

**Charakterisierung kleiner cytoplasmatischer Hitzeschockproteine  
der Wildtomate (*Lycopersicon peruvianum* L.)**

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

von Alexander Bucka

geboren am 29. April 1967 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Dr. habil. D. Neumann
2. Prof. Dr. habil. G.-J. Krauss
3. Prof. Dr. habil. K. Kloppstech

Halle/Saale, verteidigt am 30. April 1999

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kurze Darstellung der Hitzestreßantwort pflanzlicher Systeme	1
1.2	Die Hitzeschockproteine	4
1.3	Signaltransduktion in Streßsituationen	14
1.4	Zielstellung	16
2	Materialien und Methoden	17
2.1	Pflanzenmaterial und Kulturbedingungen	17
2.1.1	Zellkulturen: <i>Lycopersicon peruvianum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Silene vulgaris</i>	17
2.1.2	Pflanzen: <i>Lycopersicon esculentum</i>	17
2.2	Wirtsstämme und Vektoren	17
2.3	Streßregime	17
2.3.1	Hitzestreß	17
2.3.2	Schwermetallstreß	18
2.4	Häufig verwendete Lösungen	20
2.4.1	Puffer, Hybridisierungslösungen	20
2.4.2	Nährmedien und Zusätze	21
2.4.3	Nucleinsäureisolation	22
2.4.4	Proteinisolation	23
2.5	Mikroskopische Verfahren	24
2.5.1	Lichtmikroskopische Verfahren	24
2.5.1.1	PEG-Einbettung	24
2.5.1.2	<i>In Situ</i> Hybridisierung	24
2.5.1.3	Immunohistochemie	26
2.5.1.4	Messung intrazellulärer pH-Wert-Veränderungen im konfokalen Mikroskop	27
2.5.2	Elektronenmikroskopische Verfahren	28
2.5.2.1	Glutaraldehyd-Osmium-Fixierung, Einbettung in ERL	28
2.5.2.2	Formaldehyd-Fixierung, Einbettung in Lowicryl	29

---

2.5.2.3	Autoradiographie	30
2.6	Molekularbiologische und zellbiologische Verfahren	30
2.6.1	Direkter DNA Transfer in <i>Escherichia coli</i>	30
2.6.2	Screening einer $\lambda$ -gt11 Expressionsgenbank (cDNA-Bank)	31
2.6.3	Isolation und Charakterisierung genomischer Klone	31
2.6.4	Sequenzierung	32
2.6.5	Gesamt-RNA aus Pflanzengeweben	32
2.6.6	Northern Hybridisierung	33
2.6.7	Primer Extension	34
2.6.8	Isolation pflanzlicher Gesamt-DNA	34
2.6.9	Genomische Southern Hybridisierung	35
2.6.10	Expression eines LMW HSPs aus <i>Lycopersicon peruvianum</i> in <i>Escherichia coli</i>	36
2.6.10.1	Expression als GST-Fusionsprotein	36
2.6.10.2	Expression des rekombinanten Proteins als Fusionsprotein mit einem Hexahistidinpeptid	36
2.6.11	<i>In vitro</i> Chaperon Assays zur Charakterisierung des rekombinanten Proteins	37
2.6.12	Untersuchungen zur nativen Struktur des Proteins	39
2.6.12.1	Nichtdenaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	39
2.6.12.2	Negativkontrastierung für die Elektronenmikroskopie	40
2.6.13	Gesamt-Protein-Extraktion aus pflanzlichen Zellkulturen	40
2.6.14	Bestimmung der Proteinkonzentration nach ESEN (1978)	41
2.6.15	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)	41
2.6.16	Zweidimensionale Gelelektrophorese (IEF, SDS-PAGE) nach O'FARRELL (1975)	42
2.6.17	Western Blotting	43
2.6.18	Anfärben von Proteinen auf Membranen mit Ponceau Rot	44
2.6.19	Blot Overlay Assays	44
2.6.20	Versuche mit ATPase-Hemmstoffen und Ionophoren	44
2.6.21	In Gel Kinase Assays	45
2.6.22	Sequenzvergleiche, Hydropathieplots	45

---

3	Ergebnisse	47
3.1	cDNAs	47
3.1.1	Sequenzanalyse	52
3.2	Genomische Klone	55
3.3	Expression eines rekombinanten Hitzeschockproteins in <i>Escherichia coli</i>	56
3.4	Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften des rekombinanten HSP17	58
3.5	Struktur des nativen Proteins	62
3.5.1	Negativkontrastierung	62
3.5.2	Native Gelelektrophorese	63
3.6	Untersuchungen zur Expression des HSP17	64
3.7	Unterschiede der Reaktion auf Hitzestress und Schwermetallexposition	66
3.8	Untersuchungen zur Lokalisation von RNA in den Hitzeschockgranula	74
3.9	Untersuchungen zur Signaltransduktion in Stresssituationen	77
3.9.1	Versuche mit ATPase-Hemmstoffen und Ionophoren, Kinase Assays	77
4	Diskussion	80
4.1	Eigenschaften kleiner Hitzeschockproteine der Tomate	80
4.2	Charakterisierung der Hitzeschockgranula, ultrastruktureller Vergleich verschiedener Stresssituationen	83
4.3	Untersuchungen zur Signaltransduktion: Hemmstoffe, Ionophoren und In Gel Kinase Assays	86
5	Zusammenfassung	89
6	Literatur	91

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid (komplementäre DNA)
CS	Citrat Synthase
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribnucleic Acid (Desoxyribonucleinsäure)
ds	doppelstrang-
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamine tetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockprotein)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kDa	kilo Dalton
LMW HSP	Low Molecular Weight Heat Shock Protein (kleines Hitzeschockprotein)
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NTP	Nucleosidtriphosphat
oligo(dT)	Oligo-thymidin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	PBS + 0.1 % Tween 20

PEP	Phosphoenolpyruvat
pI	Isoelektrischer Punkt
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonucleinsäure)
rRNA	Ribosomal RNA (Ribosomale RNA)
RUBISCO	Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC	Saline Sodium Citrate
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
tRNA	transfer RNA
U	Uracil (in Sequenzen)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## Abkürzungen der proteinogenen Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
Z	Valin

# 1 Einleitung

## 1.1 Kurze Darstellung der Hitzestreßantwort pflanzlicher Systeme

Alle Organismen sind wechselnden Umweltbedingungen, das heißt Schwankungen einer Reihe von abiotischen (zum Beispiel Licht, Wasser, Temperatur) und biotischen Faktoren (Pathogene) ausgesetzt. Häufig haben derartige Situationen, die eine Abweichung von einem relativ eng begrenzten Optimum darstellen, eine veränderte Genexpression zur Folge, die eine Vielzahl von Anpassungs- oder Abwehrreaktionen bewirkt. Solche Abweichungen vom Optimum, die daraus folgenden Belastungen des Organismus und dessen Reaktionen werden in der Biologie als Streß bezeichnet. Der Begriff Streß (*lat. stringere*) läßt sich mit Zwangslage, Bedrängnis, auch physikalische Beanspruchung erklären. In der Biologie wurde dieser Begriff von SELYE (vergleiche SELYE, 1984) eingeführt, und er wird häufig sowohl für den einwirkenden Störfaktor (Hitzestreß) als auch für die Antwort beziehungsweise den inneren Belastungszustand des Organismus verwendet (ZOEGER et al., 1992). Streßantworten sind transiente Reaktionen, das heißt, daß nach einer vorübergehenden Destabilisierung eine Reaktion erfolgt, die zu einer Normalisierung und häufig zu einer Resistenzsteigerung führt.

Die Hitzeschockantwort stellt eine komplexe Reaktion auf hohe, aber nicht letale Temperaturen dar und gehört zu den auf molekularer Ebene am besten charakterisierten Phänomenen (Zusammenfassungen in NEUMANN et al., 1989; NOVER, 1990; HIGHTOWER, 1991; NOVER, 1991; ZOEGER et al., 1992; MORIMOTO et al., 1994; DE MACARIO & MACARIO, 1994; NOVER & SCHARF, 1997). Diese Streßantwort ist hochkonserviert in allen bisher untersuchten Organismen. Das betrifft sowohl den Mechanismus der Geninduktion (SORGER, 1991; MORIMOTO et al., 1994; NOVER & SCHARF, 1997; SCHÖFFL et al., 1998) als auch die wesentlichen Eigenschaften der Hitzeschockproteine. Neben der Reaktion auf erhöhte Temperaturen gibt es andere Streßsituationen (zum Beispiel osmotischer Streß, Salzstreß), auf die Pflanzen mit spezifischen, zum Teil überlappenden Antworten reagieren.

Obwohl die molekulare Charakterisierung der Hitzeschockantwort erst in den letzten zwanzig Jahren erfolgte, hat die Bearbeitung dieses Problems eine lange Tradition. Der deutsche Pflanzenphysiologe Julius SACHS hatte schon im Jahre 1864 eine Veröffentlichung über die obere Temperaturgrenze der Vegetation publiziert, in der das Verhalten von Pflanzen unter dem Einfluß hoher Temperaturen untersucht wurde und in der unter anderem Veränderungen in der Plasmaströmung und der Membranpermeabilität beschrieben wurden.

RITOSSA beobachtete im Jahre 1962 bei *Drosophila*-Larven dramatische Veränderungen in den "Puff"-Mustern ihrer polytenen Riesenchromosomen und eine veränderte Genexpression nach Hitzeschock oder der Gabe von 2,4-Dinitro-Phenol.

Die ersten Hitzeschockproteine, also Proteine, die nach der Einwirkung des Stressors hohe Temperatur induziert werden, wurden 1974 von TISSIERES et al. beschrieben. In Pflanzen wurde die Expression von Hitzeschockproteinen zuerst 1980 von BARNETT und Mitarbeitern beobachtet. In den vergangenen zwei Jahrzehnten hat sich das Wissen von den Vorgängen sowohl bei der Streßantwort als auch bei induzierten Toleranzen gegen Stressoren, von den Eigenschaften der Hitzeschockproteine und der Regulation ihrer Expression stark erweitert (NOVER, 1991; NOVER & SCHARF, 1997).

Neben erhöhten Temperaturen gibt es andere Stressoren, die nach dem Expressionsmuster der synthetisierten Hitzeschockproteine in zwei Gruppen von induzierenden Agenzien unterteilt werden können (NOVER, 1990):

a) hitzeschockartige Induktoren, die offenbar über das selbe Signalsystem wirken und das ganze Spektrum der bei Hitzeschock exprimierten Proteine induzieren (dazu gehören zum Beispiel Schwermetalle, Ethanol, Aminosäureanaloga)

b) spezifische Induktoren, die einzelne Hitzeschockproteine induzieren und deren Wirkung oft auf einzelne Organismen beschränkt ist (zum Beispiel  $K^+$ -Ionophoren bei *Drosophila*, Nikotin bei Säugern).

Eine typische Hitzeschockantwort wird in den meisten Organismen bei Temperaturen ausgelöst, die etwa 10 Kelvin über deren optimalen Wachstumstemperaturen liegen. Dabei werden bereits nach wenigen Minuten für Hitzeschockproteine kodierende mRNAs transkribiert und translatiert. Die Reifung ribosomaler RNA und die Synthese von Ribosomen werden stark reduziert. Die Translation von Kontrollproteinen (sogenannten Haushaltsproteinen) wird drastisch eingeschränkt, während Transkription und Translation der Hitzeschockproteine stark induziert werden. Andere, zelluläre Merkmale des Hitzestresses sind der Zerfall der Polysomen, der Kollaps des Cytoskelettes in tierischen Systemen und die Blockierung des Zellzyklus. Sowohl in Pflanzen als auch in Tieren wurde die Bildung granulärer Strukturen, sogenannter Hitzeschockgranula, im Cytosol beschrieben (NOVER et al., 1983; COLLIER et al., 1988).

Neben der Synthese von Hitzeschockproteinen und protektiven Enzymen ist die Veränderung der Zusammensetzung der Membranen (verstärkter Einbau gesättigter Fettsäuren) eine wichtige Reaktion auf erhöhte Temperaturen, allerdings ist das eine sehr viel langsamere Reaktion als die Synthese der Hitzeschockproteine.

Die Regulation der Expression der Hitzeschockproteine erfolgt in allen Eukaryoten auf Transkriptionsebene. Während einer Hitzestreßantwort werden spezifische Hitzestreßtranskriptionsfaktoren (HSF) aus einer inaktiven, Regulator- (zum Beispiel

HSP70 in Säugern; BALER et al., 1996) gebundenen, monomeren Form in eine aktive, trimere Form überführt, die aus dem Cytoplasma in den Kern transportiert wird. Im Nukleus erfolgt die Bindung an regulatorische Hitzeschockelemente in den Promotorregionen der Hitzeschockproteingene und deren Translation (Zusammenfassungen in NOVER & SCHARF, 1997; SCHÖFFL et al., 1998).

Die hier beschriebenen Reaktionen ermöglichen dem Organismus ein Überleben der Streßsituation und resultieren häufig in einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen spätere Streßeinwirkungen. Allerdings gehen diese Vorteile einher mit Verlusten an Produktivität, da ein beträchtlicher Teil des Stoffwechsels umprogrammiert werden muß und Ressourcen für die Synthese der Hitzeschockproteine notwendig sind, die sonst dem «normalen» Stoffwechsel zur Verfügung stünden (vergleiche ZOEGER et al., 1992; COLEMAN et al., 1995).

Es sei angemerkt, daß der Hitzeschock im hier verwendeten Sinne ein experimentelles, relativ gut charakterisiertes Phänomen darstellt. Für die meisten Untersuchungen wurden Zellkulturen, Pflanzenteile oder Pflanzen in der kontrollierten Umgebung von Phytokammern verwendet. Viele Versuche, besonders zu Aspekten der Signalerkennung und -wandlung, wurden mit einem schnellen Anstieg der Temperatur durchgeführt, der in der Natur eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Situation ist auch deshalb nur bedingt mit den Verhältnissen am natürlichen Standort zu vergleichen, da dort eine Vielzahl weiterer exogener Faktoren (Wind, Wasserverfügbarkeit, Bodenbeschaffenheit, Pathogene usw.) als auch morphologischer und physiologischer Besonderheiten (Blattstellung, epikutikuläre Wachse, Kühlung durch Transpiration) eine Streßperzeption beziehungsweise eine Streßantwort modulieren können (MCKERSIE & LESHEM, 1994). Unterschiede in der Hitzetoleranz von Schlüsselenzymen scheinen die Ursache für eine geringere Empfindlichkeit von C4-Pflanzen gegenüber Hitze zu sein, da deren PEP-Carboxylase weniger empfindlich ist als die RUBISCO der C3-Pflanzen (MCKERSIE & LESHEM, 1994). Außerdem ist beschrieben worden, daß in verschiedenen Organen einer Pflanze die Expression von Hitzeschockproteinen bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgt. Die Hitzeschockantwort von Pflanzen ist somit eine lokal begrenzte Reaktion («local adaptation syndrome» nach SELYE), das heißt, daß zum Beispiel in Wurzeln keine Hitzeschockproteine induziert werden, wenn in Blättern diese schon deutlich nachweisbar sind (MCKERSIE & LESHEM, 1994).

Zu den chemischen Stressoren, die die Induktion von Hitzeschockproteinen bewirken, gehören die auch als Umweltschadstoffe relevanten Schwermetalle. Schwermetall- und Arsenverbindungen können als hitzeschockartige Induktoren der HSP-Synthese angesehen werden. Die Abundanz der Hitzeschockproteine ist jedoch geringer als bei Hitzestreß. In beiden Fällen erfolgt die Induktion der Transkription der

Hitzeschockproteingene schon nach einer Minute und das Maximum wird in zwei bis fünf Minuten erreicht (WOLLGIEHN & NEUMANN, 1995). Die Synthese der ribosomalen RNA ist im Falle des Schwermetallstresses jedoch nicht merklich beeinträchtigt (WOLLGIEHN & NEUMANN, 1995).

Unter bestimmten Bedingungen werden in Tomatenzellkulturen auch während eines Schwermetallstresses Hitzeschockgranula gebildet (NEUMANN et al., 1994).

Außer der Expression von Hitzeschockproteinen gibt es eine Reihe weiterer beschriebener Stressantworten, zum Beispiel die Synthese von Phytochelatinen (GRILL et al., 1985) und anderen Metallchelatoren. Darüber hinaus führen Schwermetalle zu charakteristischen Veränderungen an Membranen (NEUMANN et al., 1994).

Neben dieser transienten, bei akuter Exposition wichtigen Stressantwort stehen der Pflanze vielfältige, zum Teil sehr spezifische Mechanismen zur Verfügung, Schwermetalle zu entgiften, diese aus dem Stoffwechsel auszuschließen, deren Ausscheidung zu beschleunigen oder deren Aufnahme zu reduzieren (VERKLEIJ & SCHAT, 1990). Eine Abgrenzung dieser Toleranzmechanismen von der molekularen Stressreaktion ist daher notwendig.

## **1.2 Die Hitzeschockproteine**

Unter Hitzeschockproteinen versteht man Proteine, deren Synthese in einer Vielzahl von Zelltypen und Organismen unter Hitzeschockbedingungen induziert oder deutlich erhöht wird (NOVER & SCHARF, 1984; LINDQUIST & CRAIG, 1988; VIERLING, 1990; NOVER, 1991; VIERLING, 1991; MORIMOTO et al., 1994; NOVER & SCHARF, 1997).

Der Name Hitzeschockproteine ist vor allem historisch bedingt; die Mehrzahl dieser Proteine wird auch konstitutiv beziehungsweise in bestimmten Phasen der Entwicklung oder des Zellcyclus synthetisiert und übt essentielle Funktionen in der Zelle aus (Zusammenfassungen in HIGHTOWER & NOVER, 1991; NOVER, 1991; PECHAN, 1991; KONING et al., 1992; MORIMOTO et al., 1994; NOVER & SCHARF, 1997).

Hitzeschockproteine werden nach ihrem Molekulargewicht in verschiedene Familien unterteilt (vergleiche Abbildung 1).

---

Folgende Seite: Abbildung 1: Übersicht über die Familien der Hitzeschockproteine

Archae	Prokaryoten	Eukaryoten			
		Proteine eukaryotischen Ursprungs		Proteine prokaryotischen Ursprungs	
<b><u>HSP110 Familie</u></b>	<b><u>HSP110 Familie</u></b> ClpA ( <i>E. coli</i> , Teil eines ATP-abhängigen Proteasekomplexes, Clp); ClpB; ClpC	<b><u>HSP110 Familie</u></b> HSP104 (Hefe) HSP100 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Cytoplasma Cytoplasma	<b><u>HSP110 Familie</u></b> ClpP, ClpC	Plastiden
<b><u>HSP90 Familie</u></b>	<b><u>HSP90 Familie</u></b> HtpG	<b><u>HSP90 Familie</u></b> HSP90 GRP94	Cytoplasma ER	<b><u>HSP90 Familie</u></b> cpHSP82	Plastiden
<b><u>HSP70 Familie</u></b> <i>Chaperone</i> DnaK ( <i>Methanosarcina mazei</i> )	<b><u>HSP70 Familie</u></b> <i>Chaperone</i> DnaK ( <i>E. coli</i> )	<b><u>HSP70 Familie</u></b> <i>Chaperone</i> HSC/HSP70 GRP78, BIP	Kern, Cytoplasma ER/Golgi	<b><u>HSP70 Familie</u></b> <i>Chaperone</i> HSP68	Mitochondrien, Plastiden
<b><u>HSP60 Familie</u></b> <i>Chaperonine Klasse II</i> Thermosome TF 55	<b><u>HSP60 Familie</u></b> <i>Chaperonine Klasse I</i> GroEL ( <i>E. coli</i> )  <i>Co-Chaperonine</i> GroES ( <i>E. coli</i> )	<b><u>HSP60 Familie</u></b> <i>Chaperonine Klasse II</i> CCT (chaperonin containing T-complex polypeptide)	Cytoplasma	<b><u>HSP60 Familie</u></b> <i>Chaperonine Klasse I</i> HSP60 (cpn60)  <i>Co-Chaperonine</i> cpn10	Mitochondrien, Plastiden  Mitochondrien, Plastiden
<b><u>HSP40 Familie</u></b> <i>Co-Chaperone</i> DnaJ ( <i>Methanosarcina mazei</i> )	<b><u>HSP40 Familie</u></b> <i>Co-Chaperone</i> DnaJ ( <i>E. coli</i> )	<b><u>HSP40 Familie</u></b> <i>Co-Chaperone</i> HSP 40, z.B. Hdj1 ( <i>Homo sapiens</i> )		<b><u>HSP40 Familie</u></b>	<i>Co-Chaperone</i>
<b><u>HSP20 Familie</u></b> HSP 16.5 ( <i>Methanococcus jannaschii</i> )	<b><u>HSP20 Familie</u></b>	<b><u>HSP20 Familie</u></b> HSP17 (Pflanzen), HSP26 (Säuger) HSP20/22	Cytoplasma ER	<b><u>HSP20 Familie</u></b> HSP20/22	Mitochondrien, Plastiden
<b><u>Ubiquitin Familie</u></b> Ubiquitin ( <i>Thermoplasma acidophilum</i> )	<b><u>Ubiquitin Familie</u></b> Ubiquitin ( <i>Anabaena variabilis</i> )	<b><u>Ubiquitin Familie</u></b> Ubiquitin	Cytoplasma	<b><u>Ubiquitin Familie</u></b>	

Im Rahmen dieser Einleitung soll nur ein kurzer Überblick über die Hitzeschockproteinfamilien gegeben werden. Dabei folgt die Einteilung für pflanzliche Hitzeschockproteine der von VIERLING (1991) vorgeschlagenen Nomenklatur.

Da die Hitzeschockantwort ein universeller Prozeß ist, der sowohl bei Archaeobakterien als auch bei Pro- und Eukaryoten beobachtet wird, ist diese Einteilung nicht nur auf Pflanzen anwendbar. Die verschiedenen Organismengruppen unterscheiden sich aber deutlich in der Anzahl der exprimierten Proteine, dem Expressionsmuster und zum Teil in der Proteinstruktur.

Nach phylogenetischen Gesichtspunkten können zwei große Gruppen von Hitzeschockproteinen unterschieden werden: die prokaryotischen und die eukaryotischen Hitzeschockproteine. Auch in Archaeobakterien sind Hitzeschockproteine, die sich verschiedenen Familien zuordnen lassen, beschrieben worden, zum Beispiel die HSP60-homologen Thermosomen, die Ähnlichkeiten zu einer Gruppe eukaryotischer Chaperonine aufweisen (KLUMPP et al., 1997; KLUMPP & BAUMEISTER, 1998). Das deutet auf das hohe evolutionäre Alter dieser Klasse von Proteinen hin. In guter Übereinstimmung mit der Endosymbiontenhypothese treten typische Vertreter der prokaryotischen Hitzeschockproteine auch in den semiautonomen Organellen der Eukaryoten, also in den Plastiden und Mitochondrien, auf, während im Cytosol eukaryotische Homologe der gleichen Familie zu finden sind (zum Beispiel HSP60 in den Plastiden und das eukaryotische CCT im Cytosol; das mitochondriale HSP68 und das cytosolische HSP70).

### *HSP110-Familie*

Vertreter der HSP110-Familie (Molekulargewichtsbereich 104-110 kDa) wurden in den meisten Eukaryoten, mit Ausnahme von *Drosophila*, gefunden. In Hefen und Pflanzen gibt es sowohl cytosolische als auch organelläre Formen (LEONHARDT et al., 1993; MOORE & KEEGSTRAS, 1993). Die großen Untereinheiten der bakteriellen ClpP Protease sind die prokaryotischen Homologen dieser Hitzeschockproteine (GOTTESMAN et al., 1990; SQUIRES et al., 1991; SCHIRMER et al., 1996). ClpP-homologe Proteine wurden auch in den Chloroplasten höherer Pflanzen nachgewiesen (SHANKLIN et al., 1995; OSTERSETZER et al., 1996).

Vertreter der HSP110-Familie zeichnen sich durch zwei konservierte, etwa 200 Aminosäuren große ATP-bindende Domänen aus (PARSELL et al., 1991). Über die Funktionen dieser Proteine ist wenig bekannt, wenngleich sie *in vitro* als Chaperone fungieren können (WICKNER et al., 1994; SCHMITT et al., 1995). Für das HSP104 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde nachgewiesen, daß es essentiell für die erworbene Thermotoleranz, jedoch nicht notwendig für ein Wachstum bei normalen und bei hohen Temperaturen ist (SANCHEZ & LINDQUIST, 1990; SANCHEZ et al., 1993). Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß bei *Drosophila* die Funktionen des HSP104 von HSP70 übernommen werden (SANCHEZ et al., 1993). Das HSP104 ist in der Hefe

in der Recovery-Phase an der Auflösung aggregierter Proteine beteiligt und wirkt dabei mit HSP70 und HSP40 zusammen (GLOVER & LINDQUIST, 1998).

### *HSP90-Familie*

Mitglieder der HSP90-Familie (Molekulargewichtsbereich von 80 bis 94 kDa), die im Cytosol und im Endoplasmatischen Retikulum (GRP94 - glucose regulated protein) lokalisiert sind, hat man in allen bisher untersuchten Eukaryoten gefunden.

Das HSP90 der Säuger ist in großem Umfang Gegenstand der Forschung, da es aus Säugerzellen als Komplex mit Steroidhormonrezeptoren isoliert werden kann und offenbar an diese Proteine bindet, bis das entsprechende Rezeptor-aktivierende Signal (das Hormon) das Chaperon aus dieser Bindung verdrängt (HENDRICK & HARTL, 1993). HSP90 binden ATP und haben autophosphorylierende Aktivität (CSERMELY et al., 1993). Außerdem wurde gezeigt, daß sie mit Actin und Tubulin wechselwirken und *in vitro* Chaperonaktivität zeigen (WIECH et al., 1992; JAKOB & BUCHNER, 1994; JAKOB et al., 1995, CSERMELY et al., 1998).

HSP90 Gene wurden auch aus Pflanzen isoliert, allerdings ist über die Funktion der Proteine noch wenig bekannt (CONNER et al. 1990; KONING et al., 1992; MARRS et al., 1995). PETRASEK et al. (1998) haben gezeigt, daß in Tabak HSP90 mit Mikrotubuli assoziiert ist und daß es *in vitro* an Tubulin bindet (FREUDENREICH & NICK et al., 1998).

Ein HSP82 mit Homologie zu eubakteriellen Proteinen wurde auch in Chloroplasten von Roggen beschrieben (SCHMITZ et al., 1997).

Hefe enthält zwei Gene dieser Gruppe, die essentiell für den Organismus sind (BORKOVICH et al., 1989). Auch *Escherichia coli* enthält ein HSP90 Homologes, das htpG-Genprodukt (SPENCE & GEORGOPOULOS, 1989).

### *HSP70-Familie*

Es können zwei HSP70-Multigenfamilien (Proteine mit einem Molekulargewicht von 63 bis 78 kDa) unterschieden werden, eine eukaryotische, deren Vertreter im Cytosol und im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (BiP - binding protein und GRP - glucose regulated protein) lokalisiert sind, sowie eine DnaK-verwandte Gruppe prokaryotischen Ursprungs, deren Vertreter sowohl in der Matrix der Mitochondrien als auch in Chloroplasten nachgewiesen wurden (vergleiche MIERNYK, 1997).

Das prokaryotische Homologe des HSP70 ist das DnaK aus Bakterien (BARDWELL & CRAIG, 1984).

In einem Archaeobakterium, *Methanococcus jannaschii*, dessen Genom vollständig sequenziert wurde, konnte erstaunlicherweise kein HSP70 identifiziert werden (BULT et al., 1996), während

in anderen Archaeobakterien ein dem prokaryotischen dnaK homologes Gen identifiziert wurde (GUPTA & SINGH, 1992; CLARENS et al., 1995).

Die Familie umfaßt neben den hitzeinduzierten Proteinen (HSPs) auch eine Reihe von Proteinen, die konstitutiv exprimiert werden (HSCs - heat shock cognates) und deren Synthese unter Hitzeschockbedingungen erhöht ist.

Dieser Befund und die ubiquitäre Verbreitung der HSP70 deuten darauf hin, daß die Proteine essentielle Funktionen haben, die unter allen physiologischen Bedingungen in der Zelle erfüllt werden müssen. Tatsächlich sind HSP70 zusammen mit anderen Proteinen (HSP40, HSP35, HSP104) an einer Vielzahl von Proteinfaltungs- und Translokationsprozessen (vergleiche RASSOW et al., 1997; MIERNYK, 1997; BUKAU & HORWICH, 1998; zum Beispiel in den Nukleus und in Mitochondrien; SCHWARZ & NEUPERT, 1994; Auflösung von Aggregaten, GLOVER & LINDQUIST, 1998), an der Reorganisation des Cytoskelettes und an der Autoregulation der Genaktivierung bei Hitzestress beteiligt (vergleiche NOVER & SCHARF, 1997; SCHÖFFL et al., 1998).

Alle Vertreter dieser Proteinklasse bestehen aus einer N-terminalen ATP-bindenden Domäne und einer C-terminalen Wechselwirkungsdomäne, die eine Vielzahl ungefalteter oder denaturierter Proteine bindet (MIERNYK, 1997; BUKAU & HORWICH, 1998).

### *HSP60-Familie*

Vertreter der HSP60-Familie (Molekulargewichtsbereich 53-62 kDa), die die ersten Hitzeschockproteine waren, für die der Begriff der molekularen Chaperone oder Chaperonine verwendet worden war, werden in zwei Klassen unterteilt: die Chaperonine der Gruppe I kommen in Eubakterien (GroEL, GEORGOPOULOS et al., 1973) und den semiautonomen, endosymbiontischen Organellen der Eukaryoten (HSP60 in Mitochondrien, CHENG et al., 1989, und RUBISCO-Untereinheit-bindendes Protein in Chloroplasten, HEMMINGSEN et al., 1988) vor, während Chaperonine der Gruppe II im Cytosol der Eukaryoten (CCT - chaperonine containing TCP-1, TCP-1 - *t*-complex polypeptide 1, vergleiche YAFFE et al., 1992; FRYDMAN et al., 1992) und in Archaeobakterien auftreten (z. B. Thermosomen, PHIPPS et al., 1991; DITZEL et al., 1998; KLUMPP & BAUMEISTER, 1998).

