

Department Chemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Lokalisation und Funktion von Hsp12 aus
der Bäckerhefe *S. cerevisiae***

Birgit Meinlschmidt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Steffen Glaser

Prüfer der Dissertation: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
Univ.-Prof. Dr. Dieter Langosch

Die Dissertation wurde am 28.09.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 27.11.2006 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Stressantwort in Hefe	1
1.1.1	Auswirkungen von Stress auf Hefezellen.....	2
1.1.2	Die Hitzeschockproteine (Hsps) in <i>S. cerevisiae</i>	7
1.2	Die Zellhülle von <i>S. cerevisiae</i>	12
1.3	Hsp12 aus <i>S. cerevisiae</i>	22
1.4	Nativ entfaltete Proteine.....	29
1.5	Problemstellung	34
2	Material und Methoden.....	37
2.1	Materialien.....	37
2.1.1	Chemikalien.....	37
2.1.2	Größenstandards und Kits	39
2.1.3	Proteine und Antikörper.....	39
2.1.4	Chromatographiematerialien.....	40
2.1.5	Sonstige Materialien.....	40
2.1.6	Geräte.....	41
2.1.7	Computerprogramme	43
2.2	Verwendete Organismen und deren Kultivierung	44
2.2.1	Stämme	44
2.2.2	Medien.....	45
2.2.3	Kultivierung und Konservierung von <i>E.coli</i>	47
2.2.4	Kultivierung und Konservierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
2.3	Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	48
2.3.1	Plasmide.....	48
2.3.2	Oligonukleotide.....	49
2.3.3	Lösungen für molekularbiologische Methoden	50
2.3.4	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	51
2.3.5	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	51
2.3.6	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	52
2.3.7	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	52
2.3.8	Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten.....	52
2.3.9	DNA-Sequenzanalyse	52
2.3.10	Transformation von <i>E. coli</i>	52
2.3.11	Lithiumacetat-Methode zur Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	53
2.3.12	PCR-Amplifikation	53
2.3.13	DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme.....	55
2.3.14	Dephosphorylierung von DNA-Enden	55
2.3.15	Ligieren von DNA-Fragmenten	55

2.4	Proteinanalytische Arbeitstechniken.....	56
2.4.1	Lösungen für Proteinchemische Methoden.....	56
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	57
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976).....	57
2.4.4	Färbung nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971).....	58
2.4.5	Immunoblotting (Western Blot).....	58
2.4.6	Interaktionsanalysen mittels Differentialkalorimetrie (DSC).....	59
2.4.7	Interaktionsanalyse mittels Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC).....	60
2.5	Chromatographie.....	61
2.5.1	Ionenaustauschchromatographie.....	61
2.5.2	Gelfiltrationschromatographie.....	62
2.6	Präparative Methoden.....	62
2.6.1	Zellaufschluss.....	62
2.6.2	Proteinexpressionsnachweis in Hefe.....	63
2.6.3	Aufkonzentrierung und Dialyse von Proteinen.....	63
2.6.4	Reinigung von Hsp12 _{A84P} aus <i>E. coli</i>	63
2.7	Spektroskopie.....	64
2.7.1	UV/VIS-Spektroskopie.....	64
2.7.2	Fluoreszenzpolarisation und Probenvorbereitung.....	65
2.7.3	Circulardichroismus Spektroskopie.....	67
2.8	Mikroskopie.....	69
2.8.1	Phasenkontrastmikroskopie.....	69
2.8.2	Fluoreszenzmikroskopie Calcofluor White-gefärbter Zellen.....	69
2.8.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	69
2.9	Lokalisationsstudien und Funktionsassays.....	70
2.9.1	Subzelluläre Fraktionierung im Saccharosedichtegradienten.....	70
2.9.2	Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation.....	71
2.9.3	Subzelluläre Fraktionierung von <i>E. coli</i>	72
2.9.4	Isolation von Vakuolen.....	73
2.9.5	Isolation der Plasmamembran.....	73
2.9.6	Isolation von Mitochondrien.....	74
2.9.7	Ermittlung des Chitingehaltes ganzer Zellen.....	74
2.9.8	Importversuche.....	75
2.10	Proteom- und Lipidanalyse.....	76
2.10.1	Probenvorbereitung für die 2D-Gelelektrophorese.....	76
2.10.2	Isoelektrische Fokussierung.....	76
2.10.3	2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	77
2.10.4	Coomassiefärbung von 2D-Gelen.....	79
2.10.5	Massenspektrometrische Proteinanalyse.....	79
2.10.6	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrische Lipidanalyse.....	81
2.10.7	Lipidanalytik mittels ESI-MS/MS und Gas-Chromatographie.....	82

3	Ergebnisse	83
3.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>HSP12</i> -Deletionsmutante	83
3.1.1	Wachstumskinetik	83
3.1.2	Wachstum in Abhängigkeit von der Temperatur	84
3.1.3	Rasterelektronenmikroskopie	88
3.1.4	Zellwandanalyse mittels Calcofluor white (CFW)	93
3.1.5	Kolorimetrische Ermittlung des Chitingehaltes	94
3.1.6	Überprüfung der Zellwandstabilität	94
3.2	Lokalisation von Hsp12 in lebenden Zellen	96
3.2.1	Subzelluläre Fraktionierung im Saccharosedichtegradienten	96
3.2.2	Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation	98
3.2.3	Die Assoziation von Hsp12 an Zellorganellen	101
3.2.4	Analyse der Assoziation von Hsp12 an Membranen	102
3.2.5	<i>In vivo</i> Verteilung von Hsp12 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase	103
3.2.6	Einfluss von Hitzeschock auf die <i>in vivo</i> Verteilung von Hsp12	107
3.3	Translokation von Hsp12 durch Lipiddoppelschichten	108
3.3.1	Signalsequenz	108
3.3.2	Translokation von Hsp12 durch die Plasmamembran lebender Hefe Zellen	110
3.3.3	Verteilung von rekombinantem Hsp12 in <i>Escherichia coli</i>	112
3.3.4	Hsp12-Import in „Large Unilamellar Vesicles“ (LUVs)	113
3.4	Interaktion von Hsp12 mit Modellmembranen	114
3.4.1	Kalorimetrische Interaktionsanalyse von Hsp12 mit Lipid	115
3.4.2	Bindung von Hsp12 an Modellmembranen	118
3.5	Lipidanalyse von Zellmembranen	121
3.5.1	Massenspektrometrische Lipidanalyse von Hefezellmembranen	121
3.5.2	Membranfluidität lebender Zellen	127
3.6	Proteomanalyse	129
3.7	<i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Untersuchungen an Hsp12-Fragmenten	131
3.7.1	Planung der Hsp12-Fragmente	131
3.7.2	Verteilung der Deletions- und Substitutionsmutanten in lebenden Hefezellen	133
3.7.3	Die Zelloberfläche der Hsp12-Mutanten	134
3.7.4	Wachstumstemperaturbereich der <i>HSP12</i> Mutanten	136
3.7.5	Translokation der Hsp12-Fragmente durch Phospholipid Modellmembranen	137
3.7.6	Sekundärstruktur und Lipid-Interaktionsanalyse von Hsp12 _{A84P}	138
4	Diskussion	140
4.1	Phänotypische Charakterisierung von Δ HSP12-Zellen	140
4.2	Die <i>in vivo</i> Lokalisation von Hsp12	149
4.3	Translokation von Hsp12 durch Lipidmembranen	152
4.4	Interaktion von Hsp12 mit synthetischen Membranen	154
4.5	Lipid- und Proteomanalysen ganzer Zellen	158
4.6	Hsp12-Fragmente	163

4.7	Modell für Hsp12	165
5	Zusammenfassung	167
6	Literaturverzeichnis	170
7	Abkürzungen	194

1 Einleitung

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* stellt für die moderne Biologie einen wichtigen Modellorganismus dar, der darüber hinaus der am besten untersuchte Eukaryot ist. Grund für das große Interesse an diesem Organismus ist, dass es ein sehr einfach zu kultivierender, sich schnell verdoppelnder, einzelliger Eukaryot ist, der sämtliche ultrastrukturellen Charakteristika höherer eukaryotischer Zellen beherbergt. *S. cerevisiae* ist taxonomisch den Ascomyceten, den sogenannten Schlauchpilzen, zugeordnet, die wiederum den höheren Pilzen, den Eumycetes, angehören. In einer weltweiten Kollaboration konnte 1996 die Gesamtgenomsequenzierung von *S. cerevisiae* abgeschlossen und veröffentlicht werden (Goffeau et al., 1996). Mit 5570 bekannten Genen, 12,07 Millionen Basen auf einer kleinen Anzahl an Chromosomen – 16 Stück - besitzt sie ein, im Vergleich zu dem Modellbakterium *E. coli* nur dreimal so großes Genom (Goffeau et al., 1996). Dementsprechend ist diese Hefe ein für eine Vielzahl an genetischen, molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen relativ einfach zugänglicher Eukaryot.

1.1 Die Stressantwort in Hefe

Wie alle lebenden Zellen kann auch *S. cerevisiae* stammabhängig innerhalb bestimmter Bereiche äußerer Bedingungen wie Temperatur (0°C – 48°C), pH (4,5 – 6,5) und Osmolarität (minimales Wasserpotential Ψ_w : -5 bis -20 MPa, optimales Ψ_w : -1,5 MPa) normales Wachstum aufrechterhalten (van Uden, 1984; Walker, 1999; Lagunas, 1986). Wird die Zelle allerdings Bedingungen ausgesetzt, die außerhalb dieses Bereiches liegen und das Zellwachstum beeinträchtigen oder sogar das Überleben bedrohen, so spricht man allgemein von Zellstress. Wie jeder einzelliger Organismus ist auch *S. cerevisiae* natürlichen Umgebungsschwankungen besonders stark ausgesetzt, da wegen der Bewegungsunfähigkeit ein aktives Entkommen und aufgrund der geringen Zellgröße eine Abschirmung gegen Umwelteinflüsse unwahrscheinlich ist (Walker, 1999). Derartige Schwankungen können physikalischer oder chemischer Natur sein. Dazu zählen plötzliche Veränderungen der Temperatur,

Austrocknung, oxidativer und osmotischer Stress, Druck, Strahlung, bestimmte Ionen, toxische, chemische Verbindungen und Nährstoffmangel. In der Natur müssen Organismen häufig Schwankungen mehrerer Parameter gleichzeitig bewältigen (Piper, 1997).

1.1.1 Auswirkungen von Stress auf Hefezellen

Schwankungen der äußeren Umgebung können zu Störungen des Gleichgewichts des inneren Milieus von jeglicher Art von Zellen führen. Unter Umständen werden so optimale Enzymaktivitäten stark beeinträchtigt, der Metabolismus wird gestört und zelluläre Strukturen werden destabilisiert (Nover und Hightower, 1991; Laszlo, 1992; Webster und Watson, 1993). Ein Schutzmechanismus der Hefezellen vor einem Schaden durch äußere Einwirkungen stellt die Initiation eines spezifischen Genexpressionsprogrammes dar. Dieses Programm, das als Stressantwort (Environmental stress response - ESR) bezeichnet wird, umfasst neben der Expression von ungefähr 900 Genen, die Repression mehrerer hundert anderer Gene. Die ESR wird grundsätzlich initiiert, wenn Hefen plötzlichen Umgebungsänderungen ausgesetzt sind (Gasch et al., 2000). Die Hochregulation der Gene der Stressantwort unterliegt der Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Msn2p und Msn4p (induzieren 88% der ESR-Gene), Hsf1p (bei Hitzeschock) und Hot1p (bei osmotischem Schock) (Gasch et al., 2000; Gasch, 2003). Diese regulieren unter anderem Gene, die eine Vielzahl an molekularen Chaperonen codieren oder die bei der Trehalose-Synthese und deren Abbau, bei der oxidativen Stressabwehr und der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Martinez-Pastor et al., 1996; Schmitt und McEntee, 1996; Boy-Marcotte et al., 1998; Gasch et al., 2000; Amoros und Estruch, 2001). *S. cerevisiae* reagiert auf eine Vielzahl von Stresseinwirkungen (siehe Tabelle 1-1) mit der koordinierten Expression dieser Gene, allerdings ist die Regulation der Expressionsänderung abhängig vom Gen und den vorherrschenden Bedingungen.

Stressantwort auslösende Faktoren	
Temperaturschock Hitzeschock Kälteschock	pH Extreme sauer alkalisch
Nährstoffmangel Stationäre Phase Aminosäurenmangel Stickstoffmangel Phosphatmangel Zinkmangel	Oxidativer und reduktiver Stress H ₂ O ₂ Menadion Diamid Cadmium DTT
Osmotischer Schock Sorbit KCl NaCl	DNA Mutagene alkylierende Verbindungen ionisierende Strahlen Doppelstrangbrüche
Stoffwechsel Petite Mutanten Diauxie nicht fermentierbare Kohlenstoffe	Ethanolchock
diverse Zellgifte	alpha Faktor Langzeitexponierung

Tabelle 1-1 Äußere Bedingungen, die zu einer Stressantwort führen

Daten wurden aus weitreichenden Translationsinitiations- und Genexpressionsanalysen ermittelt. Modifiziert nach (Gasch, 2003).

Zellen wie auch *S. cerevisiae* reagieren auf plötzliche Umgebungsänderungen in drei mehr oder minder gut zu unterscheidenden Phasen. In einer ersten Phase treten als unmittelbare Folge äußerer Einwirkungen zelluläre Veränderungen auf. Viele Arten von Stress führen zu einem Verlust der Polarisierung des Aktin Cytoskeletts, die in aktiv wachsenden Zellen die Knospung während der Zellteilung ermöglicht. Die Aktinstränge in der Mutterzelle werden aufgelöst, was mit der Aufgabe der Zellpolarität einhergeht und in letzter Konsequenz zum Wachstumsstop führt (Chant, 1999). Äußerlich sehr gut erkennbare Auswirkungen werden durch osmotischen Stress herbeigeführt. Werden Hefezellen einer erhöhten externen Osmolarität durch hohe Konzentrationen an Salz oder Zucker im Medium ausgesetzt, verlieren sie

unmittelbar an cytosolischem Volumen – die Zellen schrumpfen (Marechal et al., 1995). Dies ist auf die Elastizität der Hefezellwand zurückzuführen, die somit kaum vor Wasserverlust schützen kann (Rose, 1975; Meikle et al., 1988). Osmotischer Stress führt darüber hinaus zu Veränderungen der Plasmamembran, genauer gesagt deren Struktur, Permeabilität und mechanischen Fähigkeiten (Wood, 1999). Dies wiederum resultiert aus einer veränderten Expression von am Lipidmetabolismus beteiligten Genen. So wird die Phosphatidylcholin und –ethanolsynthese verstärkt induziert, während die von Ergosterol abnimmt (Rep et al., 2000; Causton et al., 2001). Veränderungen der Membranen beeinflussen andererseits die Aktivität verschiedener Transmembranproteine, wie Transporter und mechanosensitiver Kanäle, den sogenannten Osmosensoren (Rubenhagen et al., 2000; Sukharev et al., 2001; Hamill und Martinac, 2001; Heide et al., 2001). Eine andere Art von Stress, die Änderungen in der Ultrastruktur von Hefezellen erzeugen kann, ist der Hitzestress. Thermische Schäden in Hefezellen resultieren hauptsächlich aus der Zerstörung von Wasserstoffbrücken und hydrophoben Interaktionen, die zur allgemeinen Denaturierung von Proteinen und DNA führen. Setzt man Zellen intensiver Hitze aus, so kann Proteinaggregation und letztendlich Zelltod beobachtet werden (Ang et al., 1991; Parsell und Lindquist, 1994). Jedoch führen höhere Temperaturen zunächst zu einem vorübergehenden Wachstumsstillstand in der G₁-Phase des Zellteilungszyklus (Johnston und Singer, 1980). Nach nur einer halben Stunde Temperaturerhöhung von 25°C auf 37°C konnten im Elektronenmikroskop eine Volumenabnahme des Nukleolus, Partikel mit hoher Elektronendichte in den Mitochondrien und cytoplasmatische Aggregate kleiner Partikel, sogenannte Hitzeschockgranula, beobachtet werden (Webster und Watson, 1993). Mit der Abnahme der Mitochondrien-Anzahl nehmen Atmung und oxidative Phosphorylierung ab und es tritt eine Entkoppelung dieser beiden Vorgänge auf (Patriarca und Maresca, 1990). Dementsprechend bewirkt der Hitzeschock eine Reduktion des zellulären ATP-Spiegels (Findly et al., 1983). Morphologische Veränderungen im Zellkern sind auf unlösliche Protein- und Nukleinsäureaggregate in Form granulärer Ablagerungen zurückzuführen (Littlewood et al., 1987). Die Denaturierung dieser Proteine muss zwangsläufig zu schwerwiegenden Defekten in der Regulation der Transkription und einer ineffizienten DNA-Reparatur führen. Weitere Änderungen der Zellmorphologie sind durch Umgestaltung der Zellmembran und Zellwand bedingt. So konnten Änderungen der Membranfluidität und Struktur beobachtet werden (Suutari et al.,

1990; Beney und Gervais, 2001). Ferner wird durch unphysiologisch hohe Temperaturen das Verhältnis von Lipiden zu Proteinen in der Hefemembran beeinflusst (Piper, 1993) und häufig ist die Aggregation integraler Membranproteine zu beobachten (Kruuv et al., 1983). Dies kann einen verheerenden Einfluss auf die Nährstoffaufnahme haben, falls Membranproteine betroffen sind, die für den Transport von essentiellen Bestandteilen des Hefemetabolismus verantwortlich sind. Der Einfluss von Stress führt außerdem neben irregulärem Wachstum und gleichzeitiger Schwächung der Zellwand zu einer Streckung der Plasmamembran (Kamada et al., 1995). Dies hat womöglich eine erhöhte Membranpermeabilität zur Folge.

In einer zweiten Phase der Stressantwort werden zunächst spezifische Abwehrmechanismen ausgelöst, die am Beispiel des osmotischen Schockes erläutert werden sollen. In diesem Fall tritt ähnlich wie bei Hitzeschock zunächst ein vorübergehender Wachstumsstopp ein (Chant, 1999) und aufgrund veränderter physikochemischer Eigenschaften der Plasmamembran wird der auf Diffusion beruhende Transmembrantransport von Glycerin reduziert, um dieses später akkumulieren zu können (Gancedo et al., 1968; Sutherland et al., 1997). Darüber hinaus erlauben viele Signaltransduktionswege der Hefe schnell auf veränderte Bedingungen zu reagieren. Ein bekannter Weg unter Bedingungen des osmotischen Schockes ist der sogenannte HOG (high osmolarity glycerol) und der MAP Kinase Weg (Posas und Saito, 1997; Gustin et al., 1998). In Abhängigkeit von der über diesen Weg aktivierten MAP Kinase Hog1p kommt es zu einer verstärkten Expression einer relativ geringen Anzahl bestimmter Gene (Posas et al., 2000; Rep et al., 2000). Die Zahl der Gene, deren Expression abnimmt, ist dabei bedeutend höher. Im Großen und Ganzen wird durch osmotischen Stress die Expression von etwa 10% der Hefegene verändert (Gasch et al., 2000; Posas et al., 2000; Rep et al., 2000).

Unter bestimmten Voraussetzungen sind Hefezellen nicht nur in der Lage sich den äußeren Angriffen auf ihre Zellintegrität zu widersetzen, sondern sich darüber hinaus an derart widrige Wachstumsbedingungen zu adaptieren und wieder eine mehr oder minder normalen Zellproliferation aufzunehmen (Lindquist, 1986; Lindquist und Craig, 1988; Watson, 1990) Dies geschieht in einer letzten, der sogenannten adaptiven Phase der Stressantwort. Während dieser Phase werden beispielsweise kompatible Solute in der Zelle angehäuft. Diese Verbindungen beeinflussen weder

physikalische noch biochemische Prozesse innerhalb der Zelle, erhöhen die interne Osmolarität und ermöglichen so der Zelle, mehr Wasser aus der Umgebung (in einer effizienteren Art und Weise) aufzunehmen (Yancey et al., 1982). Einige dieser Verbindungen vermögen Wasser sogar zu ersetzen oder dessen Oberflächenspannung zu erhöhen und somit die Wasserhülle um Makromoleküle herum zu stabilisieren (Yancey et al., 1982; Wiggins, 1990). Viele verschiedene Verbindungen werden als kompatible Solute genutzt, wobei *S. cerevisiae* ausschließlich Glycerin anhäuft (Brown, 1978; Blomberg und Adler, 1992).

Andere Stressbedingungen verlangen nach anders gearteten Schutzmechanismen. So finden sich unter verschiedenen Stresssituationen große Mengen an Glykogen als Nährstoffreserve (Francois und Parrou, 2001) oder Trehalose. Letztere scheint in *S. cerevisiae* der generellen Protektion zu dienen, da es molekulare Chaperone bei der Kontrolle der Proteindenaturierung und –renaturierung unterstützt (De Virgilio et al., 1994; Singer und Lindquist, 1998a; Singer und Lindquist, 1998b). Trehalose wird kaum in logarithmisch wachsenden Zellen detektiert, umso mehr allerdings in stationären und Sporen (Kane und Roth, 1974; Lillie und Pringle, 1980). Nach mildem Hitzestress wird das Disaccharid in der Zelle angehäuft, jedoch wieder ziemlich schnell nach der Stresseinwirkung abgebaut (Attfield, 1987; Hottiger et al., 1987). Trehalose stabilisiert Proteine während des Hitzeschocks und ist sogar in der Lage, Proteinaggregation zu reduzieren. Da es in hoher Konzentration die Reaktivierung denaturierter Proteine durch molekulare Chaperone inhibiert, muss Trehalose schnell nach der Stresseinwirkung abgebaut werden (Singer und Lindquist, 1998a).

Im Zuge der Adaption an veränderte Bedingungen, können des Weiteren Umgestaltungen der Membranlipide festgestellt werden. So ändern sich bei verschiedenen Hefen sowohl der Grad der Sättigung als auch die mittleren Kettenlängen der Fettsäuren (Suutari et al., 1990) und die Zusammensetzung der Lipide. Bei *S. cerevisiae* konnte eine Induktion von Sphingolipiden beobachtet werden, wobei es innerhalb von 15 Minuten zu einer bis zu zehnfachen Erhöhung dieser Lipidklasse kommt (Jenkins et al., 1997). Innerhalb einer weiteren Stunde kann eine Zunahme von zwei verschiedenen Ceramiden, die aus Sphingolipiden entstehen, beobachtet werden. Man nimmt an, dass diese strukturellen Komponenten für die Hitzetoleranz benötigt werden, wobei die Sphingolipide auch eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen könnten (Jenkins et al., 1997).

Die wohl bekannteste Antwort von lebenden Zellen auf Hitzestress ist die Synthese einer bestimmten Gruppe von Proteinen, den sogenannten Hitzeschockproteinen (Hsps). Sie helfen der Zelle, extreme Umweltbedingungen zu überleben und stellen eine hoch konservierte Proteinklasse dar, die in allen bekannten Organismen auftritt (Lindquist und Craig, 1988). Sobald diese adaptive Phase der Stressantwort abgeschlossen, der zelluläre Energiemetabolismus angepasst, das Zytoskelett, also die Aktinrepolarisierung, wiederhergestellt, die Architektur der Zellwand den äußeren Bedingungen entsprechend angepasst ist, kann das Wachstum und die Zellteilung wieder aufgenommen werden (Piper, 1997).

Abhängig von Dauer und Stärke der Stresseinwirkung, kann es allerdings nicht nur zu einem vorübergehenden Wachstumsstopp, sondern durchaus auch zum Zelltod kommen. Dieser Fall tritt dann ein, wenn die zellulären Protektionsmechanismen nicht mehr ausreichen, den angerichteten Schaden zu beheben. Dementsprechend sterben Hefezellen, wenn sie z.B. exzessivem physikalischen Stress wie hohem Druck, extrem hohen oder sehr niedrigen Temperaturen ausgesetzt sind (van Uden, 1984; Hashizume et al., 1995). Darüber hinaus kann die Einwirkung verschiedener chemischer Verbindungen auf Hefezellen tödlich wirken. So zerstören schwache Säuren, die in ihrer undissoziierten Form in die Hefezellen transportiert werden, den Protonengradienten der Plasmamembran, da sie im Zellinneren in ihre Ionen dissoziieren (Stratford und Anslow, 1996). Viele antimykotische Wirkstoffe führen durch Interaktion mit der Plasmamembran ebenfalls zum Zelltod (Ryder und Dupont, 1985; Vanden Bossche et al., 1990; Georgopapadakou und Walsh, 1996).

1.1.2 Die Hitzeschockproteine (Hsps) in *S. cerevisiae*

Sämtliche Organismen haben einen bestimmten Temperaturbereich, innerhalb dessen sie wachsen können. Werden sie allerdings Temperaturen ausgesetzt, die weit außerhalb dieses Bereiches liegen, kann die Zellintegrität darunter leiden. Viele Zellstrukturen insbesondere einzelliger Organismen stellen einen Angriffspunkt für supraoptimale Temperaturen dar (Nover, 1991; Dawes, 1999). Hefezellen besitzen ein molekulares Verteidigungssystem, das unmittelbar nach Beginn der Stresseinwirkung durch erhöhte Temperatur induziert wird. Diese sogenannte Hitzeschockantwort ist ein ubiquitäres Regulationselement, das in allen untersuchten Organismen zu finden ist. Es umfasst die Synthese einer bestimmten Gruppe an Proteinen nach erfolgtem Hitzeschock – den hoch konservierten

Hitzeschockproteinen (Hsps) (Lindquist und Craig, 1988). Ein allgemeines Signal für die Induktion der Hsps ist das Vorhandensein anormaler Proteine, wie sie durch nicht optimale Temperaturen oder hohe Konzentrationen schädigender Verbindungen wie Ethanol oder Schwermetallionen entstehen (Nover, 1991; Rodriguez-Vargas et al., 2002). Darüber hinaus führen eine Vielzahl verschiedener Stressarten, sowie die intrazelluläre Anhäufung von Fremdproteinen bzw. von denaturierten Proteinen zur Synthese von Hitzeschockproteinen in unterschiedlichen Zelltypen (Goff und Goldberg, 1985; Kurtz et al., 1986; Ananthan et al., 1986; Werner-Washburne et al., 1989).

Die schnelle Reaktion der Zelle auf äußere Stresseinwirkung durch die Hitzeschockantwort erlaubt eine rasche Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes des Organismus innerhalb weniger Stunden (Mager und Ferreira, 1993). Derartige Reaktionen auf veränderte Umgebungsbedingungen setzen einen präzisen Regulationsmechanismus voraus. In Eukaryoten wird die verstärkte Expression von Hsps durch die Aktivierung des sogenannten Hitzeschockfaktors (Hsf) vermittelt, der hoch konserviert ist (Morimoto et al., 1992). Hsf bindet an das aus fünf Basenpaaren bestehende Hitzeschockelement (HSE) in der Promotorregion der Zielgene und aktiviert die Transkription dieser Gene in Abhängigkeit von Hitzestress (Bienz und Pelham, 1986). In *S. cerevisiae* wird Hsf1p durch ein einziges, essentielles Gen codiert – das *HSF1* (Sorger und Pelham, 1988; Wiederrecht et al., 1988). Hsf1p bindet nicht nur unter Stressbedingungen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen an die Promotoren und stellt mit dieser Fähigkeit eine Ausnahme unter eukaryotischen Hsfs dar (Sorger et al., 1987). Jedoch geht diese Beobachtung mit der Tatsache einher, dass viele Hitzeschockgene unter normalen Wachstumsbedingungen konstitutiv exprimiert werden (Parsell und Lindquist, 1993; Becker und Craig, 1994).

Neben der Regulation der Hsp-Expression durch Hsf1p existiert ein zweiter Weg, der nicht nur auf Hitzeschock, sondern auf eine Vielzahl zellulärer und äußerer Stressbedingungen reagiert. Die beiden Transkriptionsfaktoren Msn2p und Msn4p binden dabei an ein Sequenzelement innerhalb betroffener Promotoren bestehend aus fünf Basenpaaren geringer Varianz, was als „stress response element“ oder STRE bezeichnet wird (Marchler et al., 1993). Gene, die STRE-Elemente enthalten, werden negativ durch den Proteinkinase A Signaltransduktionsweg reguliert. Die Aktivität dieser Kinase wird über die Verfügbarkeit von Nährstoffen gesteuert,

respektive über den intrazellulären cAMP-Spiegel (Thevelein und de Winde, 1999). Dementsprechend werden viele Gene mit STRE-Elementen in Wachstumsphasen exprimiert, in denen die Glukose verbraucht und der cAMP-Spiegel niedrig ist (DeRisi et al., 1997). Obwohl einige Hsps wie *HSP12*, *HSP26* und *HSP104* zusätzlich durch STRE-Elemente reguliert werden, unterliegen die meisten Gene der Hitzeschockproteine jedoch dem Hsf1p durch das HSE in ihren Promotoren (Varela et al., 1995; Amoros und Estruch, 2001). Hsf1p scheint hauptsächlich für die Expression von Chaperonen während eines Hitzeschockes verantwortlich zu sein, während Msn2p/Msn4p die Expression von Genen reguliert, die in den Metabolismus involviert sind (DeRisi et al., 1997; Boy-Marcotte et al., 1999). Gene wie *HSP26* und *HSP12* werden dementsprechend wohl spezifisch durch einen bestimmten Stressfaktor abhängig von der Art und Weise des auftretenden Stressses aktiviert.

Die meisten Hitzeschockproteine zeichnen sich nicht nur durch verstärkte Induktion als Antwort auf äußeren Stress, ihr Vorkommen in sämtlichen untersuchten Organismen und ihrem hohen Anteil an homologen Aminosäuresequenzen aus, sondern auch durch ihre Funktion als molekulare Chaperone (Lindquist und Craig, 1988). Die meisten Chaperone können der Gruppe der Hitzeschockproteine zugeordnet werden (Georgopoulos und Welch, 1993; Buchner, 1996). Molekulare Chaperone sind an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge beteiligt (Buchner et al., 1991; Gething und Sambrook, 1992; Becker und Craig, 1994; Buchner, 1996). Als Faltungshelfern versuchen sie allgemeinen Faltungsproblemen wie Proteinaggregation in der Zelle entgegenzuwirken, die aufgrund hoher lokaler Proteinkonzentrationen und ungünstigen Temperaturen auftreten können (Jaenicke und Bohm, 1998; Walter und Buchner, 2002; Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Dabei erkennen und binden molekulare Chaperone ihre Vielzahl an Substraten über exponierte, hydrophobe Bereiche, stabilisieren so die in der Faltung befindlichen Proteinketten und verhindern die Aggregation aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen. Die Feisetzung von Substrat wird oft durch ATP-verbrauchende Konformationsänderungen gewährleistet. Auf diese Weise erhöhen sie die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein (Schwarz et al., 1996). Dabei spielen viele Hsps nicht nur eine Rolle bei der Aufrechterhaltung zellulärer Prozesse unter Stress, viele sind auch essentiell für das Zellwachstum unter physiologischen Bedingungen, was sie zu einer unentbehrlichen und sehr bedeutenden Proteinfamilie macht (Becker und Craig, 1994; Beissinger und Buchner, 1998).

Die Familie der molekularen Chaperone kann anhand ihrer molekularen Massen und Sequenzhomologien in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Buchner, 1996) (siehe auch Tabelle 1-2): die 60 kDa Hsps, z.B. GroEL mit seinem Co-Chaperon GroES (Martin und Hartl, 1997; Bukau und Horwich, 1998; Walter und Buchner, 2002), die 70 kDa Hsps, z.B. Hsp70, DnaK mit den Co-Chaperonen aus der Hsp40-Proteinfamilie, wie z.B. DnaJ (Bukau und Horwich, 1998; Bukau et al., 2000; Wegele et al., 2004), die 90 kDa Hsps, z.B. Hsp90 und HtpG (Richter et al., 2005; Pearl und Prodromou, 2006), die 100 kDa Hsps, z.B. Hsp104 und ClpB (Mogk und Bukau, 2004; Bosl et al., 2006) und die Familie der kleinen Hitzeschockproteine (sHsps) mit einer molekularen Masse von 10 – 40 kDa (Haslbeck et al., 2005a).

Im Vergleich zu den anderen genannten Chaperonen stellen die „kleinen Hitzeschockproteine“ durch eine gewisse Heterogenität in Sequenz und Größe eine sehr divergente Familie dar (Haslbeck und Buchner, 2002; Haslbeck et al., 2005a). Die Einordnung in die Gruppe der sHsps erfolgt neben der Überexpression bei Hitze und der geringen Größe anhand einer stark konservierten C-terminalen Domäne. Dieser Bereich aus etwa 90 Aminosäureresten wird wegen der engen Verwandtschaft mit dem Augenlinsenprotein α -Kristallin auch als α -Kristallindomäne bezeichnet (de Jong et al., 1998; Horwitz, 2003). „Kleine Hitzeschockproteine“ binden *in vitro* spezifisch an ungefaltete Proteine und verhindern in einem ATP-unabhängigen Weg deren Aggregation (Jakob und Buchner, 1994; Van Montfort et al., 2001; Haslbeck et al., 2005a). Verglichen mit anderen molekularen Chaperonen besitzen sie eine herausragende Bindekapazität, wobei die Größe der Substrate keine Rolle zu spielen scheint (Haslbeck et al., 2004; Basha et al., 2004). sHsps bilden lösliche hocholigomere Komplexe mit ihren Substratproteinen (Ehrnsperger et al., 1997; Haslbeck et al., 1999; Kim et al., 1998). Sie selbst assemblieren in große oligomere Komplexe, die aus zwölf bis 42 Untereinheiten bestehen können (Haslbeck et al., 2005a). Für die Rückfaltung der Substrate in die aktive Form sind jedoch weitere Chaperone, wie Hsp70, Hsp40 und Hsp104 erforderlich (Ehrnsperger et al., 1997; Lee und Vierling, 2000; Mogk et al., 2003; Haslbeck et al., 2005b).

Hitzeschockprotein	Vermutete physiologische Funktion
Hsp150/Pir2p	Stabilisierung der Zellwand
Hsp104 (<i>Hsp100-Familie</i>)	Chaperonfunktion notwendig für das Überleben nach Hitzeschock und den Erwerb der Stresstoleranz (Auflösung und Reaktivierung von Proteinaggregaten) Überexpression bei Hitzestress/ Stationäre Phase
Hsp82 (<i>Hsp90-Familie</i>)	Chaperonfunktion essentiell für Zellviabilität und Wachstum bei hohen Temperaturen starke Induktion durch Hitze von einem niedrigen Basallevel
(<i>Hsp70-Familie</i>)	Chaperonfunktion essentiell für Zellviabilität und Wachstum bei hohen Temperaturen verhindert Proteinaggregation und assistiert bei Faltung und Rückfaltung; in posttranslationale Importabläufe involviert Rolle bei der Proteolyse von Proteinen
Hsp60 (<i>Hsp60-Familie</i>)	Chaperonfunktion; mitochondrial; Faltungshelfer erleichtert posttranslationale Assemblierung von Proteinen
Hsp30	Induktion in stationärer Phase, bei Hitzeschock, hohen EtOH-Konzentrationen, osmotischen Stress Lokalisation in der Plasmamembran; an Regulation der H ⁺ -ATPase beteiligt
<i>Kleine Hsps</i>	Chaperonfunktion
Hsp42	zelluläre Rolle noch nicht geklärt
Hsp26	Induktion in stationärer Phase, bei Sporulation, Hitzeschock
PPI	Faltungshelfer; Peptidyl-Prolyl-Isomerase
PDI	Faltungshelfer; Protein-Disulfid-Isomerase
Andere	
Ubiquitin	Verantwortlich für Langzeitüberleben bei gemäßigt hohen Temperaturen und für die proteolytische Umsetzung denaturierter Proteine
Glykolytische Enzyme	Enolase (Hsp48); GAPDH (Hsp35); PGK
Katalase	Schutz vor Antioxidantien
GP400	Funktion ungeklärt; sekretorisches Glykoprotein/Hsp
Proteine der Hefevakuole	Carboxypeptidase Y, Proteinase A

Tabelle 1-2 Beschreibung der wichtigsten Hsps aus *S. cerevisiae*

(Lupashin et al., 1992; Parsell und Lindquist, 1994; Parsell und Lindquist, 1993; Piper et al., 1997; Walker, 1999; Dawes, 1999)

Neben diesen klassischen Chaperonen existieren weitere Proteine, die bei Hitzeschock überexprimiert werden und als Faltungshelfer bezeichnet werden können (siehe auch Tabelle 1-2). So konnten verschiedene Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen (PPIs) als Hitzeschockproteine identifiziert werden, da sie die Stresstoleranz beeinträchtigen (Parsell und Lindquist, 1994; Andreeva et al., 1997). Unter Stressbedingungen kommt es außerdem zu einer verstärkten Synthese von Proteinen, die für die Polyubiquitinylierung zuständig sind (Parag et al., 1987; Finley und Chau, 1991; Parsell und Lindquist, 1994).

Darüber hinaus gibt es eine Reihe weiterer Stressproteine, deren genaue Aufgaben noch nicht geklärt sind, die aber im allgemeinen Verteidigungssystem eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (siehe Tabelle 1-2).

1.2 Die Zellhülle von *S. cerevisiae*

Hefezellen sind von einer sogenannten Zellhülle umgeben, die aus drei verschiedenen Strukturen besteht (siehe auch Abbildung 1-1). Das sind vom Zellinneren her gesehen die Plasmamembran, der periplasmatische Raum und die Zellwand.

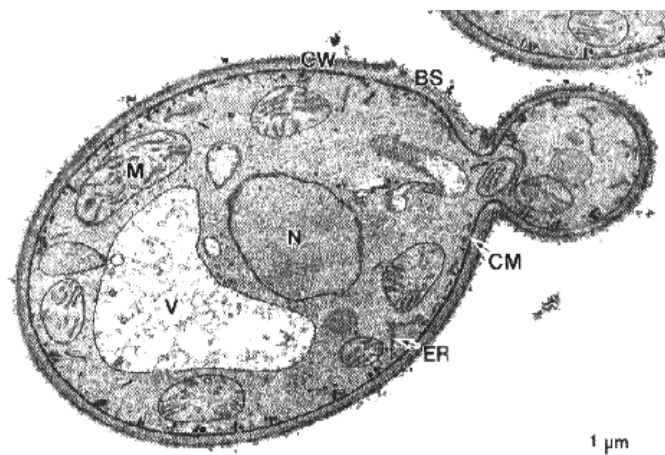


Abbildung 1-1 Elektronenmikroskopische (TEM-) Aufnahme einer Hefezelle

CW: Zellwand; CM: Periplasmamembran; BS: Knospungsnarbe; N: Zellkern; M: Mitochondrium; ER: Endoplasmatisches Retikulum; V: Vakuole; Abbildung aus: (Walker, 1999).

Diese Zellhülle macht bei *S. cerevisiae* etwa 15% des gesamten Zellvolumens aus und spielt eine große Rolle bei der Regulation der Osmose und Permeabilität (Walker, 1999).

Die Zellwand von Hefen stellt die äußerste Schicht der Zellhülle dar, steht damit in unmittelbarem Kontakt mit der Umgebung und ist eine äußerst strapazierfähige Zellkomponente (Smith et al., 2000). Sie macht mit ihrer 100 bis 200 nm dicken, mehrschichtigen Struktur aus Kohlenhydraten und Proteinen bis zu 30% des Zellrockengewichtes aus (Valentin et al., 1987; Fleet, 1991). Die Zellwand vermag einen Innendruck von 15 bar und mehr standzuhalten und ist trotz dieser enormen Stabilität keine starre Struktur konstanter Zusammensetzung (Eamus und Jennings, 1986). Eine Hauptaufgabe der Zellwand ist die Aufrechterhaltung der Zellform, die eine ovale oder elongierte bis hin zu der Gestalt von Pseudohyphen annehmen kann (Cabib et al., 1988). Darüber hinaus dient sie als Schutzwall, der in erster Instanz versucht, negativen Einflüssen, v.a. physikalischem Stress, entgegenzuwirken. Sie ist unter anderem an der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes beteiligt ist, wobei sie als robuste und flexible Struktur einen Gegendruck erzeugt und so den Wassereinstrom abwehren kann. Die Kombination aus mechanischer Festigkeit und hoher Elastizität gewährleistet einen effizienten Schutz gegen physikalisch ausgeübten Druck, da dieser einfach weitergeleitet und verteilt wird (Morris et al., 1986).

Polysaccharide bilden das Grundgerüst der Zellwand, an dem eine äußere Schicht von Proteinen besonderer Eigenschaften angebracht ist (siehe auch Abbildung 1-3; S. 18). Es handelt sich dabei um Glykoproteine (Mannoproteine), deren Seitenketten aus Kohlenhydraten die Permeabilität der Zellwand für Makromoleküle bestimmen (De Nobel et al., 1990; Osumi, 1998). Somit werden zum einen die Polysaccharide vor einem Angriff fremder, glykolytischer Proteine geschützt, zum anderen wird verhindert, dass kleinere Bausteine während der Zellwandkonstruktion in das umgebende Medium diffundieren. Auf diese Art und Weise entsteht ein kleiner, abgegrenzter Bereich in der inneren Region der Zellwand direkt anschließend an die Plasmamembran (siehe auch Abbildung 1-3). Diese als periplasmatischer Raum bezeichnete Region besteht hauptsächlich aus sekretorischen Proteinen, die die Zellwand nicht durchqueren können. Dazu gehören die Invertase und die saure Phosphatase. Sie katalysieren die Hydrolyse von Substraten, die die

Plasmamembran nicht passieren können (Arnold, 1991; Robinow und Johnson, 1991).

Die Plasmamembran besteht aus einer etwa 7,5 nm dicken Lipiddoppelschicht und enthält eine Mischung aus polaren Lipiden und Proteinen, die durch ihre Interaktion die Struktur der Membran bestimmen (van der Rest et al., 1995). Singer und Nicolson beschrieben 1972 Membranen nach ihrem berühmten Fluid-Mosaik-Modell (Singer und Nicolson, 1972). In diesem Modell werden Lipide als ein homogener See angesehen, in dem hauptsächlich monomere Proteine in niedriger Konzentration wahllos verstreut sind. Heute weiß man, dass Proteine nicht zufällig über die Membran verteilt sind; Membranen weisen eine unregelmäßige Architektur auf. Es gibt abgetrennte Regionen unterschiedlicher Struktur und Funktion, die in Dicke und Zusammensetzung variieren. Außerdem werden viel mehr Proteine beherbergt als vorher angenommen (Engelman, 2005).

Die Lipidzusammensetzung von Membranen ist sehr komplex und darüber hinaus nicht konstant. In *S. cerevisiae* gibt es große Unterschiede in den Anteilen der Phospholipide nicht nur zwischen den verschiedenen Wildtypstämmen, sie verändern sich auch in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle und der Kultivierungsbedingungen (Daum et al., 1999) (siehe auch Tabelle 1-3). Daraus wird deutlich, wie strikt die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran reguliert wird. Diese Regulation beeinflusst viele Membranproteine, denn Phospholipide und Sterole sind für die optimale Aktivität verschiedener Membranproteine von großer Wichtigkeit (Opekarova und Tanner, 2003).

Lipide	Zusammensetzung (%)	
	(Patton und Lester, 1991)	(Zinser et al., 1991)
Phosphatidylcholin (PC)	17,0	16,8
Phosphatidylethanolamin (PE)	14,0	20,3
Phosphatidylinositol (PI)	27,7	17,7
Phosphatidylserin (PS)	3,8	33,6
Cardiolipin (CL)	4,2	0,2
Phosphatidsäure (PA)	2,5	3,9
Sphingolipide	30,7	nb

Tabelle 1-3 Lipidzusammensetzung der Plasmamembran von *S. cerevisiae*
Nach (Patton und Lester, 1991) und (Zinser et al., 1991); nb: nicht bestimmt

Die Lipide der Plasmamembran sind asymmetrisch über die Doppelschicht verteilt. Die cytosolische Lipidschicht ist in *S. cerevisiae* reich an Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) (van der Rest et al., 1995). Die Lipidasymmetrie wird durch eine energieabhängige Flippase generiert und aufrechterhalten, die PS und PE von der exoplasmatischen zur cytosolischen Seite der Doppelschicht schafft (Seigneuret et al., 1984). Die Hauptlipidklassen stellen die Glycerophospholipide, Sphingolipide und Sterole dar. Glycerophospholipide bestehen aus zwei Fettsäureketten, die über eine Esterbindung an Glycerin-3-Phosphat gebunden sind, woran wiederum verschiedene die Kopfgruppe darstellende Substituenten geknüpft sind (Cholin, Ethanolamin, Serin, etc.) (van der Rest et al., 1995).

PE und PC sind die am weitesten verbreiteten Phospholipide eukaryotischer Zellen und machen 25% und 50% der Phospholipide aus (Kohlwein et al., 1996; Burgermeister et al., 2004). Sie werden hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum aber auch in den Mitochondrien synthetisiert (Dennis und Kennedy, 1972; Daum, 1985; Burgermeister et al., 2004). PS gehört zu den in geringerem Maß vertretenen Phospholipiden in Hefe. Es ist asymmetrisch über die Doppelschicht verteilt und wird im ER synthetisiert. PS scheint eine Rolle bei der Signaltransduktion zu spielen (Vance und Steenbergen, 2005). PI, das neben Phosphatidylglycerin (PG) zu den negativ geladenen Lipiden zählt, ist mit das wichtigste Phospholipid in eukaryotischen Zellen. Zusammen mit seinen Derivaten reguliert es diverse zelluläre Prozesse, wie die Glykolipidverankerung von Proteinen (Shields und Arvan, 1999), die Signaltransduktion (Divecha und Irvine, 1995; Ohanian und Ohanian, 2001), den mRNA Export aus dem Zellkern (Saiardi et al., 2000) und den Vesikel-Transport (Martin, 2001).

In *S. cerevisiae* gibt es nur drei verschiedene Sphingolipide, die alle drei aus einem Ceramid-Rückgrat bestehen (van der Rest et al., 1995). Ein weiterer Bestandteil der Plasmamembran stellen Sterole dar. Sie bestimmen in erster Linie die Rigidität der Membran und spielen eine Rolle bei der Zellvermehrung (van der Rest et al., 1995; Nes et al., 1993).

Ölsäure, bestehend aus 18 C-Atomen und einer Doppelbindung (18:1), Palmitoleinsäure (16:1) zusammen mit Spuren an Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) stellen die prinzipiellen Fettsäureketten in *S. cerevisiae* dar (Botha und Kock, 1993) (siehe auch Abbildung 1-2).

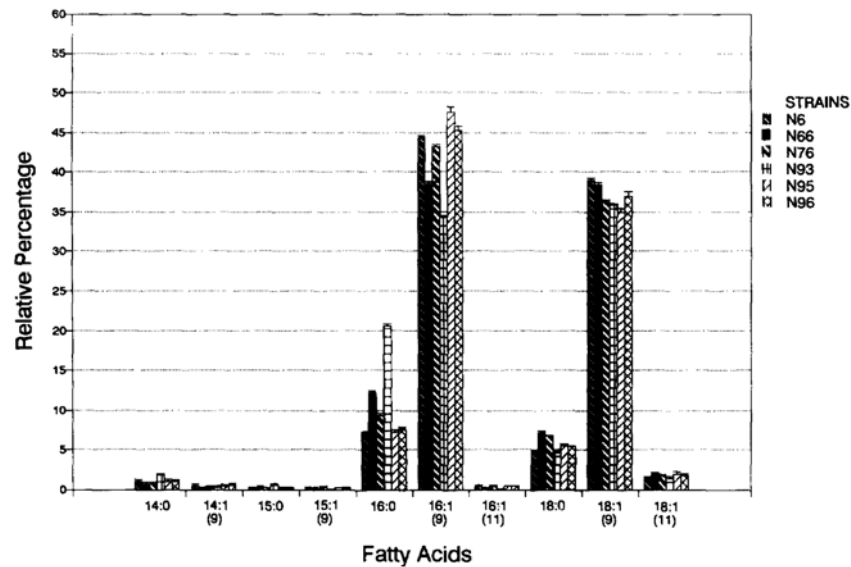


Abbildung 1-2 Fettsäureprofil von verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen

x-Achse: Anzahl der C-Atome : Anzahl der Doppelbindungen; Zahl in Klammern beschreibt die Position der Doppelbindung; Abbildung aus: (Botha und Kock, 1993).

Über die Fettsäureketten und deren Packung wird im Wesentlichen die Membranfluidität bestimmt. Die Packung wird umso dichter, je länger die Fettsäureketten sind und je geringer die Anzahl an Doppelbindungen ist. Dies führt zu einer geordneteren Struktur und einer Abnahme der Fluidität. Kalorimetrische Untersuchungen zeigten nämlich, dass weniger Doppelbindungen zu einem höheren Temperaturübergang als ungesättigte Lipide bei der Phasenumwandlung vom Gel zum Flüssig-kristallinen Zustand des Lipides führen (Huang und Li, 1999).

Die Kopfgruppen beeinflussen nicht nur das Oberflächenpotential der Membran (Carbon und Calderon, 1991) sie können auch direkt in die Aktivität von Membranproteinen eingreifen (Chen und Wilson, 1984). Lipide wie PC, PS und PI mit Kopfgruppen und Fettsäureketten, deren Querschnittsfläche vergleichbar ist, besitzen eine zylindrische Struktur und gliedern sich anstandslos in die Lipiddoppelschicht ein (de Kruijff, 1987). Lipide mit kleineren Kopfgruppen als Fettsäureketten, wie PE und Sterole, sind kegelförmig und stören die Membranorganisation. Hohe Konzentrationen an solchen Lipiden in der Membran können lokal eine starke Membrankrümmung induzieren und zu einem Defekt in der Packung der Lipide führen, wodurch Proteine beispielsweise leichter inserieren können. PE wird als ein Nicht-Bilayer-Lipid bezeichnet, das eine gewisse Diskontinuität in die allgemeine Struktur der Lipiddoppelschicht hinein bringt und so möglicherweise die Vesikelbildung beeinflusst (de Kruijff, 1987; Dowhan, 1997). PC

ist die Hauptkomponente zellulärer Membranen, dient aber auch als Vorläufer verschiedener Lipid-Second-Messenger und als Sammelstelle für Signalmoleküle (Exton, 1994; Burgermeister et al., 2004). PS ist ein geringerer Bestandteil von Membranen, es ist asymmetrisch über die Doppelschicht verteilt, wobei die Exponierung an der Außenseite Signalfunktion übernehmen kann. Wahrscheinlich spielt es eine Rolle bei der Beseitigung apoptotischer Zellen und stellt einen Co-Faktor vieler wichtiger Enzyme dar, die in Signaltransduktionswege involviert sind. Außerdem ist PS ein Vorläufer des Phosphatidylethanolamines (Vance und Steenbergen, 2005).

Durch Schwankungen der äußeren Umgebung, der molekularen Zusammensetzung der Membran oder durch Interaktionen von Fremdkörpern mit Membranbestandteilen können dynamische und strukturelle Eigenschaften der Membran verändert werden. In der sogenannten flüssigkristallinen Phase der Membran ist die Anordnung und Orientierung der Lipide ungeordnet, wobei sie gleichzeitig innerhalb des Bilayers diffundieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Phase viele Proteinfunktionen unterstützt (McElhaney, 1984; McElhaney, 1989). Äußere Parameter, wie Temperatur, Druck und Hydratation können Veränderungen dieser dynamischen Eigenschaften hervorrufen (Luzzati und Husson, 1962; Beney und Gervais, 2001). Beispielsweise führt eine Abnahme der Temperatur oder Erhöhung des Druckes zu einer Abnahme der Mobilität bestimmter Moleküle, was mit der Abnahme der sogenannten Membranfluidität interpretiert wurde (Macdonald et al., 1988). Dementsprechend wird die Membran zunehmend viskos (Sinensky, 1974; Quinn, 1988) und vollzieht bei einer typischen Temperatur (T_m) den Phasenübergang zur Gelphase (Beney und Gervais, 2001). Mikroorganismen sind in der Lage, ihre Membranen äußeren Bedingungen anzupassen. So werden Fettsäurekettenlängen und der Sättigungsgrad in Abhängigkeit der Temperatur verändert (Watson, 1978), es kommt zu cis-trans Isomerisierungen von Doppelbindungen (Loffeld und Keweloh, 1996) und zu Änderungen polarer Kopfgruppen (Ramos et al., 1997). Sterole, wie Cholesterin und Ergosterol, führen beispielsweise zu einer Abnahme der Fluidität und üben somit stabilisierende Effekte in Membranen lebender Zellen aus (Parks et al., 1982; Bottema et al., 1985). Die Zucker Saccharose und Trehalose interagieren andererseits mit polaren Gruppen der Phospholipide, halten so den Abstand zwischen den Kopfgruppen aufrecht und stabilisieren die Doppelschicht unter verschiedenen Stressbedingungen (Rudolph et al., 1986). Mit diesen Mechanismen

kann ein optimales Maß an Fluidität bewahrt werden und die Zellen können unter Stress überleben. Darüber hinaus kann die Membran äußere Schwankungen über ihre Fluidität wie eine Art Stress-Sensor wahrnehmen. So konnte ein Zusammenhang zwischen dem physikalischen Zustand der Membran und der Expression von Stressproteinen hergestellt werden. Veränderungen in der Membranlipidzusammensetzung von *S. cerevisiae* beeinflussten die Temperaturschwelle, die die Hsp Synthese initiierte (Chatterjee et al., 1997). Auch das Verhältnis zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren hat signifikante Auswirkungen auf die Transkription von Hsps (Carratu et al., 1996; Chatterjee et al., 2000). Außerdem scheint die Plasmamembran im Gegensatz zu Hsps direkt an der hitzeinduzierten Thermotoleranz beteiligt zu sein (Guyot et al., 2005).

Abhängig von den Wachstumsbedingungen macht die Zellwand 10 bis 25% des Zellrockengewichtes aus. Der Aufbau der Zellwand ist in Abbildung 1-3 schematisch dargestellt.

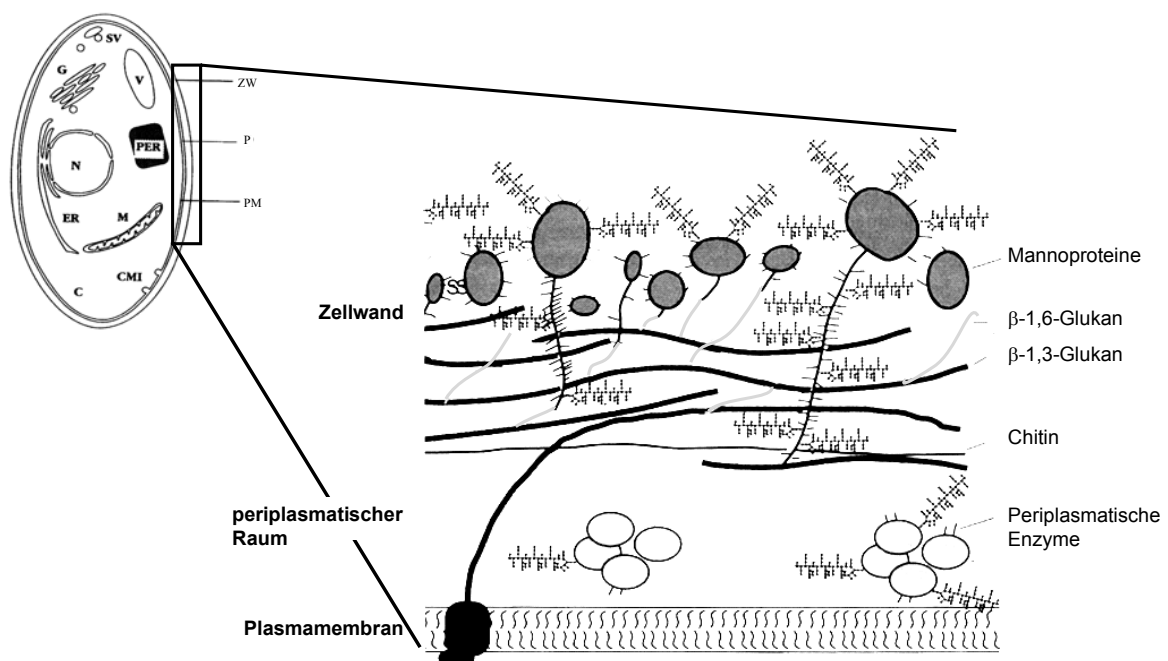


Abbildung 1-3 Zusammensetzung und Struktur der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Zellwand besteht aus zwei verschiedenen Schichten; einer inneren Glukanschicht bestehend aus β -1,3-Glukan und β -1,6-Glukan komplexiert mit Chitin. Diese Schicht sorgt für Festigkeit. Die äußere Schicht besteht aus Mannoproteinen und bestimmt die Oberflächeneigenschaften der Zelle. Der Großteil der Mannoproteine ist kovalent an die innere Glukanschicht gebunden. Periplasmatische Enzyme sind eingeschlossen zwischen der Plasmamembran und der inneren Zellwandschicht. C: Cytosol; CMI: Invaginationen; ER: Endoplasmatisches Retikulum; G: Golgi; M: Mitochondrien; N: Nukleus; P: Periplasmatischer Raum; Per: Peroxisomen; PM: Plasmamembran; V: Vakuole; ZW: Zellwand. Modifiziert nach (Walker, 1999).

Die Zellwand besteht aus einer inneren Schicht aus Polysacchariden, die für die Zellwandstabilität und Widerstandsfähigkeit verantwortlich ist. Diese setzt sich wiederum hauptsächlich aus moderat verzweigtem 1,3- β -Glukan zusammen (Fleet, 1991; Manners et al., 1973). Aufgrund der Seitenketten stehen 1,3- β -Glukan Moleküle nur über Wasserstoffbrücken in Verbindung. Daraus ergibt sich ein kontinuierliches, hoch elastisches dreidimensionales Netzwerk, das sich unter normalen osmotischen Bedingungen ausdehnen kann. Hypertonische Lösungen hingegen führen zu einem Schrumpfen der Zellen, wobei 60% des Originalvolumens und 40 bis 50% der Oberfläche eingebüßt werden (Morris et al., 1986). An der äußeren Seite, an den nicht reduzierenden Enden des 1,3- β -Glukan Netzwerkes sitzen stark verzweigte – und somit wasserlösliche - 1,6- β -Glukan-Ketten, die mit GPI-modifizierten Mannoproteinen verbunden sein können (Kollar et al., 1997). An der Innenseite des 1,3- β -Glukan Netzwerkes werden in den lateralen Zellwänden, allerdings erst nachdem die Zytokinese stattgefunden hat, Chitinketten angelagert (Shaw et al., 1991; Kollar et al., 1997). Dementsprechend trägt Chitin in sehr jungen Hefezellen nicht zur mechanischen Stabilität lateraler Zellwände bei. In Abhängigkeit von Zellwandstress kann Chitin allerdings darüber hinaus an 1,6- β -Glukan Ketten glykosidisch verknüpft werden. Normalerweise findet sich Chitin hauptsächlich während der Knospung bei der Bildung des Septums und des Knospungsrings in der Zellwand und wird weniger in laterale Zellwände eingelagert (Shaw et al., 1991). Trotz allem ist Chitin, obwohl es nur in geringen Mengen vorkommt, ein für die Integrität der Zellwand wichtiger Bestandteil (Bulawa, 1993).

Die Mannoproteinschicht ist anders als Glukan und Chitin nicht direkt an der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität beteiligt. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass Hefezellen ihre Form auch nach proteolytischem Verdau der äußeren Zellwandschicht aufrechterhalten können (Koch und Rademacher, 1980; Zlotnik et al., 1984). Je nach Verankerung in der Zellwand lassen sich verschiedene Gruppen von Zellwandproteinen unterscheiden (siehe auch Tabelle 1-4).

Kovalent mit dem Glukan der Zellwand verbunden sind die Pir-Proteine (proteins with internal repeats) und Proteine mit Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankerrest. Das Hefegenom kodiert für insgesamt 58 Proteine, die neben einem Signalpeptid für die Sekretion, eine hydrophobe Sequenz (ω -Motiv) für die Übertragung eines GPI-Ankers aufweisen (Caro et al., 1997). Durch diese C-terminale Modifikation, die in allen höheren Eukaryonten zu finden ist, werden sekretorische Proteine zunächst in

der Plasmamembran verankert. 1997 konnten Kollar *et al.* zeigen, dass eine kovalente Bindung an das nicht reduzierende Ende von β -1,6 Glukan über einen Teil des GPI-Ankers erfolgt.

Zellwandproteine	Verankerung	Funktion
GPI-Proteine (Glykosylphosphatidylinositol)	C-terminaler GPI-Anker; kovalente Bindung an nicht reduzierendes Ende des β -1,6-Glukan über einen Teil des GPI-Ankers	in äußerer Schicht der Zellwand; strukturelle Funktion; Beitrag zu Zellwandstabilität; Rolle bei der Quervernetzung der Zellwandkomponenten; extensive O-Glykosylierung
ASL-Proteine (alkali-sensitive-linkage) PIR-Proteine (proteins with internal repeats)	Verknüpfung an 1,3- β -Glukan netzwerk über nicht identi- fiziertem Linker; Sequenzwiederholungen involviert in Verknüpfung	in innerer Zellwandschicht; Verknüpfung von mehreren 1,3- β -Glukanmolekülen; Festigung der Zellwand; Beeinflussung der Permeabilität
SCWPs (soluble cell wall proteins)	z.T. über Disulfidbrücken	glykolytische/hydrolytische Aktivität; Quervernetzung der Zellwandbestand- teile

Tabelle 1-4 Beschreibung der Proteine der Zellwand
Informationen aus (Klis *et al.*, 2006; Lesage und Bussey, 2006).

Neben den GPI-Zellwandproteinen gibt es eine kleinere Proteingruppe, die direkt an das 1,3- β -Glukan über einen noch unbekanntem Linker, der sich sensitiv gegenüber milden Alkali verhält, verknüpft ist. Diese Proteine werden als ASL (alkali-sensitive-linkage)-Zellwandproteine bezeichnet. Dazu gehört auch die Familie der Pir-Zellwandproteine (Mrsa *et al.*, 1997; De Groot *et al.*, 2005). Während GPI-Zellwandproteine in der äußeren Schicht der Zellwand gefunden werden können, scheinen Pir-Zellwandproteine innerhalb der inneren Zellwandschicht verteilt zu sein, da sie direkt mit 1,3- β -Glukan Molekülen verknüpft sind (Kapteyn *et al.*, 1999). Pir-Proteine werden verstärkt während der frühen G₁-Phase des Zellzykluses exprimiert, die sich durch eine stark herabgesetzte Permeabilität der Zellwand auszeichnet (De Nobel und Barnett, 1991). Außerdem erfolgt eine verstärkte Synthese dieser Zellwandproteine als Folge von Zellwandstress, weshalb man ihnen eine Rolle bei der Zellwandverstärkung zugesprochen hat (Kapteyn *et al.*, 1999; Boorsma *et al.*, 2004). Dies geht mit der Annahme einher, dass die repetitiven Sequenzen der Pir-Proteine direkt an der Verknüpfung an das 1,3- β -Glukan beteiligt sind (Castillo *et al.*,

2003). Demzufolge können Proteine mit mehreren solcher Sequenzen eine entsprechende Anzahl an 1,3- β -Glukan Moleküle miteinander verknüpfen, was zu einer Festigung der Zellwand führt. Dadurch würde auch die Permeabilität derselben herabgesetzt werden.

