das mehrmalige waschen in osmotisch aktiver

Harnstofflösung (Lysepuffer) hat sich die rundliche äußere Form der Zellwand in eine durch Wasserentzug bedingte geschrumpfte Form, verändert. Die Trennung der intakten Zellen von den Zellwandfragmenten ist ein wesentlicher Schritt in dieser Extraktionsprozedur, da bei anschließender Zugabe der zellwandlytischen Enzyme, intakte Zellen enzymatisch aufgeschlossen, und die Proteine des Cytoplasma die schwer löslichen und in niederen Konzentrationen vorhandenen CWP's ausfällen würden.

In Abb. 79d ist bei 1000 facher Vergrößerung die CWP - Extraktion nach dem zellwandlytischen Verdau (Chitinaseverdau) zu sehen. Die Präparatfärbung ist nach Lowry im SDS - Puffer durchgeführt worden; diese Färbung detektiert Proteinpeptidbindungen (Biuretreaktion) in einem blaugefärbten Komplex (s. Kap. 2.3.1.5). Zur Detektion der freigesetzten Zellwandproteine wurde das Präparat bis zur beginnenden SDS - Kristallisation getrocknet. Es erfolgte die Reinkristallbildung des Natriumdodecylsulfats, das SDS - solubilisierte Protein wird an die Kristalloberfläche verdrängt und kann so als blaugefärbtes Protein an der farblosen Kristalloberfläche mikroskopisch detektiert werden. Am rechten Bildrand ist eine intakte Zelle oder dessen Protolast zu erkennen, welche die gesamte Prozedur überstanden haben muß. Derartige Zellen werden durch Zentrifugation (5 min, 14000 rpm) am Ende der Extraktion entfernt.

4.3.2.2 Radioaktive Detektion der CWP aus dem Gesamtproteom

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den einzelnen Isolationsschritten wurden eine ^{35}S - Isotopendetektionen (s. Kap. 1.3.1.6) ausgehend von einer radioaktiv markierten Kultur (12 $\mu\text{Ci/ml}$; OD 1,0; 12ml Kulturvolumen; 5 mg dw) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um folgende Proben:

- 1) ^{35}S - Detektion des Kulturmediums vor der Zellernte
- 2) Messung der Waschlösung (steriles Wasser bidest.) nach dem Ernten der Zellen
- 3) Bestimmung des ^{35}S markierten Proteins nach Ultraschallbehandlung des Pellets
- 4) ^{35}S - Detektion der gesammelten Waschlösungen während der Extraktion
- 5) Bestimmung der Proteinkonzentration nach Glucanaseverdau der Zellwand

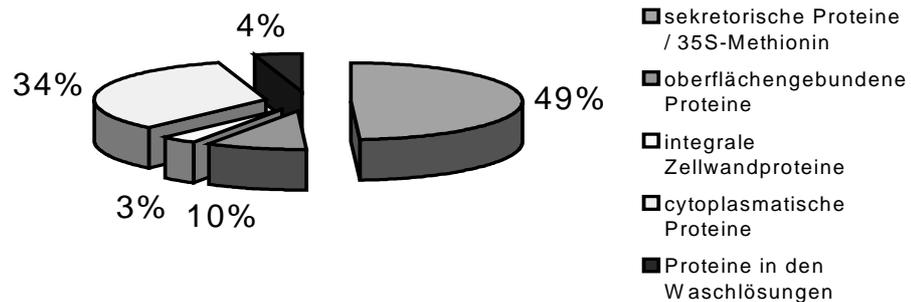


Abb. 80: Darstellung der Proteinverteilung (35S - Markierung) in den einzelnen Isolationsschritten der Extraktionsprozedur

Nach Auswertung der Graphik zeigte sich, daß 49% der Gesamtaktivität im Kulturmedium bzw. als markierte sekretorische Proteine im Medium verblieben. Wie bereits in Kap. 2.2.1.6.2 in der 35S - Absorptionskinetik von Hefezellen beschrieben, muß man davon ausgehen, daß der größte Teil dieser Aktivität aus nicht absorbierten Methionin stammt. 10% der Gesamtaktivität wird durch das Waschen der geernteten Zellen in sterilem Wasser (bidest.) entfernt. Hierbei handelt es sich um adsorbiertes 35 - Methionin und um surfaciale Proteine der Zelle.

Die dritte 35S - Messung wurde nach Ultraschallbehandlung im SDS - Puffer, aus dem klaren Überstand durchgeführt. In dieser Fraktion befinden sich ausschließlich Proteine des Cytosols und der Organellen von geöffneten Zellen. Etwa 1/3 der Gesamtaktivität ist in dieser Fraktion solubilisiert. Proteine dieser Fraktion (s. Abb. 69) wurden entfernt, da diese durch ihre hohe Kopienzahl und Leichtlöslichkeit störend wirken würden. In der vierten Messung wurde die Aktivität aus den gesammelten Waschlösungen, die während der Prozedur angefallen waren bestimmt. Die Messung ergab einen Wert von 4% der Gesamtaktivität. Die Aktivität der Waschlösungen setzt sich aus Proteinen aller Fraktionen zusammen.

Die letzte Messung wurde nach Chitinase und Glucanaseverdau desselben Pellets im Lysepufferextrakt durchgeführt. Die CWP - Konzentration von 3% der Gesamtaktivität zeigen die geringe Kopienzahl dieser Proteine auf, und sind möglicherweise Grund dafür, daß es bisher nicht gelang eine Fraktion von CWPs zu isolieren. Bei dieser Messung wurde die Aktivitätenverteilung der gesamten Prozedur, beginnend von der Markierung der Zellen bis zur Bestimmung der freigesetzten CWP - Konzentration lückenlos dargestellt.

3.4.2.1 Optimierte Trennung der CWP - Fraktion in der 2. Dimension

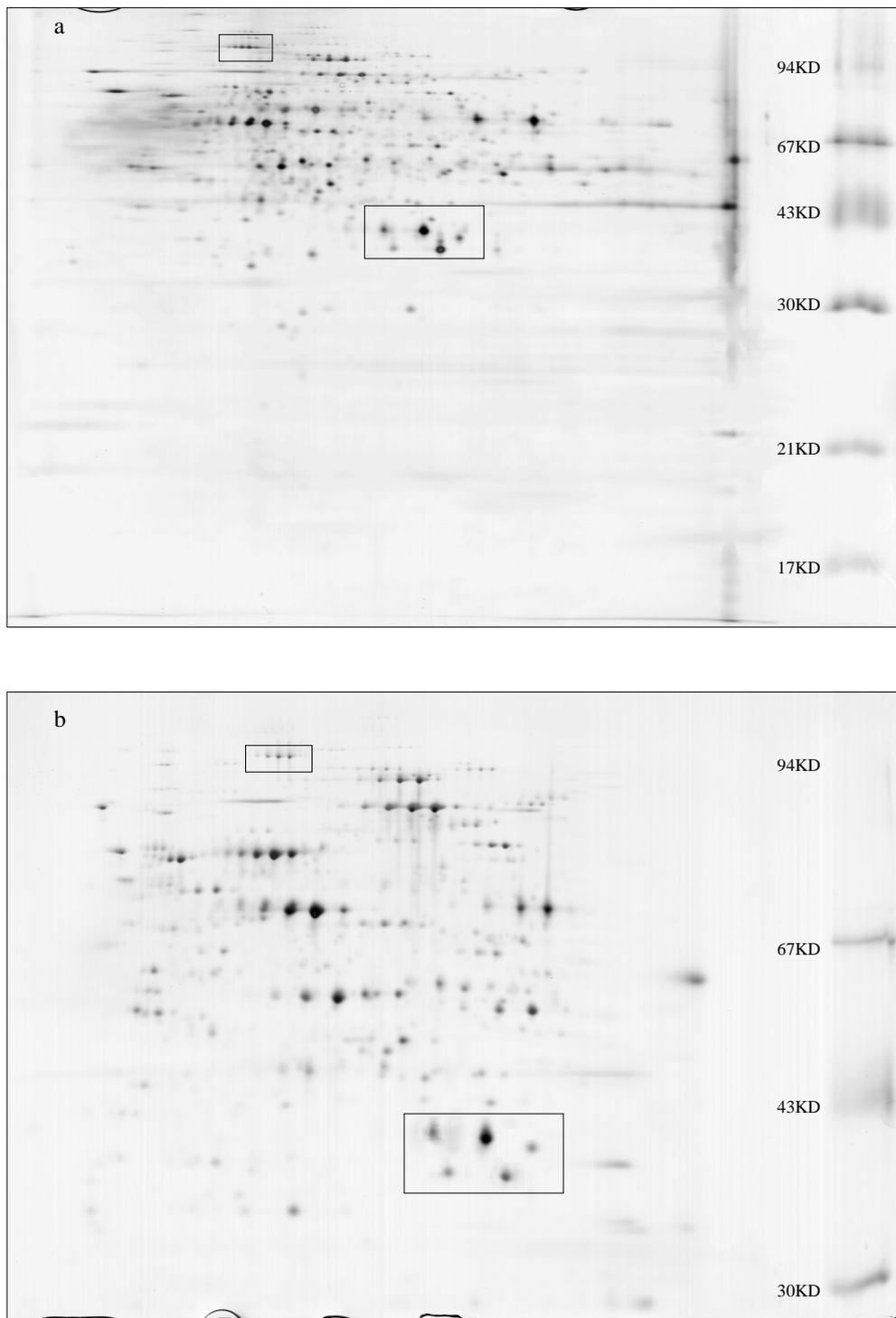


Abb. 81: 2D - Elektrophorese (IPG 4 - 9) der chitingebundenen Zellwandproteine von *Saccharomyces cerevisiae* (Wildtyp 288c)

a) 2. Dimension nach Standardprotokoll

b) 2. Dimension mit verlängerter Laufzeit und Tankpufferwechsel

Die elektrophoretische Trennung der 2. Dimension wurde bisher mit folgenden Parametern durchgeführt [21]:

Probeneinlauf: 1 h 80 mA 200 V

Trennung: 18 h 160 mA 200 V

Das Ergebnis dieser Trennung zeigt sich in Abb. 81 a; da es sich in dieser Fraktion des Hefeproteoms ausschließlich um Proteine im Molekulargewichtsbereich von 120 - 30 KD handelt, macht es Sinn diese Proteine auf das ganze Gelformat zu trennen.

Folgende Vorteile ergeben sich aus einer Spreizung der Trennung in der 2. Dimension:

- computerdensitometrische Auswerteverfahren können einfacher und mit höherer Reproduzierbarkeit durchgeführt werden
- das Ausstechen der Spots für die MALDI Sequenzanalyse kann genauer und ohne Proteinkontaminationen benachbarter Spots durchgeführt werden
- Spots, die mehrere Proteine beinhalten, können auf diese Weise u. U. in einzelne Spots getrennt werden
- für die Spotbeschriftung eines "Mastergel" (s. 2.4.5.1) verspricht diese Geldarstellung eine erhöhte Übersicht.

Anstelle einer Verringerung des T - Wertes, welcher zu einer verschlechterten Trennung niedermolekularer Proteine führte, gelang es hier erstmalig, eine Spreizung der Trennung in der 2. Dimension durchzuführen; hierzu wurde die Laufzeit, bei gleichzeitigem Tankpufferwechsel nach 18h Trennzeit verdoppelt.

Probeneinlauf: 1 h 80 mA 200 V

1. Trennphase: 18 h 160 mA 200 V

Tankpufferwechsel: quantitativer Austausch (20l) des Tankpuffers

2. Trennphase 18 h 160 mA 200 V

Werden Fraktionen mit großem Anteil an niedermolekularen Proteinen getrennt, muß die Laufzeit entsprechend reduziert werden, um zu vermeiden, daß niedermolekulare Proteine auswandern und somit nicht mehr erfaßt und ausgewertet werden können.

4.3.2.4 MS - Identifikation des CWP - Extrakts

Es wurden insgesamt 8 Proteine aus der extrahierten Fraktion identifiziert. Die Spots wurden nach Silberfärbung der Gele (Glucanfraktion, Chitinfraktion) ausgestanzt, tryptisch verdaut und mit Hilfe der MALDI TOF - Analyse identifiziert.