Die eukaryotischen Proteine sind kerncodiert und auch unter Kontrollbedingungen abundant. Das HSP60 der Chloroplasten, das ursprünglich als das RUBISCO-Untereinheit-bindende Protein identifiziert wurde, ist an der Assemblierung des RUBISCO-Holoenzym und anderer Proteine beteiligt (HEMMINGSEN et al., 1988; ROY, 1989).

Die Struktur des prokaryotischen HSP60-Homologen aus *Escherichia coli*, des GroEL (LANGER et al., 1992; CHEN et al., 1994) ist mit Hilfe elektronenmikroskopischer und kristallographischer Techniken gut aufgeklärt (vergleiche HARTL, 1996; XU et al., 1997; BUKAU & HORWICH, 1998).

Es ist als Homooligomer aus 14 Untereinheiten, die in zwei Ringen angeordnet sind, aufgebaut und in einer 1:1-Stöchiometrie mit einem ringförmigen Heptamer aus GroES (einem 10 kDa Protein aus *Escherichia coli*, vom gleichen Operon kodiert wie GroEL; auch cpn10 genannt) assoziiert. Diese Bindung wird durch MgATP und MgADP stabilisiert. Transient erfolgt während des Faltungszyklus die Bindung eines zweiten GroEL Ringes.

Detaillierte Untersuchungen dieses Systems haben zu einem ausgereiften Modell der Funktion dieses Chaperoninkomplexes geführt (zusammengefaßt in ELLIS & VAN DER VIES, 1991; HENDRICK & HARTL, 1993; HORWICH et al., 1993; MAYHEW et al., 1996; WEISSMAN et al., 1996; HARTL, 1996; XU et al., 1997; RICHARDSON et al., 1998; BUKAU & HORWICH, 1998). Die Faltung des Substratproteins erfolgt in dem zentralen Hohlraum des GroEL-Doppelringes, der von den GroES Heptameren geschlossen wird. Die Faltung ist ATP-abhängig und erfolgt in mehreren Zyklen (MAYHEW et al., 1996; WEISSMAN et al., 1996). Eine wesentliche Funktion des HSP60 ist dabei wahrscheinlich die Schaffung einer für eine solche Faltung günstigen Umgebung (AGARD, 1993).

Auch in Mitochondrien und Chloroplasten (HARTMANN et al., 1992; BERTSCH et al., 1992) sind GroES-verwandte Proteine nachgewiesen, die mit dem HSP60 kooperieren. Das GroES-verwandte Protein der Chloroplasten aus *Pisum sativum* ist ein 24 kDa-Protein, dessen cDNA aus zwei als Tandemrepeats angeordneten groES besteht (BERTSCH et al., 1992).

Für die Chaperonine der Gruppe II wurden bisher keine Co-Chaperonine (in Analogie zu GroES) nachgewiesen (KLUMPP & BAUMEISTER, 1998).

### *HSP40-Familie*

Die Familie der HSP40 wird als Co-Chaperone bezeichnet, da sie als Regulator von Proteinen der HSP70 Familie eine wichtige Rolle spielen (CYR et al., 1994; BUKAU & HORWICH, 1998; KELLEY, 1998). Das DnaJ, das prokaryotische HSP40 Homologe aus *Escherichia coli*, besteht aus vier Domänen, von denen die J-Domäne für die Interaktion mit HSP70 wichtig zu sein scheint (KELLEY, 1998). Eine weitere Komponente, die an dem Chaperon-Zyklus des DnaK (HSP70) beteiligt ist, ist das GrpE, welches als Nukleotidaustauschfaktor wirkt. Durch die Bindung des GrpE wird ADP aus dem Komplex verdrängt und ATP wird daraufhin gebunden (zusammengefaßt in RASSOW et al., 1997; BUKAU & HORWICH, 1998).

### *Kleine Hitzeschockproteine (Low Molecular Weight HSP)*

Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine (Low Molecular Weight HSP, LMW-HSP, Molekulargewichtsbereich 15-30 kDa) umfaßt in *Drosophila* vier Proteine und in Säugern drei bis vier Proteine, während in Hefe nur ein einziges Protein identifiziert worden ist (VIERLING,

1991; WATERS et al., 1996). In Pflanzen jedoch ist diese Familie sehr viel umfangreicher, sodaß hier mehrere Unterfamilien unterschieden werden (SCHÖFFL et al., 1988, VIERLING, 1991; WATERS et al., 1996).

In Pflanzen ist die konstitutive Expression der kleinen Hitzeschockproteine äußerst gering, sie werden jedoch unter Streßbedingungen in großer Vielfalt stark induziert. Auf Grund des niedrigen basalen Niveaus und der deutlichen Expression unter Streßeinwirkung stellen sie einen guten Marker für verschiedene Streßsituationen dar.

In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß einige dieser LMW-HSP auch entwicklungsbedingt exprimiert sind. In reifenden Samen von Tabak, Tomate, Erbse und anderen Arten wurde die Akkumulation von HSP17 nachgewiesen, welches während der Keimung innerhalb von wenigen Tagen abgebaut wird (COCA et al., 1994; DEROCHE & VIERLING, 1994; ZUR NIEDEN et al., 1995; CARRANCO et al., 1997, MEDINA-ESCOBAR et al., 1998). Andere Entwicklungsprozesse, in denen kleine Hitzeschockproteine exprimiert werden, sind Pollenentwicklung, Fruchtreifung und somatische Embryogenese (zusammengefaßt in WATERS et al., 1996).

In Pflanzen werden nach ihrer subzellulären Lokalisation, Aminosäuresequenzhomologien und Kreuzreaktivitäten fünf Unterfamilien kleiner Hitzeschockproteine unterschieden (VIERLING, 1991; WATERS et al., 1996): dabei sind zwei Klassen im Cytosol, je eine in Chloroplasten, Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Alle untersuchten LMW HSPs sind kerncodiert, werden an freien Ribosomen synthetisiert und danach in die Organellen transportiert.

Die bisher beschriebenen kleinen Hitzeschockproteine weisen in ihrem C-terminalen Teil eine Homologie zu  $\alpha$ -Crystallin (vergleiche GROENEN et al., 1994), dem Strukturprotein der Augenlinse, auf. Eine hochkonservierte Region nahe des C-Terminus (Pro-X14-Gly-Val-Leu) ist besonders prominent (WATERS et al., 1996).

ATP-Bindungsstellen wurden im Gegensatz zu der Situation bei anderen HSP-Familien bisher nicht identifiziert. Generell ist die Ähnlichkeit zwischen Proteinen der gleichen Klasse aus unterschiedlichen Arten höher als die Homologie von Vertretern unterschiedlicher Klassen des gleichen Organismus (VIERLING, 1991; WATERS et al., 1996).

Für die kleinen Hitzeschockproteine der Säuger konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung der Proteine durch Hitzestreß und andere Stimuli induziert werden kann (WELCH, 1985; ARRIGO & WELCH, 1987; LANDRY et al., 1992; BENNDORF et al., 1994; ITO et al., 1997). Ein analoges Verhalten ließ sich für pflanzliche Hitzeschockproteine bisher nicht nachweisen. Auch eine Wechselwirkung kleiner Hitzeschockproteine und des  $\alpha$ -Crystallins mit verschiedenen Komponenten des Cytoskelettes, zum Beispiel der Schutz von Intermediärfilamenten während einer Streßsituation, wurde bisher nur im Säugersystem gezeigt (LAVOIE et al., 1993; BENNDORF et al., 1994; WANG & SPECTOR, 1996; DJABALI et al., 1997).

Eine weitere Besonderheit der kleinen Hitzeschockproteine ist die Bildung großer, subzellulärer Komplexe (10-20S), die als Hitzeschockgranula bezeichnet werden (NOVER et al., 1983; NEUMANN et al., 1984). Die Hitzeschockgranula aus Tomate, etwa 40 bis 80 Nanometer im Durchmesser, bestehen hauptsächlich aus LMW-HSP, HSP70, anderen Proteinen und sogenannter "housekeeping" mRNA (NOVER et al., 1989).

CLARKE & CRITCHLEY (1992) haben in den Chloroplasten von Gerste einen hochmolekularen Komplex aus acht HSP32-Molekülen identifiziert, der unter Hitzeschockbedingungen gebildet wird. Dieser Komplex, dessen Funktion unklar bleibt, enthält keine Nukleinsäuren.

Auch in Tieren sind Streßgranula charakterisiert worden (COLLIER et al., 1988). Es wurden jedoch keine Anhaltspunkte dafür gefunden, daß diese Strukturen RNA enthalten.

Das  $\alpha$ -Crystallin formt ebenfalls große Aggregate mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 800 kDa (GROENEN et al., 1994).

Die Funktion der LMW-HSP ist noch nicht aufgeklärt, wenngleich es Anhaltspunkte für essentielle Funktionen dieser Proteine gibt.

Verschiedene Autoren schlagen eine Rolle der kleinen Hitzeschockproteine für eine erworbene Thermotoleranz in Pflanzen vor (VIERLING, 1991; HSIEH et al., 1992, YEH et al., 1994). So weisen zum Beispiel transgene *Arabidopsis thaliana*, die GUS-HSF Fusionen (Glucuronidase-Hitzeschock Transkriptions Faktoren) exprimieren und ein erhöhtes Niveau der Expression kleiner Hitzeschockproteine zeigen, eine erhöhte Thermotoleranz (LEE et al., 1995) auf. Da jedoch auch andere Hitzeschockproteine überexprimiert werden, ist es schwierig, die erhöhte Thermotoleranz einzig dem erhöhten Niveau der kleinen HSPs zuzuordnen. Auch *Escherichia coli*, die ein kleines Hitzeschockprotein aus Reis exprimierten, zeigten eine deutlich erhöhte Thermotoleranz (YEH et al., 1997).

Neben dem Schutz beziehungsweise der Speicherung translationsinaktiver mRNA während eines Hitzeschockes in den Hitzeschockgranula (NOVER et al., 1989) ist auch eine Funktion bei der Stabilisierung von Mikrofilamenten diskutiert worden (WOLLGIEHN et al., 1994).

Für HSP25 und  $\alpha$ -Crystallin der Säuger konnte gezeigt werden, daß sie *in vitro* als Chaperon fungieren können (HORWITZ, 1992; JAKOB et al., 1993). Auch für pflanzliche kleine HSPs konnte in jüngster Zeit mit Hilfe der von BUCHNER (BUCHNER et al., 1991; JAKOB et al., 1993) entwickelten Assays gezeigt werden, daß sie *in vitro* als Chaperone wirken können (LEE et al., 1995; BOSTON et al., 1996; LEE et al., 1997). Im Unterschied zu anderen Chaperonen erfordern die kleinen HSPs für ihre Wirkung nicht die Gegenwart von ATP.

## *Ubiquitin*

Ubiquitin (8.5 kDa), ein hochkonserviertes Protein aus 76 Aminosäuren, wird, ebenso wie einige an der Ubiquitinkonjugation beteiligte Enzyme, in vielen Eukaryoten durch Hitzeschock induziert (SEUFERT & JENTSCH, 1992; CHRISTENSEN et al., 1992; VARSHAVSKY, 1997). Ubiquitin wird kovalent an andere Proteine gebunden, die damit für einen nachfolgenden Abbau, der meist durch das 26 S Proteasom erfolgt, markiert werden (GOLDBERG, 1995). Da diese Bindung reversibel sein kann, dient sie wahrscheinlich auch regulatorischen Funktionen. Ein erhöhter Bedarf für Ubiquitin unter Hitzestressbedingungen ist zu erwarten, da mehr beschädigte oder teilweise denaturierte Proteine auftreten.

In Pflanzen wird Ubiquitin von einer Multigenfamilie codiert und nur manche Vertreter sind hitzeinduzierbar, während andere kein verändertes Expressionsmuster aufweisen (CHRISTENSEN & QUAIL, 1989; GARBARINO et al., 1992; CHRISTENSEN et al., 1992).

In den letzten Jahren wurde Ubiquitin auch in Prokaryoten und Archaeobakterien nachgewiesen (WOLF et al., 1993; DURNER & BÖGER, 1995), allerdings liegen keine Daten zur Expression in Stresssituationen vor.

Neben diesen Hitzeschockproteinen sind eine Reihe von proteolytischen Proteinen (CHIN et al., 1988; WAGNER et al., 1994) und einige Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen, die keiner der HSP-Familien zugeordnet werden können, durch Hitzestress induzierbar (SYKES et al., 1993; LUAN et al., 1994a; LUAN et al., 1994b).

Viele der auch konstitutiv exprimierten Hitzeschockproteine erfüllen wichtige Funktionen, für die Mehrzahl der Proteine wurde eine Rolle als Chaperone beziehungsweise Chaperonine gezeigt. Chaperon bedeutet eigentlich Gouvernante. Hier wird es verwendet im Sinne von bei der Proteinfaltung assistierend oder eine Faltung oder "unerwünschte" Aggregation verhindernd (HARTL, 1996; JAENICKE, 1996; BEISSINGER & BUCHNER, 1998). In der hoch konzentrierten Proteinlösung, die eine Zelle darstellt, sind solche Wechselwirkungen durchaus wahrscheinlich (HARTL, 1996). Chaperone helfen bei der Aufrechterhaltung einer faltungskompetenten oder translokationskompetenten Proteinkonformation (für Übersichten vergleiche HENDRICK & HARTL, 1993; ELLIS, 1994; HARTL, 1996; BUKAU & HORWICH, 1998). Einige Chaperone sind auch Bestandteil von Proteasekomplexen (SCHIRMER et al., 1996).

Der Begriff "molecular chaperone" wurde von LASKEY et al. (1978) für einen "nucleosome assembly factor" (ein Nucleoplasmin) eingeführt. Die Funktion dieses speziellen Chaperons sahen die Autoren im Verhindern inkorrekt ionischer Wechselwirkungen zwischen Histonen und der DNA. Der Begriff wurde dann für Vertreter der HSP60-Familie verwendet, später jedoch auf die Familien der HSP70 und HSP90 ausgedehnt (GEORGOPOULOS, 1992; HENDRICK & HARTL, 1993; CRAIG, 1993; BECKER & CRAIG, 1994; HARTL, 1996; BUKAU & HORWICH, 1998).

Chaperone enthalten selbst keine sterische Information für die Faltung oder Assemblierung und sie sind selbst auch nicht Teil des Endproduktes. Im Unterschied zu Faltungsenzymen, zum Beispiel den Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen und Protein-Disulfid-Isomerasen, die die Geschwindigkeit langsamer Reaktionen bei der Faltung erhöhen, verbessern Chaperone die Ausbeute der Faltungsreaktion (HARTL, 1996; JAENICKE, 1996). Chaperone stellen daher keine Enzyme im engeren Sinne dar.

Einige der Chaperone benötigen für ihre Funktion ATP (zum Beispiel GroEL und HSP70; vergleiche HENDRICK & HARTL, 1993; BUKAU & HORWICH, 1998), während andere ATP-unabhängig wirken (humanes HSP27, JAKOB et al., 1993).

Obwohl Chaperone an der Faltung und der Assemblierung vieler Proteine beziehungsweise Proteinkomplexe beteiligt sind, benötigen nicht alle Proteine Chaperone, um ihre korrekte Tertiär- und Quartärstruktur zu erreichen (HARTL, 1996; NETZER & HARTL, 1998; BEISSINGER & BUCHNER, 1998).

### 1.3 Signaltransduktion in Streßsituationen

Sowohl Hitzeschock als auch Schwermetallstreß führen in pflanzlichen Zellkulturen zur Expression von Hitzeschockproteinen. Obwohl eine Reihe von Untersuchungen in verschiedenen Systemen vorliegen (zusammengefaßt in NOVER, 1991), sind die Komponenten der Signalerkennung und Signalwandlung, besonders im Falle der Schwermetallexposition, immer noch unzureichend charakterisiert.

Eine Antwort auf den physikalischen Streß Hitze erfordert nicht zwingend die Beteiligung von Komponenten in der Plasmamembran, da das Signal sich relativ schnell auch in den Zellen und Organen ausbreitet. Schon 1985 war jedoch von WEITZEL et al. eine Änderung des cytosolischen pH-Wertes von Hefezellen während eines Hitzeschocks gezeigt worden.

Für die Transkriptionskontrolle der HSP-Gene war ein Autoregulationsmechanismus vorgeschlagen worden, der das Freisetzen eines an HSP70 gebundenen Hitzeschocktranskriptionsfaktors erfordert, der dann die Transkription der Hitzeschockgene ermöglicht. Der Transkriptionsfaktor kann unter anderem freigesetzt werden, wenn durch die Gegenwart vieler denaturierter Proteine der Bedarf an HSP70 in der Zelle steigt. Dieser Autoregulationsmechanismus ermöglicht auch das Herunterfahren der HSP Synthese, sobald genug HSP70 verfügbar ist, um den Transkriptionsfaktor wieder zu binden (zusammengefaßt in MORIMOTO, 1993; SCHÖFFL et al., 1998).

Andere Komponenten, die an der Regulation der Expression von Hitzeschockproteinen beziehungsweise an der Aktivierung/Inaktivierung von Hitzeschocktranskriptionsfaktoren in tierischen Systemen beteiligt sind, sind Proteinkinasen und -phosphatasen (WU, 1995; SCHÖFFL et al., 1998).

Die Situation im Falle des Schwermetallstressses unterscheidet sich in einigen Aspekten vom Hitzestreß. Die Rezeption des Signals an der Plasmamembran erscheint wahrscheinlich und verlangt auch die Unterscheidung zwischen essentiellen und toxischen Metallen und ein "Sensing" der notwendigen, aber noch nicht toxischen Konzentration (zum Beispiel bei Kupfer). Alternativ wäre eine Aufnahme von Schwermetallen (über die Ionentransporter der Zellmembran) denkbar, die dann in der Zelle zu Veränderungen führen (Proteindenaturierungen), die wiederum im einfachsten Falle den oben umrissenen Selbstregulationsmechanismus in Gang setzen.

In den letzten Jahren wurden besonders in Hefe und im Säugersystem, aber auch zunehmend in Pflanzen, zahlreiche MAP-Kinasen (MAP - mitogen-activated protein) identifiziert, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind (CANO & MAHADEVAN, 1995; MADHANI & FINK, 1998; SEO et al., 1995; CHANG & STEWART, 1998). Zu den Stimuli, die diese MAP-Kinasen aktivieren, gehören neben entwicklungsbedingten Signalen auch verschiedene Stressoren, zum Beispiel hohe Osmolarität, UV-Bestrahlung und Verwundung (vergleiche CANO & MAHADEVAN, 1995). In

pflanzlichen Systemen wurden MAP-Kinasen beschrieben, die entwicklungsbedingt, durch Verwundung und als Reaktion auf Pathogene aktiviert werden (SEO et al., 1995; SUZUKI & SHINSHI, 1995; BÖGRE et al., 1997; MIZOGUCHI et al., 1997, WILSON et al., 1997). MAP-Kinasen sind Teil von Signaltransduktionskaskaden, die weitere Proteinkinasen (MAP-Kinase Kinase; MAP-Kinase Kinase Kinase), Phosphatasen und Rezeptoren umfassen (vergleiche DAVIS, 1993; CANO & MAHADEVAN, 1995; LUAN, 1998), die letztendlich zur Aktivierung, das heißt zu einer Phosphorylierung von Tyrosinen und Threoninen der MAP-Kinasen, führt (ANDERSON et al., 1990; POSADA et al., 1991). Über die pflanzlichen Substrate der beschriebenen MAP-Kinasen liegen kaum Untersuchungen vor. Im Säugersystem sind unter anderem auch kleine Hitzeschockproteine Substrate der MAP-Kinasen (LANDRY et al., 1992; ROUSE et al., 1994; LARSEN et al., 1997).

## 1.4 Zielstellung

Die biochemische Charakterisierung der kleinen, cytoplasmatischen Hitzeschockproteine (Low Molecular Weight HSP) der Tomate *in vivo* und *in vitro* und Untersuchungen zu den Funktionen dieser Proteine sowohl in Streßsituationen als auch in ausgewählten Phasen der Entwicklung waren der wesentliche Inhalt der vorliegenden Arbeit. In diesem Zusammenhang waren vor allem Unterschiede der Streßantwort auf Hitze und auf Schwermetallexposition von Interesse. Für diese Untersuchungen war es sinnvoll, Zellkulturen zu verwenden, da damit reproduzierbare experimentelle Bedingungen gewährleistet werden konnten. Die Hitzeschockantwort von pflanzlichen Zellkulturen war in vorausgegangenen Arbeiten gut charakterisiert worden. Dabei hatte sich auch gezeigt, daß die undifferenzierten Zellkulturen deutlicher auf Hitze reagieren als verschiedene pflanzliche Gewebe. Die prinzipiellen, molekularen Mechanismen der Streßreaktion sind trotz dieser Einschränkungen gleich.

Zur Charakterisierung der Proteine sollten zunächst verschiedene, für kleine Hitzeschockproteine kodierende cDNAs isoliert und charakterisiert werden. Die Expression eines rekombinanten Hitzeschockproteins würde die Möglichkeit eröffnen, mit dessen Hilfe die biochemischen Eigenschaften des Proteins *in vitro*, zum Beispiel seine mögliche Funktion als Chaperon, zu untersuchen. Außerdem wäre dies eine Voraussetzung für die *in vitro* Suche nach möglichen Bindungspartnern des HSP17 und die Charakterisierung dieser Wechselwirkungen, die für die Funktion des Proteines in der Zelle von Bedeutung sein würden. Weiterhin sollten Komponenten der Signaltransduktionsketten, die in diesen verschiedenen Streßsituationen zur Expression der kleinen Hitzeschockproteine führen, beschrieben werden.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Pflanzenmaterial und Kulturbedingungen**

#### **2.1.1 Zellkulturen: *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon esculentum*, *Silene vulgaris***

Zellsuspensionskulturen von *Lycopersicon peruvianum* L. wurden unter Schütteln (120 rpm) bei 25°C im Dunkeln in MS Medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962) kultiviert. Für die Versuche wurden 2,5 Tage alte, in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Kulturen verwendet. Einige Versuche wurden auch an Zellkulturen von *Lycopersicon esculentum* Mill. (von Frau Elster dankenswerterweise zur Verfügung gestellt) und von *Silene vulgaris* (Moench) Garcke durchgeführt. Diese Zellkulturen waren fünf Tage alt.

#### **2.1.2 Pflanzen: *Lycopersicon esculentum***

Pflanzen von *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Hellfrucht wurden im Gewächshaus auf Erde in einem 16 Stunden Tag / 8 Stunden Nacht Rhythmus bei 25°C kultiviert.

### **2.2 Wirtsstämme und Vektoren**

*Escherichia coli* K12 Sicherheitsstämme: Y1090, DH5 $\alpha$ , K812, BL21, K802

Bakteriophagen  $\lambda$ : EMBL3,  $\lambda$ -gt11

Vektoren: pBKS (Stratagene, La Jolla, USA), pQE32 (Qiagen, Hilden, Bundesrepublik Deutschland), pGEX-5X-2 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

### **2.3 Streßregime**

#### **2.3.1 Hitzestreß**

Regime I und II: Die Zellkulturen wurden im Wasserbad schüttelnd von Raumtemperatur langsam auf 40°C erwärmt. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die Zellkulturen abgesaugt. Die Gabe radioaktiven Uridins (<sup>3</sup>H-Uridin; 100  $\mu$ Ci/ml; Chemapol, Prag, CSSR) erfolgte vor beziehungsweise während des Hitzestresses für 30 Minuten. Die

Temperatur in der Nährlösung gleicht innerhalb von wenigen Minuten der Temperatur des Wasserbades.

Regime VI: Pflanzliche Zellkulturen wurden in einem Wasserbad bei 39°C für zwei Stunden geschüttelt.

Regime VII: Zur Isolation von Hitzeschockproteinen wurde ein stufenweiser Hitzeschock durchgeführt. Dazu wurden die Zellkulturen im Wasserbad bei folgenden Temperaturen geschüttelt: 37°C, 1 Stunde; 38,5°C, 1 Stunde; 41°C, 2 Stunden.

### **2.3.2 Schwermetallstreß**

Regime III und IV: Den Nährmedien wurden die entsprechenden Stammlösungen der in Wasser gelösten Schwermetallsalze zugesetzt. Die Zellkulturen wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Radioaktives Uridin wurde vor beziehungsweise während der Schwermetallexposition für eine halbe Stunde gegeben.

Regime V: Die Zellkulturen wurden bei 25°C in Gegenwart von Schwermetallen für zwei Stunden geschüttelt.

Die Endkonzentrationen der Schwermetallsalze beziehungsweise des Arsenites betragen:

CdCl <sub>2</sub> :	1 mM bis 5 mM
HgCl:	0,05 bis 0,1 mM
NaAsO <sub>4</sub> :	5 mM

In Abbildung 2 sind die Streßregime und die Zeiten der Uridingabe für die autoradiographischen Untersuchungen (Regime I bis IV) dargestellt.

Die Versuchsanordnungen V und VI wurden für die Versuche mit Ionophoren und ATPase-Inhibitoren verwendet.

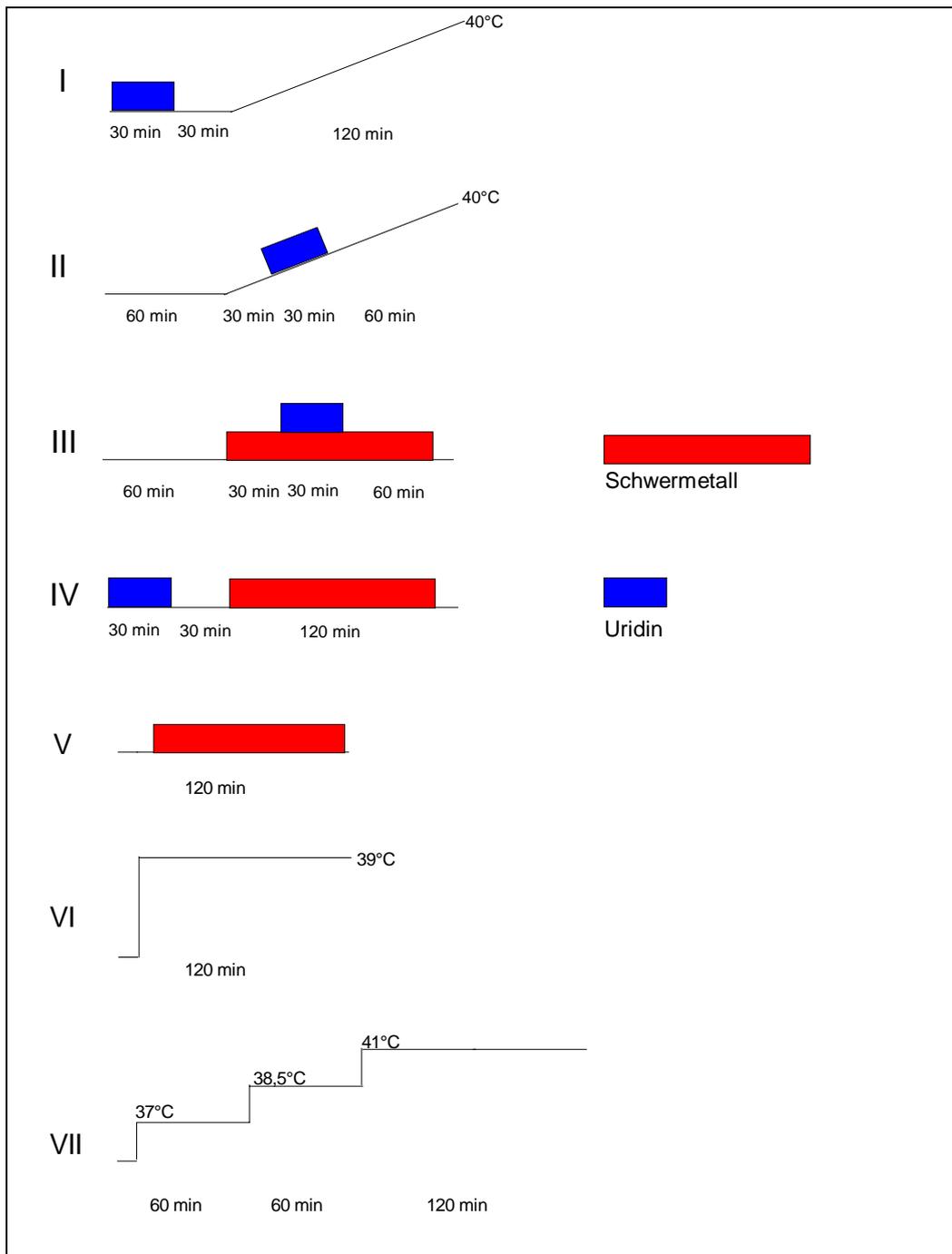


Abbildung 2: Schema der Streßregime und der Gabe von Uridin während der Versuche.

## 2.4 Häufig verwendete Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser (Millipore Milli Q System; Millipore, Bedford, USA) bereitet und bei 121°C, 15 psi (1,1 bar) sterilisiert oder steril filtriert (Celluloseacetatfilter; 0,22 µm; Roth, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland). Lösungen für das Arbeiten mit RNA wurden vor dem Autoklavieren außerdem mit Diethylpyrocarbonat (0,1 % DEPC; Sigma, St. Louis, USA) behandelt.

Die verwendeten Chemikalien mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* waren, soweit nicht anders vermerkt, von Merck (Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland) bezogen worden. Restriktionsenzyme und andere Enzyme für die Molekularbiologie wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim, Bundesrepublik Deutschland), Appligene Oncor (Illkirch, Frankreich) und Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen.