Darüber hinaus enthält die Zellwand zum einen Proteine, die nicht kovalent verknüpft sind, wie z.B. die Glukanase Bgl2, zum anderen solche, die über Disulfidbrücken an andere Proteine gebunden werden, wie die Agglutinin Untereinheit Aga2p in MATa Zellen (Klebl und Tanner, 1989; Cappellaro et al., 1994). Sie werden als Scwps (soluble cell wall proteins) bezeichnet und lassen sich unter reduzierenden Bedingungen, beispielsweise mit geringen Konzentrationen DTT oder Laemmli-Puffer aus der Zellwand extrahieren (Valentin et al., 1987; Montijn et al., 1994; Cappellaro et al., 1998). Viele dieser Proteine sind sekretorische, die dem klassischen Exportweg folgen. Sie besitzen zur Erkennung des Transportweges über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat ein N-terminales Signalpeptid mit einer speziellen Domänenstruktur (von Heijne, 1990; Gunkel et al., 2005). Möglicherweise sind einige cytosolische Proteine wie glykolytische Enzyme ebenfalls intrinsische Bestandteile der Zellwand, die selbige aber nicht über den klassischen Exportweg erreichen (Cleves et al., 1996; Molina et al., 2000).

Die Konstruktion der Zellwand wird sehr gut reguliert. Die Polysaccharidzusammensetzung, die Struktur und die Dicke der Zellwand unterliegen sehr großen Variationen, die abhängig von äußeren Bedingungen sind, wie pH-Wert, Medium und Temperatur (Aguilar-Uscanga und Francois, 2003). Dementsprechend strikt wird der Aufbau der Zellwand im Zusammenspiel mit dem Zellzyklus koordiniert. Beispielsweise wird der Großteil der Zellwandprotein codierenden Gene zyklusabhängig reguliert (Smits et al., 1999; Bahler, 2005). So unterscheidet sich die Zellwand exponentiell wachsender Zellen gravierend von solchen, die gerade die stationäre Phase betreten. In letztere ist sie bedeutend weniger durchlässig und bei weitem resistenter gegenüber dem Angriff von Glukanasen. Darüber hinaus lässt sich ein sechsfach höherer Level an Disulfidbrücken in derartigen Zellwänden feststellen (De Nobel et al., 1990). Dieses Phänomen geht einher mit radikalen Änderungen im Zellwandproteinmuster (Shimoi et al., 1998). Beispielsweise wird die Expression von Sed1p in der stationären Phase um ein Vielfaches gesteigert, so dass es zum dominantesten Zellwandprotein dieser Wachstumsphase wird. In logarithmisch wachsenden Zellen ist es kaum nachweisbar (Gasch et al., 2000).

Sed1p zeichnet sich durch eine äußerst starke Glykosylierung aus und weist darüber hinaus vier Cysteinreste auf, was die verringerte Permeabilität und erhöhte Festigkeit der stationären Zellwand erklärt (De Nobel et al., 1990; Shimoï et al., 1998). Auch während Zellwandstress, wie Hitzestress, oxidativen und hyperosmotischen Stress, wird Sed1p stark induziert, was diesem Protein eine allgemeine protektive Rolle zusprechen könnte (Gasch et al., 2000; Boorsma et al., 2004; Hagen et al., 2004). Die spezifische Einlagerung von Chitin läuft ebenfalls abhängig vom Zellzyklus ab. Es ist verteilt in der lateralen Zellwand von wachsenden Tochterzellen nach der Zytokinese (G₁-Zellen), liegt in ringförmiger Anordnung an der mutmaßlichen Knospungsstelle von späten G₁-Zellen vor und ist im Primärseptum von M/G₁-Zellen zu finden (Shaw et al., 1991; Cabib und Duran, 2005). Zu einer Umverteilung des Chitins kann es allerdings in Folge von Zellwandstress kommen. Im Falle von Schädigungen der Zellwand wird der sogenannte Zellwand-Integritäts-Weg (cell wall integrity (CWI) pathway) aktiviert (Levin, 2005). Im Zuge dessen kommt es unter anderem zu einer massiven Ablagerung von Chitin in den lateralen Zellwänden der Mutter und sogar der wachsenden Knospe. Gleichzeitig nimmt die Ausbildung von Komplexen aus GPI-Zellwandproteinen und Polysacchariden zu, wobei letztere aus mit Chitin verlinktem 1,6-β-Glukanen bestehen. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Resistenz gegen Glukanasen (Kapteyn et al., 1997; Boorsma et al., 2004).

All diese Beobachtungen machen deutlich, dass die Konstruktion der Zellwand von Hefezellen ein hochdynamischer Prozess ist, an dem viele Komponenten beteiligt sind. So wird die Zellwand ständig den äußeren Bedingungen durch Änderungen der Zellwandorganisation und der Zellwandproteine angepasst, wodurch das Überleben selbst unter widrigen Bedingungen und die Anpassung daran ermöglicht wird.

1.3 Hsp12 aus *S. cerevisiae*

Hsp12 wurde 1990 das erste Mal von Praekelt und Meacock als neues kleines Hitzeschockgen von *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Grund für die Suche nach einem weiteren kleinen Hitzeschockprotein war die Tatsache, dass das bekannteste seiner Art – Hsp26 - in Hefe nach Deletion keinen erkennbaren Phänotyp lieferte. So hatte Hsp26 trotz starker Induktion bei Hitzestress keinen

Einfluss auf die Thermotoleranz der Hefe (Petko und Lindquist, 1986). Dies führte zu der Vermutung, dass in *S. cerevisiae* noch weitere kleine Hsps existieren, die das Fehlen von Hsp26 kompensieren könnten (Petko und Lindquist, 1986; Bossier et al., 1989). Mit Hsp12 wurde ein aus 109 Aminosäuren bestehendes, etwa 12 kDa großes Protein gefunden, das in exponentiell wachsenden Kulturen nicht nachgewiesen werden konnte. Beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, bei einem geringen cAMP-Spiegel und durch Hitzeschock hingegen wird Hsp12 mehrere hundertfach induziert (Praekelt und Meacock, 1990).

Die Expression von Hsp12 wird darüber hinaus bei den verschiedensten Arten von Stress sehr schnell und intensiv angesteuert. So konnte eine verstärkte Synthese bei hohen EtOH-Konzentrationen, oxidativem Stress, unter Glukosemangel, unter Zellwandstress verursacht durch Congo Red und in Anwesenheit eines Herbizides beobachtet werden (Stone et al., 1990; Jamieson et al., 1994; Piper et al., 1994; Varela et al., 1995). Untersuchungen zum Überleben eukaryotischer Zellen bei tiefen Temperaturen bzw. während des Einfrierens ergaben einen Anpassungsmechanismus, der unter 10°C aktiviert wird und die Toleranz gegenüber derartiger Temperaturen bedeutend erhöhte. Diese Stressantwort beinhaltet neben der massiven Anhäufung von Trehalose die verstärkte Synthese bestimmter Hitzeschockproteine, wie Hsp104, Hsp42, Ssa4 und eben auch Hsp12 (Kandror et al., 2004).

Umfassende genomische Expressionsanalysen, denen die Reaktion von *S. cerevisiae* auf veränderte Umweltbedingungen zugrunde lag, ergab, wie zu erwarten, dass Hsp12 ein Teil der allgemeinen Stressantwort (ESR) darstellt (Boy-Marcotte et al., 1998; Gasch et al., 2000; Estruch, 2000; Gasch, 2003). Diese Eigenschaft macht Hsp12 zu einem wichtigen generellen Stressmarker, wie er in diversen Expressionsstudien und Untersuchungen zur Auswirkung von Stress auf Hefezellen genutzt wird (Ivorra et al., 1999; Simoes et al., 2003; Perez-Torrado et al., 2005). In Abbildung 1-4 ist das Expressionsprofil von Hsp12 in *S. cerevisiae* Zellen dargestellt, die verschiedenen Umweltbedingungen ausgesetzt waren.

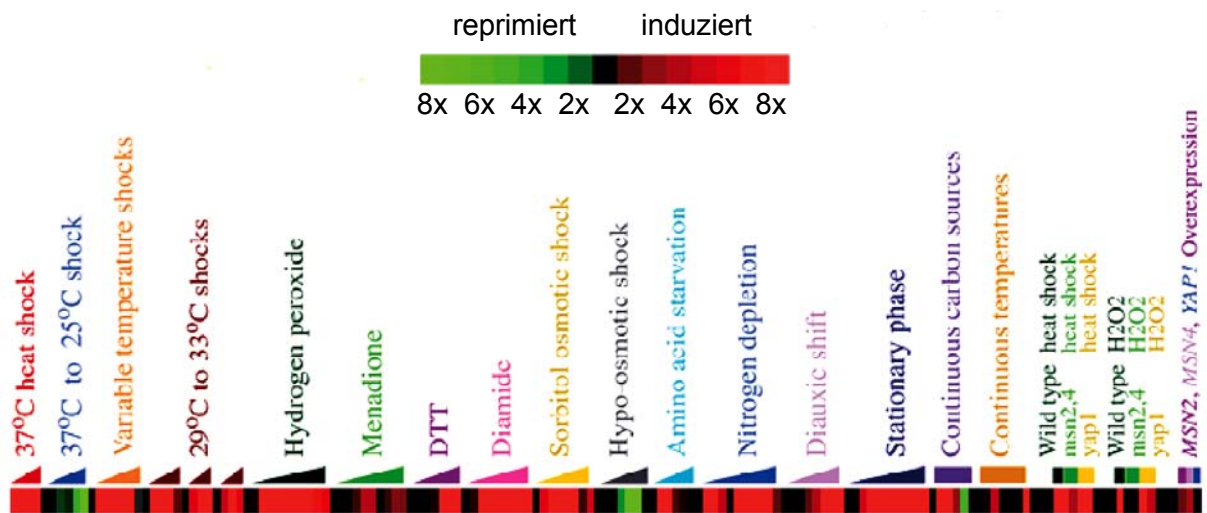


Abbildung 1-4 Expressionsprofil von Hsp12 in Abhängigkeit äußerer Bedingungen

Grün: Repression, rot: Induktion der Expression; Abbildung aus: http://genome-www.stanford.edu/yeast_stress

Hsp12 wird unter fast allen getesteten Bedingungen dieser umfangreichen Expressionsanalyse verstärkt synthetisiert. Eine Ausnahme stellt das Abkühlen nach Hitzeschock auf 25°C dar und der Hypo-Osmotische Schock. Betrachtet man die dazugehörigen normalisierten, relativen Transkriptionslevel im Vergleich mit anderen Hitzeschockproteinen, so fällt die sehr starke Induktion von Hsp12 auf. Abbildung 1-5 stellt den Transkriptionsspiegel bei Hitzeschock durch Inkubation der Hefezellen bei 37°C in Abhängigkeit der Zeit dar. Zum Vergleich wurden durch Hitze induzierbare Proteine wie Hsp26, Hsp82 und Ssa4 gewählt. Hsp12 wird zu jedem gewählten Zeitpunkt am stärksten exprimiert und nicht einmal Ssa4, das cytosolische, stress-induzierbare Hsp70 Homolog (Craig und Jacobsen, 1984) erreicht derartige Transkriptionslevel.

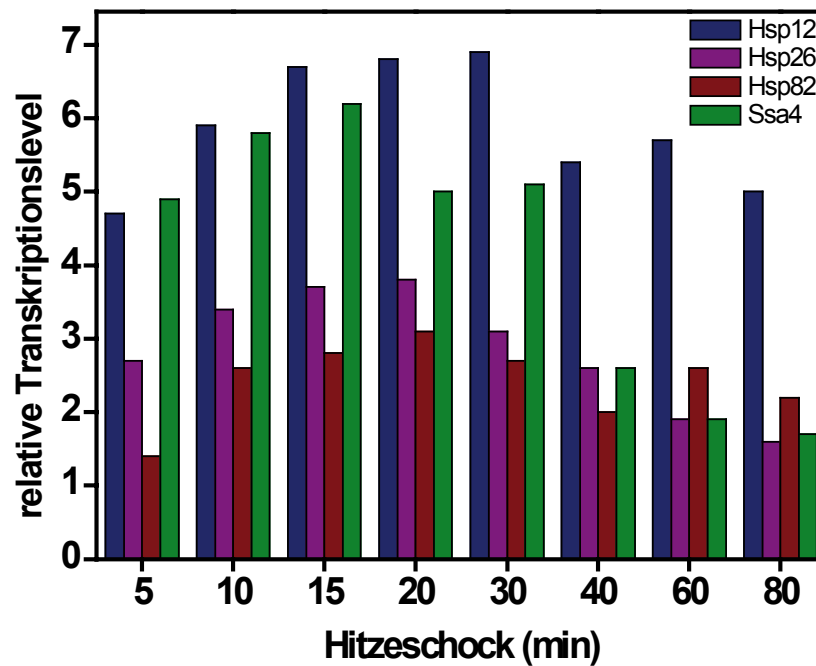


Abbildung 1-5 Normalisierte, relative Transkriptionslevel bei Hitzeschock für Hsp12, Hsp26, Hsp82 und Ssa4
Rohdaten aus (Gasch et al., 2000).

Dieses komplexe Expressionsmuster und die ungewöhnliche Stärke des Promotors von *HSP12* gaben Anlass, die regulativen cis-Elemente des Promotors und die Rolle verschiedener Signaltransduktionswege bei der Regulation dieses Genes zu untersuchen. Proteomanalysen identifizierten Hsp12 als ein von dem Transkriptionsfaktor Hsf1p abhängiges Hitzeschockprotein (Boy-Marcotte et al., 1999). Damit entspricht es allen anderen durch Hitzeschock regulierten Genen aus Eukaryoten, die alle ein oder mehrere Hitzeschockelemente besitzen und ausschließlich darüber angesteuert werden (Bienz und Pelham, 1986; Morimoto et al., 1992; Wu, 1995; Trott und Morano K.A, 2003). Auch in der Promotorsequenz von *HSP12* tauchen zwei mögliche HSEs auf (Praekelt und Meacock, 1990), überraschender Weise stimmt das Sequenzmotiv aber nicht mit dem anderer Hitzeschockproteine überein (Tuite et al., 1988). Darüber hinaus besitzt *HSP12* fünf Tandemwiederholungen des sogenannten STRE (STress Response Element) (Varela et al., 1995; Amoros und Estruch, 2001). Diese Sequenz vermittelt die Reaktion auf viele äußere Änderungen, wie Hitzeschock, osmotischer Stress und wechselnde Energiequellen (Marchler et al., 1993). Die Transkriptionsfaktoren Msn2p und Msn4p binden an STRE und aktivieren die Zielgene, die meist in Stoffwechselfvorgänge involviert sind (Martinez-Pastor et al., 1996; DeRisi et al., 1997; Gorner et al., 1998). Mit diesen Regulations-

elementen ist die breit gefächerte Induktion von *HSP12* auf jegliche Stressarten zu erklären.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass *HSP12* unter osmotischem und Zellwand-Stress über den HOG-Signalweg aktiviert wird, wobei das Ausmaß der Expression von der Kohlenstoffquelle abhängt, die der Zelle zur Verfügung steht (Varela et al., 1995; Rodriguez-Pena et al., 2005). So steigt beispielsweise die *HSP12* Synthese, wenn der Hefe Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle angeboten wird (Siderius et al., 1997). Eine erhöhte Expression des *HSP12* Gens kann unter Zellwandstress aber auch in Abhängigkeit von Sit2 und Rim1 – den Transkriptionsfaktoren des Zellintegritätsweges - stehen (Garcia et al., 2004).

Die negative Regulation von *HSP12* erfolgt über den Glukosespiegel im umgebenden Medium. Kleinste Mengen bis unter 0,005% führen zu einer Repression. Bei derart niedrigen Glukose-Konzentrationen spielen allerdings weder der allgemeine Glukose-Repressionsweg noch die cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A eine Rolle (de Groot et al., 2000). Nichtsdestotrotz wird die Msn2/4p-abhängige Geninduktion durch STREs mittels der cAMP-abhängige Proteinkinase A negativ gesteuert, die ihrerseits unter der Kontrolle des Ras/cAMP Signalweges steht (Marchler et al., 1993; Martinez-Pastor et al., 1996; Boy-Marcotte et al., 1998). Eine Aufgabe dieses Signalweges ist es, bei hohem cAMP Spiegel und dementsprechend aktiver Proteinkinase A die Msn2/4p Lokalisation in den Zellkern zu verhindern (Gorner et al., 1998). So konnte auch für *HSP12* eine negative Kontrolle durch Proteinkinase A gezeigt werden (Varela et al., 1995).

Die Komplexität der Regulation, der die Hsp12 Expression unterliegt, mag die mannigfaltige Induktion bei verschiedenartigen Stressbedingungen erklären.

Die Funktion von Hsp12 ist bis heute weitgehend ungeklärt. So wiesen *HSP12*-Deletionsmutanten keinen Wachstumsdefekt bei hohen Temperaturen auf, noch war ein Einfluss auf die Fähigkeit zu beobachten, Thermotoleranz zu erwerben. Allerdings konnten unter Hitzeschock bei dieser Disruptionsmutante (*hsp12::URA3*) geringe Level einer verkürzten Version eines *HSP12* Transkripts detektiert werden, das mögliche Effekte kompensieren könnte (Praekelt und Meacock, 1990). Leichte Wachtumsnachteile des Δ *HSP12*-Stammes bei einigen chemischen Verbindungen, wie unter anderem Nocodazol (Angriff auf das Zytoskelett), Hygromycin (Beeinflussung der Proteinbiosynthese), H₂O₂ (oxidativer Stress) und

Kohlenstoffmangel konnten beobachtet werden. Die knock-out-Zellen wiesen außerdem morphologische Veränderungen – bipolare Zellteilung und Ausbildung von Pseudohyphen - unter dem Rasterelektronenmikroskop auf (Haslbeck, 2001). Des Weiteren verursachte das Herbizid 2,4-Dichlorophenoxy-Essigsäure leichte Wachstumsnachteile bei $\Delta HSP12$ -Zellen (Simoes et al., 2003). Diese Verbindung ist eine stark fettlösliche, leichte Säure, die zur Erhöhung des intrazellulären pH Wertes führt und die Organisation der Plasmamembran stark beeinträchtigt (Simoes et al., 2003).

Bei einem speziellen Stamm von *S. cerevisiae*, der zur Herstellung von traditionellem spanischen Sherry verwendet wird (Cantarelli und Martini, 1969), führt die Deletion von *HSP12* zur Unterdrückung der sonst für diese Hefe typischen Biofilmbildung. Dieser auf der Oberfläche des Mediums schwimmende, elastische Film stellt einen adaptiven Mechanismus der Hefe dar, der es ihr erlaubt, Ethanol als Wachstumsquelle in Gegenwart von Sauerstoff zu verwenden. Die Rolle von Hsp12 bei der Ausbildung des Biofilms ist allerdings noch nicht geklärt (Zara et al., 2002).

Erste sehr wage Lokalisationsversuche konnten Hsp12 innerhalb lebender Zellen nicht eindeutig einem Kompartiment zuordnen. So wurde es in der Nähe der Plasmamembran oder im Bereich der Zellwand und im Cytosol vermutet, wobei man ihm eine Rolle bei der Barotoleranz und beim Schutz der Membran gegen Austrocknung zuzusprechen versuchte (Sales et al., 2000; Motshwene et al., 2004).

In einer globalen Studie zur Proteinlokalisierung wurden 75% des Hefegenomes mit *GFP* fusioniert und konnten so entsprechenden Zellkompartimenten zugeordnet werden (Huh et al., 2003). Wie in Abbildung 1-6 zu sehen lokalisiert mit Gfp fusioniertes Hsp12 eindeutig im Cytosol.

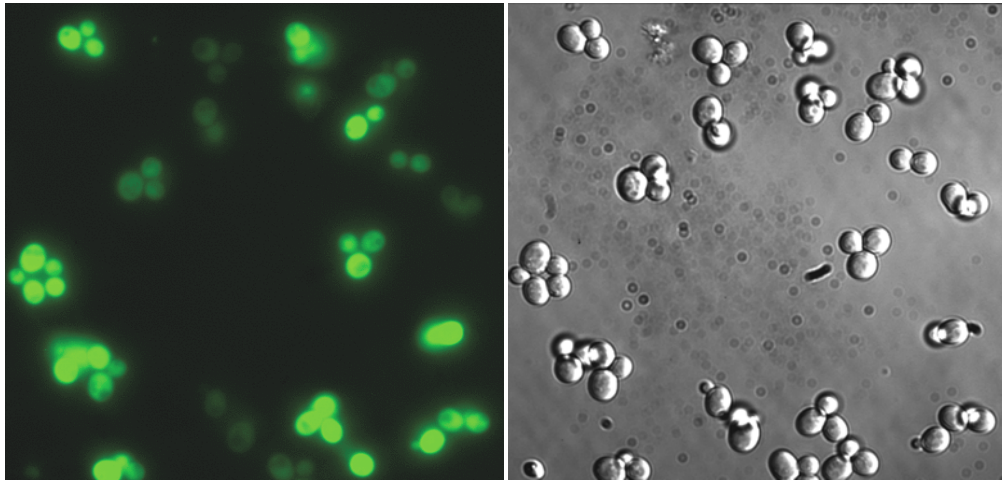


Abbildung 1-6 Hsp12-Gfp Lokalisierung in *S. cerevisiae*

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (2000 ms Belichtung) vom Hsp12-Gfp-Fusionskonstrukt (links) und zugehörige Aufnahme im differentiellen Interferenzkontrast (DIC) (rechts). Bilder aus: <http://yeastgfp.ucsf.edu>.

Hsp12 weist kaum Homologien zu bekannten Proteinen auf mit Ausnahme von Wh11 aus *Candida albicans* (Srikantha und Soll, 1993) und Hsp9 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Jang et al., 1996; Orlandi et al., 1996). Wh11 ist etwa 7 kDa groß, im Cytoplasma lokalisiert und wird in der sogenannten „white budding“ Phase der Zellen synthetisiert, wobei die physiologische Funktion noch nicht entschlüsselt ist (Schroppel et al., 1996). Eine verstärkte Synthese unter Stressbedingungen konnte nicht beobachtet werden (Srikantha et al., 1997). Hsp9 wird ebenso wie Hsp12 unter Hitzestress, Glukosemangel und beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase exprimiert (Orlandi et al., 1996), eine Klärung der physiologischen Funktion steht aber weitgehend noch aus.

Aufgrund seiner geringen Größe und der Überexpression unter Hitzestress, wurde Hsp12 neben Hsp26 und Hsp42 in die Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) eingeordnet (Praekelt und Meacock, 1990). Ein Sequenzvergleich mit diesen Proteinen lässt allerdings keine deutlichen Homologien in der für sHsps typischen und hochkonservierten α -Kristallindomäne erkennen (Stone et al., 1990; Praekelt und Meacock, 1990). Des Weiteren war für Hsp12 keine für sHsps häufig beschriebene Chaperonfunktion (Jakob et al., 1993) nachzuweisen (Fischer, 1999). Und auch die Ausbildung der für sHsps typischen hocholigomeren Komplexe konnte nicht für Hsp12 gezeigt werden (Fischer, 1999). Untersuchungen zum strukturellen Verhalten von Hsp12 ergaben hingegen, dass sowohl das rekombinante aus *E. coli*

als auch das aus *S. cerevisiae* gereinigte Hsp12 in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegt. Dementsprechend konnte Hsp12 den nativ entfalteten Proteinen zugeordnet werden (Fischer, 2003). Erst durch die Bindung von SDS und Derivaten wurde α -helikale Struktur in Hsp12 induziert (Fischer, 1999; Fischer, 2003). Dabei ragen die geladenen Reste der Helices nach außen und interagieren mit den negativen Kopfgruppen des SDS. Ungeladene Aminosäuren sind in die SDS-Mizelle gerichtet, wodurch hydrophobe Interaktionen ermöglicht werden (Dehner, 2004).

1.4 Nativ entfaltete Proteine

Ein Meilenstein der Proteinbiologie stellte das Struktur-Funktionsparadigma dar. Diesem Konzept lag die Meinung zugrunde, dass die spezifische Funktion eines Proteins durch seine einzigartige und rigide dreidimensionale Struktur bestimmt wird. Inzwischen konnte für eine stetig wachsende Anzahl an Proteinen gezeigt werden, dass sie zwar keine definierte, gefaltete Struktur besitzen, aber trotzdem eine Funktion im zellulären Kontext erfüllen (Weinreb et al., 1996; Kriwacki et al., 1996; Konno et al., 1997; Daughdrill et al., 1998; Dedmon et al., 2002). Diese auch als intrinsisch ungeordnet bezeichneten Proteine stellen eine große Fraktion innerhalb eukaryotischer Proteine dar. Wahrscheinlich sind mehr als 30% aller eukaryotischen Proteine entweder vollständig oder zumindest teilweise ungefaltet (Dunker et al., 2000; Ward et al., 2004). Genomanalysen deuten darauf hin, dass je komplexer der untersuchte Organismus ist, desto größer ist der Anteil an ungefalteten Proteinen (Wright und Dyson, 1999; Dunker et al., 2000; Iakoucheva et al., 2002). So enthält das Genom von *S. cerevisiae* dreimal mehr ungeordnete Strukturen als das von *E. coli* (Tompa et al., 2006).

Die Gruppe der nativ ungefalteten Proteine definiert sich über extreme Flexibilität, eine essentiell gestreckte, nicht kompakte Konformation und lässt unter physiologischen Bedingungen keine Sekundärstruktur erkennen (Uversky, 2002). Da diese Proteine in den meisten, wenn nicht sogar allen Organismen vertreten sind, können sie als eine separate funktionelle und strukturelle Kategorie an Proteinen angesehen werden (Tompa, 2002). Sie lassen sich in zwei verschiedene Gruppen einteilen, einmal in die wirklichen nativ entfaltenen, die über ihre gesamte Länge keine Sekundärstruktur aufweisen und in diejenigen, die große strukturlose Bereiche

(> 30 – 40 Reste) innerhalb eines ansonsten gefalteten Proteins besitzen (Uversky, 2002).

Ein Vorzug intrinsisch ungefalteter Proteine ist, dass sie formbarer als globuläre sind, was Vorteile bei deren Regulation und Bindung an diverse Liganden bringt. Außerdem besitzen sie große intermolekulare Interaktionsflächen. Ein monomeres, gefaltetes Protein mit einer entsprechenden Interaktionsfläche müsste zwei bis dreimal so groß sein, was die zelluläre Proteinkonzentration um ein Vielfaches erhöhen oder eine Vergrößerung der Zelle um 15 bis 30% nach sich ziehen würde (Gunasekaran et al., 2003).

Nativ entfaltete Proteine sind in der Zelle dem proteolytischen Abbau schutzlos ausgeliefert. Der einfachste Weg, dem zu entgehen, ist die Komplexierung mit einem Partner, wodurch sie zumindest zum Teil Struktur annehmen. Eine Voraussetzung für die Ausübung ihrer Funktion ist die Bindung intrinsisch gefalteter Proteine an einen Partner, wie andere Proteine, DNA oder Membranen. Typisch für diese Interaktion ist die Induktion von Struktur in ursprünglich entfaltete Proteine. Ein Beispiel dafür ist Melittin, ein Peptid aus dem Gift der Honigbiene, das als antibakterielles Peptid agiert. Melittin liegt in wässriger Lösung unstrukturiert vor und bildet bei Bindung an Membranen α -helikale Struktur aus (Goto und Hagihara, 1992; Ladokhin und White, 1999). Ein weiteres Beispiel für ein unstrukturiertes Protein, das bei Bindung an Membranen, genauer gesagt den Myelin-Lipiden, Struktur annimmt, ist das basische Myelin (MBP) (Polverini et al., 1999). Auch α -Synuklein nimmt bei Interaktion mit negativ geladenen, synthetischen Lipidvesikeln α -helikale Struktur an (Davidson et al., 1998). Die sogenannte HMG-Domäne des Transkriptionsfaktors LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor-1 weist hingegen nur gebunden mit DNA Struktur auf (Love et al., 2004). Gleiches gilt unter vielen anderen für den neuronalen Zinkfingerfaktor-1 und den Transkriptionsfaktor ADR1 (Parraga et al., 1988; Berkovits und Berg, 1999). Die meisten bis heute beschriebenen Wechselwirkungen finden zwischen ursprünglich ungefaltetem Protein und Partnerprotein statt. Calmodulin wird beispielsweise erst bei niedrigen Kalziumkonzentrationen *in vitro* sensitiv gegenüber Proteasen (Yazawa et al., 1990). *In vivo* dagegen löst sich Calmodulin bei sinkendem intrazellulären Kalziumspiegel von seinem enzymatischen Partner und bindet stattdessen an Proteine mit dem sogenannten IQ Motiv (Chakravarthy et al., 1999). Die Calmodulin-Bindedomäne von Calcineurin unterliegt ebenfalls in Anwesenheit von Kalziumionen der Proteolyse, da sie unter diesen Bedingungen

keine Struktur aufweist. (Hubbard und Klee, 1989). Durch Bindung von Kalzium kommt es zu konformationellen Änderungen innerhalb der Calcineurin-B-Domäne, was wiederum zur Exponierung der Calmodulin-Bindedomäne und deren Entfaltung führt (Yang und Klee, 2000). Ein weiteres Modell für ein nativ ungefaltetes Protein ist IA3, ein hoch spezifischer Inhibitor der Proteinase A aus Hefe. Dieses 68 Aminosäuren-Peptid liegt vollständig ungefalteter in Lösung vor, nimmt aber α -helikale Struktur nach Bindung an (Green et al., 2004).

Der Mangel an Struktur kann einem Protein beträchtliche Vorteile verleihen, da effiziente Interaktionen mit vielen verschiedenen Regionen eines Partners oder sogar mehrerer Liganden bewerkstelligt werden können (Liu und Lu, 2002). Interessanter Weise sind viele intrinsisch ungefalteten Proteine in die wichtigsten regulatorischen Funktionen einer eukaryotischen Zelle, wie Zellzykluskontrolle, Regulation der Transkription und Translation, Signaltransduktion involviert. Des Weiteren spielen sie eine Rolle bei der Proteinphosphorylierung und greifen in die Regulierung der Selbstassemblierung großer Multiproteinkomplexe wie das bakterielle Flagellum und das Ribosom ein (Wright und Dyson, 1999; Namba, 2001; Dunker et al., 2002; Tompa, 2002; Fink, 2005).

Ungefaltete Bereiche innerhalb von Transkriptionsfaktoren sind weit verbreitet. Die N-terminale Aktivierungsdomäne des Hefe Hsf1p ist beispielsweise ungefalteter und bleibt es überraschender Weise auch nach DNA-Bindung (Cho et al., 1996). Außerdem sind die Aktivierungsdomänen des Transkriptionsfaktors Creb und von p53 intrinsisch ungeordnet, nehmen aber amphipatische, helikale Strukturen an, sobald sie in Kontakt mit ihren Zielproteinen, Cbp (Transkriptions-Koaktivator) bzw. Mdm2 (Onkoprotein) kommen (Kussie et al., 1996; Radhakrishnan et al., 1997; Radhakrishnan et al., 1998; Bell et al., 2002; Dawson et al., 2003). p53, das bei der Zellproliferation, Apoptose und Tumor-Suppression eine große Rolle spielt, stellt dabei ein gutes Beispiel für die Flexibilität der Bindung durch ungefaltete Proteine dar. Der unstrukturierte N-terminale Bereich von p53 und die gefalteten Regionen funktionieren nämlich in der Mdm2-Bindung synergistisch (Dawson et al., 2003).

Was für eine wichtige Rolle unstrukturierte Domänen in der Transkriptions-Aktivierung spielen können, soll am Beispiel des Transkriptionsfaktors Creb veranschaulicht werden. Die kinaseinduzierbare Aktivierungsdomäne (Kid) von Creb bindet mit hoher Affinität an die Kix-Domäne von Cbp. Cbp ist ein zentraler Vermittler der Transkription, wobei er durch Modifikation des Chromatins und der

Transkriptionsfaktoren die selektive Induktion der Genexpression bewirkt (Janknecht und Hunter, 1996; Goodman und Smolik, 2000). Diese Bindung findet nur statt, wenn Kid phosphoryliert ist (pKid). Dabei liegt pKid in Lösung unstrukturiert vor, faltet aber bei Bindung an das Zielprotein (Radhakrishnan et al., 1997). In einem nicht phosphorylierten Zustand ist die Bindung aufgrund mangelnder Wasserstoffbrücken zwischen Kid und Kix sehr schwach, da die kleine Bindeenthalpie den Energieaufwand, der für die Induktion der Faltung nötig ist, nicht kompensieren kann. Damit ist diese Bindung induzierbar und nicht konstitutiv wie bei c-Myc, das als gefaltetes Protein ständig an dieselbe Bindestelle der Kix-Domäne binden kann (Parker et al., 1999).

Eine herausragende Eigenschaft intrinsisch ungefalteter Proteine ist, dass sie sehr schnell abgebaut werden können. Diese Idee wurde durch Beobachtungen an dem nativ entfalteten tau gemacht. Es kann nämlich direkt von dem 20S Proteasom ohne Ubiquitylierung abgebaut werden (David et al., 2002). Die Tatsache, dass unstrukturierte Proteine schnell umgesetzt werden können, so lange sie nicht an einen Liganden binden, gibt ihnen eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Zellzykluses. So kann eine Zelle sehr sensitiv auf äußere Bedingungen reagieren. Der Zyklin abhängige Kinaseinhibitor p21 ist ein Beispiel für ein derartiges Protein. Es inhibiert den Zellzyklus und spielt eine große Rolle bei der Koordination interner und externer Signale (Johnson und Walker, 1999). p21 ist ebenfalls unstrukturiert, faltet sich aber bei Zugabe der Kinase Cdk2 (Kriwacki et al., 1996; Pavletich, 1999). Die Flexibilität und strukturelle Unordnung mag eventuell die Fähigkeit von p21 erklären, so viele verschiedene Verbindungen zu binden und deren Signal zu vermitteln.

Interessante Aufgaben übernehmen unstrukturierte Domänen bei der Vesikelfusion in Eukaryoten. Dieser Prozess wird durch die SNARE Proteine bewältigt. Der Hauptkomplex besteht aus drei Proteinen, die in der Hefe Sso1, Snc1 und Sec9 bezeichnet werden. Die letzten beiden sind außerhalb des Komplexes ungefaltet, wie auch N- und C-terminale Bereiche des monomeren Syntaxin Homologon Sso1, das als partiell gefaltet bezeichnet werden kann. Sowohl Sso1 als auch Snc1 sind jeweils in eine der beiden zu fusionierenden Membranen verankert. Die Assemblierung des Komplexes beinhaltet durch Bindung induzierte Strukturbildung. Dieses Zusammenspiel aus Faltung und Bindung steuert unter Umständen die Assemblierung des ternären Komplexes, der durch Verkürzung ursprünglich

ungefalteter, flexibler Bereiche Membranoberflächen in nächste Nähe zueinander bringt. Dadurch wird eine Fusion zweier Lipiddoppelschichten ermöglicht (Fiebig et al., 1999).

In einem anderen Fall, wie dem der Proteintranslokation durch Membranen, ist ein ungefalteter Terminus zum einen ein Initiationssignal zum anderen eine physikalische Voraussetzung, um durch enge Kanäle hindurch zu passen. Beim Import in Mitochondrien zieht die Importmaschinerie die ungefaltete N-terminale Signalsequenz in den Kanal, entfaltet das gesamte Protein während es in das Kompartiment durch den Kanal gezogen wird (Hebert, 1999; Huang et al., 1999; Pilon und Schekman, 1999; Voisine et al., 1999). Innerhalb der mitochondrialen Matrix wird die Signalsequenz abgespalten und das Protein nimmt seine native Struktur an (Schatz und Dobberstein, 1996). Darüber hinaus enthüllten Strukturanalysen, dass Teile der Importmaschinerie ungefaltete Bereiche aufweisen. So liegt die cytosolische Domäne des Tom70 Rezeptors unstrukturiert vor. In dieser Domäne befindet sich das TPR-Motiv, das verantwortlich für die Bindung von Substrat im Cytosol ist. Ähnliches konnte für Tom22, lokalisiert im Intermembranraum beobachtet werden (Beddoe et al., 2004; Perry und Lithgow, 2005). Man geht davon aus, dass sich nach Bindung der Übergang in einen gefalteten Zustand vollzieht. Derartig flexible Domänen in Proteinen können eine große Anzahl an Substraten effizienter binden. Es wird sogar angenommen, dass die Energie, die ein Protein beim Passieren durch die mitochondrialen Membranen benötigt, durch konformationelle Änderungen der Importkomponenten zur Verfügung gestellt wird, die nativ entfaltete Bereiche besitzen. So könnten Translokase-Untereinheiten den Protein-Import Prozess antreiben (Marcos-Lousa et al., 2006).

Nichtsdestotrotz können unstrukturierte Proteine viel schneller durch Membranen passieren als gefaltete. Dementsprechend bleiben Proteine, die durch Membranen translokiert werden sollen, im Cytoplasma größtenteils unstrukturiert (Randall und Hardy, 1989; Hartl und Neupert, 1990). Ein Beispiel dafür stellt das photosynthetische Protein Plastocyanin dar, das *in vitro* sehr langsam faltet (Koide et al., 1993) und welches vor dem Transport in den Chloroplast als ungefaltetes Vorläuferprotein bestehen bleibt (Merchant und Bogorad, 1986; Li et al., 1990).

Außerdem existieren ungefaltete Regionen in vielen Chaperonen, die eventuell einen wichtigen Teil der Funktion erfüllen. So wurden z.B. für Hsp26 26,3%, für Hsp82 24,8% und für Hsp104 aus *S. cerevisiae* 36,7% unstrukturierte Bereiche

hervorgesagt (Tompa und Csermely, 2004). Diese kurzen, ungefalteten Segmente könnten für die Bindung und Erkennung falschgefalteter Proteine wichtige flexible und anpassungsfähige Bereiche darstellen (Tompa und Csermely, 2004).

Als letztes sei noch die Beteiligung nativ entfalteter Proteine an Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen erwähnt (Nielsen et al., 2001; Iakoucheva et al., 2002; Lotharius und Brundin, 2002). Bei α -Synuklein konnte beispielsweise die Bildung von Fibrillen beobachtet werden. Dieses Protein ist normalerweise an der Regulation des präsynaptischen Vesikel-Gleichgewichtes involviert, scheint aber wesentlich an Parkinson und anderen neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt zu sein (Nielsen et al., 2001; Lotharius und Brundin, 2002).

1.5 Problemstellung

Hsp12 ist ein bislang kaum untersuchtes Hitzeschockprotein aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Beobachtung, dass es unter einer Vielzahl von Stressbedingungen sehr stark exprimiert wird, macht es zum allgemeinen Stressmarker. Aus diesem Grund findet es sich in vielen Expressionsanalysen zu unterschiedlichen äußeren Bedingungen wieder. Doch die Funktion von Hsp12 bleibt mysteriös.

Ursprünglich wurde es zu der Familie der kleinen Hitzeschockproteine (sHsps) gerechnet, allerdings konnte diese Annahme widerlegt werden. Hsp12 besitzt weder die typische α -Kristallindomäne noch konnte die Ausbildung hocholigomerer Komplexe beobachtet werden. Auch die für sHsps typische Fähigkeit, Proteinaggregation zu unterdrücken, ließ sich für Hsp12 nicht ausmachen. Stattdessen konnte es der Gruppe der nativ entfalteten Proteine zugeordnet werden (Fischer, 2003). Unter physiologischen Bedingungen liegt es unstrukturiert vor und erst durch die Bindung an SDS bzw. ähnlichen Verbindungen und an Liposomen (persönliche Mitteilung, Elke Fischer) nimmt es α -helikale Struktur an. Dies könnte auf eine *in vivo* Lokalisation an Membranen hindeuten. Eine Insertion in die Membran ist auszuschließen, da das Protein sehr hydrophil ist. Auch eine Verankerung in dieselbe ist nicht denkbar, da vorangegangenen Untersuchungen an direkt aus Hefe gereinigtem Hsp12 keine postrationalen Veränderungen in Form eines Membranankers bemerken ließen (Fischer, 2003). In dieser Arbeit sollte eine mögliche Bindung an und die Interaktion mit Lipiden genauer analysiert werden. So

könnte ein eventueller Zusammenhang zwischen der Ausbildung der α -helikalen Struktur und der Funktion von Hsp12 hergestellt werden. Dabei sollte untersucht werden, ob Hsp12 in Lipiddoppelschichten integrieren, oder diese durchqueren kann, oder ob es lediglich an die Membranoberfläche bindet. Die Interaktion von Hsp12 mit mizellenartigen Strukturen und Liposomen könnte auf eine Rolle des Proteins bei der Stabilisierung oder der Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen hindeuten. Mit Hilfe von Fluiditätsmessungen der Plasmamembranen ganzer Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen könnten deren physikalischen Eigenschaften analysiert und miteinander verglichen werden. Eine Lipidanalyse der Gesamtmembranen von Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen sollte über mögliche veränderte Lipidzusammensetzungen Aufschluss geben. Vergleichende Proteomanalysen dieser beiden Zelltypen würden darüber hinaus aufzeigen, wie in $\Delta HSP12$ -Zellen der Verlust von Hsp12 kompensiert wird. Die Induktion anderer Proteine bestimmter Funktionen könnte einen Einblick in den Aufgabenbereich von Hsp12 liefern.

Hsp12 kann bis heute keinem Zellkompartiment in lebenden Hefezellen eindeutig zugeordnet werden. Es wird sowohl im Cytoplasma, an der Plasmamembran als auch in der Zellwand vermutet. Eine Klärung der subzellulären Lokalisierung könnte vielleicht auch die Frage nach der Funktion beantworten. Durch Fraktionierungen ganzer Hefezellen im Saccharosegradienten oder durch differentielle Zentrifugation und anschließender Zuordnung der Fraktionen zu einem Zellkompartiment mittels Markerproteine sollte Hsp12 in lebenden Zellen lokalisiert werden können. Darüber hinaus ließe sich eine mögliche Assoziation an verschiedene Zellorganellen durch deren Isolation und Analyse mittels Western Blot untersuchen.

Es ist kein Phänotyp von $\Delta HSP12$ Zellen bekannt, der die genaue zelluläre Funktion dieses Proteins beschreiben könnte. Selbst eine Aufgabe bei Hitzestress, bei dem es hundertfach überexprimiert wird, ist fraglich. Es besitzt keine Chaperonfunktion, bindet nicht an Aktin oder Ribosomen und es konnten keine Interaktionspartner identifiziert werden (Fischer, 2003). Allerdings waren morphologische Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu sehen (Haslbeck, 2001). In dieser Arbeit sollten eine nähere Untersuchung der Zellmorphologie mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie, und die Suche nach einem Phänotyp funktionelle Eigenschaften von Hsp12 enthüllen. Die morphologischen Veränderungen der $\Delta HSP12$ -Zellen könnten auf einen Defekt in der Zellhülle hindeuten. Untersuchungen der Zellwandzusammensetzung durch Bestimmung des Chitingehaltes, durch einen

spezifisch an Chitin bindenden Fluoreszenzfarbstoff und mit Hilfe von Stabilitätsuntersuchungen der Zellwand sollten mögliche Mängel aufdecken. Analysen des Wachstums und des gesamten Temperaturbereiches von $\Delta HSP12$ -Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen könnten einen möglichen Phänotyp aufdecken.

Die Deletion oder Mutation bestimmter Sequenzbereiche von Hsp12, die in Anwesenheit von SDS α -helikale Struktur annehmen können, und die *in vivo* und *in vitro* Analyse dieser Hsp12-Fragmente könnte außerdem mögliche strukturell wichtigen Bereiche von Hsp12 identifizieren lassen.

Mit dieser Aufgabenstellung soll ein außergewöhnliches Hitzeschockprotein analysiert werden, das schon mit seinen bisher bekannten Eigenschaften einen einzigartigen Vertreter einer ganz neuen Gruppe an Stressproteinen darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung (38 % mit 2 % Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe, D
Adenosyl-imidodiphosphat (AMP-PNP)	Roche, Mannheim, D
Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Dinatriumsalz	Roche, Mannheim, D
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Dinatriumsalz	Roche, Mannheim, D
Agar Bacteriological	
Agarose	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roche, Mannheim, D
Ammoniumsulfat	VWR, Darmstadt, D
Ampicillin, Na-Salz	Sigma, St. Louis, USA
Bacto Agar	
Bacto Pepton	Difco, Detroit, USA
Bacto Trypthon	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
Calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28)	Sigma, St. Louis, USA
Chaps	Sigma, St. Louis, USA
Chloroform	VWR, Darmstadt, D
Complete Protease Inhibitor Mix G	Serva, Heidelberg, D
<i>Complete</i> Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, D
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg, D
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt, D
DMPC	Sigma, St. Louis, USA
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	
DMPG	Sigma, St. Louis, USA
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3- [Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]	
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, p.a.	Riedel de Haen AG, Seelze, D
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA

Formaldehyd	
Glycerin, 99 %	ICN, Costa Mesa, USA
Glutaraldehyd, 25 %	Serva, Heidelberg, D
Harnstoff	VWR, Darmstadt, D
Iodacetamid	VWR, Darmstadt, D
Immersionsöl	VWR, Darmstadt, D
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Rothe, Karlsruhe, D
Kanamycin	
Lachssperma DNA	Sigma, St. Louis, USA
2-Mercaptoethanol, reinst	Sigma, St. Louis, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)	ICN, Costa Mesa, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat	VWR, Darmstadt, D
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	VWR, Darmstadt, D
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, D
POPC	Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, USA
1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	
POPG	Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, USA
1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]	
Pharmalyte 3 – 10	GE Healthcare, Freiburg, D
Phenol-Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Polyoxyethylen-Sorbitan-monolaurat (Tween 20)	VWR, Darmstadt, D
Ponceau S	Sigma, St. Louis, USA
2-Propanol	Roth, Karlsruhe, D
Silbernitrat, p.a.	Roth, Karlsruhe, D
Serdolit MB-1	Serva, Heidelberg, D
Serva Blau G-250	Serva, Heidelberg, D
Serva Blau R-250	Serva, Heidelberg, D
Thioharnstoff	Sigma, St. Louis, USA

Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, St. Louis, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN, Costa Mesa, USA
Yeast Nitrogene Base (YNB)	Difco, Detroit ,USA

Weitere verwendete Chemikalien wurden von der Firma VWR (Darmstadt) bezogen und haben, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad z.A.. Zur Herstellung von Puffer und Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.1.2 Größenstandards und Kits

ECL Plus Western Blot Detektionssystem	GE Healthcare, Freiburg, D
2-D Quant Kit	GE Healthcare, Freiburg, D
High Pure Plasmid Isolation Kit	Promega, Madison, USA
High Pure PCR Product Purification Kit	Promega, Madison, USA
1kb Leiter	PeqLab, Erlangen, D
Low-Range-Molekulargewichtsstandard (LMW für SDS-PAGE)	BioRad Laboratories, München, D
QIAquick, Gel Extraction Kit	Promega, Madison, USA
Rotimark für SDS-PAGE	Roth, Karlsruhe, D

2.1.3 Proteine und Antikörper

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim, D
Lytikase	Sigma, St. Louis, USA
Chitinase	Sigma, St. Louis, USA
Pwo-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, D
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim, D
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, D
T4-Ligase	Promega, Madison, USA
Hifi-Polymerase	Roche, Mannheim, D
polyklonales Serum gegen Hsp12 (Hase)	Dr. J. Pineda Antikörper Service, Berlin, D
polyklonales Serum gegen Aktin (Hase)	Dr. J. Pineda Antikörper Service, Berlin, D
polyklonales Serum gegen Hexokinase (Hase)	Dr. Doron Rappaport, München (LMU)
polyklonales Serum gegen Porin (Hase)	Dr. Doron Rappaport, München (LMU)
polyklonales Serum gegen Erp24 (Hase)	Dr. Doron Rappaport, München (LMU)

polyklonales Serum gegen Vam3 (Hase)	Prof. Dr. Christian Ungermann, Biochemie Zentrum, Heidelberg
polyklonales Serum gegen Cts1p (Hase)	Prof. Dr. Ludwig Lehle, Universität Regensburg, D
monoklonaler IgG gegen Pma1p	abcam, Cambridge, UK
monoklonaler IgG-POD Konjugat gegen Hasen-IgG (Schaf)	Sigma, St. Louis, USA
monoklonaler IgG-POD Konjugat gegen Maus-IgG (Ziege)	Sigma, St. Louis, USA
monoklonaler IgG-Antikörper gegen Penta-Histidin (Maus)	Roche, Mannheim, D
Hsp12	Elke Fischer (TUM)
C _L	Matthias Feige (TUM)
Hsp12 _{ΔN10}	Sylvia Wandelt (TUM)
Hsp12 _{ΔC36}	Sylvia Wandelt (TUM)

2.1.4 Chromatographiematerialien

Q-Sepharose	GE Biosciences, Freiburg, D
Superdex 75 Prep Grade	GE Biosciences, Freiburg, D

2.1.5 Sonstige Materialien

Amicon-Ultrafiltrationsmembran YM3	Amicon, Lexington, USA
Dialyseschläuche	Spectrum, Houston, USA
Spectra/Por 6000-8000 Da	
Einmalküvetten 1,5 ml halbmikro	Starna GmbH, Pfungstadt, D
Einmalreaktionsgefäß	Nerbe, Winsen, D
Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
Immobilon-NC(Nitrocellulose)-Membran	Millipore, Bedford, USA
Kulturröhrchen (17 x 100 mm)	Elkay, Hampshire, England
Petrischalen aus Polystyrol, 94 mm	Greiner & Söhne, Nürtingen, D
PVDF Membran	Roth, Karlsruhe, D
pH-Indikatorstreifen	VWR, Darmstadt, D Quarzglas Suprasil
Röntgenfilme X-OMAT AR	Eastman Kodak, Rochester, USA
Sterilfilter 0,2 µm	VWR, Darmstadt, D

Alle sonstigen Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma VWR (Darmstadt) bezogen.

2.1.6 Geräte

Absorptionsspektrophotometer:

Varian Cary 50 Bio UV-Vis-Spektrophotometer (Varian, Palo Alto, USA)

Novaspec II visible (GE Biosciences, Freiburg, D)

Circulardichroismus-Spektropolarimeter:

Jasco J715 mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit (Jasco, Groß-Unstadt, D)

Fluoreszenz-Spektrophotometer:

FluoroMax-3 mit thermostatisierbarem Küvettenhalter (Spex, Edison, USA)

Chromatographieanlagen:

FPLC-Anlage (GE Biosciences, Freiburg, D)

Super-Loop 150 ml (GE Biosciences, Freiburg, D)

PU-1580 HPLC Pump (Jasco, Groß-Unstadt, D)

LG-980-02S Gradient Unit (Jasco, Groß-Unstadt, D)

FP-1520 Fluorescence Detector (Jasco, Groß-Unstadt, D)

UV-1575 UV-VIS Detector (Jasco, Groß-Unstadt, D)

Gelelektrophorese- und Blotapparaturen:

RHU10X (Roth, Karlsruhe, D)

Hofer Mighty Small II Gelelektrophoreseeinheit (GE Biosciences, Freiburg, D)

Fast Blot B44 Apparatur (Biometra, Göttingen, D)

Microkalorimeter:

VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal Incorporated, Northampton, USA)

ThermoVac (MicroCal Incorporated, Northampton, USA)

VP-DSC MicroCalorimeter (MicroCal Incorporated, Northampton, USA)

Mikroskope:

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Jena D)

UV-Ausstattung (Fluo Arc, Zeiss, Leipzig, D)

CCD-Kamera (Hamamatsu, Herrsching, D)
 Rasterelektronenmikroskop (Jeol, Eching, D)
 Sputter (Bal-Tec, Balzers, Lichtenstein)

Spannungsquellen:

LKB-GPS 200/400 (GE Biosciences, Freiburg, D)
 EPS 3500, 301 und 1001 (GE Biosciences, Freiburg, D)

Waagen:

Analysenwaage BP 121 S (Sartorius, Göttingen, D)
 Halbmikrowaage BL 310 (Sartorius, Göttingen, D)

Zentrifugen:

Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, D)
 Rotina 46 R Kühlzentrifuge (Hettich, Tuttlingen, D)
 Avanti J 25 mit JA-10 und JA-25.50-Rotoren (Beckman, Wien, Österreich)
 Optima™ Max-E Ultrazentrifuge (Beckman, Wien, Österreich)

Weitere Geräte:

-80°C Kühlschrank CFC FREE	Sanyo, München, D
Autoklav-Dampfkessel (TRD) 601 MM	H+P, Oberschleißheim, D
Digitalthermometer mit Thermofühler	Keithley, Cleveland, USA
Elektroporator	Peqlab, Erlangen, D
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, D
Entwicklermaschine Optimax TR	MS Laborgeräte, Heidelberg, D
Eppendorf-Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, D
Ettan Dalt II	GE Healthcare, Freiburg, D
Geldokumentationsystem Biodoc II	Biometra, Göttingen, D
Kulturschüttler Certomat S	Braun Biotech, Melsungen, D
Magnetrührer Heidolph MR 2000	Heidolph, Kelheim, D
Massenspektrometer Ultraflex (MALDI-TOF/TOF)	Bruker Daltronics, Bremen, D
Metallthermoblock TB 1	Biometra, Göttingen, D
IPGphor	GE Healthcare, Freiburg, D
pH-Meter	WTW, Weilheim, D
Reagenzglasroller	Heidolph, Kelheim, D
Schwenktisch Polymax1040	Heidolph, Kelheim, D

Thermocycler Primus	MWG, Ebersberg, D
Ultraschallaufschlussgerät Sonifier B-12	Branson, Danbury, USA
Ultraschallbad Sonsorex RK 100H	Bandelin, Berlin, D
Umluftinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D
Zellaufschlussgerät Basic Z	Constant Systems, Warwick, England
Wasserbad Haake F6-K	Haake, Karlsruhe, D

2.1.7 Computerprogramme

Adobe Photoshop 9.0	Adobe Inc., San Jose, USA
Adobe Illustrator 12.0	Adobe Inc., San Jose, Usa
Adobe Reader 7.0	Adobe Inc., San Jose, USA
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)
Microsoft Office XP	Microsoft, Unterschleißheim, D
Origin 7	OriginLab Corp., Northampton, USA
ProtParamTool ExPasy	http://expasy.org
Reference Manager 10	ISI ResearchSoft (Berkeley, USA)

2.2 Verwendete Organismen und deren Kultivierung

2.2.1 Stämme

Tabelle 2-1 fasst die in dieser Arbeit verwendeten Organismen zusammen.

Bakterienstämme	Geno-/Phänotyp	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>araD</i> 139Δ(<i>ara leu</i>) 7697Δ <i>lacX74 gaU gaK</i> <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr⁻ hsdRMS-mcrBC</i>) <i>rpsL decR</i> 380 Δ <i>lacZ</i> ΔM15 <i>endA1 nupG recA1</i>	(Jessee, 1986)
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (rR ⁻ mR ⁻) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1</i> <i>gaK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	(Bolivar und Backman, 1979) 1979; (Roulland-Dussoix und Boyer, 1969)
<i>E. coli</i> BL21DE3	F-omp T Ion(rB-mB-)	Stratagene, La Jolla, USA
Hefestämme		
SEY6211	MATa <i>ura3-52 his3-200</i> <i>ade2-101 trp1-901 leu2-3,112</i> <i>suc2-9 GAL</i>	(ATCC 96100, (Robinson et al., 1988))
W303	Mata <i>ura3-52 his3-200 lys2-801</i> <i>trp1-901 leu2-3,112 suc2-9</i>	(Palmer et al., 1979)
ΔHSP12	SEY6211 <i>hsp12::TRP</i>	(Haslbeck, 2001)
ΔHSP104	W303 <i>hsp104::HIS</i>	(Sanchez und Lindquist, 1990)
ΔSSA1/SSA2	Y406 <i>ssa1::HIS; ssa2::LEU</i>	(Craig und Jacobsen, 1984)

Tabelle 2-1 Bakterien- und Hefestämme

2.2.2 Medien

Folgendes Medium wurde zur Anzucht von *E.coli* verwendet:

LB ₀ :	Bacto Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	Mit NaOH auf pH 7,2 einstellen	
	Für LB ₀ Platten: 15 g Bacto Agar	

Selektion bei *E.coli*:

Ampicillin	100µg/ml
Kanamycin	35µg/ml

Folgende Medien wurden zur Anzucht von Hefestämmen verwendet:

YPD:	Hefeextrakt	5 g
	Bacto Pepton	10 g
	Glukose	20 g
	1 M NaOH	1 ml
	H ₂ O	ad 1 l
	Für YPD Platten: 15 g Bacto Agar	

CSM:	Yeast Nitrogen Base	6,7 g
	Selektiv-Aminosäuren-Mix	1,4 g
	Glukose	20 g
	1 M NaOH	1 ml
	H ₂ O	ad 1 l
	Für Platten: 20 g Bacto Agar	

CSM_{Ölsäure}: zusätzlich 0,1 % Ölsäure und 0,2 % Tween80

Selektiv-Aminosäure-Mix	Adenin	0,5 g
	Alanin	2,0 g
	Arginin	2,0 g
	Asparagin	2,0 g
	Aspartat	2,0 g
	Cystein	2,0 g
	Glutamin	2,0 g
	Glutamat	2,0 g
	Glycin	2,0 g
	Histidin	2,0 g
	Inositol	2,0 g
	Isoleucin	2,0 g
	Leucin	10,0 g
	Lysin	2,0 g
	Methionin	2,0 g
	<i>para</i> -Aminobenzoesäure	0,2 g
	Phenylalanin	2,0 g
	Prolin	2,0 g
	Serin	2,0 g
	Threonin	2,0 g
	Tryptophan	2,0 g
	Uracil	2,0 g
	Valin	2,0 g

Die Medien oder Stammlösungen wurden nach dem Einwiegen und dem Einstellen des pH-Wertes in Erlenmeyerkolben (Borsilikatglas, Schott) oder Reagenzgläser abgefüllt und verschlossen. Es erfolgte eine Sterilisation in einem Autoklaven für 30 min bei 121°C und 200 kPa. Agarplatten wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C unter sterilen Bedingungen in Plastik- oder Glaspetrischalen gegossen.

2.2.3 Kultivierung und Konservierung von *E.coli*

Ausstrichkulturen von *E.coli* auf Agarplatten wurden unter konstanten Temperaturbedingungen im Brutschrank inkubiert und zur vorübergehenden Lagerung bei 4°C unter Luftabschluss aufbewahrt.

Die Anzucht von *E.coli*-Flüssigkulturen in LB-Medium erfolgte in Schüttelinkubatoren oder Reagenzglasrollern bei konstanter Temperatur. Antibiotika resistente Stämmen wurden durch Zugabe entsprechender Antibiotika selektioniert. Zur Vereinzelnung wurde nach Ausplattieren oder einem Reinigungsausstrich eine einzelne Kolonie gepickt und in Flüssigmedium überimpft. Das Wachstum der Bakterien in Flüssigmedium wurde photometrisch bei 600 nm beobachtet. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa 2×10^8 Zellen/ml (Sambrook et al., 1989).

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer Kultur mit 300 µl sterilem 50%igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.4 Kultivierung und Konservierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Ausstrichkulturen von *S. cerevisiae* wurden auf YPD oder CSM-Platten bis zu sichtbarem Wachstum bei der entsprechend Temperatur inkubiert. Die Anzucht in Flüssigmedien erfolgte im Reagenzglasroller oder Schüttelinkubator bei konstanten Temperaturen. Zur Selektionierung von Einzelkolonien wurde von Platte angeimpft, ansonsten wurden aus Flüssigansätzen transferiert.

Das Wachstum der Zellen wurde photometrisch bei 595 nm verfolgt. Dabei entspricht eine OD₅₉₅ von eins etwa 10^7 Zellen/ml (Walker, 1999).

Die Hefestämme wurden für kurze Zeit als stationäre Flüssigkulturen bei 4°C oder Raumtemperatur gelagert.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden 700 µl einer exponentiell wachsenden Flüssigkultur mit 300 µl sterilem 50%igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.3.1 Plasmide

Folgende Plasmide wurden verwendet bzw. in dieser Doktorarbeit hergestellt.

Vektor	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pET21a	Amp ^R , lac Promotor/Operator-Element	EMD Bioscience inc, San Diego, USA
pET21a-A84P	Hsp12 mit A84P Mutation; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert	diese Arbeit
p2UGPD	pRS426, GPD Promotor EcoR1/BamHI inseriert	(Christianson et al., 1992)
pMH1	<i>HSP12</i> über BamHI/NotI inseriert in p2UGPD	(Haslbeck, 2001)
pMH2	<i>HSP12</i> über NdeI/XbaI in p11395 inseriert	(Haslbeck, 2001)
p2Unp <i>HSP12</i>	natürlicher Promotor von <i>HSP12</i> aus <i>S.cerevisiae</i> über EcoR1/BamHI inseriert in pMH1	diese Arbeit
p2Unp – ΔN10	AS 11 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔN24	AS 25 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔN39	AS 40 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔC13	AS 1 – 96 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔC36	AS 1 – 72 von Hsp12; Nukleotidsequenz über	diese Arbeit

	BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	
p2Unp-A26P	Hsp12 mit A26P Mutation; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp-A84P	Hsp12 mit A84P Mutation; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp-A26P – A84P	Hsp12 mit A26P und A84P Mutation; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit

Tabelle 2-2 Plasmide

2.3.2 Oligonukleotide

In Tabelle 2-3 sind die für PCR-Reaktionen und für Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, D) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Hsp12-BamHI-5'	GAT CGG ATC CAT GCT TCT TGG TTG GGT CTT CTT C
Hsp12-NotI-3'	ATG CGG CCG CTT ACT TCT TGG TTG GGT C
ΔN10-Hsp12-BamHI	TAG GATC CAT GGA AAA AGC TTC TGA AGC
ΔN24-Hsp12-BamHI	TAG GATC CAT GTA CGC TGA ACA AGG TAA G
ΔN39-Hsp12-BamHI	TAG CATC CAT GGT CGC TGG TAA GGT TCA AC
ΔC13-Hsp12-NotI	ATG GCG GCC GCT TAG GAA ACA TAT TCG ACG GC
ΔC36-Hsp12-NotI	ATG GCG GCC GCT TAC AAA GAT TCA CCT TGA CCT TC
Hsp12-A26P-5'	CAA AAG TCA TAC CCT GAA CAA G
Hsp12-A26P-3'	CTT GTT CAG GGT ATG ACT TTT G
Hsp12-A84P-5'	TAC ATG GGA CCC GCC AAG TCC
Hsp12-A84P-3'	GGA CTT GGC GGG TCC CAT GTA
T7-prom (Sequenzierung)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7-term (Sequenzierung)	CAC ACA GGA AAC AGC TAT

Tabelle 2-3 Für PCR-Reaktionen bzw. Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

2.3.3 Lösungen für molekularbiologische Methoden

TAE (50x):	Tris/Acetat pH 8,0	2 M
	EDTA pH 8,0	50 mM
Gelauftragungspuffer (10x):	Glycerin	50% (v/v)
	EDTA (pH 8,0)	10 mM
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Xylencyanol	0,2 % (w/v)
1 %ige Agarose-Lsg:	Agarose	1 g
	TAE (1x)	100 ml
	Ethidiumbromid	1 µl
Lyselösung:	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)
dNTP-Mix:	dATP	10 mM
	dGTP	10 mM
	dCTP	10 mM
	dTTP	10 mM
Lösung A:	3 M NaAc (pH 5,5)	13 ml
	1 M CaCl ₂	100 ml
	2,8 M MnCl ₂	25 ml
	H ₂ O	862 ml
	sterilfiltriert	
Lösung A - Glycerin:	Glycerin (87%)	69 ml
	Lösung A	331 ml
Suspensions Puffer:	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
	Lyticase	4,5 U/µl
	Triton X-100	2% (v/v)
Lyse Puffer:	SDS	1% (v/v)
	NaCl	100 mM
	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM

TE 10.1:	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
Glass Beads (425-600 µm):	5 h in HNO ₃ konz. waschen; mit H ₂ O spülen und bei 180°C trocknen	
Puffer 1:	Tris/HCl (pH 7,4)	10 mM
	EDTA	2 mM
Puffer 2:	PEG 3350	35% (w/v)
	Ethylenglycol	5% (v/v)

Zur Anzucht von Mikroorganismen und zu molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.4 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurden 5 ml stationäre Hefezellen 5 min bei 4000 Upm (Tischzentrifuge) abzentrifugiert, das Zellsediment in 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 200 µl Lyse Puffer resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (CIA) und 300 µl Glassperlen (Durchmesser 0,45 mm). Die Suspension wurde 5 -10 min durch Vortexen gemischt, wobei die Gefäße zwischendurch auf Eis gekühlt wurden. Nach Zugabe von 200 µl TE 10.1 wurde bei 14000 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die genomische DNA mit 1 ml absolutem Ethanol für mindestens 30 min. bei -20°C gefällt. Im Anschluss wurde die genomische DNA bei 18000 Upm sedimentiert, mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 - 100 µl TE 10.1-RNase aufgenommen.