4.3.2.4.1 Glucangebundene CWPs

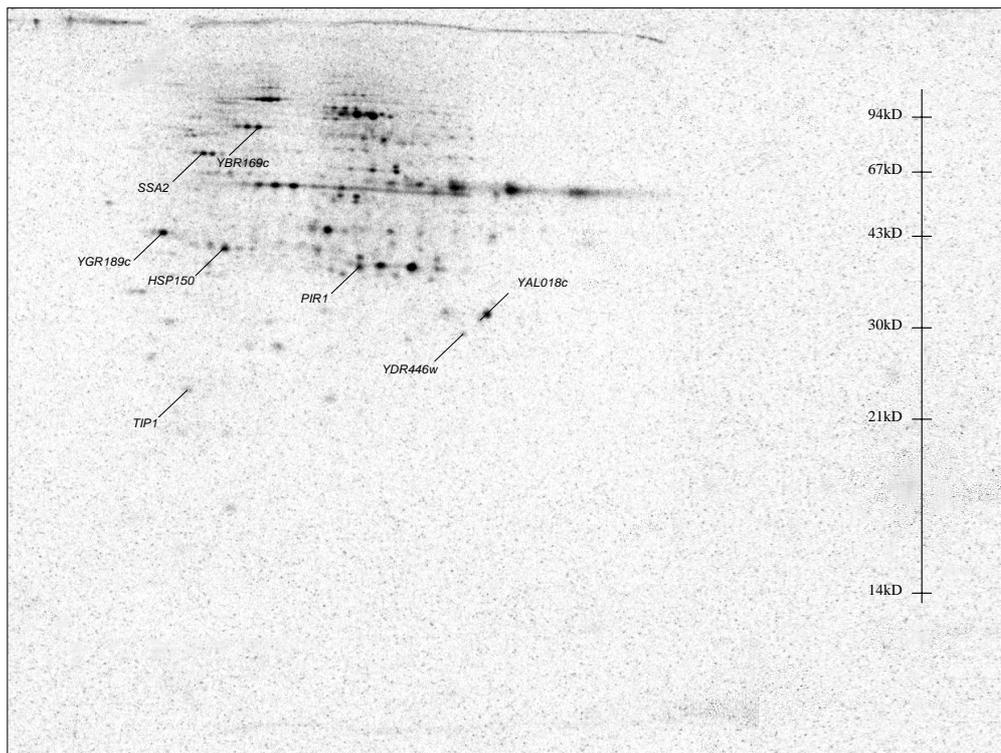


Abb. 82: Darstellung der mittels MALDI-tof MS identifizierten Zellwandproteine von *Saccharomyces cerevisiae* (S288c) nach 1,3 β - Glucanase Verdau (Interspex) im 2D Gel.

Die Identifikation der glucangebundenen Proteine (Tab. 21) zeigt die hohe Selektivität der Fraktion bzgl. ihrer Fraktionsreinheit. YBR067c, YKL164c, YGR189c, sind in den Datenbanken als direkte Zellwandproteine charakterisiert, YLL024c und YBR169c haben die Bezeichnung "cytoplasmic translocated". Es kann gefolgert werden, daß diese translokalen Proteine nicht nur im Cytoplasma, sondern auch in der Zellwand präsent sind.

Die Lokalisation von **YAL018c** ist als "unspecified integral membran" beschrieben; durch die Identifikation des Proteins aus der glucangebundenen CWP - Fraktion, wird der Datenbankeintrag um die Beschreibung

" glucan linked cell wall protein "

erweitert werden.

YJL159w bestätigt mit dem Eintrag über die Lokalisation "extracellulär, cell wall" in der Datenbank die hohe Selektivität dieser Extraktionsprozedur. Zudem kann man bei Detektion weiterer extracellulär gebundener Proteine aus der Glucanase - verdauten Fraktion auf eine Glucan - Proteinbindung von extrazellulären Proteinen schließen.

Zu den Genprodukten **YBR067c**, **YBR169c**, **YAL018c** und **YJL159w** wird die Beschreibung

"glucan linkage"

für die zelluläre Proteinlokalisierung in die Datenbanken hinzugefügt.

Als nächster Schritt könnte die Identifikation weiterer Spots aus dieser Fraktion erfolgen, die dann ebenfalls als glucangebundene Zellwandproteine beschrieben werden können, oder es kann eine funktionale Beschreibung dieser weitgehend unbekannt ORFs durch Applikation verschiedener Induktionen (s. 4.3.2.5) durchgeführt werden.

Tab. 21: Zuordnung von bereits bekannten Funktionen, zellulären Aufgaben und Lokalisation der identifizierten glucangebundenen Proteine nach Datenbankrecherche (www.expasy.ch; www.proteome.com;))

gene name	cellular role	biochem. function	localisation
YBR067c TIP1	<i>cell stress cell wall maintance</i>	<i>unknown</i>	<i>cell wall</i>
YKL164c PIR1	<i>cell stress cell wall maintence</i>	<i>structural protein</i>	<i>cell wall</i>
YGR189c	<i>cell wall maintance</i>	<i>unknown</i>	<i>cell wall</i>
YLL024c SSA2	<i>protein folding protein translocation</i>	<i>heat shock protein chaperones</i>	<i>cytoplasmic translocated</i>
YBR169c SSE2	<i>protein folding</i>	<i>shock protein chaperones</i>	<i>cytoplasmic translocated</i>
YAL018c	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	<i>unspecified integral membrane</i>
YJL159w HSP150	<i>cell stress cell wall maintance</i>	<i>heat shock protein structural protein</i>	<i>extracellular cell wall</i>

4.3.2.4.2 Chitingebundene CWPs

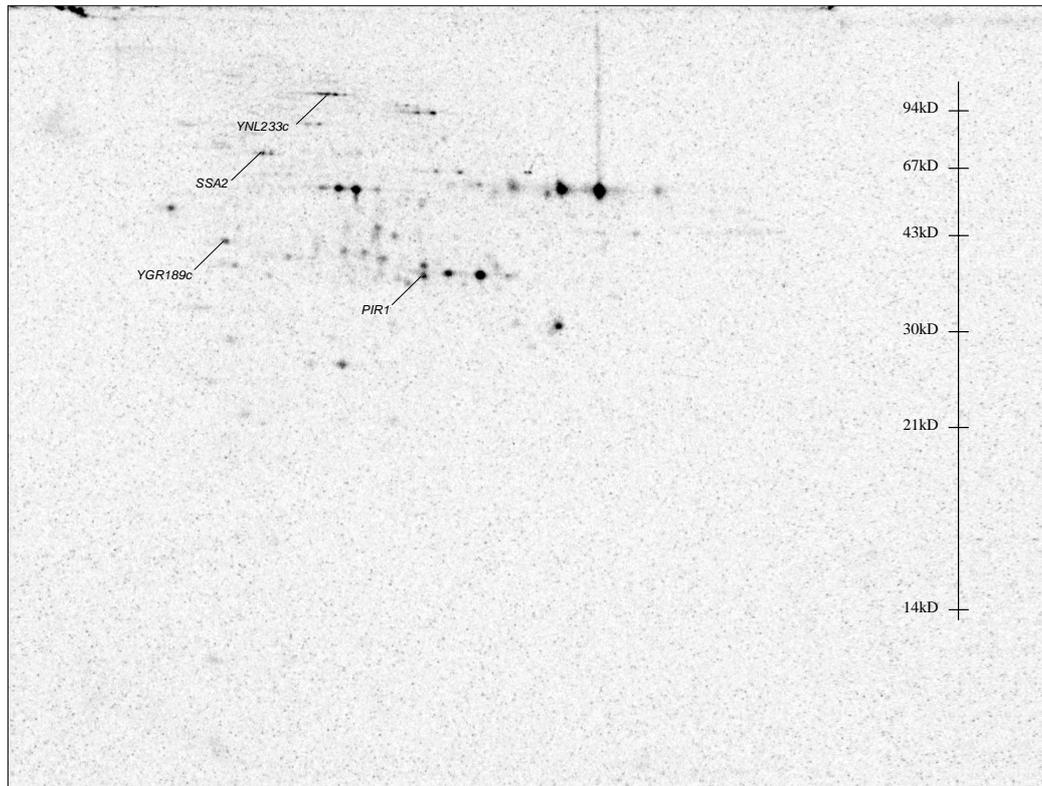


Abb. 83: Darstellung der mittels MALDI -tof identifizierten Zellwandproteine von *Saccharomyces cerevisiae* nach Chitinase Verdau (Roche)

Die Fraktionen der chitin- und der glucanverdauten Zellwandfragmente zeigen die zu erwartende Ähnlichkeit in den elektrophoretisch getrennten Fraktionen, da es sich bei beiden Fraktionen um das gleiche Zellkompartiment, nämlich das der Zellwand handelt.

Tab. 22: Zuordnung von bereits bekannten Funktionen, zellulären Aufgaben und Lokalisation der identifizierten Proteine nach Datenbankrecherche (www.expasy.ch; www.proteome.com;))

gene name	cellular role	biochem. function	localisation
YNL233w	cell wall maintance cytokinesis	unknown	cytoskeletal bud neck
YKL164c PIR1	cell stress cell wall maintence	structural protein	cell wall
YGR189c	cell wall maintance	hydrolase	cell wall
YLL024c SSA2	protein folding protein translocation	heat shock protein chaperones	cytoplasmic translocated

Bei Vergleich von glucan- und chitingebundener Fraktion sind signifikante Unterschiede der einzelnen CWPs bezüglich ihrer Quantität zu erkennen, woraus auf die entsprechende Affinität des jeweiligen Proteins zu Glucan bzw. Chitin in der Zellwand geschlossen werden kann.

Obwohl nur ein Chitinanteil von 2% in der Hefezellwand bestimmt wurde (Glucananteil 57%), wird durch Chitinasebehandlung bereits ein Großteil der zellwandgebundenen Proteine freigesetzt.

Dies deutet auf eine wesentliche Funktion des Chitins bzgl. der Integrität und Organisation der Zellwand hin [96, 130, 136].

Ein Zellwandprotein, das im Vergleich zu den anderen CWPs eine hohe Affinität zu Chitin besitzt ist das **YNL 233w** (s. Abb. 83). Für die Erweiterung der Datenbanklistungen ist die Beschreibung

linkage to the cell wall component chitin

zutreffend.

4.3.2.4.3 Fazit

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die beschriebene Extraktionsmethode eine sehr hohe Selektivität bzgl. der extrahierten Proteine aufweist. Es konnte gezeigt werden, daß nach 1,3 β - Glucanasebehandlung der Zellwand mehr CWPs freigesetzt werden konnten, als nach einem Chitinaseverdau. Es wurden sieben CWPs aus der glucanaseverdauten und vier aus der chitinaseverdauten Fraktion identifiziert. Nach Quantifizierung der entsprechenden Proteinspots konnte festgestellt werden, daß YNL233w eine höhere Bindungsaffinität zu Chitin, YKL164c, YGR189c, YLL024c, YBR067c, YAL018c, YJL159w, YBR169c dagegen eine höhere Affinität zu Glucan aufzeigen.

4.3.2.5 Diskussion und Datenbankreche der identifizierten CWPs

Im folgenden werden die identifizierten glucan- und chitingebundenen CWPs beschrieben und kategorisiert.

Es wird ein Modell für die Freisetzung der CWPs in der durchgeführten Extraktionsprozedur gezeichnet und die funktionelle Analyse des bisher in der Funktion unbekanntes Zellwandproteins YAL018c durchgeführt.