### 2.4.1 Puffer, Hybridisierungslösungen

10 × PBS	20 × SSC
1,37 M NaCl 27 mM KCl 70 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [·2H <sub>2</sub> O] 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -auf pH 7,4 (NaOH) einstellen	3 M NaCl 0,3 M Na <sub>3</sub> -citrat·2H <sub>2</sub> O

Hybridisierungslösung:	100 × Denhardt's
5 × SSC 5 × Denhardt's 50 % Formamid 0,1 % SDS 100 µg/ml Herings-DNA, denaturiert 100 µg/ml tRNA (Hefe)	2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone PVP-360 (Sigma, St. Louis, USA) 2 % (w/v) Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) 2 % (w/v) BSA, Fraction V (Serva, Heidelberg, Deutschland) sterilfiltrieren

TE	TBS
10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl

#### 2.4.2 Nährmedien und Zusätze

LB (Luria-Bertini)	2 × YT
Bacto-Trypton 10 g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l NaCl 10 g/l -mit 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen	Bacto-Trypton 16 g/l Bacto-Hefeextrakt 10 g/l NaCl 5 g/l -mit 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen

Als Nährmedien für Y1090, K802 und LE 392 wurde LB, ergänzt durch 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub>, verwendet.

SOB	SOC
Bacto-Trypton 20 g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l NaCl 0,5 g/l 250 mM KCl 10 ml/l -mit 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen -vor Gebrauch 5 ml/l einer 2 M MgCl <sub>2</sub> Lösung zugeben	Bacto-Trypton 20 g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l NaCl 0,6 g/l KCl 0,2 g/l -mit 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen -nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugeben: 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 10 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> 10 ml 2 M Glucose

#### Antibiotikastammlösungen

Ampicillin (Serva, Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland)	100 mg/ml in sterilem Wasser
Carbenicillin (Duchefa, Haarlem, Niederlande)	100 mg/ml in sterilem Wasser

### 2.4.3 Nucleinsäureisolation

Lösungen für  $\lambda$ -DNA-Minipräparation

SM	TMG
50 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 8 mM MgSO <sub>4</sub>	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 mM MgSO <sub>4</sub> 0,01 % Gelatine

L 2	L 3
30 % PEG-6000 3 M NaCl in SM	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 25 mM EDTA, pH 7,5

L 4	L 5
4 % SDS	2,55 M K-acetat, pH 4,8

Lösungen für die Isolation pflanzlicher DNA

CTAB Extraktionslösung	CTAB Präzipitationslösung
2 % (w/v) CTAB 100 mM Tris-HCl; pH 8,0 20 mM EDTA; pH 8,0 1,4 M NaCl	1 % (w/v) CTAB 50 mM Tris-HCl; pH 8,0 10 mM EDTA; pH 8,0

Hochsalz-TE-Puffer	CTAB/NaCl Lösung
10 mM Tris-HCl; pH 8,0 0,1 mM EDTA; pH 8,0 1 M NaCl	10 % CTAB in 0,7 M NaCl

## Lösungen für die Isolation pflanzlicher RNA

TLE-S (Aufschlußpuffer):	TLE
0,18 M Tris-HCl, pH 8,2 0,09 M LiCl 4,5 mM EDTA 1 % SDS	0,2 M Tris-HCl, pH 8,2 0,1 M LiCl 5 mM EDTA

**2.4.4 Proteinisolation**

M1 Puffer	3 × Probenpuffer
250 mM Saccharose 25 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Tris-HCl, pH 7,8 0,08 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,1 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton X-100 10 µM PMSF	150 mM Tris-HCl, pH 6,8 5,14 % SDS 18 % Glycerol 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,006 % Bromphenolblau

## **2.5 Mikroskopische Verfahren**

### **2.5.1 Lichtmikroskopische Verfahren**

#### **2.5.1.1 PEG-Einbettung**

Polyethylenglykol ist ein wasserlöslicher Kunststoff, der für das Einbetten und Schneiden von Gewebe geeignet ist. Für eine Einbettung wird in allen Schritten ein Gemisch von zwei Teilen PEG1500 und einem Teil PEG4000 (Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland) verwendet.

Die Fixierung kleiner Gewebestückchen erfolgte in 4 % Paraformaldehyd in PBS. Nach dem Waschen und der Dehydrierung in der aufsteigenden Ethanolreihe wurde 15 Minuten in reinem Ethanol bei 55°C inkubiert. Das Ethanol wurde durch PEG-Ethanol-Gemische (1:3; 1:1; 3:1; jeweils eine Stunde bei 55°C) ersetzt. Anschließend wurden die Objekte in reines PEG überführt. Das PEG wurde einmal gewechselt. Die Infiltration des reinen PEG erfolgte über Nacht bei 55°C. Bei der Einbettung der Objekte in flachen Gefäßen ist auf eine homogene, gleichmäßige Erstarrung des PEG zu achten.

#### **2.5.1.2 *In Situ* Hybridisierung**

Für die *in situ* Hybridisierung erfolgte nach Fixierung in 4 % Paraformaldehyd die Einbettung in Paraffin. Die Schnitte (5-7 µm dick) wurden auf beschichtete Objektträger (Poly-L-Lysin oder Silan) aufgebracht und über Nacht bei 40°C angetrocknet.

Nach dem Entparaffinieren (Xylol, Xylol-Ethanol-Gemische; absteigende Ethanolreihe) wurden die Schnitte in 200 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0, äquilibriert. Danach wurde für zehn Minuten in Pronaselösung (250 µg/ml in 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.5) inkubiert (Raumtemperatur). Die Schnitte wurden erneut fixiert (4 % Formaldehyd, 0,25 % Glutaraldehyd in Natriumphosphatpuffer; 10 Minuten, Raumtemperatur) und gewaschen. Nach der Entwässerung in der aufsteigenden Ethanolreihe wurden sie an der Luft getrocknet.

Nach der Prähybridisierung (Hybridisierungslösung ohne Sonde, 1 Stunde, 42°C) erfolgte über Nacht die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (*in vitro* translatierte RNA; Antisense als Sonde und Sense als Kontrolle).

Hybridisierungslösung [100 µl]:

50 µl Formamid (deionisiert)  
20 µl Dextransulfat [50%]  
6 µl 5 M NaCl  
2 µl 50 × TE  
2 µl 50 × Denhardt's  
6 µl 0.75 M DTT (nur für <sup>35</sup>S-markierte Sonden)  
14 µl Sonde (10 ng einer <sup>35</sup>S-markierten Sonde) und Wasser

10 µl der Hybridisierungslösung wurden vorsichtig über die Schnitte verteilt. Die Schnitte wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und dieses wurde mit Kautschuk-Kleber (1:1 mit Petroleumbenzin verdünnt) versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer, gesättigt mit 2 × SSC (oder Wasser), bei 50°C.

Nach der Hybridisierung wurde mit einem Skalpell vorsichtig der Kautschuk-Kleber entfernt und die Deckgläschen in 2 × SSC abgelöst. Die Objektträger wurden gewaschen und mit RNase behandelt:

- 2 × 45 Minuten bei 45°C in 1 × SSC, 50% Formamid (10 mM DTT bei <sup>35</sup>S-Sonden)
- 1 × 5 Minuten bei Raumtemperatur in 1 × SSC (10 mM DTT)
- 1 × 30 Minuten bei 37°C in RNaseA-Puffer (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 20 µg/ml RNaseA
- 2 × 45 Minuten bei 45°C in 1 × SSC, 50% Formamid (10 mM DTT bei <sup>35</sup>S-Sonden)
- 2 × 5 Minuten bei Raumtemperatur in 1 × SSC (10 mM DTT)

Anschließend wurden die Schnitte in der aufsteigenden Ethanolreihe entwässert.

Mikroautoradiographie

Alle Schritte der Mikroautoradiographie müssen in einer Dunkelkammer, ausgestattet mit einer dunkelroten Lichtquelle (Wratten Rot-Filter Nr. 2, 15 W Lampe), oder in vollständiger Dunkelheit durchgeführt werden .

Ein Aliquot der photographischen Emulsion Kodak NTB 2 (Kodak, Rochester, USA) wurde bei 42°C im Wasserbad geschmolzen (etwa 30 Minuten), vorsichtig in eine Tauchkammer gegossen und mit einem gleichen Volumen 600 mM Ammoniumacetat, vorgewärmt auf 42°C, gemischt (durch mehrmaliges Eintauchen eines Objektträgers). Die Emulsion sollte 10 Minuten ruhen, damit eventuell enthaltene Luftblasen entweichen können. Einige Testobjektträger sind notwendig zur Kontrolle der Emulsion auf Luftblasen und gute Durchmischung.

Die Objektträger wurden mit der Emulsion beschichtet, indem sie in die Emulsion getaucht werden und langsam und gleichmäßig schnell aus der Emulsion herausgezogen werden. Überschüssige Emulsion sollte kurz an einem Papierhandtuch abgestrichen werden. Zum Trocknen wurden die Objektträger aufrecht gestellt. Die Objektträger sollten mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur trocknen; forciertes Trocknen (Heißluft) ist unbedingt zu vermeiden, da die Emulsion dadurch Risse bekommen kann.

Zur Exposition wurden die trockenen Objektträger in lichtdichte Plastikboxen verpackt, die etwas Trockenmittel enthielten. Die Boxen wurden nochmals mit schwarzem Klebeband abgeklebt und die Objektträger bei 4°C im Dunkeln exponiert. Die Expositionszeit kann zwischen 1-2 Tagen und mehreren Wochen variieren, abhängig von der Abundanz der mRNA, der spezifischen Aktivität der Sonde und der Verteilung im Gewebe.

Für die Entwicklung sollten die Objektträger, der Entwickler, das Wasser und der Fixierer die gleiche Temperatur haben (15°C), da große Temperaturschwankungen zu Rissen in der Emulsion führen können. Die Objektträger wurden in Kodak D-19 Entwickler für 2,5 Minuten entwickelt. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurde in Kodak Unifix (Kodak, Rochester, USA) für 5 Minuten fixiert. Nach dem Waschen in einem großen Volumen Wasser (20 Minuten) und dem Trocknen der Objektträger an der Luft wurden diese in einem wässrigen Eindeckmittel permanent eingeschlossen.

### **2.5.1.3 Immunohistochemie**

Der immunhistochemische Nachweis von Antigenen erfolgte mittels eines indirekten enzymatischen Systems (TSA™-Direct, Tyramid Signal Amplifikation; NEN™ Life Science Products, Boston, USA)

Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die PEG-Schnitte mit der entsprechenden Konzentration des primären Antikörpers (anti-HSP17) inkubiert. Zur Detektion des primären Antikörpers wurden die Schnitte nach Waschschritten mit einem sekundären, biotinylierten Antikörper inkubiert, an den nachfolgend ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat binden konnte. Die Enzymaktivität der Peroxidase ermöglichte die Spaltung eines Substrates, welche zur Ablagerung eines fluoreszierenden FITC-Derivates führte. Als Kontrollen für die Spezifität des primären Antikörpers wurden Schnitte mit dem entsprechenden prä-Serum inkubiert.

Das genaue Protokoll ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben:

1. Aldehydblock	50 mM Glycin in TBS (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl), 15 Minuten, RT
2. Waschen	3 × 1 Minute in TBS, RT
3. Proteinblock	5 % BSA in TNT (TBS plus 0,05 % Tween 20)
4. primärer Antikörper	anti-HSP17 (entsprechende Verdünnung) bzw. Prä-Serum in Proteinblock (5 % BSA in TNT), über Nacht bei 4°C
5. Waschen	3 × 5 Minuten in TNT, RT
6. sekundärer Antikörper	biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen (NEN™; 1:300 in TNB, d.h. TNT mit 0,5 % Blockierungsreagenz), 30 Minuten, RT
7. Waschen	3 × 5 Minuten in TNT, RT
8. blockieren	TNB, 30 Minuten, RT
9. TNB abtupfen	
10. Streptavidin-Enzym Konjugat	Streptavidin-Peroxidase (NEN™; 1:100 in TNB; 100 µl je Slide), 30 Minuten, RT
11. Waschen	3 × 5 Minuten in TNT, RT
12. Enzymreaktion	Fluorescein-Tyramid (NEN™; 1:50 in 1 × Amplifikationslösung; 150 µl je Slide), 9 Minuten, RT, im Dunkeln
13. Waschen	3 × 5 Minuten in TNT, RT
14. Gegenfärbung	DAPI (4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) in TBS; 25 Minuten, RT, im Dunkeln
15. Waschen	2 × 5 Minuten in TNT, RT
16. Einschluß	in Paraphenylendiamin/Glycerol

#### 2.5.1.4 Messung intrazellulärer pH-Wert-Veränderungen im konfokalen Mikroskop

Für intrazelluläre pH-Messungen wurde der Farbstoff LysoSensor Blue DND-192 (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffes (Anregung bei 374 nm; Emmision bei 424 nm) erhöht sich in Folge der Protonierung, also mit einer Erniedrigung des pH-Wertes.

Tomatenzellen wurden mit dem Farbstoff (1:1.000 in Nährlösung) beladen und auf einem mit einer dünnen Agarschicht überzogenen Objektträger sedimentiert. Dieser Objektträger wurde in eine Perfusionskammer (Bachofar, Reutlingen, Bundesrepublik Deutschland) eingebracht, die auf dem Objektisch eines konfokalen Umkehrmikroskops

(LSM 410 invert; Zeiss, Oberkochen, Bundesrepublik Deutschland) montiert war. Zunächst wurde eine Verteilung der Fluoreszenzintensität der Zellen in Nährmedium aufgenommen. Danach wurden die Zellen von einer Schwermetalllösung (5 mM CdSO<sub>4</sub> in Nährlösung) umspült. Alle fünf Minuten wurde ein Bild der Fluoreszenzemission aufgenommen. Von diesen Bildern wurde das Anfangsbild (t=0) subtrahiert. Das Differenzbild gibt eine qualitative Aussage über die Veränderung des pH-Wertes. Dabei entsprechen helle Bereiche einer Erniedrigung des pH-Wertes.

## 2.5.2 Elektronenmikroskopische Verfahren

### 2.5.2.1 Glutaraldehyd-Osmium-Fixierung, Einbettung in ERL (Epoxy Resin Low Viscosity; SPURR, 1969)

Diese Einbettung diente vor allem der guten Erhaltung der Ultrastruktur, außerdem wurde sie für autoradiographische Methoden verwendet. Eine Vorfixierung erfolgte mit Glutaraldehyd, anschließend wurde das Gewebe in Osmiumtetroxid fixiert, in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und mit dem Einbettungsmittel infiltriert. Die einzelnen Schritte des Protokolls sind in Tabelle 1. wiedergegeben. Die Prozessierung erfolgte in einem Einbettungsautomaten (LYNX el, Australian Biomedical Corporation Ltd., Mount Waverley, Australien). Nach der Überführung der Proben in Einbettungsgefäße erfolgte die Polymerisation der ERL-Blöckchen bei 60°C für mindestens 24 Stunden in einem Einbettungssofen (Taab Embedding Oven; Taab, Berkshire, Großbritannien).

Nr.	Vorgang	Zeit	Temperatur
1	Fixierung, Glutaraldehyd	2 Stunden	alle Schritte bei 20°C
2	waschen (PBS)	15 Minuten	
3	waschen (PBS)	30 Minuten	
4	waschen (PBS)	60 Minuten	
5	waschen (PBS)	60 Minuten	
6	Fixierung, OsO <sub>4</sub>	60 Minuten	
7	waschen/Leitungswasser	20 Minuten	
8	waschen/Leitungswasser	20 Minuten	
9	waschen/Leitungswasser	20 Minuten	
10	waschen/Leitungswasser	20 Minuten	
11	Aceton 20 % / Uranylacetat	30 Minuten	
12	Aceton 50 %	10 Minuten	
13	Aceton 75 %	10 Minuten	

14	Aceton 90 %	10 Minuten	
15	Aceton absolut	20 Minuten	
16	Aceton absolut	20 Minuten	
17	Aceton : ERL 1:1	20 Minuten	
18	Aceton : ERL 1:2	20 Minuten	
19	ERL	60 Minuten	
20	ERL	12 Stunden	

Table 1: Schema für die ERL-Einbettung (Prozessierung im Einbettungsautomaten)

### 2.5.2.2 Formaldehyd-Fixierung, Einbettung in Lowicryl

Für immunhistologische Untersuchungen und *in situ* Hybridisierungen wurde das Gewebe mit Formaldehyd fixiert und nach Entwässerung in einer Ethanolreihe in Lowicryl 4 KM (Polysciences, Eppelheim, Bundesrepublik Deutschland) eingebettet (siehe Tabelle 2).

Nr.	Vorgang	Zeit	Temperatur
1	Fixierung, Formaldehyd in PBS	2 Stunden	alle Schritte bei 20°C
2	waschen (PBS)	15 Minuten	
3	waschen (PBS)	15 Minuten	
4	waschen (PBS)	30 Minuten	
5	waschen (PBS)	30 Minuten	
6	waschen (PBS)	30 Minuten	
7	Ethanol 30 %	30 Minuten	
8	Ethanol 50 %	60 Minuten	
9	Ethanol 70 %	60 Minuten	
10	Ethanol 95 %	60 Minuten	
11	Ethanol absolut	60 Minuten	
12	Ethanol absolut	60 Minuten	
13	Ethanol : Lowicryl 1:1	60 Minuten	
14	Ethanol : Lowicryl 1:2	60 Minuten	
15	Lowicryl	60 Minuten	
16	Lowicryl	12 Stunden	

Table 2: Schema für die Lowicryl-Einbettung (Prozessierung im Einbettungsautomaten)

### 2.5.2.3 Autoradiographie

Den Nährmedien pflanzlicher Zellkulturen wurde zu unterschiedlichen Zeiten (vergleiche Abbildung 2) radioaktiv markiertes Uridin ( $^3\text{H}$ -Uridin; 100  $\mu\text{Ci/ml}$ ; Chemapol, Prag, CSSR) zugesetzt. Nach einer Inkubation für eine halbe Stunde wurde das Medium durch frische Nährlösung ersetzt. Die Zellkulturen wurden abgesaugt, in Agarose eingebettet (2 % Agarose NA; Pharmacia, Uppsala, Schweden), in Glutaraldehyd (Polysciences, Warrington, USA) und Osmiumtetroxid fixiert und nachfolgend in ERL (siehe 2.5.2.1) eingebettet. Ultradünne Schnitte der Präparate wurden auf Kupferblenden (200 mesh, Formvar-beschichtet) aufgenommen. Die Blenden wurden im dunklen Rotlicht mit einer Monoschicht einer fotografischen Emulsion (L4; Ilford, Mobberley, Großbritannien) beschichtet (Schlingenmethode nach VAN TUBERGEN, 1961) und für vier bis sechs Wochen bei 4°C exponiert. Nach der Entwicklung (Kodak D19; Kodak, Rochester, USA) und Kontrastierung (5 % Uranylacetat) wurden die Schnitte im Elektronenmikroskop untersucht (Zeiss EM 912; Zeiss, Oberkochen, Bundesrepublik Deutschland).

## 2.6 Molekularbiologische und zellbiologische Verfahren

Plasmidpräparationen, Restriktionsansätze, Subklonierungen, Ligationen, Phosphatase-behandlungen, Agarosegelelektrophoresen und andere grundlegende Manipulationen von Nucleinsäuren wurden nach den Protokollen von SAMBROOK et al. (1989) und AUSUBEL et al. (1994) durchgeführt.

### 2.6.1 Direkter DNA Transfer in *Escherichia coli*

Der Transfer von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* erfolgte entweder in chemisch kompetente Zellen (vergleiche SAMBROOK et al., 1989) oder mittels Elektroporation in elektrokompente Zellen. Zur Präparation von Bakterienzellen für die Elektroporation wurden exponentiell wachsende Kulturen von *E. coli* abzentrifugiert und in 10 % Glycerol resuspendiert. Dies wurde mehrfach wiederholt, bevor die Zellen in 10 % Glycerol eingefroren wurden.

Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser / Pulse Controller System von Bio-Rad (Hercules, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei der Verwendung von Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm wurde eine Spannung von 2,5 kV benutzt. Das entsprach einer Feldstärke von 25 kV/cm. Die Zeitkonstante betrug zwischen

4,5 und 4,8 Millisekunden, in Abhängigkeit von der Präparation kompetenter Zellen und der Qualität der verwendeten DNA.

### **2.6.2 Screening einer $\lambda$ -gt11 Expressionsgenbank (cDNA-Bank)**

Eine hitzeschockspezifische  $\lambda$ -gt11 Expressionsbank (SCHARF et al., 1990) wurde auf LB-Agarose-Platten in *Escherichia coli* Y1090 als Wirt ausplattiert. Nach etwa vier Stunden Inkubation bei 42°C wurden IPTG-getränkte (100 mM IPTG; Roth, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland) Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schuell, Dassel, Bundesrepublik Deutschland) auf die Platten gelegt. Nach weiterer Inkubation (4 Stunden; 37°C) wurden die Positionen der Filter markiert und die Filter abgezogen. Für das erste Screening wurde ein zweites Set Filter als Kontrolle für die Spezifität der immunologischen Reaktion verwendet.

Die Filter wurden kurz in PBS gespült und für eine Stunde in Blockierungslösung (1 % Blockierungsreagenz [Boehringer Mannheim, Mannheim, Bundesrepublik Deutschland] in PBS) inkubiert. Der Nachweis des exprimierten Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Antiserum gegen HSP17 in einer Verdünnung von 1:3.000 in Blockierungslösung. Die nachfolgende Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte mit einem Schaf-Anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:10.000 in Blockierungslösung; Tropix, Bedford, USA). Als Chemilumineszenz-Substrate wurden CSPD oder CDP-Star (Tropix, Bedford, USA) verwendet.

### **2.6.3 Isolation und Charakterisierung genomischer Klone**

Das Screening einer genomischen Bank von Tomate, *Lycopersicon esculentum*, (Clontech, LaJolla, USA), die in EMBL3 Phagen kloniert war, erfolgte im Wesentlichen nach dem für die  $\lambda$ -gt11 Expressionsbank beschriebenen Protokoll. Als *E.coli* Wirtstamm wurde K802 verwendet. Die mit den Phagen infizierten Bakterien wurden auf LB-Agarose Platten ausplattiert und für etwa 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Transfer der Phagen erfolgte von den gekühlten Platten auf Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schuell, Dassel, Bundesrepublik Deutschland). Die anhaftende DNA wurde denaturiert und fixiert. Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten analog zu dem für genomische Southern Hybridisierungen beschriebenen Protokoll.

#### 2.6.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte entweder radioaktiv mit dem T7-Sequenzierungs-Kit von Pharmacia (Uppsala, Schweden) und  $^{35}\text{S}$ -dATP (Amersham, Little Chalfont, Großbritannien) oder mit PCR-Sequencing-Kits (Thermo Sequenase; Amersham, Little Chalfont, Großbritannien) und nichtradioaktiv markierten Oligonukleotidprimern. Die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsreaktionen erfolgte in denaturierenden Polyacrylamidgelen (8 M Harnstoff) in einer Macrophor-Anlage (Pharmacia, Uppsala, Schweden) oder mittels Sequenzierautomaten von Pharmacia (Uppsala, Schweden) beziehungsweise Li-Cor (Lincoln, USA).

Als Sequenzierungsprimer wurden verwendet:

T3; T7; SK; KS (auch mit Infrarotfarbstoff IRD 700 markiert für automatische Sequenzierung)

QE1, QE4

#### 2.6.5 Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

0,5 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem gekühlten Mörser zu einem feinen Puder zermahlen, welches mit 5 ml TLE-S und 1,7 ml Phenol (mit TE äquibriert, Roth, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland) versetzt wurde. Das Gemisch wurde mit einem Polytron (2 Minuten) homogenisiert. Nach Zugabe von 1,7 ml Chloroform wurde mit dem Polytron gemischt, anschließend wurde bei 50°C für 20 Minuten inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei  $17.700 \times g$  (4°C, 20 Minuten) wurde die wässrige Phase (ohne Zwischenschicht) in ein neues Zentrifugenglas überführt. Nach Zugabe von 1,7 ml Phenol und 1,7 ml Chloroform wurden die Phasen gemischt und erneut zentrifugiert ( $17.700 \times g$ , 4°C, 15 Minuten). Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues Zentrifugenglas überführt und dreimal mit Phenol/Chloroform extrahiert, zum Abschluß erfolgte eine Extraktion mit Chloroform.

Die RNA wurde mit Lithiumchlorid (Endkonzentration 2 M LiCl; 4°C; über Nacht) gefällt. Durch Zentrifugation (4°C,  $15.300 \times g$ , 20 Minuten) wurde die RNA präzipitiert, das Pellet wurde mit 2 M LiCl gewaschen, nach erneuter Zentrifugation in Wasser (0,5 ml) gelöst und mit einem Drittel Volumen 8 M LiCl umgefällt. Nach mindestens zweistündiger Inkubation bei 4°C wurde die RNA abzentrifugiert (4°C,  $15.300 \times g$ , 20 Minuten), gewaschen mit 2 M LiCl und anschließend in Wasser (0,2 ml) gelöst. Die RNA wurde mit Natriumacetat (3 M; 20  $\mu\text{l}$ ) und Ethanol (550  $\mu\text{l}$ ) umgefällt. Nach Inkubation über Nacht bei -20°C erfolgte eine Zentrifugation ( $17.700 \times g$ , 4°C, 15 Minuten). Die RNA wurde in wenig DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration UV-spektrophotometrisch bestimmt.

### 2.6.6 Northern Hybridisierung

Die pflanzliche Gesamt-RNA wurde in denaturierenden Agarosegelen (1,5 bis 2 % Agarose, 2,2 M Formaldehyd) in  $1 \times$  MOPS-Puffer (20 mM MOPS, pH 7,0, 8 mM Na-acetat, 1 mM EDTA) getrennt.

10  $\mu$ g der RNA-Proben wurden mit vier Teilen Probenpuffer vermischt und für zehn Minuten bei 65°C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

Während der Elektrophorese erfolgte eine Umwälzung des Puffers entgegengesetzt zur Laufrichtung der Nucleinsäuren, beginnend zehn Minuten nach dem Start. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 70 Volt (70 W, 40 mA) für bis zu 2,5 Stunden.

Danach wurde das Gel gründlich in Wasser gewaschen und anschließend in  $20 \times$  SSC äquilibriert. Der Transfer auf Nylon-Membranen (Pall Biodyne; Pall BioSupport, East Hills, USA) erfolgte mittels einer Vakuumblotapparatur (Appligene Vacuum Transfer Unit; Appligene, Illkirch, Frankreich) für mindestens eine Stunde bei einem Vacuum von 75 mbar. Nach dem Transfer wurde die RNA durch ultraviolette Strahlung (120 mJ) an die Membran gebunden (Stratalinker; Stratagene, La Jolla, USA).

Nach einer mindestens einstündigen Prähybridisierung in Hybridisierungslösung bei 42°C in einem Hybridisierungsofen (GFL, Burgwedel, Bundesrepublik Deutschland) erfolgte die Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten Sonde in Hybridisierungslösung über Nacht bei 42 °C. Als Sonden wurden einzelsträngige, *in vitro* translatierte RNA (antisense) Proben verwendet, die durch Translation der entsprechenden cDNAs erhalten worden waren.

Die einzelnen Waschschrte sind kurz zusammengefaßt:

- $2 \times$  SSC, 0,1 % SDS
- $0,2 \times$  SSC, 0,1% SDS
- $0,2 \times$  SSC, 0,1% SDS
- $0,1 \times$  SSC, 0,1% SDS
- $0,1 \times$  SSC, 0,1% SDS
- jeweils 30 Minuten, Temperatur entsprechend Stringenz

Nach Äquilibration in PBS wurden die Nylonmembranen in Blockierungslösung (1 % Blockierungsreagenz in PBS; Boehringer Mannheim, Mannheim, Bundesrepublik Deutschland) inkubiert. Der Nachweis der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden erfolgte mit einem Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Fab-Fragmente; 1:12.000 verdünnt in Blockierungspuffer; Boehringer Mannheim, Mannheim, Bundesrepublik Deutschland) und einem Chemilumineszenz-Substrat (CSPD; Tropix, Bedford, USA).

### 2.6.7 Primer Extension

Zwanzig Mikrogramm Gesamt-RNA wurden in Hybridisierungspuffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7,0, 100 mM KCl; Gesamtvolumen 10  $\mu$ l) mit 100 fmol eines radioaktiv markierten Oligonukleotides (Primer HSP17,  $^{32}$ P-markiert) gemischt und bei 71°C (hohe Stringenz) beziehungsweise bei 58°C (niedrige Stringenz) für zwanzig Minuten inkubiert. Danach kühlten die Hybridisierungsansätze langsam auf Raumtemperatur ab. Drei Mikroliter wurden anschließend für eine reverse Transkription der RNA verwendet. Dazu wurde die Stratascript Reverse Transcriptase (Stratagene, La Jolla, USA) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden auf denaturierenden Polyacrylamidgelen (10 % Acrylamid; 7 M Harnstoff) getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das feuchte Gel mit Haushaltsfolie (Saran Wrap; Dow, Midland, USA) abgedeckt. Die Detektion erfolgte mit Kodak BioMax Filmen (Kodak, Rochester, USA).

*Primer HSP17:* 5'- ATG GAT CGA ACA TGC TGC TGC TTC GTC G -3'

### 2.6.8 Isolation pflanzlicher Gesamt-DNA

Die frisch bereitete Mercaptoethanol/CTAB-Extraktionslösung (2 % Mercaptoethanol (v/v) in CTAB-Extraktionslösung) und die CTAB/NaCl-Lösung wurden vor Gebrauch auf 65°C erwärmt. Mörser und Pistil wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Das pflanzliche Gewebe wurde darin pulverisiert und anschließend in ein Zentrifugenglas überführt. Nach Zugabe der warmen Mercaptoethanol/CTAB-Extraktionslösung (etwa 4 ml je g Frischmasse) wurde gründlich gemischt und bei 65°C für 60 Minuten inkubiert. Das Homogenat wurde mit einem Volumen 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach Zentrifugation (7.500  $\times$  g; 5 Minuten; 4°C) wurde die obere, wäßrige Phase in ein neues Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen der auf 65°C erwärmten CTAB/NaCl-Lösung wurde vorsichtig gemischt. Das Homogenat wurde nochmals mit einem Volumen 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und durch vorsichtiges Schwenken gut gemischt. Nach Zentrifugation (7.500  $\times$  g; 5 Minuten; 4°C) wurde die obere, wäßrige Phase in ein neues Röhrchen überführt. Daraufhin wurden die Nucleinsäuren durch Zugabe von einem Volumen CTAB-Präzipitationslösung gefällt. Nach Zentrifugation (500  $\times$  g; 5 Minuten; 4°C) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in Hochsalz-TE-Puffer gelöst (0,5 bis 1 ml je Gramm Ausgangsmaterial). Die Nucleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 7.500  $\times$  g; 4°C für 15 Minuten wurde das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert, getrocknet und

anschließend in einem minimalen Volumen TE (0,1 bis 0,5 ml je Gramm Ausgangsmaterial) gelöst.