2.3.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem Wizard Plus SV Miniprep System nach Anleitung des Herstellers Promega (Madison WI, USA) durchgeführt.

2.3.6 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Sowohl die analytische, als auch die präparative Auftrennung von DNA erfolgte in 1 %igen (0,3 – 10 kb) bis 2 %igen (0,1 – 1 kb) Agarosegelen, die 0,4 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mittels eines UV-Leuchtschirmes detektiert. Als Längenstandard diente die 1kb-DNA-Leiter (PeqLab, Erlangen, D).

2.3.7 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die benötigten DNA-Banden wurden mit dem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem kommerziell erhältlichen PCR Clean-Up System (Promega, Madison WI, USA) entsprechend der Produktbeschreibung aus dem Gel isoliert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.3.8 Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

Alle Arten von DNA-Fragmenten wurden mit dem PCR Clean-Up System (Promega, Madison WI, USA) entsprechend der Herstellerangabe gereinigt.

2.3.9 DNA-Sequenzanalyse

Alle molekularbiologisch veränderten Vektoren und DNA-Fragmente wurden vor ihrer Weiterverwendung sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firmen GENEART (Regensburg, D) und GATC Biotech AG (Konstanz, D)

2.3.10 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden die zu transformierenden Stämme nach Sambrook *et al.* (1989) kompetent gemacht (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde eine frische 100 ml *E. coli*-Flüssigkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1,0 mit 2 ml 1 M MgCl₂ versetzt und 10 min weiter inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 60 min auf Eis gekühlt, 5 min bei 4°C abzentrifugiert, das Sediment in 20 ml Lösung A resuspendiert und weitere 60 min auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4°C wurde das Sediment in 2 ml Lösung A - Glycerin aufgenommen und die

Zellen in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden entweder direkt mit Plasmid-DNA transformiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden je 100 µl kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA vermischt und 15 - 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend einem einminütigen Hitzeschritt bei 42°C unterzogen, wieder auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 900 µl LB₀-Medium 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen, das Bakteriensediment im verbliebenen Medium resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

2.3.11 Lithiumacetat-Methode zur Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA wurden 100 ml frische, exponentiell wachsende Flüssigkulturen ($2 - 3 \times 10^7$ Zellen/ml) 5 min bei RT zentrifugiert (3500 Upm, Hettich Rotina 46 R). Das Zellsediment wurde in 5 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, RT, 3500 Upm, Hettich Rotina 46 R). wurde das Sediment zweimal in 5 ml 0,1 M LiAc/TE 10.1 gewaschen. Die kompetenten Zellen wurden schließlich in 1 ml 0,1 M LiAc/TE 10.1 resuspendiert und innerhalb der nächsten 5 h verarbeitet.

50 µl kompetente Hefezellen wurden mit 1-5 µg Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurde die DNA mit den kompetenten Zellen vermischt, 5 µl Lachssperma-DNA (Carrier-DNA; Sigma, St. Louis, USA) und 300 µl Puffer 2 (40% PEG 4 000 in 0,1 M LiAc/TE 10.1) zugesetzt. Diese Mischung wurde 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 min auf 42°C erhitzt, sofort wieder abgekühlt, 1 ml steriles Wasser zugegeben und 5 min bei RT und 5000 Upm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Sediment im verbleibenden Restmedium resuspendiert und auf CSM-Selektionsplatten ausplattiert.

2.3.12 PCR-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) (Mullis und Faloona, 1987) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Das Enzym DNA-Polymerase dupliziert einzelsträngige DNA (ssDNA) von ihrem freien 3'-OH-Ende weg, indem sie diese mit den zur vorliegenden Sequenz komplementären

Basen auffüllt. Als Substrate dienen die vier Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Mit Hilfe von Oligonukleotiden, sogenannten Primern, kann man, von beiden Enden eines DNA-Abschnittes her, Kopien erstellen.

Mit der PCR wurden gezielt DNA-Bereiche aus dem Hefegenom oder aus plasmidcodierten cDNAs amplifiziert. Diese wurden in der Folge für die Klonierung in verschiedene Plasmide verwendet.

Bei der Wahl der für die PCR verwendeten Primer wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperaturen beider Primer etwa gleich hoch waren (ungefähr 70-75°C). Die Auswahl der Primer und die Berechnung der Schmelztemperaturen wurde mit Hilfe des Computerprogramms Primer Design 1.02 (S & E Software, Madison, USA) durchgeführt. Zur gerichteten Klonierung wurden an den Enden der Primer Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angebracht.

In der Regel wurden die PCR-Amplifikationen in folgendem Standardansatz durchgeführt. Dazu wurden ultradünnwandigen PCR-Reaktionsgefäße verwendet.

Template DNA	0,5 µl (ca. 25 ng)
10 x Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mix	1 µl
Primer (50 pmol/µl)	je 0,5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O	42,25 µl

Grundsätzlich wurde die sogenannte *hot start* Methode verwendet. Hierbei wurden die Reaktionsgefäße erst dann in den Thermocycler gestellt, wenn dieser auf 95°C aufgeheizt war. Die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte wurde auf diese Art vermindert und die Ausbeute an PCR-Produkten erhöht.

Die PCR-Amplifikationen wurden im ThermoCycler Primus (MWG, Ebersberg, D) durchgeführt. Die Einstellungen des Cyclers wurden je nach Primerpaar und verwendeter DNA-Polymerase variiert. In der Regel wurden 25 Zyklen durchlaufen, wobei folgende Standardbedingungen verwendet wurden:

Denaturierung	95°C	30 s
Annealing	60°C	30 s
Synthese	72°C	etwa 1 min pro 1 kB Insertgröße

2.3.13 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Sowohl zur analytischen Kontrolle eines Plasmids, als auch zur präparativen Gewinnung von geschnittenen DNA-Fragmenten wurden Restriktionsverdau durchgeführt. Je nach Zielsetzung wurden unterschiedliche Ansatzvolumina gewählt. Für die analytische Spaltung wurden 10 µl Plasmid-DNA mit 3 Units (meist 0,3 µl) des jeweiligen Restriktionsenzym versetzt. Die Spaltung erfolgte unter Zusatz von 0,1 Ansatzvolumina des vom Hersteller beigefügten 10 x Restriktionspuffers. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gewählt. Im Anschluss wurde die Spaltung durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.6) verifiziert. Für die präparative Spaltung von DNA wurden etwa 30 µl Plasmid-DNA oder gereinigte PCR-DNA mit 20 Einheiten des Restriktionsenzym und 0,1 Ansatzvolumina 10 x Restriktionspuffer versetzt und das gewünschte Spaltprodukt nach Ablauf der Inkubationszeit gereinigt.

2.3.14 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um das Religieren von geschnittenen Plasmiden (Vektoren) auszuschließen, wurden diese im Anschluss an den Restriktionsverdau mit Alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim, D) behandelt. Entsprechende Ansätze wurden mit ca. 8 – 12 U alkalischer Phosphatase für ca. 1 h inkubiert.

2.3.15 Ligieren von DNA-Fragmenten

In der Regel wurde 500 ng Fragment-DNA mit 200 ng Vektor-DNA ligiert. Dazu wurde eine Unit (meist 1 µl) T4-DNA-Ligase (Promega, Madison, USA) und 0,1 Ansatzvolumina T4-Ligasepuffer zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.4 Proteinanalytische Arbeitstechniken

2.4.1 Lösungen für Proteinchemische Methoden

Laufpuffer (10x)	Tris	0,25 M
	Glycin	2 M
	SDS	1% (w/v)
5x-Laemmli Auftragspuffer	SDS	10% (w/v)
	Glycerin	50% (w/v)
	Tris	300 mM
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
	2-Mercaptoethanol	5% (v/v)
Trenngelpuffer (4x)	SDS	0,8%
	Tris/HCl, pH 8,8	5 M
Sammelgelpuffer (2x)	SDS	0,4%
	Tris/HCl, pH 6,8	0,25 M
Acrylamid	Acrylamid/Bisacrylamid = 38:2	40% (w/v)
Transferpuffer	Glycin	36 g
	Tris	7,6 g
	Methanol	500 ml
	SDS	0,3% (w/v)
	H ₂ O	ad 2,5 l
TBS (-T)	Tris	6 g
	NaCl	20 g
	H ₂ O	ad 2,5 l
	→ mit HCl pH 7,6 einstellen (Tween-20)	2,5 ml)
PBS (-T)	NaCl	5,84 g
	Na ₂ HPO ₄	11,5 g
	NaH ₂ PO ₄	2,96 g
	H ₂ O	ad 1 l
	(Tween-20)	1 ml)

Stripping Puffer	SDS	2%
	Tris/HCl (pH 6,7)	62,5 mM
	2-Mercaptoethanol	100 mM

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) wurden mit dem Puffersystem von Fling und Gregerson zur Analyse von Proteinextrakten und Zellaufschlüssen durchgeführt (Fling und Gregerson, 1986).

Die Auftrennung erfolgt auf vertikalen 7 x 9 x 0,075 cm großen SDS-PAGE-Gelen in einer SDS-PAGE-Elektrophoreseapparatur bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA je Gel. Es wurden 12,5, 15 und 17,5%ige SDS-Gele verwendet. Die Proteinlösungen wurden vor der Elektrolyse mit 5 x Laemmli-Ladepuffer versetzt, der zur Reduktion der Disulfidbrücken β -Mercaptoethanol enthielt. Für eine vollständige Denaturierung der Proteine wurden die Proben direkt vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 95 °C erhitzt.

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurde der LMW-Standard (Biorad Laboratories, München, D) oder der vorgefärbte Roti-Marker (Roth, Karlsruhe, D) (für Westernblot) mit auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung eines Farbstoffes vor allem an basische und aromatische Aminosäuren in Proteinen. Aus der Bindung resultiert eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm (rot-violett) nach 595 nm (blau). Die kommerziell erhältliche Färbelösung (Coomassie Protein Assay Reagent; Pierce, Rockford, USA) wurde vor Gebrauch 1:1 mit H₂O bidest. verdünnt. 5 μ l Probe wurden in 95 μ l Wasser verdünnt und mit je 900 μ l dieser Lösung versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration kann dann über eine BSA-Eichgerade ermittelt werden. Dabei wird angenommen, dass der Farbstoff mit dem untersuchten Protein in der gleichen Effizienz wechselwirkt wie mit BSA.

2.4.4 Färbung nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971)

SDS-Polyacrylamidgele wurden hierbei in Lösung A gefärbt und nachfolgend schrittweise in den Lösungen B, C und D entfärbt. Durch kurzes Aufkochen der Gele konnten die Inkubationszeiten in den verschiedenen Lösungen abweichend von der Originalvorschrift auf etwa 1 min verkürzt werden; (Fairbanks et al., 1971): 2 h Färben, je 1 h Entfärben.

Verwendete Lösungen:

Lösung A:	25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) technische Essigsäure, 0,05% Coomassie Blau R
Lösung B:	10% Isopropanol, 10% techn. Essigsäure, 0,005% Coomassie Blau R
Lösung C:	10% technische Essigsäure, 0,002% Coomassie Blau R
Lösung D:	10 % technische Essigsäure

2.4.5 Immunoblotting (Western Blot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer *Semi Dry* Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen, Deutschland) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Für den Übertragungsvorgang wurde ein Stapel aus drei Whatman Filterpapieren, einer Nitrocellulose- oder PVDF-Membran, dem SDS-PAGE-Gel und erneut drei Whatman Filterpapieren in die Blot-Apparatur eingespannt. Alle Komponenten wurden vorher 10 min in Transferpuffer eingelegt. Die PVDF-Membran wurde vorerst mit Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und daraufhin in Transferpuffer inkubiert. Die Übertragung erfolgte 1 h bei 1,5 mA/cm² SDS-PAGE-Gel. Um unspezifische Bindestellen abzudecken wurden die Membranen mit den transferierten Proteinen mind. 1 h in PBS-T mit 5% Magermilchpulver oder in 1 x Roti-Block (Roth, Karlsruhe, D) inkubiert. Die Membran wurde dann mit primären, spezifisch gegen die jeweiligen Proteine gerichteten Antikörpern in PBS-T/1% Magermilchpulver überschichtet und 60 min inkubiert. Die verwendete Konzentration des primären Antikörpers richtet sich nach dem Antikörpertyp und wurde individuell eingestellt. Die Membranen wurden anschließend dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen. Nun wurde der primäre Antikörper 60 min mit

einem sekundären Antikörper mit Peroxidase-Konjugat (1:4000 verdünnt) komplexiert.

Nach mehreren Waschschrritten wurde dieses Antikörper-Enzym-Konjugat mit Hilfe des ECL-Systems nach Vorschrift des Herstellers nachgewiesen. Bei dieser Reaktion katalysiert die Peroxidase in Anwesenheit von H_2O_2 die Oxidation von zyklischem Diacylhydrazin-Luminol, wobei Licht freigesetzt wird (Chemolumineszenz). Durch das Auflegen eines Röntgenfilms (X-Omat, Kodak, Rochester, USA) wurde diese Lichtreaktion detektiert.

2.4.6 Interaktionsanalysen mittels Differentialkalorimetrie (DSC)

Energie, die als Wärme übertragen wird, kann mittels eines Kalorimeters gemessen werden. Wird eine Lipiddoppelschicht einer sukzessiven Temperaturerhöhung ausgesetzt, so vollzieht sich ein thermotropischer Phasenübergang vom Gel zum flüssig-kristallinem Zustand (Beney und Gervais, 2001). Diese Phasenumwandlung ist mit der Entstehung von Wärme verbunden und kann mittels DSC dargestellt werden. Bekanntermaßen beeinflusst die Art und Weise der Interaktion mit Lipid und das Maß der Penetration eines Proteins in eine Lipiddoppelschicht das thermotropische Verhalten des Lipid-Phasenüberganges (Papahadjopoulos et al., 1975; Ghosh et al., 1997). Aus diesem Grund wurde die DSC benutzt, um Bindung von Hsp12 an anionische oder zwitterionische Membranen zu messen.

Dazu wurden zunächst kleine unilamellare Vesikel (Small Unilamellar Vesicles: SUVs) aus DMPG (1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)]) bzw. DMPC (1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine) präpariert. Jeweils 3 mg Lipid wurden in Chloroform/Methanol (1:1 (v/v)) in einem Glasgefäß gelöst, mit Hilfe von Stickstoff abgedampft und im Vakuumschrank (Kendro, München, D) bei 700 Torr und Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Derart getrocknete Lipidproben wurden abgewogen und konnten sofort weiter verarbeitet, oder bei $-20^{\circ}C$ gelagert werden.

Nach Zugabe von 1 ml Puffer (10 mM Na-Phosphat, pH 7,4, 100 mM NaCl) wurde die Dispersion für mindestens 1 min stark gevortext. SUVs mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 30 nm (Sanghera und Pinheiro, 2002) wurden mittels Ultraschallbehandlung (Ultraschallgerät Sonifier B-12, ausgestattet mit ein Mikro-Sonde) für etwa 3 min in einem Eiswasserbad präpariert. Sobald der Ansatz transparent wurde, folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 13 000 Upm in der

Tischzentrifuge, um mögliche Partikel der Sonde, die sich während der Behandlung lösen können, zu entfernen.

Der Überstand alleine oder mit entsprechenden Mengen an Hsp12 wurde zunächst unter Vakuum unter sanftem Rühren entgast (ThermoVac, MicroCal Incorporated, Northampton, USA) und in die Messzelle des Kalorimeters gefüllt (ca. 600 μ l). Unterschiede in der Wärmekapazität zwischen der Probe und der mit Puffer gefüllten Referenzzelle wurden durch Erhöhung der Temperatur mit einer konstanten Rate von 60°C/h über einen Temperaturbereich von 10 bis 40°C erhalten. Nach jedem Heizvorgang erfolgte eine Abkühlung auf 10°C. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden jeweils vier Scan-Zyklen durchlaufen. Die Nullwert-Korrektur und Analyse erfolgte mit Hilfe der Instrumentensoftware (Microcal Origin Software).

2.4.7 Interaktionsanalyse mittels Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)

Kalorimetrie beruht auf der Detektion von Wärmeunterschieden, die durch thermodynamische Prozesse verursacht werden. Nahezu jede chemische Reaktion und jeder physikalischer Absorptionsprozess gehen mit der Entstehung oder Absorption von Wärme einher und ITC misst direkt diese Reaktionswärme. Somit kann die Analyse der Wechselwirkung zweier Substanzen wie z.B. von Lipid und Protein durch kalorimetrische Methoden erfolgen (Jelesarov und Bosshard, 1999; Seelig, 1997). Die hochsensitive ITC erlaubt die simultane Messung von Bindekonstanten und Reaktionsenthalpie (Wiseman et al., 1989).

ITC wurde verwendet, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipidvesikeln thermodynamisch zu analysieren. Dazu wurden zunächst wie unter 2.4.6 beschrieben SUVs präpariert, die allerdings aus zwei verschiedenen Lipiden bestanden. Aus POPG: 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)] und POPC: 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine. Diese Lipide wurden nacheinander so in Chloroform/Methanol gelöst und abgedampft, dass ein Mischverhältnis von POPC/POPG von 3:1 entstand.

Üblicherweise wurden etwa 2 ml dieser Lipidlösung (ca. 10 mg/ml) in 40 mM HEPES, pH 7,4 unter Vakuum entgast (ThermoVac, MicroCal Incorporated, Northampton, USA), in der Messzelle auf 28°C temperiert und Hsp12 in variierender Konzentration in der Injektionsspritze vorgelegt. Die Injektionsspritze wurde in die Messzelle

eingeführt. Nach Abschluss der Temperierungsphase wurde das Experiment gestartet und dabei 28 Injektionen des Proteins in die Messzelle vorgenommen. Die Grundlage der Analyse der dabei entstandenen Bindungsisotherme bildete das Langmuir Bindemodell. Die Auswertungen erfolgten in einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Joachim Seelig, Biozentrum, Universität Basel.

2.5 Chromatographie

Die im Folgenden beschriebenen chromatographischen Methoden fanden bei der durchgeführten Proteinreinigung von Hsp12_{A84P} Anwendung. Der Reinigungserfolg wurde nach jedem Schritt durch SDS-PAGE (siehe 2.4.2) kontrolliert.

2.5.1 Ionenaustauschchromatographie

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf der Anziehung unterschiedlich geladener Teilchen. Proteine tragen aufgrund ihrer geladenen Seitenketten positive oder negative Nettoladungen, weshalb es ihnen möglich ist, an ein entgegengesetzt geladenes Trägermaterial zu binden. Die Elution erfolgt in der Regel durch Erhöhung der Ionenstärke im Laufpuffer. Dadurch werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmaterial abgeschwächt und die gebundenen Proteine dissoziieren von der Matrix ab. Sowohl das Säulenmaterial, als auch der Laufpuffer werden abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins gewählt, da die Nettoladung eines Proteins bedingt ist durch den pK-Wert und die Lage seiner ionisierbaren Gruppen sowie den pH-Wert des Laufpuffers.

Je nach Art der geladenen Gruppen unterscheidet man zwischen Kationenaustauschern, die negativ geladene Gruppen an der Oberfläche des Trägermaterials aufweisen oder Anionenaustauschern, die positive Ladungen besitzen. Zur Reinigung der Proteine fand in dieser Doktorarbeit das Trägermaterialien Q-Sepharose Anwendung.

2.5.2 Gelfiltrationschromatographie

Proteine lassen sich mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie nach ihrem hydrodynamischen Radius auftrennen. Die Matrix dieser Säulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk definierter Porengröße. Proteine, deren Durchmesser größer ist als die Porengröße, sind nicht in der Lage, in die Poren des Trägermaterials einzudringen und eluieren daher gemeinsam im Ausschlussvolumen. Kleinere Partikel können dagegen in die Gelporen eindringen und wandern daher langsamer durch die Säule als die größeren Moleküle (Lottspeich und Zorbas H, 1998). Der Trennbereich einer Gelfiltrationssäule wird folglich durch die Porengröße bestimmt. Zur Durchführung werden üblicherweise Puffer mit höherer Ionenstärke verwendet, um ionische Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix zu unterdrücken.

Zur Reinigung der Hsp12-Mutante A84P wurde hierbei die Fertigsäule Superdex 75 Prep Grade verwendet.

2.6 Präparative Methoden

2.6.1 Zellaufschluss

Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einer Zellaufschlussmaschine (BasicZ, Constant Systems, Warwick, England) mittels Prallstrahlverfahren. Dabei wird eine Suspension mittels einer Hochdruckpumpe auf Drücke von bis zu 2,5 kbar verdichtet und dann durch eine Düse entspannt. Nach dem Durchtritt durch die Düse wird die Suspension im Freistrahlfeld auf eine Prallplatte geführt, wo sie mit hoher Geschwindigkeit auftrifft. Die Beanspruchung der Zellen erfolgt sowohl durch Kavitationen im Bereich der Düse, als auch durch die schlagartige Verzögerung auf die Prallplatte.

Der Aufschluss von Hefezellen erfolgte mit einem Druck von 2,5 kbar und einem Düsendurchmesser von 35 µm, der Aufschluss von *E. coli*-Zellen erfolgte mit einem Druck von 1,8 kbar. Vorhandene genomische DNA wurde beim *E. coli*-Aufschluss durch 20 s Ultraschall (Sonifier B-12, Branson, Danbury, USA) zerkleinert. Zur Abtrennung intakter Zellen, unlöslicher Bestandteile und von Zell- und Membrantrümmern wurde der *E. coli*-Zellaufschluss anschließend 60 min bei 30 000 x g und 4 °C abzentrifugiert.

2.6.2 Proteinexpressionsnachweis in Hefe

Zum Nachweis der Hsp12-Expression in Hefe wurden Zellen bei 5000 Upm (TZ) für 5 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 50 μ l 2 M NaOH resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 50 μ l 50%ige TCA zugegeben und das Sediment weitere 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 10 000 Upm (TZ) zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Sediment vollständig getrocknet. Danach wurde die Probe in 70 μ l 1 x Laemmli resuspendiert und so lange 1 M Tris zugegeben, bis die Farbe von gelb nach blau umschlug. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot.

2.6.3 Aufkonzentrierung und Dialyse von Proteinen

Zur Aufkonzentrierung von Volumina über 5 ml wurde eine Amicon-Ultrafiltrationszelle (50 ml) eingesetzt. Als Membran dienten dabei für Hsp12_{A84P} Amicon YM3-Membranen mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa. Der Überdruck der Stickstoffbegasung von etwa 3 bar presst die Proteinlösung durch die Membran, wobei allerdings nur die Pufferlösung passieren kann und das Protein in der Zelle verbleibt. Um eine Erwärmung der Proteinlösung zu vermeiden, wurde die Amicon-Zelle auf Eis gekühlt.

Zur Veränderung der Pufferbedingungen wurde gegen das 100-1000fache des entsprechenden Ausgangsvolumens bei 4 °C dialysiert. Für eine effektive Dialyse wurde der Puffer einmal gewechselt. Der Pufferaustausch erfolgte über eine semipermeable Membran.

2.6.4 Reinigung von Hsp12_{A84P} aus *E. coli*

Die Hsp12-Reinigung erfolgte leicht modifiziert nach dem bekannten Protokoll (Fischer, 2003). Hsp12_{A84P} wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert. Zur Reinigung wurde der *E. coli*-Stamm BL21 DE3 verwendet, der mit dem Expressionsplasmid pET21a-A84P transformiert war. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezogen und durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach einer fünfstündigen Expression bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 5500 Upm, 8°C; JA-10-Rotor; Beckman, Wien, Österreich)

geerntet, in Aufschlusspuffer (10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4, 10mM NaCl, 1mM DTT, 1 mM EDTA) resuspendiert und wie unter 2.6.1 beschrieben aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Anionenaustauscherchromatographie (Q-Sepharose) aufgereinigt (Gradient von 10 bis 500 mM NaCl), die Hsp12_{A84P} enthaltenden Fraktionen gesammelt und einem Hitzeschritt für 15 Minuten bei 80°C unterzogen. Die denaturierten, aggregierten Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (40 min, 14 000 Upm, 8°C; JA-25.50-Rotor; Beckman, Wien, Österreich). Hsp12 blieb unter diesen Bedingungen fast ausschließlich im löslichen Überstand. Dieser Überstand wurde durch Ultrafiltration aufkonzentriert und in einem letzten Reinigungsschritt, der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75PG, GE Healthcare, Freiburg, D) sauber aufgereinigt.

Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE überprüft und dokumentiert. Das gereinigte Hsp12 wurde aufkonzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.7 Spektroskopie

Bei allen spektroskopischen Untersuchungen wurden die aufgenommenen Spektren gegen entsprechende Pufferspektren als Referenz korrigiert. Diese Referenzen enthielten den Dialysepuffer, gegen den das verwendete Protein zuletzt dialysiert worden war.

2.7.1 UV/VIS-Spektroskopie

Eine Absorption elektromagnetischer Strahlung im UV/VIS-Bereich erfolgt, wenn delokalisierte π -Elektronen aus ihrem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand überführt werden. Spektroskopische Untersuchungen von Proteinen erfolgen meist im Wellenlängenbereich von 180 nm bis 300 nm. Im Bereich von 180 bis 240 nm absorbiert vor allem die Peptidbindung mit ihrer Carbonylfunktion. Im Bereich von 250 bis 300 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, und in geringerem Maße auch Phenylalanine und Disulfidbrücken. Tyrosin und Tryptophan liefern den größten Beitrag zur Absorption, da ihre Extinktionskoeffizienten um fast eine Größenordnung höher liegen als die des Phenylalanins und der Disulfidbrücken. Die UV-

Absorptionsspektroskopie wurde vor allem verwendet, um die Konzentration von Proteinlösungen zu bestimmen. Dazu kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei bekanntem Extinktionskoeffizienten die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm errechnet werden.

Lambert Beer'sches Gesetz: $A = \varepsilon \cdot c \cdot d$

- ε molarer Extinktionskoeffizient
- E gemessene Extinktion bei 280 nm
- c Konzentration der Proteinlösung
- d Schichtdicke der Küvette

Der Extinktionskoeffizient lässt sich für Proteine aus der Aminosäurezusammensetzung ermitteln (Pace et al., 1995). Dazu wurde das Programm ProtParam (<http://expasy.org>) verwendet.

In allen UV-Absorptionsexperimenten wurden Quarzglas Suprasil Küvetten mit einer Schichtdicke von 1-10 mm verwendet.

2.7.2 Fluoreszenzpolarisation und Probenvorbereitung

Unter Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung des UV/Vis-Bereichs (200 nm bis 800 nm) auf Moleküle mit geeigneten Chromophoren kommt es durch Lichtabsorption zur Elektronenanregung (vergleiche 2.7.1). Bei der Energieabgabe durch Fluoreszenz ändert sich das Dipolmoment des Moleküls und man kann für die strahlenden Prozesse ein Emissionsübergangsdipolmoment bestimmen. Die Übergangsdipolmomente für die Absorption und die Emission sind nicht parallel, sondern um einen bestimmten, aber meist kleinen Winkel gegeneinander verschoben. Unter der Voraussetzung, dass sich ein Fluorophor zwischen Absorption und Emission nicht nennenswert bewegt, folgt daraus, dass bei Anregung mit linear polarisiertem Licht auch die entstehende Fluoreszenzstrahlung zu einem gewissen Grad polarisiert ist.

Bei Fluoreszenzanisotropie- oder Fluoreszenzpolarisations-Messungen werden herkömmliche Fluorimeter verwendet, bei denen sowohl in den Anregungs- als auch in den Emissionsstrahlengang zusätzlich zum Monochromator je ein Polarisator

installiert ist. Die Anregung der Moleküle/Proteine erfolgt mit monochromatischem, vertikal linear polarisiertem Licht. Mit Anisotropiemessungen wird die durchschnittliche Winkelverschiebung des Emissionsdipolmomentes im Zeitraum zwischen Absorption und anschließender Emission von Photonen erfasst. Diese Verschiebung ist abhängig von der Rotationsdiffusion des Fluoreszenzfarbstoffes während der Lebenszeit des angeregten Zustandes.

Um dies zu bestimmen wird die Fluoreszenzintensität einmal bei vertikal und einmal bei horizontal gestelltem Emissionspolarisation gemessen.

Die Membranfluidität ganzer Zellen wurde mittels Fluoreszenzanisotropie unter Verwendung des spezifischen Plasmamembran-Fluoreszenzfarbstoffes Diphenylhexatrien (DPH) bestimmt. Dieses Molekül taucht zum einen tief in die Lipiddoppelschicht ein (Kaiser und London, 1998), zum anderen wird die Fluoreszenz von DPH durch die Interkalation in die Membran massiv verstärkt wird, während sie in wässriger Umgebung vernachlässigbar gering ist. Die Fluoreszenzanisotropie dieses Chromophores korreliert umgekehrt mit der Membranfluidität (Lentz, 1993).

Über Nacht bei den entsprechenden Temperaturen gewachsene Zellen wurden zentrifugiert (5000 Upm, TZ), mit sterilem 1 x PBS gewaschen und auf eine OD_{600} von 0,3 eingestellt. Zu 2 ml Zellsuspension in PBS wurden 10 μ l DPH (1,46 mg/10 ml DMSO) bzw. 10 μ l DMSO als Kontrolle gegeben und bei der jeweiligen Temperatur unter Ausschluss von Licht für 20 min unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Waschen in 1 x PBS wurden die Pellets in PBS aufgenommen und auf die gleiche Zelldichte eingestellt. Die Proben wurden daraufhin in eine Quarzglas Suprasil Fluoreszenzrührküvette (1,5 ml) überführt, in den thermostatisierbaren Küvettenhalter des Fluoromax 3 platziert und bei konstanter Temperatur vermessen. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen betragen 340 nm und 432 nm. Jede gemessene Fluoreszenzintensität wurde durch Subtraktion der Lichtintensitäten, die für ungelabelte lediglich mit DMSO behandelte Zellen detektiert wurden, korrigiert. Die Fluoreszenzanisotropie kann nach folgender Formel bestimmt werden.

$$r = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + 2G \times I_{VH}}$$

$$\text{mit } G = \frac{I_{VH}}{I_{HH}}$$

Dabei stellt r die Fluoreszenzanisotropie und I die korrigierte Fluoreszenzintensität des Emissionslichtes dar, wobei V und H (vertikal und horizontal) die Ausrichtung der Polarisatoren zum elektrischen Feldvektor des Anregungslichtes beschreiben.

2.7.3 Circular dichroismus Spektroskopie

Optisch aktive Substanzen zeichnen sich dadurch aus, dass sie links- und rechts-circular polarisiertes Licht verschieden stark absorbieren. Bei Biomolekülen ist dies dann der Fall, wenn das Molekül einen Chromophor in chiraler Umgebung besitzt. Es finden Wechselwirkungen von Licht mit der polarisierbaren Elektronenhülle optisch aktiver Substanzen statt. Diese können anhand der Differenz der molaren Absorptionskoeffizienten für rechts- und linksdrehende Moleküle gemessen werden (Circular dichroismus, CD). Alternativ kann der CD-Effekt in Form eines Winkels als Maß für die Elliptizität angegeben werden, da diese direkt proportional zur Differenz der molaren Absorptionskoeffizienten ist. In Proteinen sind Disulfidbrücken, Peptidbindungen oder die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Histidin für CD-spektroskopische Messungen von Bedeutung. Disulfidbrücken (inhärent chiral) besitzen keine lokale Symmetrie. Ihre Wechselwirkungen mit rechts- und links-circular polarisiertem Licht ist wesentlich stärker ausgeprägt als die der achiralen Chromophore (z.B. Trp und Tyr). Erst bei einer Einbettung dieser sogenannten inhärent symmetrischen Chromophore in eine chirale Umgebung sind Unterschiede im Absorptionsverhalten zu erkennen (dissymmetrische Störung). In der Regel wird die Stärke der in Biomolekülen beobachteten CD-Effekte zu einem großen Teil durch die gegenseitige Orientierung der Chromophore bestimmt. Die CD-Spektroskopie ist daher eine äußerst empfindliche Methode zur Konformationsuntersuchung, insbesondere zur Feststellung von Konformationsänderungen von Proteinen in Lösung.

Konformationsuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie werden grundsätzlich in zwei Bereiche unterschiedlicher Wellenlänge unterteilt. Lokale Strukturänderungen in Proteinen können vielfach in der Aromaten-Region im Nah-UV-Bereich bei 240-350 nm beobachtet werden. Globale Konformationsänderungen erfassen zusätzlich den Fern-UV-Bereich bei 170-240 nm. In der Fern-UV-Region sind beispielsweise die Sekundärstrukturtypen α -Helix mit zwei benachbarten Minima hoher Intensität bei 208 und 222 nm, β -Faltblatt mit einem Minimum geringerer Intensität bei 218 nm zu erkennen. Random-coil-Konformation haben ein starkes Minimum bei 203 nm. Das CD-Signal liefert somit Informationen über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins. Die in dieser Arbeit vorgestellten Fern-UV-CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-715-Spektrophotometer mit PTC 343 Peltier-Temperiereinheit durchgeführt. Die CD-Signale werden mit der Elliptizität Θ (in Grad) als quantitatives Maß für die Ausprägung der Struktur angegeben.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MRW}{c \cdot d} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_R}{c \cdot d \cdot N_A}$$

- Θ gemessene Elliptizität [grad]
- Θ_{MRW} Elliptizität der Aminosäuren (Grad x cm² x dmol⁻¹)
- M_R Molekulargewicht des Proteins (g/mol)
- MRW mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren
- c Konzentration der Proteinlösung
- N_A Anzahl der Aminosäuren
- d Schichtdicke der Küvette

Die Messungen wurden in thermostatisierten Quarzküvetten der Schichtdicke 1 mm durchgeführt.

2.8 Mikroskopie

2.8.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Ansätze wurden mit einem inversen Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Leipzig, D) bei 1250-facher Vergrößerung mit dem Objektiv F 100/1,25 Öl (12,5x Okular) unter Benutzung von Immersionsöl durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels einer angeschlossenen CCD-Kamera (Hamamatsu, Herrsching, D).

2.8.2 Fluoreszenzmikroskopie Calcofluor White-gefärbter Zellen

Die Zellwände der Hefezellen wurden mit Calcofluor White M2R (CFW) angefärbt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl CFW (0,01% in Wasser) versetzt. Nach Mischen der Lösungen erfolgte die Mikroskopie an einem Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 200 mit UV-Ausstattung (Fluo Arc, Zeiss, Leipzig, D). Die Zellen wurden bei 1250-facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv (F 100/1,25) mikroskopiert. Folgender spezifischer Filtersätze wurden verwendet (Filter set 02):

Anregung	G 365
Emission	LP 420
Beam splitter	FT 395

2.8.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die Untersuchung der Morphologie einzelner Hefestämme wurde die Methode der Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt. Bei dieser Methode wird ein biologisches Präparat mit einer dünnen Schicht aus schwerem Metall, in der Regel Gold, überzogen und mit einem Elektronenbündel bestrahlt (Spector et al., 1998). Dieses Elektronenbündel lässt man über das Objekt wandern. Die Elektronen, die durch das Metall gestreut werden, werden gesammelt und zur Entstehung eines elektronischen, dreidimensionalen Bildes genutzt.

Zur Probenvorbereitung wurden die Hefezellen aus der gewünschten Wachstumsphase abzentrifugiert (5000 Upm; 5 min, RT, Tischzentrifuge), mit PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 270 µl PBS aufgenommen, zur Fixierung mit 30 µl 25%igem Glutaraldehyd versetzt und eine

Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation und erneutem Waschen mit PBS-Puffer wurde das Pellet je nach Zelldichte in einer entsprechenden Menge PBS aufgenommen, 30 µl dieser Suspension auf runde Plastikobjektträger (Thermanox Coverslips, Nunc, Wiesbaden, D) aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, ohne die Zellen völlig auszutrocknen. Nun erfolgte eine Entwässerung durch sukzessives Waschen (jeweils ca. 5 Minuten) mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %; 70 %; 80 %, 95 % und dreimal 100 % (v/v)). Anschließend wurden die Präparate im Vakuumtrockenschrank (Kendro, München, D) bei 700 Torr und Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Die Objektträger wurden mit Klebstoff auf 5 x 12,5 mm zylindrische Präparateträger (Plano, Wetzlar, Deutschland) aufgeklebt und getrocknet. Die getrockneten Präparate wurden dann mit einem Beschichter (Sputter, SCD 005, Bal-Tec, Balzer, Lichtenstein) mit Gold unter Vakuum für mindestens 100 Sekunden beschichtet, in die Vakuumkammer des Rasterelektronenmikroskopes (5900 LV, Joel, Eching, D) eingebracht und bei 20 kV Hochspannung mikroskopiert.

2.9 Lokalisationsstudien und Funktionsassays

2.9.1 Subzelluläre Fraktionierung im Saccharosedichtegradienten

Um Hsp12 innerhalb von Wildtyp-Hefezellen zu lokalisieren, wurde Gesamtzell-Lysat in einem Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Mit dieser Methode lassen sich verschiedene Zellorganellen, wie Mitochondrien, Vakuolen, ER, etc. voneinander separieren, da sie sich in Größe und Gewicht unterscheiden. Während der Zentrifugation bei hoher Geschwindigkeit, sedimentieren deshalb die einzelnen Organellen, bis ihre Schwebedichte genau der im Saccharosegradienten entspricht (Lehninger et al., 1998).

Dazu wurden 250 ml bis zur stationären Phase in YPD gewachsene Wildtypzellen geerntet (2500 x g, 10 min, RT), mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden zum einen in einer möglichst kleinen Menge SET-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,2 M Sorbit, 1 mM MgCl₂) aufgenommen, mit Proteaseinhibitoren (1:100) (Complete Protease Inhibitor Mix G Serva, Heidelberg, D) versetzt und mit Hilfe der Zellaufschlussmaschine, wie unter 2.6.1 beschrieben, aufgeschlossen. Zum anderen wurden geerntete und gewaschene Zellen in osmotisch stabilisiertem SPM-

Puffer (50 mM K-Phosphat, pH 7,3, 1,2 M Sorbitol) aufgenommen mit 400 Units der Endoglukanase Lytikase aus *Arthrobacter luteus* (in 50 mM Tris/HCl, pH 8,2, 10% Saccharose (w/v)) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Schrittes sollte die Zellwand der Hefen durch Hydrolyse des β -1,3-Glukan abgelöst werden. Die Umwandlung in sogenannte Spheroblasten wurde mikroskopisch überprüft. Nach Zentrifugation (2500 x g, 10 min RT) wurde der Überstand abgezogen, das Pellet in SET-Puffer aufgenommen und mit Proteaseinhibitoren versetzt. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels eines Glaspotters (100 x pottern). Sowohl diese Zell-Lysat als auch das mit Hilfe der Aufschlussmaschine erhaltene wurden 10 min bei 600 x g und 8°C zentrifugiert, um ganze Zellen zu entfernen. Das so gewonnene Gesamt-Zell-Lysat (je 800 μ l) wurde auf einen Saccharose/EDTA-Stufengradienten geladen (0,5 ml 55%; 1 ml 45%; 0,8 ml 30%; 0,5 ml 20% und 0,5 ml 10% Saccharose (w/w) in 20 mM Triethanolamin, pH 7,2, 5 mM EDTA) und bei 100 000 x g für 2,5 h zentrifugiert (Optima™ Max-E Ultrazentrifuge (Beckman, Wien, Österreich). 500 μ l Fraktionen wurden von oben beginnend abgenommen, mit dem gleichen Volumen eiskaltem 20%igem TCA in Aceton, 0,2% DTT versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13 000 Upm (TZ) wurde das Pellet mit Aceton, 0,2% DTT gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Nach Aufnahme in 1 x Laemmli erfolgte eine 5 minütige Erhitzung bei 96°C. Über SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (siehe 2.4.2 und 2.4.5).

2.9.2 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation

Um Hsp12 einem Zellkompartiment zuzuordnen, wurden ganze Hefezellen mittels differentieller Zentrifugation in drei verschiedene Fraktionen zerlegt: einer Zellwand-, einer cytosolischen und einer Membranfraktion. Dabei nutzt man die Tatsache aus, dass Zellorganellen, wie die Plasmamembran, der Golgi-Apparat, das ER, etc. sich in der Größe unterscheiden und deshalb bei Zentrifugation mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten sedimentieren.

Dazu wurden 50 ml stationäre Zellen mit 60 μ M Natriumazid abgetötet, wie in 2.9.1 beschrieben geerntet, gewaschen und in Spheroblasten überführt (in 1 ml SPM). Nach Zentrifugation bei 600 x g wurde der Überstand (800 μ l) einer erneuten Zentrifugation bei 12 000 x g (30 min, 8°C) unterzogen. Dadurch wurde die Membranfraktion von

der cytosolischen Fraktion getrennt. Letztere wurde so abgenommen (700 μ l), dass Kontaminationen durch das Pellet auszuschließen waren. Das Pellet wurde erneut mit SET-Puffer gewaschen, zentrifugiert (12 000 x g) und in 70 μ l SET-Puffer aufgenommen. Zur weiteren Analyse der cytosolischen Fraktion wurde diese einer weiteren Zentrifugation bei 100 000 x g (30 min) unterzogen. Der Überstand (S100) wurde vorsichtig ohne Pellet abgezogen, letzteres in SET-Puffer resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet (P100) wurde in 30 μ l SET-Puffer aufgenommen.

Die Zellwandfraktion wurde aus 1 ml Zellen erhalten. Diese wurden geerntet, mit Wasser gewaschen, zentrifugiert und in 100 μ l 200 mM NaOH aufgenommen. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis folgte eine kurze Zentrifugation (2000 x g), 70 μ l vom Überstand ergaben die Zellwandfraktion. Alle Fraktionen wurden mit 20 μ l 20%iger SDS-Lösung versetzt und deren Proteingehalt nach Bradford bestimmt (2.4.3). Identische Proteinmengen der verschiedenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE getrennt und mittels Western-Blot analysiert.

2.9.3 Subzelluläre Fraktionierung von *E. coli*

Um Hsp12 in lebenden *E. coli*-Zellen zu lokalisieren, wurde der Stamm HB101 mit dem Expressionsplasmid pMH2 transformiert, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 gezogen, mit 1 mM IPTG induziert und nach Expression über Nacht mit CuSO₄ (0,5 mM Endkonzentration) versetzt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (10 min) wurden die Zellen geerntet (5000 x g, 10 min, 8°C), der Überstand abgezogen und das Zellpellet dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Das Pellet wurde in 0,5 mM MgCl₂ (1/40 des Ausgangszellvolumens) gelöst und 10 min auf Eis unter sanftem Rühren inkubiert. Die Abtrennung der Spheroblasten erfolgte durch Zentrifugation, der Überstand ergab die Zellwandfraktion.

Für die cytosolische- und Membranfraktion wurden 50 ml *E. coli*-Zellen nach Hsp12-Expression über Nacht abzentrifugiert und in 1 ml 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 12% Saccharose (w/v) aufgenommen. Diese versetzte man mit 50 μ l einer 2 mg/ml Lysozymlösung (in 8 mM EDTA) und inkubierte 15 min auf Eis. Die Bildung der Spheroblasten wurde mikroskopisch überprüft. Nach Zentrifugation wurde das Spheroblastenpellet in 1 ml SET-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen, mit Glasperlen versetzt und durch Vortexen und zwischendurch Kühlen auf Eis lysiert.

Die zelluläre Fraktionierung des Lysates und Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte wie unter 2.9.2 beschrieben.

2.9.4 Isolation von Vakuolen

Um eine Assoziation von Hsp12 mit Vakuolen zu überprüfen, wurden diese aus Wildtypzellen mittels differentieller Zentrifugation und Auftrennung im Saccharosedichtegradienten isoliert.

Dazu wurden 250 ml Wildtyp-Zellen wie unter 2.9.1 beschrieben in Spheroblasten überführt, mit Hilfe eines Glaspotters lysiert und bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und mit 20%iger Saccharoselösung (siehe 2.9.1) überschichtet. Nach 30 min Zentrifugation bei 60 000 x g und 8°C wurde die obere weiße aus Vakuolen bestehende Schicht abgesammelt und mit 10%iger Saccharoselösung überschichtet. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 60 000 x g und 8°C wurde die weiße Schicht erneut gesammelt, in SET-Puffer aufgenommen, mit 1% SDS versetzt und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (siehe 2.4.3). Die Analyse erfolgte mittel SDS-PAGE und Western Blot.

2.9.5 Isolation der Plasmamembran

Zur Aufreinigung von Plasmamembranen aus Wildtyp-Hefezellen wurden 250 ml in YPD gewachsene Zellen geerntet, mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in SET-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen, wie unter 2.9.1 beschrieben mit Hilfe der Aufschlussmaschine aufgeschlossen und bei 600 x g zentrifugiert (10 min, 8°C), um verbleibende ganze Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde nun 20 min bei 20 000 x g zentrifugiert (8°C), das Pellet in 20% Glycerin mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetragen. Dieser bestand aus zwei Teilen 43%iger (w/v) Saccharose- und einem Teil 53%iger Saccharoselösung (in 20 mM Triethanolamin, pH 7,2, 5 mM EDTA). Nach 6 h Zentrifugation bei 80 000 x g wurden die gereinigten Plasmamembranen von der Grenzfläche zwischen 43%iger und 53%iger Saccharoselösung mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen. Nach Verdünnung mit 4 Volumen Wasser wurden die Membranen für 20 min bei 50 000 x g pelletiert, in SET-Puffer aufgenommen, der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (2.4.3) und die Proben mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.9.6 Isolation von Mitochondrien

Zur Aufreinigung von Mitochondrien (modifiziert nach (Meisinger et al., 2000)) wurden, wie unter 2.9.5 beschrieben, Zellen geerntet und aufgeschlossen. Diese Zellsuspension wurde zur Abtrennung ganzer Zellen und Zellkernen bei 1500 x g (5 min, 8°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min unterzogen und die Mitochondrien aus diesem Überstand bei 12 000 x g pelletiert (15 min, 8°C). Das mitochondriale Pellet wurde mit SET-Puffer gewaschen, erneut bei 12 000 x g zentrifugiert und in SET-Puffer aufgenommen. Diese mitochondriale Fraktion wurde anschließend auf einen Dreistufen-Saccharosegradienten geladen, der sich folgendermaßen zusammensetzte: 750 µl 60%, 2 ml 32%, 750 µl 23%, 750 µl 15% (w/v) Saccharose in 20 mM Triethanolamin, pH 7,2, 5 mM EDTA. Nach Zentrifugation bei 100 000 x g für 2,5 h konnten die gereinigten Mitochondrien von der 60%/32% Grenzfläche abgenommen werden. Diese wurden mit 2 Volumen SET-Puffer verdünnt, bei 10 000 x g pelletiert, in SET-Puffer aufgenommen und nach Konzentrationsbestimmung (siehe 2.4.3) mittel SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.9.7 Ermittlung des Chitingehaltes ganzer Zellen

Mit Hilfe der Morgan-Elson Methode ließ sich der Chitingehalt von Hefezellen ermitteln (LELOIR und CARDINI, 1953). Dazu wurden bis zur stationären Phase gewachsene Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen auf dieselbe Zelldichte eingestellt, abzentrifugiert (2500 x g, 10 min, RT) und mit Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abgezogen, so dass ungefähr 20 – 40 mg (Nassgewicht) Zellpellet erhalten wurden. Dieses wurde in 500 µl 6% KOH resuspendiert und für 90 min auf 80°C erhitzt. Die Proben wurden bei 20 000 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen. Nach Waschen in 1 x PBS wurde das Pellet in 100 µl SPM-Puffer (50 mM K-Phosphat, pH 7,3, 1,2 M Sorbitol) aufgenommen und mit 100 µl Lytikase (8000 U/ml), mit 1 mg/ml Chitinase oder Zymolyase versetzt und mindestens 2 h bei RT inkubiert. In diesem Schritt sollte das Chitin zu N-Acetyl-Glucosamin hydrolysiert werden. Nach Zentrifugation wurden 100 µl des Überstandes mit 100 µl NaBO₃ (0,27 M), pH 9 versetzt und 10 min auf 100°C erhitzt. Sofort nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1 ml einer frisch verdünnten DMAB-Lösung (Ehrlich's Reagenz bestehend aus 10 g p-

Dimethylaminobenzaldehyd in 12,5 ml konzentrierter HCl und 87,5 ml Eisessig, wird 1:10 mit Eisessig verdünnt) den Proben zugefügt, die anschließend 20 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Absorption wurde bei 585 nm gemessen, der ermittelte Chitingehalt für Wildtyp-Zellen wurde auf 100% festgelegt.

2.9.8 Importversuche

Für Importversuche durch synthetische Membranen wurden POPC und POPG (10 mg) im Verhältnis 3:1 wie unter 2.4.6 und 2.4.7 beschrieben miteinander gemischt und getrocknet. Das getrocknete Lipid wurde in 1 ml 40 mM Hepes pH 7,4 aufgenommen und für 1 min gevortext. Aus der Lipidsuspension wurden mittels Extrusion 400 nm große unilamellare Vesikel hergestellt (MacDonald et al., 1991). Dazu presste man die Lösung 40-mal durch einen Polycarbonatfilter mit 400 nm Porengröße eines Extruders (LiposoFast, Avestin, Mannheim,D). Die Importreaktion wurde durch Zugabe von Hsp12 zu den LUVs im Verhältnis 1:25 gestartet, nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben auf Eis abgekühlt und in mehrere Aliquots aufgeteilt. Eine Probe (je 100 µl) blieb unbehandelt, eine andere wurde mit 0,5 µl Proteinase K (13,3 mg/ml) versetzt und eine letzte wurde mit 2% SDS und Proteinase K behandelt. Zugabe der Proteinase K und Inkubation auf Eis (30 min) führte zum Abbau ungeschützter Proteine, gleichzeitige Zugabe von SDS zur Auflösung der Vesikel. Proteinase K Verdau wurde durch Proteaseinhibitoren gestoppt. Die Proben wurden wie unter 2.9.1 beschrieben gefällt und analysiert.

Für Importversuche mit ganzen Hefezellen wurden logarithmische Δ HSP12-Zellen mit doppelter Menge an Lytikase versetzt (800 U), so zumindest zum Teil innerhalb von 2 – 3 h in Spheroblasten überführt und diese erneut in SPM-Puffer aufgenommen (siehe 2.9.1). Je 100 µl Zellsuspension wurden mit 80 µg Protein versetzt, 2 h bei 30°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Ein Ansatz blieb unbehandelt, einer wurde wie oben beschrieben mit Proteinase K, ein weiterer mit SDS und Proteinase K behandelt. Die Degradation durch Proteinase K wurde mittels Proteaseinhibitoren gestoppt (siehe oben), die Ansätze wurden zentrifugiert und nach Fällung sowohl Überstand als auch Zellpellet analysiert.

2.10 Proteom- und Lipidanalyse

2.10.1 Probenvorbereitung für die 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese erlaubt die Auflösung komplexer Proteinmischungen. So kann das Proteinexpressionsmuster verschiedener Zellen analysiert und miteinander verglichen werden.

250 ml bis in die späte stationäre Wachstumsphase (mindestens 48 h) in YPD gewachsene Hefezellen wurden durch Zentrifugation (2500 x g, 10 min, RT) geerntet, mit 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 10 ml Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) aufgenommen und nach Zugabe von Proteaseinhibitoren (1:100) (Complete Protease Inhibitor Mix G Serva, Heidelberg, D) mit Hilfe der Zellaufschlussmaschine, wie unter 2.6.1 beschrieben, aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde mikroskopisch überprüft und unter Umständen wiederholt. Nun folgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 600 x g und 8°C, um ganze Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde einer erneuten Zentrifugation bei 12 000 x g und 8°C 30 min unterzogen. Dies sollte die Membranen und Zellwandbruchstücke vom löslichen Teil trennen. 1,5 ml dieses Überstandes wurde mit 500 µl 2D-Lysepuffer versetzt und 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Proteinkonzentration dieser Proben wurde mit Hilfe des 2-D Quant Kits (GE Biosciences, Freiburg, D) ermittelt.

2D-Lysepuffer	Harnstoff	21 g
	Thioharnstoff	7,6 g
	Serdolit MB-1	0,5 g
	H ₂ O	ad 48 ml
	filtrieren	
	DTT	0,5 g
	Chaps	1 g
	Pharmalyte 3 – 10	1 ml

2.10.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist eine Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) eines Proteins. Man erzeugt einen pH-Gradienten, indem man ein elektrisches Feld an ein Gel anlegt, das eine Mischung von niedermolekularen, organischen Säuren und Basen enthält, so dass sich diese

unterschiedlich verteilen. Wird eine Proteinmischung aufgetragen, wandert jedes Protein bis es den pH-Wert erreicht hat, der seinem pI entspricht. Proteine mit verschiedenen isoelektrischen Punkten werden in Folge dessen über das Gel verteilt. Dazu wurde jeweils Lyse-Puffer in Keramikscheffchen vorgelegt und so mit Probe aufgefüllt, dass 350 µg Protein geladen wurden. Ein vorgefertigter auf eine Plastikfolie polymerisierter isoelektrischer Fokussierungsgradient (Imobiline DryStrip, pH 4 – 7, 24 cm; GE Healthcare, Freiburg, D) wurde blasenfrei darüber gelegt und mit 1,6 ml Silikonöl überschichtet.

Die isoelektrische Fokussierung fand unter folgenden Bedingungen in einer IPGphor (GE Healthcare, Freiburg, D) statt:

6 – 9 h	30 V
6 – 9 h	60 V
2 h	200 V
2 h	500 V
2 h	1000 V
2 h	1000 – 8000 V
12 – 16 h	8000V

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die DryStrips entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

2.10.3 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese können Proteine mit übereinstimmender molarer Masse, aber unterschiedlichen pI-Werten oder Proteine mit gleichem pI-Wert und verschiedenen molaren Massen getrennt werden, da die Methode der isoelektrischen Fokussierung und der SDS-PAGE kombiniert werden. Die Kombination dieser beiden Methoden in zweidimensionalen Gelen erlaubt die Auflösung komplexer Proteinmischungen. Diese analytische Methode ist wesentlich empfindlicher als die isoelektrische Fokussierung oder die SDS-PAGE alleine.

Die DryStrips wurden aufgetaut und jeweils 15 min in DTT-Lösung und IAA-Lösung äquilibriert, kurz in 2D-Laufpuffer gewaschen, auf 13%ige 2D-Gele (19 x 24 cm) aufgelegt und mit 2D-Agaroselösung am SDS-PAGE Gel (Vorlauf: 1 h 100 mA) anpolymerisiert. Die Gele wurden unter folgenden Bedingungen in einer Ettan Dalt II (GE Healthcare, Freiburg, D) aufgetrennt:

Einlaufen in das Gel: 1 h bei 50 mA

Gellauf: ca. 20 h 160 – 170 mA

2D-Resolvingpuffer	Tris	18,2 g
	SDS	0,4 g
	Natriumazid	10 mg
	H ₂ O	ad 100 ml
	mit HCl pH 8,8 einstellen filtrieren und bei 4°C lagern	
2D-Äuilibrierungspuffer	Harnstoff	36 g
	Glycerin	30 g
	SDS	2 g
	2D-Resolvingpuffer	3,34 ml
	H ₂ O	ad 100 ml
DTT-Lösung	DTT	1%
	in 2D-Äuilibrierungspuffer lösen	
IAA-Lösung	Jodacetamid	4%
	in 2D-Äuilibrierungspuffer lösen	
2D-Gelpuffer	Tris	90,85 g
	SDS	2 g
	H ₂ O	ad 500 ml
	Natriumazid	50 mg
	mit HCl pH 8,6 einstellen, filtrieren	
2D-Gel (13%)	Acrylamid (30, 30,8%)	27,85 ml
	2D-Gelpuffer	14,28 ml
	Glycerin	2,86 g
	H ₂ O	12,42 ml
	TEMED (100%)	2,7 µl
	APS (10%)	0,28 ml
2D-Laufpuffer	Tris	58 g
	Glycin	299,6 g
	SDS	20 g
	H ₂ O	ad 20 l

2D-Agaroselösung	Agarose	0,5 g
	Bromphenolblau	0,25 mg
	2D-Laufpuffer	ad 100 ml

2.10.4 Coomassiefärbung von 2D-Gelen

Bei dieser Färbung wurden die Gele, nach Fixierung für mindestens 2 h in 40% Ethanol und 10% Essigsäure, in 25% Ethanol und 8% Essigsäure überführt und 30 min inkubiert. Daraufhin erfolgte die Färbung in der 2D-Coomassiefärbelösung für 1 h oder über Nacht. Zum Abschluss wurden die Gele zunächst mit Wasser, dann in 25% Ethanol und 8% Essigsäure und letztendlich in 1% Essigsäure über Nacht stehend gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte in Wasser.

2D-Coomassiefärbelösung	Serva Blau G-250	0,1%
	Serva Blau R-250	0,1%
	Ethanol	45%
	Essigsäure	10%
	Lösung wurde 1 h gerührt und über einen Faltenfilter filtriert	

2.10.5 Massenspektrometrische Proteinanalyse

Mit der Methode der Massenspektrometrie werden freie Ionen im Hochvakuum nach ihrem m/z (Masse/Ladung) Verhältnis aufgetrennt. So können Proteine eingebettet in einer Matrix aus Zimtsäure (Shevchenko et al., 1996) mittels Laserimpuls ionisiert werden, so dass sie in die Gasphase übertreten und fliegen. Dieses Verfahren nennt man Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) (Lottspeich und Zorbas H, 1998).

Massenanalysatoren funktionieren nach verschiedenen Prinzipien. Ein einfach aufgebauter Analysator ist der Flugzeitmassenanalysator (TOF= time of flight). Darin werden die fliegenden Proteine beschleunigt und im Hochvakuum über eine Messstrecke von ca. 1-3 m geschossen. Anhand der Flugzeit kann die exakte Größe der Proteine berechnet werden. Es werden Geschwindigkeiten von 10.000 m/s und mehr erreicht, trotzdem ist diese Messung äußerst genau. Üblicherweise koppelt man die Ionisierungstechnik MALDI mit einem oder auch zwei hintereinander

geschalteten Flugzeitmassenspektrometern, die man als MALDI-TOF- bzw. MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer bezeichnet.

Die Massenspektrometrie wurde für die Identifizierung von Proteinbanden in 2D-Gelen verwendet. Hierfür ist per MALDI-TOF/TOF Analyse ein Peptidfingerprint erstellt worden, über den mit Hilfe des Programms BioTools (Bruker, Bremen, D) durch eine Datenbanksuche mit Mascot (Matrix Science, London, GB) das Protein erkannt werden konnte. Falls nötig wurden auch einzelne Peptide durch MS/MS (zwei miteinander gekoppelte Massenanalytoren) sequenziert, um die Signifikanz des Datenbanksuchergebnisses zu erhöhen.

Zur Identifizierung von Proteinbanden aus SDS-Gelen mittels MALDI-TOF/TOF-Analyse wurden diese ausgestochen und folgender Reinigungsprozedur unterzogen:

- Zugabe von 100 µl Acetonitril, mischen und entfernen des Überstandes
- Zusatz von 100 µl einer Ammoniumbicarbonatlösung (100 mM)
- Entfernen des Überstandes nach 5 min Inkubationszeit
- Zugabe von 130 µl Acetonitril, 15 min Inkubation
- Zugabe von 100 µl einer Ammoniumbicarbonatlösung (100 mM)

Die wechselnde Zugabe von Acetonitril und Ammoniumbicarbonat wurde bis zur vollständigen Entfärbung der Gelstücke wiederholt.

Das Protein wurde nun in 100 µl einer 10 mM DTT-Lösung 45 min bei 56°C reduziert. Nach Abzug der reduzierenden Lösung, wurde die Probe mit 130 µl Acetonitril gewaschen. Die Methylierung der freien Thiolgruppen erfolgte nach Zugabe einer Iodacetamidlösung (55 mM) unter Lichtausschluss über 30 min. Im Anschluss an weitere Waschschriffe mit Ammoniumbicarbonatlösung und Acetonitril wurde das Protein über 3 h durch Zusatz einer 12,5 ng/ml Trypsinlösung bei 4°C verdaut und der Überstand verworfen. Nach erneuter Inkubation in der Ammoniumbicarbonatlösung wurden die gebildeten Peptide analysiert. Die MALDI-TOF/TOF Analysen wurden mit einem Ultraflex Massenspektrometer (Bruker, Bremen, D) durchgeführt.

2.10.6 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrische Lipid-analyse

Die Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen von Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Dazu wurden zunächst 150 bis 250 ml spät stationäre (mindestens 48 h) oder früh logarithmische ($OD_{600} < 1$) in YPD gewachsene Hefezellen durch Zentrifugation (2500 x g, 10 min, RT) geerntet, mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 10 ml SET-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 0,2 M Sorbit, 1 mM $MgCl_2$) aufgenommen und nach Zugabe von Proteaseinhibitoren (1:100) (Complete Protease Inhibitor Mix G Serva, Heidelberg, D) mit Hilfe der Zellaufschlussmaschine, wie unter 2.6.1 beschrieben, aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde mikroskopisch überprüft und unter Umständen wiederholt. Nun folgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 600 x g und 8°C, um ganze Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde einer erneuten Zentrifugation bei 12 000 x g und 8°C für 30 min unterzogen. Dies sollte die Membranen und Zellwandbruchstücke vom löslichen Teil trennen. Das Pellet wurde in SET-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die so gewonnene Gesamtmembranfraktion wurde in maximal 800 μ l SET-Puffer aufgenommen und der Proteingehalt nach Bradford (siehe 2.4.3) bestimmt. Die minimale Proteinkonzentration sollte 100 μ g betragen.