4.3.2.5.1 Modell der CWP Freisetzung

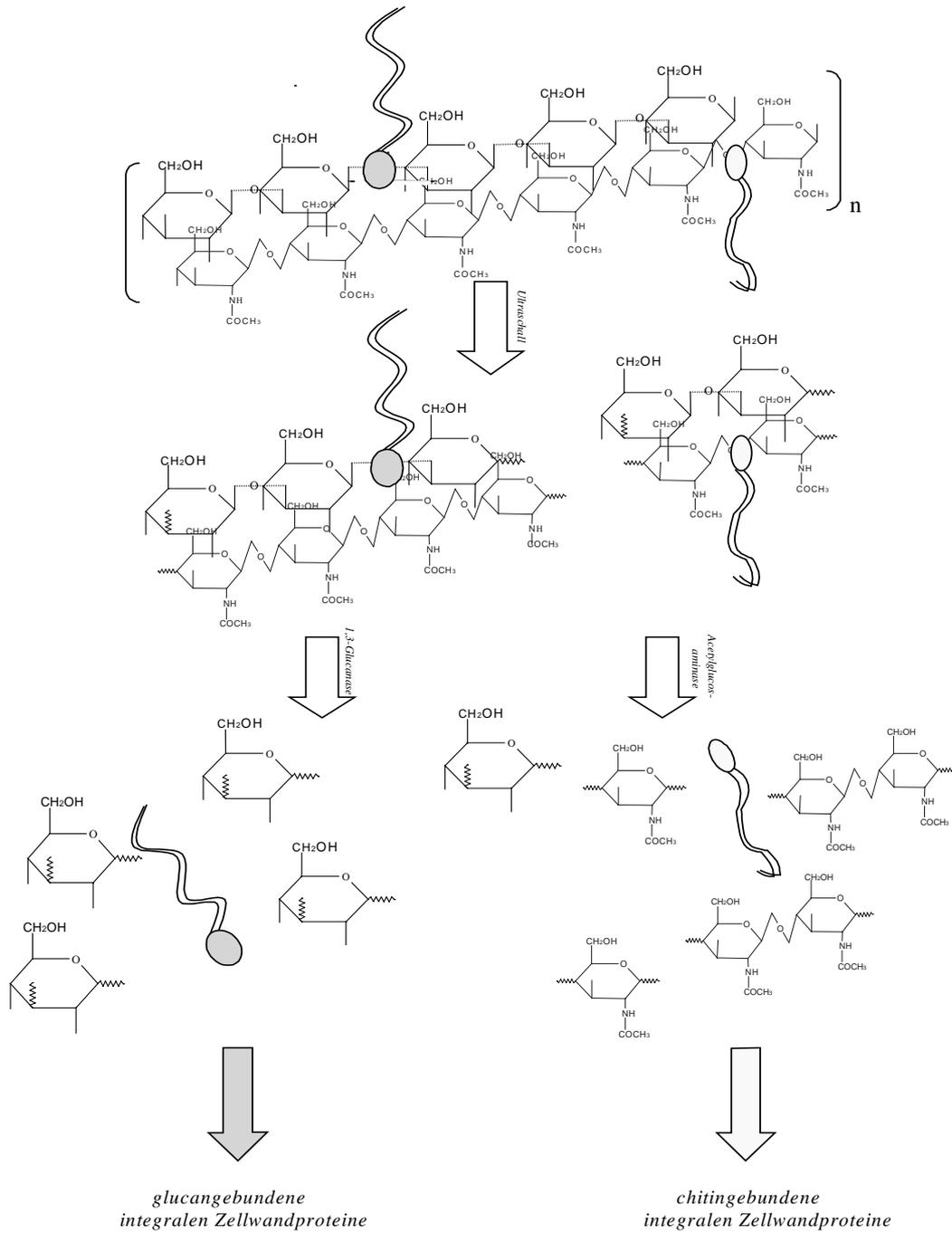


Abb. 84: Modell der für die Freisetzung der Zellwandproteine in *Saccharomyces cerevisiae* nach der in 4.3.1 beschriebenen Extraktionsprozedur

4.3.2.5.2 CWP - Datenbankeintrag

Es sind bisher 35 Zellwandproteine in der Hefe beschrieben und identifiziert worden, wobei die genaue Funktion bei den meisten CWPs noch weitgehend unbekannt ist. Zudem sind extrazelluläre Proteine, wie z. B. YIR019c oder surfaciale Proteine wie YDR077w darin aufgeführt. Da außer dem GPI - und PIR - Bindungsmotiv keine eindeutigen CWP - Motive und bisher auch keine quantitative Extraktion der Zellwandproteine in der Hefe gelungen ist, kann dieser Katalog keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

Tab. 23: Katalog der bisher detektierten Zellwandproteine n. MIPS [10].

cell wall (35 ORFs)

<u>YAL063c</u>	<u>FLO9</u>	strong similarity to <u>Flo1p</u>
<u>YAL064c-a</u>		putative pseudogene
<u>YAR050w</u>	<u>FLO1</u>	cell wall protein involved in flocculation
<u>YBR040w</u>	<u>FIG1</u>	required for efficient mating
<u>YBR067c</u>	<u>TIP1</u>	esterase
<u>YBR093c</u>	<u>PHO5</u>	repressible acid phosphatase precursor
<u>YCR089w</u>	<u>FIG2</u>	required for efficient mating
<u>YDR077w</u>	<u>SED1</u>	abundant cell surface glycoprotein
<u>YDR261c</u>	<u>EXG2</u>	exo-beta-1,3-glucanase minor isoform
<u>YER011w</u>	<u>TIR1</u>	cold-shock induced protein of the <u>Tir1p,Tip1p</u> family
<u>YGL028c</u>	<u>SCW11</u>	glucanase gene family member
<u>YGL032c</u>	<u>AGA2</u>	a-agglutinin binding subunit
<u>YGR279c</u>	<u>SCW4</u>	glucanase gene family member
<u>YGR282c</u>	<u>BGL2</u>	endo-beta-1,3-glucanase of the cell wall
<u>YHR139c</u>	<u>SPS100</u>	sporulation-specific wall maturation protein
<u>YIR019c</u>	<u>MUC1</u>	extracellular alpha-1,4-glucan glucosidase
<u>YJL159w</u>	<u>HSP150</u>	member of the <u>Pir1p/Hsp150p/Pir3p</u> family
<u>YKL096w</u>	<u>CWP1</u>	cell wall mannoprotein
<u>YKL096w-a</u>	<u>CWP2</u>	cell wall mannoprotein
<u>YKL163w</u>	<u>PIR3</u>	member of the <u>Pir1p/Pir2p/Pir3p</u> family
<u>YKL164c</u>	<u>PIR1</u>	required for tolerance to heat shock
<u>YKR102w</u>	<u>FLO10</u>	similarity to <u>Flo1p</u>
<u>YLL024c</u>	<u>SSA2</u>	heat shock protein of HSP70 family, cytosolic
<u>YLR155c</u>	<u>ASP3A</u>	L-asparaginase II
<u>YLR157c</u>	<u>ASP3B</u>	L-asparaginase II
<u>YLR158c</u>	<u>ASP3C</u>	L-asparaginase II
<u>YLR160c</u>	<u>ASP3D</u>	L-asparaginase II
<u>YLR286c</u>	<u>CTS1</u>	endochitinase
<u>YLR390w-a</u>	<u>SSR1</u>	Secretory Stress Response protein 1
<u>YMR305c</u>	<u>SCW10</u>	member of the glucanase gene family
<u>YNL066w</u>	<u>SUN4</u>	cell wall protein with homology to beta-glucosidase
<u>YNL260c</u>		hypothetical protein
<u>YNL233c</u>	<u>KRE1</u>	cell wall protein
<u>YOR010c</u>	<u>TIR2</u>	cold shock induced protein
<u>YOR190w</u>	<u>SPR1</u>	exo-1,3-beta-glucanase precursor

4.3.2.5.3 Das Grundgerüst der Hefezellwand

Die Hefezellwand besteht nach heutigem Wissen im wesentlichen aus drei Makromolekülen, dem Glucan, dem Chitin und den Zellwandproteinen (CWPs). Die Zellwand besteht zu etwa 57% aus Glucan, 1-2% aus Chitin und zu etwa 42% aus Zellwandproteinen, wobei den Großteil der Zellwandproteine das surfaciale Mannoprotein darstellt [96].

Es sind zwei verschiedene Glucane bekannt, das β 1,6 -Glucan und das β 1,3 - Glucan. β 1,6 - Glucane sind relativ kleine Moleküle (~140 Glucosemoleküle) und repräsentieren etwa 5% der Zellwand von *S. cerevisiae*. Kollar et al. zeigten vor kurzem, daß das reduzierende Ende des β 1,6 - Glucans in einer bisher unbekanntem Verknüpfungsform, mit dem nicht reduzierenden Ende des β 1,3 - Glucans verknüpft sein kann [101, 109, 113].

Meist mehr als die Hälfte der Zellwand in *S. cerevisiae* besteht aus β 1,3 - Glucan. Es ist somit der Hauptbestandteil der Hefezellwand und ist zusammen mit Chitin für die Zellrigidität, die Formgebung und den mechanischen Schutz verantwortlich. β 1,3 - Glucan ist ein lineares Polymer, das sich aus etwa 1500 Glucosemonomeren zusammensetzt [109, 115]. An diesem Polymer sind zudem 40 - 50 Glucosereste an deren C6 - Atomen glycosidisch verknüpft. Man nimmt an, daß durch die vielen nichtreduzierenden Gruppen dieses Polymers, Wechselwirkungen zu β 1,6 - Glucan, Chitin und den GPI- CWPs stattfinden [106, 116, 137].

Trotz des geringen Anteils von Chitin in der Hefezellwand scheint Chitin eine wesentliche Rolle in der Zellregulation zu spielen [109, 112, 120,]. Es wird vermutet, daß die Chitinsynthese in der Zellwand Zellzyklus kontrolliert ist. Zudem scheint Chitin eine wesentliche Funktion in der Osmoregulation der Zelle zu spielen, was wiederum die Chitinsynthese der Mycota zu einem potentiellen Target für Antimykotika macht [117, 128].

Es ist eine β 1,4- Bindung zwischen dem reduzierenden Ende einer Chitinkette und einer nichtreduzierenden Gruppe eines β 1,3 - Glucan Polymers beschrieben, die die Sekundärstruktur der Hefezellwand andeuten könnte [96, 115, 118]. Die genaue Struktur, sowie die Synthese und Regulation der Hefezellwand sind nach wie vor noch nicht geklärt [119, 120].

4.3.2.5.3.1 GPI - Zellwandproteine

In der Strukturkennung von Zellwandproteinen (CWPs) der Hefe wurden in den letzten Jahren neue Erkenntnisse gewonnen. Man unterscheidet heute GPI - CWPs und PIR - CWPs. Beide Proteingruppen charakterisieren eine spezifische supramolekulare Struktur, die sich aus Primärsequenz und Röntgenkristallographieaufnahmen erkennen läßt [94, 121].

GPI (glycosyl posphatidyl inositol) - Zellwandproteine erhalten das GPI - anchor während ihres Transportes durch den sekretorischen Stoffwechselzyklus, in dem die meisten GPI- CWPs zudem noch N- glycosyliert und / oder O- glycosyliert werden. Diese Proteine sind in der Regel bei Extraktionen mit heißem SDS stabil, was auf eine kovalente Bindung zu anderen Zellwandkomponenten hindeutet. Es wird angenommen, daß GPI - CWPs vorwiegend an β - Glucane gebunden sind [123, 125].

GPI- CWPs gehören zu den serin,- threoninaccumulierenden Proteinen, die nach Expression meistens ein N- terminales Signalpeptid mit typischen internalen Wiederholungssequenzen und einer terminalen hydrophoben Sequenz aufweisen, die im ER durch das GPI - anchor ersetzt wird. GPI - CWPs sind wahrscheinlich durch eine Bindungssequenz des GPI - anchors an andere Komponenten der Zellwand gebunden [126, 127]. De Nobel und Lipke beschrieben ein Modell für die integrale Bindung von GPI - CWPs in der Zellwand [128]. Hierbei schlugen sie eine kovalente Bindung eines GPI- anchor Restes zu β 1,6 - Glucan vor. Dieses Modell wurde später von Kollar et al. durch Spaltung der Phosphordiesterbindung in demsGPI - anchor nach endo- β 1,6 -Glucanase Behandlung gefestigt [129]. Es gibt also bisher gefestigte Erkenntnisse, daß GPI - CWPs kovalent an die nichtreduzierende Gruppen der β 1,6 - Glucans binden können.

Aus dem Proteom von *S. cerevisiae* konnten bisher acht GPI - CWPs auf Grund dieser Bindungssequenz identifiziert werden:

AGA1	[130]	SED1	[127]
CWP1	[116]	TIP1	[116]
CWP2	[127]	TIR1 / SRP1	[131]
FLO1	[127]	YCR089w	[131]

Aus der glucangebundenen CWP - Extraktion (s. 4.3.2.4.1) wurde das TIP1 Protein, welches in der Fraktion der glucangebundenen Proteine gefunden wurde, identifiziert. Dieses Protein besitzt nach obiger Listung ein GPI - anchor [116], das nach Kollar et al. eine kovalente Bindung an die nichtreduzierende Gruppen der β 1,6 - Glucans bildet.