### 2.6.9 Genomische Southern Hybridisierung

Jeweils 10 µg genomische DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die gespaltene DNA wurde in einem 0,7 %igem Agarosegel in 0,5 × TBE (mit Ethidiumbromid) bei einer Feldstärke von 1 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Dokumentation in 0,25 M HCl inkubiert (30 Minuten, partielle Depurinierung), kurz in destilliertem Wasser gespült und anschließend in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert (2 × 20 Minuten). Die Neutralisation erfolgte nach kurzem Spülen in Wasser durch Inkubation in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0 (2 × 20 Minuten). Nach dem Spülen in destilliertem Wasser wurde das Gel in 20 × SSC äquilibriert. Der Transfer der Nucleinsäuren auf Nylon-Membranen (Pall Biodyne Nylon Membrane, 0,2 µm; Pall BioSupport, East Hills, USA) erfolgte durch ein Vakuum (2 Stunden; 60 mbar, Appligene Vacuum Transfer Unit; Appligene, Illkirch, Frankreich) in 20 × SSC. Die Membran wurde kurz in 2 × SSC gespült, getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung fixiert (120 mJ, Stratalinker; Stratagene, La Jolla, USA).

Unspezifische Bindungen wurden durch eine Prähybridisierung im Hybridisierungspuffer (50 % Formamid; 5 × SSC; 5 × Denhardt's; 0,1 % SDS; 100 µg/ml Herings-DNA), für mindestens eine Stunde bei 42°C, unterdrückt. Die Hybridisierung mit der Sonde (entweder radioaktiv oder mit Digoxigenin markiert) im Hybridisierungspuffer erfolgte über Nacht bei 42°C. Danach wurde die Membran mehrfach gewaschen:

- 2 × SSC, 0,1 % SDS
- 2 × SSC, 0,1 % SDS
- 0,2 × SSC, 0,1 % SDS
- 0,2 × SSC, 0,1 % SDS
- 0,1 × SSC, 0,1 % SDS
- 0,1 × SSC, 0,1 % SDS
- jeweils 30 Minuten, Temperatur entsprechend Stringenz (etwa 10 K unter der Schmelztemperatur)

Anschließend wurde die Membran getrocknet und bei der Verwendung einer radioaktiven Sonde exponiert (Kodak X-Omat™ Blue XB-1; Kodak, Rochester, USA).

Bei der Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte zunächst eine Äquilibrierung in PBS, anschließend eine Blockierung (1 % Blockierungsreagenz in PBS; Boehringer Mannheim, Mannheim, Bundesrepublik Deutschland) und daraufhin die Detektion mit Ziege-Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase (Fab-Fragmente; 1:12.000;

Boehringer Mannheim, Mannheim, Bundesrepublik Deutschland). Als Chemilumineszenz-Substrat für den Nachweis der Alkalischen Phosphatase wurden CSPD oder CDP-Star (Tropix, Bedford, USA) verwendet.

#### **2.6.10 Expression eines LMW HSPs aus *Lycopersicon peruvianum* in *Escherichia coli***

##### **2.6.10.1 Expression als GST-Fusionsprotein**

Aus dem Screening einer  $\lambda$ gt11-cDNA-Expressionsbank waren mehrere cDNAs, kodierend für LMW HSPs, erhalten worden. Einer dieser Klone, 92, wurde aus pBKS in den Expressionsvektor pGEX-5X-2 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) unter Erhalt des Leserahmens umkloniert. Die Expression des Fusionsproteins in den Transformanten wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration im Nährmedium) induziert. Das Fusionsprotein wurde im Batch-Verfahren an Glutathion-Sepharose gereinigt und durch Trennung im SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Für die Gewinnung im präparativen Maßstab wurde das rekombinante Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein) in *Escherichia coli* BL21 exprimiert und anschließend gereinigt. Dabei wurde die GST-Domäne proteolytisch abgespalten (Factor Xa; Denzyme ApS, Aarhus, Dänemark). Die Trennung des rekombinanten Proteins von der Glutathion-S-Transferase erfolgt mittels einer Glutathion-Sepharose-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

##### **2.6.10.2 Expression des rekombinanten Proteins als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Hexahistidinpeptid**

Der Klon 92 wurde aus pBKS in den Expressionsvektor pQE32 (Qiagen, Hilden, Bundesrepublik Deutschland) unter Erhalt des Leserahmens umkloniert. Die Expression des Fusionsproteins mit einem N-terminalen Hexahistidinpeptid in den Transformanten wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration im Nährmedium) induziert. Das Fusionsprotein wurde entweder mittels Metallaffinitätschromatographie über eine Säule (Fast Flow Chelating Sepharose; Pharmacia, Uppsala, Schweden) oder im Batch-Verfahren an Fast Flow Chelating Sepharose gereinigt und durch Trennung im SDS-Polyacrylamid analysiert.

Für die Gewinnung im präparativen Maßstab wurde das rekombinante Fusionsprotein in *E. coli* BL21 exprimiert und anschließend gereinigt. Dabei zeigte es sich, daß im Gegensatz zu den Empfehlungen der Hersteller, die Nickelionen als Gegenionen

empfehlen, eine bessere Reinigung mit Kupferionen ( $\text{Cu}^{++}$ ) als Gegenionen an der Sepharose erreicht werden konnte.

Ein verhältnismäßig großer Anteil des Fusionsproteins wurde nach der Ultraschallbehandlung und Zentrifugation im Pellet gefunden. Das Pellet wurde mit 8 M Harnstoff solubilisiert, danach erfolgte die Bindung an die Sepharose und die nachfolgende Elution bei niedrigem pH.

Daraufhin wurden die Fraktionen gegen PBS dialysiert, um den Harnstoff zu entfernen und das Protein zu renaturieren.

### **2.6.11 *In vitro* Chaperon Assays zur Charakterisierung des rekombinanten Proteins**

Zur Charakterisierung der möglichen Aktivität des rekombinanten HSP17 als Chaperon wurden verschiedene Assays verwendet, die die Renaturierung der Citrat Synthase (1), eine erhöhte Thermostabilität (2) der Citrat Synthase in der Gegenwart von Chaperonen und das Verhindern der Aggregation (3) analysieren (LEE, 1995).

Die optimale Konzentration der Citrat Synthase für die hier verwendeten Assays beträgt 150 nM (Konzentration der Monomere, CS ist ein Homodimer). Die auf ihre mögliche Funktion als Chaperone zu untersuchenden Proteine wurden in der gleichen Konzentration verwendet. Für die Chaperone wurde die entsprechende Konzentration der Multimere (Dodecamere) verwendet, da die Multimere die aktive Form darstellen.

#### Citrat Synthase Aktivitätsassay

In diesem Assay wurde die Umsetzung von Acetyl-CoA durch Citrat Synthase gemessen. Dabei wurde die Spaltung der Thioesterbindung des Acetyl-CoA, die bei 233 nm absorbiert, verfolgt. Eine Lösung von 425  $\mu\text{M}$  Oxalessigsäure in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 diente als Referenz.

In einer Küvette wurden zu 470  $\mu\text{l}$  dieser Oxalessigsäurelösung 10  $\mu\text{l}$  einer 7,5 mM Acetyl-CoA-Lösung gegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe eines 20  $\mu\text{l}$  Aliquots der Renaturierungsreaktion gestartet. Nach Vortexen wurde die Absorption bei 233 nm alle fünf Sekunden für eine Minute gemessen. Die Absorption wurde gegen die Zeit aufgetragen und der negative Anstieg des linearen Teils der Kurve bestimmt, dieser entspricht der Anfangsrate der Reaktion.

Zum Vergleich wurde eine äquivalente Menge nicht denaturierter Citrat Synthase vermessen, die Aktivität bestimmt, und die Aktivität der renaturierten Citrat Synthase als Verhältnis zu diesem Ausgangswert ausgedrückt (in Prozent).

Citrat Synthase muß immer in heftig schüttelnde Lösungen pipettiert werden, um lokal hohe Konzentrationen zu vermeiden.

#### Assay 1: Refolding der chemisch denaturierten Citrat Synthase

I) Die Konzentration einer kommerziell erhältlichen Citrat Synthase Lösung wurde durch die Messung der Absorption der Proteinlösung bestimmt.

Dabei gilt bei einer Weglänge von 1 cm:  $A_{280} (0,1 \%) = 1,78$

II) 75 Mikrogramm Citrat Synthase wurden in 6 M Guanidinhydrochlorid (in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5mM DTT) in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß für zwei Stunden bei Raumtemperatur denaturiert.

III) Die Citrat Synthase wurde bei Raumtemperatur renaturiert, indem sie 1:100 mit einer Lösung verdünnt wurde, die das zu testende Chaperon in äquimolarer Konzentration enthält (in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; Proteinpuffer).

Zu Beginn der Renaturierung wurden sofort 20 µl des Ansatzes für ein Citrat Synthase Aktivitätsassay entnommen. Über eine Stunde verteilt, wurde die Aktivität der renaturierten Citrat Synthase bestimmt. Die Aktivität des Enzyms wurde als Verhältnis zur Aktivität des nativen Proteins (in Prozent) angegeben.

#### Assay 2: Schutz der Citrat Synthase gegen thermische Inaktivierung

In diesem Assay wurde die Chaperone-Aktivität bei erhöhten Temperaturen getestet. Citrat Synthase wurde in Anwesenheit oder Abwesenheit eines potentiellen Chaperons bei 38°C inkubiert, dies entspricht einem moderaten Hitzeschock in Pflanzen. Nach dem Rückführen auf Raumtemperatur (22°C) sollte sich die Citrat Synthase, falls durch ein Chaperone geschützt, wieder zurückfalten und Aktivität zeigen.

I) In einem Borsilikatreagenzglas wurden 3,75 µg Citrat Synthase in 50 mM Hepes-KOH, pH 8,0 (Gesamtvolumen 500 µl) gelöst.

II) Zu Beginn wurde ein Aliquot (20 µl) für eine Citrat Synthase Aktivitätsmessung entnommen, danach wird bei 38°C inkubiert. Über eine Stunde verteilt, wurden mehrere Aliquots für CS Aktivitätsmessungen entnommen. Nach einer Stunde wurde der Ansatz in ein 22°C-Wasserbad überführt und für eine weitere Stunde wurde mehrmals die CS Aktivität bestimmt.

III) Die verbleibende CS Aktivität wurde als Verhältnis zur Ausgangsaktivität (Zeit=0) in Prozent angegeben.

### Assay 3: Schutz der Citrat Synthase gegen Aggregation

Die Lichtstreuung infolge von Proteinaggregation wurde durch spektrophotometrische Messung der scheinbaren Absorption einer Lösung bei 320 nm bestimmt. Bei der Citrat Synthase beginnt die Aggregation bei einer Temperatur von 45°C, sie kann in Gegenwart eines Chaperons unterdrückt werden.

I) In einer Küvette wurden die Citrat Synthase (150 nM) und das Chaperon (150 nM) in 50 mM Hepes-KOH, pH 7,5 zusammengegeben und gründlich gemischt.

II) Das Photospektrometer wurde bei 320 nm gegen eine Referenzlösung (50 mM Hepes-KOH, pH 7,5) abgeglichen, danach wurde die Absorption der Probe bei 320 nm zum Zeitpunkt Null gemessen. Die Referenzküvette und die Probe wurden in einem Wasserbad bei 45°C inkubiert. Alle fünf Minuten wurde gegen die Referenzprobe abgeglichen und die Absorption der Probe bestimmt.

III) Die Absorption in Abhängigkeit von der Zeit ist ein Maß für die Streuung beziehungsweise Aggregation der Citrat Synthase.

Als Kontrolle sollte auch das vermutliche Chaperone in Hepes, pH 7,5 auf 45°C erhitzt und auf eine eventuelle Aggregation hin untersucht werden.

In allen Assays wurde BSA in einer Konzentration von 150 nM als Kontrolle anstelle des rekombinanten kleinen Hitzeschockproteins verwendet.

Alle Messungen wurden in einem Varian UV-Vis-Spektrophotometer Cary 3E (Varian, Mulgrave, Australien) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

## **2.6.12 Untersuchungen zur nativen Struktur des Proteins**

### **2.6.12.1 Nichtdenaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese**

Für die native Gelelektrophorese wurden Gradientengele (180 mm hoch, 160 mm breit, 1 mm dick) verwendet. Dazu wurden 10 ml einer schweren Lösung (22 % Acrylamid-Bisacrylamid, 15 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 4 µl TEMED, 25 µl APS) in die untere Gradientenmischkammer und 25 ml einer leichten Lösung (4 % Acrylamid-Bisacrylamid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 12 µl TEMED und 50 µl APS) in die obere Gradientenmischkammer gegeben. Das Gemisch wurde mit einer Peristaltikpumpe zwischen die Glasplatten gepumpt, der Taschenformer wurde direkt in das Trenngel eingesetzt. Die Trennung der Proben erfolgte in einem Tris-Glycin-Puffer (50 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3) bei einer Spannung von 90 Volt für 48 Stunden. Als

Molekulargewichtsmarker wurde der HMW Electrophoresis Calibration Kit von Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose geblottet beziehungsweise im Gel mit Coomassie Brilliantblau G 250 gefärbt.

Molekulargewichtsmarker für die native Gelelektrophorese:

HMW Native Marker Kit (Pharmacia Biotech)	
Thyroglobulin	669.000
Ferritin	440.000
Catalase	232.000
Lactate Dehydrogenase	140.000
Albumin	67.000

Für die nichtdenaturierende Gelelektrophorese wurden die Proben in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puder zermahlen und anschließend in Probenpuffer (60 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM  $\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure; 1 mM Benzamidine; 15 % Saccharose) aufgenommen. Nach einer Zentrifugation ( $16.000 \times g$ ; 4°C; 20 min) wurde der Überstand auf das native Gel aufgetragen.

### 2.6.12.2 Negativkontrastierung für die Elektronenmikroskopie

Eine verdünnte Proteinlösung wurde auf Kohlenstoff-bedampfte, Formvar-befilmte Cu-Blenden aufgetropft und sedimentierte auf diesen für zehn Minuten. Nach kurzem Spülen mit Wasser wurden die Proteine für einige Minuten mit wässrigem Uranylacetat (2 %; pH 4,8) kontrastiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Blenden wurden an der Luft getrocknet.

### 2.6.13 Gesamt-Protein-Extraktion aus pflanzlichen Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden abgesaugt und mit Nährlösung gewaschen. 0,4 g Zellen wurden in ein Reagenzglas überführt und in 1,5 ml M1-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall ( $2 \times 30$  Sekunden) aufgeschlossen. Nach Abtrennung der Zellbruchstücke durch zweimalige Zentrifugation (10 Minuten bei 5.000 rpm; danach 10 Minuten bei 15.000 rpm) wurde der Überstand mit 1/3 Volumen Trichloressigsäure (20 %) gefällt. Nach mindestens zweistündiger Inkubation bei 4°C wurden die Proteine

abzentrifugiert (5.000 rpm; 15 Minuten; 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit Tris/Ethanol (2 M Tris-HCl, pH 8,0 : Ethanol; 1:50), zweimal mit Ethanol und abschließend zweimal mit Diethylether gewaschen, bevor es an der Luft getrocknet wurde. Die Proteine wurden in einem möglichst kleinen Volumen Probenpuffer resuspendiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### **2.6.14 Bestimmung der Proteinkonzentration nach ESEN (1978)**

Zehn Mikroliter der zu analysierenden Proteinlösungen, des Puffers und eines Standards (2 mg/ml BSA in Probenpuffer) wurden auf Filter (Zelluloserundfilter FN6; Filtrak, Niederschlag, Bundesrepublik Deutschland) pipettiert und getrocknet. Die Filter wurden fünf Minuten in Fixierungslösung (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure in Wasser) gewaschen und anschließend 15 Minuten in Coomassie-Brillantblau G 250 (0,1 % in Wasser) geschüttelt. Die Filter wurden mehrfach mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen und zweimal je eine Minute in destilliertem Wasser gekocht. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Filter getrocknet. Der Farbstoff-Protein-Komplex wurde aus den Filtern in je drei Millilitern SDS-Lösung (0,5 % in Wasser) bei 55°C für zwanzig Minuten extrahiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen (Uvikon; Kontron Instruments, Mailand, Italien) und die Proteinkonzentration (als BSA-Äquivalent, da die Bindung des Farbstoffes auch von der Aminosäurezusammensetzung der jeweiligen Proteine abhängig ist) wurde berechnet.

#### **2.6.15 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)**

Die eindimensionale Auftrennung der Proteine entsprechend ihres scheinbaren Molekulargewichtes erfolgte in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (Biotec-Fischer, Reiskirchen, Bundesrepublik Deutschland) in denaturierenden, kontinuierlichen Mini-Polyacrylamidgelen (12 % Polyacrylamid, Trenngel 80 × 60 × 1 mm) nach der Methode von LAEMMLI (1970). Als Puffersystem wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3). Nach der elektrophoretischen Trennung erfolgte entweder eine Färbung mit Coomassie Brilliantblau G 250 oder ein Transfer auf Nitrocellulosemembranen (0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel, Bundesrepublik Deutschland).

Für eine höhere Auflösung und in der zweidimensionalen Elektrophorese wurden Gradientengele (siehe unten) verwendet.

### 2.6.16 Zweidimensionale Gelelektrophorese (IEF, SDS-PAGE) nach O'FARRELL (1975)

#### 1. Dimension: Isoelektrofokussierung (IEF)

Die Ampholine für die Isoelektrofokussierung waren von Pharmacia (Uppsala, Schweden), Acrylamid (4 × kristallisiert) und N, N'-Methylen-Bisacrylamid (2 × kristallisiert) von Serva (Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland) bezogen worden.

In silanisierte Glasröhrchen, die an ihrer Unterseite mit Dialyseschlauch verschlossen worden waren, wurde die Gellösung vorsichtig mit einer Spritze mit langer Kanüle bis zu einer Höhe von 152 mm eingefüllt.

#### Gellösung:

16,5 g Harnstoff

6 ml Wasser

6 ml 10 % Nonidet NP-40

4 ml Acrylamid/Bis-acrylamid [28,38 %/1,62 %]

1,2 ml Ampholine, pH 5-8

0,3 ml Ampholine, pH 3,5-10

40 µl TEMED

50 µl 10 % APS)

Die Lösung wurde mit 50 µl 8 M Harnstoff überschichtet und polymerisierte für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde der Harnstoff abgegossen und durch 20 µl Überschichtpuffer 1 (8 M Harnstoff; 3,3 % Ampholine, pH 3,5-10; 4 % Nonidet NP 40) ersetzt. Nach weiteren zwei Stunden wurden die Proteine aufgetragen.

Die Proben (bis zu 300 µg in 65 µl Probenpuffer) wurden mit Ampholinen, Nonidet und Harnstoff gemischt und bei Bedarf leicht erwärmt, bis der Harnstoff vollständig gelöst war. Nach dem Befestigen der Röhrchen in der Elektrophoreseapparatur (Model 175, Tube Cell; BioRad, Hercules, USA) wurde der Überschichtpuffer 1 entfernt. Die gut durchmischten Proben wurden luftblasenfrei aufgetragen, danach wurden vorsichtig 50 µl Überschichtpuffer 2 (7,5 M Harnstoff, 1,63 % Ampholine pH 3,5-10) aufgefüllt. Nach dem Auffüllen der Röhrchen mit 0,02 M NaOH wurde die untere Kammer mit 0,01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gefüllt (750 ml), die obere Kammer wurde mit 0,02 M NaOH aufgefüllt.

Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei einer Spannung von 300 Volt, danach für 14 Stunden bei 500 Volt und abschließend für eine Stunde bei 600 Volt. Nach der Trennung wurden die Gele mit Druckluft aus den Röhrchen gepreßt und zweimal 20 Minuten in Äquilibrierungspuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1,2 % SDS; 10 % Glycerol;

1,5 % Mercaptoethanol; 0,006 % Bromphenolblau) inkubiert, bevor sie auf Trockeneis eingefroren und bei -20°C aufbewahrt wurden.

## 2. Dimension (SDS-PAGE, Gradientengele)

Die Gradienten (von 10 bis 20 % Acrylamid) für die Gele (180 mm hoch, 160 mm breit, 1 mm dick) wurden in einer Gradientenmischkammer gemischt. Dazu wurden für das Trenngel 10 ml einer schweren Lösung (20 % Acrylamid und zusätzlich 10 % Saccharose) in die untere Gradientenmischkammer und 25 ml einer leichten Lösung (10 % Acrylamid) in die obere Kammer gegeben. Das Gemisch wurde mit einer Peristaltikpumpe bis zu einer Höhe von 1,5 cm unterhalb des Randes zwischen die Platten gepumpt.

Für die zweite Dimension eines zweidimensionalen Geles wurde das IEF-Gel mit warmer Agaroselösung an das Startgel angeklebt.

Für eindimensionale Polyacrylamidgele wurde ein Taschenformer in das Startgel eingesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte im Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3) anfangs bei einer Stromstärke von 20 mA, später bei 30 mA je Kammer. Die Spannung wurde auf 400 Volt begrenzt, um ein Überhitzen zu vermeiden.

### **2.6.17 Western Blotting**

Nach der Trennung im Polyacrylamidgel wurden die Proteine in einem Semi-Dry-Verfahren (TOWBIN et al., 1979; KYHSE-ANDERSEN, 1984) bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 60 Minuten auf Membranen (Nitrocellulose, 0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel, Bundesrepublik Deutschland) geblottet (Fast-Blot; Biometra, Göttingen, Bundesrepublik Deutschland). Nach dem Trocknen wurde die Membran kurz in PBS äquilibriert und anschließend blockiert (1 % Blockierungsreagenz; Boehringer Mannheim, Mannheim, Bundesrepublik Deutschland). Nach der Inkubation mit primären Antikörper wurden die Membranen in PBST (PBS, 0,1 % Tween 20) mehrfach gewaschen. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem Biotin-konjugierten sekundären Antikörper und Streptavidin-Alkalische Phosphatase (beide TROPIX, Bedford, USA). Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurden CSPD oder CDP-Star (TROPIX, Bedford, USA) verwendet.

### 2.6.18 Anfärben von Proteinen auf Membranen mit Ponceau Rot

Die Membranen wurden fünf Minuten in Ponceau Lösung (0,2 % Ponceau S, 3 % TCA in Wasser) geschüttelt und anschließend so lange in Wasser entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Nach der Dokumentation wurden die Membranen durch Inkubation in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,5 M NaCl) vollständig entfärbt. Der nachfolgende immunologische Nachweis wurde durch diese Färbung nicht beeinflusst.

### 2.6.19 Blot Overlay Assays

Diese Methoden (vergleiche HOFFMANN & CELIS, 1994 und CRAWFORD & BECKERLE, 1994) dienen der Untersuchung einer möglichen Wechselwirkung des rekombinanten Proteins (HSP17) mit Gesamt-RNA beziehungsweise mit anderen Proteinen. Dazu wurden für den Fall der Wechselwirkung mit anderen Proteinen Gesamtproteinextrakte pflanzlicher Zellkulturen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell, Dassel, Bundesrepublik Deutschland) transferiert. Nach Äquilibrierung in PBS und Blockierung wurden die Membranen mit einer Lösung von rekombinanten Protein (in Blockierungslösung) inkubiert. Nach drei Waschschritten (PBS; je 10 Minuten) wurden die Membranen kurz fixiert (0,2 % Glutaraldehyd in PBS) und nochmals gewaschen. Der Nachweis des eventuell gebundenen rekombinanten HSPs erfolgte analog der Vorgehensweise im Western Blot (siehe 2.6.17).

Ein Test auf eine mögliche Bindung von RNA erfolgte unter Verwendung von auf Nylonmembranen übertragener elektrophoretisch getrennter Gesamt-RNA und Inkubation mit rekombinanten HSP17. Der weitere Nachweis erfolgte wie oben beschrieben. Alternativ wurden rekombinantes Protein oder Gesamtprotein elektrophoretisch getrennt und auf Membranen transferiert. Diese wurden dann mit <sup>32</sup>P-endmarkierter Gesamt-mRNA aus Tomate (*Lycopersicon peruvianum*) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten bei geringer Stringenz (maximal 0,5 M NaCl, Raumtemperatur) wurden die Membranen getrocknet und für zwei Tage exponiert (Kodak Bio-Max; Kodak, Rochester, USA).

### 2.6.20 Versuche mit ATPase-Hemmstoffen und Ionophoren

Pflanzliche Zellkulturen (*Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon esculentum*, 2,5 Tage alt; *Silene vulgaris*, 6 Tage alt) wurden abgesaugt, gewaschen und in frische Waschlösung (hormonfreie Nährlösung) überführt. Vor der Applikation der Schwermetalle beziehungsweise vor dem Hitzeschock wurden den Zellkulturen die in Tabelle 3

aufgeführten Inhibitoren zugesetzt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet, da viele der Inhibitoren darin gelöst worden waren.

Die Zellkulturen wurden entweder zwei Stunden bei 25°C (Kontrolle), zwei Stunden bei 39°C (Hitzestress) oder zwei Stunden bei 25°C unter Zusatz von Schwermetall (Schwermetallstress) geschüttelt. Abschließend wurden die Zellen abgesaugt und die Gesamtproteine isoliert und analysiert.

### **2.6.21 In Gel Kinase Assays**

In Gel Kinase Assays wurden nach den Protokollen von USAMI et al. (1995) und STRATMANN & RYAN (1997) durchgeführt. Dazu wurden Gesamtproteine in einem Puffer extrahiert, der eine Reihe von Phosphatasehemmern enthielt. Nach einer Zentrifugation wurden bis zu 30 Mikrogramm Protein auf denaturierende Polyacrylamidgele, in die das MAP-Kinase-Substrat Myelin Basic Protein (0,5 mg/ml; Sigma, St. Louis, USA) einpolymerisiert worden war, aufgetragen. Als Kontrolle auf Autophosphorylierung wurden Gele mitgeführt, die kein Myelin Basic Protein enthielten.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele gewaschen und die Proteine wurden in einem Guanidinhydrochloridpuffer denaturiert. Nach der Renaturierung über Nacht erfolgte die Inkubation der Gele in einem Kinasepuffer, dem pro Gel 50 µCi  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP zugesetzt worden waren. Die Gele wurden anschließend gewaschen, fixiert, getrocknet und für zwei Tage exponiert (Kodak Bio-Max; Kodak, Rochester, USA).

### **2.6.22 Sequenzvergleiche, Hydropathieplots**

Die EMBL (STOESSER et al., 1998) und SWISS-PROT (BAIROCH & APWEILER, 1998) Datenbanken wurden über das WWW-Interface des European Bioinformatics Institute (EBI, Hinxton, Großbritannien) unter Verwendung der Programme BLAST und FASTA nach Homologen der cDNA-Sequenzen beziehungsweise der abgeleiteten Proteinsequenzen durchsucht (PEARSON, 1990; ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1994). Der Zugriff auf Sequenzdaten erfolgte über das Sequence Retrieval System des European Bioinformatics Institute (SRS; ETZOLD et al., 1996).

Die Hydropathieplots für das HSP17 der Tomate und andere verwandte HSPs wurden mit Hilfe der ExPasy Tools (ProtScale; APPEL et al., 1994) über das WWW-Interface des Schweizerischen Institutes für Bioinformatik (SIB) erstellt.

---

Folgende Seite:

[Tabelle 3](#): Verzeichnis der verwendeten Hemmstoffe und deren Eigenschaften

<u>Hemmstoff</u>	<u>MW</u>	<u>Konzentration (im Medium)</u>	<u>Lösungs- mittel</u>	<u>Angaben zur Wirkung, Funktion</u>	<u>ausgewählte Literatur</u>
Calcimycin (A 23187)	1077,44	25 µM	DMSO	erhöht die Permeabilität von Membranen für divalente Kationen durch Bildung stabiler Komplexe mit divalenten Ionen, die dadurch löslich in der Lipidumgebung werden	IM et al. (1996)
Carbonylcyanid-m Chlorophenylhydrazon	204,62	0,1 mM	DMSO	effektiver Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung im mitochondrialen System	HEYTLER & PRICHARD (1962) HEYTLER (1963)
K-Ionophore II	720,82	0,1 mM	DMSO	erhöht selektiv die Membranpermeabilität für Kalium	ROBINSON (1981)
Valinomycin	1111,36	0,1 mM	DMSO	cyclisches Peptid; Ionophore mit sehr hoher Selektivität für Kalium	ROBINSON (1981) PRESSMAN (1976)
DCC (N,N' Dicyclohexyl- carbodiimid)	206,33	0,1 mM	DMSO	Inhibitor der F <sub>0</sub> /F <sub>1</sub> -ATPase und der Plasmamembran-ATPase; Kopplungsreagenz	HUANG & BERRY (1990)
Natriumorthovanadat	183,91	0,1 mM	H <sub>2</sub> O	inhibitiert ATPase, alkalische Phosphatase und Tyrosin-Phosphatase	HUANG & BERRY (1990)
EGTA	380,4	10 mM	H <sub>2</sub> O	Calcium-Chelator, reduziert die Konzentration an freiem, verfügbarem Calcium im Medium	ROBINSON (1981)
Monensin	692,9	10 µM	DMSO	neutrales Ionophor für monovalente Kationen, höchste Selektivität für Natrium	ROBINSON (1981) AMANO et al. (1997)
Neomycinsulfat	908,9	0,1 mM	DMSO	Inhibitor der Polyphosphoinositidhydrolyse	LEGENDRE et al. (1993)
Diethylstilbestrol	268,4	0,1 mM	DMSO	ATPase-Inhibitor	VARA & SERRANO (1982) DOMINGAN et al. (1988)

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 cDNAs**

Das erste Screening einer Expressionsgenbank ( $\lambda$ -gt11, SCHARF et al., 1990) mit einem polyklonalen Kaninchenantiserum gegen HSP17 der Tomate ergab mehr als einhundert positive Klone. Ein Teil davon wurde weiter gereinigt und charakterisiert. Nach der Umklonierung der Inserts in das Plasmid pBKS (Stratagene, La Jolla, USA) wurden die erhaltenen Plasmide sequenziert. Mindestens fünf verschiedene cDNAs, die für kleine Hitzeschockproteine der cytoplasmatischen Klasse I kodieren, konnten identifiziert werden.