Die Gesamtlipidextraktion wurde am Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Regensburg von Dr. Gerhard Liebisch durchgeführt. Sie erfolgte nach einer Methode von Bligh und Dyer (BLIGH und DYER, 1959) und wurde ausschließlich in Glasgefäßen durchgeführt, um Lipidverluste weitgehend zu vermeiden. Die Gesamtmembranfraktion wurde mit 3 ml einer Mischung aus Methanol und Chloroform (2:1) aufgefüllt und gut durchmischt. Nach einer Stunde wurde durch Zugabe von je 1 ml Chloroform und Wasser die Phasentrennung herbeigeführt. Daraufhin wurde gevortext und zur Vervollständigung der Phasentrennung für 15 min bei 3000 x g zentrifugiert. Die hierbei erhaltene, untere Chloroform-Phase wurde mit einer Pasteur-Pipette möglichst exakt abgenommen und in Szintvials überführt. Aus diesen wurde sodann mit Hilfe einer Gefriertrocknungszentrifuge (Christ, Osterode) das Lösungsmittel abgezogen.

2.10.7 Lipidanalytik mittels ESI-MS/MS und Gas-Chromatographie

Bei der ESI-MS/MS Massenspektrometrie werden gelöste Moleküle in ein starkes elektrisches Feld gesprüht, was als Electrospray-Ionisierung (ESI) bezeichnet wird. Durch hohe Temperaturen wird das Lösungsmittel komplett verdampft, die ionisierten Verbindungen bleiben zurück und fliegen durch elektrische Felder geleitet in zwei miteinander gekoppelte Massenanalysatoren (MS/MS).

Für die MS-basierte Lipidanalytik wurde die mit internen Standards der jeweiligen Lipide versetzte und extrahierte Gesamtmembranfraktion in einer 10 mM Ammoniumacetat-Lösung in Methanol/Chloroform (3:1) aufgenommen. Davon wurden 20 µl mit Hilfe eines HTS PAL-Autosamplers (Zwingen, Schweiz) über eine binäre Pumpe (Agilent1100, Waldbronn) in den mit einer Elektrospray-Ionenquelle ausgestatteten Triple-Quadrupol-Massenspektrometer Quattro Ultima (Micromass, Manchester, England) injiziert. Die Elektrospray-Ionisierung erfolgte dabei im Positiv- oder Negativ-Ionen-Modus (ESI+/-)

Die Gas-Chromatographie (GC) trennt flüchtige Verbindungen eines Gemisches nach ihrer relativen Tendenz, sich in dem inerten Material, mit dem die Chromatographiesäule gepackt ist, zu lösen bzw. sich zu verflüchtigen und im Strom eines inerten Gases, wie Helium, durch die Säule zu wandern. Für die Analyse der Fettsäuren aus den extrahierten (siehe 2.10.6) Lipidproben wurden diese zunächst zum Methylester derivatisiert und mittels GC analysiert (Shimadzu GCMS-QP2010 mit Autosampler und Injektor AOC-20si; Säule: HP-5MS).

Die Vermessungen der Lipidproben wurde in Regensburg von Dr. Gerhard Liebisch in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Schmitz am Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypische Charakterisierung der HSP12-Deletionsmutante

Mittels homologer Rekombination wurde das Hitzeschockprotein (Hsp) 12 codierende Gen *YFL014W* aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm SEY6211, entfernt und durch den Selektionsmarker Tryptophan ersetzt (Haslbeck, 2001). Im Folgenden soll nun diese Deletionsmutante phänotypisch charakterisiert werden.

3.1.1 Wachstumskinetik

Mögliche Wachstumsdefekte des *HSP12*-knock-outs wurden zunächst mittels Wachstumskinetiken analysiert. Dazu wurde die Zellverdoppelung der Deletionsmutante im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen photometrisch bei 600 nm kinetisch verfolgt (Abbildung 3-1).

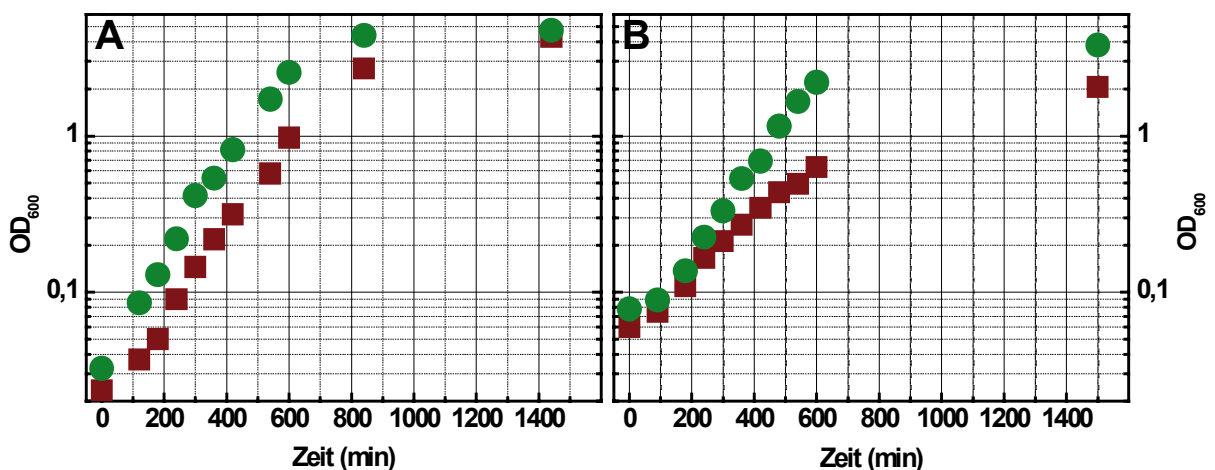


Abbildung 3-1 Wachstumskurven von $\Delta HSP12$ - (■) und Wildtyp-Zellen (●) in Vollmedium (YPD) (A) bzw. definiertem Medium (CSM) (B) bei 30°C.

Unter Standardbedingungen (Vollmedium, 30°C, schüttelnd) waren zwischen Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen kaum Unterschiede im Wachstum zu beobachten (Abbildung 3-1 (A)). So verdoppelte sich der Wildtyp einmal innerhalb von etwa 100 Minuten, während die knock-out-Zellen ca. 110 Minuten benötigten. Im Gegensatz

dazu wiesen die $\Delta HSP12$ -Zellen in definiertem CSM-Medium, bestehend aus Glukose, dem vollständigen Aminosäuremix und allen essentiellen Vitaminen und anorganischen Salzen (Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids), einen eindeutigen Wachstumsnachteil auf. Während die Verdopplungszeit des Wildtyps im Vergleich zu der in Vollmedium nahezu unverändert bei 100 Minuten blieb, benötigte die Deletionsmutante nun 150 Minuten für eine Zellteilung (Abbildung 3-1 (B)).

3.1.2 Wachstum in Abhängigkeit von der Temperatur

Ein möglicher Einfluss der *HSP12*-Deletion auf das Wachstum bei hohen Temperaturen wurde zunächst durch einen *Drop-Assay* getestet. Hierzu wurden, ausgehend von $\Delta HSP12$ - und Wildtyp-Zellsuspensionen mit einer optischen Dichte von 0,6, aufeinander folgende zehnfache Verdünnungen erstellt. Diese wurden auf Agarplatten aus Vollmedium aufgebracht, bei optimaler Wachstumstemperatur (30°C) als Kontrolle und bei entsprechend höheren Temperaturen für mindestens zwei Tage inkubiert (Abbildung 3-2).

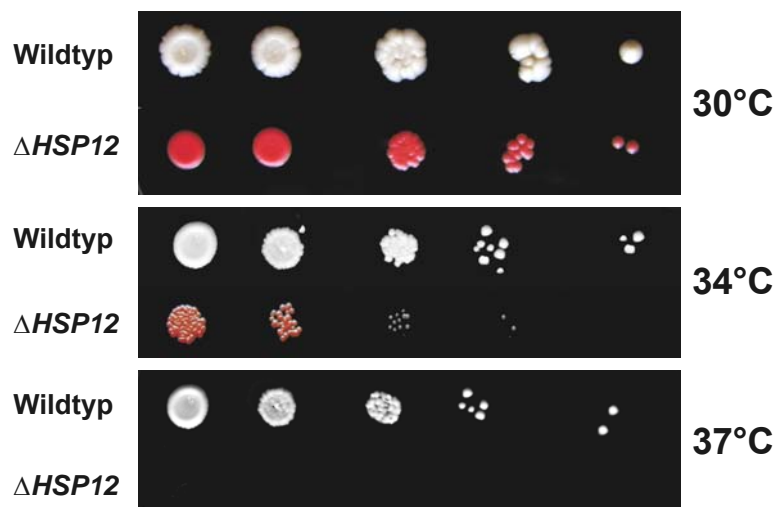


Abbildung 3-2 Drop-assays inkubiert bei hohen Wachstumstemperaturen

Über Nacht gewachsene Zellen wurden auf OD_{600} 0,6 verdünnt, 3 μ l aufeinander folgender zehnfacher Verdünnungen auf YPD-Agarplatten von links nach rechts aufgebracht und bei entsprechenden Temperaturen ca. 48 Stunden inkubiert. Im jeweils oberen Bildabschnitt sind die Zellsuspensionen des Wildtypes, im unteren des $\Delta HSP12$ aufgetragen worden.

Unabhängig von der Inkubationstemperatur wiesen die Kolonien der $\Delta HSP12$ - Zellen eine rote Färbung auf, die sowohl bei Verwendung von Vollmedium, definiertem Medium als auch bei Zellen aus Flüssigkulturen beobachtet werden konnte. Mit

Erhöhung der Inkubationsdauer intensiviert sich die Färbung, welche bei den entsprechenden Wildtyp-Zellen nie in Erscheinung trat. Diese Rotfärbung ist auf eine Mutation die Adenin-Biosynthese betreffend zurückzuführen, die im genetischen Hintergrund von SEY6211 (*ade2-101*) manifestiert ist. Die Mutation im *ADE2* Gen führt zur Anhäufungen eines nicht verwertbaren Stoffwechselintermediates – das Phosphoribosylaminoimidazol (AIR) (Fisher, 1969). Diese Verbindung, die sich normalerweise ausschließlich bei Wachstum auf Medium ohne Adenin anhäuft, wird mit bestimmten Aminosäuren komplexiert, in die Vakuole transportiert und nimmt unter oxidativer Kondensation und Polymerisation eine rote Färbung an (Smirnov et al., 1967). Bei Wachstum auf Vollmedium wird die Adenin-Biosynthese reprimiert, weshalb die Zellen normalerweise weiß erscheinen.

Bei der Standardwachstumstemperatur von 30°C ließen sich keine Unterschiede zwischen Deletionsmutante und Sey6211 ausmachen. Wurden die Platten bei 34°C inkubiert, waren eindeutige Wachstumsnachteile der *HSP12*-Deletionsmutante im Vergleich zu dem Wildtyp Stamm zu erkennen. Die Überlebensrate bei höheren Verdünnungen war deutlich herabgesetzt. Bei 37°C konnte kein Wachstum des knock-outs festgestellt werden, auch nicht nach längerer Inkubation, während die Wildtypzellen kaum eine Beeinträchtigung aufwiesen.

Mit Hilfe eines Temperaturgradienten sollte die genaue maximale Wachstumstemperatur ermittelt werden. Dazu wurde eine große Glaspetrischale befüllt mit YPD-Agar auf dem Temperaturgradientenblock der TGGE MAXI 2 so platziert, dass ein Bereich von 33°C bis 40°C abgedeckt war. Sowohl $\Delta HSP12$ -, Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen mit *HSP12* exprimierenden Plasmid als auch Deletionsmutanten weiterer Hitzeschockproteine aus *S. cerevisiae* als Vergleich wurden auf der Platte ausgestrichen. Nach zwei Tagen Inkubation konnte das Wachstum entlang des Temperaturgradienten abgelesen werden (Abbildung 3-3).

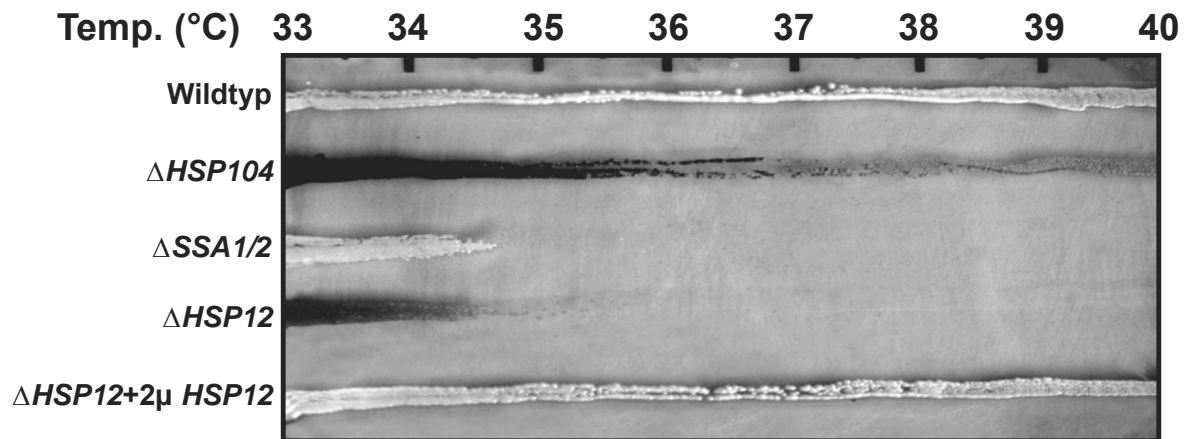


Abbildung 3-3 Wachstum auf YPD-Agar entlang eines Temperaturgradienten von 33°C bis 40°C nach zwei Tagen Inkubation

$\Delta HSP104$: bei 30°C über Nacht gewachsene Zellen wurden vor dem Ausstreichen eine Stunde bei 37°C inkubiert; leichte Wachstumsdefizite ab ca. 36°C; maximale Wachstumstemperatur von $\Delta SSA1/SSA2$ Zellen: ca. 34,5°C; maximale Wachstumstemperatur von $\Delta HSP12$ -Zellen: ca. 34,5°C; $\Delta HSP12 + 2\mu HSP12$: *HSP12*-Deletionsmutante mit 2 μ -Plasmid, *Hsp12*-Expression unter Kontrolle des natürlichen Promotors;

Die *HSP12*-Deletionsmutante zeigte verglichen mit den Wildtypzellen eine deutliche Temperatursensitivität. Die maximale Wachstumstemperatur war bei etwa 34,5°C erreicht. Ein ähnlicher Temperaturbereich konnte von der temperatursensitiven *SSA1/SSA2* Doppelmutante erreicht werden, aus der zwei Vertreter der *Hsp70* Familie entfernt wurden. Die Deletion eines weiteren wichtigen Hitzeschockproteins der *Hsp100* Familie aus *S. cerevisiae* führte vergleichsweise zu einer geringeren Temperatursensitivität. Hefezellen, die *Hsp104* exprimieren, weisen eine 1000 fach höhere Überlebensfähigkeit nach extremen Stress auf als entsprechende Deletionsmutanten (Sanchez und Lindquist, 1990). Dementsprechend konnte bei $\Delta HSP104$ -Zellen, die eine Stunde lang 37°C ausgesetzt waren, ab etwa 36°C ein leicht vermindertes Wachstum beobachtet werden.

Die erhöhte Temperatursensitivität des *HSP12*-knock-outs konnte durch Expression des Hitzeschockproteins von einem 2 μ -Plasmid, das den natürlichen Promoter von *HSP12* enthielt, ausgeglichen werden. Wie der Wildtyp wies dieser Stamm über den gesamten Temperaturbereich keinerlei Wachstumsdefizite auf, die durch den Verlust von *HSP12* entstandene Thermosensitivität konnte vollständig rückgängig gemacht werden. Darüber hinaus war keine Rotfärbung dieser Zellen mehr festzustellen, dementsprechend ist auch dieser Effekt lediglich dem Verlust von *HSP12* zuzuschreiben.

Temperaturen unterhalb der optimalen Bedingungen hatten entgegengesetzte Effekte auf das Wachstum der Zellen (Abbildung 3-4).

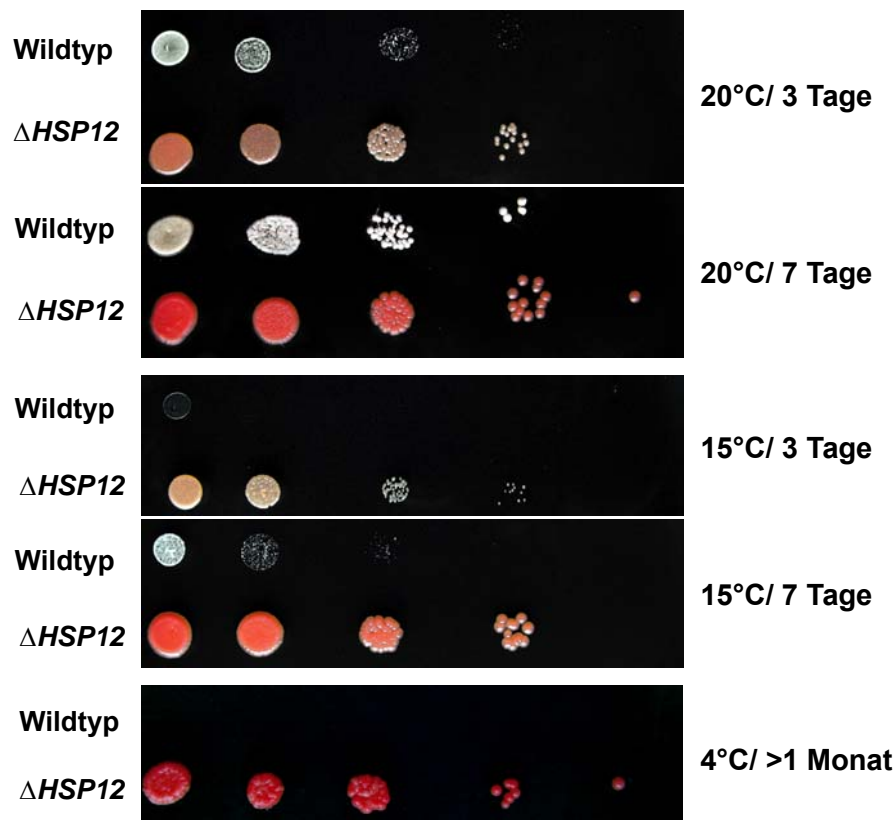


Abbildung 3-4 Drop-assays inkubiert bei niedrigen Wachstumstemperaturen

Über Nacht gewachsene Zellen wurden auf OD_{600} 0,6 verdünnt, 3 μ l aufeinander folgender zehnfacher Verdünnungen auf YPD-Agarplatten von links nach rechts aufgebracht und bei entsprechenden Temperaturen für die angegebene Zeit inkubiert. Im jeweils oberen Bildabschnitt sind die Zellsuspensionen des Wildtypes, im unteren der $\Delta HSP12$ -Zellen aufgetragen worden.

Bei diesen Experimenten wies der Wildtyp verglichen mit der *HSP12*-Deletionsmutante einen Wachstumsnachteil auf. Bei 20°C war eine Wachstumsverzögerung zu beobachten. So waren bei dem Wildtyp nach drei Tagen Inkubation weniger Kolonien aus entsprechenden Verdünnungsstufen sichtbar angewachsen als bei der Mutante. Nach weiteren vier Tagen Wachstum konnte eine Vergrößerung dieser Kolonien festgestellt werden. Bei 15°C war dieser Effekt noch ausgeprägter. Selbst nach sieben Tagen waren deutlich weniger Kolonien aus den SEY6211 als aus entsprechenden $\Delta HSP12$ -Suspensionen angewachsen. Die Kolonien des knock-outs waren hingegen bereits nach drei Tagen sichtbar und vergrößerten sich während der weiteren Inkubation. Bei 4°C konnte selbst nach über einen Monat Inkubation kein Wachstum der Wildtyp-Zellen festgestellt werden, während die knock-out-Zellen aus jeder Verdünnungsstufe Kolonien bildeten.

3.1.3 Rasterelektronenmikroskopie

Von morphologischen Veränderungen der $\Delta HSP12$ -Zellen wurde bereits berichtet (Haslbeck, 2001). Zur näheren Untersuchung der Oberflächenbeschaffenheit der Zellen wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) herangezogen. Dazu erntete man zunächst bei 30°C gewachsene Wildtyp- und $HSP12$ -knock-out-Zellen zum Zeitpunkt hoher $HSP12$ -Expression - in der sehr späten stationären Phase - und präparierte sie für vergleichende Analysen für die Elektronenmikroskopie (siehe 2.8.3) (Abbildung 3-5).

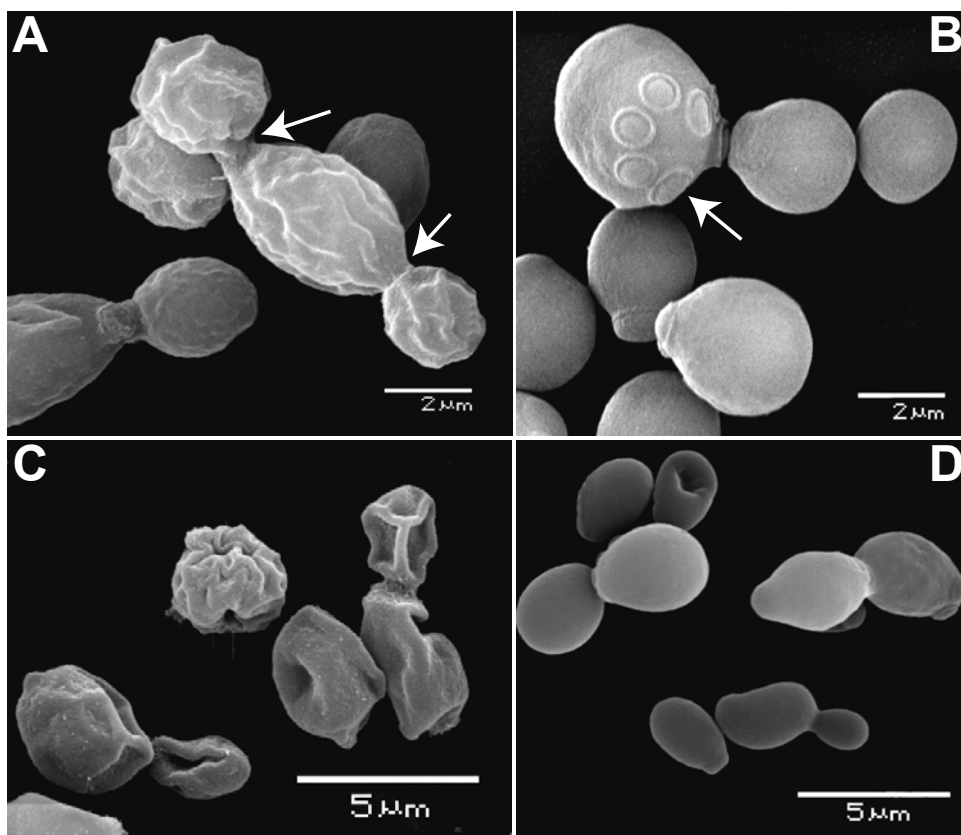


Abbildung 3-5 REM-Aufnahmen von $\Delta HSP12$ - (A, C) und Wildtyp-Zellen (B, D)

Zellen wurden nach mindestens 48 Stunden Inkubation in Flüssigmedium (schüttelnd) bei 30°C (A und B) bzw. nach Wachstum und anschließender siebenwöchiger Lagerung bei 4°C (C und D) fixiert, entsprechend präpariert (siehe 2.8.3) und mikroskopiert.

Die Abbildung 3-5 zeigt deutlich, dass die Architektur und Integrität der Zellhülle durch den Mangel an Hsp12 in Mitleidenschaft gezogen wird. Die Zellen fallen nach der Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie in sich zusammen, sie schrumpfen regelrecht und weisen deutliche Unregelmäßigkeiten bzw. Einbuchtungen auf. Dieser Effekt wird nach mehrwöchiger Lagerung bei 4°C noch verstärkt, wahrscheinlich weil $\Delta HSP12$ -Zellen unter diesen Bedingungen weiter

wachsen können (Abbildung 3-5 C). Stabilität und Widerstandsfähigkeit der Zellen war ohne Hsp12 nicht mehr gegeben. Die für die Bäckerhefe typische ovale Gestalt konnte nun nicht mehr aufrechterhalten werden; die Zellen schienen sogar einen Volumenverlust erlitten zu haben. Erneute Anzuchten aus länger gelagerten Kulturen gelangen im Vergleich zum Wildtyp nur schwer, oft überhaupt nicht. Im Vergleich dazu wird die Integrität der Wildtyp-Zellhülle durch lange Lagerung bei 4°C kaum beeinträchtigt (Abbildung 3-5 D). Diese Zellen wiesen nach sieben Wochen lediglich leichte Deformierungen auf und ließen sich problemlos erneut kultivieren.

Darüber hinaus lässt der $\Delta HSP12$ -Stamm Knospungsdefekte erkennen (Abbildung 3-5, A, weiße Pfeile und Abbildung 3-6). Einige Tochterzellen konnten sich zum einen nicht ablösen, da mehrere mit einer Mutterzelle verbunden bleiben. Zum anderen verlief die Knospung zum Teil bipolar statt in der für haploide *S. cerevisiae* Stämme typischen axialen Art und Weise (Walker, 1999). Die axiale Knospung ist an den nahe beieinander liegenden Knospungsnarben des Wildtypes (Abbildung 3-5 B, Pfeil) deutlich zu erkennen. Eine weitere phänotypische Auffälligkeit stellen die teilweise elongierten und im Allgemeinen leicht vergrößerten $\Delta HSP12$ -Zellen dar (Abbildung 3-5 A, bipolar knospende Mutterzelle und Zelle in der linken unteren Ecke) im Gegensatz zu den runden bis ovalen Wildtyp-Zellen.

Bei näherer Betrachtung (Abbildung 3-6) fällt die unregelmäßige und schuppige Oberfläche der Deletionsmutanten im Vergleich zu der der glatten Wildtyp-Zellen auf. Die Zellen lieferten eher ein granuläres Erscheinungsbild, wobei auch längere Schlieren vor allem in der Nähe der Knospungsstellen zu sehen waren (Pfeile).

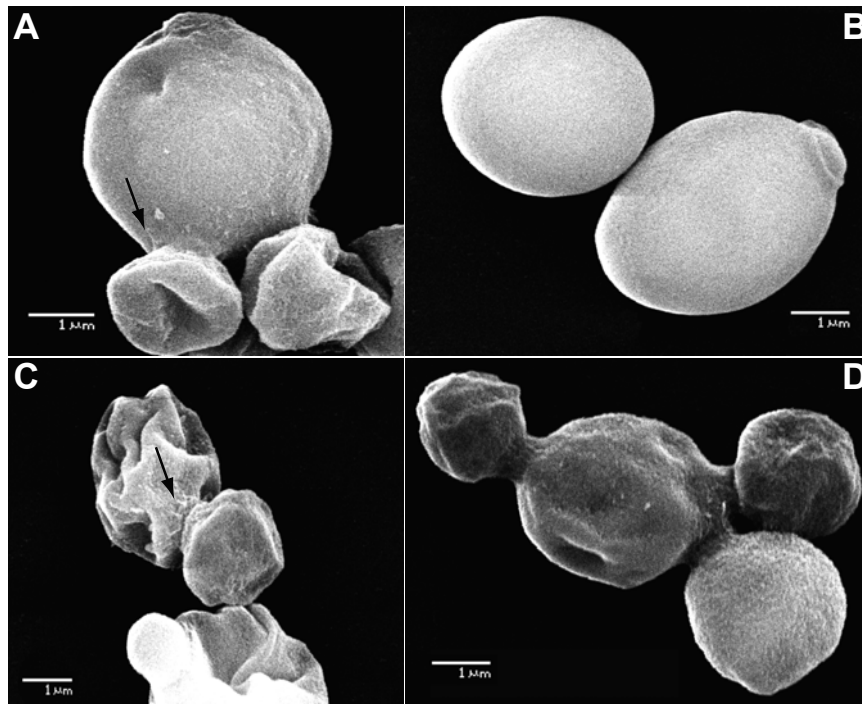


Abbildung 3-6 REM-Aufnahmen von stationären Δ Hsp12- (A, C, D) und Wildtyp-Zellen (B)

Pfeile kennzeichnen starke Unregelmäßigkeiten in der Nähe der Knospungsstelle. Zellen wurden nach mindestens 48 Stunden Inkubation in Flüssigmedium (schüttelnd) bei 30°C fixiert, entsprechend präpariert und mikroskopiert.

Sämtliche durch die Rasterelektronenmikroskopie sichtbar gemachten Zelldefekte konnten durch das Einbringen eines 2 μ -Plasmides mit der genetischen Information des Hsp12 unter Kontrolle des natürlichen Promotors von *HSP12* ausgeglichen werden (Abbildung 3-7 (A)).

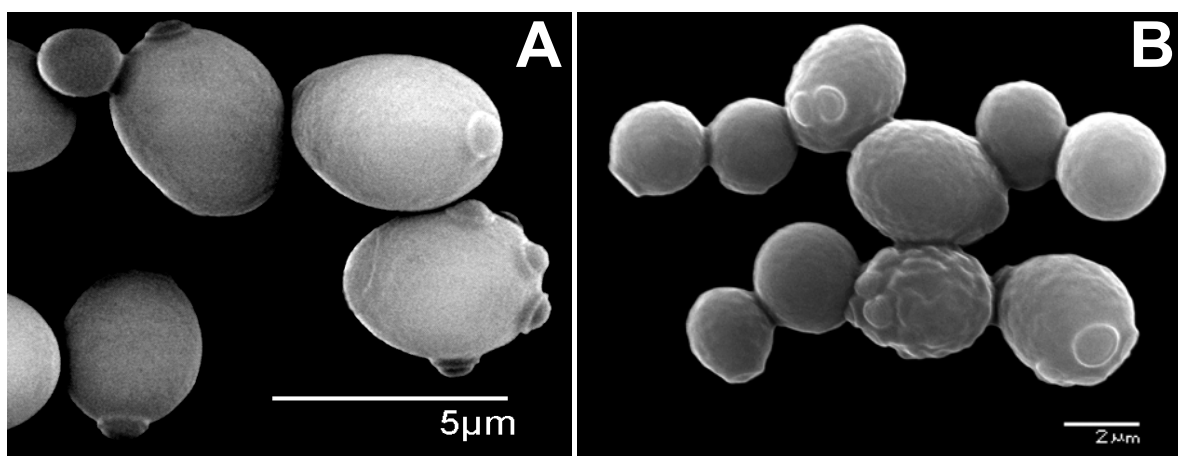


Abbildung 3-7 REM Aufnahme stationärer Δ HSP12-2 μ pHSP12- (A) und SEY6211-2 μ GPDHSP12-Zellen (B)

Zellen wurden nach mindestens 48 Stunden Inkubation in Flüssigmedium (schüttelnd) bei 30°C fixiert, entsprechend präpariert und mikroskopiert.

Weder eine fehlerhafte Knospung noch Beschädigungen der äußeren Zellhüllorganisation wurden bei diesem Stamm beobachtet. Dementsprechend können sämtliche beobachteten Beeinträchtigungen der äußeren Zellhülle des $\Delta HSP12$ -Stammes auf den Verlust von Hsp12 zurückgeführt werden.

Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von Hsp12 unter der Kontrolle eines konstitutiven GPD Promotors in Wildtyp Hefezellen zu Zellanomalien (Abbildung 3-7 (B)). Sowohl Unregelmäßigkeiten der Zelloberfläche in Form von Einbuchtungen als auch massive Teilungsdefekte wurden sichtbar. Die Zellknospung schien derart beeinträchtigt, dass mehrere Zellen kettenartig aneinander haften blieben.

Der Verlust von Hsp12 schien durch Inkubation bei tieferen Temperaturen hingegen geringere Auswirkungen auf die Zelloberfläche zu haben. In Abbildung 3-8 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hefezellen zu sehen, die unterschiedlich lange bei etwa 16,5°C inkubiert wurden.

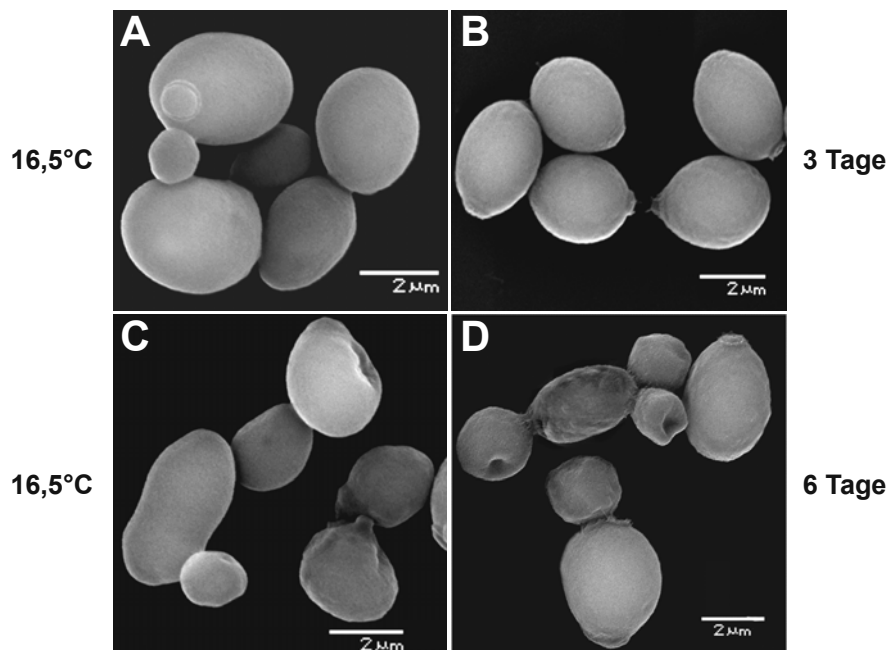


Abbildung 3-8 REM-Aufnahmen von Wildtyp (A, C) und $\Delta HSP12$ -Zellen (B, D)
Die Zellen wurden bei 16,5°C für drei (A, B) bzw. sechs Tage (C, D) inkubiert.

Sogar nach dreitägigem Wachstum wiesen die $\Delta HSP12$ -Zellen eine glatte Oberfläche auf und waren kaum von Wildtyp-Zellen zu unterscheiden, obwohl sie eine optische Dichte von etwa 2,5 erreicht hatten. Nach weiterer Inkubation konnten sehr hohe Zelldichten erzielt (bis zu OD_{600} 7,3) und einige Deletionsmutanten mit leicht unregelmäßiger Oberfläche beobachtet werden (Abbildung 3-8 (D)). Die

Zellhülle des Sey6211 schien durch die niedrigen Temperaturen und lange Inkubationsdauer ebenfalls zum Teil in Mitleidenschaft gezogen, da sowohl unregelmäßige Oberflächen als auch deformierte Zellen zu sehen waren (Abbildung 3-8 (C)). Bei näherer Betrachtung derartig gezogener Zellen (Abbildung 3-9) fiel im Vergleich zu bei Standard Bedingungen kultivierten $\Delta HSP12$ -Zellen (Abbildung 3-6) eine weniger beeinträchtigte Zelloberfläche auf.

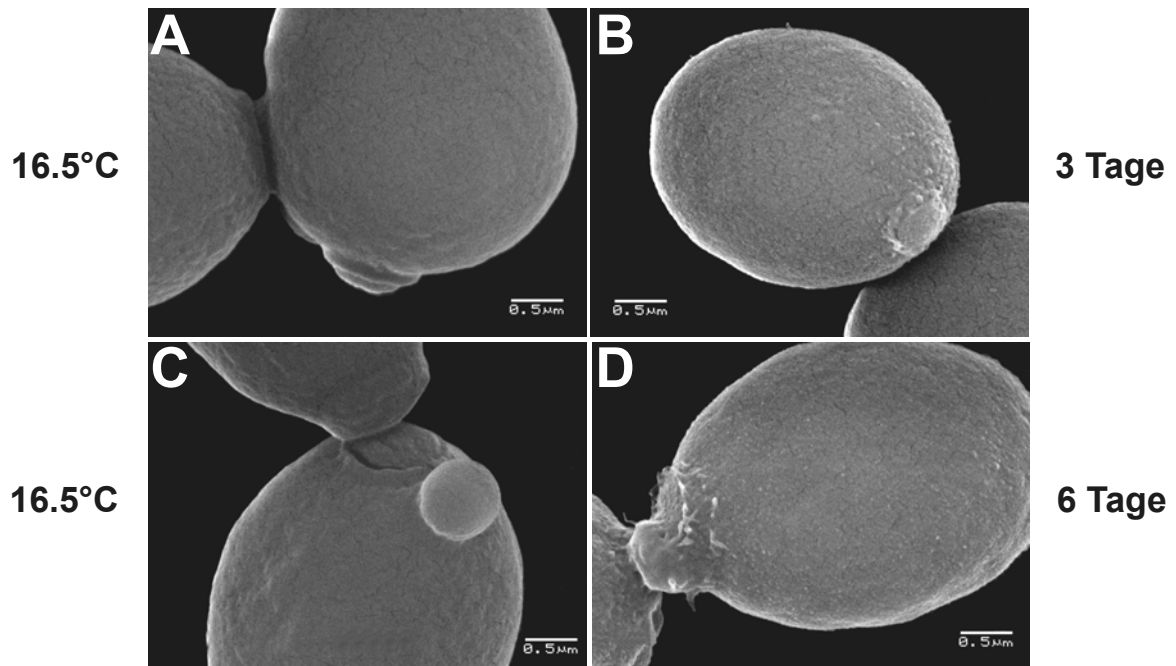


Abbildung 3-9 REM-Aufnahmen von Wildtyp (A, C) und $\Delta HSP12$ -Zellen (B, D)
Die Zellen wurden bei 16,5°C für drei Tage (A, B) bzw. sechs Tage (C, D) inkubiert.

Die Zellen wiesen selbst nach sechs Tagen Inkubation eine bedeutend glattere Zelloberfläche auf, ähnlich der des Wildtypes. Nur in der Nähe der Knospungsnarben waren eine granuläre Beschaffenheit der Zelloberfläche und schlierenartige Strukturen augenfällig, die beim Wildtyp nicht auszumachen waren (siehe Abbildung 3-9, D).

3.1.4 Zellwandanalyse mittels Calcofluor white (CFW)

Zur näheren Untersuchung der Beschaffenheit der Zellwand wurde Calcofluor White M2R (CFW) herangezogen. Bei CFW handelt es sich um einen negativ geladenen Fluoreszenzfarbstoff, der mit vielen β -verzweigten Polysacchariden interagieren kann (Pringle et al., 1989). Vorzugsweise bindet CFW durch Wasserstoffbrücken und Dipolinteraktionen an wachsende Chitinketten und in geringerem Ausmaß an Glukane (Elorza et al., 1983; Murgui et al., 1985; Ram et al., 1994). Durch Fluoreszenzmikroskopie kann somit vor allem die Lokalisation des Chitins sichtbar gemacht werden, das hauptsächlich während der Knospung bei der Bildung des Septums und des Knospungsringes in die Zellwand und weniger in laterale Zellwände eingelagert wird (Shaw et al., 1991).

In der Aufsicht in Abbildung 3-10 (A, Pfeile) ist die typische ringförmige Anhäufung des Chitins in den nahe beieinander liegenden Knospungsnarben stationärer Wildtyp-Zellen zu sehen, während in der Seitenansicht (Abbildung 3-10 B, Pfeile) die Knospen als intensivere Färbung in Erscheinung treten.

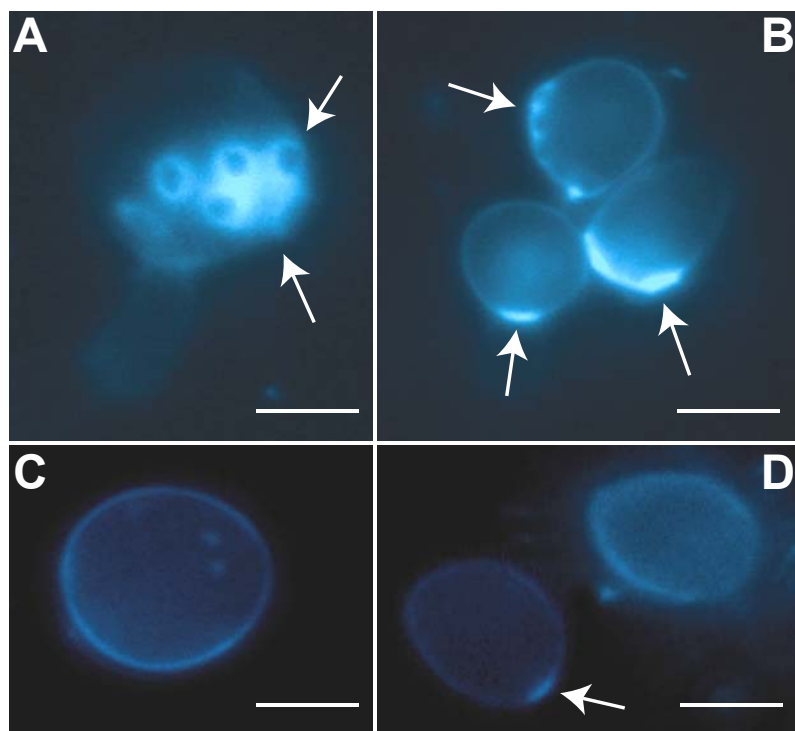


Abbildung 3-10 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit Calcofluor White gefärbten Wildtyp- (A und B) und Δ Hsp12-Zellen (C und D)

Die Zellen wurden mindestens 48 Stunden bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Pfeile kennzeichnen stark angefarbte Chitininringe innerhalb der Knospungsnarbe. Maßstab: 2 μ m

Darüber hinaus sind die Zellen von einem leichten Fluoreszenzsignal umgeben, was der Anfärbung der dünnen lateralen Chitinschicht oder einer Anfärbung des Glukans entsprechen dürfte. Bei den ebenfalls stationären *HSP12*-Deletionsmutanten (Abbildung 3-10 C und D) hingegen lassen sich in eventueller Ermangelung des Chitins kaum Knospungsnarben anfärben (Abbildung 3-10 (D) Pfeil), nur eine dünne, die Zellen umgebende Schicht ist zu beobachten. Der Chitingehalt scheint im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen stark herabgesetzt zu sein.

3.1.5 Kolorimetrische Ermittlung des Chitingehaltes

Eine mögliche Korrelation zwischen den durch die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemachten Auswirkungen des *HSP12*-Verlustes auf die Chitinverteilung und den Chitingehalt der Zellen sollte mit Hilfe der Morgan-Elson Methode analysiert werden (LELOIR und CARDINI, 1953). Dazu wurde mittels Lauge das Chitinpolymer aus ganzen Zellen herausgelöst, dieses mit Chitinasen in den Einzelbaustein N-Acetylglucosamin zerlegt und mit Hilfe des Ehrlich's Reagenz angefärbt. Die Ermittlung des Chitingehalts erfolgte photometrisch bei 585 nm und wurde für Wildtyp-Zellen auf 100% festgelegt. Die Verwendung verschiedener Chitinasen (Lytikase, Chitinase, Zymolyase) lieferten für $\Delta HSP12$ -Zellen einen Durchschnittswert von 50,14% ($\pm 15,31$). Es handelt sich dabei um eine Mittelung von sieben Messungen mit jeweils drei Ansätzen pro Kultur. Diese deutliche Abnahme des Chitinanteils des *HSP12*-knock-outs im Vergleich zu Wildtyp-Zellen bestätigt die bei der Fluoreszenzmikroskopie gemachten Beobachtungen.

3.1.6 Überprüfung der Zellwandstabilität

Die Stabilität der Zellwand ließ sich durch folgenden Versuchsaufbau überprüfen. Stationäre, bei 30°C über Nacht gewachsene Zellen wurden mit der Endoglukanase Lytikase behandelt, was zur Hydrolyse des β -1,3-Glukan führte. Die dadurch entstandenen Spheroblasten – zellwandlose Zellen – wurden durch Sorbit osmotisch stabilisiert, somit vor dem Platzen bewahrt und konnten mikroskopisch untersucht werden. Die lichtmikroskopischen Phasenkontrastaufnahmen in Abbildung 3-11 zeigen deutlich, dass Wildtyp-Zellen im Vergleich zu $\Delta HSP12$ -Zellen eine für Spheroblasten typische herabgesetzte Lichtbrechung aufwiesen und dunkler erschienen. Teilweise schienen sie sogar zu lysieren (Abbildung 3-11 (A), Pfeil). Dies

ist auf einen Abbau der Zellwand und damit eine Konvertierung zu Spheroplasten zurückzuführen. Die Zellwand der Deletionsmutante schien hingegen von dem Angriff der Endoglukanase unbeeinträchtigt zu sein. Die Zellen waren nicht von unbehandelten zu unterscheiden, was an dem stark lichtbrechenden, hellen Kranz um die Zellen zu erkennen ist (Abbildung 3-11, B).

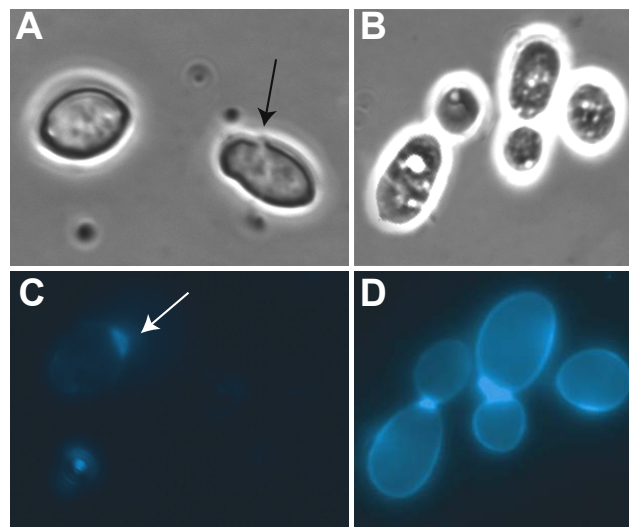


Abbildung 3-11 Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit Lytikase behandelten Zellen

Phasenkontrastaufnahmen von Wildtyp-Zellen (**A**; Pfeil: lysierte Zelle mit aufgerissener Zellhülle) und $\Delta HSP12$ -Zellen (**B**) nach einer Stunde Inkubation mit Lytikase (400 U) in SPM-Puffer (2.9.1). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit CFW gefärbten Wildtyp-Zellen (**C**; Pfeil: durch CFW angefärbte Knospungsnarbe) und $\Delta HSP12$ -Zellen (**D**) nach einer Stunde Inkubation mit Lytikase.

Eine Anfärbung durch CFW und anschließende Fluoreszenzmikroskopie lieferte ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 3-11, C und D). Die mit Lytikase behandelten Wildtyp-Zellen fluoreszierten deutlich schwächer als unbehandelte Zellen (vgl. Abbildung 3-10), lediglich an der Knospungsnarbe konnte deutlich abgeschwächt Chitin nachgewiesen werden (Pfeil in Abbildung 3-11). Durch die Hydrolyse des Glukans schien der Großteil des lateralen zum Teil durch glykosidische Bindung mit dem Glukan verknüpften Chitins (Shaw et al., 1991) ebenfalls entfernt zu werden. Die $\Delta HSP12$ -Zellen hingegen wiesen keinerlei Unterschiede zu unbehandelten Zellen auf, waren gegen den Lytikase Angriff resistent, selbst nach noch längerer Inkubationszeit.

3.2 Lokalisation von Hsp12 in lebenden Zellen

Mikroskopische Analysen zeigten eindeutig, dass die Organisation der Zellhülle durch die Abwesenheit von Hsp12 stark beeinflusst wird. Ob dieser Effekt im direkten oder indirekten Zusammenhang mit der Deletion steht, sollte über die *in vivo* Lokalisation von Hsp12 analysiert werden.

3.2.1 Subzelluläre Fraktionierung im Saccharosedichtegradienten

Die Auftrennung von Zell-Lysat mittels eines Saccharosedichtegradienten wurde gewählt, um die Verteilung von Hsp12 und eine eventuelle Zuordnung zu einem speziellen Kompartiment innerhalb der Zelle sichtbar zu machen. Dazu konvertierte man stationäre Wildtyp-Zellen zunächst in zellwandlose Spheroplasten, öffnete sie mechanisch mit Hilfe eines Glaspotters und lud das Zell-Lysat auf einen Saccharose/EDTA-Stufengradienten (siehe 2.9.1). Nach Ultrazentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen über SDS-PAGE getrennt und mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern gegen Hsp12 und einige Markerproteine aus verschiedenen Zellorganellen analysiert. Dabei diente die Plasmamembran ATPase Pma1 als charakteristischer Vertreter eines Proteins der Plasmamembran, Porin als Protein der äußeren Membran als Marker für Mitochondrien, das endosomale Membranprotein Emp24 als Marker für das Endoplasmatische Retikulum und das Membranprotein Vam3 als Vertreter der Vakuole. Die Marker für die verschiedenen Zellkompartimente wurden aus der Proteindatenbank Swiss-Prot ermittelt (www.expasy.org/sprot). Ein derartiger Western Blot ist in Abbildung 3-12 gezeigt.

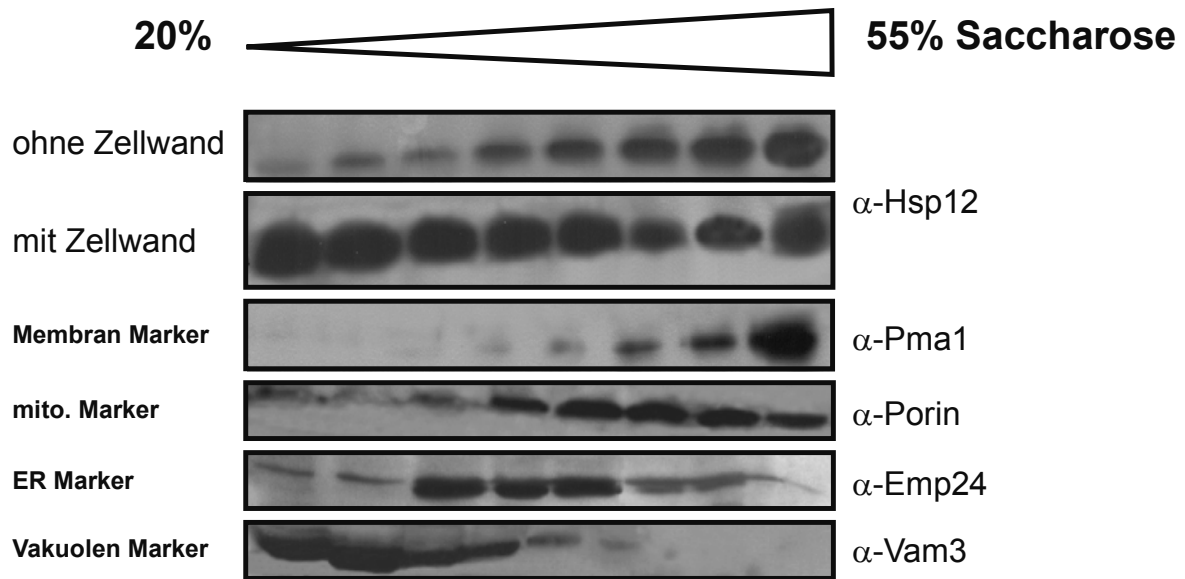


Abbildung 3-12 Subzelluläre Fraktionierung mittels eines Saccharose/EDTA Stufengradienten
 Lysat aus Speroblasten (ohne Zellwand) oder aus ganzen Wildtyp-Zellen (mit Zellwand) wurde auf einem Saccharose/EDTA-Stufengradienten aufgetrennt, die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE getrennt und durch Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Hsp12 und verschiedenen Markerproteine aus Zellorganellen analysiert. (Plasmamembranmarker: Pma1; mitochondrialer Marker: Porin; ER Marker: Emp24; Vakuolen Marker: Vam3).

Hsp12 im Zell-Lysat aus zellwandlosen Zellen ist nach Auftrennung durch einen Saccharosedichtegradienten asymmetrisch entlang der von links nach rechts ansteigenden Konzentrationen des Gradienten verteilt (Abbildung 3-12; oberes Feld). Während bei niedrigen Saccharosekonzentrationen, charakterisiert durch den Vakuolen Marker, ein relativ schwaches Signal im Western Blot detektierbar ist, nimmt dessen Intensität zu höherer Dichte hin zu. Vergleiche mit den Markerproteinen deuteten vor allem auf eine Kolo-kalisation mit Mitochondrien (Porin) und im ausgeprägteren Maß, da die Bande bei 55% Saccharose jeweils am markantesten erscheint, mit der Plasmamembran (Pma1) hin. Darüber hinaus konnte zumindest eine geringe Assoziation mit Teilen des Endoplasmatischen Retikulums (Emp24) nicht ausgeschlossen werden. Unter Verwendung von Lysat ganzer, also zellwandhaltiger Zellen veränderte sich die Verteilung von Hsp12 signifikant. Nun war das Hitzeschockprotein in ausnahmslos jeder Fraktion nachweisbar (Abbildung 3-12; zweites Feld), wobei die stärksten Signale in Fraktionen geringer Konzentration zu beobachten waren. In diesem Bereich des Zuckergradienten sind lösliche Proteine und Organellen geringer Dichte zu erwarten, veranschaulicht durch das kofraktionierende Western Blot Signal für Vam3 als Vertreter für die Vakuole. Die Verteilung der benutzten Markerproteine steht nicht in Abhängigkeit des verwendeten Lysates (zellwandhaltig oder zellwandlos; Daten nicht gezeigt). Die deutliche

Zunahme von Hsp12 bei geringer Zuckerdichte bezog sich also ausschließlich auf die Verwendung von zellwandhaltigem Lysat, das wohl zusätzlich angereichert an verankerten Zellwandproteinen und löslichen Proteinen aus dem periplasmatischen Raum war. Im Vergleich zu dem aufgetrennten, zellwandlosen Lysat ließ sich Hsp12 entlang des Gradienten verstärkt detektieren, mit Ausnahme der letzten drei Fraktionen höherer Zuckerkonzentration. Dies könnte daran liegen, dass ein möglicher großer, löslicher periplasmatischer Anteil unspezifisch an anderen Organellen haften blieb und sich dadurch über den Gradienten verteilte.

3.2.2 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation

Da die Auftrennung von Zell-Lysat mittels eines Saccharosedichtegradienten keine eindeutige Zuordnung von Hsp12 zu einem bestimmten Zellkompartiment ergab, wurde eine weitere Methode der subzellulären Fraktionierung verwendet. Wie unter 2.9.2 beschrieben wurden wiederum Wildtyp-Zellen aus der späten stationären Phase geerntet und in drei verschiedenartig definierte Fraktionen aufgetrennt. Eine kurze Behandlung intakter Zellen mit Natronlauge trennt alkalilösliche Zellwandproteine (Mrsa et al., 1999) und möglicherweise einen Teil des Glukans heraus (Fleet und Manners, 1976; Fleet, 1991). Dabei wird die Zellwand derart perforiert, dass lösliche Proteine des Periplasmas ebenfalls in dieser Zellwandfraktion enthalten sein dürften. Verdau bestimmter Zellwandpolymere durch Lytikase konvertierte die Zellen in Spheroplasten, die mechanisch aufgeschlossen und durch differentielle Zentrifugation in eine Membran- und eine cytosolische Fraktion separiert wurden. Die Membranfraktion sollte reich an Plasmamembranen, aber auch an einigen größeren Organellen wie Endoplasmatischem Retikulum, Zellkern, Mitochondrien, und spätem Golgi sein. Die cytosolische Fraktion dürfte hauptsächlich durch lösliche Proteine, kleinere Organellen, wie Golgi, Endosomen, Lysosomen und Vesikel und Organellen geringer Dichte wie Vakuolen charakterisiert sein. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden gleiche Proteinmengen der einzelnen Fraktionen über SDS-PAGE getrennt und deren Zusammensetzung mittels Western Blot analysiert. Dafür wurden einerseits der Antikörper gegen Hsp12, andererseits Antikörper gegen Proteine der Zellwand (Cts1p; eine Chitinase), der Plasmamembran (Pma1) und des Cytosols (Aktin, HXK1; Hexokinase 1) als Kontrollen eingesetzt. Abbildung 3-13 zeigt die Verteilung von Hsp12 und ausgewählter Markerproteine in stationären Wildtypzellen.

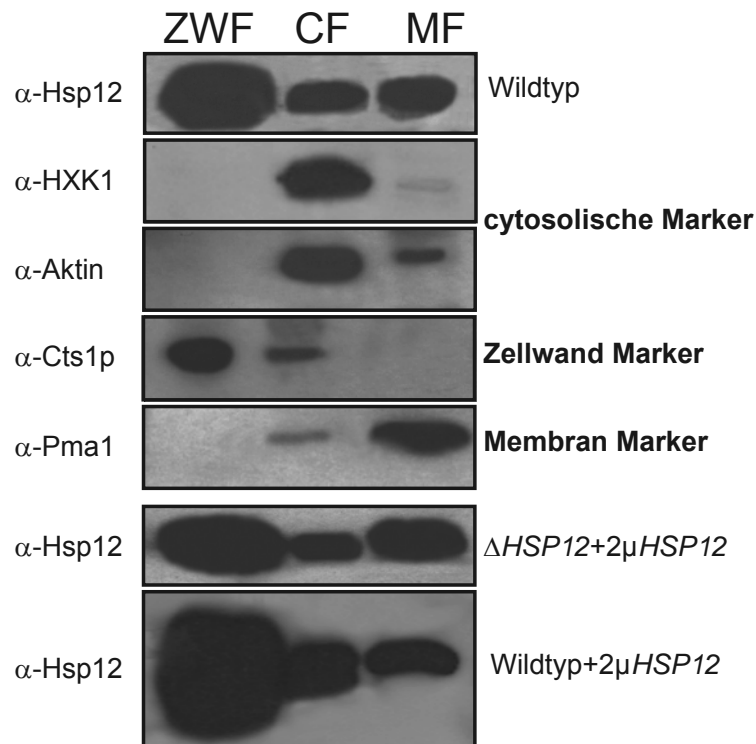


Abbildung 3-13 Western Blots der Zellfraktionierungen von Wildtyp-Zellen bzw. $\Delta HSP12+2\mu HSP12$ - und Hsp12-überexprimierender Wildtyp-Zellen (untere Felder)

Die Verteilung von Hsp12 in den verschiedenen Fraktionen (ZWF: Zellwandfraktion; CF: cytosolische Fraktion; MF: Membranfraktion) wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot ermittelt unter Benutzung spezifischer Antikörper (α). (cytosolische Marker: Aktin, HXK1 (Hexokinase1); Zellwandmarker: Cts1p (Chitinase1); Plasmamembranmarker: Pma1 (Plasmamembran ATPase1)).

Hsp12 konnte in jeder der drei Fraktionen detektiert werden, während die jeweiligen Markerproteine hauptsächlich auf eine spezifische Fraktion beschränkt waren. Der größte Anteil an Hsp12 wurde in der Zellwandfraktion zusammen mit der vor allem in der Zellwand lokalisierten Chitinase Cts1p nachgewiesen. Durch die erhöhte Expression von Hsp12 nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase von Hefezellen ist ein Western Blot Signal in der cytosolischen Fraktion nachweisbar, die ebenfalls reich an Aktin und Hexokinase 1 ist. Darüber hinaus ließ sich Hsp12 in der durch die Plasmamembran ATPase Pma1 charakterisierte Membranfraktion detektieren. Ein Großteil von Hsp12 schien sich neben dem zu erwarteten cytosolischen Anteil während der stationären Wachstumsphase der Zellen in der Zellhülle, also in bzw. an Zellwand und Plasmamembran, zu befinden. Ähnliches konnte für den komplementierten *HSP12*-knock-out und für den Hsp12 überexprimierenden Wildtyp-Stamm beobachtet werden, wobei letzterer entsprechend höhere Expressionslevel aufwies.

Zur genaueren Analyse und weiteren Fraktionierung des cytosolischen Anteils wurde diese Fraktion einer weiteren Zentrifugation bei 100 000 x g unterzogen. Der daraus resultierende Niederschlag (P100) und der Überstand (S100) wurden zusammen mit den anderen Fraktionen erneut mittels SDS-PAGE getrennt und Western Blot analysiert. Als Kontrolle und Markerproteine dienten Membranproteine folgender Organellen: Endoplasmatisches Retikulum (Emp24), Vakuole (Vam3), Mitochondrium (Porin) und Plasmamembran (Pma1).

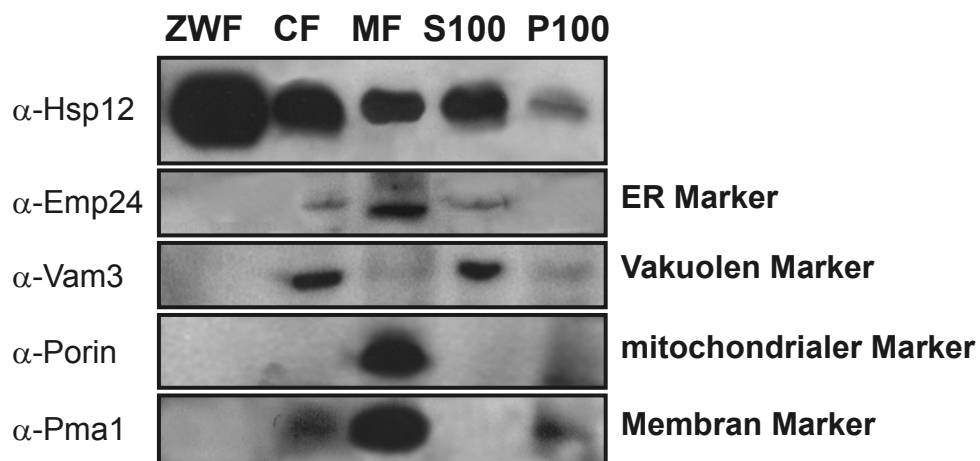


Abbildung 3-14 Western Blot von Wildtyp-Zellfraktionen unter Benutzung verschiedener, spezifischer Antikörper

Ermittlung der Verteilung von Hsp12 und verschiedenen Markerproteinen (Emp24 (endosomales Membranprotein; Vam3 (Membranprotein der Vakuole) Porin (mitochondriales Membranprotein) und Pma1 (Plasmamembran ATPase): in den Fraktionen: ZWF (Zellwandfraktion), CF (cytosolische Fraktion), MF (Membranfraktion) S100 (Überstand nach Zentrifugation bei 100 000 x g) und P100 (Pellet nach Zentrifugation bei 100 000 x g).

Wiederum ließ sich Hsp12 hauptsächlich in der Zellwandfraktion nachweisen. Darüber hinaus konnte eine Kolokalisation mit Endosomen geringerer Dichte und der Vakuole im cytosolischen Anteil nachgewiesen werden. Außerdem sedimentierte ein weiterer Teil von Hsp12 mit Mitochondrien, der größten Fraktion des Endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran, deren Marker Signal hauptsächlich in der Membranfraktion zu finden war. Nach erneuter Zentrifugation der cytosolischen Fraktion konnte Hsp12 vor allem im Überstand zusammen mit dem Markerprotein für die Vakuole detektiert werden, die aufgrund ihrer geringen Dichte in S100 verblieb. Ein schwaches Signal für den endosomalen Marker befand sich ebenfalls in diesem erneut behandelten Überstand. Nur unbedeutende Mengen an Hsp12 sedimentierten vergleichbar mit dem in der cytosolischen Fraktion verbliebenen Rest an Pma1.

3.2.3 Die Assoziation von Hsp12 an Zellorganellen

Da die Western Blot Signale in der cytosolischen, S100 und Membran-Fraktion auf eine Assoziation an weitere Organellen hindeuteten, sollte diese Möglichkeit näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien, Vakuolen und die Plasmamembran durch eine Kombination aus differentieller Zentrifugation und Auftrennung über Saccharosegradienten entsprechender Dichten getrennt voneinander isoliert und aufgereinigt. Die so erhaltenen Organellen wurden erneut über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen Hsp12 bzw. gegen die Markerproteine der Plasmamembran, Mitochondrien und Vakuole analysiert (Abbildung 3-15).