Die Bindungsmotive der anderen identifizierten CWP, mit Ausnahme des YKL164c, sind bisher nicht bekannt. Die übrigen identifizierten CWPs aus der glucangebundenen Fraktion müssen entweder auch ein GPI - anchor besitzen oder aber andere glucanbindende Motive. Bei der Verwendung von einer 1,6 β - Glucanase in der Extraktionsprozedur wären möglicherweise die β 1,6 -glykosilierten Zellwandproteine deglykosiliert worden, und dadurch nicht mehr identifizierbar gewesen.

β 1,6 glykosilierte CWPs wurden auch in anderen Mycota wie *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* oder *Fusarium oxysporum* nachgewiesen, die besonders klinische bzw. therapeutische Bedeutung besitzen [100, 132].

4.3.2.5.3.2 PIR - Zellwandproteine

PIR - CWPs (proteins with internal repeats) wurden vor kurzem als weitere Familie von Zellwandproteinen entdeckt. Neuere Untersuchungen ergaben, daß diese Proteinfamilie ähnlich wie die GPI- CWPs mehrmals O - glycosyliert sind, aber keine GPI - anchor besitzen [94, 131]. Da die Glycopeptidbindung der O - verknüpften Seitenketten unter milden alkalischen Bedingungen geöffnet werden kann, wird vermutet, daß PIR - CWPs über diese Brücke zu anderen Zellwandkomponenten gebunden sind. Als mögliche Bindungspartner werden Chitin und β 1,3- Glucan diskutiert [127, 135]. Kapteyn et al. [96] schlägt hier nach Untersuchungen mit "O-glycosylation defective yeast mutants" folgende Struktur vor:

PIR-CWP-Ser/Thr-O-Kette \leftarrow 1,3 Glucan

Zudem steht die Frage der Bindungsart offen, es wird zwar eine kovalente Bindung angenommen, ebenfalls wären aber auch andere Wechselwirkungen, wie H - Brückenbindungen oder van der Waals Bindungen denkbar. Spärliches Wissen ist nicht nur über Bindung und Bindungsmotive der CWPs in der Zellwand vorhanden, sondern auch die Detektion von Zellwandproteinen aus dem Proteom der Hefe und deren funktionelle Beschreibung stehen am Anfang. Die Zellwand der Mycota ist eine dynamische Struktur, die mit Veränderungen auf extrazelluläre und

intrazelluläre Induktionen reagiert [136, 138]. In der Extraktion wurde ein Vertreter der PIR - CWP - Familie identifiziert, das YKL164c (PIR1). Dieses Protein wurde in vergleichbaren Quantitäten sowohl in der glucanbindenden, als auch in der chitinbindenden Fraktion detektiert (s. 4.3.2.4). Die Primärstruktur von YKL164 ist wie folgt:

Tab. 24: Primärstruktur von YKL164c

10	20	30	40	50	60
MQYKKSLVAS	ALVATSLAAY	APKDPWSTLT	PSATYKGGIT	DYSSTFGIAV	EPIATTASSK
70	80	90	100	110	120
AKRAAAISQI	GDGQIQATTK	TTAAAVSQIG	DGQIQATTKT	KAAAVSQIGD	GQIQATTKTT
130	140	150	160	170	180
SAKTTAAAVS	QIGDGQIQAT	TKTKAAAVSQ	IGDGQIQATT	KTTAAAVSQI	GDGQIQATTK
190	200	210	220	230	240
TTAAAVSQIG	DGQIQATTNT	TVAPVSQITD	GQIQATTLTS	ATIIPSPAPA	PITNGTDPVT
250	260	270	280	290	300
AETCKSSGTL	EMNLKGGILT	DGKGRIGSIV	ANRQFQFDGP	PPQAGAIYAA	GWSITPEGNL
310	320	330	340		
AIGDQDTFYQ	CLSGNFYNLY	DEHIGTQCNA	VHLQAIDLLN	C	

Das charakteristische Element der PIR- CWPs sind Sequenzwiederholungen innerhalb ihrer Domäne [137]. Die Sequenz von YKL164c setzt sich aus 341 AS zusammen. 1 - 63 stellt ein Signalpeptid dar, die Domäne mit insgesamt acht Repeats läuft von AS 64 bis 220. Die Repeatsequenz besteht aus 18AS, beginnend mit einem Alanintriplt:

AAAVSQIGD GQIQATTKTT

Die Repeats 1-8 besitzen folgende Verteilung:

REPEAT	64	82	PIR1/2/3	REPEAT 1.
REPEAT	83	101	PIR1/2/3	REPEAT 2.
REPEAT	102	125	PIR1/2/3	REPEAT 3.
REPEAT	126	144	PIR1/2/3	REPEAT 4.
REPEAT	145	163	PIR1/2/3	REPEAT 5.
REPEAT	164	182	PIR1/2/3	REPEAT 6.
REPEAT	183	201	PIR1/2/3	REPEAT 7.
REPEAT	202	220	PIR1/2/3	REPEAT 8.

Es sind derzeit drei Proteine (PIR1, PIR2, PIR3) aus dem gesamten Hefeproteom mit vergleichbaren internalen Repeats bekannt. In den Proteindatenbanken sind diese drei Proteine als kovalent an Komponenten der Zellwand gebunden beschrieben. Eine Glycosylierung dieser Proteine ist nachgewiesen [138]. Mit der Extraktion und der zweidimensionalen elektrophoretischen Trennung dieser CWPs kann nun in weiterführenden Experimenten eine genaue Funktionsbeschreibung von PIR1 und der übrigen getrennten CWPs durchgeführt werden.

4.3.2.5.4 YAL018c - ein Target für antimykotische Substanzen

Im folgenden Abschnitt wird eine erste funktionelle Beschreibung des Zellwandproteins (YAL018c), das in der Fraktion der glucangebundenen CWPs identifiziert wurde, durchgeführt. Die Eignung dieses Proteins als Target für eine antimykotisch wirksame Substanzen aus wird im Folgenden dargestellt.

4.3.2.5.4.1 YAL018c ein hypothetisches CWP

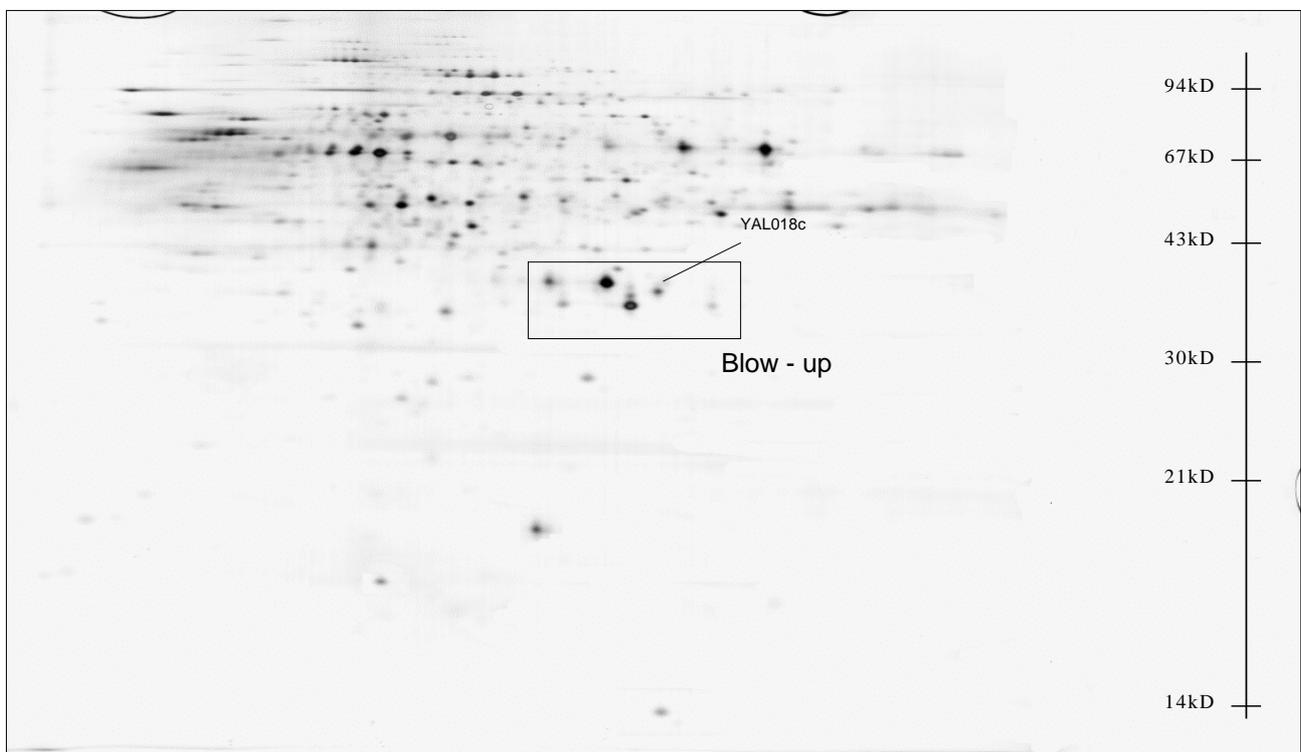


Abb. 85: Übersicht für das streßregulierte Zellwandprotein YAL018c in der glucangebundenen CWP - Fraktion; 2D Elektrophorese: 1. Dim.: IPG 4-9; 2.Dim.: T13%, C2,7%, Silberfärbung

An Zellen des Wildtyps S288c wurden, wie in Kapitel 3 beschrieben, die Streßinduktion durch Gefrieren und Lyophilisieren appliziert. Mit diesen streßinduzierten Zellen wurde dann die Solubilisierung der Zellwandproteine (s. Kap. 4.3) für sämtliche Streßparameter (streßfrei, gefrieren mit $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$, gefrieren mit $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, lyophilisieren mit Einfriergeschwindigkeiten von $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) durchgeführt, elektrophoretisch getrennt und computerdensitometrisch bearbeitet und ausgewertet.

Die Auswertung ergab eine signifikante Regulation in der Fraktion der glucangebundenen Zellwandproteine. Das detektierte Protein ist in Abb. 85 gekennzeichnet und wurde nach MALDI - MS Analyse als YAL018c identifiziert.

YAL018c ist ein transmembranes Protein (hypothetisches MW 37050 Da, 325AS) dessen Funktion, Proteinfamilie und Interaktionen nach Eintragungen folgenden Datenbanken bisher unbekannt ist:

<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=YAL018C>

<http://presage.berkeley.edu/search.cgi?spac=P31379>

<http://www.ebi.ac.uk/htbin/expasyfetch?L05146>

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&uid=92221690&dopt=r>

http://www.expasy.ch/cgi-bin/ft_viewer.pl?P31379&SWISS-PROT

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-ft-details.pl?P31379@TRANSMEM@92@112>

<http://www.proteome.com>

Tab. 25: Zusammenfassung der Eintragungen zu YAL018c aus den Proteindatenbanken

SWISS-PROT:	YAB8_YEAST P31379
Other IDs:	pacc: AAC04939.1
Species:	Saccharomyces cerevisiae (baker's yeast)
Description:	Hypothetical 37.0 kda protein in ats1-tpd3 intergenic region.
Subcellular location:	Integral membrane protein (potential).
Experiment :	None
Structure Prediction :	None
Recommendation :	None
Request :	None
Families :	None

4.3.2.5.4.2 YAL018c - cell wall protein involved in stressresponse of freezing

Wie bereits in 4.3.6.2.4.1 erwähnt, ist außer pl, MW, Primärsequenz und transmembraner Domäne keine weitere Beschreibung für YAL018c bekannt. In 4.3.2.4.1 konnte bereits durch die Identifikation dieser ORF in der glucanverdauten Fraktion eine erste Proteinbeschreibung vorgenommen werden:

" glucan linked cell wall protein "

Die Regulation des Zellwandproteins YAL018c nach subletalem Gefrieren und Lyophilisieren in der Zellwand ist in den Abb. 86 dargestellt.