Obwohl eine Vielzahl positiver Klone erhalten worden waren, ließen sich nur wenige unterschiedliche cDNAs identifizieren. Da das Screening in einer hitzeschock-spezifischen cDNA-Bank erfolgte, ist die große Anzahl hsp17-ähnlicher Klone ein Indiz für die hohe relative Häufigkeit der hsp17-mRNA nach einem Hitzeschock.

Exemplarisch ist die cDNA Sequenz und die abgeleitete Proteinsequenz des Klons 92, der für die Expression des rekombinanten Proteins genutzt wurde, in Abbildung 3 wiedergegeben. Weitere cDNAs sind in Abbildung 4 aufgeführt.

1											M	S	L	I	P	R	6
1	CAT	ATA	AAA	TTC	TCA	AAA	AGC	TCA	CTG	AAA	ATG	TCT	CTG	ATC	CCA	AGA	48
7	I	F	G	D	R	R	S	S	S	M	F	D	P	F	S	I	22
49	ATT	TTC	GGC	GAT	CGA	CGA	AGC	AGC	AGC	ATG	TTC	GAT	CCA	TTT	TCA	ATT	96
23	D	V	F	D	P	F	R	E	L	G	F	P	G	T	N	S	38
97	GAC	GTA	TTT	GAT	CCA	TTC	AGG	GAA	TTA	GGC	TTC	CCA	GGT	ACC	AAT	TCA	144
39	G	E	T	S	A	F	A	N	T	R	I	D	W	K	E	T	54
145	GGG	GAG	ACC	TCT	GCG	TTT	GCC	AAC	ACT	CGA	ATA	GAC	TGG	AAG	GAA	ACT	192
55	P	E	A	H	V	F	K	A	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	70
193	CCA	GAA	GCT	CAT	GTG	TTC	AAG	GCT	GAT	CTT	CCA	GGG	CTT	AAG	TTG	GAG	240
71	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	86
241	GAA	GTA	AAA	GTG	GAA	GTC	GAG	GAG	GAT	AGG	GTT	CTT	CAG	ATC	AGC	GGA	288
87	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	K	E	D	K	N	D	K	W	Q	R	V	102
289	GAG	AGG	AAC	ATG	GAG	AAA	GAA	GAT	AAG	AAT	GAT	AAG	TGG	CAG	CGC	GTG	336
103	E	R	S	S	G	K	F	M	R	R	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	118
337	GAG	CGA	AGC	AGC	GGG	AAA	TTC	ATG	AGG	AGA	TTT	AGA	CTT	CCG	GAG	AAT	384
119	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	134
385	GCA	AAG	ATG	GAT	CAA	GTT	AAG	GCT	TCA	ATG	GAG	AAT	GGA	GTG	CTT	ACT	432
135	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	E	E	M	K	K	P	D	V	K	S	I	150
433	GTT	ACA	GTT	CCG	AAG	GAA	GAA	ATG	AAG	AAG	CCT	GAT	GTG	AAG	TCC	ATT	480
151	E	I	S	G	*												155
481	GAG	ATC	TCT	GGT	TAA	AAA	TAC	ATT	TGT	TAA	TTA	AGT	TGA	TGT	GTA	TGG	528
529	TCA	AAT	AAT	AAC	TGA	GTT	TGT	TGT	GTC	CGT	TGA	AGA	TTT	GAA	GTT	GCT	576
577	CTG	TTT	TTC	TAT	CGA	AGT	CTT	GAG	TCG	GCT	TTG	CTT	CTC	GCC	TAA	TGG	624
625	CGT	AGT	TGT	ACT	TTT	TCA	AGT	TTG	ACG	TTG	AAT	ATG	AAA	AAT	TTG	TCT	672
673	TTT	ATT	TTT	TTA	CTG	TAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AA					707

**Abbildung 3:** Nukleinsäure- und abgeleitete Proteinsequenz des cDNA Klons 92. Die Consensus Sequenzen I und II sind unterstrichen.

1												M	S	L	I	P	5
1	AA	ACA	CAG	AAA	ATT	CTC	AAT	AGC	TCA	CTG	AAA	ATG	TCA	CTG	ATC	CCA	47
6	R	I	F	G	D	R	R	S	T	S	V	F	D	P	F	S	21
48	AGA	ATC	TTC	GGC	GAT	CGA	CGA	AGC	ACC	AGC	GTG	TTC	GAT	CCA	TTT	TCA	95
22	I	D	V	F	D	P	F	K	E	L	G	F	T	V	S	N	37
96	ATT	GAC	GTA	TTT	GAT	CCA	TTC	AAG	GAA	TTA	GGC	TTT	ACA	GTT	TCC	AAT	143
38	S	G	E	T	S	A	F	A	N	T	R	I	D	W	K	E	53
144	TCA	GGG	GAG	ACC	TCT	GCA	TTT	GCT	AAC	ACC	CGA	ATC	GAC	TGG	AAG	GAA	191
54	T	P	E	A	H	V	F	K	A	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	69
192	ACT	CCA	GAA	GCT	CAT	GTG	TTC	AAG	GCT	GAT	CTT	CCA	GGA	CTT	AAG	AAG	239
70	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	85
240	GAG	GAA	GTA	AAA	GTG	GAA	GTC	GAG	GAG	GAT	CGT	GTT	CTT	CAG	ATC	AGC	287
86	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	E	D	K	N	D	T	W	H	R	101
288	GGA	GAG	AGG	AAC	GTG	GAG	AAA	GAA	GAC	AAG	AAC	GAT	ACT	TGG	CAC	CGT	335
102	V	E	R	S	S	G	K	F	M	R	R	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	117
336	GTG	GAA	CGC	AGC	AGC	GGG	AAA	TTC	ATG	AGA	AGA	TTT	AGA	CTT	CCG	GAG	383
118	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	133
384	AAT	GCA	AAG	ATG	GAT	CAA	GTT	AAG	GCG	TCT	ATG	GAG	AAT	GGA	GTG	CTT	431
134	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	E	E	V	N	N	P	D	V	K	S	149
432	ACT	GTT	ACT	GTT	CCG	AAG	GAG	GAG	GTG	AAT	AAC	CCT	GAT	GTC	AAG	TCC	479
150	I	E	I	S	G	*											154
480	ATT	GAG	ATC	TCT	GGT	TAA	AAT	ATG	TGA	ATT	TAT	TGT	ATC	CTT	GTA	TGG	527
528	GCA	AAA	AAA														534

**Abbildung 4a:** cDNA- und abgeleitete Proteinsequenz des Klons 36. Die Consensus Sequenzen I und II sind unterstrichen.

1												M	S	L	I	4	
1						TCA	AAA	AGC	TCA	CTG	AAA	ATG	TCT	CTG	ATC	30	
5	P	R	I	F	G	D	R	R	S	S	S	M	F	D	P	F	20
31	CCA	AGA	ATC	TTC	GGC	GAC	CGA	CGA	AGC	AGT	AGC	ATG	TTC	GAT	CCA	TTT	78
21	S	I	D	V	F	D	P	F	R	E	L	G	F	P	G	T	36
79	TCA	ATT	GAC	GTA	TTT	GAT	CCA	TTT	AGG	GAA	TTA	GGC	TTT	CCA	GGT	ACC	126
37	N	S	R	E	T	S	A	F	A	N	T	R	I	D	W	K	52
127	AAT	TCA	CGG	GAG	ACC	TCT	GCA	TTT	GCT	AAC	ACT	CGA	ATC	GAT	TGG	AAG	174
53	E	T	P	E	A	H	V	F	K	A	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	68
175	GAA	ACT	CCA	GAA	GCT	CAT	GTG	TTC	AAA	GCC	GAT	CTT	CCA	GGG	CTT	AAG	222
69	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	84
223	AAG	GAG	GAA	GTG	AAA	GTG	GAG	ATC	GAA	GAA	GAT	AGG	GTT	CTT	CAG	ATC	270
85	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	K	E	D	K	N	D	T	W	H	100
271	AGC	GGA	GAG	AGG	AAC	GTG	GAG	AAA	GAA	GAT	AAG	AAC	GAT	ACT	TGG	CAT	318
101	R	V	E	R	S	S	G	K	F	M	R	R	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	116
319	CGT	GTG	GAA	CGC	AGC	AGT	GGA	AAA	TTC	ATG	AGG	AGA	TTT	AGA	CTT	CCG	366
117	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	132
367	GAG	AAC	GCA	AAG	ATG	GAT	CAA	GTT	AAG	GCT	TCT	ATG	GAG	AAT	GGA	GTG	414
133	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	E	E	V	K	K	P	D	V	K	148
415	CTG	ACT	GTC	ACT	GTT	CCA	AAG	GAA	GAA	GTG	AAG	AAA	CCT	GAT	GTC	AAG	462
149	S	I	E	I	S	G	*										154
463	TCT	ATT	GAA	ATC	TCT	GGT	TAA	AAC	TTC	ATT	TGT	TTA	TTA	AGT	GGT	AGT	510
511	ATA	TGA	TGT	ATG	AAC	AAA	TAA	TCA	GTT	GAA	GTT	GTT	GTG	TCT	TTG	TAT	558
559	TCA	AGT	GTT	TGA	GTT	GTC	GCT	GTT	TCT	TGT	GTT	CAA	AAT	ATG	AAA	TAC	606
607	TAG	TCC	TTT	TGA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA								633

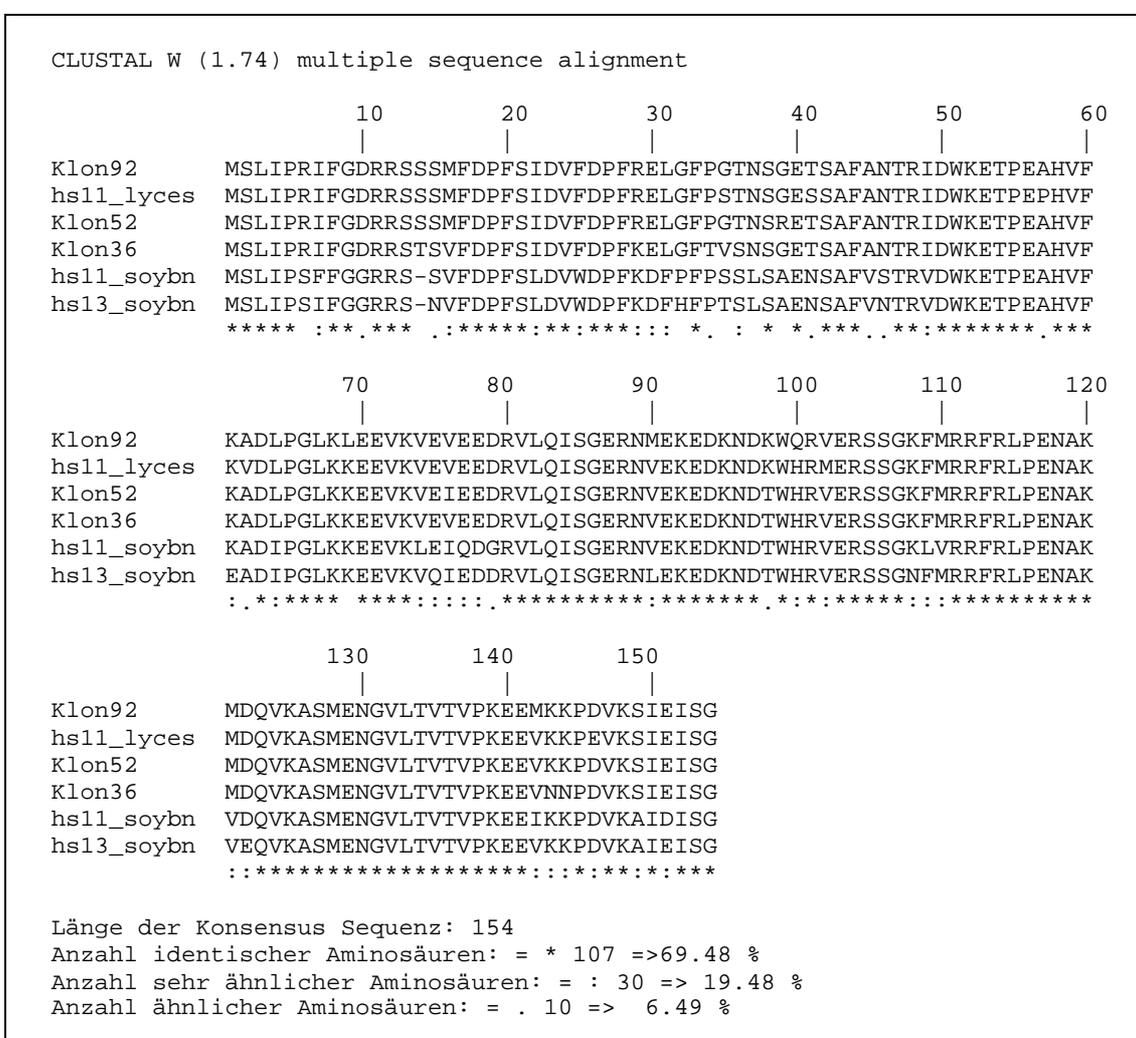
*Abbildung 4b:* cDNA- und abgeleitete Proteinsequenz des Klons 52. Die Consensus Sequenzen I und II sind unterstrichen.

1	AG GAA ATT GGT GAG GAA AGC AAG ATG GAA GAA GTG GAC TAA TCA TTG	47
48	AAA TCA GTT GAG ACT TTT GAG ATG CGT GAA AAT ACA ATT TGA GCG TGT	95
96	TGC TTT TTT TCT CAT CTT TTG TCT AGT ATA GTT TTT TTT TTG GCT AGT	143
144	GGT TCA GAT GGG TTA TTC GTC TGT TGT GTA AGT AAT GTG TTT TTG TGT	191
192	CCT GTC CAA GTG TTA AAG AGA ATA TGT CCA TCA GTT AAC CGA AAT GTT	239
240	ATA AAC TTC TAT TTT GGA TCA AAC CAA AAT TGA AAT TTC ACG CAC AAA	287
1		
288	ATC ACA ATA TCC AAA AAT TTC TCA ATA CTG AAA ATG GAT TTG AGG TTG	335
		M D L R L
6	L G I D N T P L F H T L H H M M	21
336	TTG GGT ATC GAT AAC ACA CCA CTC TTC CAC ACT CTC CAC CAT ATG ATG	383
22	E A A G E D S V N A P S K I Y V	37
384	GAA GCT GCC GGT GAA GAT TCC GTG AAT GCA CCA TCA AAG ATT TAT GTT	431
38	R D A K A M A A T P A D V K E Y	53
432	CGT GAT GCT AAG GCC ATG GCT GCT ACA CCA GCG GAT GTG AAG GAG TAT	479
54	P N S Y V F V V <u>D M P G L K S G</u>	69
480	CCT AAT TCG TAT GTT TTT GTT GTG GAT ATG CCA GGG TTG AAA TCT GGA	527
70	<u>D I K V Q V E E D N V L L I S G</u>	85
528	GAT ATC AAA GTG CAG GTG GAA GAA GAC AAT GTG CTG TTG ATA AGT GGT	575
86	<u>E R K R E</u> E E K E G A K F I R M	101
576	GAA AGG AAG AGG GAA GAA GAG AAA GAA GGT GCA AAG TTT ATT AGG ATG	623
102	E R R V G K F M R K <u>F S L P E N</u>	117
624	GAG AGA AGG GTT GGG AAA TTC ATG AGG AAG TTT AGT CTG CCA GAG AAT	671
118	<u>A N T D A I S A V C Q D G V L T</u>	133
672	GCG AAT ACT GAT GCA ATT TCT GCA GTT TGT CAA GAT GGA GTT CTG ACT	719
134	<u>V T V Q K L P P P E P K K P K T</u>	149
720	GTT ACT GTT CAG AAA TTG CCT CCT CCT GAG CCA AAG AAA CCG AAA ACA	767
150	I E V K V A *	155
768	ATT GAG GTG AAA GTT GCT TGA AGT TAT GGA CTC TGT TTT GAT GGT TGG	815
816	TGG TAT GAT GTA TTA CAA ATA AAG ATG TAG GAG TAG TGA ACT TCT TTC	863
864	TTT TAT CTT TCT GCT ATG TTT TCA CGT CTG TTT GAA AGT TAC AAT AGC	911
912	CAT GGG TAT TGT TTG TTT TGT TGT CTA ATG CAG TGC TAT GCT TCT GTC	959
960	ACA TTT TCT TTA AAC AGA AAA AAA	983

*Abbildung 4c:* cDNA- und abgeleitete Proteinsequenz des Klons 41. Die Consensus Sequenzen I und II sind unterstrichen.

### 3.1.1 Sequenzanalyse

Der Vergleich der cDNA Sequenzen und der daraus abgeleiteten Proteinsequenzen mit der EMBL- beziehungsweise SWISS-PROT-Datenbank (EBI, Hinxton, Großbritannien) zeigte eine fast hundertprozentige Identität zu einem HSP17 der Tomate *Lycopersicon esculentum* (FRAY et al., 1990) und sehr hohe Homologien zu anderen Vertretern der Klasse I cytoplasmatischer LMW HSPs (vergleiche Abbildung 5). Ähnlichkeiten zu anderen pflanzlichen kleinen Hitzeschockproteinen wurden zwar ebenfalls gefunden, allerdings waren diese nicht so ausgeprägt und beschränkten sich meist auf die C-terminale Domäne des Proteins. Auch die beiden Consensus Sequenzen I und II (VIERLING, 1991) sind in dem hier charakterisierten HSP17 vorhanden (vergleiche Abbildung 3).



**Abbildung 5:** Homologie der abgeleiteten Proteinsequenzen der HSP17-Klone 92, 52 und 36 aus *Lycopersicon peruvianum* zu kleinen cytoplasmatischen HSPs aus der Tomate, *Lycopersicon esculentum* (hs11\_lyces) und der Sojabohne (hs13\_soybn und hs11\_soybn). Clustal W Alignment (THOMPSON et al., 1994)

In Abbildung 6 sind errechnete Hydropathieplots des von Klon 92 kodierten Proteins und einiger homologer Proteine dargestellt. Alle verwendeten Algorithmen liefern ein ähnliches Muster, welches typisch für die bisher beschriebenen Vertreter dieser Proteinklasse ist.

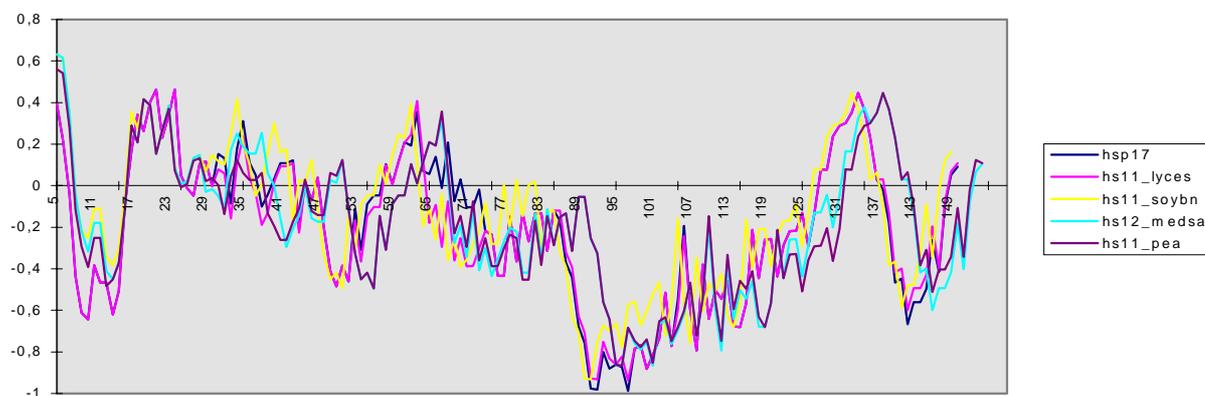


Abbildung 6 a: Hydropathieplots nach EISENBERG et al. (1984) für das HSP17 aus *Lycopersicon peruvianum* (hsp17) und die HSP17 aus *Lycopersicon esculentum* (hs11\_lyces), aus der Sojabohne (hs11\_soybn), aus *Medicago sativa* (hs12\_medsa) und aus der Erbse (hs11\_pea)

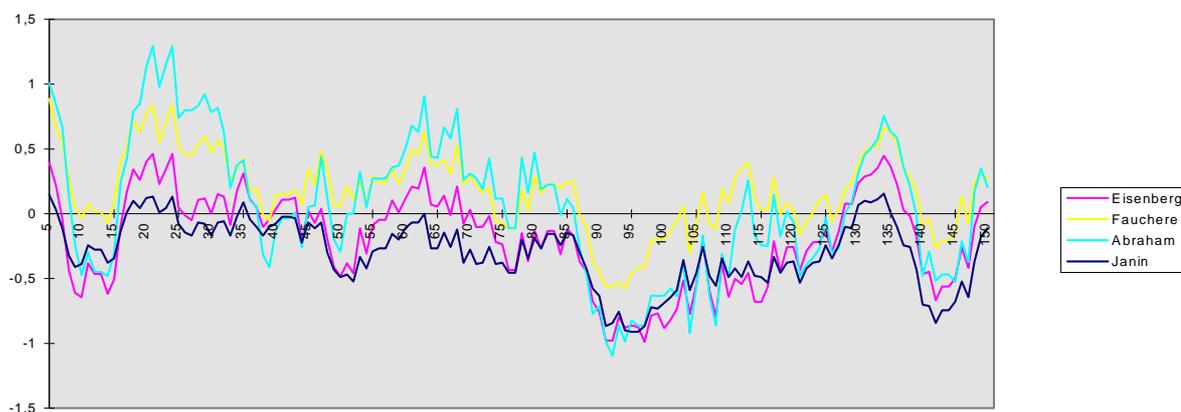


Abbildung 6 b: Hydropathieplots für das HSP17 aus *Lycopersicon peruvianum* nach den Algorithmen von EISENBERG et al. (1984), FAUCHERE & PLISKA (1983), ABRAHAM & LEO (1987) und JANIN (1979)



Auch das kleine Hitzeschockprotein aus *Methanococcus jannaschii*, dessen Kristallstruktur von KIM et al. (1998) aufgeklärt wurde, weist einen sehr hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt und eine N-terminale, ungeordnete Region auf.

### 3.2 Genomische Klone

Eine genomische Bank der Tomate, *Lycopersicon esculentum* (Stratagene, La Jolla, USA), konstruiert in dem Vektor EMBL 3, wurde mit der cDNA des Klons 92 hybridisiert. Dabei wurden acht positive Klone identifiziert. Die Analyse der Restriktionsmuster ergab, daß es sich um vier unabhängige genomische Inserts handelt.

Southern Blots mit genomischer DNA aus Tomate (Abbildung 8) zeigten mehrere Banden. Es sind offenbar mindestens sechs Gene, die für kleine cytoplasmatische HSPs kodieren, im Genom dieser Pflanzen vorhanden.

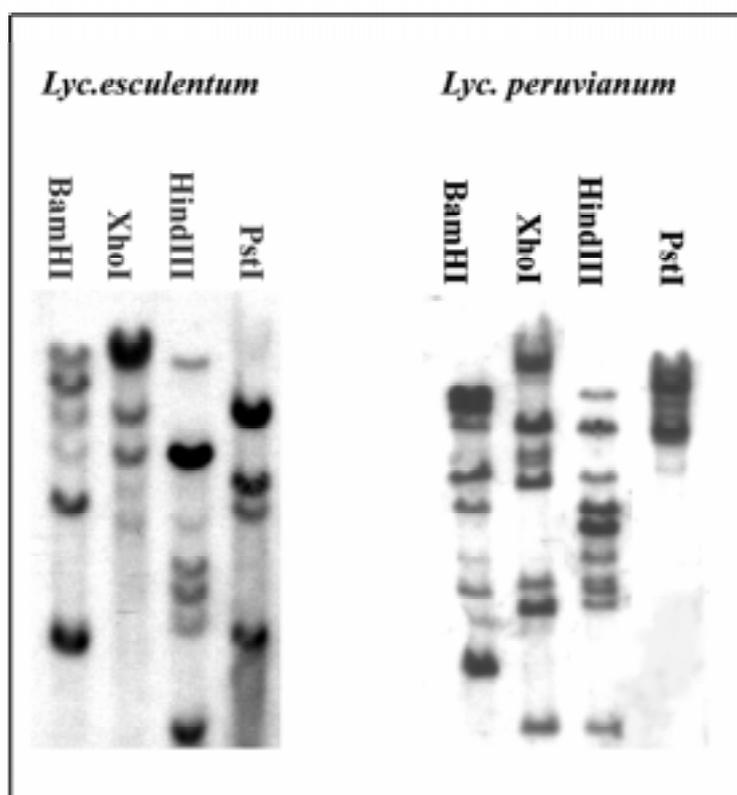


Abbildung 8: Southern Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde (cDNA Klon 92) und Chemilumineszenz-Nachweis. Gesamt-DNA wurde aus Zellkulturen (*Lycopersicon peruvianum*) beziehungsweise Blättern (*Lycopersicon esculentum*) isoliert.

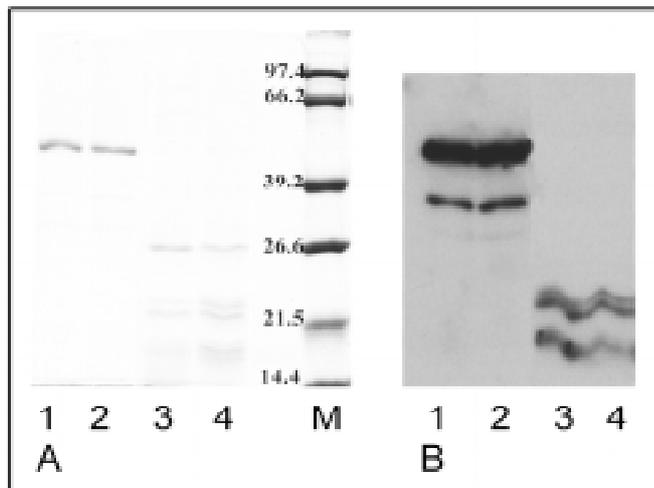
### 3.3 Expression eines rekombinanten Hitzeschockproteins in *Escherichia coli*

Das von der cDNA des Klonen 92 kodierte kleine, cytoplasmatische, Klasse I (Low Molecular Weight) Hitzeschockprotein aus Tomate (*Lycopersicon peruvianum*) wurde als GST-Fusionsprotein (a) beziehungsweise als Fusionsprotein mit einem Hexahistidinpeptid exprimiert (b). In beiden Fällen wurde *Escherichia coli* BL21 benutzt.

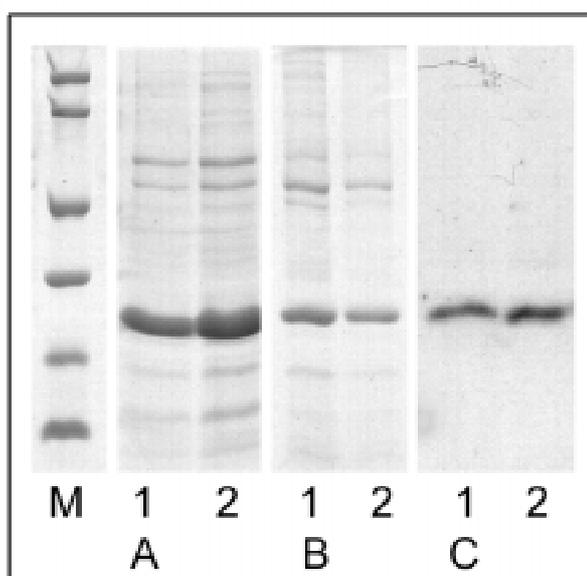
a) Die cDNA des Klonen 92 wurde unter Erhalt des Leserahmens in den Expressionsvektor pGEX5X-2 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) kloniert. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte im Batchverfahren an Glutathion-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Nach der Aufreinigung des GST-Fusionsproteins waren in Western Blots beim Nachweis mit anti-HSP17 Antiserum immer mehrere Banden sichtbar (Abbildung 9). Auch nach der Spaltung mit Factor Xa wurden mehrere Banden erhalten. In beiden Fällen waren dies offenbar nicht proteolytische Abbauprodukte, da auch die Zugabe von Proteaseinhibitoren (PMSF, Aprotinin, Leupeptin) das Erscheinen dieser Proteine nicht unterdrückte. Wahrscheinlich handelte es sich um vorzeitig terminierte Translationsprodukte, da nach der Spaltung mit Faktor Xa sich die im Western Blot detektierten Banden nach unten verschoben. Somit ist es unwahrscheinlich, daß es sich bei den kleineren, kreuzreagierenden Proteinen um während der Reinigung angereicherte *E. coli* Proteine handelte, die dann eine Faktor Xa Erkennungssequenz enthalten müßten.

b) Die Expression des Proteins als Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidin-Peptid erfolgte in dem Vektor pQE32 (Qiagen, Hilden, Bundesrepublik Deutschland). Das erlaubte die Isolierung des rekombinanten Proteins an Fast Flow Chelating Sepharose, die mit Kupfer-II-Ionen beladen worden war (Abbildung 10). Dies ergab eine weitaus bessere Reinigung des Proteins als bei der Verwendung von Nickel-II-Ionen, bei der einige bakterielle Proteine ebenfalls angereichert wurden. Teilweise erfolgte die Aufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe von Ni-NTA Spin Columns (Qiagen, Hilden, Bundesrepublik Deutschland), da damit wesentlich höhere Ausbeuten erreicht werden konnten als bei nativer Extraktion.