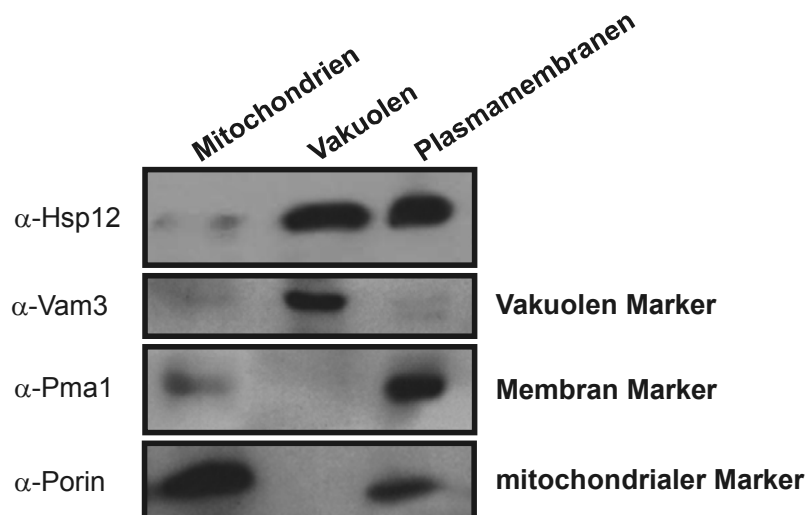


Abbildung 3-15 Western Blot von isolierten Vakuolen, Mitochondrien, Plasmamembranen

Vakuolen, Mitochondrien und Plasmamembranen wurden durch differentielle Zentrifugation und Auftrennung über einen Saccharosedichtegradienten isoliert, mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Benutzung der Antikörper gegen folgende Proteine analysiert: Hsp12; Vam3 (Membranprotein der Vakuole); Pma1 (Plasmamembran ATPase) und Porin (mitochondriales Membranprotein).

Hsp12 schien eindeutig mit der Vakuole und der Plasmamembran assoziiert zu sein, da immunologische Analysen der isolierten Organellen intensive Banden sichtbar machten (Abbildung 3-15, oberes Feld). Die isolierten Mitochondrien lieferten nur ein sehr schwaches Signal für Hsp12, das auf die Verunreinigung durch Plasmamembran zurückzuführen sein könnte. So konnte zum einen in durch SDS-PAGE aufgetrennten Mitochondrienproben stets Pma1 detektiert werden, der Marker für die Membran, zum anderen fielen Verunreinigungen der Plasmamembran durch

Porin auf, dem äußeren Membranprotein aus Mitochondrien. Nur die Vakuole schien frei von überprüfbareren Kontaminationen.

3.2.4 Analyse der Assoziation von Hsp12 an Membranen

Im Folgenden sollte zum einen die Art und Weise der Assoziation von Hsp12 an Organellen analysiert werden, zum anderen sollte die Löslichkeit von Hsp12 im periplasmatischen Raum näher untersucht werden. Dazu wurde jeweils eine Hälfte der durch differentielle Zentrifugation gewonnenen cytosolischen als auch der Membranfraktion mit einer Protease versetzt, die ungeschütztes Protein verdaute. In einem weiteren Versuchsansatz wurden intakte Wildtyp-Zellen zunächst mit Lytikase behandelt, um die Zellwand zu entfernen. Lediglich zu einer Hälfte dieses Ansatzes wurde Protease im Verhältnis 1:200 hinzugefügt und auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation beider Ansätze wurden diese Überstände sowie die übrigen Ansätze mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

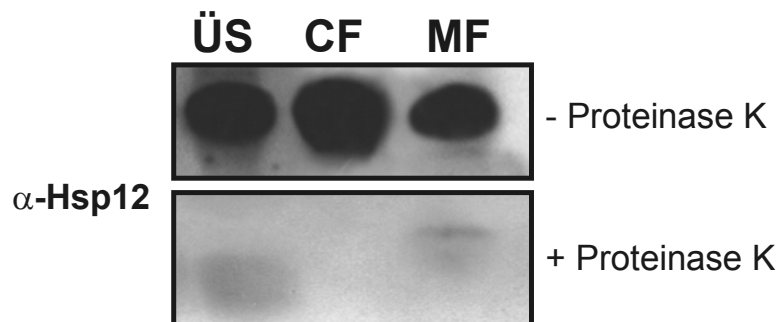


Abbildung 3-16 Western Blot von Zellfraktionen mit (unten) und ohne Proteinase K-Behandlung (oben)

Western Blot unter Benutzung des spezifischen Antikörpers gegen Hsp12. ÜS: Überstand nach Zentrifugation von mit Lytikase (400 U) behandelten Wildtyp-Zellen (in SPM-Puffer (siehe 2.9.1)); CF: cytosolische Fraktion und MF: Membranfraktion erhalten durch differentielle Zentrifugation.

Hsp12 konnte im Überstand von mit Lytikase behandelten Zellen detektiert werden (Abbildung 3-16). Nach Inkubation mit Proteinase K verschwand das Signal für das ungeschützte Protein nahezu vollständig, vergleichbar mit den Beobachtungen für die cytosolische Fraktion. Das Signal für Hsp12 in der Membranfraktion, das auf eine Assoziation vor allem mit der Plasmamembran hindeutete, konnte nach Einwirkung der Protease nur noch in Spuren nachgewiesen werden. Hsp12 schien selbst durch die Assoziation mit Organellen bzw. deren Lipiddoppelschichten nicht vor Protease Abbau geschützt.

3.2.5 *In vivo* Verteilung von Hsp12 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Hsp12 weist eine von der Wachstumsphase der Hefezellen abhängige Expressionsrate auf. So konnte aus exponentiell in Vollmedium wachsenden Zellen keine mRNA isoliert werden, während nach Eintritt in die stationäre Phase bzw. durch Hitzeschock eine um einige hundertfach verstärkte Induktion beobachtet wird (Praekelt und Meacock, 1990).

In Abbildung 3-17 sind eine Wachstumskurve und die dazugehörige Expressionskinetik von in Vollmedium gewachsenen Wildtyp-Zellen dargestellt.

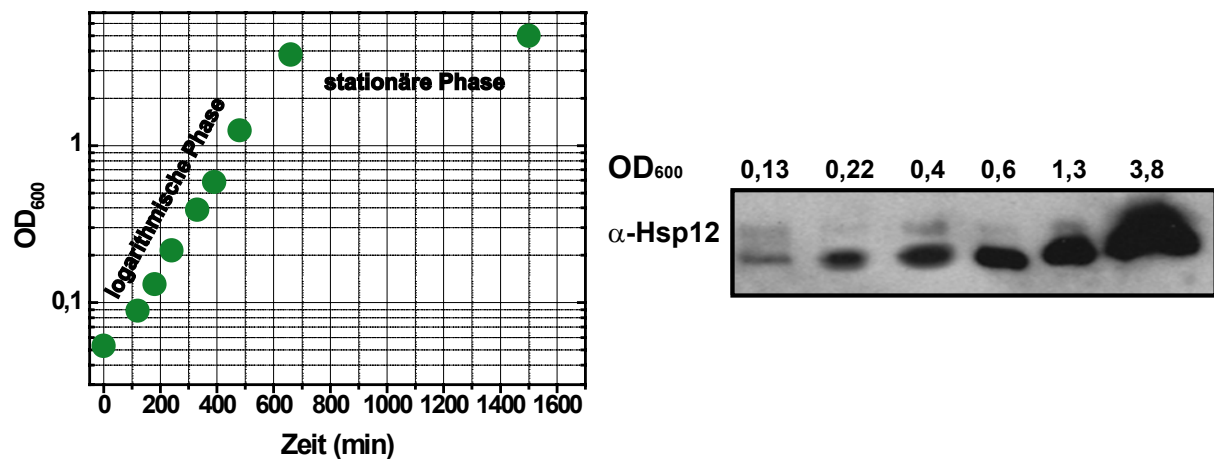


Abbildung 3-17 Wachstumskinetik (links) und Expressionsanalyse (rechts) von Wildtyp-Zellen
Das Wachstum der Wildtyp-Zellen bei 30°C wurde photometrisch verfolgt, die Zelldichte bei 600 nm bestimmt und halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (links). Zu bestimmten Zeitpunkten/Zelldichten wurde eine gleich bleibende Menge an Zellen entnommen, aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE und Western Blot die Expression von Hsp12 verfolgt (rechts).

Dazu wurden zu bestimmten Zeitpunkten Zellen zur Dichtebestimmung und zur Expressionsanalyse mittels Western Blot entnommen. Selbst bei geringen Zelldichten in der frühen logarithmischen Wachstumsphase ließ sich mit Hilfe des spezifischen Antikörpers gegen Hsp12 dieses Protein in geringen Mengen nachweisen. Eine verstärkte Expression war wie zu erwarten erst in der späten logarithmischen bzw. bei Eintritt in die stationäre Phase (hier bei OD₆₀₀ von 3,8) erkennbar.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Wachstumsphase und der Verteilung von Hsp12 innerhalb lebender Zellen sollte im Folgenden analysiert werden. Dazu wurde

das Wachstum bei 30°C in Vollmedium photometrisch verfolgt, zu bestimmten Zeitpunkten Zellen entnommen und wie unter 2.9.2 beschrieben in die drei verschiedenen Zellfraktionen aufgetrennt. Die Verteilung von Hsp12 innerhalb dieser Fraktionen wurde mittels Western Blot bestimmt. Parallel dazu wurden sowohl Wildtyp- als auch $\Delta HSP12$ -Zellen zu entsprechenden Zeitpunkten entnommen und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Dies ließ einen direkten Vergleich der *in vivo* Verteilung von Hsp12 und der entsprechenden Zellgestalt des Wildtypes und der *HSP12*-Deletionsmutante aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen zu (Abbildung 3-18).

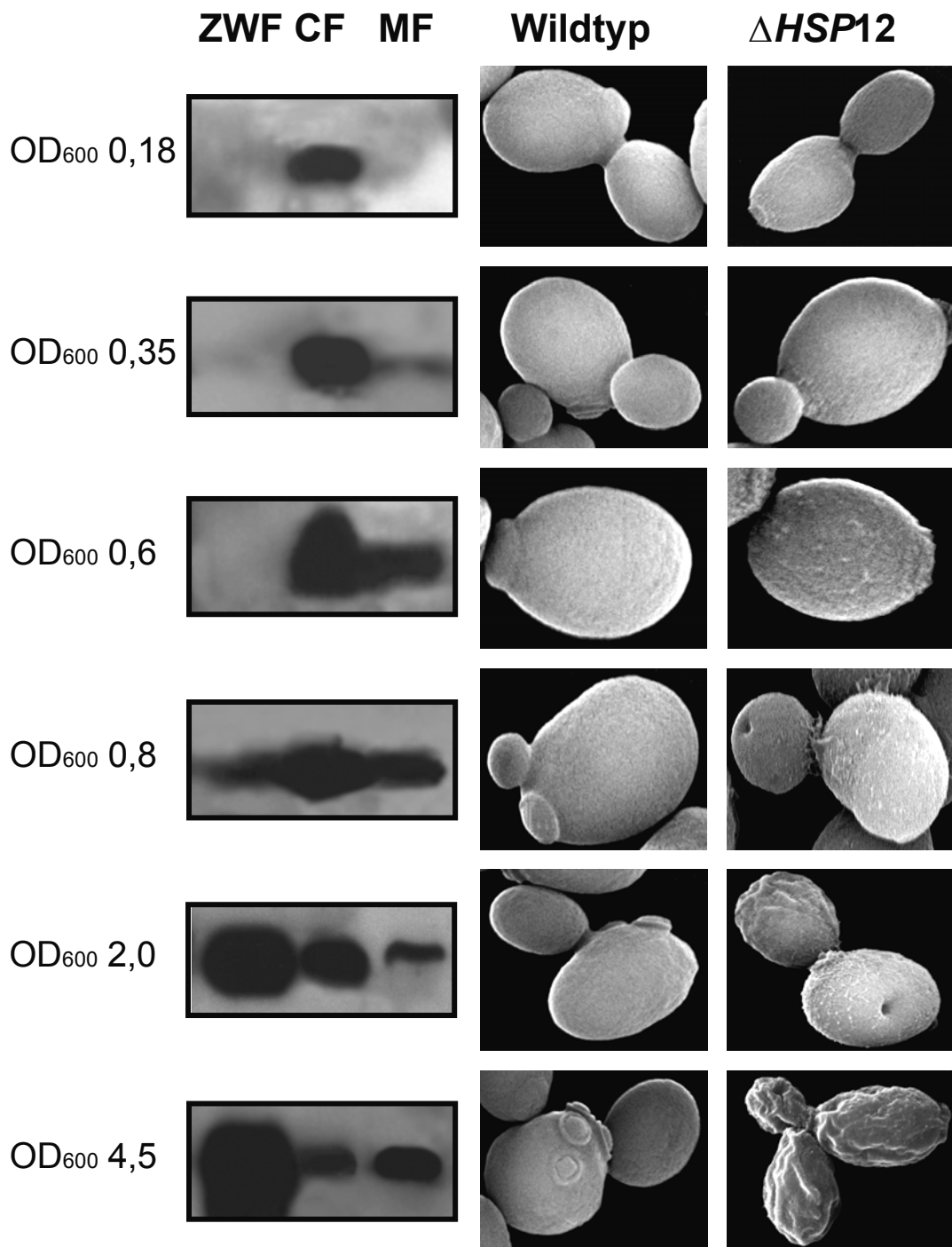


Abbildung 3-18 Verteilung von Hsp12 in Wildtyp-Zellen und REM-Aufnahmen von Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte

Linke Spalte: Western Blot gegen Hsp12 von fraktionierten Wildtyp-Zellen unterschiedlicher Zelldichten. ZWF: Zellwandfraktion; CF: cytosolische Fraktion; MF: Membranfraktion; Mittlere Spalte: REM-Aufnahmen von Wildtyp-Zellen unterschiedlicher Zelldichten; Rechte Spalte: REM-Aufnahmen von $\Delta HSP12$ -Zellen unterschiedlicher Zelldichten.

Junge Zellen aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase ließen vergleichsweise geringe Mengen an Hsp12 nachweisen. Dies befand sich ausschließlich in der cytosolischen Fraktion. Bei einer optischen Dichte von 0,35 entstand ein zusätzliches, leichtes Signal in der Membranfraktion, das mit wachsender Zelldichte der Kultur stetig zunahm. Mit voranschreitendem Alter der Kultur tauchte ein zunächst schwaches Signal für Hsp12 in der Zellwandfraktion auf, das sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} 2,0) verstärkte und zur typischen Verteilung von Hsp12 in den Zellfraktionen führte. Darüber hinaus war in der stationären und späten stationären Wachstumsphase eine Zunahme des Zellwandanteils und eine leichte Abnahme innerhalb der cytosolischen Fraktion erkennbar. Vergleicht man diese Veränderung der Hsp12-Lokalisation in Abhängigkeit von der Zeit mit dem Zustand entsprechender Zellen, so fällt deutlich auf, dass je mehr Hsp12 in die Zellhülle, v.a. in den Zellwandbereich, transportiert wurde, desto stärker wurde die Zellgestalt der Deletionsmutante in Mitleidenschaft gezogen. Zellen, die bei einer optischen Dichte von 0,18, 0,35 oder 0,6 geerntet wurden, sich also innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase befanden, waren kaum von Wildtyp-Zellen zu unterscheiden. Die Ausnahme bildete eine simultan mit ansteigendem Hsp12-Signal in der Membranfraktion von Wildtyp-Zellen zunehmend granulär strukturierte Zelloberfläche. Bei einer Zelldichte von etwa 0,8 war eine massive Körnung und starke Unregelmäßigkeiten der Oberfläche zu erkennen, die sich mit fortschreitendem Wachstum und Anreicherung von Hsp12 in der Zellwandfraktion als deutliche Defekte manifestierten und zu Deformierung der äußeren Gestalt führten. In der stationären Wachstumsphase trat nun der schon unter 3.1.3 beschriebene Phänotyp zu Tage. Die Zellen schienen an Volumen zu verlieren, wiesen starke Eindellungen und eine raue, unregelmäßige Oberfläche auf. Derartige Veränderungen der Zellbeschaffenheit beim Durchlaufen der verschiedenen Wachstumsphasen waren über den gesamten Zeitrahmen bei Wildtyp-Zellen nicht zu beobachten. Diese Zellen zeichneten sich durch die für *S. cerevisiae* typische ovale Gestalt mit glatter Oberfläche aus. Lediglich eine typische Anhäufung von Knospungsnarben in der späten logarithmischen und stationären Wachstumsphase fiel auf.

3.2.6 Einfluss von Hitzeschock auf die *in vivo* Verteilung von Hsp12

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob neben dem Altern von Kulturen, also dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, andere Arten von Stress einen Einfluss auf die Verteilung von Hsp12 innerhalb lebender Wildtypzellen haben. Dafür wurde der Hitzeschock gewählt. Außerdem wurde parallel der Effekt eines abrupten Hitzestresses auf die Gestalt junger $\Delta HSP12$ -Zellen getestet. Dazu wurden 30°C-Kulturen von Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase für eine Stunde bei 47°C inkubiert. Zusammen mit bei 30°C gewachsenen Hefen einer entsprechenden optischen Dichte (OD_{600} 0,18) wurden diese Zellen zum einen fraktioniert, zum anderen für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert.

Die Fraktionierung und Rasterelektronenmikroskopie von jungen Zellen aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase (Abbildung 3-19, obere Reihe) zeigen das unter 3.2.5 beschriebene Bild.

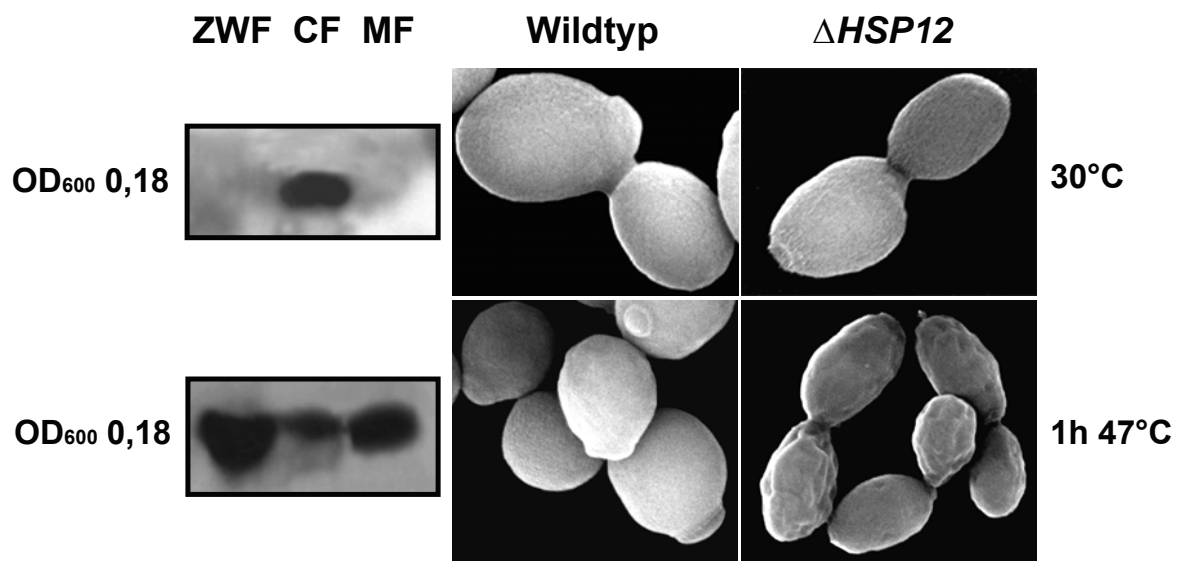


Abbildung 3-19 Verteilung von Hsp12 in Wildtyp-Zellen und REM-Aufnahmen von Wildtyp und $\Delta HSP12$ -Zellen bei gleicher Zelldichte in Abhängigkeit von einer Stunde Hitzestress

Linke Spalte: Western Blot gegen Hsp12 in Zellfraktionen von Wildtyp-Zellen (OD_{600} 0,18), die durchgehend bei 30°C (oben) oder aus 30°C für eine Stunde bei 47°C inkubiert wurden (unten); mittlere Spalte: REM Bilder von Wildtyp-Zellen (OD_{600} 0,18) bei 30°C (oben) oder aus 30°C für eine Stunde bei 47°C (unten) inkubiert; rechte Spalte: REM Bilder von $\Delta HSP12$ -Zellen (OD_{600} 0,18) bei 30°C (oben) oder aus 30°C für eine Stunde bei 47°C (unten) inkubiert.

Hsp12 ließ sich ausschließlich in der cytosolischen Fraktion nachweisen und sowohl Wildtyp- als auch $\Delta HSP12$ -Zellen ließen keine Auffälligkeiten bemerken. In Zellen der gleichen optischen Dichte von 0,18, die eine Stunde Hitzeschock bei 47°C

ausgesetzt waren und anschließend fraktioniert wurden, konnte hingegen Hsp12 in allen Fraktionen detektiert werden. Der größte Anteil fand sich in der Zellwand- und Membranfraktion. Das Verteilungsmustern ähnelte dem spät logarithmischer bzw. stationärer Wildtyp-Zellen. Darüber hinaus wiesen $\Delta HSP12$ -Zellen nach dem Hitzeschock phänotypische Merkmale von Zellen fortgeschrittenen Alters auf (siehe Abbildung 3-5 und Abbildung 3-18). Sie fielen in sich zusammen, schienen an Volumen zu verlieren und waren durch eine unregelmäßige Oberfläche gekennzeichnet. Zellen des Stammes SEY6211 schienen von der sprunghaften Temperaturerhöhung im Großen und Ganzen unbeeindruckt. Im Rasterelektronenmikroskop waren die typischen Hefezellen zu beobachten.

3.3 Translokation von Hsp12 durch Lipiddoppelschichten

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass ein Großteil von Hsp12 in Wildtyp-Zellen aus der stationären Wachstumsphase innerhalb der Zellhülle lokalisiert ist und dort wohl funktionell wirksam wird. Dementsprechend muss Hsp12 auf irgendeine Art und Weise in der Lage sein, die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran zu durchqueren, was im Folgenden untersucht werden sollte.

3.3.1 Signalsequenz

Eine eukaryotische Zelle stellt nur dann eine funktionierende Einheit dar, wenn ihre tausende von Proteinen ihrer Funktion entsprechend über die Komponenten der Zelle korrekt verteilt sind. Zu diesem Zweck existieren verschiedene, spezifische Sequenzsignale und hoch selektive Translokationsmaschinerien, die dafür sorgen, dass jedes Protein an den für ihn vorhergesehenen Ort gelangt. Dies mag ein subzelluläres Kompartiment sein, oder im Falle von sekretorischen Proteinen, das Zellexterieur (Gunkel et al., 2005). In Eukaryoten werden sekretorische Proteine und solche, die in der Plasmamembran bzw. Zellhülle verbleiben über das Endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi Apparat letztendlich zu der oder durch die Plasmamembran transportiert (Palade, 1975; Gunkel et al., 2005). Dies kann in Hefezellen post- oder cotranslational erfolgen, wobei in beiden Fällen die Erkennung über eine N-terminale Signalsequenz läuft. Sie bestehen aus 16 bis 30 Resten, die häufig in drei unterschiedliche Domänen eingeteilt werden können (von

Heijne, 1990). Eine aminoterminal positiv geladene Region aus häufig nur einem Rest bestehend (n-Region), ein zentraler hydrophober Teil (h-Region) und eine mehr polare carboxyterminale Domäne (c-Region) können als allgemeines Muster genannt werden. Darüber hinaus besteht keine präzise Sequenzkonservierung dieser hochvariablen schnell evolvierenden Struktur. Einige Beispiele für N-terminale Signalpeptide aus *S. cerevisiae* sind in Tabelle 3-1 gezeigt, wobei die kritischen Reste der drei Domänen, soweit vorhanden, farbig hervorgehoben sind.

Protein	N-terminale Signalsequenz
Pre-Phosphatase (Ppa3)	MFKS V VY S VLAAAL V NAGT
Pre-Invertase (Inv1)	MLLQ A FL F LAG F AAKIS A SM
Pre-Glukanase (Bgl1)	M R FSTTL A T A T A LF F T A S Q V S AIG
Pre-Chitinase (Cts1)	MSLL Y I I LL F T Q F L LL P T D A F D
Pre-Agglutinin (Aga1)	MTLS F A H F T Y L F T ILL G L T N I A L A S D P
Pre-Fusionsprotein (Fus1)	MVATIMQTT T T V L T T V A A M S T L ASN
Pre-Mating process Protein (Mid2)	MLSFT T K N S F RL L LL L IL S C I S T IRA Q
Hsp12	MSD A GR K G F GE K A S E A L K P D S Q K S Y

Tabelle 3-1 N-terminale Signalsequenzen verschiedener Hefeproteine im Vergleich mit Hsp12

Blau: positiv geladene Reste der n-Region; rot: kontinuierliche hydrophobe Bereiche der h-Region; grün: polare, carboxyterminale Domäne. Proteinsequenzen aus Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot).

Dargestellt sind Signalsequenzen von periplasmatischen Proteinen (Ppa3 und Inv1), Proteinen aus der Zellwand (Bgl1, Cts1 und Aga1) und von Membranproteinen (Fus1 und Mid2). Besonders ausgeprägt sind die kontinuierlichen, hydrophoben Bereiche der h-Domäne (Tabelle 3-1, rot dargestellt) und die daran anschließende kürzere, polare Region (grün dargestellt). Nur drei der dargestellten Signalsequenzen (Ppa3, Bgl1 und Mid2) besitzen einen positiv geladenen Rest (blau dargestellt) vor der hydrophoben Domäne. Die ersten 25 Aminosäurereste vom N-Terminus der Hsp12-Sequenz lassen sich im Vergleich dazu nicht in die drei Domänen einteilen. Weder eine kontinuierliche hydrophobe Sequenz noch eine polare Region konnten detektiert werden. Dementsprechend scheint Hsp12 zumindest keine bekannte Signalsequenz sekretorischer Proteine zu besitzen und beschreitet wohl einen davon abweichenden Weg zur Zelloberfläche.

3.3.2 Translokation von Hsp12 durch die Plasmamembran lebender Hefe Zellen

Hsp12 scheint in der Lage zu sein, die Plasmamembran von Hefezellen zu durchqueren, da es in der stationären Phase hauptsächlich in der Zellhülle zu finden ist (siehe 3.2). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es sich dabei um einen Prozess in eine Richtung also unter Mitwirkung spezifischer, zellulärer Translokationsmechanismen handelt, oder ob Hsp12 davon unabhängig die Lipidmembran durchqueren kann. Folglich wurde die Bindung an und die Translokation von gereinigtem Hsp12 von der Zellaußenseite durch die Zellmembran mittels folgenden Versuch getestet (Abbildung 3-20).

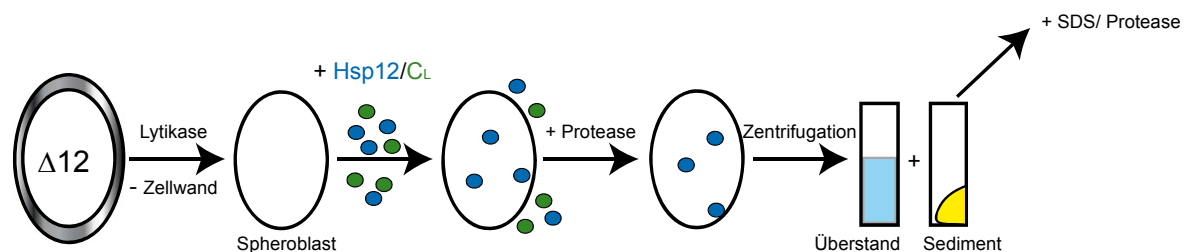


Abbildung 3-20 Schematische Darstellung des Translokationsversuches von Hsp12 durch die Zellmembran lebender Δ HSP12-Zellen

Oval: Δ HSP12-Zellen mit (dicke, graue Umrandung) oder ohne Zellwand; (●): gereinigtes, rekombinantes Hsp12; (●): C_L: konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers (ca. 12 kDa).

Δ HSP12-Zellen wurden zunächst mit Hilfe einer doppelten Menge an Lytikase zumindest zum Teil in Spheroplasten konvertiert. Diese zellwandlosen, lebenden Zellen wurden mit gereinigtem, rekombinanten Hsp12 zehn Minuten bei Raumtemperatur und osmotisch stabilisiert inkubiert, um eine potentielle Membrantanslokation zu ermöglichen. Als Kontrolle diente der gleiche Zellansatz versetzt mit gereinigtem Histidin-gekoppelten C_L (die konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers), das mit etwa 12 kDa der Größe von Hsp12 entspricht. Zugabe von Proteinase K nach der Importreaktion sollte zum Abbau aller ungeschützten Proteine führen, die nicht in der Lage waren, tief in die Zellmembran einzutauchen oder diese zu durchqueren. Nach Zentrifugation der Ansätze wurden sowohl die Überstände als auch die pelletierten und daraufhin aufgeschlossenen Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Western Blot analysiert (Abbildung 3-21).

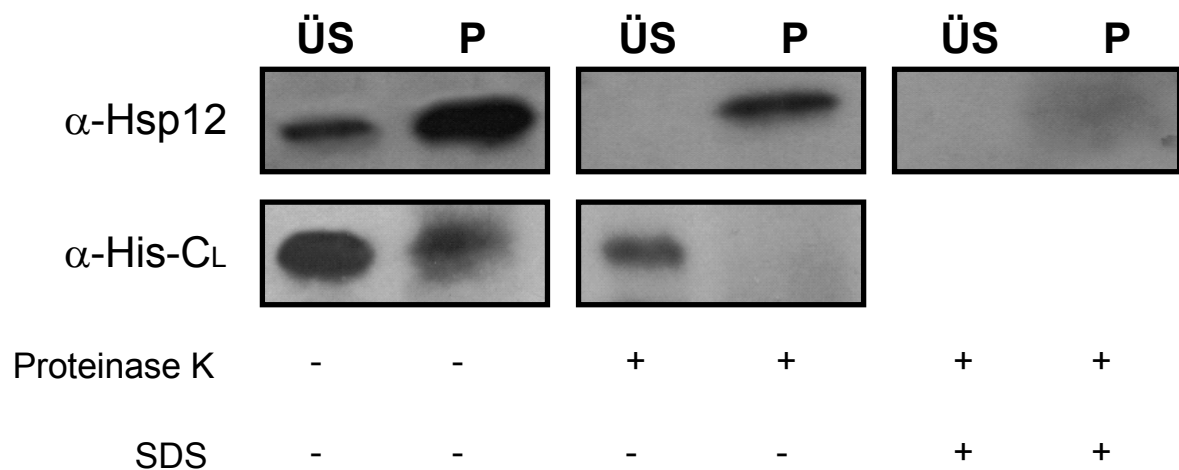


Abbildung 3-21 Western Blot gegen Hsp12 bzw. C_L nach Translokationsversuch durch die Plasmamembran von Δ HSP12-Zellen

Linke Spalte: Western Blot nach Importreaktion von Hsp12 bzw. C_L durch die Membran zellwandloser Δ HSP12-Zellen und Zentrifugation; mittlere Spalte: Western Blot nach Importreaktion, Inkubation mit Protease (Proteinase K) und Zentrifugation; rechte Spalte: Western Blot nach Importreaktion, Inkubation mit SDS und Protease und nach Zentrifugation. Benutzung des spezifischen Antikörpers gegen Hsp12 bzw. des monoklonalen Antikörpers gegen den Histidin-Tag von C_L (die konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers); **ÜS** (Überstand, zellfrei), **P** (Pellet, sedimentierte Speroblasten).

Zentrifugation der Zellen nach erfolgter Importreaktion sollte zunächst nicht an die Membran gebundene Proteine von gebundenen trennen. Da Hsp12 sowohl im Überstand als auch im Sediment nachweisbar war (Abbildung 3-21, linke Spalte), schien zumindest eine Bindung an die Plasmamembran der Speroblasten möglich. Ähnlich verhielt sich allerdings das ebenfalls ca. 12 kDa schwere Kontrollprotein C_L, wobei das Signal im Pellet bedeutend schwächer erschien. Nach Proteasezugabe ließ sich das sehr stabile C_L zwar noch im Überstand nachweisen, aus dem Pellet war das Signal allerdings verschwunden. Ein gewisser Teil des eingesetzten Hsp12 hingegen war trotz der Proteasebehandlung ausschließlich im Zellpellet detektierbar (Abbildung 3-21, mittlere Spalte) und wurde erst nach Lyse der Zellen mit SDS vollständig durch die Proteinase K abgebaut (rechte Spalte). Dementsprechend darf davon ausgegangen werden, dass dieser Hsp12 Anteil aufgrund tiefen Eindringens in die Membran bzw. Durchqueren derselben vor der Protease geschützt war.

3.3.3 Verteilung von rekombinantem Hsp12 in *Escherichia coli*

Zur Unterscheidung zwischen einem spezifischen und unspezifischen Prozess bei der Translokation durch Membranen wurde die Verteilung von rekombinantem Hsp12 innerhalb lebender *E. coli* Zellen untersucht, da in diesen Zellen kein Hsp12-Homolog existiert. Zu diesem Zwecke wurden die Hsp12-exprimierenden Bakterien in einer ähnlichen Art und Weise wie die Hefezellen in die drei bekannten Zellfraktionen zerlegt (siehe 3.2.2). Diese konnten mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden (Abbildung 3-22).

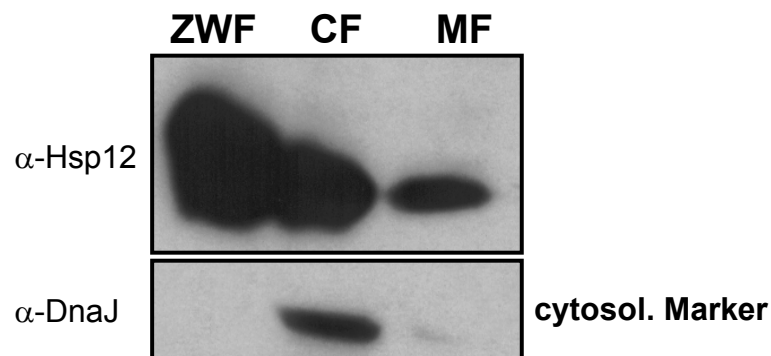


Abbildung 3-22 Western Blot auf Zellfraktionen Hsp12-exprimierender *E.coli* Zellen

Durch Behandlung ganzer Zellen mit Magnesiumionen bzw. durch differentielle Zentrifugation zellwandloser *E. coli* Zellen entstanden folgende Fraktionen: ZWF: Zellwandfraktion; CF: cytosolische Fraktion; MF: Membranfraktion; Western Blot unter Benutzung der spezifischen Antikörper gegen Hsp12 und DnaJ (Protein aus der Hsp40-Familie; cytosolischer Marker für *E. coli*).

Die Verteilung von rekombinantem Hsp12 in *E. coli* ähnelte der natürlichen Lokalisation in Hefe Zellen (siehe 3.2.2). Das Hitzeschockprotein aus *S. cerevisiae* kann in allen drei Fraktionen der Bakterien detektiert werden, das intensivste Signal findet sich allerdings in der Zellwandfraktion. Ein kleinerer Anteil cofraktioniert mit dem cytosolischen Markerprotein DnaJ und auch innerhalb der Membranfraktion lässt sich Hsp12 nachweisen. Selbst in prokaryotischen Zellen kann demnach die Zellhülle erreicht bzw. die Membran durchquert werden.

3.3.4 Hsp12-Import in „Large Unilamellar Vesicles“ (LUVs)

Zur Überprüfung, ob gereinigtes Hsp12 synthetische Lipiddoppelschichten - Modellmembranen - passieren kann, wurden zunächst große Phospholipidvesikel präpariert. Diese setzten sich aus zwei verschiedenen Lipidspezies zusammen. Zum einen dem POPC, ein Phosphatidylcholin verknüpft mit einer gesättigten Fettsäure mit 16 C-Atomen und einer einfach ungesättigten mit 18 C-Atomen, zum anderem aus POPG, das sich nur durch die Kopfgruppe bestehend aus Glycerin von POPC unterschied (siehe Abbildung 3-23).

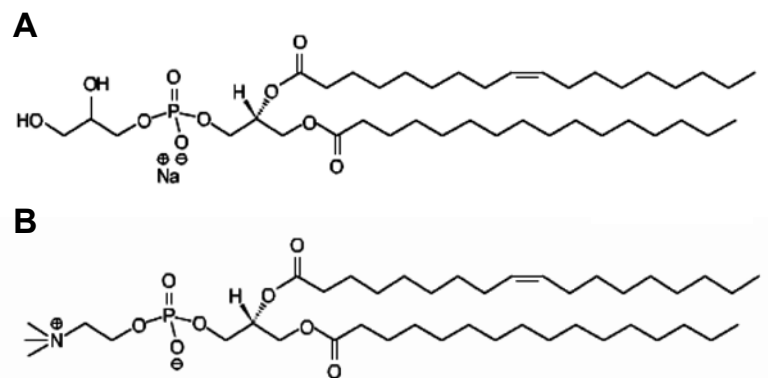


Abbildung 3-23 Struktur von POPG (A) und POPC (B)

A: POPG: 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)]; Fettsäurezusammensetzung: 16:0-18:1; **B:** POPC: 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; Fettsäuren: 16:0 - 18:1.

Diese Mischung aus ungeladenem (POPC) und negativ geladenem (POPG) Lipid wurde mittels eines Extruders durch einen Polycarbonat-Filter definierter Porengröße gepresst. Dabei entstanden große unilamellare Vesikel (LUV's) mit einem Durchmesser von 400 nm durch Extrusion (MacDonald et al., 1991). Eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur mit gereinigtem Hsp12 bzw. C_L als Kontrolle sollte ein mögliches Durchqueren durch die synthetische Membran der Liposomen gewährleisten. Ungeschütztes Protein wurde daraufhin, oder nach Auflösung der Lipidvesikel durch Detergenz, von der Proteinase K abgebaut. Die Ansätze wurden nach Auftrennung über SDS-PAGE mit Western Blot analysiert (Abbildung 3-24).

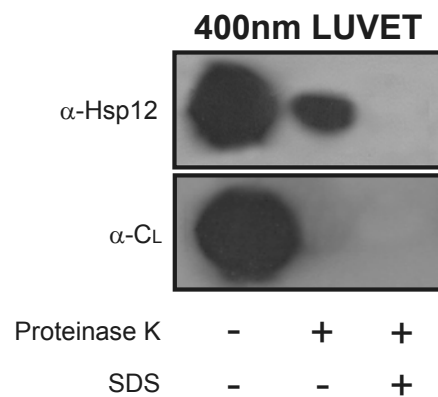


Abbildung 3-24 Western Blot der Importversuche von Hsp12 bzw. C_L durch 400nm LUV-Membranen

Linke: Western Blot nach Inkubation von Hsp12 bzw. C_L mit LUV's im Verhältnis 1:25; Mitte: nach Importreaktion und Inkubation mit Protease; rechte Seite: nach Importreaktion und Inkubation mit SDS und Protease; LUV: large unilamellar vesicel bestehend aus POPG und POPC im Verhältnis 1:3.

Nach Inkubation von Hsp12, beziehungsweise dem Kontrollprotein C_L, mit den großen Lipidvesikeln konnten beide Proteine im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 3-24, links). Im Anschluss an die Behandlung mit Proteinase K war nur noch ein, wenn auch kleinerer, Anteil an Hsp12 detektierbar; das Kontrollprotein ist vollständig abgebaut worden (Abbildung 3-24, Mitte). Diese nach der Importreaktion proteaseresistente Fraktion an Hsp12 wurde erst nach Auflösung der Vesikelmembran mit Hilfe von SDS abgebaut (Abbildung 3-24, rechts). Demnach war zumindest ein gewisser Anteil von Hsp12 in der Lage, derartige Modellmembranen zu durchqueren oder in sie einzutauchen und sich dem Proteaseangriff zu entziehen.

3.4 Interaktion von Hsp12 mit Modellmembranen

Im vorausgegangenen Kapitel konnte aufgezeigt werden, dass Hsp12 in der Lage ist, verschiedene Membransysteme wie synthetische Lipidvesikel und Plasmamembranen - sowohl von *S. cerevisiae* als auch von fremden Organismen wie *E. coli* - zu durchqueren. Um diesen Mechanismus aufzuklären, wurde Hsp12 auf die Fähigkeit getestet, mit synthetischen Vesikeln zu interagieren.

3.4.1 Kalorimetrische Interaktionsanalyse von Hsp12 mit Lipid

Energie, die als Wärme übertragen wird, kann mittels Kalorimetrie gemessen werden. Die Kalorimetrie beruht auf der Detektion von Wärmeunterschieden, die durch thermodynamische Prozesse verursacht werden. Die Phasenumwandlung eines Lipids vom Gel zum flüssig-kristallinen Zustand in Abhängigkeit der Temperatur ist mit der Entstehung von Wärme verbunden und kann mittels Differentialkalorimetrie (DSC) dargestellt werden.

DSC wurde verwendet, um die Bindung von Hsp12 an anionische oder zwitterionische Membranen zu analysieren. Bekanntermaßen beeinflusst die Art und Weise der Interaktion mit Lipid und das Maß der Penetration eines Proteins in eine Lipiddoppelschicht das thermotropische Verhalten des Lipid-Phasenüberganges (Papahadjopoulos et al., 1975; Ghosh et al., 1997). Für diese Experimente wurden mittels Ultraschall kleine Lipidvesikel mit einem Durchmesser von ca. 30 nm bestehend aus Lipiden präpariert, die im DSC einen scharfen Phasenübergang aufweisen. Es handelte sich um die dimyristoylierten Phospholipide Phosphatidylcholin (DMPC) oder Phosphatidylglycerin (DMPG) (Abbildung 3-25).

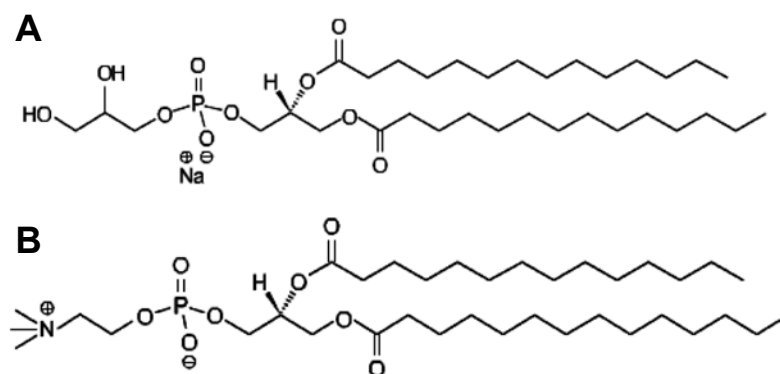


Abbildung 3-25 Struktur von DMPG (A) und DMPC (B)

A: DMPG: 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)], Fettsäuren: 14:0, **B:** DMPC: 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine, Fettsäuren: 14:0.

Beide Lipidspezies besitzen gesättigte Fettsäuren mit 14 C-Atomen, wobei DMPC zwitterionisch, ungeladen und DMPG negativ geladen ist. DMPG und DMPC weisen einen Phasenübergang bei milden Temperaturen von etwa 23°C auf.

Die wie unter 2.4.6 beschriebenen präparierten kleinen unilamellaren Vesikel (SUVs) wurden mit oder ohne Hsp12 zunächst unter Vakuum entgast und in die Messzelle des Kalorimeters gefüllt. Unterschiede in der Wärmekapazität zwischen der Probe in

der Messzelle und dem Puffer in der Referenzzelle wurden durch Erhöhung der Temperatur bei einer konstanten Rate von 60°C pro Stunde über einen Temperaturbereich von ca. 10 bis 40°C erhalten. Innerhalb dieses Temperaturbereiches, können strukturelle Änderungen von Hsp12 ausgeschlossen werden (Fischer, 2003). Dieser Aufheizvorgang wurde viermal nach zwischenzeitlichem Abkühlen wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Kurvenverläufe zu überprüfen (Abbildung 3-26).

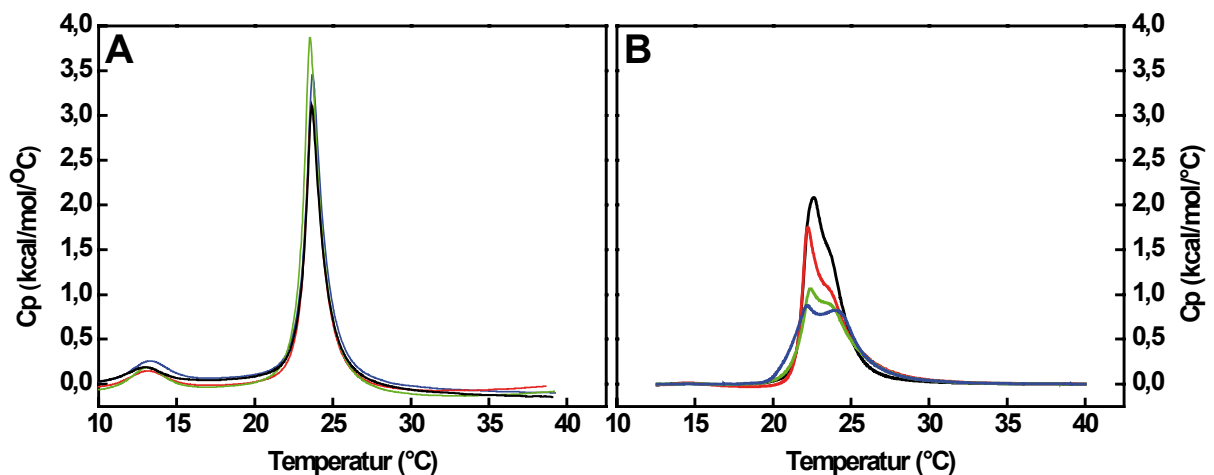


Abbildung 3-26 DSC Daten der Hsp12-Interaktion mit DMPC (A) und DMPG (B) über einen Temperaturbereich von ca. 10°C bis 40°C

Eine zunehmende Menge an Hsp12 wurde einer fixen Konzentration an Lipid (3 mg/ml) zugefügt, um folgende Lipid zu Protein Mischungsverhältnisse zu erhalten: (—): kein Protein; (—): 40:1; (—): 30:1; (—): 20:1. Pufferbedingungen: 10 mM Na-Phosphat, pH 7,4, 100 mM NaCl; Heizrate: 60°C/h; Temperaturbereich: 10 – 40°C; pro Lauf vier Scan-Zyklen.

Die DSC Messungen mit DMPC zeigen einen scharfen Phasenübergang hoher Kooperativität, was der Hauptumwandlung des Lipids entspricht, begleitet von einem kleineren Peak, der sogenannten Vorumwandlung (Abbildung 3-26, (A)). Dabei spielte es keine Rolle, ob Hsp12 zugesetzt worden war oder nicht. Lediglich die Maximalwerte des Phasenüberganges schienen bei Zugabe unterschiedlicher Mengen an Protein leicht zu variieren. In Tabelle 3-2 sind die Enthalpien, die aus den Flächen unterhalb der DSC-Kurven berechnet wurde, und die Temperatur an den Maxima des Haupt-Phasenüberganges (T_m) gelistet. Letztere wiesen unabhängig von der Zugabe von Hsp12 eine Temperatur von 23,7°C am Maximum der Wärmekapazität auf. Dieser Wert stimmt in etwa mit solchen aus der Literatur überein (Huang und Li, 1999). Die Reaktionsenthalpie für DMPC alleine lag bei etwa 5 kcal/mol. Steigende Hsp12-Konzentrationen führten zu einer leichten Zunahme der

Enthalpie, was eventuell auf eine geringe Stabilisierung der Membran zurückzuführen ist. Diese korrelierte allerdings nicht direkt mit der Erhöhung der Hsp12-Konzentration. Dementsprechend konnte für zwitterionisches Lipid, also ohne Nettoladung, keine auffällige Interaktion mit Hsp12 nachgewiesen werden.

	DMPC	Hsp12/DMPC 1:40	Hsp12/DMPC 1:30	Hsp12/DMPC 1:25
ΔH (kcal/mol)	5,1	5,2	6,6	6,3
T_m (°C)	23,7	23,7	23,7	23,7

Tabelle 3-2 Enthalpie (ΔH) und Umwandlungstemperatur (T_m) der Phasenumwandlung von DMPC in Abhängigkeit von Hsp12

Bei DSC-Analysen von negativ geladenem DMPG ohne Hsp12 konnte ein breiterer Übergang geringerer Kooperativität mit Ausbildung einer leichten Schulter und eines geringeren Maximums als bei DMPC beobachtet werden (Abbildung 3-26, (B)). Der thermische Phasenübergang von DMPG ist stark abhängig von den Umgebungsbedingungen und kann sich oft über einen breiten Temperaturbereich erstrecken (Salonen et al., 1989; Heimbürg und Biltonen, 1994; Lamy-Freund und Riske, 2003; Riske et al., 2003).

Durch Zugabe von Hsp12 (im Verhältnis 1:40 und 1:30) wurde zunächst lediglich das Kurvenmaximum reduziert unter weiterem Verlust der Kooperativität des Übergangs. Durch Erhöhung der Hsp12-Konzentration auf ein Protein Lipid Verhältnis von 1:20 konnte eine allgemeine Verbreiterung des Übergangs und eine intensivere Ausbildung der Schulter beobachtet werden. Dabei könnte es sich um dicht beieinander liegende Phasenumwandlungen handeln, was auf eine Domänenbildung in der Membran schließen lassen könnte.

Tabelle 3-3 zeigt die Enthalpieänderung der Gel zu flüssig kristallinen Phasenumwandlung der Ansätze aus DMPG mit unterschiedlichen Mengen an Hsp12. Die DSC-Werte für DMPG alleine stimmen wiederum mit solchen aus der Literatur überein (Huang und Li, 1999).

	DMPG	Hsp12/DMPG 1:40	Hsp12/DMPG 1:30	Hsp12/DMPG 1:20
ΔH (kcal/mol)	5,6	4,7	3,9	4,2
T_m (°C)	22,6	22,3	22,4	22,2

Tabelle 3-3 Enthalpie (ΔH) und Umwandlungstemperatur (T_m) der Phasenumwandlung von DMPG in Abhängigkeit von Hsp12

Die Erhöhung der Proteinkonzentration führte zu einer zunächst fortschreitenden, signifikanten Abnahme von ΔH des Gesamtübergangs, obwohl eine Bestimmung aufgrund der zwei Kurvenmaxima vor allem bei hohen Hsp12-Konzentrationen erschwert wurde. Ähnliches gilt für die Temperaturbestimmung des schärferen und höheren Maximums, wobei eine marginale Temperaturabnahme beobachtet werden konnte. Nichtsdestotrotz deuten die Abnahme der Enthalpie und vor allem der Kooperativität der Phasenumwandlung gerade bei hohen Konzentrationen an Hsp12 auf eine Interaktion mit negativ geladenem Lipid hin.

3.4.2 Bindung von Hsp12 an Modellmembranen

Nahezu jede chemische Reaktion und jeder physikalischer Adsorptionsprozess ist mit einer Freisetzung oder Absorption von Wärme verbunden. Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) erlaubt die simultane Messung von Bindekonstante und Reaktionsenthalpie, indem direkt und hochsensitiv die freiwerdende Energie der Reaktion in Form von Wärme gemessen wird (Wiseman et al., 1989).

Um Wechselwirkungen zwischen Hsp12 und Lipidmembranen thermodynamisch zu analysieren, wurde ITC verwendet. Dazu wurden Aliquots einer Hsp12-Lösung in eine Suspension aus Lipidvesikeln hoher Konzentration (ca. 10 mM) injiziert. Die 30 nm unilamellaren Lipidvesikel (SUVs) bestanden aus einer 3:1 Mischung ungeladener (POPC) und negativ geladener Lipide (POPG) (Abbildung 3-23), die mittels Ultraschall präpariert wurden (siehe 2.4.6).

Abbildung 3-27 zeigt exemplarisch eine typische kalorimetrische Titrationskurve von kleinen Mengen an Hsp12 (0,5 mg/ml) in eine Lipidsuspension.

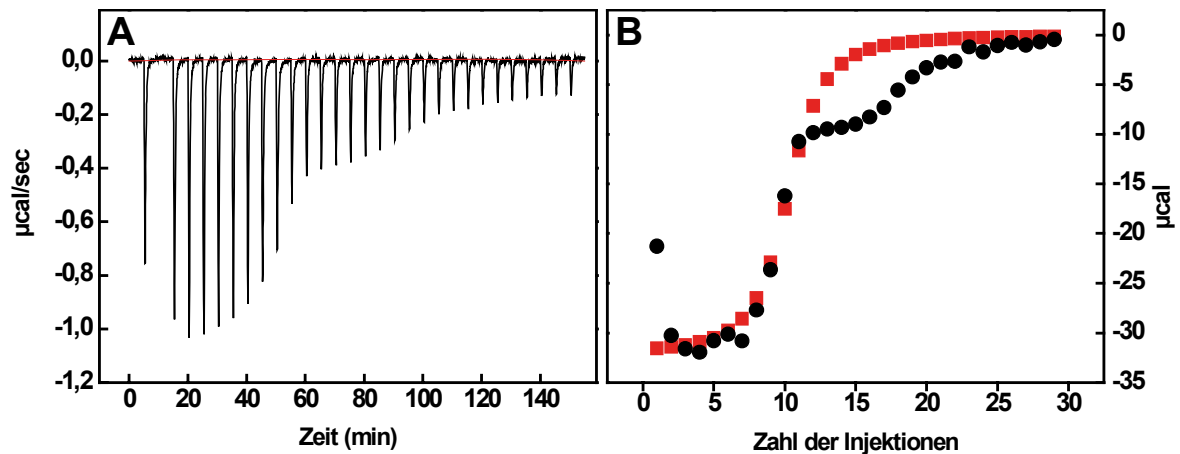


Abbildung 3-27 ITC Daten für Hsp12-Bindung an POPC/POPG-SUVs (Small Unilamellar Vesikels) bei 28°C

A: Kalorimetrischer Verlauf von 10 µl Injektionen von Hsp12 (0,5 mg/ml) in eine Lipidsuspension aus POPC/POPG Vesikeln, 3:1, (9,14 mg/ml) in 40 mM Hepes Puffer, pH 7,4, in 5 min Intervallen. **B:** Reaktionswärme in µcal der einzelnen Injektionen von Hsp12 berechnet aus der Fläche unter den Injektionskurven. (●): experimentelle Werte;(■): Theorie (Langmuir Bindemodell).

Da die ersten Einspritzungen zu nahezu identischen Reaktionswärmern führten, kann davon ausgegangen werden, dass alles injizierte Protein gebunden wird. Die Bindung von Hsp12 an SUVs verlief exotherm, wobei zu sehen ist, dass sich zwei verschiedene Prozesse abspielten. Eine erste Phase, in der Lipid im deutlichen Überschuss vorliegt und ein zweiter exothermer Prozess, der einsetzt, wenn im Laufe der Titration etwa 90 % des Lipids durch Hsp12 gebunden sind.

Die thermodynamischen Parameter, die für die Interaktion von Hsp12 mit POPC/POPG kleinen Lipidvesikeln bei 28°C erhalten wurden, sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

Zwei Zahlen der Tabelle sind bemerkenswert konstant. Zum einen die Wärmetönung pro Molekül Hsp12 mit $-75,47 \pm 5,5$ kcal/mol, zum anderen die Wärmetönung der zweiten Phase ΔH_{II} mit $-5,16 \pm 0,6$ kcal/mol. Die Fehler in diesen beiden Zahlen sind mit 7 bzw. 12 % sehr gering während sie für die anderen Parameter, wie die Bindekonstante oder die Zahl der gebundenen Lipide, bis zu 40 % betragen können. Auffallend groß erscheinen die Zahlen für die gebundenen Lipide pro Protein.

cHsp12 (μM)	C_{Lipid} (mM)	K_D (μM)	K_A (M^{-1})	n	ΔH_{Hsp12} (kcal/mol)	ΔH_{II} (kcal/mol)	ΔG_{Hsp12} (kcal/mol)	$T\Delta S_{\text{Hsp12}}$ (kcal/mol)
14,88	10,98	250	$4,0 \times 10^3$	2000	-80,00	nb	-4,94	-75,06
29,76	10,98	333,3	$3,0 \times 10^3$	2400	-72,20	-6,04	-4,77	-67,23
42,33	11,48	111,1	$9,0 \times 10^3$	2300	-75,46	-4,91	-5,43	-70,47
42,76	12,01	1000	$1,0 \times 10^3$	4000	-73,70	-4,27	-5,49	-70,51
84,67	11,48	142,8	$7,0 \times 10^3$	1200	-71,40	-5,28	-5,28	-69,12
85,52	12,06	142,8	$7,0 \times 10^3$	2300	-87,60	-5,05	-5,28	-82,12
171,05	11,63	100	$1,0 \times 10^3$	1900	-72,60	-5,34	-5,49	-68,61
\emptyset			$(7,14 \pm 2,79)$ $\times 10^3$	2350 ± 922	-75,47 $\pm 5,50$	-5,16 $\pm 0,60$	-5,24 $\pm 0,28$	-71,88 $\pm 5,14$

Tabelle 3-4 Thermodynamische Parameter für die Bindung von Hsp12 unterschiedlicher Konzentrationen an POPC/POPG (3:1)-SUVs bei 28°C

ΔH und ΔS Werte sind pro mol Hsp12; H: Enthalpie; S: Entropie; G: freie Energie; K_D : Dissoziationskonstante; K_A : Assoziationskonstante; n: Zahl der gebundenen Lipide pro Molekül Hsp12; nb: nicht bestimmt.

Um einen Hinweis auf die Art der Bindung zu erhalten, wurden Messungen mit erhöhter Salzkonzentration von 150 mM beziehungsweise mit kleinen unilamellaren Vesikeln mit stark vermindertem Gehalt an negativ geladenem Lipid (POPC/POPG 10:1) durchgeführt (Abbildung 3-28, A bzw. B).

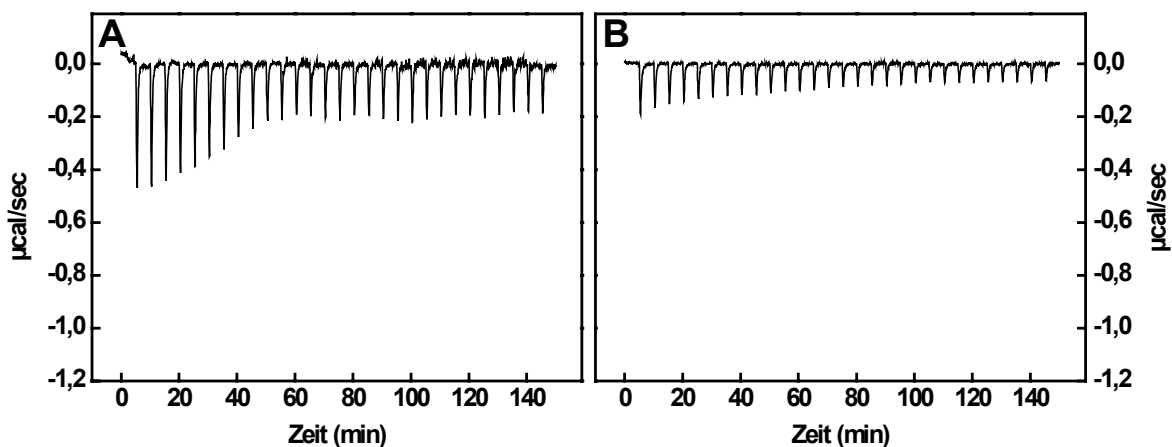


Abbildung 3-28 Kalorimetrische Titrationskurven von Hsp12 in SUVs unter Zusatz von 150 mM Salz (A) bzw. von Hsp12 in SUVs mit 10 % POPG (B) bei 28°C

10 μl Injektionen einer Hsp12 Suspension (0,5 mg/ml) wurden pipettiert: (A) in eine Lipidlösung aus POPC/POPG SUVs, 3:1, (9,4 mg/ml) in 40 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl; bzw. (B) in eine Lipidlösung aus POPC/POPG SUVs, 10:1, (9,1 mg/ml) in 40 mM Hepes, pH 7,4

Dabei erschienen die Messeffekte im Vergleich zu vorangegangenen Titrationsen (Abbildung 3-27, A) derart gering, dass nicht mehr von einer Bindung des Proteins an Liposomen ausgegangen werden kann. Dementsprechend deuten diese Ergebnisse auf eine durch elektrostatische Wechselwirkung bedingte Bindung von Hsp12 an Lipid hin.

3.5 Lipidanalyse von Zellmembranen

Eine Interaktion von Hsp12 mit Lipiddoppelschichten konnte in vorangegangenen Kapiteln gezeigt werden. Ob sich diese Wechselbeziehung zwischen Protein und Membran auf die Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften der Zellmembranen von Hefezellen auswirkt, sollte im Folgenden untersucht werden.

3.5.1 Massenspektrometrische Lipidanalyse von Hefezellmembranen

Mit Hilfe der ESI (Elektrospray Ionisierungsquelle) Tandem Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) können Phospholipide hervorragend analysiert werden, da es sich um eine äußerst sensitive Methode handelt, bei der Gesamtlipidextrakt verwendet werden kann.

Die Analytik von Lipiden liefert umfassende und zugleich detaillierte Informationen über einzelne Lipidklassen und deren Fettsäuremuster. Zur Analyse und Quantifizierung der Phospholipide wurden Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen gezogen, die Membranfraktionen wie unter 2.10.6 beschrieben gewonnen, und die Gesamtlipide extrahiert (2.10.7).

Mit Hilfe der Massenspektrometrie können aus einer Probe sämtliche Lipidklassen wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), Lyso-PC (LPC), Lyso-PE (LPE) und Inositolphosphatceramid (IPC) quantifiziert werden.

In Abbildung 3-29 sind die hauptsächlich vorkommenden Lipide aus Wildtyp-Zellen und $\Delta HSP12$ -Zellen dargestellt.