Die Blow - ups zeigen eine signifikante up - Regulation von YAL018c nach Streßinduktion des Gefrieren bis $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Vergleich zur streßfreien Fraktion. Bei der Streßinduktion des Lyophilisierens ist eine down - Regulation von YAL018c mit beiden Einfriergeschwindigkeiten erkennbar.

Dieser Regulationsverlauf läßt grundsätzlich folgende zwei Hypothesen zu:

- a) YAL018c fungiert als transmembranes Signalprotein für allgemeine exogene Streßinduktionen. Die Down - Regulation während des Lyophilisierens läßt sich durch die langdauernde Trocknung der Zellen erklären, da in dieser Zeit keine neuen Streßinduktionen auf die Zellen wirken, und dadurch keine neue exogene Signaltransduktion stattfindet [57, 95,].
- b) YAL018c ist ein transmembranes Zellwandprotein, das spezifisch auf die Streßinduktion des Gefrierens exprimiert wird. Es ist bekannt, daß bereits in streßfreien Zellen eine geringe Kopienzahl von zellulären Streßproteinen exprimiert ist [94, 133].

Ein ähnliches Regulationsmuster konnte bereits bei der Phosphoglyceratkinase 1 (YCR12w) in 3.3.5.8.3 festgestellt werden. Hier war jedoch eine eindeutige funktionelle Zuordnung dieses Proteins in die Streßantwort des Gefrierens und Lyophilisierens durch dessen Multifunktionalität nicht möglich.

Die Detektion als streßreguliertes Zellwandprotein bzgl. den Induktionen des Gefrierens und Lyophilisierens läßt folgende Erweiterung der Proteinbeschreibung von YAL018c zu:

Glucan linked cell wall protein involved in stressresponse

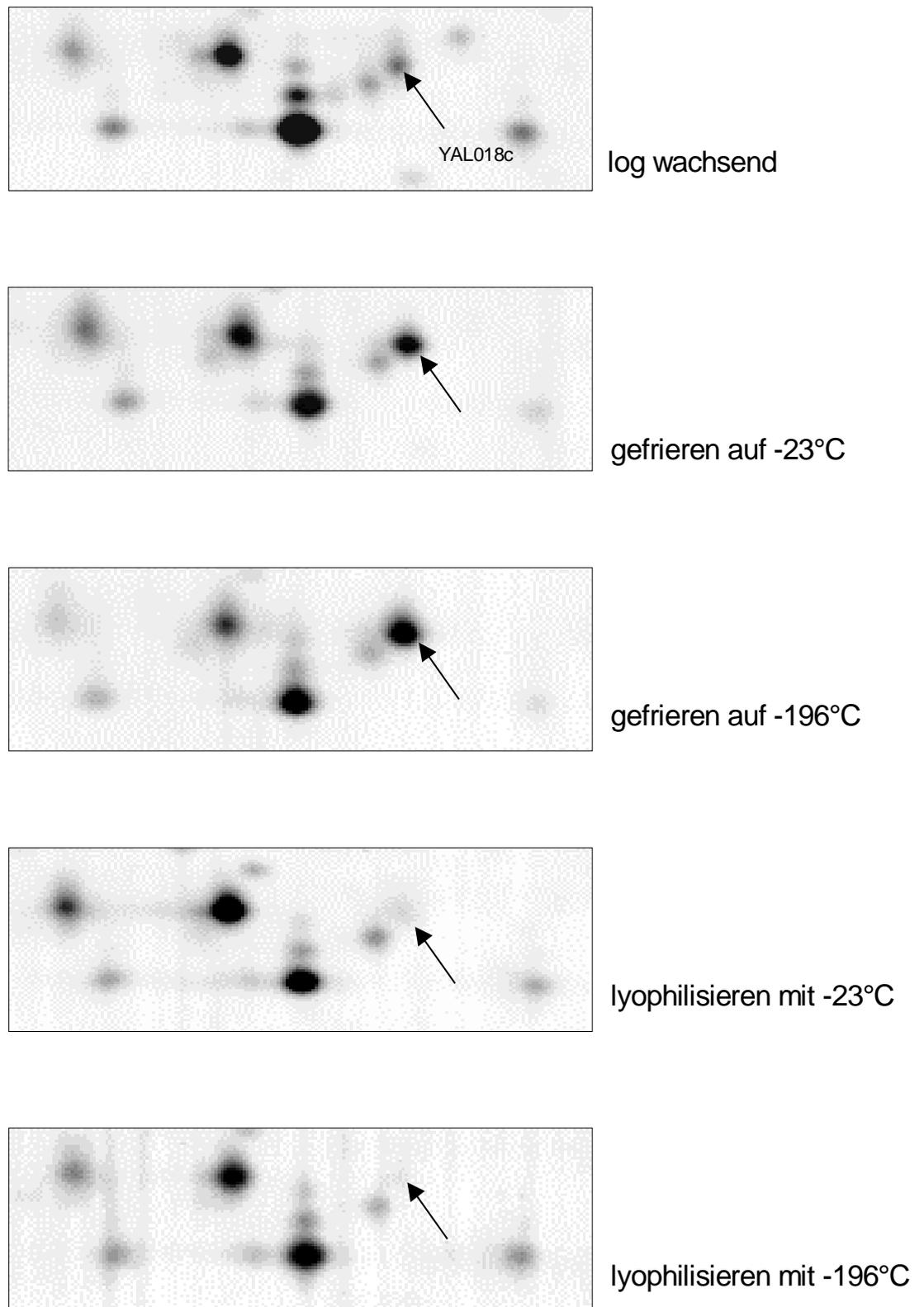


Abb. 86: YAL018c - Blow up der glucangebundenen Zellwandfraktion von *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp 288c. Vergleich der Proteinexpressionen von streßfreier (logarithmisch wachsend), gefrorenen (-23 °C und -196 °C) und lyophilisierter (vorgefroren mit -23 °C und -196 °C) Kultur.

4.3.2.5.4.3 Beschreibung einer neuen Domäne in YAR018c

In der Primärstruktur von YAL018c sind bisher fünf Domänen bekannt, die auf die transmembrane Position dieses ORF hindeuten. Im folgenden Drei - Buchstaben - Code sind die fünf transmembranen Domänen mit roten Buchstaben gekennzeichnet.

Tab. 26: Drei - Buchstaben - Code der Primärsequenz von YAL018c. In roten Buchstaben sind die fünf bereits bekannten transmembranen Domänen markiert.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
1	Met	Ser	Phe	Thr	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Leu	15
16	Val	Tyr	Lys	Phe	Gly	Gly	Gly	Gln	Ser	Tyr	Glu	Lys	Leu	Pro	Tyr	30
31	Val	Asn	Ile	Pro	Phe	Asn	Gln	Tyr	Leu	Asp	Lys	Val	Tyr	Lys	Lys	45
46	His	Phe	Ser	Lys	Val	Met	Ser	Arg	Thr	Arg	Tyr	Val	Leu	Met	Asn	60
61	Phe	Phe	Lys	Asp	Ala	Phe	Thr	Gly	Gly	Ala	Phe	Met	Tyr	Pro	Phe	75
76	Lys	Gly	Phe	Leu	Glu	Phe	Asn	Thr	Asn	Lys	Ser	Ser	Tyr	Ser	Thr	90
91	Thr	Met	Leu	Gly	Ile	Leu	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ile	Met	Phe	Ala	Leu	105
106	Val	Ser	Phe	Val	Tyr	Trp	Ala	Thr	Ile	Thr	Pro	Met	Tyr	Thr	Ala	120
121	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Gly	Pro	Ile	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Phe	135
136	His	Ser	Phe	Leu	Gln	Ala	Asn	Val	Phe	Thr	Leu	Leu	Phe	Met	Arg	150
151	Leu	Ser	His	Phe	Asn	Asn	His	Leu	Val	Glu	Val	Cys	Leu	Glu	Lys	165
166	Asn	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Leu	Ser	Glu	Val	Lys	Pro	Ile	Lys	Tyr	180
181	Tyr	Ala	Pro	Ile	Asn	Ser	Ile	Tyr	Phe	Trp	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Pro	195
196	Phe	Lys	Leu	Val	Lys	Tyr	Met	Leu	Gly	Leu	Ser	Val	Leu	Phe	Val	210
211	Leu	Leu	Val	Ile	Ser	Phe	Phe	Pro	Leu	Ile	Gly	Pro	Ile	Leu	Phe	225
226	His	Ile	Leu	Ile	Ser	Pro	Phe	Ile	Thr	Gln	Ile	Tyr	Phe	Thr	Lys	240
241	Val	Leu	Arg	Leu	Gln	Asn	Phe	Asp	Asn	Ile	Gln	Arg	Arg	Glu	Asn	255
256	Ile	Tyr	Leu	His	Ala	Gly	Gln	Tyr	Ala	Ser	Phe	Gly	Phe	Leu	Ala	270
271	Gly	Leu	Ile	Glu	Ser	Val	Pro	Ile	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Ser	285
286	Thr	Asn	Thr	Ile	Gly	Ser	Val	Leu	Phe	Asn	Leu	Asp	His	Pro	Met	300
301	Val	Pro	Glu	Asn	Leu	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	315
316	Pro	Gln	Asp	Ile	Asn	Gln	Gln	Pro	Asn	Gln						

TRANSMEM1	<u>92</u>	<u>112</u>	POTENTIAL.	TRANSMEN4	<u>209</u>	<u>229</u>
TRANSMEM2	<u>119</u>	<u>139</u>	POTENTIAL.	TRANSMEN5	<u>264</u>	<u>284</u>
TRANSMEM3	<u>187</u>	<u>207</u>	POTENTIAL.			

Für eine funktionale Charakterisierung von YAL018c wurde mit dem Suchoperator von *ProDom* in der "zentralen Datenbank für **Proteindomänen** - Toluose", aus allen verfügbaren Proteinprimärsequenzen eine Domänen in YAL018c gesucht:

<http://www.toulouse.inra.fr/prodom/doc/form99.2.html>

<http://bioinfo.mbb.yale.edu/genome/yeast/search.cgi?orf=YAL018C>

Folgende Suchparameter wurden verwendet:

Minimal distance between sequences (in PAM): 20

Maximal numbers of clusters: 3

Graphic representation of one protein in SwissProt / TrEMBL: YAB8

Es konnte eine geschlossene Domäne (außer den bereits bekannten) in YAL018c (YAB8) detektiert werden, die zudem in zwei weiteren Proteinen von *S. cerevisiae*

vorkommt: CHROMOSOME XV READING FRAME ORF YOL047C - Q08218
 CHROMOSOME XV READING FRAME ORF YOL048C - Q08219

Tab. 27: Primärstruktur von YAL018c; die detektierte Domäne ist blau markiert

10	20	30	40	50	60
MSFTGSLALA	GIGGLVYKFG	GGQSYEKL	PNQYLD	KVYKKHFSKV	MSRTRYVLMN
70	80	90	100	110	120
FFKDAFTGGA	FMYPFKGLF	FNTNKSSYST	TMLGILSSYL	IMFALVSFVY	WATITPMYTA
130	140	150	160	170	180
FLIVLGPIGL	FIAIFHSFLQ	ANVFTLLFMR	LSHFNNHLVE	VCLEKNGLEE	NLSEVKPIKY
190	200	210	220	230	240
YAPINSIYFW	AYYFPFKLVK	YMLGLSVLFV	<u>LLVISFFPLI</u>	<u>GPILFHILIS</u>	<u>PFITQIYFTK</u>
250	260	270	280	290	300
VLRLQNFJNI	QRRENIYLHA	GQYASFGFLA	GLIESVPILA	GFAISTNTIGSVL	FNLDHPM
310	320	325			
VPENLVETQA	EIEAAPQDIN	QQPNQ			

Die Domäne beginnt nach der 211 AS und ist etwa 80 AS lang. Eine Funktionszuweisung dieser Domäne, oder ein Nachweis von Bindungsmotiven in dieser Domäne gelang bislang nicht [94, 100, 136]. Mit einem Consensus von 2,99 besitzt diese Domäne eine relative hohe Übereinstimmung zu den gematchten ORFs YOL047c und YOL048c, und damit eine hohe funktionelle Signifikanz.