Das durch die Gegenwart von Harnstoff denaturierte rekombinante Protein bindet sehr viel stärker an Fast Flow Chelating Sepharose als natives, das heißt gegen PBS dialysiertes, rekombinantes Protein (Abbildung 11, Elution aller gebundener Proteine mit 0.1 M EDTA). Wahrscheinlich war durch die Denaturierung das Hexahistidinpeptid besser zugänglich oder Wechselwirkungen zwischen den Proteinen, zum Beispiel Aggregationen, wurden unterdrückt, sodaß die Monomere besser an die Sepharose binden konnten.



**Abbildung 9:** Expression eines GST-HSP17-Fusionsproteins. A) Reinigung des rekombinanten Proteins an Glutathion-Sepharose: 1. und 2. Eluat; 3. und 4. Spaltung der Eluate des Fusionsproteins mit Faktor Xa; M - Molekulargewichtsmarker. A) Denaturierende Polyacrylamid-gelelektrophorese, Coomassiefärbung. B) Western Blot zu A) 1. und 2. Eluat; 3. und 4. Spaltung mit Faktor Xa Nachweis mit einem polyklonalen Antiserum gegen das HSP17 der Tomate und nachfolgender Chemilumineszenz.



**Abbildung 10:** Expression des rekombinanten HSP17 als Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidinpeptid. A) Reinigung an Ni<sup>++</sup>-Fast Flow Chelating Sepharose. M - Molekulargewichtsmarker, 1. und 2. Eluat; B) Reinigung an Cu<sup>++</sup> Sepharose. 1. und 2. Eluat. A) & B) Denaturierende Polyacrylamid-gelelektrophorese, Coomassiefärbung. C) Korrespondierender Western Blot zu B): 1. und 2. Eluat. Nachweis des Fusionsproteins unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen HSP17.

Das rekombinante HSP17 hat ein scheinbares Molekulargewicht von 20 kDa (inklusive des Hexahistidin-Peptides und einiger vom Polylinker kodierter Aminosäuren). Die für die biochemischen Untersuchungen verwendeten Fraktionen waren frei von nennenswerten Mengen an anderen Proteinen (eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese). Die verwendete cDNA (Klon 92) kodiert für ein Protein mit einem definierten isoelektrischen Punkt von 5,41 (vergleiche Abschnitt 3.1.1). Nach zweidimensionaler Elektrophorese und anschließendem immunologischen Nachweis wurden mehrere Isoformen des rekombinanten Proteins gefunden, die sehr wahrscheinlich einen Artefakt darstellten (Daten nicht gezeigt). Die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte waren offenbar ein Ergebnis von Carbamylierungen, wie dies auch für  $\alpha$ -Crystallin beschrieben ist (QIN et al., 1992; GROENEN et al., 1994). Ausreichende Mengen rekombinanten Proteins ließen sich nur unter denaturierenden Bedingungen, das heißt in Gegenwart von 8 M Harnstoff, aufreinigen. Auch für die isoelektrische Fokussierung war die Denaturierung in Harnstoff erforderlich.



Abbildung 11: Bindung des denaturierten (8 M Harnstoff) beziehungsweise des nativen (PBS) rekombinanten HSP17 an  $\text{Cu}^{++}$ -Fast Flow Chelating Sepharose. Gleiche Mengen des Proteins wurden an 20  $\mu\text{l}$  Sepharose gebunden. Nach vier Waschschrinen wurde das gebundene Protein mit 0.1 M EDTA eluiert. 1, 2: 1. und 2. Eluat des nativen Proteins; 3, 4: 1. und 2. Eluat des denaturierten Proteins; M: Molekulargewichtsmarker. Denaturierende Polyacrylamidgелеlektrophorese, Coomassiefärbung.

### 3.4 Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften des rekombinanten HSP17

Das Verhalten des rekombinanten kleinen HSPs der Tomate wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Methoden auf eine mögliche Chaperonfunktion *in vitro* untersucht (LEE, 1995).

Der erste Test untersuchte den Einfluß des rekombinanten Proteins auf die Renaturierung chemisch denaturierter Citrat Synthase. Das durch Guanidinhydrochlorid inaktivierte Enzym erlangte auch in Gegenwart des HSP17 nicht seine Aktivität zurück (Daten nicht

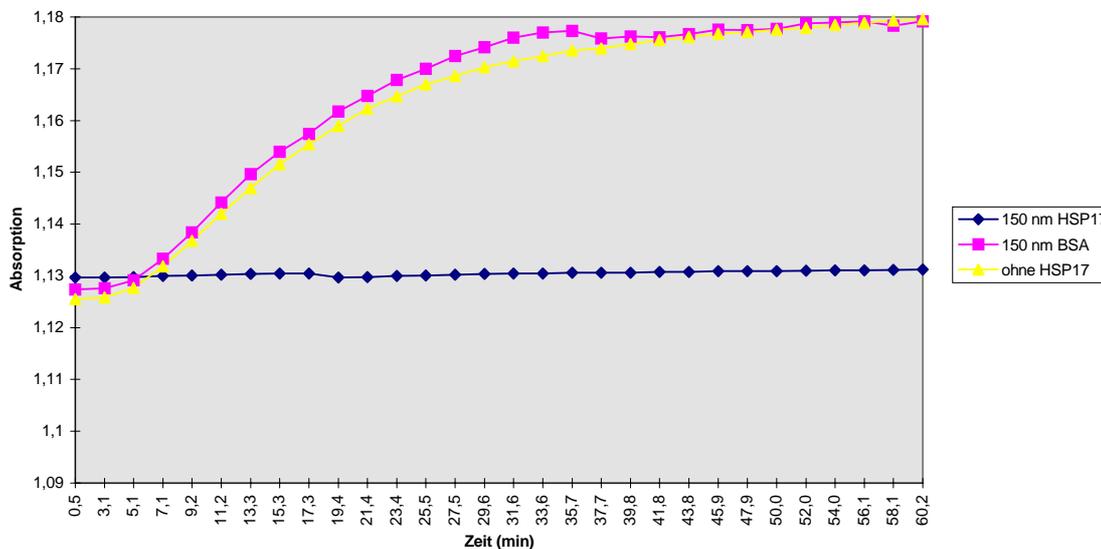
gezeigt). Eine Renaturierung der Citrat Synthase nur in Gegenwart von HSP17 ist nicht möglich.

In einem weiteren Assay wurde Citrat Synthase in Gegenwart des rekombinanten HSP17 beziehungsweise eines Kontrollproteins einem moderaten Hitzeschock unterworfen. Die Enzymaktivität wurde sowohl während der Inkubation bei 38°C als auch während der nachfolgenden Recovery-Phase bei Raumtemperatur bestimmt. Citrat Synthase behält in Gegenwart des rekombinanten HSP17 eine höhere Aktivität. Auch in der Erholungsphase bei 25°C zeigte die in Gegenwart von HSP17 inkubierte Citrat Synthase eine höhere Aktivität, wenngleich die Ausgangswerte nicht wieder erreicht wurden.

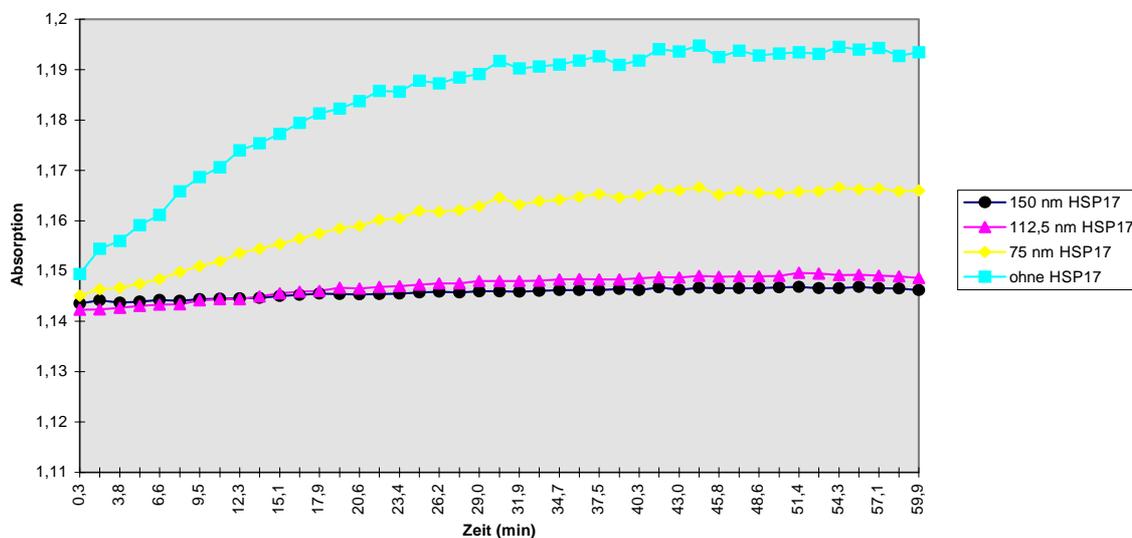
Ein dritter Assay untersuchte die Wirkung des HSP17 auf die hitzebedingte Aggregation der Citrat Synthase.

Dabei zeigte sich, daß rekombinantes HSP17 in der Lage ist, die Aggregation von Citrat Synthase bei erhöhten Temperaturen (45°C für eine Stunde) zu verhindern. Diese Wirkung als Chaperon war konzentrationsabhängig: bei einem äquimolaren Verhältnis von Citrat Synthase und HSP17-Dodecamer wurde die Aggregation vollständig unterdrückt (vergleiche Abbildung 12).

### Wirkung von HSP17 und BSA auf die Aggregation der Citrat Synthase



### Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von HSP17



**Abbildung 12:** Das rekombinante HSP17 ist in der Lage, die Aggregation der Citrat Synthase bei 45°C zu verhindern. Der Schutz der Citrat Synthase ist nicht durch ein BSA möglich (oben) und die Wirkung des Chaperons ist von dessen Konzentration abhängig (unten).

Neben diesen Assays wurde versucht, mögliche Bindungspartner der kleinen Hitzeschockproteine zu identifizieren.

Ausgehend von unseren Modellen zur Funktion der kleinen Hitzeschockproteine wurde besonders eine Wechselwirkung mit RNA und, da HSP17 auch in reifenden und reifen Samen gefunden worden war (ZUR NIEDEN et al., 1995), eine Wechselwirkung mit Speicherproteinen (Vicilin, Tabakglobulin und Legumin) untersucht.

In Blot-Overlay-Assays (CRAWFORD et al., 1994) konnte in keinem Falle eine Wechselwirkung unseres rekombinanten Proteins mit RNA oder Speicherproteinen nachgewiesen werden. Abbildung 13 zeigt ein Beispiel für einen solchen Blot-Overlay-Assay, wobei nur ein Protein des Molekulargewichtsmarkers Nucleinsäuren bindet.

Auch in den unter nativen Bedingungen durchgeführten GST-Pull-Down-Assays (AUSUBEL et al., 1994) beziehungsweise in Dot Blots, bei denen natives Protein auf Nitrocellulosemembranen aufgebracht wurde, konnten keine spezifischen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen gefunden werden. Im Falle der GST Assays waren die unspezifischen Bindungen an die Sepharose zu groß, um eine ausreichende Sensitivität zu ermöglichen (Daten nicht gezeigt).

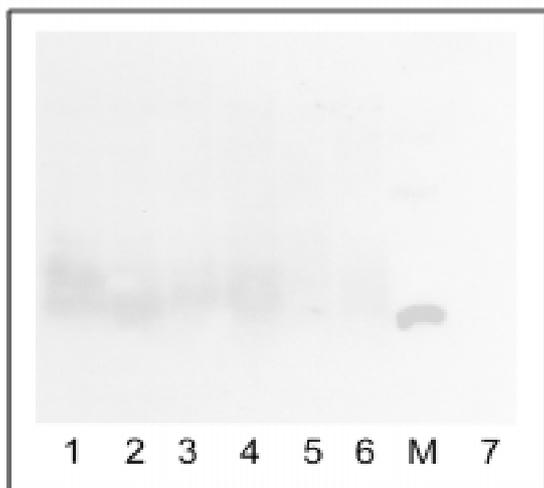


Abbildung 13: Autoradiographie eines Blot-Overlay-Assays (Northwestern). Gesamtproteine aus Tomatenzellkulturen wurden elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Nach einer Blockierung erfolgte die Inkubation des Blots mit radioaktiv markierter RNA. 1: Kontrolle, 10  $\mu\text{g}$ ; 2: Kontrolle, 20  $\mu\text{g}$ ; 3: Hitzeschock, 10  $\mu\text{g}$ ; 4: Hitzeschock, 20  $\mu\text{g}$ ; 5: 2,5 mM  $\text{Cd}^{++}$ , 10  $\mu\text{g}$ ; 6: 2,5 mM  $\text{Cd}^{++}$ , 20  $\mu\text{g}$ ; 7: rekombinantes HSP17, 4  $\mu\text{g}$ ; M: Molekulargewichtsmarker

### 3.5 Struktur des nativen Proteins

#### 3.5.1 Negativkontrastierung

Isolierte Granula, deren Vorstufen in Tomatenzellen und rekombinante Proteine ließen sich mittels Negativkontrastierung mit Uranylacetat im Elektronenmikroskop abbilden (Abbildung 14).

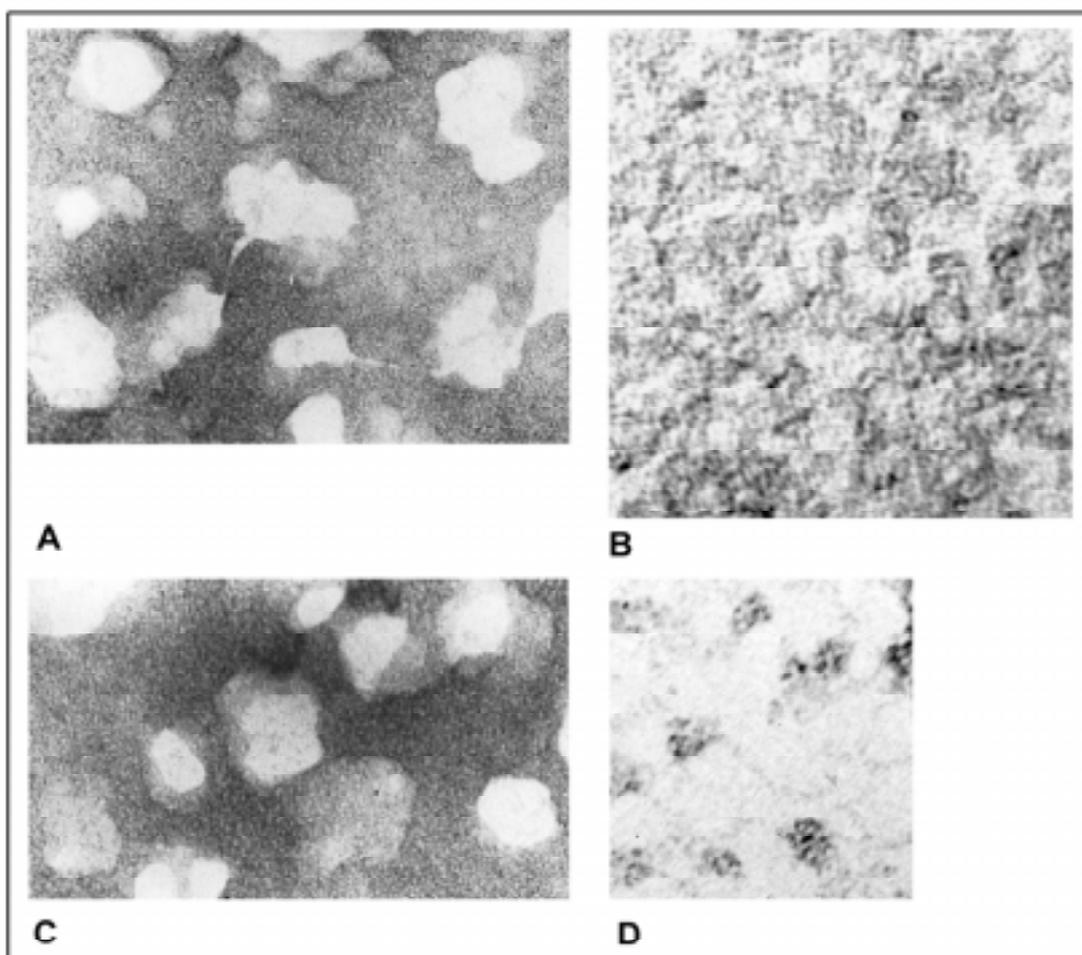
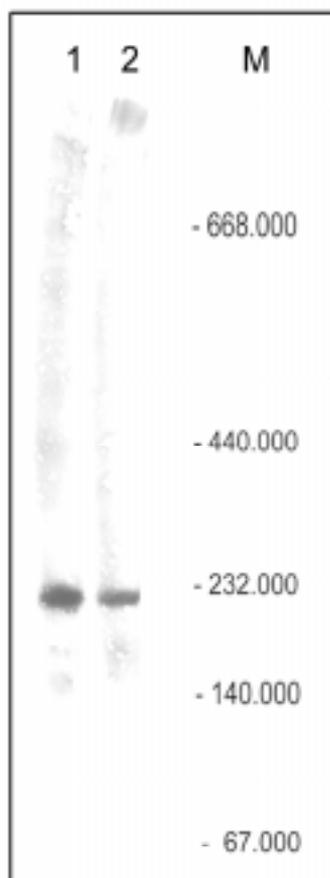


Abbildung 14: Negativkontrastierung von Hitzeschockgranula (A, C, je 320.000  $\times$ ) und prä-Granula im Cytosol hitzestresser Tomatenzellkulturen (B, D, je 420.000  $\times$ , Ultradünnschnitte).

Die cytoplasmatischen, makromolekularen Strukturen sind sphärisch und haben einen mittleren Durchmesser von 40 Nanometer (A, C), während deren Vorstufen etwa 10 Nanometer messen. Es sind keine regelmäßigen Komplexe einheitlicher Größe zu erkennen, die auf eine geordnete, einheitliche Multimerstruktur hindeuten würden. HSP17 neigt offenbar sehr stark zur Bildung größerer Proteinkomplexe. Aussagen über die Stöchiometrie oder Symmetrie der Komplexe sind aus diesen Untersuchungen nicht möglich.

### 3.5.2 Native Gelelektrophorese

Mittels einer nativen Pore-Size-Exclusion-Gradientengelelektrophorese (Abbildung 15) ließ sich das ungefähre Molekulargewicht der nach einem Hitzeschock gebildeten hochmolekularen Komplexe aus HSP17 bestimmen. Dabei wurde davon ausgegangen, daß die elektrophoretische Mobilität etwa proportional dem negativen Logarithmus des Molekulargewichtes ist. Unter diesen Voraussetzungen und anhand der Eichung mit Molekulargewichtsmarkern (Pharmacia, Uppsala, Schweden) ergab sich für die HSP Multimere ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 200.000, was einer Zusammensetzung aus 12 Monomeren entsprechen würde.



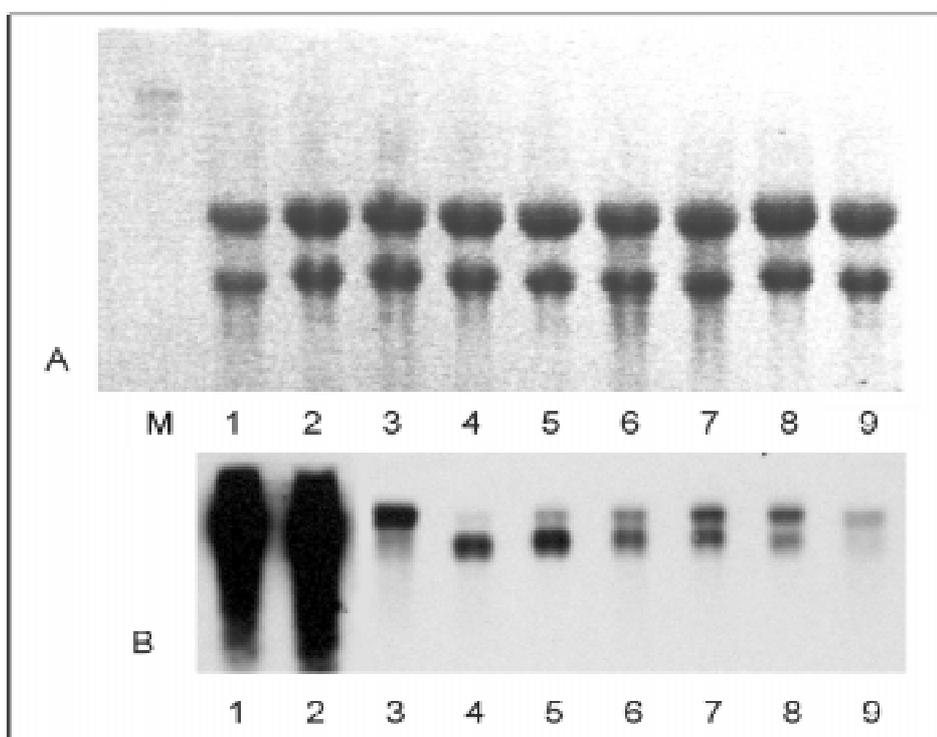
Im Western Blot dieses nativen Geles (Abbildung 15) konnte gezeigt werden, daß dieser Komplex tatsächlich aus HSP17 besteht. Das schließt nicht aus, daß auch andere Proteine darin enthalten sein können.

*Abbildung 15:* HSP17 formt Dodecamere in Tomatenzellkulturen nach einem Hitzeschock. Native Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Western Blot. Nachweis mit einem polyklonalen Antiserum gegen HSP17, Detektion des gebundenen primären Antikörpers mit einem Alkalische Phosphatase-Konjugat und CSPD. Lane 1: Überstand nach Zentrifugation bei  $18.000 \times g$ ; 2: Überstand nach Zentrifugation bei  $30.000 \times g$ ; M: Positionen der Proteine des Molekulargewichtsmarkers.

### 3.6 Untersuchungen zur Expression des HSP 17

Um Aufschlüsse über die temporäre und spatiale Expression des HSP17 der Tomate sowohl während der Reaktion auf verschiedene Streßfaktoren als auch während bestimmter Entwicklungsphasen zu erhalten, wurde zunächst die Transkription der entsprechenden mRNA mit Hilfe von Northern Hybridisierungen und *in situ* Hybridisierungen verfolgt.

Diese Untersuchungen ergaben Daten, die in guter Übereinstimmung mit den bisher gewonnenen Erkenntnissen aus Western Blots und immunhistochemischen Untersuchungen sind (ZUR NIEDEN et al., 1995).



**Abbildung 16:** Northern Hybridisierung. Gesamt-RNA wurde in denaturierenden Gelen getrennt (A) und nach dem Transfer auf Nylonmembran mit einer hsp17 Sonde (Klon 92) hybridisiert (B). 1: Hitzeschock, 39°C, 2 Stunden; 2: Schwermetallstreß, 2,5 mM Cd<sup>++</sup>, 2 Stunden; 3: Samen, 48 Stunden gekeimt; 4: Früchte, 39 Tage nach Anthese; 5: Früchte, 29 Tage nach Anthese; 6: Früchte, 21 Tage nach Anthese; 7: Früchte, 19 Tage nach Anthese; 8: Früchte, 15 Tage nach Anthese; 9: Zellkultur, Kontrolle.

I) Die verwendeten sensitiven, nichtradioaktiven Detektionsmethoden erlaubten den Nachweis eines geringen basalen Niveaus der hsp17 mRNA auch unter Kontrollbedingungen, das heißt in Zellkulturen, die bei 25°C kultiviert wurden, beziehungsweise in Blättern von Pflanzen aus dem Gewächshaus (vergleiche Abbildung 16).

II) Alle in dieser Untersuchung verwendeten Hitzeschockregime führen zu einem schnellen und sehr ausgeprägten Anstieg der hsp17-mRNA Menge. Pflanzliche Zellkulturen, die in der Gegenwart von Schwermetallsalzen ( $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Pb}^+$ ) inkubiert wurden, zeigten ebenfalls eine deutliche, wenn auch geringere Induktion der hsp17 mRNA.

III) Die Daten aus den Northern Blots zeigen weiterhin eine Induktion der hsp17 mRNA in Blüten und in reifenden Früchten und Samen. Die Menge an mRNA liegt unter dem Niveau, welches während einer klassischen Streßantwort erreicht wird.

Eine genauere Analyse zeigte, daß die verwendete Sonde (der Klon 92) zwei verschiedene Transkripte, die sich in ihrer Größe nur gering unterscheiden, in den Northern Blots detektierte. Dabei zeigten sich Unterschiede im Expressionsmuster dieser beiden Transkripte (vergleiche Abbildung 16). So ist in Streßsituationen bevorzugt ein kleineres Transkript detektierbar, während sehr junge Früchte ein größeres Transkript enthalten. In Primer Extension Assays (vergleiche Abbildung 17) mit einem Oligonukleotid (Primer HSP-A), welches komplementär zu dem Klon 92 war, konnten bei einer hohen Stringenz des Annealings in den klassischen Streßsituationen mehrere Transkripte identifiziert werden. In den hier analysierten Entwicklungsstadien der Blüten beziehungsweise Früchte ließen sich mit dem hier verwendeten Primer nur ein oder zwei Transkripte detektieren, während in Kontrollen keine Signale gefunden werden konnten.

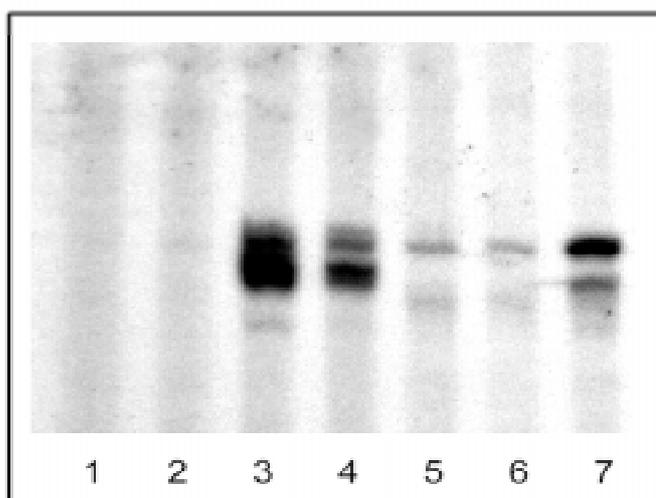
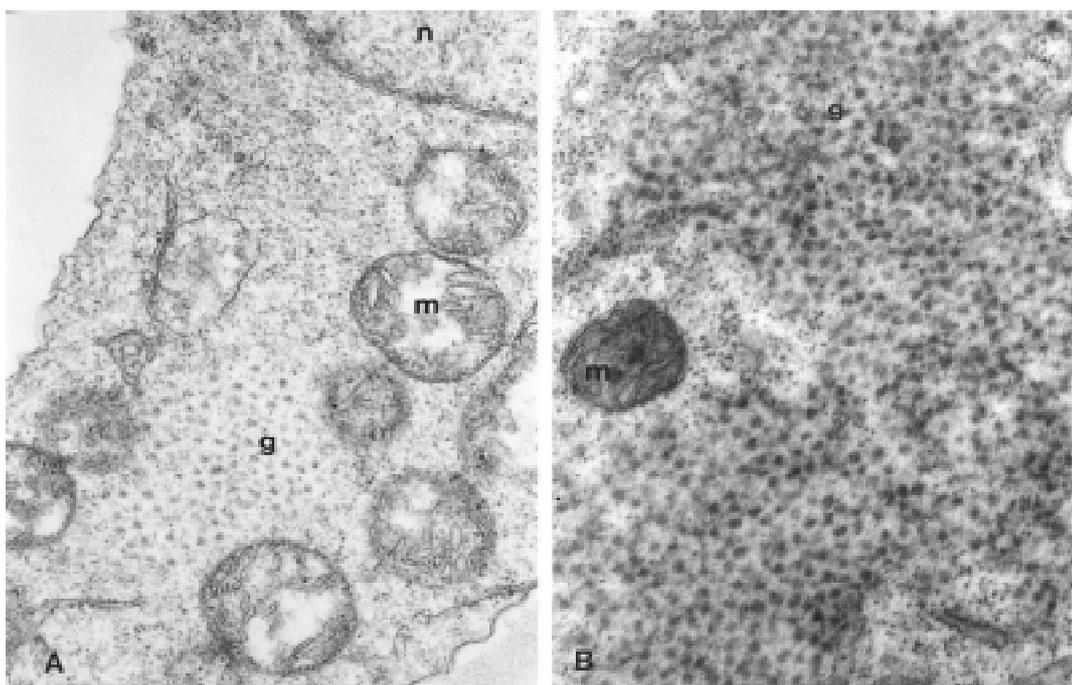


Abbildung 17: Primer Extension Assay. Gesamt-RNA wurde mit einem spezifischen, radioaktiv markierten Primer (HSP17) hybridisiert und revers transkribiert. Denaturierende Gelelektrophorese in Sequenzierungsgelen und Detektion der Reaktionsprodukte durch Autoradiographie. Hybridisierung bei 71°C. 1: Kontrolle, Zellkultur; 2: Kontrolle, Blatt; 3: Hitzeschock, Zellkultur; 4: Schwermetallstreß, Zellkultur; 5: Früchte, 21 Tage nach Anthese; 6: Früchte, 39 Tage nach Anthese; 7: Blatt, Hitzeschock. Zellkultur: *Lycopersicon peruvianum*; Pflanzen: *Lycopersicon esculentum*.