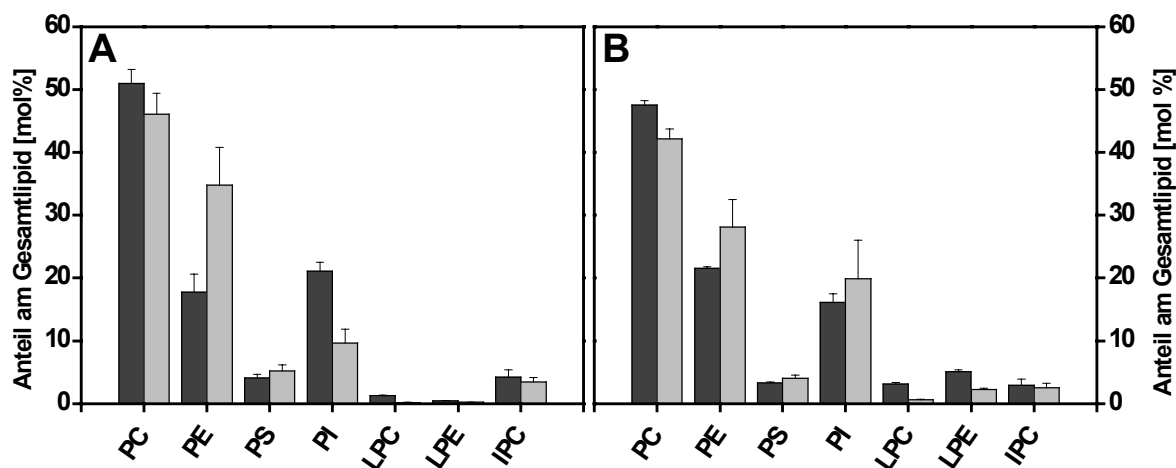


Abbildung 3-29 Quantifizierung der Hauptlipide in Wildtyp- (■) und $\Delta HSP12$ -Zellen (▒)

Dargestellt sind die Anteile der jeweiligen Lipidklassen am Gesamtlipid aus Zellen aus der späten stationären (A) und frühen logarithmischen Wachstumsphase (B). Die Zellen wurden für mindestens zwei Tage in Vollmedium inkubiert. Die Gesamtmenge an analysiertem Lipid betrug für stationäre Wildtyp-Zellen 506 ± 118 nmol/mg Zellprotein, für stationäre $\Delta HSP12$ -Zellen 337 ± 59 nmol/mg Zellprotein; für logarithmische Wildtyp-Zellen 359 ± 126 nmol/mg Zellprotein und $\Delta HSP12$ -Zellen 387 ± 98 nmol/mg Zellprotein. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit dreifach Bestimmung.

Aus den Gesamtmembranfraktionen stationärer $\Delta HSP12$ -Zellen ließ sich bedeutend weniger Lipid pro mg Zellprotein extrahieren als aus Wildtyp-Zellen. So betrug die Gesamtmenge für die Deletionsmutante lediglich 337 ± 59 nmol/mg während sich für Wildtyp-Zellen 506 ± 118 nmol/mg ergaben, was in weiteren davon unabhängigen Experimenten reproduziert werden konnte. Dieser Unterschied wurde bei Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase, in der kaum Hsp12 exprimiert wird, vernachlässigbar gering ($\Delta HSP12$: 387 ± 98 nmol/mg, Wildtyp: 359 ± 126 nmol/mg). Kaum Unterschiede konnten im Anteil an PC, PS, LPC, LPE und IPC zwischen Wildtyp- (dunkelgrau) und $\Delta HSP12$ -Zellen (hellgrau) sowohl aus der stationären als auch aus der logarithmischen Wachstumsphase festgestellt werden. Dabei machte, wie zu erwarten, PC mit 40 bis 50% den größten Anteil an Gesamtlipid aus (Abbildung 3-29, A und B) (Burgermeister et al., 2004). $\Delta HSP12$ -Zellen wiesen im Vergleich zum Wildtyp darüber hinaus vor allem in der stationären Phase größere Mengen an PE auf (ca. 35%), während PI stärker in stationären Wildtyp-Zellen vertreten war. Dieses Verhältnis drehte sich in der logarithmischen Phase um. Lipide lassen sich neben der Einteilung aufgrund verschiedener Kopfgruppen (Lipidklassen) durch ihre Fettsäuren charakterisieren. Diese werden nach der Kettenlänge - sprich der Anzahl der C-Atome - und dem Grad der Sättigung - der Anzahl der Doppelbindungen - in die sogenannten molekularen Lipidspezies

eingeteilt. Zur näheren Charakterisierung wurde die Verteilung der molekularen Spezies der verschiedenen Lipidklassen mittels ESI-MS/MS analysiert und die Verteilung der Spezies quantifiziert. Abbildung 3-30 zeigt exemplarisch die Zusammenfassung dieser Analyse für Phosphatidylcholin.

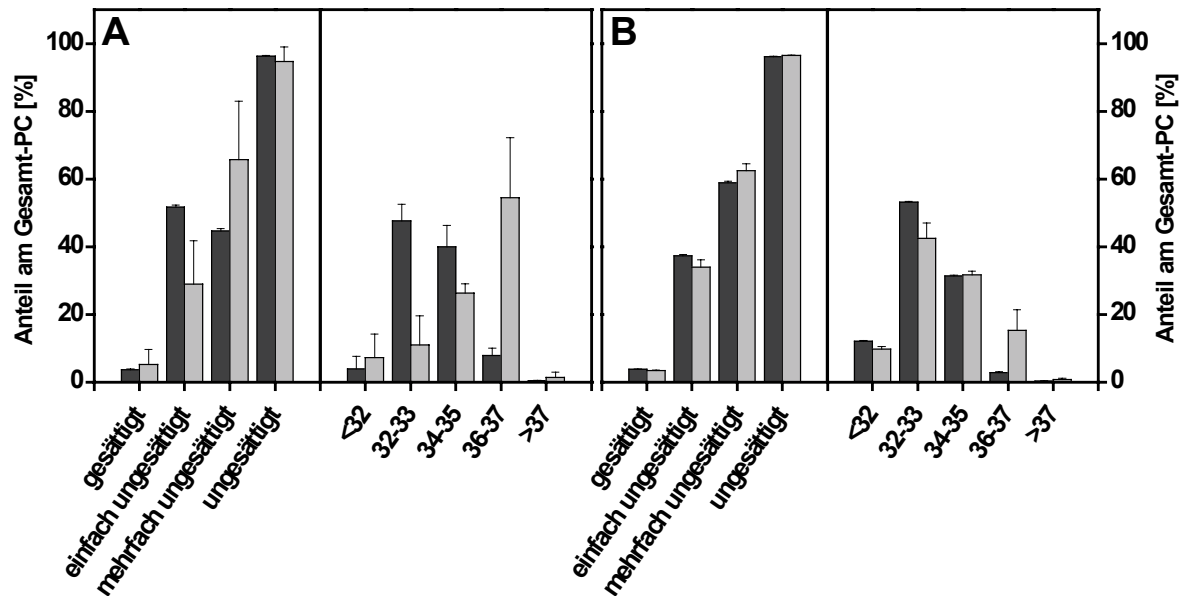


Abbildung 3-30 Phosphatidylcholin-Spezies in Wildtyp- (■) und Δ HSP12-Zellen (□)

Dargestellt ist eine Zusammenfassung der molekularen PC-Spezies-Verteilung von Gesamtlipidextrakten aus Wildtyp- und Δ HSP12-Zellen aus der stationären (A) und logarithmischen Wachstumsphase (B). Linke Seite der Graphen bildet den Grad der Sättigung ab; rechte Seite: Zahlen der x-Achse verweisen auf die Anzahl der Gesamt-C-Atome jeweils beider Fettsäureketten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit Dreifachbestimmung.

Während der stationären Wachstumsphase waren gravierende Unterschiede in der vorwiegenden Fettsäurekettenlänge von PC zwischen Δ HSP12- und Wildtyp-Zellen erkennbar (Abbildung 3-30, A, rechte Seite). Die Anzahl der C-Atome bezog sich immer auf die Summe beider Fettsäureketten. Während in Lipidextrakten des Wildtyps kürzere Fettsäuren mit insgesamt 32 bis 35 C-Atomen dominierten, wies die HSP12-Deletionsmutante einen erheblichen Anteil (ca. 54%) aus 36 bis 37 C-Atomen bestehenden Fettsäuren auf. Kürzere Ketten waren mit dem Wildtyp verglichen deutlich geringer vertreten. Interessanter Weise reduzierten sich diese Unterschiede in den bevorzugten Fettsäurekettenlängen zwischen Wildtyp- und Δ HSP12-Lipiden, sobald Kulturen aus der frühen logarithmischen Phase untersucht wurden. Diese Beobachtungen konnten für sämtliche analysierten Lipidklassen gemacht werden mit Ausnahme von PI und PS. Hier waren kaum Differenzen

zwischen Wildtyp- und knock-out-Lipidspezies zu sehen und ein deutlich geringerer mit dem Wildtyp vergleichbarer Anteil an C 36 bis 37 konnte für $\Delta HSP12$ -Fettsäuren detektiert werden. Die linken Hälften der Graphen in Abbildung 3-30 repräsentieren den Grad der Sättigung jeweils beider Fettsäureketten zusammen. Sowohl in der stationären (A) als auch in der logarithmischen Wachstumsphase (B) dominierten für beide Zelltypen mit rund 95% die ungesättigten Fettsäuren. Auffällig hingegen war der größere Anteil (ca. 65%) an mehrfach ungesättigten Fettsäuren der stationären $\Delta HSP12$ -Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (45%), wobei diese wiederum mit etwa 50% einfach ungesättigter Fettsäuren über die im knock-out-Stamm detektierte Menge dominierten. Derartige Unterschiede konnten allerdings im Fettsäureprofil von PE und PS beider Zelltypen nicht gemacht werden. Im Grad der Sättigung waren darüber hinaus wieder kaum Unterschiede zwischen den untersuchten Lipidspezies aus Wildtyp-Zellen oder $\Delta HSP12$ -Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase auszumachen.

Um die Fettsäuren näher zu charakterisieren und die einzelnen Ketten über eine genaue Zuordnung der Anzahl an C-Atomen und Lage der Doppelbindungen exakt zu definieren, wurde eine Analyse von Gesamtlipid der zwei Hefestämme mittels Gas-Chromatographie durchgeführt. Auch bei dieser Untersuchung bestätigten sich vorangegangene Beobachtungen (Abbildung 3-31).

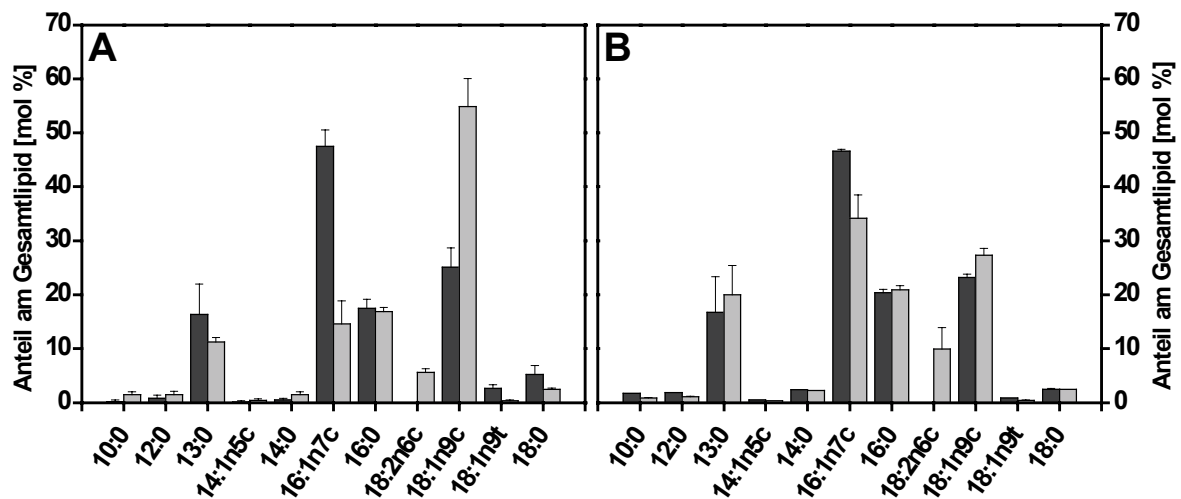


Abbildung 3-31 Fettsäureanalyse von Wildtyp- (■) und Δ HSP12-Lipid (▒)

Fettsäurespezies aus Gesamtlipid von Zellen aus der späten stationären (A) und frühen logarithmischen Wachstumsphase (B). Zahlen der X-Achse vor dem Doppelpunkt verweisen auf die Anzahl der C-Atome, Zahlen nach dem Doppelpunkt auf die Anzahl an Doppelbindungen. nx: Position x der Doppelbindung; c: cis; t: trans.

Bei Wildtyp-Zellen aus der stationären Phase bestand der größte Teil der Lipide aus den kurzkettigen Fettsäuren Palmitoleinsäure (16:1) mit 47,5%, Palmitinsäure (16:0) mit 17,5% und Tridekansäure (13:0) mit 16,3% (Abbildung 3-31, A, dunkelgrau). Diese Ergebnisse stimmen gut mit Werten aus der Literatur für verschiedene *S. cerevisiae*-Stämme überein (siehe auch Abbildung 1-2) (Botha und Kock, 1993). In Δ HSP12-Zellen machte hingegen mit 54,9% die Ölsäure (18:1) statt Palmitinsäure (14,6%) den Hauptanteil an Fettsäurespezies aus. Das Fettsäurespeziesmuster von Δ HSP12-Zellen ist im Vergleich zu Wildtyp-Zellen eindeutig zu längererkettigen verschoben. Dieser Unterschied in der Verteilung konnte bei Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase nicht mehr beobachtet werden. Der Anteil an längererkettigen Fettsäuren aus den HSP12-knock-out-Zellen nahm ab, während der der kürzererkettigen zunahm und sich damit das Verteilungsmuster an das der Wildtyp-Zellen anpasste. Allerdings fiel in beiden Wachstumsphasen das Vorkommen von Linolsäure (18:2) bei Fettsäuren aus HSP12-Deletionsmutanten auf - eine für *S. cerevisiae* völlig untypische Fettsäure, die normalerweise nicht detektiert werden kann (Botha und Kock, 1993; Kobayashi et al., 1987) und auch beim Wildtyp SEY6211 nie vorhanden war.

Um zu untersuchen, ob Linolsäure von außen aufgenommen wurde oder selbständig synthetisiert wurde, wurden Hefezellen statt auf Vollmedium auf definiertem Medium

gezogen und mittels Massenspektrometrie analysiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Hefen mit Ölsäure supplementiert, um eine mögliche Zunahme an Linolsäure durch Oxidation von 18:1 zu verfolgen. In Abbildung 3-32 ist exemplarisch die Quantifizierung und Verteilung von PC-Spezies aus stationären Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen zu sehen, die in definiertem (A) oder in definiertem Medium mit 0,2% Ölsäure (B) inkubiert wurden.

Ähnlich wie in Vollmedium zeigten Lipide aus stationären Wildtyp-Zellen vorwiegend kurzkettige Fettsäuren während die aus $\Delta HSP12$ -Zellen unter anderem einen dominanten Ausschlag bei 36:2 - bestehend aus zwei 18:1 Ketten- aufwiesen. Trotz definiertem Mediums konnten 18:2 Fettsäuren in Form von 36:3 (entspricht: 18:1/18:2) und 36:4-Fettsäuren detektiert werden. Diese verschwanden fast vollständig in Anwesenheit von Ölsäure. Darüber hinaus glich sich diesmal das Verteilungsmuster von Wildtyp-Lipidspezies an das von $\Delta HSP12$ -Zellen an. So nahmen die Anteile an kurzkettigen Fettsäuren im Vergleich zu längerkettigen wie vor allem 36:2 zu. In $HSP12$ -Deletionsmutanten stiegen sowohl Fettsäurespezies wie 34:2 als auch 40:0 an.

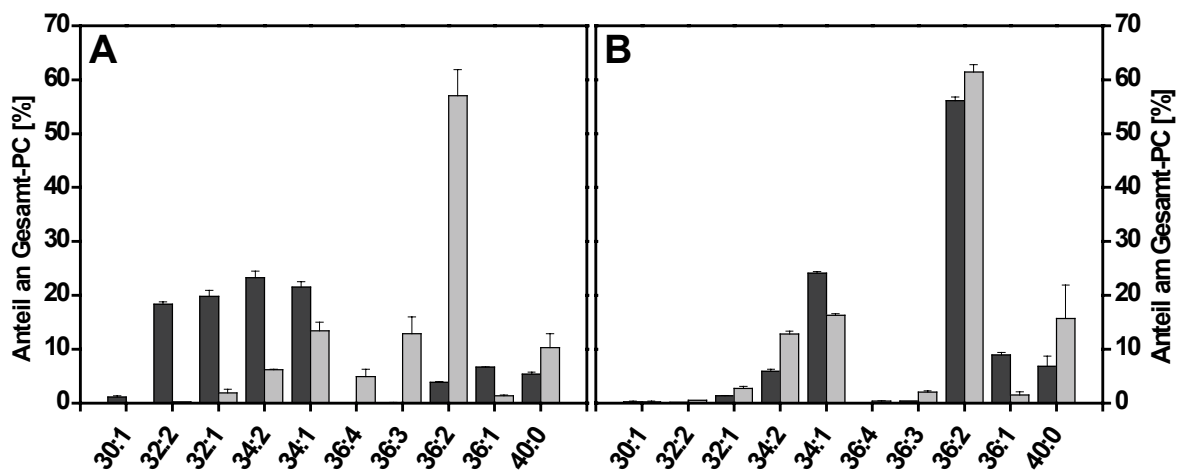


Abbildung 3-32 PC-Spezies von Wildtyp- (■) und $\Delta HSP12$ -Zellen (□)

Molekulare PC-Spezies-Verteilung von Gesamtlipidextrakten aus Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen inkubiert in definiertem Medium (CSM) (A) und definiertem Medium mit 0,2% Ölsäure (B). Zahlen der X-Achse verweisen auf die Anzahl der C-Atome und Doppelbindungen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit dreifach Bestimmung.

Ob diese Angleichung der Wildtyp-Zellen an die Lipidspeziesverteilung der $\Delta HSP12$ -Zellen auch mit einer Deformierung der Zellmorphologie einhergeht, sollte durch REM-Analysen untersucht werden. Dazu wurden Zellen in definiertem CSM-Medium

supplementiert mit 0,2% Ölsäure kultiviert, nach Wachstum bis zur stationären Phase fixiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert. Abbildung 3-33 zeigt derartig gewachsene Zellen.

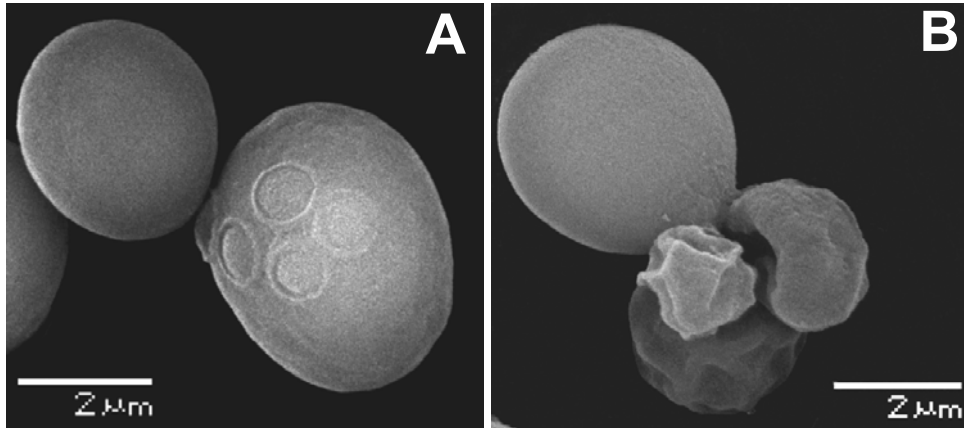


Abbildung 3-33 REM-Aufnahmen von Wildtyp- (A) und $\Delta HSP12$ -Zellen gewachsen in CSM-Medium mit 0,2% Ölsäure
Zellen wurden nach mind. 48 Stunden Wachstum auf Ölsäure (30°C) geerntet.

Die Wildtyp-Zellen zeigten keine auffälligen morphologischen Veränderungen nach Wachstum in definiertem Medium mit Ölsäure. Hingegen wiesen die $\Delta HSP12$ -Zellen zum einen die bekannten Deformationen auf (vergleiche Abbildung 3-5), zum anderen konnten vermehrt unbeeinträchtigte Zellen beobachtet werden. Die Supplementation mit Ölsäure schien sich positiv auf den morphologischen Phänotyp der $HSP12$ -Deletion auszuwirken.

3.5.2 Membranfluidität lebender Zellen

Veränderungen des Sättigungsgrades und der Kettenlänge von Fettsäuren, wie sie mittels Massenspektrometrie für die $\Delta HSP12$ -Hefezellen beobachtet werden konnten, können die Fluidität von Membranen beeinflussen. Dies ist auf entsprechend veränderte Temperaturen des Lipidphasenüberganges von der Gelphase zum flüssig-kristallinen Zustand zurückzuführen (Huang und Li, 1999; Beney und Gervais, 2001). Um zu analysieren, ob der Verlust von Hsp12 in Hefezellen mit einer veränderten Membranfluidität korreliert, wurde die Fluidität von Wildtyp und $\Delta HSP12$ -Zellmembranen bestimmt. Dazu wurden ganze, lebende Zellen mit dem spezifischen Plasmamembran-Fluoreszenzfarbstoff Diphenylhexatrien (DPH) markiert. Dieses Molekül taucht tief in die Lipiddoppelschicht ein (Kaiser und

London, 1998) und differenziert nicht zwischen Gel- und flüssig Phase der Phospholipide (Florine-Casteel und Feigenson, 1988). Ein großer Vorteil ist, dass die Fluoreszenz von DPH durch die Interkalation in die Membran massiv verstärkt wird, während sie in wässriger Umgebung vernachlässigbar gering ist. DPH ist ein zylindrisches Molekül, dessen Fluoreszenzpolarisation in Abwesenheit einer rotierenden Bewegung hoch ist und sehr sensitiv auf Umorientierungen der Längsachse reagiert, die aus Interaktionen mit umgebendem Lipid herrühren. Dementsprechend korreliert die Fluoreszenzanisotropie dieses Chromophores umgekehrt mit der Membranfluidität (Lentz, 1993).

Die Fluidität wurde von *HSP12*-Deletionsmutanten und Wildtyp-Zellen bei 30°C bzw. 16,5°C gemessen, die bei Standardbedingungen (30°C) oder bei tiefen Wachstumstemperaturen von ca. 16,5°C kultiviert wurden (Abbildung 3-34).

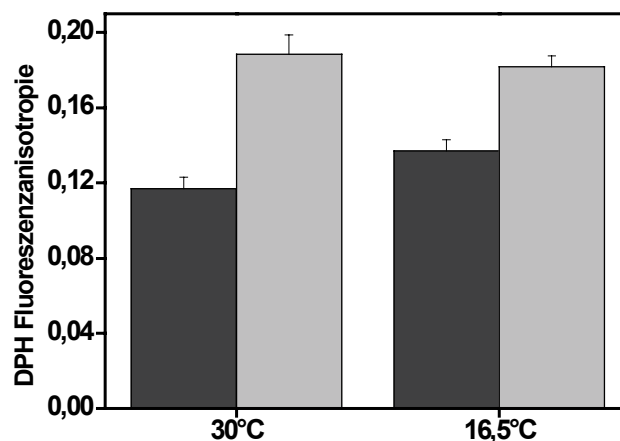


Abbildung 3-34 Fluoreszenzanisotropie von DPH in Wildtyp- (■) und $\Delta HSP12$ - (■) Zellmembranen bei 30 und 16,5°C

Die Messungen wurden an ganzen Zellen durchgeführt, die bei 30 bzw. 16,5°C gewachsen waren. Die Fluoreszenzanisotropie-Werte wurden wie unter 2.7.2 beschrieben berechnet. Die Werte repräsentieren Durchschnittswerte von drei Ansätzen mit Standardabweichung. Gemessen wurde bei den entsprechenden Wachstumstemperaturen. Für jede Messung wurden die Fluoreszenzintensitäten durch Subtraktion der Lichtintensität nicht markierter Zellen in PBS-Puffer korrigiert.

Die *HSP12*-Deletionsmutante wies mit $0,19 \pm 0,010$ im Vergleich zu Wildtyp-Zellen mit $0,117 \pm 0,006$ nach Inkubation bei 30°C höhere Fluoreszenzanisotropie-Werte auf. Dies impliziert eine erhöhte Membranordnung bzw. eine verminderte Fluidität der Plasmamembran. Bei Zellen, die bei relativ tiefen Temperaturen von 16,5°C gewachsen waren, verminderte sich diese Differenz in der Fluidität zueinander ein wenig (Abbildung 3-34). Während für Wildtyp-Zellmembranen eine Zunahme der

Anisotropie-Werte zu beobachten war, waren kaum Veränderungen für die Deletionsmutante auszumachen. Demzufolge führte die Reduktion der Wachstumstemperatur zu entsprechenden Veränderungen der physikalischen Eigenschaften der Plasmamembran von Wildtyp-Zellen. Die Membran verlor an Fluidität, während $\Delta HSP12$ -Zellen dem scheinbar entgegenwirken konnten.

Darüber hinaus konnte, verglichen mit knock-out-Zellen, eine bedeutend stärkere Einlagerung des Chromophors DPH in die Plasmamembran der Wildtyp-Zellen beobachtet werden. Obwohl stets Zellsuspensionen gleicher optischer Dichte mit gleicher Menge an DPH markiert wurden, wiesen Wildtypzellen höhere Fluoreszenzintensitäten als Deletionsmutanten auf, was wahrscheinlich auf die höhere Fluidität der Wildtyp-Membranen zurückzuführen ist. So konnten bei Inkubationstemperaturen von 16,5°C um etwa den Faktor acht, bei 30°C etwa 4,5-mal höhere Fluoreszenzintensitäten des Wildtyp-Ansatzes gemessen werden.

3.6 Proteomanalyse

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Verlust von Hsp12 und die damit verbundenen Effekte in $\Delta HSP12$ -Zellen eine veränderte Expression anderer Proteine bewirkt. Zu diesem Zwecke wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D) mit anschließender massenspektrometrischer Analyse herangezogen. Dazu wurden sowohl Wildtyp- als auch $\Delta HSP12$ -Zellen in Vollmedium bei 30°C bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert, geerntet und aufgeschlossen. Das wie unter 2.10.1 beschrieben präparierte Zell-Lysat wurde zunächst einer isoelektrischen Fokussierung entlang eines pH-Gradienten (pH 4 – 7) unterzogen und erfuhr dann eine weitere Auftrennung nach dem Molekulargewicht über eine SDS-PAGE.

Zwei exemplarische, mit Coomassie Brilliant Blue angefärbte Gele mit aufgetrennten Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Lysaten sind in Abbildung 3-35 dargestellt.

Überraschender Weise konnten Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Lysat nicht miteinander verglichen werden, da sich das Proteinmuster zu stark voneinander unterschied. Dieses Ergebnis konnte mehrfach reproduziert werden. Es schien als wären in der Deletionsmutante entweder hauptsächlich Proteine größeren Molekulargewichtes vertreten, oder das Lysat trennte sich während der SDS-PAGE nicht so gut auf wie das von Wildtyp-Zellen. So konnten beim *HSP12*-knock-out die meisten

Proteinbanden zwischen 96 und 45 kDa detektiert werden, während beim Wildtyp eine relativ gleichmäßige Verteilung der Proteinbanden zu sehen war.

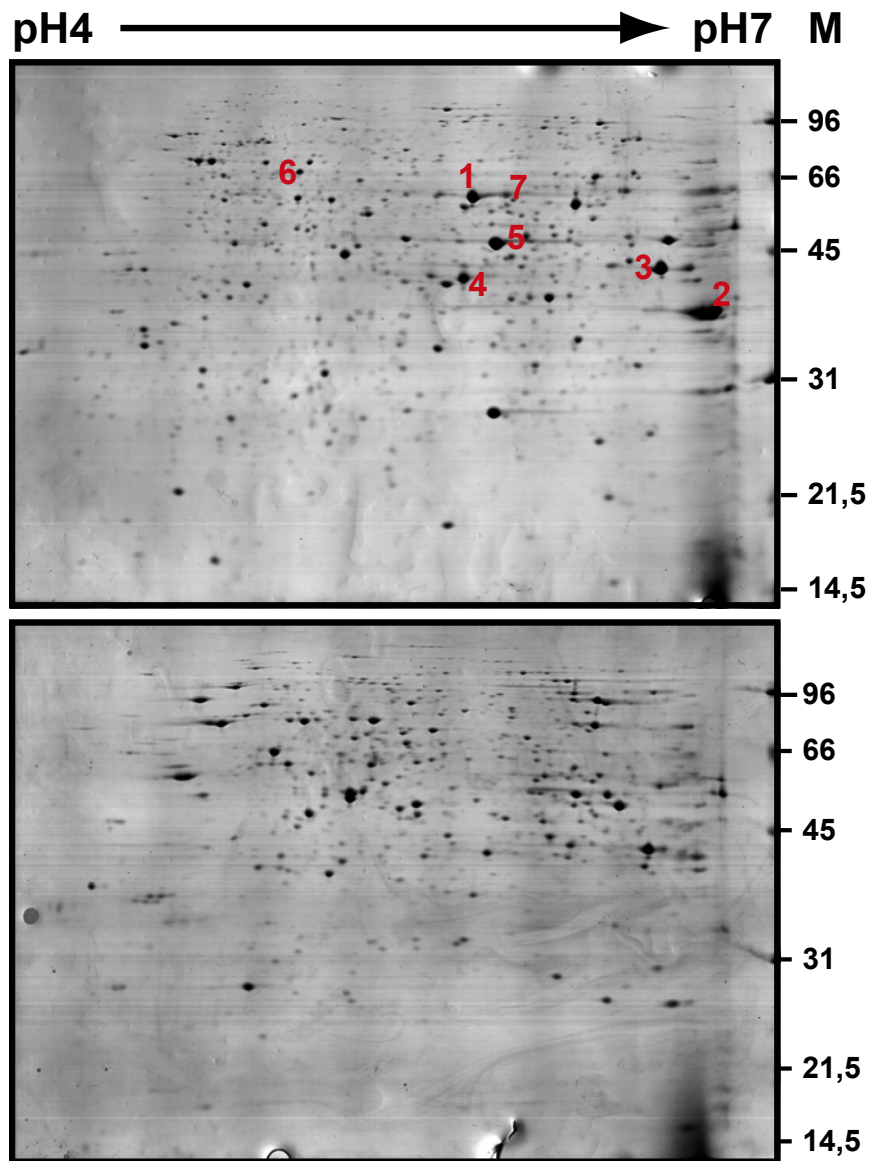


Abbildung 3-35 2D-Gel von Wildtyp-Lysat (oben) und Δ HSP12-Lysat (unten)

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte entlang eines pH-Gradienten von pH 4 – 7; die SDS-PAGE auf einem 13%igen Gel. M: Marker (LMW in kDa); Zahlen im Gel markieren über Massenspektrometrie analysierte Proteinbanden (siehe Tabelle 3-5).

In einem nächsten Schritt sollten zunächst einige dominante Proteinbanden über Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. Allerdings lieferte die Datenbankanalyse der „Peptid-Fingerprints“ für Proteinbanden aus Δ HSP12-Zell-Lysat nie eindeutige Treffer für ein Protein. Dies lag weniger an der Güte der Spektren, sondern vielmehr daran, dass ohne erkennbaren Grund keine Zuordnung der Peptidmassen zu Proteinen aus der Datenbank möglich war. Die Banden aus

Wildtyp-Zell-Lysat hingegen konnten problemlos bestimmten Proteinen zugeordnet werden. Exemplarisch sind einige aus dem Gel (Abbildung 3-35) analysierte Banden in Tabelle 3-5 gelistet.

# Proteinbande	ermitteltes Protein
1	Pyruvatdecarboxylase
2	Dehydrogenase
3	Alkoholdehydrogenase
4	Fruktose-1,6,-bisphosphataldolase
5	Enolase
6	Ssb1/Ssb2 (Hsp70-Proteinfamilie)
7	Glukokinase

Tabelle 3-5 MS-Analyse der 2D-Proteinbanden aus Abbildung 3-35

Peptid-Fingerprints wurden durch eine Mascot-Datenbank-Suche bestimmten Proteinen zugeordnet: www.matrixscience.com.

3.7 *In vivo* und *in vitro* Untersuchungen an Hsp12-Fragmenten

Um mögliche strukturell wichtige Bereiche von Hsp12 zu identifizieren, wurden verschiedene Fragmente konstruiert. Diese sollten *in vivo* und *in vitro* auf Funktionalität getestet werden.

3.7.1 Planung der Hsp12-Fragmente

Das Protein Hsp12 besteht aus 109 Aminosäuren. Unter physiologischen Bedingungen liegt es ungefaltet vor, nimmt aber in Anwesenheit von SDS α -helikale Struktur an (Fischer, 1999; Fischer, 2003). Die Lage der Helices konnte über NMR-Analysen bestimmt werden (Dehner, 2004).

In Abbildung 3-36 sind Wildtyp-Hsp12 und einige geplante Hsp12-Fragmente und Substitutionsmutanten dargestellt.

Laut NMR-Daten nehmen in Anwesenheit von SDS definierte Bereiche von Hsp12 α -helikale Struktur an (Dehner, 2004). Es können vier Helices unterschieden werden (H1 – H4), wobei sich die größte α -Helix (H4) im C-terminalen Bereich befindet.

Diese umfasst eine Sequenz von 28 Aminosäuren. H2 (22 AS) liegt in der Nähe des N-Terminus des Proteins und ist umgeben von zwei kleineren Helices mit 10 (H1) und 7 Aminosäuren (H3) (Franz Hagn, LSt. Prof. Kessler, Technische Universität München).

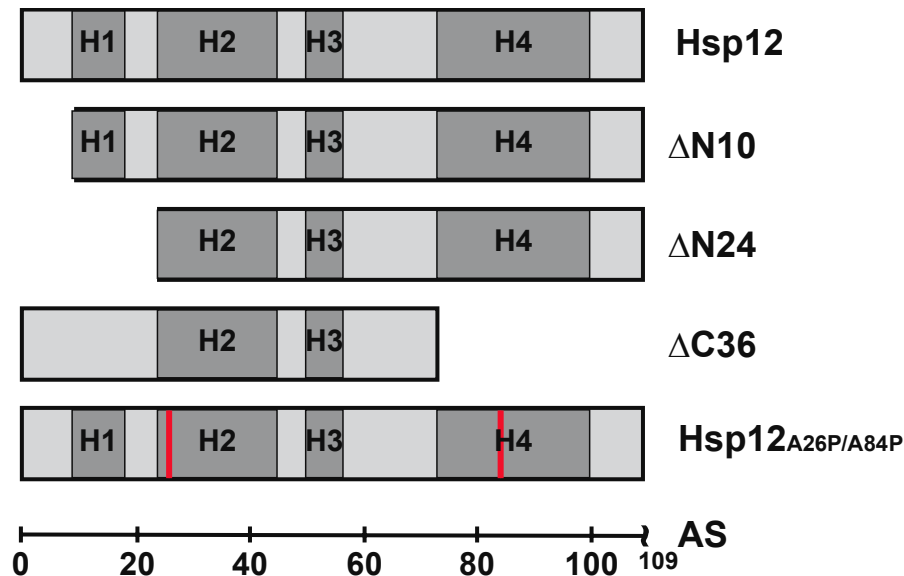


Abbildung 3-36 Schematische Darstellung von Hsp12, Deletionsfragmenten und Substitutionsmutanten

H1 bis H4 kennzeichnen postulierte α -Helices in Anwesenheit von SDS; rote Striche bezeichnen Position eines Aminosäureaustausches; AS: Aminosäure; A: Alanin; P: Prolin.

Zum einen wurden die ersten zehn N-terminalen Aminosäuren entfernt, um die Funktion und Notwendigkeit dieses unstrukturierten Bereiches aufzuklären. Eine Deletion von 24 N-terminalen oder 36 C-terminalen Aminosäuren entfernte die erste (H1) oder die vierte Helix (H4), die sich in Anwesenheit von SDS laut NMR-Daten ausbildete. Eine Deletion der zweiten Helix H2 wurde ebenfalls konstruiert, erwies sich allerdings nach neuer Zuordnung der postulierten Helices (Franz Hagn, persönliche Mitteilung) als strukturell irrelevant. Darüber hinaus wurde sowohl in H1 als auch in H4 ein Aminosäureaustausch durchgeführt. Jeweils ein Alanin wurde gegen ein Prolin ersetzt, was zu einem Knick in den Helices führen und die Notwendigkeit korrekt gefalteter und zueinander angeordneter Helices klären sollte. Sämtliche Konstrukte wurden in ein 2μ -Hefepiasmid kloniert, wobei der GPD-Promotor gegen den natürlichen Promoter von *HSP12* ausgetauscht wurde. Mit Hilfe dieses Vektors konnte jedes Fragment auf seine Funktionalität getestet werden, was Rückschlüsse auf die Bedeutung der verschiedenen strukturellen Bereiche erlaubt. Voraussetzung dafür war, dass Wildtyp-*HSP12* mit vorgeschaltetem, natürlichem

Promoter in $\Delta HSP12$ -Zellen diesen Verlust kompensieren und somit den ursprünglichen Phänotyp wiederherstellen konnte (siehe 3.1.2, 3.1.3 und 3.2.2). Zum Teil wurden die Konstrukte zusätzlich in den pet21-Vektor zur rekombinanten Expression in *E. coli* kloniert. Somit konnten des Weiteren *in vitro* Analysen an den Fragmenten durchgeführt werden.

3.7.2 Verteilung der Deletions- und Substitutionsmutanten in lebenden Hefezellen

Ob durch die Deletionen oder den Austausch von Aminosäuren die Lokalisierung des mutierten Hsp12 in lebenden Zellen beeinträchtigt ist, sollte über differentielle Zentrifugation der transformierten $\Delta HSP12$ -Zellen, wie unter 712.9.2 beschrieben, untersucht werden. Dazu wurden die Zellen bei 30°C für mindestens zwei Tage kultiviert. Die daraus erhaltenen Fraktionen wurden in identischer Proteinkonzentration über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot gegen Hsp12 analysiert. Sämtliche Deletionsfragmente und Substitutionsmutanten von Hsp12 konnten nach wie vor durch das polyklonale Antikörper-Serum erkannt werden (Abbildung 3-37). Vergleicht man in Abbildung 3-37 die Verteilung der verschiedenen Hsp12-Konstrukte in den verschiedenen Fraktionen, so fällt auf, dass $\Delta N10$, $\Delta N24$ und A26P ähnliche Muster wie Hsp12 aufwiesen. $\Delta N24$ war etwas weniger in der Membranfraktion zu finden und die Expressionsrate der Substitutionsmutanten schien im Vergleich mit anderen Konstrukten allgemein leicht herabgesetzt. Veränderungen des N-Terminus beeinflussten die Lokalisierung von Hsp12 allerhöchstens geringfügig. Anders verhielt es sich für C-terminale Bereiche ($\Delta C36$ und A84P). Die Interaktion mit Membranen in der Membranfraktion war drastisch herabgesetzt und auch der lösliche Anteil von $\Delta C36$ war deutlich reduziert. Letzteres ist möglicherweise auf eine verminderte Stabilität des Proteins aufgrund mangelnder Interaktion mit Lipiden zurückzuführen. A84P hingegen erschien weniger instabil, da nur ein kleinerer Teil der großen H4 Helix von der Umstrukturierung betroffen war und somit möglicherweise eine Interaktion mit Membranen von Organellen der cytosolischen Fraktion wie z.B. der Vakuole nicht auszuschließen sind. Bei allen untersuchten Mutanten war die Lokalisation in der Zellhülle nie beeinträchtigt, scheinbar war kein für den Transport relevanter struktureller Bereich betroffen.

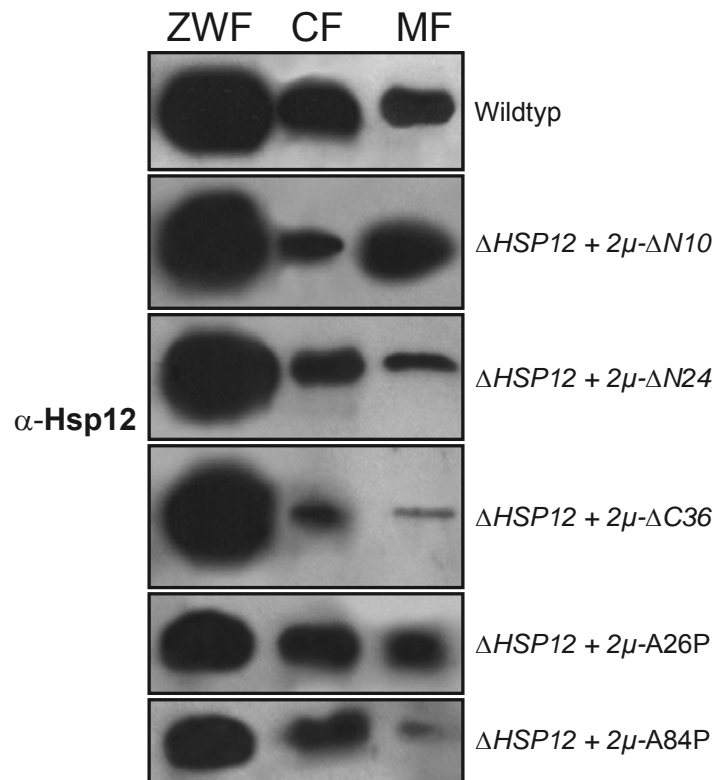


Abbildung 3-37 Western Blots der Zellfraktionierungen von Wildtyp-Zellen und *HSP12*-Mutanten exprimierender $\Delta HSP12$ -Zellen

Zellfraktionen (ZWF: Zellwandfraktion; CF: cytosolische Fraktion; MF: Membranfraktion) wurden mittels differentieller Zentrifugation (siehe 2.9.2) gewonnen, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot unter Verwendung von $\alpha\text{-Hsp12}$ analysiert. Die $\Delta HSP12$ -Zellen waren mit 2μ -Plasmiden transformiert, die unter Kontrolle des natürlichen Promoters von *HSP12* die Information für die *HSP12*-Mutanten trugen, und wurden bei 30°C auf Selektionsmedium gezogen.

Die Expression von dem 2μ -Plasmid, das die Information für die A84P Substitutionsmutanten trug, war trotz Selektionsmedium nicht stabil. Nach kurzer Zeit konnte das mutierte Hsp12 nicht mehr mittels Western Blot nachgewiesen werden, weshalb keine weiteren Analysen mit diesen Zellen durchgeführt wurden.

3.7.3 Die Zelloberfläche der Hsp12-Mutanten

HSP12-Deletionszellen wiesen bei elektronenmikroskopischen Analysen im Vergleich mit den typischen SEY6211 Wildtyp-Zellen eine stark beeinträchtigte Zelloberfläche auf. Mit $2\mu\text{npHSP12}$ transformierte $\Delta HSP12$ -Zellen schienen diese Defekte kompensiert zu haben (siehe 3.1.3 und Abbildung 3-38). Ob die Hsp12 Deletionsfragmente in der Lage sind, dem $\Delta HSP12$ -Phänotyp entgegenzuwirken und die volle Funktion von Hsp12 zu erfüllen, sollte im Folgenden untersucht werden.

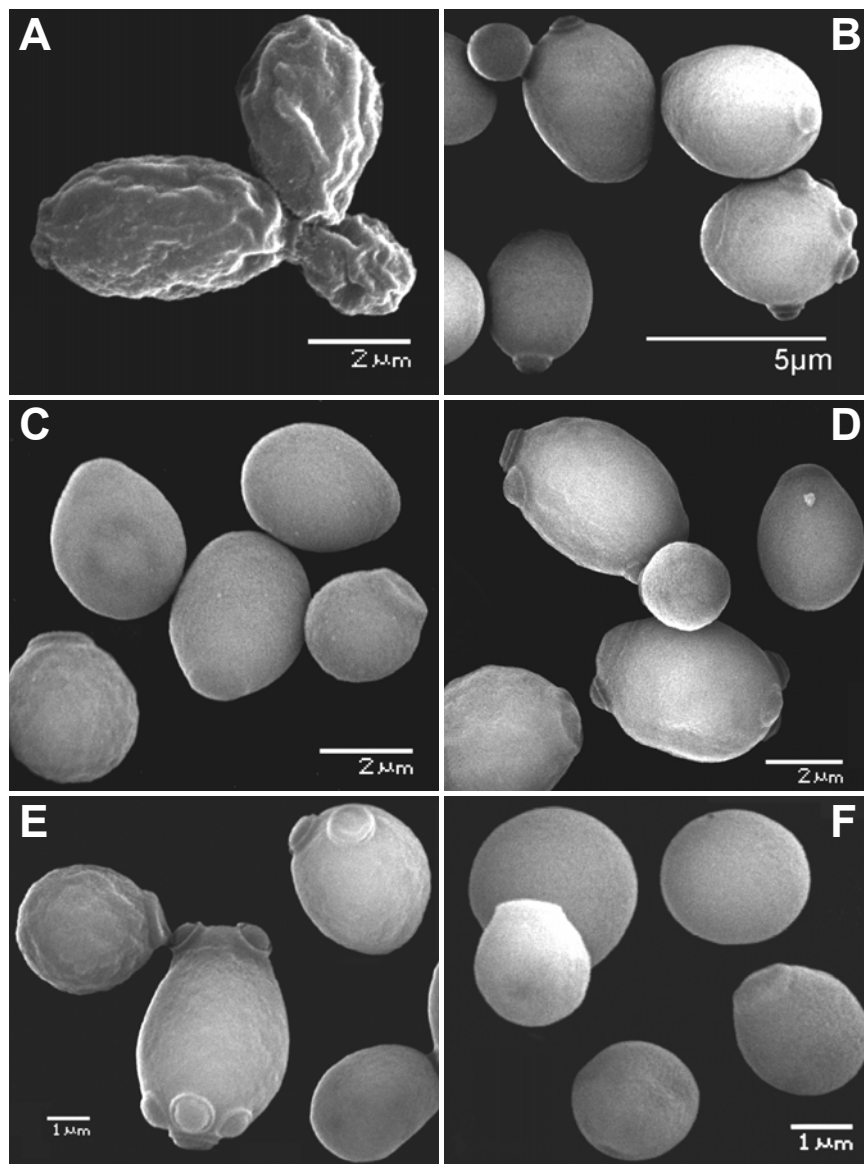


Abbildung 3-38 REM-Aufnahmen von $\Delta HSP12$ -(A), $\Delta HSP12$ -2 μ pHSP12- (B) und $HSP12$ -Mutanten exprimierenden $\Delta HSP12$ -Zellen

C: $\Delta HSP12$ -Zellen + 2 μ $\Delta N10$; **D:** $\Delta HSP12$ -Zellen + 2 μ $\Delta N24$; **E:** $\Delta HSP12$ -Zellen + 2 μ $\Delta C36$; **F:** $\Delta HSP12$ -Zellen + 2 μ $HSP12_{A26P}$; Die Zellen wurden auf Selektionsmedium bei 30°C für mindestens zwei Tage gezogen und wie unter 2.8.3 beschrieben für die Elektronenmikroskopie präpariert.

Wie in Abbildung 3-38 zu sehen ist, ähnelten die $\Delta HSP12_{\Delta N10}$ - und $\Delta HSP12_{A26P}$ -Zellen im Großen und Ganzen in Gestalt und Oberflächenbeschaffenheit Wildtyp-Zellen (siehe 3.1.3). So waren vorwiegend glatte Zellen ovaler Gestalt zu beobachten. $\Delta HSP12_{\Delta N24}$ -Zellen wiesen zum Teil eine leicht beeinträchtigte Oberfläche auf, einige Zellen schienen nicht mehr so eben und glatt wie Wildtyp-Zellen. Dieser Effekt war bei Kulturen aus $\Delta HSP12_{\Delta C36}$ -Zellen noch deutlicher zu sehen, die durch leichte Eindellungen und Unregelmäßigkeiten gekennzeichnet

waren. Dieses Deletionsfragment schien in Ermangelung der größten, C-terminalen Helix H4 am wenigstens in der Lage zu sein, die Funktion von Hsp12 vollständig zu erfüllen. Der Verlust oder die Beeinträchtigung der ersten oder zweiten N-terminalen Helix führte kaum zu Funktionsausfällen in der Zellhülle und konnte scheinbar fast vollständig kompensiert werden.

3.7.4 Wachstumstemperaturbereich der *HSP12* Mutanten

In einem nächsten Schritt galt zu ermitteln, ob Hsp12 mit Deletion N- oder C-terminaler Bereiche beziehungsweise mit Knick in Helix 2 durch Ersetzen eines Alanins gegen ein Prolin nach wie vor in der Lage ist, den Wachstumsdefekt der *HSP12*-Deletionsmutante bei hohen Temperaturen zu kompensieren. $\Delta HSP12$ -Zellen, die Wildtyp-*HSP12* unter Kontrolle des natürlichen Promoters exprimierten, wuchsen auf Agarplatten in einem Bereich von 33 bis 40°C ohne erkennbare Beeinträchtigung wie Wildtypzellen (siehe Abbildung 3-3). Sämtliche durch den Verlust von *HSP12* verursachten Wachstumsdefekte konnten kompensiert werden.

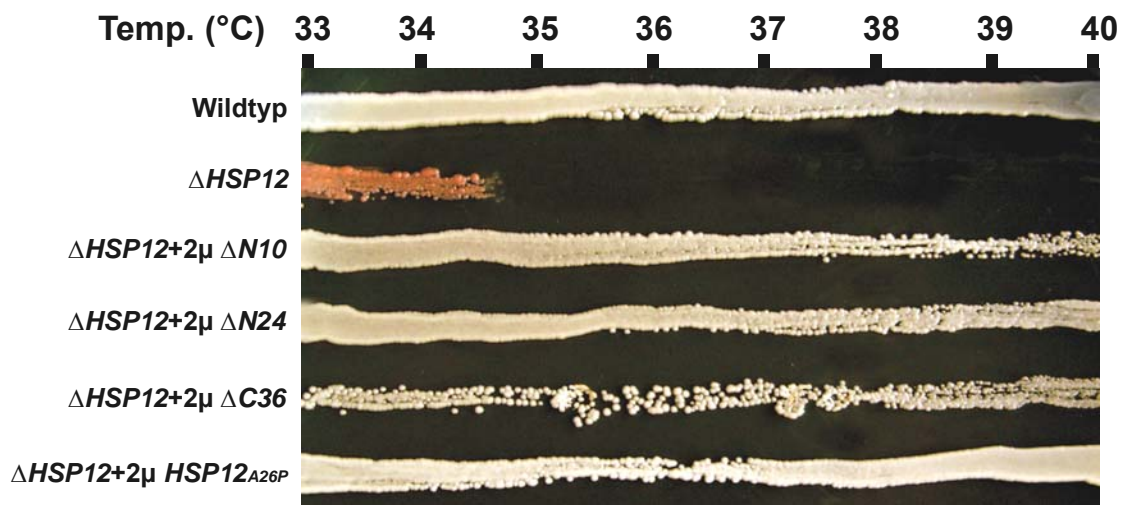


Abbildung 3-39 Wachstum der *HSP12*-Mutanten tragenden $\Delta HSP12$ -Zellen auf YPD Agar entlang eines Temperaturgradienten von 33 bis 40°C nach zwei Tagen Inkubation

In Flüssigmedium bei 30°C gewachsene Zellen wurden so auf Agarplatten ausgestrichen und diese derart platziert, dass ein Temperaturbereich von 33 bis 40°C auf der TGGE MAXI abgedeckt war. Nach zwei Tagen Wachstum konnte das Ergebnis abgelesen werden.

Alle auf Hitzesensitivität getesteten *HSP12*-Mutanten zeigten innerhalb des angesetzten Temperaturbereiches keine gravierenden Wachstumsnachteile (Abbildung 3-39), keine der deletierten oder veränderten strukturellen Bereiche von Hsp12 schienen bei Wachstum unter erhöhten Temperaturen eine funktionelle Rolle

zu übernehmen. Lediglich die Zellen, die die C-terminale Deletionsmutante exprimierten ($\Delta C36$), schienen im Wachstum leicht verzögert. Sie erreichten innerhalb der zwei Tage Inkubation nicht die gleiche Zelldichte wie die Vergleichsstämme, da einzelne, definierte Kolonien entlang des Ausstriches erkennbar blieben.

Auffallender Weise konnte die für $\Delta HSP12$ -Zellen typische Rotfärbung (siehe auch 3.1.2) für Deletionsmutanten tragende *HSP12*-knock-out-Zellen nicht mehr beobachtet werden. Auch dieser selbst bei Vollmedium auftretende Stoffwechseldefekt konnte sogar durch Expression der Hsp12-Fragmente ausgeglichen werden.

3.7.5 Translokation der Hsp12-Fragmente durch Phospholipid Modellmembranen

Hsp12 besitzt die Fähigkeit, Lipiddoppelschichten zu durchqueren, da zumindest ein gewisser Teil nach Inkubation mit großen, unilamellaren Lipidvesikeln (LUVs) durch Protease nicht mehr angegriffen wird (siehe 3.3.4). Ob die durch die eingefügten Mutationen oder Deletionen betroffenen Sequenzbereiche von Hsp12 an dieser Interaktion bzw. Import Reaktion beteiligt sind, sollte getestet werden. Dazu wurden erneut Lipidvesikel mit einem Durchmesser von 400 nm mittels Extrusion hergestellt (siehe 2.9.8). Diese bestanden aus zwei Teilen ungeladenem Phospholipid (POPC) und einem Teil aus Lipid mit negativer Nettoladung (POPG) und wurden zur Importreaktion mit Protein im Verhältnis 25:1 inkubiert und abschließend mit Proteinase K behandelt (Abbildung 3-40).

Sämtliche auf Translokation getesteten Hsp12-Deletionsmutanten bzw. Hsp12_{A84P} waren vor dem Proteaseangriff nicht geschützt. Während für Hsp12 ein deutliches Western Blot Signal bestehen blieb, das erst nach Auflösung der Vesikel mit SDS und Proteinase K Behandlung verschwand, war lediglich für $\Delta N10$ ein leichtes Signal detektierbar. Nach der zehnminütigen Inkubation der Hsp12-Mutanten mit LUVETs waren diese gegen Protease nicht resistent.

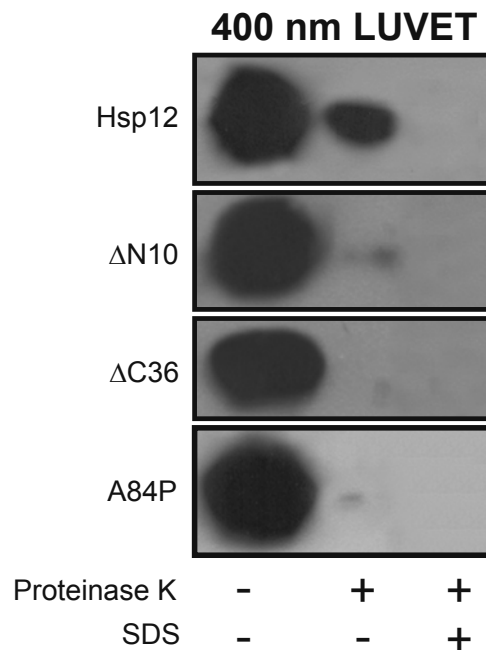


Abbildung 3-40 Western Blot der Translokationsversuche mit Hsp12-Deletions- und Substitutionsmutanten

Hsp12 bzw. Deletionsfragmente Δ N10, Δ C36 oder Substitutionsmutanten A84P wurden im Verhältnis 1:25 mit großen unilamellaren Vesikeln präpariert durch Extrusionstechnologie (LUVET) inkubiert und anschließend mit Proteinase K (und SDS) behandelt. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot

3.7.6 Sekundärstruktur und Lipid-Interaktionsanalyse von Hsp12_{A84P}

Hsp12 gehört zu der Gruppe nativ entfalteter Proteine und liegt unter physiologischen Pufferbedingungen unstrukturiert vor. In Anwesenheit mizellenbildender Verbindungen und Alkohol nimmt es allerdings α -helikale Struktur an (Fischer, 1999; Fischer, 2003). Darüber hinaus führt die Zugabe von Liposomen, bestehend aus Phosphatidylcholin und -serin, ebenfalls zur Ausbildung von Sekundärstruktur (persönliche Mitteilung, Elke Fischer). Eine Beeinflussung des Lipidphasenüberganges derartiger negativ geladener, kleiner unilamellarer Liposomen durch Hsp12 konnte mittels DSC nachgewiesen werden (siehe 3.4.1). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein Knick in der C-terminalen großen Helix (H4) verursacht durch Prolin, diese Eigenschaften beeinträchtigt.

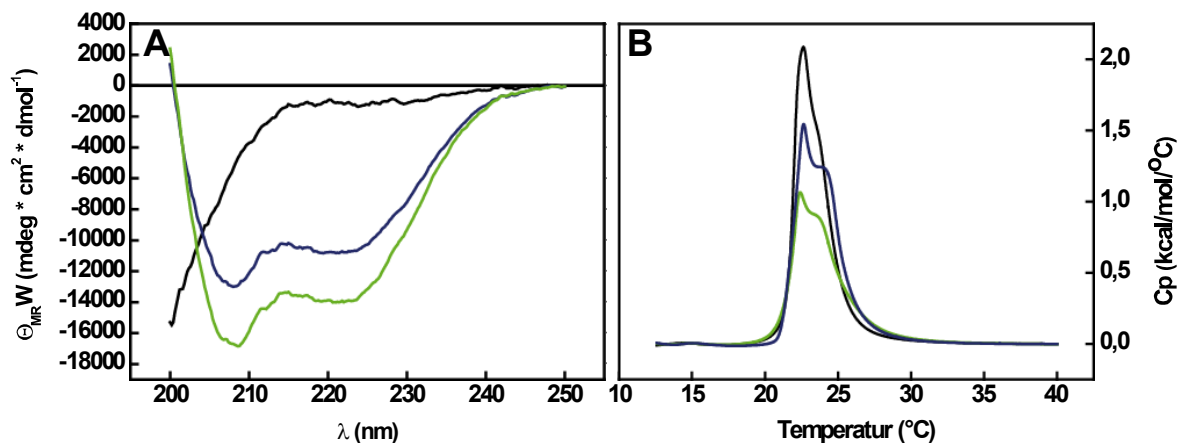


Abbildung 3-41 Sekundärstrukturanalyse (A) und kalorimetrische Untersuchungen zur Lipidinteraktion (B) von Hsp12_{A84P} im Vergleich mit Hsp12

A: Fern-UV-CD-Spektren von Hsp12_{A84P} (—) und Hsp12 (—) (0,17 mg/ml) in Anwesenheit von 10 mM SDS bzw. ohne SDS (—) in 10 mM Na-Phosphat, pH 7,4, Messbereich: 250 – 200 nm; Temperatur: 20°C; 0,1 cm Quarzküvette; Spektren wurden fünfmal akkumuliert und gegen Puffer korrigiert. **B:** Phasenübergang von SUVs aus DMPG alleine (schwarz) oder mit Hsp12_{A84P} (—) bzw. Hsp12 (—) im Verhältnis 30:1; Puffer: 10 mM Na-Phosphat, pH 7,4, 100 mM NaCl; Heizrate: 60°C/h; Temperaturbereich: 10 – 40°C; pro Lauf vier Scan-Zyklen.

Die Fern-UV-CD-Spektren aus Abbildung 3-41 (A) des nativen Hsp12_{A84P} (schwarze Kurve) gibt keinen Hinweis auf ausgedehnte α -helikale Bereiche oder β -Faltblätter innerhalb des Proteins, wie es für Hsp12 schon bekannt ist (Fischer, 1999). Die Zugabe von SDS führte bei Hsp12_{A84P} zur Entstehung eines dominanten Minimum bei 207 nm und eines schwächeren lokalen Minimums bei etwa 220 nm. In Anwesenheit von SDS erhält man also ein für α -helikale Bereiche typisches Fern-UV-CD-Spektrum. Berechnungen des α -helikalen Anteils von Hsp12 und Hsp12_{A84P} ergaben 40% und 30,4%. Der Gehalt an α -Helix wurde durch Austausch eines Alanins gegen ein Prolin signifikant herabgesetzt, mehrere Aminosäurenreste schienen von der Unterbrechung der Helix betroffen. Mit diesen Daten gingen kalorimetrische Analysen der Lipidinteraktion von Hsp12_{A84P} einher. Durch Zugabe von Hsp12_{A84P} zu kleinen unilamellaren DMPG-Vesikeln wurde das Kurvenmaximum des Lipidphasenüberganges von DMPG weit geringer reduziert als mit Wildtyp-Hsp12. Darüber hinaus ist die Änderung der Enthalpie von 5,5 kcal/mol von DMPG alleine auf 5,1 kcal/mol mit Hsp12_{A84P} vernachlässigbar gering. Die Interaktionsfähigkeit mit Lipid schien durch die Beeinträchtigung der C-terminalen Helix stark herabgesetzt.

4 Diskussion

4.1 Phänotypische Charakterisierung von $\Delta HSP12$ -Zellen

HSP12 wird unter den verschiedensten Stressbedingungen so stark überexprimiert, dass es sehr oft als Stressmarker bei Expressionsanalysen herangezogen wird (Ivorra et al., 1999; Simoes et al., 2003; Perez-Torrado et al., 2005). Dennoch ist die Funktion dieses kleinen, in wässriger Lösung unstrukturierten Proteins unbekannt. Analysen von *HSP12*-Deletionsmutanten ergaben keinen herausragenden Phänotyp, von morphologischen Veränderungen der Zellen und einer leichten Empfindlichkeit gegenüber einigen chemischen Verbindungen abgesehen (Praekelt und Meacock, 1990; Haslbeck, 2001). Die photometrische Verfolgung des Wachstums von $\Delta HSP12$ -Zellen und Wildtyp-Zellen bei 30°C ergab kaum einen Wachstumsnachteil der Deletionsmutante in Vollmedium. Allerdings verlangsamte sich das Wachstum der knock-out-Zellen dramatisch in definiertem Medium. Da *HSP12*-Transkripte anders als in Vollmedium in Minimalmedium bereits in der logarithmischen Wachstumsphase detektierbar sind (Praekelt und Meacock, 1990), war dies zu erwarten. Allerdings enthielt dieses Medium neben Glukose alle notwendigen Basen, Aminosäuren, Vitamine und Spurenelemente. Unter nicht optimalen Bedingungen, d.h. wenn nicht sämtliche Bausteine und Verbindungen frei zur Verfügung stehen, wie das im Vollmedium durch den Hefeextrakt der Fall ist, wird das Wachstum der $\Delta HSP12$ -Zellen negativ beeinflusst. Dementsprechend scheinen diese Zellen nicht in der Lage zu sein, sämtliche für optimales Wachstum benötigten Faktoren in der gleichen Zeit wie Wildtyp-Zellen aufzubereiten oder zur Verfügung zu stellen.

Auffallende Wachstumsdefekte der *HSP12*-knock-Deletionsmutante sind bei hohen Temperaturen zu beobachten - Bedingungen, bei denen *Hsp12* hundertfach überexprimiert wird (Praekelt und Meacock, 1990). Schon bei 34°C fiel ein langsames Wachstum auf bzw. war die Überlebensrate bei hohen Zellverdünnungen im *Drop-assay* stark herabgesetzt (Abbildung 3-2). Bei 37°C konnten $\Delta HSP12$ -Zellen keine Kolonien mehr bilden, mit etwa 34,5°C war auf dem Temperaturgradienten die maximale Wachstumstemperatur erreicht. Dies war vergleichbar mit der temperatursensitiven *SSA1/SSA2* Doppelmutante (Craig und Jacobsen, 1984) – zwei Vertreter der *Hsp70*-Familie, die unter anderem an der

Rückfaltung von Proteinen und dem Proteintransport durch Membranen beteiligt sind (Deshaies et al., 1988; Goloubinoff et al., 1999). Ein weiterer Kontrollstamm bei diesem Experiment stellte der $\Delta HSP104$ dar. Hsp104, ein molekulares Chaperone, hat bemerkenswerte Funktionen. Beispielsweise sind Hsp104 exprimierende Zellen nach einem Hitzeschock bei weitem überlebensfähiger als der dazugehörige Deletionsstamm (Sanchez und Lindquist, 1990). Die $\Delta HSP104$ Zellen wurden vor Inkubation auf dem Temperaturgradienten für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dennoch fiel nur ein leichter Wachstumsnachteil ab etwa 36°C auf. Der Temperaturbereich, bei dem $\Delta HSP12$ nicht mehr wächst, fällt also nicht in den Aufgabenbereich von Hsp104.