Neu detektierte Domäne in YAR018c:

Sequence ID	start	end	weight
1 Q08218_YEAST	107	197	1.10
<pre> LLLLLVPIVGPITINMLPSPGMGFYFEPYFVDVLHLDNRKLSKVYKGFQAKWLLYSISSGLESIPILGGLFIGTNAV GASLWIVKEIK - - - - - - - - - - </pre>			
1 Q08219_YEAST	11	93	0.84
<pre> LTLLSLPIVGPILANLM1APKRTFTYLQRYFL-LKGFSKKQAKDFQYEHYASFICFGMSAGLLELIPFFTIVTISNTVGAAK..... - - - - - - - - - - </pre>			
1 YAB8_YEAST	211	293	1.05
<pre> LLVISFFPLIGPILFHLIPSPFITQIYFTK-VLRLQNFJNIQRRENIYLHAGQYASFGFLAGLIESVPILAGFAISTNTIGSVL..... - - - - - - - - - - </pre>			
3 Consensus	2.99		
<pre> LLLLSLPIVGPILFNMLPSPGMTFYFQYFVLDLQHFQDNQRKEFYKHYAKWLCFGFSAGLLESIPILGGFFISTNTVGAALWIVKEIK - - - - - - - - - - </pre>			

Die Domäne wurde als D20422 in die *ProDom* - Datenbank eingetragen.

Bei beiden ORFs, YOL047c und YOL048c sind die Funktion, Lokalisierung und die zellulären Interaktionen unbekannt. YOL047c ist ein Protein mit 234 AS Länge und einem Molekulargewicht von 26,5 KD; YOL048c besteht aus 106 AS und 12,1 KD.

Da die Proteinexpression von YAL018c streßreguliert ist (s. 3.4.6.2.4.2) und transmembrane Domänen bereits bestimmt sind, kann diese Domäne (Tab. 4 - 8) in Zusammenhang mit der Streßantwort des Gefrierens gebracht werden. Der konsequente Schluß ist dann, daß auch die Gene YOL047c und YOL048c in eine Streßantwort involviert sind. Weiterführende Experimente könnten Bindungsmotive für streßregulierende Signalmoleküle, aktivierende bzw. deaktivierende Bindungsstellen oder andere streßregulierte Zentren innerhalb der Domäne bestimmen.

In Bezug auf die Streßsensitivität von YAL018c wäre auch der seltene Fall einer nicht mit dem Suchoperator detektierbaren isolierten Domäne in YAL018c denkbar, die ausschließlich von diesem Protein ausgebildet wird.

4.3.2.5.5 Fazit

Bestätigt sich die Annahme, daß YAL018c in die Signaltransduktion einer generellen Streßantwort involviert ist, wofür die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen, sowie die transmembrane Lokalisierung sprechen, dann ist YAL018c ein zentrale Schaltstelle für das Streßmanagement der Zelle. Die Inhibition, oder die Blockierung der Bindungszentren in der Domäne führen dann zu einer potentiellen Schwächung des Organismus. Die Pilzzelle könnte sich nicht mehr optimal auf pH - oder osmotische Änderungen wie sie z. B. im Körper statt finden, einstellen und würde geschwächt bzw. letal werden.

Eine derartige inhibierende Substanz eignet sich in hohem Maß als antimykotisch wirksames Agens eignen, da diese Domäne (D20422) bzw. deren Bindungsmotive nur in mycotischen Zellen vorkommt und daher geringe Nebenwirkungen in Säugerzellen erwarten läßt. Zudem ist zu erwarten, daß durch die Inhibition von Streßrezeptorproteinen oder Proteinen der Signaltransduktion eine basale Stufe der Streßantwort gehemmt wird, und so eine quantitative Inhibition der Streßantwort in der Zelle möglich wird [132, 136].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden mit der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese und der MALDI tof MS - Analyse aus dem radioaktiv markiertem (³⁵Schwefel) Proteom von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces boulardii* erstmals stressensitive Proteine bzgl. der Induktion des Lyophilisierens detektiert und identifiziert. Des weiteren wird eine Methode für die selektive Extraktion von Zellwandproteinen der Hefe erstmals beschrieben. Die Identifizierung (MALDI - MS) und funktionale Beschreibung dieser Proteine führt zur Detektion eines potentiellen Targets für eine antimycotisch wirksame Substanz.

Detektion von Streßproteinen bzgl. Gefrieren und Lyophilisieren

Für die Detektion streßsensitiver Proteine aus der ³⁵S - markierten cytoplasmatischen Fraktion von *S. cerevisiae* und *boulardii* müssen die Bedingungen für die Zellvermehrung, die Isotopenmarkierung, den Zellaufschluß, die Proteinsolubilisierung und die Streßinduktion optimiert werden.

Um proteolytischen Abbau zu reduzieren, haben sich synthetische Medien als unerlässlich erwiesen. Das Markierungsintervall (³⁵S - Methionin) für logarithmisch wachsende Zellen wurde auf 30 min , 10 μ Ci / 10⁷ Zellen festgelegt, da hierbei prozentual am meisten ³⁵S absorbiert wurde und zudem genügend markiertes Protein für die elektrophoretischen Trennungen solubilisiert werden konnte. Der Zellaufschluß wird mit Ultraschall durchgeführt, da bei enzymatischen und autolytischen Aufschlüssen Proteinabbau stattfand. Ein Aufschluß durch Zelmahlen in flüssigem Stickstoff läßt eine Reproduzierbarkeit im Vergleich zum Ultraschallaufschluß vermissen. Es hat sich nach Auswertung 2D elektrophoretischer Trennungen gezeigt, daß eine Präsolubilisierung in SDS - Puffer die Proteinlöslichkeit und die Reproduzierbarkeit der Extraktion erhöht; proteolytische Aktivität ist durch diese streng denaturierenden Bedingungen minimiert. Diese optimierte Probenaufbereitung für die Extraktion der cytoplasmatischen Fraktion von *S. cerevisiae* wird nun für die Detektion von streßsensitiven Proteinen bzgl. der Induktionen des Gefrierens und Lyophilisierens angewendet.

Die Streßapplikation wird auf eine subletale Induktion optimiert, um signifikante Streßproteinregulationen detektieren zu können. Die Messung der lag - Phasen nach Streßinduktion ergaben, daß sich die Zellen bei schnellen Einfriergeschwindigkeiten (bis -196 °C) und der Entfernung von zellulär gebundenen Hydratwassers in

erhöhtem Streßzustand befinden. Als Gefrierschutzsubstanz wurden Lactose verwendet. Folgende Streßproteine bzgl. des Gefrierens und Lyophilisierens wurden nach 2D elektrophoretischer Trennung, computerdensitometrisch Auswertung und einer MALDI TOF Analyse identifiziert.

ID-Nr. Swissprot.	Funktion	Charakterisie-rung	ORF	MW/pi	Modifikationen
P00330	Alkohol Dehydrogenase	anaerobe NADH Synthese	ADH1 YOL086c	36,7/6,7	N-terminale Acetylierung
P 27616	Phosphoribosyl-amidoimidazole succinocarbox-amid-Synthase	Purinbio-synthese	PUR YAR015w	34,6/5,8	Acetylierung
P00560	Phosphoglycerat Kinase	Enzym der Glycolyse	PGK1 YCR012w	44,6/7,7	Acetylierung
P47143	putative Adenosinkinase	Nucleotidphos- phorylierung	ADK1 YJR105w	36,4/4,8	unbekannt
P23301	Initiationfactor	unbekannte Funktion	EIF5 YEL034w	16,9/4,6	Phosphorylierung

Diskutiert man die bisher bekannten Funktionen und Interaktionen dieser identifizierten Protein, so läßt dies den Schluß zu, daß das Streßmanagement von *S. cerevisiae* und *S. boulardii* bzgl. der Induktionen Gefrieren und Lyophilisieren hauptsächlich von ATP und cAMP reguliert werden muß, da von denn sechs detektierten streßsensitiven Proteinen, sämtliche direkt (durch ATP- oder ADP Synthese) oder indirekt (durch phosphatbindende Motive) mit diesen Molekülen in Interaktion stehen.

Extraktion von glucan- und chitingebundenen Zellwandproteinen in der Hefe

Erstmals wurde eine Extraktion für Zellwandproteine (CWPs) der Hefe beschrieben. Die CWPs werden radioaktiv markiert und in zwei Fraktionen, als chitin- und glucangebundene CWPs extrahiert. Die CWP - Extraktion wird in der Weise durchgeführt, daß zuerst die Proteine der cytoplasmatischen Fraktion quantitativ entfernt, und anschließend die Zellwandfragmente durch Ultrazentrifugation von noch intakten Zellen getrennt werden; nach Quantifizierung der Zellwandproteine erfolgt ein zellwandlytischer Verdau der Fragmente, der die Zellwandproteine freisetzt.

Für die Trennung durch Ultrafiltration von intakten Zellen und Zellwandfragmenten, hat sich die Polyethersulfonmembran (0,8µm) bzgl. Proteinbindungsaffinität und Stabilität als am geeignetsten erwiesen.

Nach Wirkungsanalyse von fünf verschiedenen zellwandlytischen Enzymen hat sich die β 1,3 Glucanase von Interspex und die Acetylglucosaminidase von Roche als geeignet für die Freisetzung der CWPs in *S. cerevisiae* erwiesen. Im chitinaseverdauten Extrakt konnten aus dem Autoradiogram 46 Zellwandproteine und im glucanaseverdauten Extrakt 87 Zellwandproteine detektiert werden. Aus beiden Fraktionen wurden insgesamt zehn CWPs mit MALDI - TOF MS identifiziert:

Glucanaseverdau	cellular role	biochem. function	localisation
YBR067c TIP1	<i>cell stress</i> <i>cell wall maintance</i>	<i>unknown</i>	<i>cell wall</i>
YKL164c PIR1	<i>cell stress</i> <i>cell wall maintance</i>	<i>structural protein</i>	<i>cell wall</i>
YGR189c	<i>cell wall maintance</i>	<i>unknown</i>	<i>cell wall</i>
YLL024c SSA2	<i>protein folding</i> <i>protein translocation</i>	<i>heat shock protein</i> <i>chaperones</i>	<i>cytoplasmic</i> <i>translocated</i>
YBR169c SSE2	<i>protein folding</i>	<i>shock protein</i> <i>chaperones</i>	<i>cytoplasmic</i> <i>translocated</i>
YAL018c	<i>unknown</i>	<i>unknown</i>	<i>unspecified integral</i> <i>membrane</i>
YJL159w HSP150	<i>cell stress</i> <i>cell wall maintance</i>	<i>heat shock protein</i> <i>structural protein</i>	<i>extracellular</i> <i>cell wall</i>
Chitinaseverdau			
YNL233w	<i>cell wall maintance</i> <i>cytokinesis</i>	<i>unknown</i>	<i>cytoskeletal</i> <i>bud neck</i>
YKL164c PIR1	<i>cell stress</i> <i>cell wall maintance</i>	<i>structural protein</i>	<i>cell wall</i>
YGR189c	<i>cell wall maintance</i>	<i>hydrolase</i>	<i>cell wall</i>
YLL024c SSA2	<i>protein folding</i> <i>protein translocation</i>	<i>heat shock protein</i> <i>chaperones</i>	<i>cytoplasmic</i> <i>translocated</i>

YAL018c ein potentielles Target für ein antimycotisch wirksames Agens

CWPs von Mycota besitzen besonders für die Medizin große Bedeutung, da bis dato noch keine dem Penicillin vergleichbare antimycotische Substanz gefunden wurde.

Bei Kenntnis der zellwandregulatorischen Proteine bzw. deren Funktion und Streßregulation wäre die Entwicklung einer selektiv wirksamen Substanz gegen mycotische Infekte der nächste Schritt.

Nach 2D - elektrophoretischer Trennung der glucangebundenen CWP - Fraktion konnte YAL018c als signifikant streßsensitives Protein detektiert werden. Des weiteren ist in YAL018c, welches bisher als hypothetisches Protein geführt wurde, eine bisher unbeschriebene transmembrane Domäne entdeckt worden; hieraus kann

geschlossen werden, daß YAL018c eine signalsensorische Funktion in der zellulären Stressadaptation inne hat.