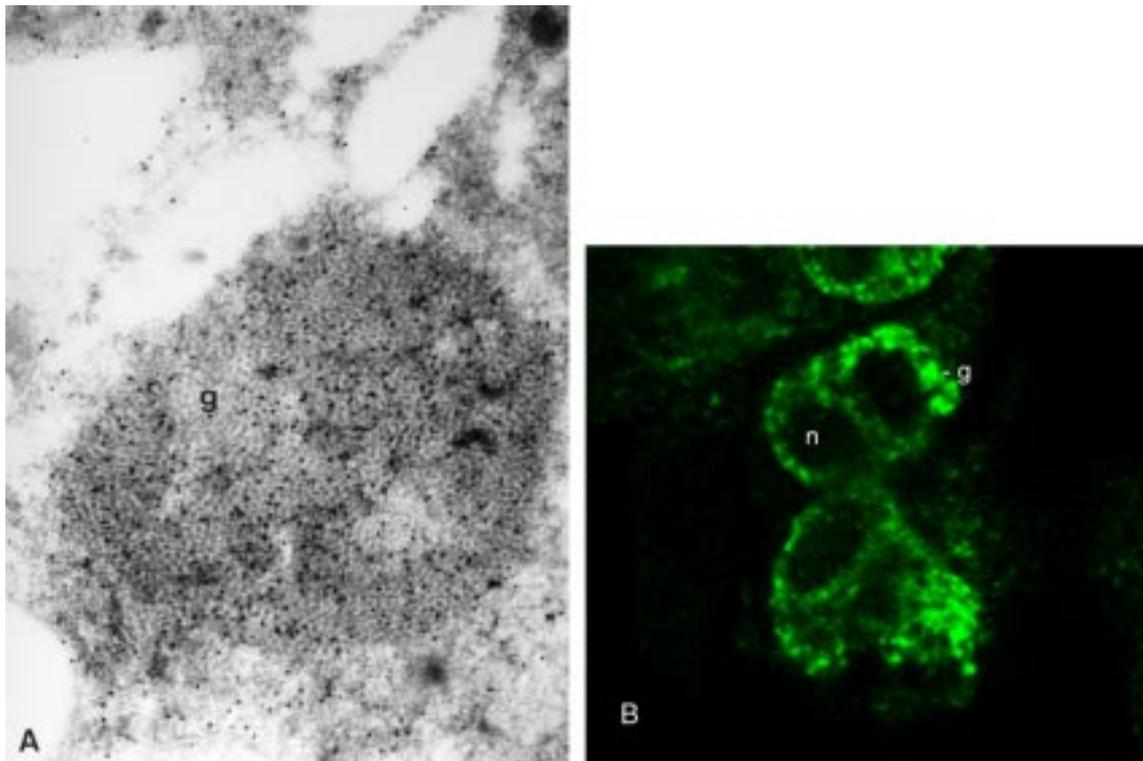
### 3.7 Unterschiede der Reaktion auf Hitzestreß und Schwermetallexposition

Die genaue elektronenoptische Untersuchung der sowohl bei Hitzestreß als auch bei der Exposition mit Schwermetallen gebildeten Hitzeschockgranula ergab eine Reihe von Gemeinsamkeiten sowie einige wesentliche morphologische Unterschiede (Abbildung 18). Wie im Falle des Hitzestresses (NEUMANN et al., 1985) bestehen die Hitzeschockgranula auch nach einer Schwermetallexposition vorwiegend aus kleinen Hitzeschockproteinen und zu wesentlich geringerem Teil aus Proteinen der HSP70 Familie. Der immunhistologische Nachweis des HSP17 in den Granula ist für den Fall des Schwermetallstresses in Abbildung 19 gezeigt. Die Ausdehnung und Zahl der Hitzeschockgranula-Komplexe ist im Falle des Hitzestresses wesentlich größer als im Falle des Schwermetallstresses.

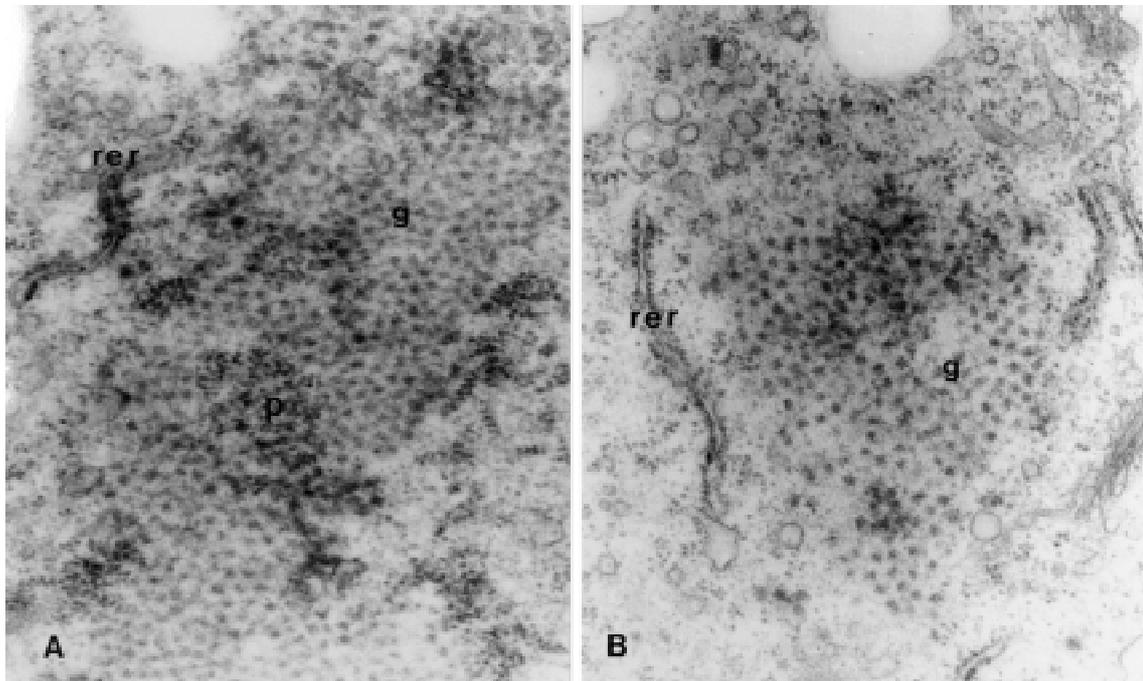


*Abbildung 18:* Ultrastruktur der Hitzeschockgranula in Tomatenzellen. A) nach Schwermetallstreß, 40.000  $\times$ ; B) nach Hitzeschock, 40.000  $\times$ ; g - Hitzeschockgranula; m - Mitochondrion; n - Nukleus

Weitere Unterschiede waren vor allem in der Recovery-Phase erkennbar. Nach Hitzestreß lösen sich die granulären Bereiche auf und die Zellen sind reich an rauhem Endoplasmatischem Retikulum und Dictyosomen (Abbildung 20). Das ist bemerkenswert, da in Zellkulturen unter Kontrollbedingungen rauhes Endoplasmatisches Retikulum sehr selten zu beobachten ist. Die bevorzugte Neubildung des rauhen Endoplasmatischen Retikulums in der unmittelbaren Umgebung der Granula läßt die Vermutung zu, daß mRNA oder aber Teile des Translationsapparates für die Synthese von Haushaltsproteinen aus den Hitzeschockgranula rekrutiert werden (Abbildung 20). Während des Recovery nach einem Schwermetallstreß ließen sich zwar aufgelockerte granuläre Bereiche beobachten, rauhes ER ist aber nicht zu finden.



*Abbildung 19:* Hitzeschockgranula nach Schwermetallstress in Tomatenzellkulturen. A) Immunogold-Nachweis des HSP17 mit einem polyklonalen Antiserum und ProteinA-Gold 15 nm. Vergrößerung 30.000  $\times$ ; B) Immunhistochemischer Nachweis des HSP17 mit einem polyklonalen Antiserum und einem FITC-Derivat. Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop. g - Hitzeschockgranula; n - Nucleus



*Abbildung 20:* Ultrastruktur von Tomatenzellkulturen während der Recovery-Phase nach einem Hitzeschock. Bevorzugt in der Nähe der sich auflösenden Granula bildet sich rauhes Endoplasmatisches Retikulum. A) 40.000  $\times$  ; B) 42.000  $\times$ ; p - Polysomen; g - Hitzeschockgranula; rer - rauhes Endoplasmatisches Retikulum

Für den Hitzeschock ist beschrieben, daß der Nukleolus aufgelockerte, dispergierende, granuläre Strukturen bildet, die als nicht fertig prozessierte Ribosomen angesehen worden sind (NEUMANN et al., 1984; NEUMANN et al., 1989). Wie in Abbildung 21 gezeigt, sind bei Schwermetallstreß solche aufgelockerte Strukturen des Nukleolus oder andere, ultrastrukturelle Veränderungen nicht zu beobachten. Das legt zusammen mit dem Befund, daß die Synthese und Reifung ribosomaler RNA nicht beeinträchtigt ist (WOLLGIEHN & NEUMANN, 1995), den Schluß nahe, daß die Funktion des Nukleolus durch die Schwermetalexposition nicht oder nur unwesentlich beeinflusst wird.

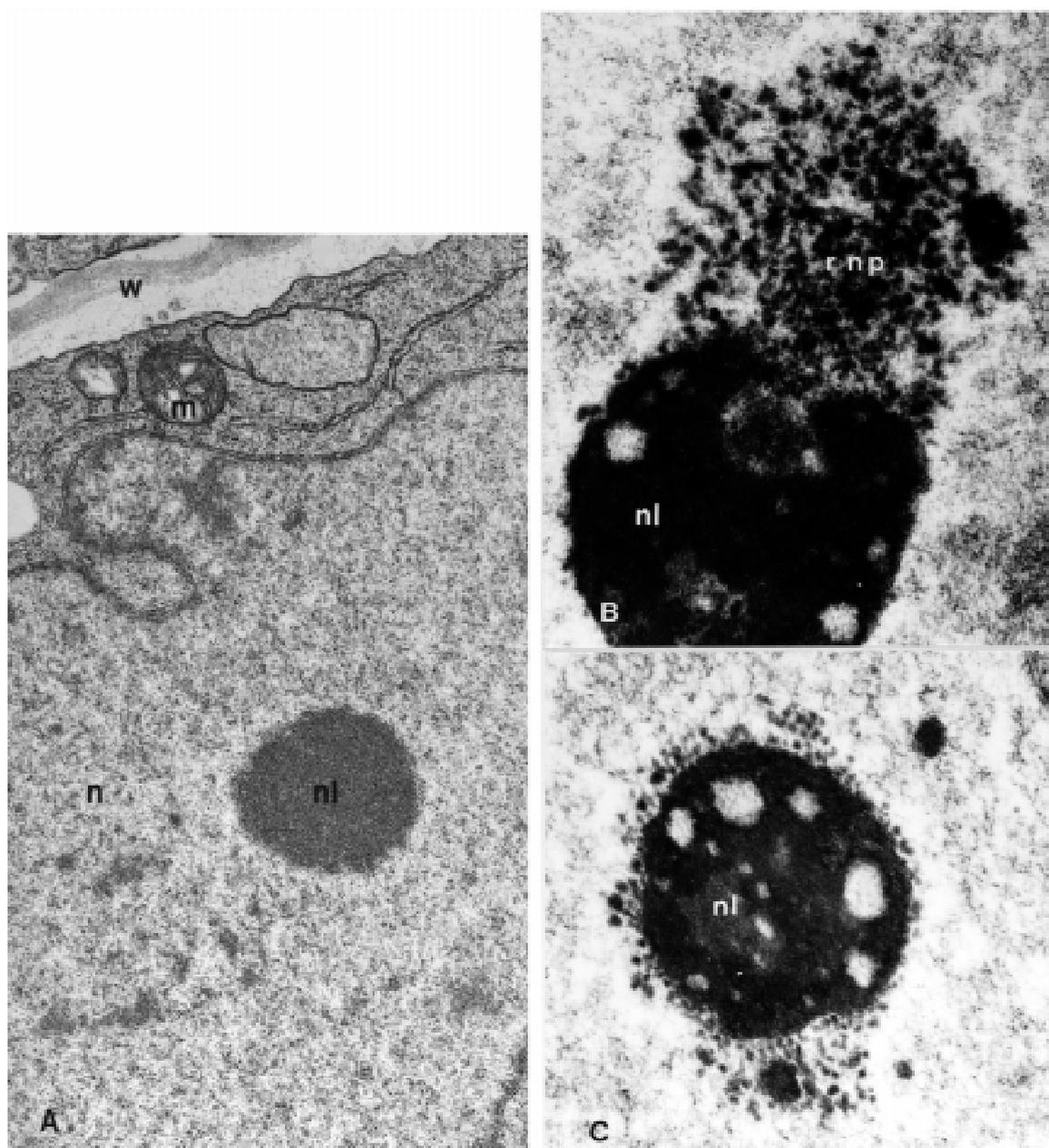
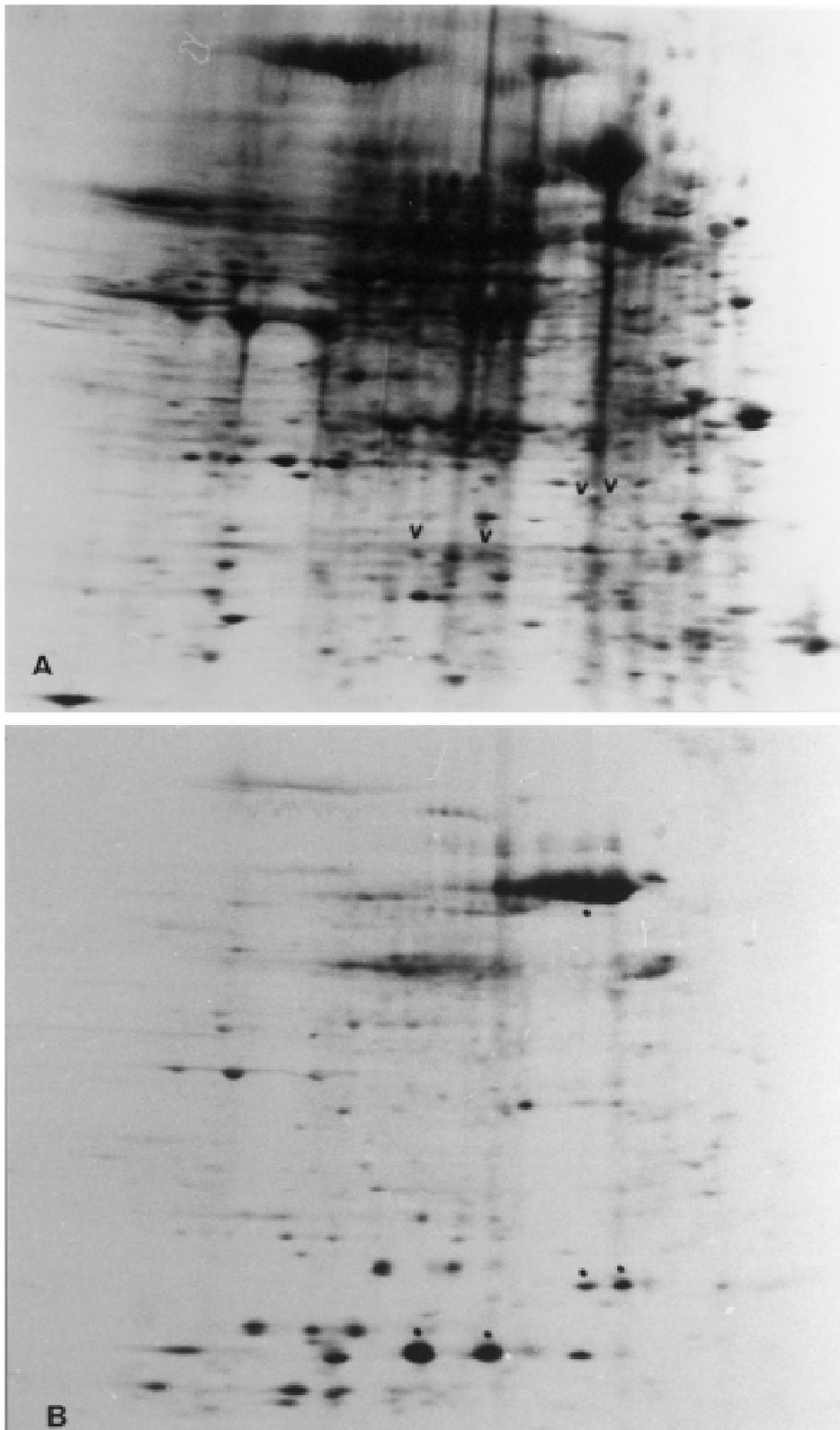
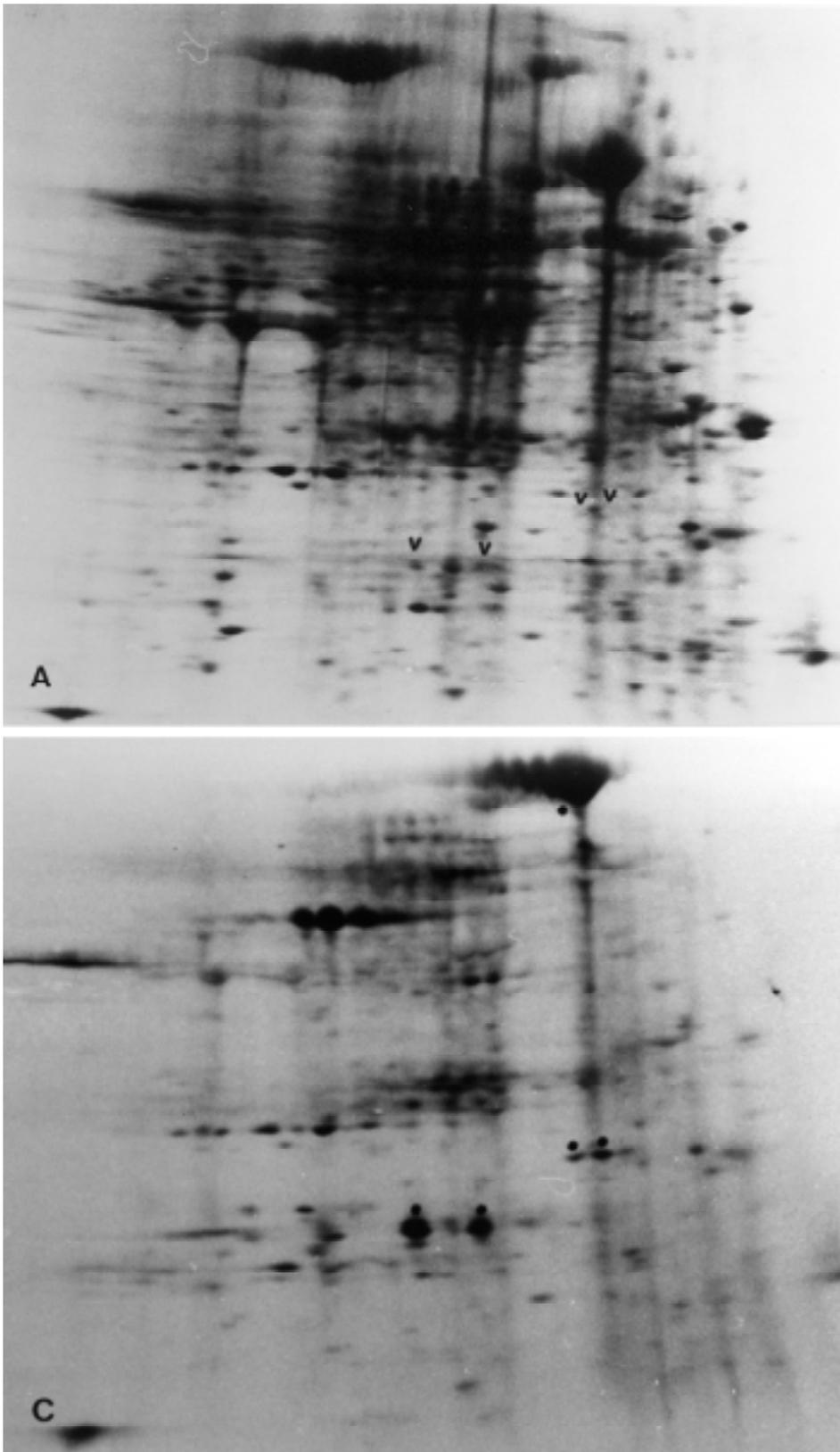


Abbildung 21: Ultrastrukturelle Veränderungen des Nukleolus in Streßsituationen. Während eines Hitzeschockes zeigt der Nukleolus aufgelockerte, dispergierende Strukturen (B und C, 24.000  $\times$ ). Bei Schwermetallstreß lassen sich keine auffallenden Veränderungen beobachten (A, 25.000  $\times$ ). n - Nukleus; nl - Nukleolus; m - Mitochondrion; rnp - Ribonukleinpartikel; w - Zellwand

Die radioaktive Markierung der während einer Streßsituation gebildeten Gesamtproteine zeigte eine stark reduzierte Synthese von sogenannten Haushaltsproteinen während eines Hitzeschockes (NEUMANN et al., 1989). Ähnliche Untersuchungen mit Zellkulturen von *Lycopersicon peruvianum*, die mit Schwermetallen inkubiert worden waren, zeigten im Gegensatz dazu ein von der Kontrolle wenig abweichendes Muster (vergleiche Abbildung 22a und 22b), das heißt die Synthese «normaler» Proteine wird durch diese Form des Stressses weitaus weniger beeinflusst als das bei einem Hitzeschock der Fall ist.



*Abbildung 22a:* Proteinsynthese in Tomatenzellkulturen. Gesamtprotein wurde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Kontrolle (A) und Hitzeschock (B).



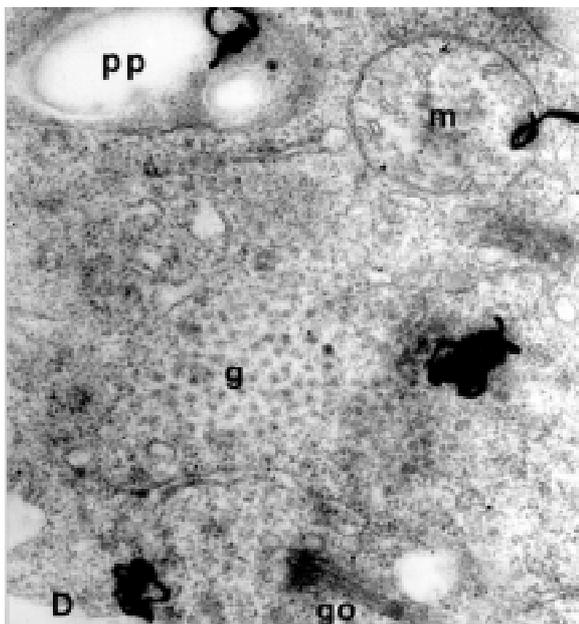
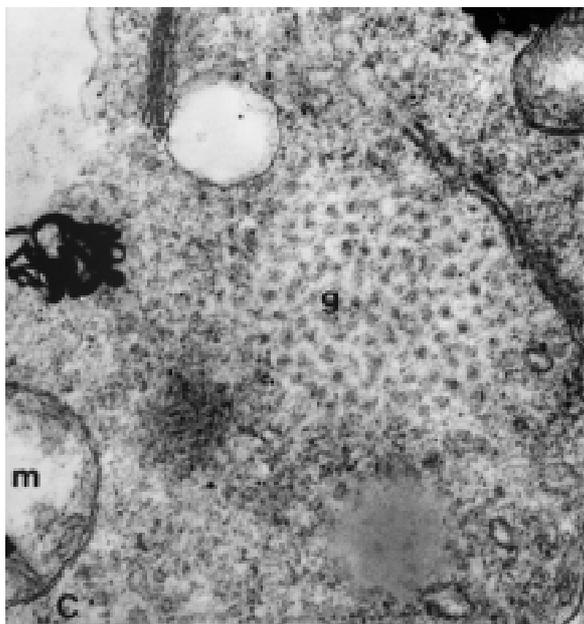
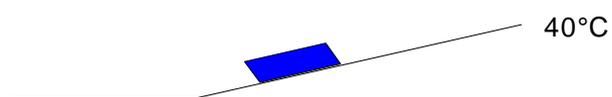
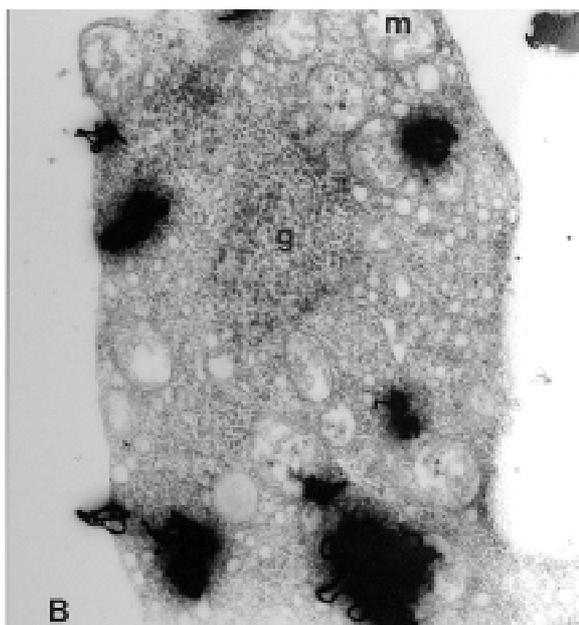
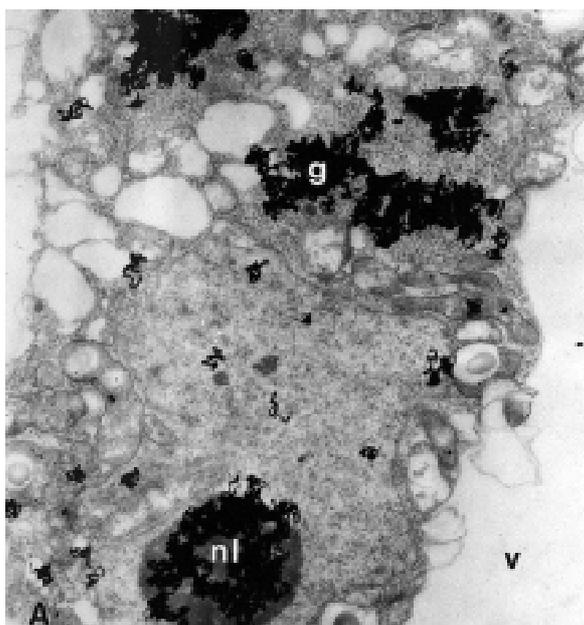
*Abbildung 22b:* Proteinsynthese in Tomatenzellkulturen. Gesamtprotein wurde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Kontrolle (A) und Schwermetallstress (C).

### **3.8 Untersuchungen zur Lokalisation von RNA in den Hitzeschockgranula**

Für die Hitzeschockantwort ist gezeigt worden, daß die in pflanzlichen Zellkulturen unter bestimmten Streßregimen beobachteten Hitzeschockgranula neben Hitzeschockproteinen (HSP17, HSP70) auch RNA enthalten (NOVER et al., 1989).

Die ursprünglichen mikroautoradiographischen Untersuchungen (NEUMANN et al., 1985) wurden wiederholt und auf den Schwermetallstreß ausgedehnt. Sie zeigten zu unserer Überraschung, daß im Falle des Schwermetallstresses keine Markierung der Hitzeschockgranula durch inkorporiertes radioaktives Uridin zu verzeichnen ist (Abbildung 23). Dies war unabhängig vom Zeitpunkt der Fütterung des radioaktiven Uridins. Die unter Schwermetallstreß gebildeten Granula enthalten also keine RNA. Das angebotene radioaktive Uridin wurde jedoch von den Zellkulturen aufgenommen und in RNA inkorporiert, was die deutliche Markierung des Nukleolus und der Organellen belegen (Abbildung 25).

Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Koloalisation von RNA und kleinen Hitzeschockproteinen ergaben kein schlüssiges Bild, obwohl sich die Granula mittels immunologischer Methoden sehr gut darstellen lassen (Abbildung 19). Eine gleichzeitige Darstellung der RNA durch Färbung mit Acridinorange und eine klare Abgrenzung dieses Signals von der Emission des FITC-Derivates ließ sich auch im konfokalen Mikroskop nicht erreichen.



 Schwermetall

 Uridin

vorhergehende Seite:

Abbildung 23: Mikroautoradiographien. Pflanzliche Zellkulturen wurden in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Uridin inkubiert. Während im Falle des Hitzeschockes eine deutliche Markierung der Hitzeschockgranula bei Gabe des Uridins vor dem Einwirken des Stressors zu beobachten ist (A - 7.200  $\times$ ; B - 18.000  $\times$ ), können die während der Schwermetallexposition gebildeten Hitzeschockgranula nicht durch die Gabe des radioaktiven Uridins markiert werden (C - 47.250  $\times$ ; D - 30.000  $\times$ ). g - Hitzeschockgranula; n - Nukleus; nl - Nukleolus; m - Mitochondrion; v - Vakuole; go - Golgiapparat; pp - Proplastid

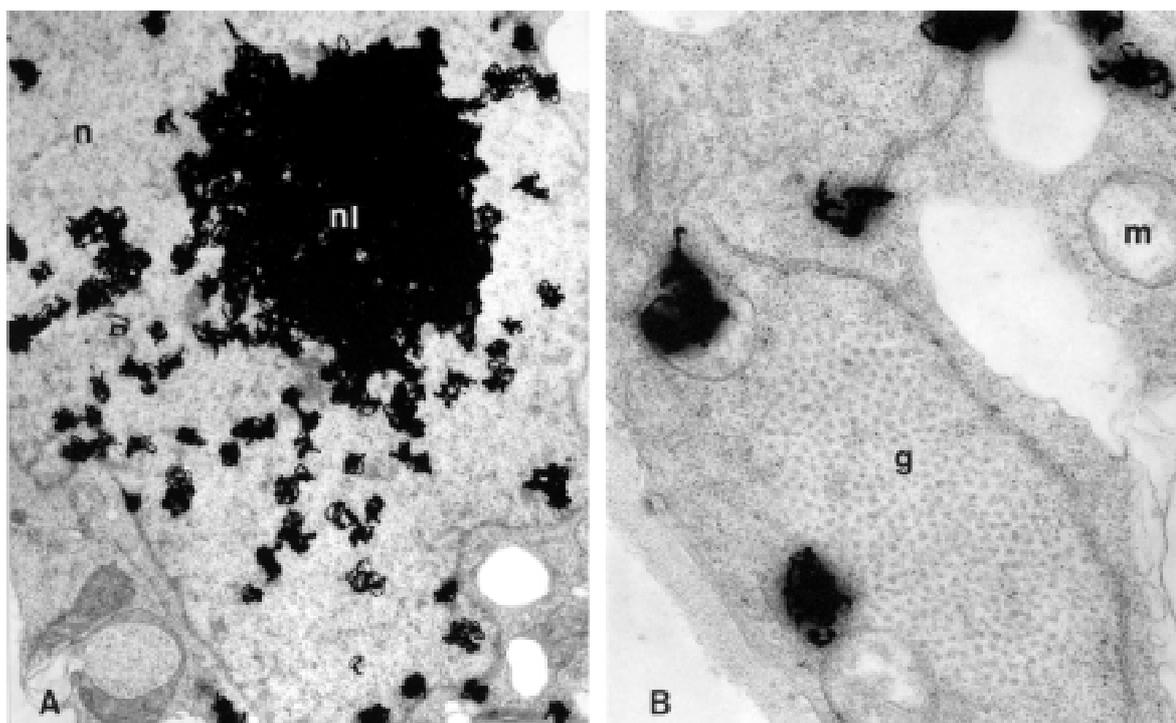


Abbildung 24: Mikroautoradiographie. Tomatenzellkulturen nehmen während eines Schwermetallstresses radioaktives Uridin auf und inkorporieren es in Nucleinsäuren. Der Nucleolus ist deutlich markiert (A - 12.000  $\times$ ), während sich die Hitzeschockgranula nicht markieren lassen (B - 30.000  $\times$ ). g - Hitzeschockgranula; n - Nucleus; nl - Nucleolus; m - Mitochondrion

### **3.9 Untersuchungen zur Signaltransduktion in Streßsituationen**

#### **3.9.1 Versuche mit ATPase-Hemmstoffen und Ionophoren**

Um mögliche Komponenten der Signaltransduktionskette im Falle des Hitzeschockes beziehungsweise des Schwermetallstressses zu identifizieren, wurden eine Reihe von Experimenten durchgeführt, in denen die Expression der kleinen Hitzeschockproteine in Streßsituationen nach gleichzeitiger Gabe von ATPase-Hemmstoffen beziehungsweise von Ionophoren untersucht wurde.