Der Phänotyp von $\Delta HSP12$ kann überwunden werden, wenn das intakte *HSP12*-Gen mittels eines Plasmides mit natürlichem Promotor in *HSP12*-Deletionsmutanten transfomiert wird. So ist dieser Temperatureffekt eindeutig auf den Verlust von *HSP12* bzw. dessen Protein zurückzuführen. In der Erstbeschreibung von Hsp12 konnte allerdings kein derartiger Phänotyp für die *HSP12*-Deletionsmutante festgestellt werden. Weder ein Einfluss auf die Thermotoleranz noch auf das Wachstum bei hohen Temperaturen war zu beobachten (Praekelt und Meacock, 1990). Diese Diskrepanz ist eventuell dadurch zu erklären, dass bei dieser Mutante nach Hitzeschock über Northernblot Analysen ein verkürztes Transkript von *HSP12* auffiel (Praekelt und Meacock, 1990). Das deutet darauf hin, dass *HSP12* nicht vollständig deletiert wurde und dieses Fragment ausreichte, um mögliche Wachstumsdefekte zu kompensieren. $\Delta HSP12$ -Zellen, die die in dieser Arbeit konstruierten Hsp12-Fragmente trugen, waren ebenfalls in der Lage, bei hohen Temperaturen zu wachsen (siehe 3.7.4).

Scheinbar sind also $\Delta HSP12$ -Zellen nicht in der Lage, selbst durch milde Temperaturerhöhungen verursachte Auswirkungen zu kompensieren und sich anzupassen - sie weisen eine ungewöhnliche Thermosensitivität auf. Möglicherweise liegt das daran, dass eine vollständige Hitzeschockantwort in diesen Zellen nicht mehr eingeleitet werden kann. Hsp12 wird also ähnlich wie Ssa1 und Ssa2 (Craig und Jacobsen, 1984) zum Wachstum im oberen Temperaturbereich benötigt, um negative Auswirkungen an Proteinen, Membranen, DNA oder anderen Komponenten und Strukturen abzublocken. Betrachtet man Wachstum im unteren Temperaturbereich, so fällt interessanter Weise genau der gegenteilige Effekt auf. $\Delta HSP12$ -Zellen wachsen bei 20°C auf YPD-Agarplatten eindeutig schneller als der

Wildtyp, sie sind im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen sogar bei 4°C noch in der Lage zu wachsen.

Es konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass das Absinken der Temperatur zu einem Erstarren der Membran führt, was konsequenter Weise zu einer Beeinträchtigung membranassoziierter, zellulärer Funktionen führt. Außerdem behindert Kältestress dramatisch membrangebundene Enzyme, verringert die Diffusionsrate und führt zu Clusterbildung integraler Membranproteine (Hazel, 1995). Zellen stellen aufgrund der Suppression der Proteinbiosynthese das Wachstum ein und die Expression sogenannter Kälteschockproteine (Csps) beginnt im Zuge der hypothermalen Adaption (Homma et al., 2003; Al Fageeh und Smales, 2006). Es findet eine Phase der Anpassung statt, wobei unter anderem versucht wird, die Fluidität der Membranen aufrechtzuerhalten. Induzierte Fettsäuredesaturasen und Dehydrasen erhöhen das Verhältnis mehrfach ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren und verkürzen evtl. deren Kettenlänge (Avery et al., 1995; Carty et al., 1999).

Hefen besitzen zwei unterschiedliche Systeme wie sie auf die Verringerung der Umgebungstemperatur und den damit einhergehenden negativen Effekten vor allem auf die Fluidität der Membran und membranassoziierte, zellulärer Funktionen (Hazel, 1995) reagieren. Zum einen gibt es die Kälteschockantwort, die in einem Bereich von 10 bis 18°C initiiert wird, zum anderen existiert bei Temperaturen $\leq 10^\circ\text{C}$ die „near-freezing“ Antwort (Kandror et al., 2004). Der Hauptunterschied dieser beiden Phasen begründet sich darin, dass Hefen bei 10 bis 18°C noch aktiv wachsen können, während bei niedrigeren Temperaturen das Wachstum normalerweise eingestellt wird. Bei der „near-freezing“ Antwort kommt es zunächst zur Induktion und starken Anhäufung von Trehalose, die essentiell für das Überleben nahe dem Gefrieren ist (Al Fageeh und Smales, 2006). Darüber hinaus werden verschiedene Gene der klassischen Stressantwort verstärkt exprimiert, *HSP12*, *HSP42*, *HSP104* und *SSA4* (Kandror et al., 2004). Bei der gemäßigten Kälteschockantwort hingegen wird Trehalose erst in einer sehr späten Phase induziert und fast alle *HSPs* werden herunterreguliert. Die Ausnahme bilden hierbei *HSP26*- und *HSP12*-Gene, die erneut verstärkt transkribiert werden (Sahara et al., 2002). Diese Erkenntnisse sind in Anbetracht der gemachten Beobachtungen bezüglich des Wachstums von $\Delta HSP12$ - und Wildtyp-Zellen bei tiefen Temperaturen äußerst interessant. Die Deletionsmutante wächst sogar unter „near-freezing“ Bedingungen im Gegensatz

zum Wildtyp. Das würde bedeuten, dass Hsp12 einen negativen Effekt auf Wachstum bei Kälte ausübt, da es unter 10°C verstärkt exprimiert wird. Der Wildtyp weist schon bei 20°C eine bedeutend höhere Verdopplungszeit auf und die Überlebensrate bei 15°C scheint zu sinken. Möglicherweise ist Hsp12 eine Art Temperatursensor und die Fähigkeit in Anwesenheit von SDS oder Liposomen Struktur anzunehmen (Fischer, 1999; Fischer, 2003), könnte dabei eine Rolle spielen. So könnte es beispielsweise in Abhängigkeit des physikalischen Zustandes der Membran (flüssig-kristallin oder Gelphase), also in Abhängigkeit der Temperatur, mit Lipiddoppelschichten interagieren, Struktur annehmen und nur dann eine bestimmte Funktion ausüben, während es ungebunden und damit ungefaltet eine andere Aufgabe übernimmt.

Bei Stressbedingungen wird Hsp12 überexprimiert (Boy-Marcotte et al., 1998; Gasch et al., 2000; Estruch, 2000) und führt wahrscheinlich zu Veränderungen der Membran, des Stoffwechsels und der Proteinexpression. Diese scheinen das Wachstum bei hohen Temperaturen zu begünstigen während es bei niedrigen Temperaturen zum Erliegen kommt. Möglicherweise wird die Zelle in ein Überdauerungsstadium versetzt, der Stoffwechsel auf ein Minimum eingestellt, bis die äußeren Umstände eine Zellvermehrung wieder erlauben. Hsp12 würde unter diesen Umständen den Wachstumstemperaturbereich von *S. cerevisiae* festlegen und verhindern, dass unnötig Energie zum Zwecke der Anpassung verbraucht wird. Die Tatsache, dass die im Zuge globaler Expressionsanalysen ermittelte *HSP12*-Expression nach Temperaturabsenkung von 37°C auf 25°C stark reprimiert wird (siehe Abbildung 1-4) (Gasch et al., 2000), könnte diese Annahme unterstützen, wenn man davon ausgeht, dass Hsp12 das Zellwachstum bei tieferen Temperaturen negativ beeinflusst. Somit kann die Zelle erst einmal versuchen, bei annehmbarem Energieaufwand unter den neuen Bedingungen zu wachsen. Möglicherweise ist das auch der Grund dafür, dass *HSP12* bei Temperaturen über 10°C erst in einer sehr späten Phase induziert wird. Eben dann, wenn die Energiebilanz ein weiteres Wachstum unökonomisch erscheinen lässt.

Ein weiteres sehr interessantes Phänomen, das bei diesen Versuchen auffiel, ist die rote Farbe der Δ *HSP12*-Kolonien und Zellen, die unter allen Wachstumsbedingungen auftrat. Diese ist, wie unter 3.1.2 erwähnt, auf eine Mutation im *ADE2* Gen der Adeninbiosynthese zurückzuführen. Unter Adeninmangel wird so während der Adeninbiosynthese das Intermediat AIR angehäuft, das unter Komplexierung,

Polymerisierung und Oxidation in der Vakuole eine rote Färbung annimmt. Bei Wachstum in Anwesenheit von Adenin wird dessen Biosynthese normalerweise reprimiert (Smirnov et al., 1967; Fisher, 1969). So ist bei Wildtyp-Zellen keinerlei Rotfärbung wahrnehmbar. Die ausnahmslose Rotfärbung der $\Delta HSP12$ -Zellen kann zwei Gründe haben. Zum einen wäre es möglich, dass die Deletionsmutante zum Aufrechterhalten der Lebensfunktionen und der Zellvermehrung einen erhöhten Energiebedarf hat, somit angebotene Nährstoffzusätze schneller verstoffwechselt und auf die Biosynthese umsteigen muss. Ein anderer Grund wären veränderte Eigenschaften der Zellhülle, die die Stoffaufnahme negativ beeinflussen könnten. So funktionieren beispielsweise einige Enzyme und Transportkanäle nur in einer liquiden lamellaren Phase der Membran, d.h. bei entsprechender Fluidität (Beney und Gervais, 2001). Falls der Stofftransport über die Plasmamembran bei $\Delta HSP12$ -Zellen negativ beeinträchtigt ist, muss auf zelleigene Biosynthese zumindest unterstützend zurückgegriffen werden, was zwangsläufig zur Rotfärbung führt - unabhängig vom Medium.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Zelloberfläche stationärer *HSP12*-Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen stark in Mitleidenschaft gezogen wurde. Ein in gewisser Hinsicht vergleichbarer Phänotyp ist bislang nur für zwei weitere Hefemutanten bekannt - die *HSP26* und *HSP42* Deletionsmutanten (Haslbeck, 2001). Überraschenderweise wurden eine große Ähnlichkeiten zu alternden Hefezellen beobachtet. Wie in Abbildung 4-1 zu sehen ist, weisen Zellen nach der achten Zellteilung ebenfalls extreme Unregelmäßigkeiten ihrer Oberfläche auf.

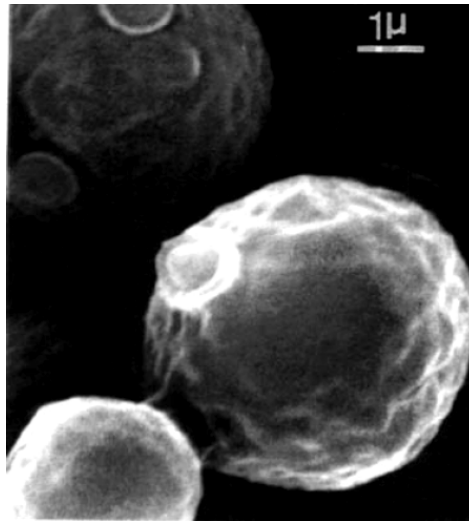


Abbildung 4-1 REM Aufnahme einer gealterten *S. cerevisiae* Zelle nach etwa acht Zellteilungen mit extrem unregelmäßiger Oberfläche

Abbildung aus: (Barker und Smart, 1996).

Auch diese Zellen besitzen eine durch Falten und Einbuchtungen gekennzeichnete Zellhülle, was typisch für den Alterungsprozess zu sein scheint (Muller, 1971; Barker und Smart, 1996). Weitere typische Phänotypen alternder Zellen stellen eine elongierte Gestalt und eine allgemeine Vergrößerung des Volumens dar (Walker, 1999). Beide Auffälligkeiten konnten auch für $\Delta HSP12$ -Zellen beobachtet werden. Allerdings waren bei der *HSP12*-Deletionsmutante nie mehr als zwei Knospungsnarben zu entdecken, wobei viele Knospungsnarben ein weiteres Charakteristikum gealterter Hefezellen darstellt (Walker, 1999).

Diese Parallelen in der Zellmorphologie gealterter Zellen und *HSP12*-Deletionsmutanten könnten auf einen Einfluss von Hsp12 auf die Steuerung des Alterungsprozesses hindeuten. Vielleicht wird dieser in Anwesenheit von Hsp12 verzögert.

Die beobachteten Oberflächeneigenschaften der $\Delta HSP12$ -Zellen könnten das Resultat der Präparationstechnik für die Elektronenmikroskopie sein. Dabei wird über eine Ethanolreihe den Zellen Wasser schrittweise entzogen. Dementsprechend könnte die eingedellte Zellhülle einen daraus resultierenden Effekt darstellen. Auf jeden Fall deuten die offensichtlichen morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen auf gravierende Veränderungen in der Zellwand letzterer hin. Es liegt wohl eine strukturelle Schwäche bei diesen Zellen vor, die zu Verformungen als Reaktion auf den Wasserentzug führt. Ob die raue, granuläre

Oberfläche, die bei näherer Betrachtung sichtbar wird (siehe Abbildung 3-6) ebenfalls auf die Präparation zurückzuführen ist, bleibt fraglich. Die äußerste Schicht der Zellwand besteht aus vernetzten Glykoproteinen, die die Porosität dieser Struktur bestimmen (De Nobel et al., 1990; Osumi, 1998). Das granuläre Erscheinungsbild könnte auf Proteinaggregation hindeuten, oder aber auf Entstehung von Regionen mit großer Dichte dieser Proteine aufgrund fehlerhafter Vernetzungen und Verknüpfungen. Im Großen und Ganzen kann davon ausgegangen werden, dass der Verlust von Hsp12 einen negativen Einfluss auf die Architektur und Integrität der Zellwand hat, da sämtliche negative Effekte durch erneutes Einbringen des Wildtyp-Genes kompensiert werden konnten.

Interessanter Weise waren derartige Effekte bei $\Delta HSP12$ -Zellen nicht oder nur kaum nach längerem Wachstum zu beobachten, wenn sie bei niedrigen Temperaturen inkubiert wurden (Abbildung 3-8, Abbildung 3-9). Dies geht wiederum einher mit der Annahme, dass Hsp12 für das Wachstum bei tiefen Temperaturen zunächst nicht benötigt wird. Erreichen die Zellen allerdings eine sehr späte stationäre Phase, treten erste Deformierungen auch dann auf. Morphologische Veränderungen konnten nach siebentägiger Inkubation auch für Wildtyp-Zellen beobachtet werden, was möglicherweise auf den Alterungsprozess zurückzuführen ist.

Das außergewöhnliche Erscheinungsbild von konstitutiv *HSP12* überexprimierenden Wildtypzellen (Abbildung 3-7) lässt erkennen, wie fein reguliert die Konzentration von Hsp12 normaler Weise innerhalb der Zelle ist. Ein Zuviel – wahrscheinlich gerade in der falschen Wachstumsphase - führt zu ähnlichen Defekten in der Zellmorphologie wie eine Deletion. Möglicherweise ist dieser feinabgestimmte Mechanismus bei einem Protein, das bei Eintritt in die stationäre Phase hundertfach überexprimiert wird (Praekelt und Meacock, 1990) auf die nativ entfaltete Natur von Hsp12 in wässriger Lösung bzw. in ungebundenem Zustand zurückzuführen. Bekannter Weise besitzen derartige Proteine sehr hohe Umsatzraten aufgrund ihrer ungefalteten Struktur (David et al., 2002; Fink, 2005). Somit wird es der Zelle eventuell durch den Stress-Sensor Hsp12 ermöglicht, aufgrund der schnellen regulativen Kontrolle, sehr rasch und sensitiv auf veränderte äußere Bedingungen zu reagieren. Auf der anderen Seite lässt sich so eventuell erklären, warum Wildtyp-Zellen bei tiefen Temperaturen nicht wachsen können im Gegensatz zu $\Delta HSP12$ -Zellen. Eben weil ein Zuviel an Hsp12 unter diesen Bedingungen negative Effekte auf die Zellteilung und die Stabilität der Zellhülle hat.

Ein weiterer Zellwanddefekt ließ sich durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Calcofluor White (CFW) aufdecken, der vorzugsweise an Chitinketten bindet (Pringle et al., 1989). Während bei stationären Wildtyp-Zellen typischer Weise hauptsächlich das in den Knospungsnarben befindliche Chitin angefärbt wurde, waren $\Delta HSP12$ -Zellen anscheinend nur von einer dünnen, gleichmäßig verteilten Chitinschicht umgeben (siehe 3.1.4). Es waren so gut wie keine mit Chitin angereicherten Stellen und dementsprechend auch keine Knospungsnarben zu sehen. Weiterführende Analysen den Chitingehalt betreffend enthüllten für *HSP12*-Deletionsmutanten einen stark herabgesetzten Anteil an diesem Polymer im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Dementsprechend kann von einer veränderten Chitinsynthese-Aktivität in $\Delta HSP12$ ausgegangen. Derartige Zellwandmutanten mit verändertem Chitingehalt werden in der Literatur häufig beschrieben und betreffen oftmals direkt Chitin-Synthesegene (Roncero et al., 1988a; Roncero et al., 1988b; Klis, 1994; Lussier et al., 1997; De Groot et al., 2001). Mutanten mit geringerem Anteil an Chitin sind meist resistent gegen CFW, was man sich bei der Suche nach Zellwandmutanten zunutze macht. Ähnliches konnte auch für $\Delta HSP12$ -Zellen beobachtet werden konnte, zumindest wiesen sie keine erhöhte Sensitivität gegen CFW auf (Haslbeck, 2001). Weitere Versuche mit höheren Konzentrationen an CFW könnten nähere Einblicke in die Funktion von Hsp12 geben.

Da Chitin zumindest nach Einlagerung in die lateralen Zellwände ein für die mechanische Stabilität der Zellwand wichtiger Bestandteil ist (Bulawa, 1993), ließe sich durch diese Ergebnisse eventuell die im Rasterelektronenmikroskop beeinträchtigte Zellhülle erklären. Allerdings darf nicht vernachlässigt werden, dass Chitin zumindest in den lateralen Zellwänden durch CFW in stationären $\Delta HSP12$ -Zellen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-10). Die Instabilität der Zellwand muss weitere Gründe haben, möglicherweise ist sie direkt auf den Verlust von Hsp12 als integralen Bestandteil der Zellwand zurückzuführen. Chitin spielt bei der Knospung eine sehr große Rolle (Shaw et al., 1991). Da es kaum in Knospungsnarben von *HSP12*-Deletionsmutanten nachgewiesen wurde, können auf jeden Fall die beobachteten Knospungsdefekte erklärt werden.

Die Frage bleibt aber, auf welche Weise Hsp12 Einfluss auf die Zellwand ausübt, da es viele mögliche Angriffspunkte gibt. Proteine werden beim Aufbau der Zellwand für die Synthese und den Transport von Substrat, beim Anlegen, der Elongation, der Verzweigung und der Termination von Polymerketten benötigt. Außerdem muss die

Zellwandsynthese in Abhängigkeit intrazellulärer und extrazellulärer Signale geregelt werden (Klis, 1994). Einerseits werden strukturelle Komponenten durch einen plasmamembrangebundenen Enzymkomplex synthetisiert, der die wachsende Polymerkette in den periplasmatischen Raum entlässt. Andererseits werden Zellwandproteine intrazellulär exprimiert und glykosyliert und über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert (Klis, 1994). Dementsprechend kann die Zellwandzusammensetzung auch durch Mutationen, die den sekretorischen Transportweg betreffen, beeinträchtigt werden. Ob Hsp12 ein direkter struktureller Bestandteil der Zellwand ist, konnte nicht geklärt werden. Allerdings konnten an aus Hefe gereinigtem, nativem Hsp12 keine Modifikationen, Verknüpfungsstücke oder Glykosylierungen festgestellt werden (Fischer, 2003).

Eine weitere sehr effiziente Methode, Veränderungen in der Zusammensetzung oder Struktur der Zellwand zu gewinnen, ist der Sensitivitätstest gegenüber Lytikase oder anderen β 1,3-Glukanase enthaltenen Enzympräparationen (De Nobel et al., 1990; De Groot et al., 2001). Die meisten so ermittelten Zellwandmutanten weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Glukanasen auf. Δ HSP12-Zellen scheinen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen allerdings äußerst resistent gegenüber Lytikase-Angriffen, selbst nach einer Stunde Inkubation mit 400 U Enzym (siehe 3.1.6). Ein Grund dafür könnten Abweichungen der Zellwand in der Permeabilität gegenüber glykolytischen Enzymen darstellen, die aus Veränderungen in der β 1,3-Glukan Schicht oder der externen Glykoproteinschicht resultieren (De Nobel et al., 1991; Ovalle et al., 1998). Möglicherweise versucht die Hefezelle der durch den Verlust von Hsp12 verursachten Verminderung der Stabilität entgegenzuwirken, verdichtet die Glukan- bzw. Glykoproteinschicht, verändert die Verteilung einzelner Zellwandkomponenten und maskiert darüber hinaus Bereiche, die Angriffspunkte für die Lytikase darstellen. So wurde von Zellwandmutanten ohne Chitinsynthase III Aktivität berichtet, die einen erhöhten Anteil an alkali-löslichem (d.h. nicht mit Chitin vernetztem) Glukan besaßen (Bulawa, 1993). Ein ähnliches Phänomen, die Sensitivität gegenüber glykolytischer Enzyme betreffend, kennt man aus Zellen fortgeschrittenen Alters bzw. der stationären Wachstumsphase (De Nobel et al., 1990). Während dieser Phase kommt es neben der vermehrten Einlagerung von Chitin in die lateralen Zellwände, zur Einlagerung für diese Wachstumsphase spezifischer Proteine, Erhöhung der Vernetzung und damit zu einer Veränderung der Permeabilität und einem Gewinn an Festigkeit (De Nobel et al., 1990; Shimoi et al.,

1998). Um den Verlust an Hsp12 und dem daraus resultierenden Mangel an Chitin und möglichen weiteren Zellwandkomponenten zu kompensieren, versuchen die $\Delta HSP12$ -Zellen, evtl. auf Kosten der Flexibilität die Zellwand zu stabilisieren. Dadurch könnte es bei dem Wasserentzug während der REM-Präparation zu den beobachteten Verformungen der Zelloberfläche kommen.

4.2 Die *in vivo* Lokalisation von Hsp12

Phänotypische Analysen lassen vermuten, dass Hsp12 ein für die Stabilität, die Flexibilität, die Architektur und Integrität der Zellwand wichtiger Bestandteil ist. Ob Hsp12 eine derartige mögliche Funktion direkt oder indirekt ausüben könnte, sollte über Lokalisationsstudien herausgefunden werden.

Hsp12 kann nach Auftrennung von Spermoblasten-Lysat im Saccharosegradienten in unterschiedlichen Mengen, aber in nahezu jeder Fraktion nachgewiesen werden, wobei das Western Blot-Signal für Hsp12 bei hohen Saccharosekonzentrationen zunimmt, vergleichbar mit dem Markerprotein für die Plasmamembran (siehe Abbildung 3-12). Bei Verwendung von ganzen Zellen änderte sich die Verteilung dramatisch. Nun wurde der Großteil an Hsp12 bei niedrigen Zuckerkonzentrationen detektiert. Da dabei Zellen mit gesamter Zellhülle verwendet wurden, sollten sich bei niedriger Saccharosekonzentration lösliche Proteine anreichern, da die kovalent mit dem Glukannetzwerk verbundenen Proteine mit Zellwandbruchstücken sedimentieren müssten. Demzufolge kann angenommen werden, dass sich ein Großteil von Hsp12 in löslicher Form in der Zellhülle befindet. Fraktionierungsversuche bestätigten diese Annahme, da dabei das intensivste Signal in der Zellwandfraktion auszumachen war. Diese wurde durch Behandlung ganzer Zellen mit Natronlauge gewonnen. Dadurch werden alkalilösliche Proteine und alkalilösliches Glukan herausgelöst (Fleet, 1991; Mrsa et al., 1999) und so die Zellwand durchlöchert. Zu den alkalilöslichen Proteinen gehören die sogenannten PIRs, die durch einen nicht bekannten Linker zur Glukanschicht und interne Sequenzwiederholungen gekennzeichnet sind. Sie sind innerhalb der inneren Zellwandschicht verteilt, direkt mit dem β 1,3-Glukan verknüpft und können die Permeabilität der Zellwand stark herabsetzen (Mrsa et al., 1997; Kapteyn et al., 1999). Vielleicht ist Hsp12 auf ähnliche Art und Weise relativ lose in der Zellwand lokalisiert, verknüpft durch seine

flexible Struktur viele Zellwandbausteine miteinander und trägt dadurch zur Stabilität vor allem unter Stressbedingungen bei. Oder aber es gehört zu der Gruppe der Scwps, der löslichen, nicht kovalent verknüpften Zellwandproteine, die allerdings größtenteils von sekretorischen Proteinen mit einer Signalsequenz für den klassischen Exportweg bestritten wird (Klebl und Tanner, 1989; Cappellaro et al., 1994). In der Sequenz von Hsp12 konnte keine derartige Signalsequenz gefunden werden.

Nicht zu vernachlässigen ist der Teil von Hsp12, der sich in der cytosolischen und Membranfraktion befindet. Es erscheint doch sehr ungewöhnlich für ein Protein, nicht eindeutig einem Kompartiment zugeordnet werden zu können, wie beispielsweise die verwendeten Markerproteine. Dabei ist die Kompartimentalisierung ein wichtiges Charakteristikum eukaryotischer Zellen (Walker, 1999), das effizient geordnete Reaktionen erlaubt. Um dies aufrecht zu erhalten, hat die Zelle hochselektive Translokationsmaschinerien entwickelt, die dafür sorgen, dass jedes Protein an den für ihn vorhergesehenen Ort gelangt (Gunkel et al., 2005). Entweder besitzt Hsp12 keine Funktion, die an einem spezifischen Ort ausgeübt werden muss, sondern erfüllt in hohen Konzentrationen eher eine allgemein protektive Aufgabe, oder es fungiert als eine Art Signalmolekül.

Ein Grund für die starke Präsenz dieses Proteins in allen drei Zellfraktionen ist wohl die starke Überexpression bei Eintritt in die stationäre Phase (Praekelt und Meacock, 1990). Demnach verwundert es nicht, dass es in der cytosolischen Fraktion detektiert werden konnte. Möglicherweise ist die intrazelluläre Umsatzrate von Hsp12 so hoch, dass es ständig nachsynthetisiert werden muss, was auf eine Rolle als Signalmolekül hindeuten würde.

Der Anteil in der Membranfraktion und der Zellwandfraktion lässt zudem eine direkte Funktion des Proteins in der Zellhülle vermuten. Möglicherweise assoziiert Hsp12 an die Außen- oder Innenseite der Plasmamembran, nimmt dort α -helikale Struktur an wie *in vitro* in Anwesenheit von SDS oder Liposomen (Fischer, 1999; Fischer, 2003; Dehner, 2004). Eventuell wird es dann erst funktionell und kann so eine stabilisierende Wirkung auf die Zellhülle ausüben. Eine dauerhafte Integration in die Membran kann jedoch ausgeschlossen werden, einmal aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des Moleküls (mit 22 negativ geladenen und 18 positiv geladenen AS-Resten; berechnet über ProtParam tool), zum anderen lässt es sich durch Proteinase K Behandlung vollständig aus der Zellwand-, cytosolischen und Membranfraktion

entfernen (siehe Abbildung 3-16). Dies wäre für ein integrales Membranprotein nicht zu erwarten. Ein Durchqueren von Membranen verschiedener Zellorganellen kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden. Außerdem zeigt dieser Versuch, dass Hsp12 nach Verdau der Zellwand löslich vorliegt, was die Annahme eines periplasmatischen oder lediglich lose mit der Zellwand verknüpften Proteins unterstützt.

Darüber hinaus konnte Hsp12 aus der Membranfraktion eindeutig der Plasmamembran zugeordnet werden, wobei eine weitere Assoziation an das ER oder Organellen ähnlicher Dichte nicht ausgeschlossen werden kann (Abbildung 3-15). Hsp12 lagert sich an die Vakuole, möglicherweise auch an kleinere Vesikel und frühen Golgi, die sich in der cytosolischen Fraktion befinden. Mit Sicherheit ist auch ein löslicher Teil dabei. Diese Assoziation an Membranen verschiedener Organellen könnte einerseits ein unspezifischer Prozess sein, andererseits ein Schutzmechanismus gegen schnellen Abbau des ansonsten ungefalteten Proteins darstellen, wie es für nativ entfaltete Proteine bekannt ist (Fink, 2005). So konnte für Hsp12 gezeigt werden, dass es in Anwesenheit von SDS, also mit α -helikaler Struktur, viel resistenter gegen Proteinase K ist, als in wässriger Lösung, in der es unstrukturiert vorliegt (Fischer, 1999).

Die Expression von Hsp12 verhält sich nicht homogen über die verschiedenen Wachstumsstadien von *S. cerevisiae*, sondern es erfolgt eine starke Überexpression bei Eintritt in die stationäre Phase, während kaum Transkripte in der logarithmischen Phase detektiert wurden (Praekelt und Meacock, 1990). Daher lag es nahe, die Verteilung von Hsp12 in Abhängigkeit von der Zelldichte einer Wildtyp-Kultur zu verfolgen. Parallel wurden Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen aus den entsprechenden Wachstumsphasen für die REM präpariert. In der frühen logarithmischen Phase, wenn sich eine kleine Menge von Hsp12 ausschließlich in der cytosolischen Fraktion von Wildtyp-Zellen befindet, können auch keine morphologischen Veränderungen an $\Delta HSP12$ -Zellen ausgemacht werden. Erst mit Zunahme des Hitzeschockproteins in der Zellwandfraktion, manifestieren sich Deformationen an der Zelloberfläche der Deletionsmutante (Abbildung 3-18). Diese Korrelation zwischen der Hsp12-Lokalisation und den zeitgleichen morphologischen Veränderungen des knock-out-Stammes festigt erneut die Annahme, dass Hsp12 selbst und direkt die Stabilität und Architektur der Zellwand beeinflusst. Und zwar erst dann, wenn es vor Ort und

eventuell durch die Interaktion mit der Membran in einen aktiven Zustand übergeht. Gleiche Resultate wurden für hitzegeschockte Zellen aus der frühen logarithmischen Phase festgestellt. Erst nach der Temperaturerhöhung konnte Hsp12 in der Zellhülle nachgewiesen werden, was wiederum mit einer Deformierung zunächst wohlgeformter $\Delta HSP12$ -Zellen einherging (Abbildung 3-19). Möglicherweise arbeitet Hsp12 mit Zellwandproteinen wie Sed1p zusammen, dessen Funktion ebenfalls noch nicht vollständig geklärt ist und das ferner wie Hsp12 bei Eintritt in die stationäre Phase oder unter Stressbedingungen überexprimiert wird. Sed1p verringert die Permeabilität und erhöht die Festigkeit stationärer Zellwände (De Nobel et al., 1990; Shimoï et al., 1998) und übt wahrscheinlich eine allgemeine protektive Rolle aus (Gasch et al., 2000; Boorsma et al., 2004; Hagen et al., 2004). Interessant in diesem Zusammenhang wäre, ob Sed1p aufgrund des Hsp12-Verlustes überexprimiert wird.

4.3 Translokation von Hsp12 durch Lipidmembranen

In diesem Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Hsp12 in der Lage ist, sowohl Hefemembranen, Membranen von *E. coli* als auch synthetische Lipiddoppelschichten zu durchqueren. Dieser offensichtlich unspezifische Prozess lässt annehmen, dass keine Translokationsmaschinerie zur Zelloberfläche (Gunkel et al., 2005) in Anspruch genommen wird. Allerdings gilt zu bedenken, dass die Importversuche (3.3.2 und 3.3.4) nicht ausschließen, dass Hsp12 lediglich tief in die Lipiddoppelschichten bzw. deren geladenen Kopfgruppen der großen Lipidvesikel bzw. der Hefemembran eintaucht und so vor dem Proteaseangriff geschützt wird. Der hohe Anteil an rekombinanten Hsp12 im zellfremden System *E. coli* deutet jedoch auf eine wirkliche Translokation durch Membranen hin. Die Frage, wie dieser Prozess sich vollzieht bleibt allerdings offen. Hsp12 besitzt in seiner N-terminalen Sequenz keine Bereiche, die einer bekannten Signalsequenz entsprechen könnten. Demzufolge gehört es nicht der Gruppe der Sekretionsproteine an und beschreitet nicht die klassischen Wege an die Zelloberfläche über ER und Golgi-Apparat (Palade, 1975). Neben dieser generellen Signalsequenz existiert für Zellwandproteine eine zusätzliche Erkennungssequenz, über die sich derartige Proteine identifizieren lassen – das GPI-Anker Signal. Es besteht aus einer hydrophoben C-terminalen Sequenz aus mindestens 12 Aminosäuren, gefolgt von

einem kurzen Abschnitt polarer Aminosäuren. Dieses Signal wird im ER abgespalten, durch einen GPI-Anker ersetzt, woraufhin der Transport an die Zelloberfläche über den Sekretionsweg erfolgt (Udenfriend und Kodukula, 1995). Eine posttranslationale Modifikation konnte bei aus Hefe gereinigtem Hsp12 allerdings ebenfalls nicht detektiert werden (Fischer, 2003). In Säugerzellen sind einige Proteine ohne Sekretionssignal bekannt, die aber dennoch, meist nach posttranslationaler Modifikation, exportiert werden können und somit unabhängig vom klassischen Exportweg sind (Muesch et al., 1990). In Hefe sorgt beispielsweise Ste6p, ein ABC-Transporter, für den nicht-klassischen Export des Paarungsfaktors α , ein kurzes carboxymethyliertes und isoprenyliertes Peptid (Michaelis und Herskowitz, 1988). Außerdem gibt es Grund für die Annahme weiterer nicht-klassischer Exportwege in *S. cerevisiae*, die möglicherweise unter Stressbedingungen angeschaltet werden (Cleves et al., 1996). Es ist also keineswegs auszuschließen, dass Hsp12 auch ohne bekannte Signalsequenz einen Weg an die Zelloberfläche findet. Die Fähigkeit, selbst synthetische Lipidvesikel zu durchqueren, deutet auf einen Mechanismus ohne Beteiligung von Transportern oder Kanalproteinen hin. Derartige energieunabhängige Translokationsprozesse von z.B. Penetratinen – durch Membranen passierende Peptide - sind ebenfalls in der Literatur beschrieben (Derossi et al., 1998). So ist eine bestimmte Domäne des Transkriptionsfaktors Antennapedia aus *Drosophila* in der Lage, unabhängig von der klassischen Endozytose Zellmembranen zu durchqueren und dabei sogar hydrophile Verbindungen zu transportieren. Diese Domäne nimmt in Anwesenheit von SDS-Mizellen eine amphipatische helikale Struktur an. (Berlose et al., 1996; Derossi et al., 1994). Außerdem konnte für ganz bestimmte Lipide die Bildung reverser Mizellen bei Zugabe dieses Peptides beobachtet werden. Man vermutet, dass es aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zu einer Anhäufung des Peptides an der Membranoberfläche kommt, die Ausbildung inverser Mizellen schließt das Peptid ein und führt zur Destabilisierung der Membranorganisation. Derart abgeschottet kann das geladene Lipid die Membran durchqueren (Derossi et al., 1998). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für das hydrophile Hsp12 denkbar, da es an SDS-Mizellen ebenfalls eine amphipatische α -helikale Struktur annimmt (Dehner, 2004). Ein weiteres, diese Hypothese unterstützendes Beispiel aus der Literatur stellt das einzigartige Protein Mistic aus *Bacillus subtilis* dar (Roosild et al., 2005). Trotz seiner hydrophilen Natur integriert Mistic vollständig unabhängig von der zellulären

Translokationsmaschinerie in die bakterielle Membran. Dieses ungewöhnliche integrale Membranprotein bildet ein Helixbündel mit überraschend hydrophiler Oberfläche aus, was eine Interaktion mit Lipiddoppelschichten eigentlich undenkbar macht. Dementsprechend kann die Polarität von Hsp12 nicht zwangsweise gegen einen Durchtritt durch die Plasmamembran unabhängig von der Translokationsmaschinerie sprechen.

4.4 Interaktion von Hsp12 mit synthetischen Membranen

Es konnte durch die Assoziation an Zellorganellen bzw. die Translokation durch Lipiddoppelschichten gezeigt werden, dass Hsp12 mit Membranen interagiert. Mittels Kalorimetrie sollte die Art und Weise dieser Interaktion ermittelt werden.

Hsp12 übte einen eindeutigen Effekt auf das thermotropische Verhalten von negativ geladenem Lipid aus, während keine Interaktion mit ungeladenem bzw. zwitterionischem Lipid beobachtet werden konnte. Dieser Effekt steht in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge, was die Annahme einer Interaktion zwischen Hsp12 und DMPG noch weiter unterstützt. Qualitativ gesehen stellen die Haupteffekte, die bei der Phasenumwandlung negativ geladener Lipidvesikel durch Zugabe von Hsp12 beobachtet werden konnten, folgende dar. Es kam zu einem gravierenden Verlust der Kooperativität, zu einer Abnahme des Kurvenmaximums und zur Ausbildung eines zusätzlichen Kurvenmaximums. Dieses komplexe Profil des Lipidphasenüberganges von DMPG bei hohen Hsp12-Konzentrationen deutet auf Ausbildung von separierten Domänen in der Lipiddoppelschicht hin, wie sie schon für andere geladene, membranbindende Proteine beschrieben wurden (Papahadjopoulos et al., 1975; Shiffer et al., 1993). Diese Domänenstruktur ist auf Membranbereiche mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften zurückzuführen. Sie bestehen aus fluiden, hydratisierten Regionen mit möglicherweise starken Krümmungen, die sich neben rigideren Regionen hoher Hydrophobizität befinden (Riske et al., 2003). Hsp12 scheint in hoher Konzentration in der Lage zu sein, die Gestalt und Struktur einer Membran zu beeinflussen. Außerdem deuten die Verbreiterung des Kurvenverlaufes und die Abnahme der Enthalpie in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration auf eine teilweise Penetration des Proteins in die hydrophobe Schicht des Lipidbilayers hin, da durch die

Interkalation hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Fettsäureketten gestört werden. Ähnliche Effekte auf den Lipidphasenübergang konnten für andere mit Lipiden interagierende Proteinen beschrieben werden (Barrera et al., 2003), allerdings weisen Membranproteine wie das Apolipoprotein A-I (apoA-I), Cytochrom C und ein virales Membranfusionspeptid viel gravierendere Effekt auf den Phasenübergang auf und haben somit eine höhere Affinität zu Lipiden (Papahadjopoulos et al., 1975; Palgunachari et al., 1996; Aranda et al., 2003). So ändert sich die Enthalpie des Phasenübergange um mehr als die Hälfte durch weitaus geringere Mengen an Apo A-I als in den Versuchen mit Hsp12 (Palgunachari et al., 1996).

Die Affinität von Hsp12 zu Lipid ist also relativ gering, was auf einen reversiblen Prozess hindeutet und die Dynamik dieses Proteins deutlich macht. Fraglich bleibt allerdings, ob die Membran ohne gravierendere Destabilisierung derselben durchquert werden kann. Entweder ist dieser Prozess sehr schnell, oder sehr stark abhängig von der Lipidspezies, d.h. der Kettenlänge und des Grades der Sättigung. Die für die Importversuche verwendeten Lipide mit einer Doppelbindung und längeren Fettsäureketten als DMPG, waren für die DSC-Analyse ungeeignet, da sie keinen scharfen Phasenübergang aufweisen.

Das Phänomen zwischen geladenem und ungeladenem Lipid zu differenzieren, ist beispielsweise für das antibakterielle Peptid Melittin bekannt. Die Bindung an negatives Lipid ist um den Faktor Hundert stärker als an zwitterionische und in Anwesenheit von negativem Lipid wird die Membranlyse durch dieses Peptid inhibiert (Ghosh et al., 1997).

Auch bei Bindungsstudien an synthetische Membranen mittels ITC, konnte diese Differenzierung zwischen positivem und ungeladenem Lipid reproduziert werden. An kleine Lipidvesikel mit niedrigem Anteil an negativer Ladung (10%) konnte keine Bindung von Hsp12 mehr festgestellt werden. Dies geht einher mit früheren Beobachtungen positive oder ungeladene, mizellenbildende Verbindungen betreffend, die keine Strukturbildung in Hsp12 induzieren konnten (Fischer, 1999).

Anionische Phospholipide spielen eine große Rolle bei Lipid-Protein-Wechselwirkungen, Membraninsertionen und Translokationen durch die Membran (de Kruijff, 1994). Viele anionische Lipide, wie Phosphatidylserin und -inositol bei *S. cerevisiae*, werden in Eukaryoten an der Membranninnenseite der Plasmamembran gefunden (van der Rest et al., 1995). Möglicherweise wird es Hsp12 so ermöglicht,

spezifisch an die cytosolische Seite der Membran zu binden und evtl. durch Strukturänderungen gerichtet die Membran zu durchqueren. Befinden sich auf der Membranaußenseite keine negativen Ladungen, würde Hsp12 somit in den periplasmatischen Raum entlassen. Derartige ladungsabhängige Bindungen induzieren häufig die Ausbildung von Domänen in Membranen ausgelöst durch die Lipid-Protein-Interaktionen (Mbamala et al., 2005) wie sie auch durch Hsp12 detektiert werden konnten.

Unter Verwendung gemischter Vesikel (POPC/POPG 2:1) konnte mittels ITC eindeutig ein exothermer Bindungsprozess von Hsp12 beobachtet werden. Dieser vollzog sich biphasisch, was aus der sukzessiven Strukturbildung der α -Helices oder konzentrationsabhängigen Umlagerungen der Membran aufgrund einer eventuellen Translokation von Hsp12 resultieren könnte. Die Stärke der Bindung von Hsp12 mit $7,14 \pm 2,79 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ist in etwa vergleichbar mit der des positiv geladenen Melittins mit $4,5 \pm 0,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ - allerdings stellt das den Wert nach Korrektur elektrostatischer Effekte dar (Beschiaschvili und Seelig, 1990). Verglichen mit apoA-I mit einer Assoziationskonstante an POPC von $4,1 \pm 0,9 \times 10^6$ (Arnulphi et al., 2004) ist die für Hsp12 deutlich geringer. ApoA-I ist ein kleines Protein, das die Hauptkomponente des humanen HDL (high-density Lipoprotein) darstellt (Fielding und Fielding, 1995). Durch die Bindung an Lipid wird der Gehalt an amphiphiler α -Helix stark erhöht und man geht davon aus, dass diese Bindung aus nichtklassischen hydrophoben Wechselwirkungen resultiert, wobei die Strukturausbildung die treibende Kraft bei der Assoziation darstellt (Arnulphi et al., 2004). Ähnliches könnte für Hsp12 zutreffen, das bei Bindung an SDS-Mizellen α -helicale Struktur annimmt, wobei geladene Reste der Helix nach außen ragen und mit den geladenen Kopfgruppen des SDS interagieren. Ungeladene Aminosäuren sind in die SDS-Mizelle gerichtet, wodurch hydrophobe Interaktionen ermöglicht werden (Dehner, 2004). Die Bindung von Hsp12 an Lipidvesikel scheint aber im Wesentlichen durch elektrostatische Wechselwirkungen bedingt zu werden, da sowohl bei hoher Salzkonzentration als auch in Abwesenheit von negativen Ladungen mittels ITC keine Bindung an Vesikel mehr beobachtet werden konnten.

Vergleichbares ist für α -Synuklein bekannt, ein hochkonserviertes präsynaptisches Protein, das mit neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson in Verbindung gebracht wird (Davidson et al., 1998). α -Syn ist ein nativ entfaltetes Protein, das lediglich an negativ geladene und nicht an ungeladene Phospholipidvesikel oder

Detergenzmizellen bindet und dabei α -helikale Struktur annehmen kann (Davidson et al., 1998). Mittels NMR konnte gezeigt werden, dass die gesamte membranbindende N-terminale Region von α -Syn eine ausgedehnte, amphiphile α -helikale Konformation ohne stabile Tertiärstruktur ausbildet (Chandra et al., 2003; Bisaglia et al., 2006). Im Gegensatz zur Interaktion von α -Syn mit künstlichen Membranen, ist die Bindung an biologische Membranen reversibel und beruht nicht auf elektrostatische Wechselwirkungen (Kim et al., 2006). Darüber hinaus ist einer Interaktion zwischen α -Syn und biologischen Membranen nur dann zu beobachten, wenn lipid- und proteinfreie cytosolische Komponenten dem Ansatz hinzugefügt wurden. Die Zugabe dieser Komponenten zu künstlichen Vesikeln resultierte ebenfalls in einer ladungsunabhängigen Bindung von α -Syn (Kim et al., 2006). Die Interaktion von α -Syn mit Membranen stellt einen strikt regulierten Prozess dar, der unabhängig von Protein- und Lipidkomponenten zu sein scheint. Ob Hsp12 in ähnlicher Weise zwischen künstlichen und natürlichen Membranen differenziert, und ob cytosolische Komponenten die Interaktion von Hsp12 mit Membranen beeinflussen, sollte untersucht werden.

Außergewöhnlich erschien die für das mit rund 12 kDa relative kleine Hsp12 hohe über ITC-Messungen ermittelte Anzahl (etwa 2350) von Lipidbindungsstellen. Für Lipidvesikel mit einem Durchmesser von 30 nm lässt sich abschätzen, dass sie aus ca. 6000 Lipiden bestehen, wovon zwei Drittel, also ca. 4000, auf der Außenseite der Membran und 2000 auf der Innenseite der Vesikel liegen (Prof. Seelig, persönliche Mitteilung). Dementsprechend kann man schlussfolgern, dass sich pro Lipidvesikel maximal zwei Proteinmoleküle entweder wegen der starken Krümmung der Vesikeloberfläche oder möglicherweise aus sterischen Gründen, binden lassen. Dann ist der Vesikel abgesättigt. Damit wäre Hsp12 in einer wohl eher gestreckten Konformation auf der Membran zu erwarten, könnte so netzartig schnell große Bereiche abdecken und dementsprechend leicht die Stabilität oder Fluidität der Plasmamembran beeinflussen, was mit den vorherige Beobachtungen übereinstimmt.

4.5 Lipid- und Proteomanalysen ganzer Zellen

Mittels Massenspektrometrie konnten gravierende Unterschiede im Gesamtlipid von Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen aus der stationären Wachstumsphase ermittelt werden. Stationäre $\Delta HSP12$ -Zellen wiesen eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierte Menge an extrahierbarem Gesamtlipid auf, die sich kaum zu der Menge aus logarithmisch wachsenden Zellen unterschied. Bei Wildtyp-Zellen aus der stationären Wachstumsphase hingegen konnte eine Zunahme des Lipidgehaltes festgestellt werden, wie das für Hefezellen unter Stressbedingungen bekannt ist (Sajbidor et al., 1995). Durch den Verlust von Hsp12 konnte dieser Regulationsmechanismus scheinbar nicht aufrechterhalten werden. Möglicherweise ist die Lipidsynthese oder der Einbau von Lipiden in die Membran gestört.

Darüber hinaus waren Unterschiede in der Verteilung der Lipidklassen zwischen den Zellen zu beobachten. Am auffälligsten ist die Zunahme von PE in stationären $\Delta HSP12$ -Zellen. PE wird als Nicht-Bilayer-Lipid bezeichnet und hohe Konzentrationen können Membraneigenschaften v.a. deren interne Krümmung beeinflussen (de Kruijff, 1987; Dowhan, 1997). Zusätzlich können durch äußeren Stress wie erhöhte Temperaturen Nicht-Bilayer-Strukturen induziert werden, die zu Membrandefekten führen und die Permeabilität der Membran beeinflussen können. Dementsprechend muss während Hitzestress deren Bildung unterdrückt werden (Dowhan, 1997). Dies könnte aufgrund der hohen Konzentration an PE in der Deletionsmutante nicht möglich sein, wodurch der Wachstumsdefekt bei hohen Temperaturen erklärt werden könnten. Aber selbst unter Normalbedingungen könnte es dadurch im *HSP12*-knock-out zusätzlich zu der herabgesetzten Lipid-Gesamtmenge zu einem Defekt in der Packung der Lipide auf Kosten der Stabilität kommen, was wiederum durch eine Verdichtung der Zellwand kompensiert werden könnte, wie man es bei $\Delta HSP12$ -Zellen gefunden hat (siehe 3.1.6).

Gravierende Unterschiede waren zwischen molekularen Lipidspezies der einzelnen Lipidklassen aus stationären Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen zu bemerken. Die *HSP12*-Deletionsmutante enthielt im Vergleich zu Wildtyp-Zellen in vielen untersuchten Lipidklassen einen größeren Anteil an mehrfach ungesättigten Lipiden – d.h. je eine Doppelbindung pro Fettsäurekette. Noch auffallender war die Verschiebung hin zu langkettigen Fettsäuren in $\Delta HSP12$ -Zellen. Derartige Differenzen fielen bei logarithmisch wachsenden Zellen, also wenn nur sehr wenig Hsp12-Expression stattfindet, kaum auf. Somit sind sämtliche Unterschiede auf den Mangel an Hsp12

zurückzuführen. Fettsäureanalysen mittels Gas-Chromatographie machten diese Unterschiede zwischen stationären Wildtyp- und $\Delta HSP12$ -Zellen noch deutlicher. Darüber hinaus wurde ausschließlich im Lipidextrakt aus $HSP12$ -Deletionsmutanten Linolsäure detektiert – eine Fettsäure mit 18 C-Atomen und zwei Doppelbindungen. *S. cerevisiae* gehört jedoch eigentlich zu den wenigen Pilzen, die lediglich einfach ungesättigte Fettsäuren bilden können (Kobayashi et al., 1987; Botha und Kock, 1993). Neben der Fähigkeit, sämtliche benötigten Fettsäuren selbst zu synthetisieren, ist diese Hefe allerdings in der Lage, eine Vielzahl langkettiger gesättigter und mehrfach ungesättigter Fettsäuren aus dem Medium aufzunehmen und in die Membran zu integrieren (Bossie und Martin, 1989; Choi et al., 1996). Jedoch selbst nach Wachstum in definiertem Medium, konnte Linolsäure in $\Delta HSP12$ -Zellen detektiert werden, was eine eigene Synthese impliziert. Der Grund für eine bisher nie beobachtete Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren in $\Delta HSP12$ -Zellen muss der dringende Bedarf danach sein, durch Änderung der Zusammensetzung von Fettsäureketten die Membranfluidität, die Dicke oder die Krümmung aufgrund einer massiven Störung darin anzupassen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu überprüfen, ob aufgrund des Mangels an Hsp12 eine bisher unbekannte Desaturase induziert wird. In *S. cerevisiae* sorgt das chimäre ER-Protein Ole1p, das aus einer an Cytochrom b_5 fusionierten Desaturase-Domäne besteht, für die Produktion einfach ungesättigter Fettsäuren aus gesättigten Fettsäure-Vorläufern. Weitere Desaturasen, die zusätzlich Doppelbindungen einfügen, wie sie in anderen Pilzen gefunden wurden, sind für *S. cerevisiae* nicht bekannt (Martin et al., 2006).

Die Verschiebung zu langkettigen Fettsäuren führt zwangsläufig zu einer Abnahme der Fluidität, da zum einen die Packung dichter wird zum anderen die Temperatur des Lipidphasenüberganges im Vergleich zu kurzkettigen Fettsäuren steigt (van der Rest et al., 1995; Huang und Li, 1999). Möglicherweise sollen so Defizite in der Stabilität ausgeglichen werden, oder aber die Synthese, der Transport oder der Einbau kurzkettiger, ungesättigter oder gesättigter Fettsäuren ist durch den Mangel an Hsp12 gestört. Diesem Effekt des Erstarrens der Membran wird dann wohl durch Synthese und Einbau von Linolsäure entgegengewirkt, denn mit Zunahme der Doppelbindungen wird die Fluidität der Membran erhöht (Thomas et al., 1978; Beney und Gervais, 2001). Derartige Gegenmaßnahmen gegen einen Defekt sind aus der Literatur bekannt. So wird in Hefestämmen, die nicht in der Lage sind, PC zu

synthetisieren, dieser Mangel durch Anhebung des PE- und PI-Gehaltes, durch allgemeine Verkürzung der Kettenlängen und Erhöhung des Sättigungsgrades ausgeglichen (Boumann et al., 2006). Offen bleibt allerdings, worauf ein potentieller Defekt in Membranen aus $\Delta HSP12$ -Zellen zurückzuführen ist. Möglicherweise trägt Hsp12 durch Anlagerungen an und Abdeckung eines großen Bereiches der Membran selbst zu deren Stabilität bei. Oder es spielt eine Rolle bei der Synthese von Phospholipiden, Sphingolipiden und Ergosterolen, die hauptsächlich im ER und weniger in den Mitochondrien stattfindet (van der Rest et al., 1995). Dadurch könnten bei Hsp12-Mangel die Lipidzusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften der Membranen gestört werden. Lipide sind innerhalb der Zelle nicht wahllos verstreut, weder zwischen den verschiedenen Organellen und noch zwischen der äußeren und inneren Lipidschicht der Plasmamembran (Holthuis und Levine, 2005). So finden sich beispielsweise PE und PS in *S. cerevisiae* hauptsächlich in der cytosolischen Schicht der Plasmamembran (van der Rest et al., 1995). Neben dem Lipidtransport über Vesikel und deren Verschmelzung mit Membranen, existieren weitere Mechanismen, die für eine gewisse Asymmetrie und einen gezielten Transport von Lipiden sorgen (Holthuis und Levine, 2005). Dabei halten beispielsweise energieabhängige Flippasen die Asymmetrie der Plasmamembran aufrecht (Seigneuret et al., 1984). Außerdem findet ein sogenanntes „lipid sorting“ entlang des endozytotischen und exozytotischen Weges statt, so dass sich kein Gleichgewicht in der Lipidverteilung zwischen Plasmamembran und ER einstellen kann. Dementsprechend befinden sich Sphingolipide und Cholesterol, obwohl sie im ER synthetisiert werden und Cholesterol sich spontan zwischen benachbarten Membranen hin und her bewegen kann, angereichert in der Plasmamembran (Holthuis und Levine, 2005). Darüber hinaus existieren sogenannte Lipid-Transferproteine (LPTs), die energieunabhängig und sehr spezifisch Lipide durch die wässrige Phase der Zelle transportieren (Wirtz, 1991). Diese Proteine wurden als cytosolische Proteine eingeordnet, heute vermutet man, dass es sich um periphere Membranproteine handeln könnte (Sha et al., 1998; Schouten et al., 2002). Da Hsp12 sowohl cytosolisch als auch membrangebunden vorkommt und in der Lage ist, Lipide zu binden, könnte es eine ähnliche Funktion wie LPTs übernehmen und so die Lipidzusammensetzung beeinflussen.

Die Zunahme an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Membranen der *HSP12*-Deletionsmutante könnte die Erklärung dafür sein, warum diese Zellen bei hohen Temperaturen nicht mehr wachsen können. Es gibt nämlich einen Zusammenhang zwischen dem physikalischen Zustand der Membran und der Expression von Hitzeschockproteinen. So wird durch Änderungen der Lipidzusammensetzung die Temperaturschwelle, die zur Initiation der Hsp-Synthese führt, beeinflusst. Große Mengen an ungesättigten Fettsäuren in Membranen verzögern die Induktion der Hitzeschockantwort (Chatterjee et al., 1997), bzw. konnte sogar gezeigt werden, dass die direkte Zugabe von ungesättigten Fettsäuren zu einer Reduktion oder sogar Eliminierung der Hitzeschockgen-Transkription führte (Carratu et al., 1996; Chatterjee et al., 2000). Möglicherweise können aufgrund dieser Tatsache in Δ *HSP12*-Zellen keine Hsps induziert werden, wodurch das Wachstum ab etwa 35°C nicht mehr möglich ist. Dass es in diesen Zellen zu einer im Vergleich zum Wildtyp völlig unterschiedlichen Aktivierung von Genen kommt, konnte mittels 2D-Gelelektrophorese gezeigt werden. Die Proteinmuster der beiden Zelltypen differierten so stark voneinander, dass kein Vergleich möglich war. Diese dramatische Abweichung in der Expression von Δ *HSP12*-Zellen könnte auch über veränderte Eigenschaften der Membran erklärt werden. Beispielsweise funktionieren viele Membranproteine, wie einige respiratorische und Transportproteine nur in der flüssig-kristallinen Phase von Lipiden (McElhaney, 1989; Beney und Gervais, 2001). Sind diese also in ihrer Funktion beeinträchtigt, wäre die Zelle genötigt, den gesamten Stoffwechsel umzustellen. Möglicherweise führt das dann auch noch zu Modifikationen der Proteine, womit die fehlerhafte MS-Analyse zu erklären wäre.

Analysen der Membranfluidität ganzer, mit DPH markierter Zellen ergaben für Δ *HSP12*-Zellen bei 30°C im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöhte Anisotropiewerte (siehe 3.5.2), was direkt mit einer herabgesetzten Fluidität der Plasmamembran korreliert. Dies ist wohl auf die starke Zunahme langkettiger Fettsäuren auf Kosten kurzkettiger zurückzuführen. Da die Fluidität der Membran maßgebend für die Funktion verschiedener Proteine ist (McElhaney, 1984; McElhaney, 1989), muss diesem Effekt entgegengewirkt werden. So lässt sich die Notwendigkeit der Synthese und des Einbaus der für *S. cerevisiae* ungewöhnlichen Fettsäure Linolsäure erklären. Die für den Wildtyp bestimmten Anisotropiewerte stimmen mit solchen aus der Literatur überein (Dowhan, 1997; Beney und Gervais, 2001), allerdings können abhängig von der Wachstumsphase, den äußeren Bedingungen und wohl auch vom

Hefestamm für Wildtyp-Hefezellen viel höhere Werte als für $\Delta HSP12$ -Zellen detektiert werden (Mukhopadhyay et al., 2002; Kaur und Bachhawat, 1999). Die Unterschiede in der Fluidität zwischen $\Delta HSP12$ - und Wildtyp-Zellen sind aber durchaus vergleichbar mit Literaturwerten. So weisen Wildtyp-Zellen und Zellen mit Deletionen verschiedener Ergosterolsynthesegene eine ähnliche Diskrepanz in den Fluoreszenzanisotropiewerten auf (Kaur und Bachhawat, 1999; Mukhopadhyay et al., 2002).

Die dynamischen und strukturellen Eigenschaften von Membranen stellen also aufgrund ihrer flüssig-kristallinen Natur einen sehr empfindlichen Parameter gegenüber äußeren Bedingungen dar. Dementsprechend einfach kann diese Struktur gestört werden und Zellen müssen dafür sorgen, dass die dynamischen Fähigkeiten, die als Grundlage vieler zellulärer Prozesse eine lebenswichtige Funktion darstellen, aufrechterhalten werden (Beney und Gervais, 2001). Es ist also durchaus vorstellbar, dass der Unterschied in der Membranzusammensetzung und somit in der Membranfluidität evtl. im Zusammenspiel mit der veränderten Permeabilität der Zellwand des $\Delta HSP12$ -Stammes ausreicht, um zu einer veränderten Stoffaufnahme zu führen. Dies könnte dann einen Wachstumsnachteil bei der Kultivierung auf definiertem Medium oder bei hohen Temperaturen nach sich ziehen und zu einem vollständig veränderten Metabolismus und zur Expression eines stark modifizierten Gen-Satzes führen. So konnte beispielsweise für ein Bakterium aufgrund niedriger Inkubationstemperatur eine Abnahme der Membranfluidität festgestellt werden, die wiederum im direkten Zusammenhang mit der Reduktion der Affinität von Transportproteinen zu Substrat stand (Nedwell, 1999). Als weiteres Beispiel in diesem Zusammenhang sei die Überproduktion von α -Synuclein in neuronalen Zellen und dessen Deletion in Mäusen genannt. Diese führte zu Veränderungen in der Fettsäureaufnahme und Metabolismus und in der Membranfluidität (Sharon et al., 2003; Golovko et al., 2005; Castagnet et al., 2005). Tiefe Temperaturen führen zu einer Abnahme der Fluidität von Membranen (Beney und Gervais, 2001), was für Wildtyp-Zellen, die bei 16,5°C inkubiert und vermessen wurden, gezeigt werden konnte. Dadurch lässt sich wohl auch die Unfähigkeit dieser Zellen bei noch tieferen Temperaturen zu wachsen, erklären. Um die Struktur und die dynamischen Eigenschaften von Membranen aufrechtzuerhalten, verändern Zellen im Zuge der Anpassung die Zusammensetzung ihrer Membranen. So besitzen psychrophile Hefen mehr ungesättigte Fettsäuren als thermotolerante (Watson,

1978). Auf den ersten Blick verwundert es, dass $\Delta HSP12$ -Zellen bei einer allgemein reduzierten Membran-Fluidität überhaupt bei tiefen Temperaturen – sogar bis 4°C – wachsen können. Zum einen muss allerdings bedacht werden, dass bei den Anisotropie-Messungen lokale, dynamische Fähigkeiten der Lipide nicht repräsentiert werden. Zum anderen ändert sich die Fluidität bei $\Delta HSP12$ -Zellen nicht in Abhängigkeit der Wachstumstemperatur, was auf einen bestimmten Anpassungsmechanismus hindeutet. Bei diesem als „homeoviscous adaptation“ bezeichneten Mechanismus spielen Lipid-Protein-Interaktionen eine große Rolle (Sinensky, 1974; Yeagle, 1989). Da die $HSP12$ -Deletionsmutante trotz geringerer Fluidität, verglichen mit Wildtyp-Zellen, in der Lage ist, bei tiefen Temperaturen zu wachsen, ist eine veränderte Membranzusammensetzung, auch was eingelagerte Proteine betrifft, durchaus vorstellbar. Der erhöhte Gehalt an PE könnte eine zusätzliche Einlagerung von Membranproteinen begünstigen (de Kruijff, 1987; Dowhan, 1997) und so der verminderten Fluidität entgegenwirken.

Somit stellt sich Hsp12 als ein Protein dar, das die Fluidität der Plasmamembran aufrechterhalten bzw. beeinflussen kann. Ob dies ein direkter Effekt des Proteins ist, sollte an synthetischen Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung noch getestet werden. Die Temperatur des Lipidphasenüberganges von synthetischen negativ geladenen Lipidvesikeln bestehend aus DMPG oder DMPC wurde zumindest nicht oder nur kaum beeinflusst.

4.6 Hsp12-Fragmente

In vivo Untersuchungen von Hsp12-Fragmenten bzw. Substitutionsmutanten zeigten, dass die entfernten bzw. veränderten Bereiche von Hsp12 nicht maßgebend zu dessen Funktion beitragen. So wiesen lediglich die in $\Delta HSP12$ -Zellen exprimierten Fragmente einen leichten Phänotyp auf, die Mutationen der großen C-terminale α -Helix, die sich in Anwesenheit von SDS ausbildet, betrafen. $\Delta C36$ und A84P waren bei Fraktionierungen weniger in der Membranfraktion vertreten, was auf eine abgeschwächte Affinität zu Lipid hindeutet. Dadurch und der daraus folgenden Strukturlosigkeit lässt sich auch die geringe Menge an $\Delta C36$ in der cytosolischen Fraktion erklären. Damit läge es also ungefaltete im Cytosol vor und wäre sehr sensitiv gegenüber Proteasen.