Die Bindungsmotive dieser neu detektierten Domäne stellen somit ein potentiell effektives Target für die Anwendung einer zellwandaktiven antimykotischen Substanz dar, da die Inhibition der Signaltransduktion eine umfassende Störung der zellulären Stressantwort erwarten läßt, was dann zu einer intensiven Schwächung der Zelle führt; zudem konnte diese Domäne bisher nur in mykotischen Proteinen detektiert werden, wofür geringe Nebenwirkungen entsprechender Antimykotika auf Säugerzellen erwarten läßt.

6 Literatur

- [1] Sherman, F.: Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194, 1-7 (1991)
- [2] Humphery-Smith, I.; Cordwell, S. J.; Blackstock, W. P.: Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 18, 1217-1242 (1997)
- [3] Williams, K. L.; Joss, G.H.; in: Maini, P. K.; Othmer, H.; Murray, J. D. (Eds.); Experimental and Theoretical Advances in Biological Pattern Formation. *Plenum Publishing Company, New York*, 345-354 (1993)
- [4] Banuett, F.: Signalling in the yeast: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 249-274 (1998)
- [5] Wilkins, M. R.; Sachnez, J.-C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L.; *Biotech. Genet. Eng. Rev.* 13, 19-50 (1995)
- [6] Garrels, J. I.; McLaughlin, C.S.; Warner, J. R.; Futcher, B.; Latter, G. I.; Kobayashi, R.; Schwender, B.; Volpe, T.; Anderson, D. S.; Mesquita Fuentes, R.; Payne, W. E.: Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis* 18, 1347-1360 (1997)
- [7] Garrels, J. I.; Futcher, B.; Latter, G.I.; Schwender, B.; Warner, J. R.; McLaughlin, C. S.: Protein identification for a *Saccharomyces cerevisiae* protein database. *Electrophoresis* 15, 1466-1486 (1994)
- [8] Boucherie, H.; Sagliocco, F.; Joubert, R.; Maillet, I.; Labarra, J.; Perrot, M.: Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* 17, 1683-1699 (1996)

- [9] Blomberg, A.: Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis* 18, 1429-1440 (1997)
- [10] Proteindatenbank mips; Munich information center for protein sequences. Germany; www.mips.biochem.mpg.de/proj/yeast/catalogues/
- [11] Proteindatenbank YPD; Proteome Incorporated; Protein information for the Genomic age. Australia; www.proteome.com
- [12] Egel, R.; Holmberg, S.: Cultivation of Yeast Cells: *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biology* 7, 421-430 (1998)
- [13] Drews, G.: Mikrobiologisches Praktikum. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 5. Auflage* (1986)
- [14] Warren, N.; Shadomy, H. J.: Yeast of medical importance. *American Society of Microbiology* 7, 617-629 (1991)
- [15] Fey, S. J.; Nawrocki, A.; Larsen, M. R.; Görg, A.; Roepstorff, P.; Skews, G. N.; Williams, R.; Larsen, P.M.: Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae*: a methodological outline. *Electrophoresis* 18, 1361-1372 (1997)
- [16] Jazwinski, M.: Preparation of extracts from yeast. *Methods Enzymol.* 18, 154-174 (1990)
- [17] Arnold, C. E.; Witrup, K. D.: The stress response to loss of signal recognition particle function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 30412-30418 (1994)

- [18] Heleen, L.; Caro, P.; Gertien, J.; Capman, J.; Kilis, F.: Transcription of multiple cell wall protein- encoding genes in *S. cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiology Letters* 161, 345-349 (1998)
- [19] Latscha, H. P.; Klein, H. A.: Organische Chemie. *Springer – Verlag Berlin* 2. Auflage (1990)
- [20] Williams, B. L.; Wilson, K.: Methoden der Biochemie. *Thieme – Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage* (1984)
- [21] Görg, A.; Postel, W.; Günther, S.: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546 (1988)
- [22] Görg, A.; Weiss, W.: Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Proteom research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. *Springer-Verlag, Berlin*, 57-92 (2000)
- [23] Görg, A.: Two dimensional electrophoresis. *Nature* 349, 545-546 (1991)
- [24] Williams K. L.: Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis* 20, 678-688 (1999)
- [25] Harder, A.; Wildgruber, R.; Nawrocki, A.; Fey, S.J.; Larsen, P. M.; Görg, A.: Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20, 826-829 (1999)
- [26] Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R.; Weiss, W.: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053 (2000)
- [27] Roberts, C. J.; Raymond, C. K.; Yamashiro, C. T.; Stevens, T. H.: Methods for studying the yeast vacuole. *Methods in Enzymology* 194, 644 - 661 (1991)

- [28] Hagel, P.: Cyanate formation in solutions of urea. Calculations of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 366-373 (1971)
- [29] Dunn, M. J.: Gel electrophoresis: proteins. *Bios Scientific Publishers 1, Billington* (1993)
- [30] Staudenmann, W.; Hatt, P. D.; Hoving, S.; Lehmann, A.; Kertesz, M.; James, P.: Sample handling for proteome analysis. *Electrophoresis* 19, 901-908 (1998)
- [31] Forster, D.: Cell disruption: breaking up is hard to do. *Biotechnol.* 10, 1539-1541 (1992)
- [32] Ovalle, R.; Seung, T.; Holder, B.; Moore, C. W.; Lipke, P. N.: A spheroplast rate assay for cell wall integrity in yeast. *Yeast* 14, 1159-1166 (1998)
- [33] Hopkins, T. R.: Physical and chemical disruption for the recovery of intracellular proteins. *Petrol Comp* 3,57-83 (1989)
- [34] Hazel, B.; Kielland, M.; Winther, J.: Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* 12, 1-16 (1995)
- [35] Klionsky, D. J.; Cueva, R; Yaver, D. S.: Aminopetidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 119, 287-299 (1992)
- [36] Rabbiloud, T.; Adessi, C.; Giraudel, A.; Lunardi, J.: Improvements of the solubilisation of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilised pH gradients. *Electrophoresis* 18, 307-316 (1997)
- [37] Ernst Moritz Arndt University Greifswald; Department of BioSciences. <http://p13mi.biologie.uni-greifswald.de/sub2D/divisionmobi.htm>

- [38] Weber, G.; Adamczyk, A.; Freytag, S.: Treatment of acne with a yeast preparation. *Fortschritt-Medizin* 107 (26), S. 563-566 (1989)
- [39] Schlegel, H. G.: Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 7. Auflage* (1992)
- [40] Ireland, L. S.; Johnston, G. C.; Drebot., M. A.; Dhillon, N.; DeMaggo, A. J., Hoekstra, M. F.; Singer, R. A.: A member of a novel family of yeast "zn-finger" proteins mediates the transition from stationary phase to cell proliferation. *EMBO J*, 13, 3812-3821 (1994)
- [41] Attfeld, P. V.: Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology* 15, 1351-1357 (1997)
- [42] Welch, W. J.: How cells respond to stress. *Scientific American*, 34-41 (1993)
- [43] Mager, H. W.; Kruijff, A. J. J.: Stress- induced transcriptional activation. *Microbiological Reviews* 59, 506-531 (1995)
- [44] Kenward, N.; Landon, M.; Laszlo, L.; Mayer, J.:Heat shock proteins, chaperones and the prion encephalopathies. *Virology* 70, 4724-4728 (1996)
- [45] Sanchez, Y.; Lindquist, S.: HSP104 is required for induced thermotolerance. *Science* 248, 1112-1115 (1990)
- [46] Beker, M. J.; Rapoport, A. I.: Conservation of yeasts by dehydration. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 35, 127-171 (1987)
- [47] Heukeshoven, J.; Dernick, R.: Improved silver staining procedure for fast staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32 (1988)

- [48] Görg, A.; Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., Weiss, W.: Two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG - Dalt): The state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 16, 1079-1086 (1995)
- [49] Beker, M. G.: factors of wine yeast resistance at teir dehydration, In: Current Development in Yeast Research. Advances in Biotechnology (Eds. Stewart, G. G, Russel, J.). *Toronto- Oxford- New York- Sydney- Paris- Frankfurt, Pergamon Press, 1981, 117-121 (1981)*
- [50] Kessler, H. G., Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik – Molkereitechnologie. *Kessler-Verlag, München 4. Auflage, S. 290–298 (1996)*
- [51] Jul, M.: The quality of frozen foods. *London: Academic Press* 8, 34-39 (1984)
- [52] Baltes, W., Lebensmittelchemie. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage (1995)*
- [53] Blum, H.; Beier, H.; Groß, H. J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99 (1987)
- [54] Varela, J. C. S.; Van-Beekvelt, C.; Planta, R. J.; Mager, W. H.: Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Mol.Microbiol.* 6, 2183-2190 (1992)
- [55] Crowe, J. H.; Carpenter, J. F.; Crowe, L. M.; Anchordoguy, T. J.: Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27, 219–231 (1990)
- [56] Latscha, H. P.; Klein H. A.: Anorganische Chemie: Chemie-Basis I. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage (1990)*
- [57] Garrels, J. I.; Franza, B. R.; Chang, C.; Latter, G.; *Electrophoresis* 11, 1114-1130 (1990)

- [58] Blomberg, A.; Blomberg, L.; Norbeck, J.; Fey, S. L.; Larsen, P. M.; Roepstoff, P.; Degand, H.; Boutry, M.; Posch, A.; Görg, A.: Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16, 1935-1945 (1995)
- [59] Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Weiss, W.: *Electrophoresis* 20, 712-717 (1999)
- [60] Görg, A.; Boguth, G.; Obermaier, C.; Weiss, W.: Two-dimensional electrophoresis in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis* 19, 1516-1519 (1998)
- [61] Suckau, D.; Kräuter, K. O.; Rapp, U.; Mann, M.; Jensen, O.: Automation of Maldi-tof MS. *Analytical Chemistry* 69, 1706 - 1714 (1997)
- [62] Grey, M.; Schmidt, M.; Brendel, M.: Overexpression of ADH1 confers hyper-resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 29, 437-440 (1996)
- [63] Ramaswamy, S.; Kratzer, D.A.; Hershey, A.D.; Rogers, P.H.; Arnone, A.; Eklund, H.; Plapp, B. V.: Crystallization and preliminary crystallographic studies of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase I. *J. Mol. Biol.* 235, 777-779 (1994)
- [64] Schmitt, A. P.; McEntee, K.: Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (12), 5777-5782 (1996)
- [65] Bertram, G. I.; Swoboda, R. K.; Gooday, G. W.; Gow, N. A.; and Brown, A. J.: Structure and regulation of the *Candida albicans* ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast* 12, 115-127 (1996)

- [66] Norbeck, J.; Blomberg, A.: Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J. Biol. Chem* 272 (9), 5544-5554 (1997)
- [67] Li, X. Y.; Virbasius, A.; Zhu, X C.; Green, M. R.: Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature* 399, 605-609 (1999)
- [68] Minet, M.; Lacroute, F.: Cloning and sequencing of a human cDNA coding for a multifunktional polypeptide of the purine pathway by complementation of the *ade2 - 101* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 18, 287-291 (1990)
- [69] Myasnikov, A.; Sasnauskas, K.; Janulaitis, A.; Smirnov, M.: The *Saccharomyces cerevisiae* ADE1 gene: structure, overexpression and possible regulation by general amino acid control. *Gene* 109, 143-147 (1991)
- [70] Ostantinin, D.; Alenin, V. V.; Domkin, V. D.; Smirnov, M.: Isolation and properties of phosphoribosyl-amino imidazol-succinocarboxamide-synthetase from *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Biokhimiia* 54, 1265-1273 (1989)
- [71] Ferbebre, G.; Bratty, J.; Chen, H.; Cedergren, R. A.: hammerhead ribozyme inhibits ADE1 gene expression in yeast. *Gene* 155, 45-50 (1995)
- [72] Levdikov, V.; Barynin, V.; Grebenko, A.; Lamzin, V.; Wilson, K.: The structure of SAICAR - synthase: an enzyme in the de novo pathway of purine nucleotide biosynthesis. *Structure* 6, 363-376 (1998)
- [73] Brandt, P.; Ramlow, S.; Otto, B.; Blöcker, H.: Nucleotide sequence analysis of a 32,500bp region of the right arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IV. *Yeast* 12, 85-90 (1996)
- [74] Stark, M. J.: Yeast protein serine/threonine Phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast* 12, 1647-1675 (1996)

- [75] Hoffmann, R.; Jung, S.; Ehrmann, M.; Hofer, H. W.: The *Saccharomyces cerevisiae* gene PPH3 encodes a protein phosphatase with properties different from PPX, PP1 and PP2A. *Yeast* 10, 567-578 (1994)
- [76] Ronne, H.; Calberg, M.; Hu, G. Z.; Nehlin, J.O.: Protein phosphatases 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4876-4884 (1991)
- [77] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.: Molekularbiologie der Zelle. Verlag, New York, 3. Auflage (1995)
- [78] Görg, A., Weiss, W.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins using immobilized pH gradients. *Cell Biology* 4, 386-397 (1998)
- [79] McPhillips, T., M.; Hus, B.; Sherman, M.; Mas, M.; Rees, D.: Structure of the R65Q mutant of yeast 3-phosphoglycerate kinase complexed with Mg-AMP-PNP and 3-phospho-D-glycerate. *Biochemistry* 35, 4118-4127 (1996)
- [80] Proteindatenbank, Swiss-Prot; NiceProt View; Schweiz
www.expasy.ch/cgi-bin
- [81] Proteindatenbank, NCBI; PubMed; National Library of Medicine;
<http://www.ncbi.nlm>
- [82] Schnier, J.; Schwelberger, H. G.; Smit-Mcbride, Z.; Kang, H. A.; Hershey, J.: Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3105-3114 (1991)
- [83] Kang, H. A.; Schwelberger, H. G.; Hershey, J. W.: Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 14750-14756 (1993)

- [84] Görg, A.; Postel, W.; Domscheit, A.; Günther, S.: Methodology of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for the analysis of cell lysates and tissue proteins; In: Ender, A.T.; Hanash, S. (eds.): *Two-dimensional electrophoresis*; Verlag Chemie, Weinheim, 267-281 (1988)
- [85] Arnheim, K.: Darmassoziiertes Immunsystem stimulieren *Saccharomyces boulardii* – Wirkungsmechanismen. *Fortschr. Med.* 30, 52-53 (1994)
- [86] McFarland, L. V.: *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clinical Infectious Diseases* 22, 200-201 (1996)
- [87] McFarland, L. V.; Bernasconi, P.: *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbial Ecology in Health and Disease* 6, 157-171 (1993)
- [88] Hitzeman, R. A.; Hagie, F.E.; Hayflick, J. S.; Chen, C. Y.; Seeburg, P. H.; Derynck, R.: The primary structure of *Saccharomyces cerevisiae* gene for 3-phosphoglycerat kinase. *Nucleic Acids Res.* 10, 7791-7808 (1982)
- [89] Cassone, A.: Cell wall of pathogenic yeast and implications for antimycotic therapy. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 12, 635-643 (1986)
- [90] Marichal, P.; Bossch, H. V.: Mechanisms of resistance to azole antifungals. *Acta Biochimica Polonica* 42, 509-516 (1995)
- [91] Yamaguchi, H.; Hiratani, T.; Baba, M.: Effect of aculeacin a, a wall- active antibiotic, on synthesis of the yeast cell wall. *Microbiol. Immunol.* 29, 609-623 (1985)
- [92] Tanner, W.; Gentzsch, M.; Immervoll, T.; Scheinost, A., Bolsinger, S.: Fungal glycoproteins and their biosynthetic pathway as potential targets for antifungal agents. *Acta Biochimica Polonica* 42, 505-508 (1995)

- [93] Minga, M.; Coulon, J.; Bonaly, R.: Effects of subinhibitory dose of amphotericin B on cell wall biosynthesis in *C. albicans*. *Res. Microbiol.* 140, 95-105 (1989)
- [94] Mrsa, V.; Seidl, T.; Gentzsch, M.; Tanner, W.: Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1145-115(1997)
- [95] Häusler, A; Ballou, L; Ballou, C. E.; Robbins, P. W.: Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an α -1,2 mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6846-6850 (1992)
- [96] Kapteyn, J.; Ende, H.; Klis, F.: The contribution of cell wall proteins to the organisation of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426, 373-383 (1999)
- [97] John, E.; Hampel, W. A.: Enzyme formation by a cell wall lytic artrobacter species: formation of β -mannanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 60-64 (1991)
- [98] Duan, X.; Ackerly, M.; Anderson, P.: Evidence for involvement of β -glucan-binding cell surface lectins in human natural killer cell function. *Cellular Immunology* 157, 393-402 (1994)
- [99] Wen, G.; Leep, T.; Hui, D.; Baumgartner, B. G.; Hameister, H.; Brenig, B.: Structural and functional analsysis of the porcine secretory carrier protein gene (SCAMP1). *Mammalian Genome* 9, 536-539 (1998)
- [100] Brul, S.; Vaart, J. M.; Chapman, F.; Verrips, C. T.: The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *S. cerevisiae* and filamentous ascomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek* 72, 229-237 (1997)

- [101] Boone, C.; Sommer, S. S.; Hensel, A.; Bussey, H.: Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall β -glucan assembly. *The Journal of Cell Biology* 110, 1833-1843 (1990)
- [102] Castro, C.; Ribas, C.; Rey, F.; Duran, A.: Papualacandin B resistance in budding and fission yeast: isolation and characterisation of a gene involved in (1,3) β -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 177, 5732-5739 (1995)
- [103] Baymiller, J.; McCulloch, J. E.: Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* mutation that allows cells to grow without chitin synthase 1 or 2. *Curr. Genetics* 23, 102-107 (1993)
- [104] Roemer, T.; Bussey, H.: Yeast β -glucan synthesis: KRE8 encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis in vivo and for glucan synthase activity in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11295-11299 (1991)
- [105] Latzko, F.; Hampel, W.: Enzyme formation by a yeast cell wall lytic arthrobacter sp.: Formation of β (1,3)-glucanase. *Appl. Microbio. Biotechnol.* 40, 12-16 (1993)
- [106] Ho, A.; Racyniak, G. A.; Ives, E. B.; Wentz, S. R.: The Integral membrane protein Snl1p is genetically linked to yeast nuclear pore complex function. *Molecular Biology of the Cell* 9, 355-373 (1998)
- [107] Jeong, Y.; Vieth, W. R.; Matsuura, T.: Studies of transport process coupled with reaction in membrane-sandwiched yeast cell reactors. *Annals New York Academy of Science* 515, 214-227 (1997)
- [108] Werner, L.; Latzko, F.; Hampel, W.: Spraydrying of yeast-lytic enzymes from arthrobacter sp. *Biothechnology Techniques* 7, 663-666 (1993)

- [109] Kollar, R.; Petrakova, E.; Ashwell, G.; Robbins, P. W.; Cabib, E.: Architecture of the yeast cell wall. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 1170-1178 (1995)
- [110] Deshpande, M. V.: Enzymatic degradation of chitin ist biological application. *Journal of Scientific and Industrial Research* 45, 273-281 (1986)
- [111] Asenjo, J .A.; Ventom, A. M.; Andrews, B. A.: Selective release of recombinant protein particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. *Biotechnology* 11, 214-217 (1993)
- [112] Fleet, G. H.; Rose, A.; Narrison, J. S.: The yeasts. *Academic Press* 4, 199-277 (1991)
- [113] Kapteyn, J. C.; Montijn, R. C.; Vink, E.; Cruz, J. D.; Llobell, J. E.; Shimoi, H.; Lipke, P. N.; Klis, F. M.; *Glycobiologie* 6, 337-345 (1996)
- [114] Görg, A., Fawcett, J. S., Chrambach, A.: The current state of electrofocusing in immobilized pH gradients; *Electrophoresis* 2, 1-40 (1988)
- [115] Hartland,R. P.; Vermeulen, C. A.; Klis,F. M.; Sietsma, J. H.; Wessels, J. G. I.; *Yeast* 10, 1591-1599 (1994)
- [116] Mol, P. C.; Wessels, J. G. I.; *FEMS Microbiol. Lett.* 41, 95-99 (1987)
- [117] Shaw, J. A.; Mol, P. C.; Bowers, B.; Silverman, S. J.; Valdivieso, M. H.; Duran, A.; Cabib, E.; *Cell. Biol.* 114, 111-123 (1991)
- [118] Cabib, E.; Robberts, R.; *Annu. Rev. Biochem.* 51, 763-793 (1982)
- [119] Orlean, P.; Pringle, R. J.; Broach, J. R.; Jones, E. W.: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. *Cell Cycle and Cell Biology* 3, 229-362 (1997)

- [120] Cabib, E.; Drgon, T.; Drgonova, J.; Ford, R. A.; Kollar, R.; *Biochem. Soc. Trans.* 25, 200-204 (1997)
- [121] Casanova, M.; Lopezribot, J. P.; Martinez, J. P.; Sentandreu, R.; *Infect. Immun.* 60, 4898-4901 (1992)
- [122] Görg, A.; Postel, W.; Weser, J.: Electrophoretic methods in horizontal systems. *Electrophoresis* 6, 435-449 (1986)
- [123] Wojchiechowicz, D.; Lu, C. F.; Kurjan, J. P. N.; Lipke, P. N.; *Mol. Cell. Biol.* 13 22554-22563 (1993)
- [124] Shimoi, H.; Imura, Y.; Obata, T.; *J. Biochem.* 118, 302-311 (1995)
- [125] Ram, A. F. J.; Ende, H.; Klis, F. M.; *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 249-255 (1998)
- [126] Kondo, K.; Inouye, M.; *Biol. Chem.* 266, 17537-17544 (1991)
- [127] Vaart, J. M.; Schage, F. A.; Mooren, J. W.; Chapman, F. M.; Klis, F. M.; Verris, C. T.; *Biochim. Biophys. Acta* 1291, 206-214 (1996)
- [128] Nobe, J. G.; Lipke, P. N.; *Trends Cell Biol.* 4, 41-45 (1994)
- [129] Kollar, R.; Reinhold, B. B.; Petrakova, E.; Yeh, H. J. C.; Aswel, J.; Drgonova, J. C.; Kapteyn, J. C.; Klis, F. M.; Cabib, E.; *J. Biol. Chem.* 272, 17762-17775 (1997)
- [130] Lu, C. F.; Montijn, R. C.; Brown, J. L.; Klis, F. M.; Kurjan, H.; Bussey, P. N.; Lipke, P. N.; *Mol. Cell. Biol.* 13, 22554-22563 (1993)
- [131] Bourdineaud, J. P.; Vaart, J. M.; Donzeau, M.; Sampaio, G.; Verris, C. T.; *Biochim. Biophys. Acta* 1291, 206-214 (1998)

- [132] Schoffemeer, E. A. M.; Kapteyn, J. C.; Montijn, R. C.; Cornelissen, B. C.: Modern fungicides and antifungal compounds. *Intercept. Andover.* 12, 157-162 (1996)
- [133] Yip, C. L.; Welch, S. K.; Klebl, F.; Gilbert, T.; Seidel, P.; Grant, F. J.; O'Hara, P. J.; McKay, V. L.: Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MMN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2723-2727 (1994)
- [134] Corbett, J. M., Dunn, M. J., Posch, A., Görg, A.: Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: An interlaboratory comparison; *Electerophoresis* 15, 1205-1211 (1994)
- [135] Yun, D. J.; Zhao, Y.; Pardo, J. M.; Narasimhan, M. L.; Damsz, B.; Lee, H.; Abad, L. R.; Hasegawa, R. A.; Bressan, R. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7082-7087 (1997)
- [136] Kapteyn, J. C.; Ram, A. F. J.; Groos, E. M.; Kollar, R., Montijn, R. C.; Ende, H.; Llobell, A.; Cabib, E.; Klis, F. M.; *J. Bacteriol.* 179, 6279-6284 (1997)
- [137] Vandenbol, M.; Bolle, P. A.; Dion, C.; Portetelle, D.; Hilger, F. *Yeast* 10, 35-40 (1994)
- [138] Toh, A. E.; Yasunaga, S.; Nisogi, H.; Tanaka, K.; Oguchi, T.; Matsui, Y.: Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast* 9, 481-494 (1993)
- [139] Görg, A.: Advances in 2D gel techniques. *Proteomics: A Trends Guide. Elsevier Science, London*, 3-6 (2000)
- [140] Dunn, M. J., Görg, A.:Two- dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for proteome analysis. *Proteomics BIOS Scientific Publisher*, 43-63 (2000)