Diese Annahmen konnte für A84P durch DSC-Messungen mit negativ geladenen Lipid und Strukturmessungen mittels CD-Spektroskopie bestätigt werden. A84P interagiert bedeutend geringer mit Lipid und bildet viel weniger α -helikale Struktur in Anwesenheit von SDS aus. Dennoch scheint der Transport an die Zellperipherie dadurch kaum beeinflusst, da – wie für alle Mutanten - ein intensives Western Blot-Signal in der Zellwandfraktion detektiert werden konnte. Wie auch alle anderen untersuchten Mutanten war A84P allerdings nicht in der Lage, synthetische Lipidmembranen zu durchqueren, was im Widerspruch zu den Lokalisationsstudien steht. Scheinbar müssen sich die amphiphilen Helices korrekt ausbilden und die richtige Lage zueinander einnehmen, um einfache Modellmembranen zu durchqueren, während in der Zelle dieser Defekt kompensiert werden kann. Möglicherweise werden dort zusätzlich unbekannte, effiziente Transportmechanismen oder Kanäle genutzt, um die Plasmamembran zu durchqueren, wobei die Struktur des Proteins nicht von Belang zu sein scheint. Dies würde auch erklären, warum eine so große Menge an Hsp12 in der Zellwandfraktion detektiert wird, während nur ein kleiner Teil des eingesetzten Wildtyp-Proteins bei Importversuchen vor Proteaseabbau geschützt ist (vergleiche Abbildung 3-13 mit Abbildung 3-24). Interessanter Weise führte keine der untersuchten Hsp12-Mutanten zu einem Wachstumsnachteil bei hohen Temperaturen. Scheinbar spielt es keine Rolle, wie viele Helices sich an Membranen ausbilden oder welche Lage sie zueinander einnehmen können. Stabilisierende Effekte können anscheinend nach wie vor aufrechterhalten werden, bzw. werden denkbare Mängel wohl anderweitig kompensiert. Möglicherweise wurden durch die vorgenommenen Deletionen und Mutationen keine wichtigen funktionellen Bereiche getroffen. Zumindest leichte morphologische Veränderungen konnten für $\Delta HSP12$ -Zellen aufgezeigt werden, die $\Delta C36$ exprimierten. Somit scheint die C-terminale Helix an der Stabilisierung der Zellhülle beteiligt zu sein.

4.7 Modell für Hsp12

Sämtliche durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zusammennehmend kann für die Lokalisation und Funktion von Hsp12 folgendes in Abbildung 4-2 gezeigtes Modell erstellt werden.

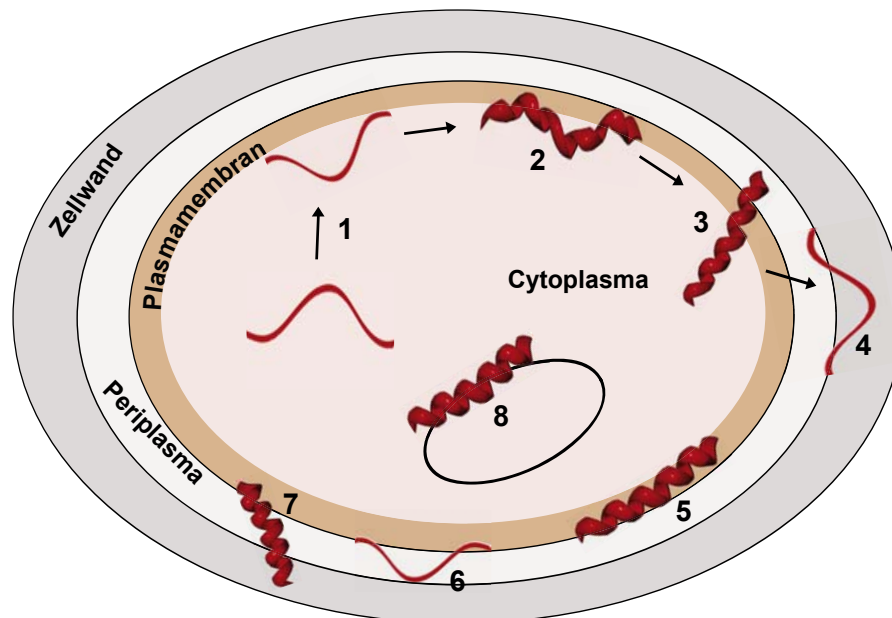


Abbildung 4-2 Lokalisationsmodell von Hsp12 in einer Hefezelle

Erklärung zu Nummerierungen: siehe Text

In Abhängigkeit von der Wachstumsphase werden zunehmende Mengen an Hsp12 im Cytosol von *S. cerevisiae* synthetisiert. Dieses wird auf einem nicht klassischen Sekretionsweg (1) mit zunehmendem Fortschreiten der Wachstumsphase an die Plasmamembran transportiert und assoziiert dort mit negativ geladenem Lipid an der cytosolischen Seite der Membran. Dadurch kann es α -helikale Struktur annehmen (2) und ist so vor einem proteolytischen Abbau geschützt. Aufgrund eines unbekannten Mechanismus kommt es zur Translokation durch die Plasmamembran (3). Dies kann ein sehr schnelles Durchtreten der Lipiddoppelschicht sein, bei dem es zu einer vorübergehenden Umorganisation der Membranstruktur und Ausbildung von Domänen kommt, oder aber ein Mechanismus, bei dem spezielle, effiziente Transportmechanismen zusätzlich involviert sind. In der Zellperipherie angelangt kann es sich, wenn keine negativ geladenen Lipide vorhanden sind, von der Membran lösen und liegt dann unstrukturiert, nicht kovalent gebunden in der Zellwand vor (4). Dort könnte es aufgrund seiner großen Flexibilität zur Vernetzung der Glukane und damit zur Stabilität der Zellwand beitragen. Hsp12

kann außerdem gebunden und mit α -helikaler Struktur an negative Bereiche der Plasmamembranaußen- oder innenseite vorliegen (5,2), wobei die relativ schwache Bindung wahrscheinlich reversibel ist. Durch diese Eigenschaft wäre unter anderem eine Funktion in der Signaltransduktion denkbar, wenn es im gebundenen und strukturierten Zustand aktiv wäre und so in der Lage ist, Signale zu übertragen. Andererseits kann es große Bereiche der Plasmamembran abdecken, da ein Molekül Hsp12 etwa 2350 Lipide absättigt, und so zur Stabilität oder Fluidität als Weichmacher der Membran beitragen. Als lösliches Protein (6) im periplasmatischen Raum könnte es als Signalmolekül oder als Lipidtransporter tätig sein. Von der Membran in die Zellwand hineinragend (7) wäre eine Funktion bei der Synthese oder des Transportes von Zellwandbausteinen anzunehmen. Oder aber es trägt selbst zur Vernetzung der Zellhülle und damit zur Stabilität bei. Darüber hinaus findet sich ein Teil von Hsp12 assoziiert mit bestimmten Zellorganellen wie z.B. der Vakuole, was ein Schutz gegen proteolytischen Abbau darstellen könnte.

Zusammenfassend lässt sich Hsp12 als ein Protein der Zellhülle beschreiben, das direkt oder indirekt zur Stabilität der Zellwand beiträgt und das in der Lage ist, die physikalischen Eigenschaften der Plasmamembran und darüber hinaus die Genexpression maßgeblich zu beeinflussen.

5 Zusammenfassung

Zellen wie auch *S. cerevisiae* reagieren auf plötzliche Umgebungsänderungen mit der Expression einer Vielzahl verschiedener Gene. Dies stellt einen Schutzmechanismus der Hefezellen vor einem Schaden durch äußere Einwirkungen dar. Hsp12, ein kleines Hitzeschockprotein aus *S. cerevisiae*, wird unter sehr vielen verschiedenen Arten von Stress außergewöhnlich stark exprimiert. Dieses Protein besitzt keine Chaperonfunktion und gehört einer neuen Familie von Hitzeschockproteinen an, den nativ entfalteten. Die Lokalisation und Funktion des in wässriger Lösung unstrukturierten Proteins sollte in dieser Arbeit untersucht werden. *HSP12*-Deletionsmutanten erwiesen sich als äußerst thermosensitiv. So konnte im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen bei Temperaturen oberhalb von circa 35°C ohne Hsp12 kein Wachstum mehr aufrechterhalten werden. Andererseits waren $\Delta HSP12$ -Zellen in der Lage, die untere Wachstumsgrenze zu verschieben und sogar noch bei 4°C Kolonien zu bilden.

Hsp12 ließ sich mittels verschiedener Fraktionierungsmethoden neben einem kleinen Anteil im Cytosol vor allem in der Zellhülle, d.h. der Zellwand, dem periplasmatischen Raum und assoziiert mit der Plasmamembran nachweisen. Die Lokalisation zeigte sich als abhängig vom Wachstumsstadium, da sich erst mit fortschreitendem Alter der Kultur eine zunehmende Menge an Hsp12 in der Zellhülle befand. Diese Beobachtung korrelierte wachstumsphasenabhängig direkt mit einer starken Beeinträchtigung der Zellmorphologie von *HSP12*-Deletionsmutanten. Sie wiesen nämlich in der stationären Phase oder nach Stresseinwirkung starke Unregelmäßigkeiten in ihrer Zelloberfläche auf, die durch Einbuchtungen und ein granuläres Erscheinungsbild geprägt war. Des Weiteren sind $\Delta HSP12$ -Zellen durch Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung gekennzeichnet, was eine Abnahme des Chitingehaltes vor allem in Knospungsnarben und eine erhöhte Resistenz gegen Lytikase, ein Zellwandpolymer hydrolysierendes Enzym, einschloss. Sämtliche derart ermittelten Effekte konnten durch erneutes Einbringen des *HSP12*-Genes kompensiert werden und sind somit direkt auf den Verlust von Hsp12 zurückzuführen.

Hsp12 als ein Protein ohne bekannte Signalsequenz erreicht die Zelloberfläche nicht über den klassischen Sekretionsweg. Es ist aber in der Lage, synthetische

Membranen, die Plasmamembran von *E. coli* und die Hefemembran von außen nach innen zu durchqueren. Darüber hinaus beeinflusst rekombinantes Hsp12 in hohen Konzentrationen das thermotropische Verhalten von negativ geladenen Lipidvesikeln. Es kann somit zumindest eine teilweise Penetration in Lipiddoppelschichten angenommen werden.

Die Bindung von Hsp12 an gemischte Lipidvesikel ist größtenteils auf elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Membranen zurückzuführen. Dabei sättigt ein Molekül Hsp12 rund 2350 Lipide derart ab, dass keine weitere Bindung möglich ist. Außerdem ist die Bindung an Lipid durch einen biphasischen Prozess gekennzeichnet. Mit der Fähigkeit an Lipide zu binden gehen möglicherweise die beobachteten Unterschiede in der Lipidzusammensetzung von Wildtyp-Hefezellen und $\Delta HSP12$ -Zellen einher. Letztere weisen einen erheblich höheren Anteil an längerkettigen Fettsäuren auf, wobei gleichzeitig bei einigen Lipidklassen eine Zunahme an ungesättigten Fettsäuren festgestellt werden konnte. Ein herausragendes Merkmal der Lipidzusammensetzung von *HSP12*-Deletionsmutanten war das Vorkommen von Linolsäure, eine zweifach ungesättigte Fettsäure, die von *S. cerevisiae* eigentlich nicht synthetisiert werden kann.

Die veränderte Zusammensetzung der Membranen aus $\Delta HSP12$ -Zellen führte im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu Veränderungen der physikalischen Eigenschaften der Plasmamembran. So konnte eine Beeinflussung der Fluidität durch Hsp12 aufgezeigt werden, da die Membran der *HSP12*-Deletionsmutanten eine deutlich verringerte Fluidität besaß und diese sich nach Temperaturabsenkung im Gegensatz zu Wildtypzellen nicht änderte.

Sämtliche Umgestaltungen der $\Delta HSP12$ -Zellen werden darüber hinaus von einem so stark veränderten Proteinexpressionsmuster begleitet, dass kein Vergleich mit dem von Wildtyp-Zellen möglich war.

Analysen von Hsp12-Fragmenten ergaben, dass die *in vivo* Funktion dieses Proteins relativ unabhängig von Sequenzbereichen ist, die *in vitro* an der Ausbildung von Sekundärstruktur in Anwesenheit von SDS-Mizellen beteiligt sind. Defekte dieser Deletionsmutanten, die *in vitro* die Bindung von Lipid betrafen, konnten in den Zellen kompensiert werden.

Zusammenfassend ist Hsp12 als ein Protein der Zellhülle zu betrachten, das zur deren Stabilität vor allem in der stationären Phase oder unter Stressbedingungen beiträgt. Hsp12 beeinflusst die Zusammensetzung von Zellwand und Membranen

und damit deren physikochemischen Eigenschaften. Dadurch wird der Wachstumstemperaturbereich bestimmt und die allgemeine Expression beeinflusst.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Uscanga, B. and Francois, J.M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 268-274.
- Al Fageeh, M.B. and Smales, C.M. (2006). Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem. J.* **397**, 247-259.
- Amoros, M. and Estruch, F. (2001). Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol. Microbiol.* **39**, 1523-1532.
- Ananthan, J., Goldberg, A.L., and Voellmy, R. (1986). Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* **232**, 522-524.
- Andreeva, L., Motterlini, R., and Green, C.J. (1997). Cyclophilins are induced by hypoxia and heat stress in myogenic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 6-9.
- Ang, D., Liberek, K., Skowrya, D., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1991). Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 24233-24236.
- Aranda, F.J., Teruel, J.A., and Ortiz, A. (2003). Interaction of a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of canine distemper virus fusion protein with phospholipid vesicles: a biophysical study. *Biochim. Biophys. Acta* **1618**, 51-58.
- Arnold, W.N. (1991). Periplasmic Space. In *The Yeasts*, A.H. Rose and J.S. Harrison, eds. (London: Academic Press), pp. 279-295.
- Arnulphi, C., Jin, L., Triccerri, M.A., and Jonas, A. (2004). Enthalpy-driven apolipoprotein A-I and lipid bilayer interaction indicating protein penetration upon lipid binding. *Biochemistry* **43**, 12258-12264.
- Attfield, P.V. (1987). Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett.* **225**, 259-263.
- Avery, S.V., Lloyd, D., and Harwood, J.L. (1995). Temperature-dependent changes in plasma-membrane lipid order and the phagocytotic activity of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* are closely correlated. *Biochem. J.* **312** (Pt 3), 811-816.
- Bahler, J. (2005). Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 69-94.
- Barker, M.G. and Smart, K.S. (1996). Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **54**, 121-126.
- Barrera, F.N., Poveda, J.A., Gonzalez-Ros, J.M., and Neira, J.L. (2003). Binding of the C-terminal sterile alpha motif (SAM) domain of human p73 to lipid membranes. *J. Biol. Chem.* **278**, 46878-46885.
- Basha, E., Lee, G.J., Demeler, B., and Vierling, E. (2004). Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1426-1436.

- Becker, J. and Craig, E.A. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* 219, 11-23.
- Beddoe, T., Bushell, S.R., Perugini, M.A., Lithgow, T., Mulhern, T.D., Bottomley, S.P., and Rossjohn, J. (2004). A biophysical analysis of the tetratricopeptide repeat-rich mitochondrial import receptor, Tom70, reveals an elongated monomer that is inherently flexible, unstable, and unfolds via a multistate pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 46448-46454.
- Beissinger, M. and Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379, 245-259.
- Bell, S., Klein, C., Muller, L., Hansen, S., and Buchner, J. (2002). p53 contains large unstructured regions in its native state. *J. Mol. Biol.* 322, 917-927.
- Beney, L. and Gervais, P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 34-42.
- Berkovits, H.J. and Berg, J.M. (1999). Metal and DNA binding properties of a two-domain fragment of neural zinc finger factor 1, a CCHC-type zinc binding protein. *Biochemistry* 38, 16826-16830.
- Berlose, J.P., Convert, O., Derossi, D., Brunissen, A., and Chassaing, G. (1996). Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem.* 242, 372-386.
- Beschiaschvili, G. and Seelig, J. (1990). Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* 29, 52-58.
- Bienz, M. and Pelham, H.R. (1986). Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the *Xenopus* hsp70 gene and when linked to a heterologous promoter. *Cell* 45, 753-760.
- Bisaglia, M., Trolia, A., Bellanda, M., Bergantino, E., Bubacco, L., and Mammi, S. (2006). Structure and topology of the non-amyloid- β component fragment of human α -Synuclein bound to micelles: Implications for the aggregation process. *Protein Sci.* 15, 1408-1416.
- BLIGH, E.G. and DYER, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Blomberg, A. and Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 33, 145-212.
- Bolivar, F. and Backman, K. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68, 245-267.
- Boorsma, A., De Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2004). Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 413-427.
- Bosl, B., Grimminger, V., and Walter, S. (2006). The molecular chaperone Hsp104-A molecular machine for protein disaggregation. *J. Struct. Biol.*
- Bossie, M.A. and Martin, C.E. (1989). Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *J. Bacteriol.* 171, 6409-6413.
- Bossier, P., Fitch, I.T., Boucherie, H., and Tuite, M.F. (1989). Structure and expression of a yeast gene encoding the small heat-shock protein Hsp26. *Gene* 78, 323-330.

- Botha,A. and Kock,J.L. (1993). Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* *19*, 39-51.
- Bottema,C.D., Rodriguez,R.J., and Parks,L.W. (1985). Influence of sterol structure on yeast plasma membrane properties. *Biochim. Biophys. Acta* *813*, 313-320.
- Boumann,H.A., Gubbens,J., Koorengevel,M.C., Oh,C.S., Martin,C.E., Heck,A.J., Patton-Vogt,J., Henry,S.A., de Kruijff,B., and de Kroon,A.I. (2006). Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote. *Mol. Biol Cell* *17*, 1006-1017.
- Boy-Marcotte,E., Lagniel,G., Perrot,M., Bussereau,F., Boudsocq,A., Jacquet,M., and Labarre,J. (1999). The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol. Microbiol.* *33*, 274-283.
- Boy-Marcotte,E., Perrot,M., Bussereau,F., Boucherie,H., and Jacquet,M. (1998). Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *180*, 1044-1052.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.
- Brown,A.D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol* *17*, 181-242.
- Buchner,J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* *10*, 10-19.
- Buchner,J., Schmidt,M., Fuchs,M., Jaenicke,R., Rudolph,R., Schmid,F.X., and Kiefhaber,T. (1991). GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry* *30*, 1586-1591.
- Bukau,B., Deuerling,E., Pfund,C., and Craig,E.A. (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* *101*, 119-122.
- Bukau,B. and Horwich,A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* *92*, 351-366.
- Bulawa,C.E. (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* *47*, 505-534.
- Burgermeister,M., Birner-Grunberger,R., Nebauer,R., and Daum,G. (2004). Contribution of different pathways to the supply of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine to mitochondrial membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* *1686*, 161-168.
- Cabib,E., Bowers,B., Sburlati,A., and Silverman,S.J. (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol. Sci.* *5*, 370-375.
- Cabib,E. and Duran,A. (2005). Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J. Biol. Chem.* *280*, 9170-9179.
- Cantarelli,C. and Martini,A. (1969). On the pellicle formation by "flor" yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* *35*, Suppl-6.

- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., and Tanner, W. (1994). Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J.* *13*, 4737-4744.
- Cappellaro, C., Mrsa, V., and Tanner, W. (1998). New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.* *180*, 5030-5037.
- Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., Van Den, E.H., and Klis, F.M. (1997). In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 1477-1489.
- Carratu, L., Franceschelli, S., Pardini, C.L., Kobayashi, G.S., Horvath, I., Vigh, L., and Maresca, B. (1996). Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 3870-3875.
- Carty, S.M., Sreekumar, K.R., and Raetz, C.R. (1999). Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction At 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 9677-9685.
- Castagnet, P.I., Golovko, M.Y., Barcelo-Coblijn, G.C., Nussbaum, R.L., and Murphy, E.J. (2005). Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from alpha-synuclein gene-ablated mice. *J. Neurochem.* *94*, 839-849.
- Castillo, L., Martinez, A.I., Garcera, A., Elorza, M.V., Valentin, E., and Sentandreu, R. (2003). Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan. *Yeast* *20*, 973-983.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., and Young, R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* *12*, 323-337.
- Cerbon, J. and Calderon, V. (1991). Changes of the compositional asymmetry of phospholipids associated to the increment in the membrane surface potential. *Biochim. Biophys. Acta* *1067*, 139-144.
- Chakravarthy, B., Morley, P., and Whitfield, J. (1999). Ca²⁺-calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends Neurosci.* *22*, 12-16.
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., and Sudhof, T.C. (2003). A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* *278*, 15313-15318.
- Chant, J. (1999). Cell polarity in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *15*, 365-391.
- Chatterjee, M.T., Khalawan, S.A., and Curran, B.P. (1997). Alterations in cellular lipids may be responsible for the transient nature of the yeast heat shock response. *Microbiology* *143* (Pt 9), 3063-3068.
- Chatterjee, M.T., Khalawan, S.A., and Curran, B.P. (2000). Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology* *146* (Pt 4), 877-884.
- Chen, C.C. and Wilson, T.H. (1984). The phospholipid requirement for activity of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *259*, 10150-10158.

- Cho, H.S., Liu, C.W., Damberger, F.F., Pelton, J.G., Nelson, H.C., and Wemmer, D.E. (1996). Yeast heat shock transcription factor N-terminal activation domains are unstructured as probed by heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci.* 5, 262-269.
- Choi, J.Y., Stukey, J., Hwang, S.Y., and Martin, C.E. (1996). Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J. Biol. Chem.* 271, 3581-3589.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119-122.
- Cleves, A.E., Cooper, D.N., Barondes, S.H., and Kelly, R.B. (1996). A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 133, 1017-1026.
- Craig, E.A. and Jacobsen, K. (1984). Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. *Cell* 38, 841-849.
- Daughdrill, G.W., Hanely, L.J., and Dahlquist, F.W. (1998). The C-terminal half of the anti-sigma factor FlgM contains a dynamic equilibrium solution structure favoring helical conformations. *Biochemistry* 37, 1076-1082.
- Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 822, 1-42.
- Daum, G., Tuller, G., Nemeč, T., Hraštnik, C., Balliano, G., Cattell, L., Milla, P., Rocco, F., Conzelmann, A., Vionnet, C., Kelly, D.E., Kelly, S., Schweizer, E., Schuller, H.J., Hojad, U., Greiner, E., and Finger, K. (1999). Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast* 15, 601-614.
- David, D.C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2002). Proteasomal degradation of tau protein. *J. Neurochem.* 83, 176-185.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* 273, 9443-9449.
- Dawes, I. (1999). Stress Responses. In *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*, J.R. Dickinson and M. Schweizer, eds. (UK: Taylor & Francis Ltd.), pp. 277-326.
- Dawson, R., Muller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H., and Buchner, J. (2003). The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J. Mol. Biol.* 332, 1131-1141.
- de Groot, E., Bebelman, J.P., Mager, W.H., and Planta, R.J. (2000). Very low amounts of glucose cause repression of the stress-responsive gene HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 146 (Pt 2), 367-375.
- De Groot, P.W., Ram, A.F., and Klis, F.M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal. Genet. Biol.* 42, 657-675.
- De Groot, P.W.J., Ruiz, c., and vazquez de Aldana, C. (2001). A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative and Functional Genomics* 2, 124-142.
- de Jong, W.W., Caspers, G.J., and Leunissen, J.A. (1998). Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 151-162.

- de Kruijff, B. (1987). Polymorphic regulation of membrane lipid composition. *Nature* 329, 587-588.
- de Kruijff, B. (1994). Anionic phospholipids and protein translocation. *FEBS Lett.* 346, 78-82.
- De Nobel, J.G. and Barnett, J.A. (1991). Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* 7, 313-323.
- De Nobel, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T., and Van Den, E.H. (1990). The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 491-499.
- De Nobel, J.G., Klis, F.M., Ram, A., Van Unen, H., Priem, J., Munnik, T., and Van Den, E.H. (1991). Cyclic variations in the permeability of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 589-598.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T., and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* 219, 179-186.
- Dedmon, M.M., Patel, C.N., Young, G.B., and Pielak, G.J. (2002). FlgM gains structure in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 12681-12684.
- Dehner, A. Protein Interactions Studied by Biochemical and NMR Spectroscopic Methods. 2004.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Dennis, E.A. and Kennedy, E.P. (1972). Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *J. Lipid Res.* 13, 263-267.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- Derossi, D., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* 8, 84-87.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol Chem.* 269, 10444-10450.
- Deshais, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A., and Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805.
- Divecha, N. and Irvine, R.F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell* 80, 269-278.
- Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66, 199-232.
- Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., and Obradovic, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41, 6573-6582.
- Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C., and Brown, C.J. (2000). Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* 11, 161-171.

- Eamus,D.G. and Jennings,D.H. (1986). Water, turgor and osmotic potential of fungi. In *Water, fungi and plants.*, P.G.a.B.L.Ayres, ed. (Cambridge, England: Cambridge University Press), pp. 27-47.
- Ehrnsperger,M., Graber,S., Gaestel,M., and Buchner,J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16, 221-229.
- Elorza,M.V., Rico,H., and Sentandreu,R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1577-1582.
- Engelman,D.M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438, 578-580.
- Estruch,F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 469-486.
- Exton,J.H. (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 26-42.
- Fairbanks,G., Steck,T.L., and Wallach,D.F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Fiebig,K.M., Rice,L.M., Pollock,E., and Brunger,A.T. (1999). Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat. Struct. Biol.* 6, 117-123.
- Fielding,C.J. and Fielding,P.E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36, 211-228.
- Findly,R.C., Gillies,R.J., and Shulman,R.G. (1983). In vivo phosphorus-31 nuclear magnetic resonance reveals lowered ATP during heat shock of *Tetrahymena*. *Science* 219, 1223-1225.
- Fink,A.L. (2005). Natively unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 35-41.
- Finley,D. and Chau,V. (1991). Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 25-69.
- Fischer, E. Reinigung und Charakterisierung von Hsp12 aus *Saccharomyces cerevisiae*. 1999.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Fischer, E. Struktur und Funktion von Hsp12 aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. 2003.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Fisher,C.R. (1969). Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 306-310.
- Fleet,G.H. (1991). Cell walls. In *The Yeasts*, A.H.Rose and J.S.Harrison, eds. (New York: Academic Press), pp. 199-277.
- Fleet,G.H. and Manners,D.J. (1976). Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 94, 180-192.
- Fling,S.P. and Gregerson,D.S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155, 83-88.

- Florine-Casteel, K. and Feigenson, G.W. (1988). On the use of partition coefficients to characterize the distribution of fluorescent membrane probes between coexisting gel and fluid lipid phase: an analysis of the partition behavior of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. *Biochim. Biophys. Acta* *941*, 102-106.
- Francois, J. and Parrou, J.L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *25*, 125-145.
- Gancedo, C., Gancedo, J.M., and Sols, A. (1968). Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *Eur. J. Biochem.* *5*, 165-172.
- Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J.M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 15183-15195.
- Gasch, A.P. (2003). The environmental stress response. In *Yeast Stress Responses*, S.Hohmann and W.H.Mager, eds. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 11-70.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4241-4257.
- Georgopapadakou, N.H. and Walsh, T.J. (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 279-291.
- Georgopoulos, C. and Welch, W.J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* *9*, 601-634.
- Gething, M.J. and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* *355*, 33-45.
- Ghosh, A.K., Rukmini, R., and Chattopadhyay, A. (1997). Modulation of tryptophan environment in membrane-bound melittin by negatively charged phospholipids: implications in membrane organization and function. *Biochemistry* *36*, 14291-14305.
- Goff, S.A. and Goldberg, A.L. (1985). Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* *41*, 587-595.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* *274*, 546, 563-546, 567.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 13732-13737.
- Golovko, M.Y., Faergeman, N.J., Cole, N.B., Castagnet, P.I., Nussbaum, R.L., and Murphy, E.J. (2005). Alpha-synuclein gene deletion decreases brain palmitate uptake and alters the palmitate metabolism in the absence of alpha-synuclein palmitate binding. *Biochemistry* *44*, 8251-8259.
- Goodman, R.H. and Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* *14*, 1553-1577.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., and Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* *12*, 586-597.

- Goto, Y. and Hagihara, Y. (1992). Mechanism of the conformational transition of melittin. *Biochemistry* 31, 732-738.
- Green, T.B., Ganesh, O., Perry, K., Smith, L., Phylip, L.H., Logan, T.M., Hagen, S.J., Dunn, B.M., and Edison, A.S. (2004). IA3, an aspartic proteinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*, is intrinsically unstructured in solution. *Biochemistry* 43, 4071-4081.
- Gunasekaran, K., Tsai, C.J., Kumar, S., Zanuy, D., and Nussinov, R. (2003). Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. *Trends Biochem. Sci.* 28, 81-85.
- Gunkel, K., Veenhuis, M., and van, d.K., I (2005). Protein translocation machineries: how organelles bring in matrix proteins. *FEMS Yeast Res.* 5, 1037-1045.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1264-1300.
- Guyot, S., Ferret, E., and Gervais, P. (2005). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to thermal stress. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 403-409.
- Hagen, I., Ecker, M., Lagorce, A., Francois, J.M., Sestak, S., Rachel, R., Grossmann, G., Hauser, N.C., Hoheisel, J.D., Tanner, W., and Strahl, S. (2004). Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in multiple GPI-anchored mannoproteins. *Mol. Microbiol.* 52, 1413-1425.
- Hamill, O.P. and Martinac, B. (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev.* 81, 685-740.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Hartl, F.U. and Neupert, W. (1990). Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247, 930-938.
- Hashizume, C., Kimura, K., and Hayashi, R. (1995). Kinetic analysis of yeast inactivation by high pressure treatment at low temperatures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1455-1458.
- Haslbeck, M. Funktion kleiner Hitzeschockproteine der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. 2001. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Haslbeck, M., Braun, N., Stromer, T., Richter, B., Model, N., Weinkauff, S., and Buchner, J. (2004). Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23, 638-649.
- Haslbeck, M. and Buchner, J. (2002). Chaperone function of sHsps. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 28, 37-59.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., and Buchner, J. (2005a). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 842-846.
- Haslbeck, M., Miess, A., Stromer, T., Walter, S., and Buchner, J. (2005b). Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J. Biol Chem.* 280, 23861-23868.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R., and Buchner, J. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* 18, 6744-6751.

- Hazel, J.R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol* 57, 19-42.
- Hebert, D.N. (1999). Protein unfolding: mitochondria offer a helping hand. *Nat. Struct. Biol.* 6, 1084-1085.
- Heide, T., Stuart, M.C., and Poolman, B. (2001). On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.* 20, 7022-7032.
- Heimburg, T. and Biltonen, R.L. (1994). Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry* 33, 9477-9488.
- Holthuis, J.C. and Levine, T.P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 209-220.
- Homma, T., Iwahashi, H., and Komatsu, Y. (2003). Yeast gene expression during growth at low temperature. *Cryobiology* 46, 230-237.
- Horwitz, J. (2003). Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.* 76, 145-153.
- Hottiger, T., Boller, T., and Wiemken, A. (1987). Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.* 220, 113-115.
- Huang, C. and Li, S. (1999). Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1422, 273-307.
- Huang, S., Ratliff, K.S., Schwartz, M.P., Spenner, J.M., and Matouschek, A. (1999). Mitochondria unfold precursor proteins by unraveling them from their N-termini. *Nat. Struct. Biol.* 6, 1132-1138.
- Hubbard, M.J. and Klee, C.B. (1989). Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochemistry* 28, 1868-1874.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Iakoucheva, L.M., Brown, C.J., Lawson, J.D., Obradovic, Z., and Dunker, A.K. (2002). Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J. Mol. Biol.* 323, 573-584.
- Ivorra, C., Perez-Ortin, J.E., and del Olmo, M. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 698-708.
- Jaenicke, R. and Bohm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 738-748.
- Jakob, U. and Buchner, J. (1994). Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 19, 205-211.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem* 268, 1517-1520.

- Jamieson,D.J., Rivers,S.L., and Stephen,D.W. (1994). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology 140 (Pt 12)*, 3277-3283.
- Jang,Y.J., Park,S.K., and Yoo,H.S. (1996). Isolation of an HSP12-homologous gene of *Schizosaccharomyces pombe* suppressing a temperature-sensitive mutant allele of *cdc4*. *Gene 172*, 125-129.
- Janknecht,R. and Hunter,T. (1996). Versatile molecular glue. Transcriptional control. *Curr. Biol. 6*, 951-954.
- Jelesarov,I. and Bosshard,H.R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit. 12*, 3-18.
- Jenkins,G.M., Richards,A., Wahl,T., Mao,C., Obeid,L., and Hannun,Y. (1997). Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem. 272*, 32566-32572.
- Jessee,J.A. (1986). *Focus 8*, 9-10.
- Johnson,D.G. and Walker,C.L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39*, 295-312.
- Johnston,G.C. and Singer,R.A. (1980). Ribosomal precursor RNA metabolism and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. 178*, 357-360.
- Kaiser,R.D. and London,E. (1998). Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry 37*, 8180-8190.
- Kamada,Y., Jung,U.S., Piotrowski,J., and Levin,D.E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev. 9*, 1559-1571.
- Kandror,O., Bretschneider,N., Kreydin,E., Cavalieri,D., and Goldberg,A.L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol. Cell 13*, 771-781.
- Kane,S.M. and Roth,R. (1974). Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. *J. Bacteriol. 118*, 8-14.
- Kapteyn,J.C., Ram,A.F., Groos,E.M., Kollar,R., Montijn,R.C., Van Den,E.H., Llobell,A., Cabib,E., and Klis,F.M. (1997). Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J. Bacteriol. 179*, 6279-6284.
- Kapteyn,J.C., Van Egmond,P., Sievi,E., Van Den,E.H., Makarow,M., and Klis,F.M. (1999). The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol. Microbiol. 31*, 1835-1844.
- Kaur,R. and Bachhawat,A.K. (1999). The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in *erg* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology 145 (Pt 4)*, 809-818.

- Kim, J.S.K., Laurine, E., Woods, W., and Lee, S. (2006). A Novel Mechanism of Interaction between α -Synuclein and Biological Membranes. *J. Mol. Biol.* 360, 386-397.
- Kim, K.K., Kim, R., and Kim, S.H. (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* 394, 595-599.
- Klebl, F. and Tanner, W. (1989). Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 6259-6264.
- Klis, F.M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10, 851-869.
- Klis, F.M., Boorsma, A., and De Groot P.W.J (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202.
- Kobayashi, K., Suginaka, H., and Yano, I. (1987). Analysis of fatty acid composition of *Candida* species by gas-liquid chromatography using a polar column. *Microbios* 51, 37-42.
- Koch, Y. and Rademacher, K.H. (1980). Chemical and enzymatic changes in the cell walls of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* by scanning electron microscopy. *Can. J. Microbiol.* 26, 965-970.
- Kohlwein, S.D., Daum, G., Schneiter, R., and Paltauf, F. (1996). Phospholipids: synthesis, sorting, subcellular traffic - the yeast approach. *Trends Cell Biol.* 6, 260-266.
- Koide, S., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (1993). Characterization of a folding intermediate of apoplastocyanin trapped by proline isomerization. *Biochemistry* 32, 12299-12310.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., and Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272, 17762-17775.
- Konno, T., Tanaka, N., Kataoka, M., Takano, E., and Maki, M. (1997). A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I. *Biochim. Biophys. Acta* 1342, 73-82.
- Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I., and Wright, P.E. (1996). Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11504-11509.
- Kruuv, J., Glofcheski, D., Cheng, K.H., Campbell, S.D., Al Qysi, H.M., Nolan, W.T., and Lepock, J.R. (1983). Factors influencing survival and growth of mammalian cells exposed to hypothermia. I. Effects of temperature and membrane lipid perturbers. *J. Cell Physiol* 115, 179-185.
- Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L., and Lindquist, S. (1986). An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* 231, 1154-1157.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274, 948-953.
- Ladokhin, A.S. and White, S.H. (1999). Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *J. Mol. Biol.* 285, 1363-1369.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lagunas,R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2, 221-228.
- Lamy-Freund,M.T. and Riske,K.A. (2003). The peculiar thermo-structural behavior of the anionic lipid DMPG. *Chem. Phys. Lipids* 122, 19-32.
- Laszlo,A. (1992). The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. *Cell Prolif.* 25, 59-87.
- Lee,G.J. and Vierling,E. (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol* 122, 189-198.
- Lehninger,A., Nelson,D., and Cox,M. (1998). *Prinzipien der Biochemie.*, H.Tschesche, ed. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
- LELOIR,L.F. and CARDINI,C.E. (1953). The biosynthesis of glucosamine. *Biochim. Biophys. Acta* 12, 15-22.
- Lentz,B.R. (1993). Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 64, 99-116.
- Lesage,G. and Bussey,H. (2006). Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 317-343.
- Levin,D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 262-291.
- Li,H.M., Theg,S.M., Bauerle,C.M., and Keegstra,K. (1990). Metal-ion-center assembly of ferredoxin and plastocyanin in isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 6748-6752.
- Lillie,S.H. and Pringle,J.R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* 143, 1384-1394.
- Lindquist,S. (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Lindquist,S. and Craig,E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- Littlewood,T.D., Hancock,D.C., and Evan,G.I. (1987). Characterization of a heat shock-induced insoluble complex in the nuclei of cells. *J. Cell Sci.* 88 (Pt 1), 65-72.
- Liu,J. and Lu,M. (2002). An alanine-zipper structure determined by long range intermolecular interactions. *J. Biol. Chem.* 277, 48708-48713.
- Loffeld,B. and Keweloh,H. (1996). cis/trans isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids* 31, 811-815.
- Lotharius,J. and Brundin,P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 932-942.
- Lottspeich,F. and Zorbas H (1998). *Bioanalytik.* (Berlin: Spektrum Verlag).
- Love,J.J., Li,X., Chung,J., Dyson,H.J., and Wright,P.E. (2004). The LEF-1 high-mobility group domain undergoes a disorder-to-order transition upon formation of a complex with cognate DNA. *Biochemistry* 43, 8725-8734.

- Lupashin, V.V., Kononova, S.V., Ratner, Y., Tsiomenko, A.B., and Kulaev, I.S. (1992). Identification of a novel secreted glycoprotein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* stimulated by heat shock. *Yeast* **8**, 157-169.
- Lussier, M., White, A.M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., Chen-Weiner, J., Ram, A.F., Kapteyn, J.C., Roemer, T.W., Vo, D.H., Bondoc, D.C., Hall, J., Zhong, W.W., Sdicu, A.M., Davies, J., Klis, F.M., Robbins, P.W., and Bussey, H. (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435-450.
- LUZZATI, V. and HUSSON, F. (1962). The structure of the liquid-crystalline phase of lipid-water systems. *J. Cell Biol.* **12**, 207-219.
- Macdonald, A.G., Wahle, K.W., Cossins, A.R., and Behan, M.K. (1988). Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **938**, 231-242.
- MacDonald, R., MacDonald, R., Menco, B., Takeshita, K., Subbarao, N., and Hu, L. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297-303.
- Mager, W.H. and Ferreira, P.M. (1993). Stress response of yeast. *Biochem. J.* **290** (Pt 1), 1-13.
- Manners, D.J., Masson, A.J., and Patterson, J.C. (1973). The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* **135**, 19-30.
- Marchler, G., Schuller, C., Adam, G., and Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**, 1997-2003.
- Marcos-Lousa, C., Sideris, D.P., and Tokatlidis, K. (2006). Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 259-267.
- Marechal, P.A., Martinez de Marañon, I., Molin, P., and Gervais, P. (1995). Yeast cell responses to water potential variations. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 277-287.
- Martin, C.E., Oh, C.S., and Jiang, Y. (2006). Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Martin, J. and Hartl, F.U. (1997). The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 1107-1112.
- Martin, T.F. (2001). PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 493-499.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**, 2227-2235.
- Mbamala, E.C., Ben Shaul, A., and May, S. (2005). Domain formation induced by the adsorption of charged proteins on mixed lipid membranes. *Biophys. J.* **88**, 1702-1714.
- McElhaney, R.N. (1984). The structure and function of the *Acholeplasma laidlawii* plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 1-42.

- McElhaney, R.N. (1989). The influence of membrane lipid composition and physical properties of membrane structure and function in *Acholeplasma laidlawii*. *Crit. Rev. Microbiol.* *17*, 1-32.
- Meikle, A.J., Reed, R.H., and Gadd, G.M. (1988). Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* *134* (Pt 11), 3049-3060.
- Meisinger, C., Sommer, T., and Pfanner, N. (2000). Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal. Biochem.* *287*, 339-342.
- Merchant, S. and Bogorad, L. (1986). Rapid degradation of apoplastocyanin in Cu(II)-deficient cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* *261*, 15850-15853.
- Michaelis, S. and Herskowitz, I. (1988). The α -factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol. Cell Biol.* *8*, 1309-1318.
- Mogk, A. and Bukau, B. (2004). Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase. *Curr. Biol.* *14*, R78-R80.
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwulbecke, S., Vierling, E., and Bukau, B. (2003). Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol. Microbiol.* *50*, 585-595.
- Molina, M., Gil, C., Pla, J., Arroyo, J., and Nombela, C. (2000). Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc. Res. Tech.* *51*, 601-612.
- Montijn, R.C., van Rinsum, J., van Schagen, F.A., and Klis, F.M. (1994). Glucmannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J. Biol. Chem.* *269*, 19338-19342.
- Morimoto, R.I., Sarge, K.D., and Abravaya, K. (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem.* *267*, 21987-21990.
- Morris, G.J., Winters, L., Coulson, G.E., and Clarke, K.J. (1986). Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* *132*, 2023-2034.
- Motshwene, P., Karreman, R., Kgari, G., Brandt, W., and Lindsey, G. (2004). LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *377*, 769-774.
- Mrsa, V., Ecker, M., Strahl-Bolsinger, S., Nimtz, M., Lehle, L., and Tanner, W. (1999). Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *181*, 3076-3086.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentsch, M., and Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 1145-1154.
- Muesch, A., Hartmann, E., Rohde, K., Rubartelli, A., Sitia, R., and Rapoport, T.A. (1990). A novel pathway for secretory proteins? *Trends Biochem. Sci.* *15*, 86-88.
- Mukhopadhyay, K., Kohli, A., and Prasad, R. (2002). Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 3695-3705.

- Muller, I. (1971). Experiments on ageing in single cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Mikrobiol.* 77, 20-25.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Murgui, A., Elorza, M.V., and Sentandreu, R. (1985). Effect of papulacandin B and calcofluor white on the incorporation of mannoproteins in the wall of *Candida albicans* blastospores. *Biochim. Biophys. Acta* 841, 215-222.
- Namba, K. (2001). Roles of partly unfolded conformations in macromolecular self-assembly. *Genes Cells* 6, 1-12.
- Nedwell, D.B. (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 101-111.
- Nes, W.D., Janssen, G.G., Crumley, F.G., Kalinowska, M., and Akihisa, T. (1993). The structural requirements of sterols for membrane function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 724-733.
- Nielsen, M.S., Vorum, H., Lindersson, E., and Jensen, P.H. (2001). Ca²⁺ binding to alpha-synuclein regulates ligand binding and oligomerization. *J. Biol. Chem* 276, 22680-22684.
- Nover, L. (1991). HSFs and HSPs--a stressful program on transcription factors and chaperones. *Stress Proteins and the Heat Shock Response*, sponsored by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY USA, April 29-May 2, 1991. *New Biol.* 3, 855-859.
- Nover, L. and Hightower, L. (1991). Heat shock and development. Introduction. *Results Probl. Cell Differ.* 17, 1-4.
- Ohanian, J. and Ohanian, V. (2001). Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 2053-2068.
- Opekarova, M. and Tanner, W. (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 11-22.
- Orlandi, I., Cavadini, P., Popolo, L., and Vai, M. (1996). Cloning, sequencing and regulation of a cDNA encoding a small heat-shock protein from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* 1307, 129-131.
- Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron.* 29, 207-233.
- Ovalle, R., Lim, S.T., Holder, B., Jue, C.K., Moore, C.W., and Lipke, P.N. (1998). A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast* 14, 1159-1166.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-2423.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358.
- Palgunachari, M.N., Mishra, V.K., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Adeyeye, S.O., Alluri, S., Anantharamaiah, G.M., and Segrest, J.P. (1996). Only the Two End Helices of Eight Tandem Amphipathic Helical Domains of Human Apo A-I Have Significant Lipid Affinity : Implications for HDL Assembly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 328-338.

- Palmer, E., Wilhelm, J.M., and Sherman, F. (1979). Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* 277, 148-150.
- Papahadjopoulos, D., Moscarello, M., Eylar, E.H., and Isac, T. (1975). Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 401, 317-335.
- Parag, H.A., Raboy, B., and Kulka, R.G. (1987). Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *EMBO J.* 6, 55-61.
- Parker, D., Rivera, M., Zor, T., Henrion-Caude, A., Radhakrishnan, I., Kumar, A., Shapiro, L.H., Wright, P.E., Montminy, M., and Brindle, P.K. (1999). Role of secondary structure in discrimination between constitutive and inducible activators. *Mol. Cell Biol.* 19, 5601-5607.
- Parks, L.W., McLean-Bowen, C., Bottema, C.K., Taylor, F.R., Gonzales, R., Jensen, B.W., and Ramp, J.R. (1982). Aspects of sterol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in *Phytophthora*. *Lipids* 17, 187-196.
- Parraga, G., Horvath, S.J., Eisen, A., Taylor, W.E., Hood, L., Young, E.T., and Klevit, R.E. (1988). Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1. *Science* 241, 1489-1492.
- Parsell, D.A. and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437-496.
- Parsell, D.A. and Lindquist, S. (1994). Heat shock proteins and stress tolerance. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 457-489.
- Patriarca, E.J. and Maresca, B. (1990). Acquired thermotolerance following heat shock protein synthesis prevents impairment of mitochondrial ATPase activity at elevated temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* 190, 57-64.
- Patton, J.L. and Lester, R.L. (1991). The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* 173, 3101-3108.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* 287, 821-828.
- Pearl, L.H. and Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 271-294.
- Perez-Torrado, R., Bruno-Barcena, J.M., and Matallana, E. (2005). Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6831-6837.
- Perry, A.J. and Lithgow, T. (2005). Protein targeting: entropy, energetics and modular machines. *Curr. Biol.* 15, R423-R425.
- Petko, L. and Lindquist, S. (1986). Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell* 45, 885-894.
- Pilon, M. and Schekman, R. (1999). Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell* 97, 679-682.
- Piper, P.W. (1993). Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 11, 339-355.

- Piper, P.W. (1997). Yeast Stress Responses., S.Hohmann and W.H.Mager, eds. (Heidelberg: Springer Verlag), pp. 75-99.
- Piper, P.W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P., and Cole, M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress. Chaperones* 2, 12-24.
- Piper, P.W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas-Ferreira, P., Byrne, K., Praekelt, U.M., Meacock, P., Recnacq, M., and Boucherie, H. (1994). Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology* 140 (Pt 11), 3031-3038.
- Polverini, E., Fasano, A., Zito, F., Riccio, P., and Cavatorta, P. (1999). Conformation of bovine myelin basic protein purified with bound lipids. *Eur. Biophys. J.* 28, 351-355.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., and Arino, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* 275, 17249-17255.
- Posas, F. and Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276, 1702-1705.
- Praekelt, U.M. and Meacock, P.A. (1990). HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol. Gen. Genet.* 223, 97-106.
- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K., and Jones, E.W. (1989). Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.* 31, 357-435.
- Quinn, P.J. (1988). Effects of temperature on cell membranes. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 42, 237-258.
- Radhakrishnan, I., Perez-Alvarado, G.C., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (1998). Conformational preferences in the Ser133-phosphorylated and non-phosphorylated forms of the kinase inducible transactivation domain of CREB. *FEBS Lett.* 430, 317-322.
- Radhakrishnan, I., Perez-Alvarado, G.C., Parker, D., Dyson, H.J., Montminy, M.R., and Wright, P.E. (1997). Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell* 91, 741-752.
- Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R., and Klis, F.M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* 10, 1019-1030.
- Ramos, J.L., Duque, E., Rodriguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haidour, A., Reyes, F., and Fernandez-Barrero, A. (1997). Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* 272, 3887-3890.
- Randall, L.L. and Hardy, S.J. (1989). Unity in function in the absence of consensus in sequence: role of leader peptides in export. *Science* 243, 1156-1159.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., and Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* 275, 8290-8300.

- Richter, K., Meinlschmidt, B., and Buchner, J. (2005). Hsp90: From Dispensable Heat Shock Protein to Global Player. In *Protein Folding Handbook*, J. Buchner and T. Kiefhaber, eds. (Weinheim: Wiley-VCH), pp. 768-875.
- Riske, K.A., Fernandez, R.M., Nascimento, O.R., Bales, B.L., and Lamy-Freund, M.T. (2003). DMPG gel-fluid thermal transition monitored by a phospholipid spin labeled at the acyl chain end. *Chem. Phys. Lipids* 124, 69-80.
- Robinow, D.F. and Johnson, B.F. (1991). Yeast cytology: an overview. In *The Yeasts*, A.H. Rose and J.S. Harrison, eds. (London: Academic Press), pp. 7-120.
- Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M., and Emr, S.D. (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol. Cell Biol* 8, 4936-4948.
- Rodriguez-Pena, J.M., Perez-Diaz, R.M., Alvarez, S., Bermejo, C., Garcia, R., Santiago, C., Nombela, C., and Arroyo, J. (2005). The 'yeast cell wall chip' - a tool to analyse the regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 151, 2241-2249.
- Rodriguez-Vargas, S., Estruch, F., and Randez-Gil, F. (2002). Gene expression analysis of cold and freeze stress in Baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3024-3030.
- Roncero, C., Valdivieso, M.H., Ribas, J.C., and Duran, A. (1988a). Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170, 1945-1949.
- Roncero, C., Valdivieso, M.H., Ribas, J.C., and Duran, A. (1988b). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J. Bacteriol.* 170, 1950-1954.
- Roosild, T.P., Greenwald, J., Vega, M., Castronovo, S., Riek, R., and Choe, S. (2005). NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. *Science* 307, 1317-1321.
- Rose, D. (1975). Physical responses of yeast cells to osmotic shock. *J. Appl. Bacteriol.* 38, 169-175.
- Roulland-Dussoix, D. and Boyer, H.W. (1969). The *Escherichia coli* B restriction endonuclease. *Biochim. Biophys. Acta* 195, 219-229.
- Rubenhagen, R., Ronsch, H., Jung, H., Kramer, R., and Morbach, S. (2000). Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 275, 735-741.
- Rudolph, A.S., Crowe, J.H., and Crowe, L.M. (1986). Effects of three stabilizing agents--proline, betaine, and trehalose--on membrane phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 245, 134-143.
- Ryder, N.S. and Dupont, M.C. (1985). Inhibition of squalene epoxidase by allylamine antimycotic compounds. A comparative study of the fungal and mammalian enzymes. *Biochem. J.* 230, 765-770.
- Sahara, T., Goda, T., and Ohgiya, S. (2002). Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol Chem.* 277, 50015-50021.

- Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H., and Shears, S.B. (2000). Inositol polyphosphate multikinase (ArgR11) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 468, 28-32.
- Sajbidor, J., Ciesarova, Z., and Smogrovicova, D. (1995). Influence of ethanol on the lipid content and fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol. (Praha)* 40, 508-510.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., and Lindsey, G. (2000). The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1463, 267-278.
- Salonen, I.S., Eklund, K.K., Virtanen, J.A., and Kinnunen, P.K. (1989). Comparison of the effects of NaCl on the thermotropic behaviour of sn-1' and sn-3' stereoisomers of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* 982, 205-215.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. (New York: Cold Spring Harbor Press).
- Sanchez, Y. and Lindquist, S.L. (1990). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248, 1112-1115.
- Sanghera, N. and Pinheiro, T.J. (2002). Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion. *J. Mol. Biol.* 315, 1241-1256.
- Schatz, G. and Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.
- Schmitt, A.P. and McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5777-5782.
- Schouten, A., Agianian, B., Westerman, J., Kroon, J., Wirtz, K.W., and Gros, P. (2002). Structure of apo-phosphatidylinositol transfer protein alpha provides insight into membrane association. *EMBO J.* 21, 2117-2121.
- Schroppe, K., Srikantha, T., Wessels, D., DeCock, M., Lockhart, S.R., and Soll, D.R. (1996). Cytoplasmic localization of the white phase-specific WH11 gene product of *Candida albicans*. *Microbiology* 142 (Pt 8), 2245-2254.
- Schwarz, E., Lilie, H., and Rudolph, R. (1996). The effect of molecular chaperones on in vivo and in vitro folding processes. *Biol. Chem* 377, 411-416.
- Seelig, J. (1997). Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1331, 103-116.
- Seigneuret, M., Zachowski, A., Hermann, A., and Devaux, P.F. (1984). Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. *Biochemistry* 23, 4271-4275.
- Sha, B., Phillips, S.E., Bankaitis, V.A., and Luo, M. (1998). Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* 391, 506-510.
- Sharon, R., Bar-Joseph, I., Mirick, G.E., Serhan, C.N., and Selkoe, D.J. (2003). Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing alpha-synuclein and human brains with alpha-synucleinopathies. *J. Biol Chem.* 278, 49874-49881.

- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A., and Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 114, 111-123.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Shields, D. and Arvan, P. (1999). Disease models provide insights into post-golgi protein trafficking, localization and processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 489-494.
- Shiffer, K., Hawgood, S., Haagsman, H.P., Benson, B., Clements, J.A., and Goerke, J. (1993). Lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, alter the thermodynamic properties of phospholipid membranes: a differential calorimetry study. *Biochemistry* 32, 590-597.
- Shimoi, H., Kitagaki, H., Ohmori, H., Imura, Y., and Ito, K. (1998). Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J. Bacteriol.* 180, 3381-3387.
- Siderius, M., Rots, E., and Mager, W.H. (1997). High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. *Microbiology* 143 (Pt 10), 3241-3250.
- Simoës, T., Teixeira, M.C., Fernandes, A.R., and Sa-Correia, I. (2003). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, mediated by Msn2p- and Msn4p-regulated genes: important role of SPI1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4019-4028.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 71, 522-525.
- Singer, M.A. and Lindquist, S. (1998a). Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell* 1, 639-648.
- Singer, M.A. and Lindquist, S. (1998b). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16, 460-468.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Smirnov, M.N., Smirnov, V.N., Budowsky, E.I., Inge-Vechtomov, S.G., and Serebrjakov, N.G. (1967). Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 299-304.
- Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E., and Middelberg, A.P. (2000). The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 9871-9874.
- Smits, G.J., Kapteyn, J.C., Van Den, E.H., and Klis, F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 348-352.
- Sorger, P.K., Lewis, M.J., and Pelham, H.R. (1987). Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* 329, 81-84.
- Sorger, P.K. and Pelham, H.R. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855-864.

- Spector,D., Goldman,R., and Leinwand,L. (1998). Cells: A laboratory manual., D.Spector, R.Goldman, and L.Leinwand, eds. (New York: Cold Spring Arbor Laboratory Press).
- Srikantha,T. and Soll,D.R. (1993). A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene* 131, 53-60.
- Srikantha,T., Tsai,L.K., and Soll,D.R. (1997). The WH11 gene of *Candida albicans* is regulated in two distinct developmental programs through the same transcription activation sequences. *J. Bacteriol.* 179, 3837-3844.
- Stone,R.L., Matarese,V., Magee,B.B., Magee,P.T., and Bernlohr,D.A. (1990). Cloning, sequencing and chromosomal assignment of a gene from *Saccharomyces cerevisiae* which is negatively regulated by glucose and positively by lipids. *Gene* 96, 171-176.
- Stratford,M. and Anslow,P.A. (1996). Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 53-58.
- Sukharev,S., Betanzos,M., Chiang,C.S., and Guy,H.R. (2001). The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* 409, 720-724.
- Sutherland,F.C., Lages,F., Lucas,C., Luyten,K., Albertyn,J., Hohmann,S., Prior,B.A., and Kilian,S.G. (1997). Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 7790-7795.
- Suutari,M., Liukkonen,K., and Laakso,S. (1990). Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1469-1474.
- Thevelein,J.M. and de Winde,J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904-918.
- Thomas,D.S., Hossack,J.A., and Rose,A.H. (1978). Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 117, 239-245.
- Tompa,P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27, 527-533.
- Tompa,P. and Csermely,P. (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* 18, 1169-1175.
- Tompa,P., Drosztanyi,Z., and Simon,I. (2006). Prevalent Structural Disorder in *E. coli* and *S. cerevisiae* Proteomes. *Journal of Proteome Research* 5, 1996-2000.
- Trott,A. and Morano K.A (2003). The yeast response to heat shock. In *Yeast Stress Responses*, S.Hohmann and W.H.Mager, eds. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 71-120.
- Tuite,M.F., Bossier,P., and Fitch,I.T. (1988). A highly conserved sequence in yeast heat shock gene promoters. *Nucleic Acids Res.* 16, 11845.
- Udenfriend,S. and Kodukula,K. (1995). How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 563-591.
- Uversky,V.N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* 269, 2-12.

- Valentin,E., Herrero,E., Rico,H., Miragall,F., and Sentandreu,R. (1987). Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* *148*, 88-94.
- van der Rest,M.E., Kamminga,A.H., Nakano,A., Anraku,Y., Poolman,B., and Konings,W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* *59*, 304-322.
- Van Montfort,R., Slingsby,C., and Vierling,E. (2001). Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv. Protein Chem* *59*, 105-156.
- van Uden,N. (1984). Temperature profiles of yeasts. *Adv. Microb. Physiol* *25*, 195-251.
- Vance,J.E. and Steenbergen,R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res.* *44*, 207-234.
- Vanden Bossche,H., Marichal,P., Gorrens,J., and Coene,M.C. (1990). Biochemical basis for the activity and selectivity of oral antifungal drugs. *Br. J. Clin. Pract. Suppl* *71*, 41-46.
- Varela,J.C., Praekelt,U.M., Meacock,P.A., Planta,R.J., and Mager,W.H. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* *15*, 6232-6245.
- Voisine,C., Craig,E.A., Zufall,N., von Ahsen,O., Pfanner,N., and Voos,W. (1999). The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* *97*, 565-574.
- von Heijne,G. (1990). The signal peptide. *J. Membr. Biol.* *115*, 195-201.
- Walker,G.M. (1999). *Yeast - Physiology and Biotechnology*.
- Walter,S. and Buchner,J. (2002). Molecular chaperones-cellular machines for protein folding. *Angew. Chem Int. Ed Engl.* *41*, 1098-1113.
- Ward,J.J., Sodhi,J.S., McGuffin,L.J., Buxton,B.F., and Jones,D.T. (2004). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J. Mol. Biol.* *337*, 635-645.
- Watson,K. (1978). Thermal adaptation in yeasts: correlation of substrate transport with membrane lipid composition in psychrophilic and thermotolerant yeasts [proceedings]. *Biochem. Soc. Trans.* *6*, 293-296.
- Watson,K. (1990). Microbial stress proteins. *Adv. Microb. Physiol* *31*, 183-223.
- Webster,D.L. and Watson,K. (1993). Ultrastructural changes in yeast following heat shock and recovery. *Yeast* *9*, 1165-1175.
- Wegele,H., Muller,L., and Buchner,J. (2004). Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* *151*, 1-44.
- Weinreb,P.H., Zhen,W., Poon,A.W., Conway,K.A., and Lansbury,P.T., Jr. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* *35*, 13709-13715.

- Werner-Washburne, M., Becker, J., Kosc-Smithers, J., and Craig, E.A. (1989). Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J. Bacteriol.* *171*, 2680-2688.
- Wiederrecht, G., Seto, D., and Parker, C.S. (1988). Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* *54*, 841-853.
- Wiggins, P.M. (1990). Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* *54*, 432-449.
- Wirtz, K.W. (1991). Phospholipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *60*, 73-99.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* *179*, 131-137.
- Wood, J.M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *63*, 230-262.
- Wright, P.E. and Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* *293*, 321-331.
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 441-469.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., and Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* *217*, 1214-1222.
- Yang, S.A. and Klee, C.B. (2000). Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochemistry* *39*, 16147-16154.
- Yazawa, M., Matsuzawa, F., and Yagi, K. (1990). Inter-domain interaction and the structural flexibility of calmodulin in the connecting region of the terminal two domains. *J. Biochem. (Tokyo)* *107*, 287-291.
- Yeagle, P.L. (1989). Regulation of membrane function through composition, structure, and dynamics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *568*, 29-34.
- Zara, S., Antonio, F.G., Budroni, M., and Bakalinsky, A.T. (2002). HSP12 is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*. *Yeast* *19*, 269-276.
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *173*, 2026-2034.
- Zlotnik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B., and Cabib, E. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J. Bacteriol.* *159*, 1018-1026.

7 Abkürzungen

Ade	Adenin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
CD	Circulardichroismus
C _L	konstante Domäne der leichten Kette eines AKs
CFW	Calcofluor White M2R
Da	Dalton
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Differentialkalorimetrie (differential scanning calorimetry)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisierungsquelle
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsre
HSE	Hitzeschockelement
Hsp	Hitzeschockfaktor
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunoglobulin G
IPC	Inositolphosphatceramid
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galaktopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPC	Lyso-PC

LPE	Lyso-PE
LUV	Large unilamellar vesicle
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
μM	mikromolar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphaditylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
pI	isoelektrischer Punkt
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
PPI	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
PS	Phosphatidylserin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SUV	small unilamellar vesicle
STRE	„stress responsive element“
TEMED	N, N ,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris-HCl	Trihydroxymethylammoniumethan Hydrochlorid

Trp	Tryptophan
TZ	Tischzentrifuge
U	unit
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2001 bis September 2006 im Department Chemie der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Biotechnologie unter Leitung von Prof. Dr. Johannes Buchner angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Johannes Buchner für die Bereitstellung dieses äußerst interessanten und zugleich herausfordernden Themas, für seine große Diskussionsbereitschaft und den kreativen Freiraum, den ich in seiner Arbeitsgruppe genossen habe.

Ein besonderer Dank gilt Stephan Frey, Dr. Fabio Falsone, Titus Franzmann, Martin Hessling, Daniel Weinfurtnner, Ottmar Hainzl, Dr. Benjamin Bösl, Dr. Sebastian Leptihn und Bettina Richter für die vielen fachlichen und v.a. auch nicht-fachlichen Gespräche, die den Laboralltag erheiterten. Ohne die gute Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem danke ich Yan Le und Sylvia Wandelt für die gute Zusammenarbeit und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Ich danke Dr. Martin Haslbeck, Anja Osterauer, Susanne Quedzuweit für jegliche Unterstützung und unseren Systemadministratoren Titus Franzmann, Dr. Lin Römer und Sebastian Wandler für die große Hilfe und intensive Computer-Betreuung.

Bettina Richter möchte ich für die REM-Aufnahmen und die Unterstützung bei der 2D-Gelelektrophorese danken; Helmut Krause für die unermüdliche MS-Analyse.

Weiterhin danke ich Prof. Joachim Seelig für die Unterstützung bei den ITC-Messungen und die vielen Diskussionen.

Ein großer Dank gilt Dr. Gerhard Liebisch für die Lipid-Analysen und die wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Mein spezieller Dank gilt Frau Susanne Hilber, ohne deren Engagement und Organisation vieles nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitskreise Buchner, Walter, Richter und Scheibel bedanken, die immer hilfsbereit waren und stets für eine gute Atmosphäre beim Arbeiten sorgten.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und mich fortwährend unterstützt und gefördert haben. Ein ganz besonderer Dank gilt Christian Rudolph, der mir mit unendlicher Geduld und Unterstützung stets zur Seite stand.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt, und auch nicht veröffentlicht.

München, September 2006