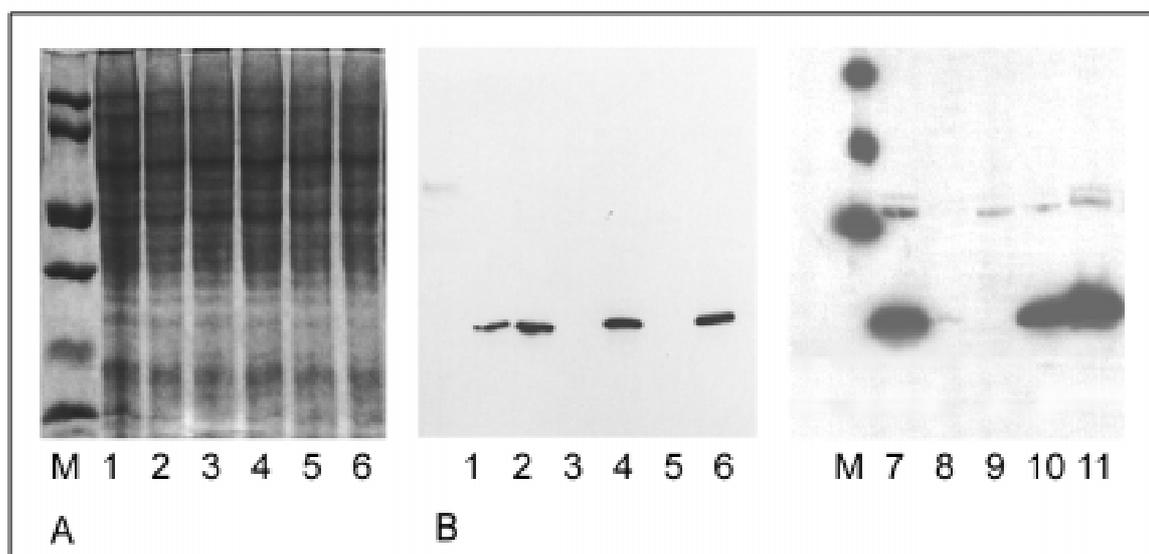
Dabei zeigte sich im Falle des Hitzeschockes die Möglichkeit der Modulation der Antwort durch die Gabe einiger der verwendeten Inhibitoren und Ionophoren (Abbildung 25). Valinomycin, ein Kalium-Ionophor, war als einziger Ionophor in der Lage, die Expression der kleinen, cytoplasmatischen Hitzeschockproteine zu blockieren. Andere Substanzen, die ebenfalls die Permeabilität der Membran für einwertige Kationen erhöhen ( $K^+$ -Ionophor II, Monensin), hatten keinen Einfluß auf die Synthese des HSP17.

Von den verwendeten ATPase-Antagonisten unterdrückten Dicyclohexylcarbodiimid und Carbonylcyanid die Expression der kleinen Hitzeschockproteine, während andere ATPase-Hemmstoffe, zum Beispiel Diethylstilbestrol und Natriumorthovanadat keine Wirkung zeigten.

Neomycinsulfat, ein Inhibitor der Polyphosphoinositidhydrolyse, hatte keinen Einfluß auf die Induktion der HSP-Synthese.

Eine Verringerung der Konzentration des extrazellulären Calciums durch den Zusatz von 10 mM EGTA oder die Gegenwart des Ionophors Calcimycin (spezifisch für divalente Kationen) hatten keinen Einfluß auf die Expression der kleinen HSPs.

Um die Reversibilität der Wirkung der Inhibitoren zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, in denen zunächst die HSP-Synthese durch die Gegenwart der jeweiligen Antagonisten gehemmt worden war. Danach wurden die Zellen gewaschen und in neues Medium überführt. Nach einer Erholungsphase wurden die Zellen wiederum den jeweiligen Stressoren, aber ohne Gegenwart von Inhibitoren, ausgesetzt. In den meisten Fällen erfolgte die Synthese der HSPs auf einem der Kontrolle vergleichbaren Niveau, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Inhibition der HSP-Synthese reversibel war und nicht die Folge einer Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen. Die Hemmstoffe in den hier applizierten Konzentrationen verringerten nicht das Wachstum oder die Überlebensrate der Zellkulturen. Diese Schlußfolgerung wurde außerdem unterstützt durch Untersuchungen zur Aufnahme und Inkorporation radioaktiv markierten Leucins in Gegenwart der Inhibitoren.



**Abbildung 25:** Wirkung von Inhibitoren und Ionophoren auf die Expression des HSP17 in Tomatenzellkulturen. A) Coomassie gefärbtes, denaturierendes Polyacrylamidgel; B) korrespondierender Western Blot mit einem polyklonalen anti-HSP17-Antikörper: 1: Hitzeschock; 2: Hitzeschock, +DMSO; 3: Hitzeschock, +DCC; 4: Hitzeschock, +K-Ionophore II; 5: Hitzeschock, +Carbonylcyanid; 6: Hitzeschock, +Vanadat; 7: Hitzeschock; 8: Hitzeschock + Valinomycin; 9: Hitzeschock +DCC; 10: Hitzeschock +Monensin; 11: Hitzeschock +EGTA; M: biotinylierter Molekulargewichtsmarker

Die analogen Versuche mit Schwermetallen und Zellkulturen von *Lycopersicon peruvianum* und *Silene vulgaris* erbrachten keine Aussagen über eine Beeinflussung der Signaltransduktionsprozesse durch die Inhibitoren, da die Zellkulturen auf die Schwermetallexposition nicht mehr mit der Expression von Hitzeschockproteinen reagierten. Offenbar hatten die Zellkulturen die Kompetenz verloren, auf diesen Stressor zu reagieren.

Vorangegangene Arbeiten, in denen Änderungen des intrazellulären pH-Wertes während des Schwermetallstress untersucht wurden, hatten jedoch gezeigt, daß die Gegenwart von Cadmiumsalzen schon nach fünf Minuten zur einer Ansäuerung des Cytosols führt (Abbildung 26).

Zusammenfassend betrachtet legen die Ergebnisse dieser Versuche den Schluß nahe, daß ATPasen und Ionenkanäle (beziehungsweise die durch sie vermittelten Ionenflüsse) offenbar an der Signalerkennung und/oder Signalwandlung beteiligt sind.

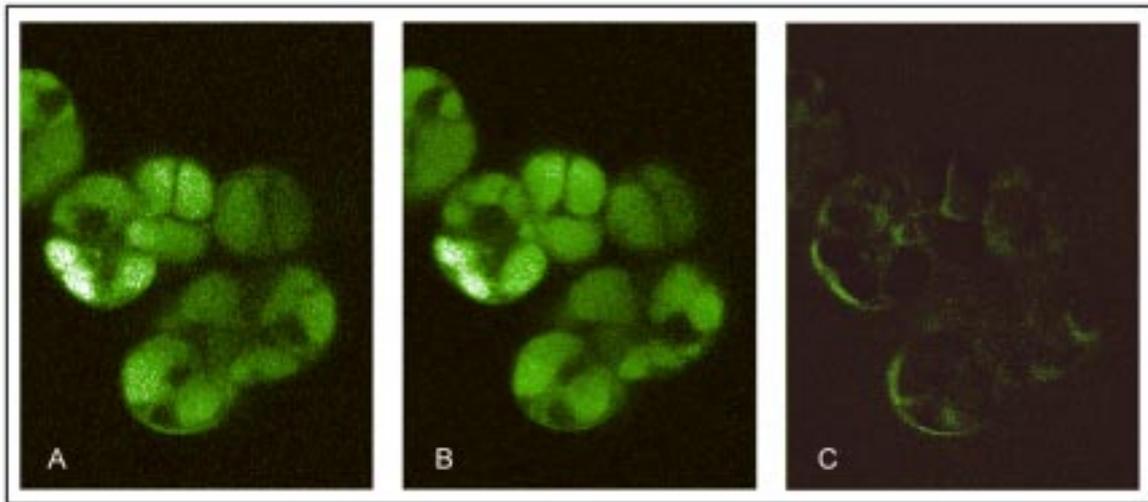


Abbildung 26: pH-Änderungen im Cytosol schwermetallgestreßter Tomatenzellen. Die Zellen wurden mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor Blue DND-192 beladen. A) Kontrolle; B) Schwermetallstreß, 5 mM CdSO<sub>4</sub>, 5 Minuten nach Applikation des Metalls; C) Differenzbild der beiden Aufnahmen (B-A). Helle Bereiche bedeuten eine pH-Wert-Erniedrigung, da sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes durch Protonierung erhöht.

## 4 Diskussion

Kleine pflanzliche Hitzeschockproteine sind, neben ihrer Expression in Streßantworten, an einer Reihe anderer Prozesse beteiligt, zum Beispiel werden sie während der Samenreifung exprimiert. Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß diese Proteine auch an Toleranzmechanismen gegen Hitze- und Schwermetallstreß beteiligt sind (NEUMANN et al., 1994; YEH et al., 1997). Die Funktion in diesen verschiedenen Situationen ist bisher wenig verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war sowohl die weitere Charakterisierung der Eigenschaften und der Funktion der kleinen cytoplasmatischen Hitzeschockproteine der Tomate *in vitro* als auch eine vergleichende Analyse der Reaktionen und Signalwandlungsprozesse pflanzlicher Zellen auf erhöhte Temperaturen beziehungsweise auf die Exposition mit Schwermetallen.

### 4.1 Eigenschaften kleiner Hitzeschockproteine der Tomate

#### i) Sequenzanalyse

Mehrere cDNAs, die für kleine, «Low Molecular Weight» Hitzeschockproteine (LMW HSP) der Wildtomate, *Lycopersicon peruvianum*, kodieren, wurden identifiziert und sequenziert. Die Analyse der Primärstrukturen der abgeleiteten Proteinsequenzen ergab eine weitgehende Übereinstimmung zu anderen Mitgliedern dieser Hitzeschockproteinfamilie, darunter eine fast 100%ige Homologie zu einem LMW HSP aus *Lycopersicon esculentum* (FRAY et al., 1990). Wie alle kleinen Hitzeschockproteine weist der C-Terminus des HSP17 der Wildtomate Ähnlichkeiten zu den  $\alpha$ -Crystallinen, den Strukturproteinen der Augenlinse, auf. Die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente und der Hydropathieplot zeigen eine große Ähnlichkeit zu den Strukturmerkmalen der anderen Mitglieder dieser Proteinfamilie aus verschiedenen Pflanzenspezies.

Obwohl die abgeleiteten Proteinsequenzen reich an basischen Aminosäuren, zum Beispiel Lysin, sind, konnten keine putativen Kernlokalisationssequenzen identifiziert werden. Die Befunde zur Lokalisation im Nukleus (WOLLGIEHN et al., 1994) lassen sich also nicht mit dem klassischen Modell des Kernimportes erklären. Es bleibt zu untersuchen, ob der Import über einen alternativen Weg oder aber zusammen mit anderen Proteinen, die ein Kernlokalisierungssignal besitzen, erfolgt. Bei der großen Affinität von HSP17 zur Bindung an andere Proteine ist das wahrscheinlich.

Im Southern Blot ließen sich sowohl in *Lycopersicon peruvianum* als auch in *Lycopersicon esculentum* mindestens sechs Kopien der entsprechenden Gene detektieren. Da Hitzeschockgene bis auf wenige Ausnahmen keine Introns enthalten und da die verwendeten Restriktionsenzyme nicht im kodierenden Bereich schneiden, kann davon ausgegangen werden, daß die Banden im Southern Blot tatsächlich einzelne Kopien von HSP17 Genen repräsentieren. Die verwendete Kulturtomate, *Lycopersicon esculentum* cv. Hellfrucht, ist diploid und somit kann angenommen werden, daß auch die Banden im Falle der eng verwandten Wildtomate, deren DNA aus Zellkulturen gewonnen worden war, nicht das Ergebnis einer Polyploidie des Ausgangsmaterials ist. Obwohl die identifizierten cDNAs Proteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten kodieren und eine Genfamilie für diese Proteine existiert, kann die Vielfalt an Isoformen, die in der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese beobachtet wird, zusätzlich auch in posttranslationalen Modifikationen der Proteine begründet liegen. Im Gegensatz zu den kleinen Hitzeschockproteinen der Säuger konnte jedoch bisher noch keine Phosphorylierung pflanzlicher kleiner Hitzeschockproteine gezeigt werden (WOLLGIEHN, unveröffentlichte Daten; SUZUKI et al., 1998). NOVER & SCHARF hatten schon 1984 gezeigt, daß das HSP17 der Tomate *in vivo* methyliert werden kann. Andere Modifikationen, zum Beispiel Glykosylierungen, die für cytosolische Proteine eine Ausnahme darstellen, wurden bisher nicht gefunden.

Einige cDNAs für HSP17 aus der Wildtomate, *Lycopersicon peruvianum*, sind von FORREITER und LOEW (1998) beschrieben worden (EMBL Identifikationsnummer LPAJ5047 entspricht Klon 92).

#### ii) Native Gelelektrophorese und Negativkontrastierung

In Tomatenzellkulturen werden nach einem Hitzeschock große Proteinkomplexe, bestehend aus HSP17, gebildet. Die native Gelelektrophorese dieser Oligomere ergab ein Molekulargewicht von etwa 200.000 Dalton, das entspricht einer Zusammensetzung aus 12 Monomeren.

In Pflanzen (*Lycopersicon esculentum*) dagegen konnte nach zweistündigem Hitzestress zwar eine schwache Bande im Coomassie gefärbten Gel identifiziert werden, allerdings zeigte diese im korrespondierenden Western Blot keine Kreuzreaktivität mit dem anti-HSP17-Serum. Da die Bedingungen eines solchen Gels und des Blottens nicht identisch mit dem denaturierenden System sind, ist ein direkter Vergleich schwierig. In Zellkulturen werden sehr viel größere Mengen an Hitzeschockproteinen gebildet als in differenzierten, älteren Geweben, sodaß geringe Mengen des Komplexes eventuell nicht nachweisbar

waren. Die Bedingungen des Hitzeschocks in einer Zellkultur sind besser definiert und reproduzierbarer.

Das Vorhandensein anderer Komponenten, zum Beispiel weiterer Proteine oder Nucleinsäuren, in diesen Komplexen konnte durch die hier verwendeten Methoden nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings ist in anderen Arbeiten (BENNDORF et al., 1994; LEE et al., 1995, KIM et al., 1998) gezeigt worden, daß sowohl pflanzliche als auch tierische, rekombinante kleine Hitzeschockproteine solche Multimere bilden, bei denen es sich in den daraufhin untersuchten Fällen immer um Homooligomere handelte. Selbst sehr ähnliche, cytoplasmatische kleine Hitzeschockproteine aus der Erbse, *Pisum sativum*, bildeten *in vitro* keine Heterooligomere (HELM et al., 1997).

Die Aussagen über die Stöchiometrie und Symmetrie dieser Komplexe sind jedoch widersprüchlich. Nach unseren Untersuchungen besteht das Multimer aus Tomatenzellkulturen aus 12 Untereinheiten. Das befindet sich in Einklang mit anderen Arbeiten über cytoplasmatische pflanzliche kleine Hitzeschockproteine (LEE et al., 1995). Für das plastidäre HSP21 der Erbse wurde jedoch eine Zusammensetzung aus neun Untereinheiten vorgeschlagen (SUZUKI et al., 1998) und die Angaben für die nativen Komplexe anderer kleiner Hitzeschockproteine schwanken beträchtlich. So gaben CHANG et al. für ein HSP16.3 aus *Mycobacterium tuberculosis* neun Untereinheiten an (1996), während KIM et al. (1998) für das Multimer aus *Methanococcus jannaschii* in einer kristallographischen Untersuchung eine Zusammensetzung aus 24 Monomeren zeigten. Auch die kleinen Hitzeschockproteine und das  $\alpha$ -Crystallin der Säuger formen große Oligomere, die im Falle des  $\alpha$ -Crystallins aus 32 Untereinheiten bestehen (HALEY et al., 1998).

Die vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen liefern keine eindeutigen Aussagen über die Größe der Multimere, da die beobachteten Komplexe zu uneinheitlich waren, um daraus eine Größenverteilung abzuleiten oder eine statistische Auswertung der Bilder vorzunehmen. Außerdem kann die Dehydrierung der Proteine bei der Negativkontrastierung zu Artefakten führen. Für das  $\alpha$ -Crystallin konnte gezeigt werden, daß Negativkontrastierung und Kryoelektronenmikroskopie unterschiedliche Ergebnisse liefern (HALEY et al., 1998).

## 4.2 Charakterisierung der Hitzeschockgranula, ultrastruktureller Vergleich verschiedener Streßsituationen

### i) Elektronenmikroskopische Untersuchungen

In pflanzlichen Zellen werden sowohl bei Hitzestreß als auch bei Schwermetallexposition Hitzeschockgranula gebildet. Ultrastrukturell sind keine Unterschiede nachweisbar, wenn man von der Größe und Häufigkeit der Komplexe in der Zelle absieht. Hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung sind die Granula in beiden Fällen sehr ähnlich. Sie enthalten neben HSP17 und HSP70 eine Reihe weiterer cytosolischer Proteine. Frühere autoradiographische Untersuchungen hatten ergeben, daß nach Fütterung von  $^3\text{H}$ -Uridin die Granula nur dann markiert waren, wenn das Uridin vor dem Hitzestreß angeboten wurde (NEUMANN et al., 1984). Das spricht für die Speicherung von RNA, möglicherweise mRNA für Haushaltsproteine, in den Granula. Nach Isolierung von RNA aus den Granula und *in vitro* Translation wurde ein Proteinmuster erhalten, das dem der Haushaltsproteine sehr ähnelt (NOVER et al., 1989). Während einer Recovery-Phase oder während eines lang anhaltenden Hitzestresses bilden sich in der Nähe der Granula rauhes Endoplasmatisches Retikulum, Polysomen und Golgiapparate, was für eine intensive Proteinsynthese in den Zellen spricht (Abbildung 20). Offenbar schützt die Verpackung in den Granula die Haushalts-mRNA vor einem Abbau während des Hitzestresses. Bei Rückkehr zur Normaltemperatur oder während eines lang anhaltenden Hitzestresses steht die RNA für die Synthese lebenswichtiger Proteine unmittelbar zur Verfügung.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Hitzeschock und Schwermetallexposition besteht darin, daß nach Schwermetallstreß die Granula keine mRNA enthalten (Abbildung 23). Die Bildung von rauhen Endoplasmatischen Retikulum, Polysomen und Golgiapparaten während des Recovery unterbleibt. Der Nukleolus, der unter Hitzeschockbedingungen dispergiert, behält während des Schwermetallstress seine normale Ultrastruktur und Integrität (Abbildung 21).

Auch Transkription und Translation von Haushaltsproteinen sind nicht wesentlich inhibiert. Im Gegensatz zum Hitzeschock wird der normale Ribosomensatz der Zelle nicht abgebaut und die Assemblierung der Ribosomen im Nukleolus läuft weiter. Run on Assays mit Kernen schwermetallgestreßter Zellen haben außerdem gezeigt, daß die Transkription und Prozessierung der ribosomalen RNA nicht beeinflusst ist (WOLLGIEHN & NEUMANN, 1995). Unter den Bedingungen des Schwermetallstress besteht kein Bedarf für die Speicherung von mRNA in den Streßgranula.

Diese Ergebnisse zeigen, daß trotz offensichtlich sehr ähnlicher Reaktionen, wie Induktion von Hitzeschockproteinen und Bildung von Hitzeschockgranula, die Zellen sehr

unterschiedlich auf die Stressoren Hitze und Schwermetall reagieren. Es ist nicht anzunehmen, daß die Hitzeschockgranula nur auf Grund der starken Protein-Protein-Wechselwirkung der kleinen Hitzeschockproteine entstehen. Unter bestimmten Bedingungen, zum Beispiel nach kurzzeitigem Hitzestreß oder während der Samenentwicklung bleiben die kleinen Hitzeschockproteine löslich im Cytoplasma und bilden keine Komplexe.

Beide Formen des Stressses führen, wenn auch durch unterschiedliche Mechanismen, zu einer Denaturierung von Proteinen. Die Denaturierung durch Schwermetalle beziehungsweise Hitzestress kann unterschiedliche Proteine betreffen. Schwermetalle reagieren besonders mit Proteinen, die Cysteinreste enthalten und sind so in der Lage, andere, essentielle Ionen ( $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{+}$ ) aus Enzymen zu verdrängen. Die Denaturierung von Membranproteinen kann zu Membranschäden führen.

Eine naheliegende Interpretation der Rolle der Hitzeschockgranula in der Zelle ergibt sich im Lichte der wachsenden Befunde über die Chaperoneigenschaften der Hitzeschockproteine (LEE et al., 1995; BOSTON et al., 1996; HARTL, 1996). Da Chaperone an einer Vielzahl von Faltungsprozessen beteiligt sind, bei denen ihre Funktion im Schutz exponierter hydrophober Bereiche, in der Verhinderung unerwünschter Aggregationen und in der Aufrechterhaltung faltungskompetenter Konformationen besteht, ist es vorstellbar, daß die kleinen Hitzeschockproteine in diesen beiden Streßsituationen ähnliche Funktionen, jedoch wahrscheinlich mit anderen Partnern oder «Substraten» erfüllen. Für eine Chaperonwirkung scheint das Zusammenspiel von mehreren Hitzeschockproteinen (vergleiche GLOVER & LINDQUIST, 1998) und offenbar anderen, bisher nicht identifizierten Proteinen Voraussetzung zu sein. Die Granula könnten einen solchen Komplex darstellen, der durch das Zusammenwirken von Hitzeschockproteinen mit anderen Proteinen die Renaturierung von durch Hitze und Schwermetalle geschädigten Proteinen bewirkt. Der Schutz von Haushalts-mRNA im Falle des Hitzeschocks ist offenbar eine weitere, spezielle Funktion, die nur diese Form des Stressses betrifft. Die Suche nach den Substraten *in vivo* bleibt eine wichtige Aufgabe für die Aufklärung der Funktion kleiner Hitzeschockproteine in verschiedenen Streßsituationen.

Da die *in vivo* Funktion der kleinen Hitzeschockproteine methodisch nur schwer zugänglich war, wurden alternative Wege gesucht. Eine Möglichkeit wäre die Suche nach Mutanten oder der Versuch einer Hemmung der Expression der kleinen Hitzeschockproteine, zum Beispiel durch Antisense-Pflanzen oder durch die Expression von single chain Antikörpern gegen kleine Hitzeschockproteine, um so die freie Konzentration des HSP17 deutlich zu verringern.

Die Konstruktion transgener Antisense-Pflanzen ist wenig aussichtsreich, da Southern Analysen zeigten, daß die Tomate, wie alle bisher untersuchten höheren Pflanzen, eine Reihe von Genen enthält, die für kleine Hitzeschockproteine kodieren. Eine wirksame Repression aller Isoformen kleiner cytoplasmatischer HSPs erscheint daher wenig aussichtsreich. In Tomate (BUCKA, 1993) und *Arabidopsis* (SCHÖFFL, persönliche Mitteilung) waren solche Versuche nicht erfolgreich. Außerdem können offenbar andere Hitzeschockproteine die Funktion der ausgeschalteten Proteine übernehmen, wie in Hefe für das HSP104 gezeigt worden ist. In diesem Falle wird die Funktion von HSP70 übernommen (SANCHEZ et al., 1993).

Nach der Expression eines rekombinanten HSP17 im heterologen *Escherichia coli* System standen ausreichende Mengen an Protein für eine weitere biochemische Charakterisierung und für die Suche nach möglichen Interaktionspartnern *in vitro* zur Verfügung.

Die Synthese kleiner Hitzeschockproteine erfolgt nicht nur in Streßsituationen, sondern auch während bestimmter Entwicklungsphasen, zum Beispiel in reifenden Samen (ZUR NIEDEN et al., 1995). Dabei werden die Hitzeschockproteine gleichzeitig mit den Speicherproteinen gebildet und in Proteinbodies abgelagert. Die kleinen Hitzeschockproteine können immunhistochemisch mit diesen in den Proteinbodies kolokalisiert werden. Deshalb wurde eine mögliche Bindung an Tabakglobulin, Vicilin und Legumin untersucht.

Eine Reihe von Blot-Overlay-Assays sind für den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgreich angewendet worden (HOFFMANN & CELIS, 1994; CRAWFORD & BECKERLE, 1994). *In vitro* konnte aber keine Wechselwirkung des rekombinanten HSP17 mit Speicherproteinen gezeigt werden.

Unter geringer Stringenz durchgeführte Northwestern-Assays (Blot-Overlay-Assays mit RNA) waren nicht in der Lage, einen Nachweis für eine *in vitro* Bindung von RNA durch das rekombinante HSP17 zu erbringen.

Diese Systeme sind jedoch artifiziell, da denaturierende Bedingungen zur elektrophoretischen Auftrennung der Speicherproteine notwendig waren und da im Falle der Wechselwirkung mit RNA das rekombinante HSP17 auch mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt worden war. Allerdings konnte auch keine Bindung des nativen rekombinanten Proteins an auf Nylonmembranen immobilisierte RNA nachgewiesen werden. Es könnte sein, daß eine spezifische Konformation des HSP17 in den Granula oder erst das Zusammenwirken mit anderen Proteinen eine RNA-Bindung ermöglicht. Außerdem läßt sich mit diesen Assays die Möglichkeit einer *in vivo* Bindung nicht ausschließen.

Von JAKOB et al. (1993) war gezeigt worden, daß kleine Hitzeschockproteine, in diesem speziellen Falle unter anderem das humane HSP27, in *in vitro* Assays als Chaperone wirken können.

Die nach den von BUCHNER et al. (1991) entwickelten Methoden durchgeführten Chaperonassays zeigten, daß rekombinantes HSP17 in der Lage ist, Citrat Synthase vor einer Aggregation bei erhöhten Temperaturen zu schützen. Die Schutzfunktion war konzentrationsabhängig und das HSP17 konnte nicht durch Rinderserumalbumin ersetzt werden. Obwohl Citrat Synthase sicher nicht das natürliche Substrat ist, zeigen diese Versuche, daß eine *in vitro* Wechselwirkung des rekombinanten HSP17 mit anderen Proteinen möglich ist.

Nicht in allen der verwendeten Assays wirkt HSP17 als Chaperon. So ist es nicht in der Lage, chemisch denaturierte Citrat Synthase wieder in eine funktionelle, aktive Form zurückzufalten.

Die Arbeiten von FORREITER et al. (1997) lieferten erstmals in einem pflanzlichen *in vivo* System, einer stabil transformierten Zellkultur, Beweise für eine tatsächliche Chaperonfunktion der kleinen HSPs in der Zelle. Da in diesen Versuchen Luciferase als Testprotein verwendet wurde, ist es aber auch hiermit nicht möglich, Aussagen über die natürlichen Substrate der kleinen HSPs zu treffen.

#### **4.3 Untersuchungen zur Signaltransduktion: Hemmstoffe, Ionophoren und In Gel Kinase Assays**

In Run on Experimenten mit isolierten Kernen war HSP17-mRNA sowohl bei Hitzeschock als auch bei Schwermetallstreß schon nach zwei bis fünf Minuten nachweisbar (WOLLGIEHN & NEUMANN, 1995). Bis zu diesem Zeitpunkt ließ sich aber noch keine Aufnahme von Schwermetallen in die Zelle nachweisen. Eine direkte Wirkung von Schwermetallen auf die Genexpression ist daher unwahrscheinlich. Deshalb war bei der Suche nach Komponenten, die an der Signalerkennung und -wandlung im Falle der Reaktion auf die Gegenwart von Schwermetallen beteiligt sind, davon ausgegangen worden, daß die Erkennung des Signals an oder in der Zellmembran erfolgt. Für den Hitzestreß gibt es eine Reihe von Untersuchungen zur Signaltransduktion (vergleiche NOVER, 1991). In Vertebraten sind zum Beispiel Veränderungen der Calciumkonzentrationen (LANDRY et al., 1988) beobachtet worden. In Hefe wurde eine Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes gezeigt (WEITZEL et al., 1985). Allerdings läßt sich bisher kein einheitliches Modell der Signalübertragung formulieren.

Neben den hier genauer untersuchten Stressoren Hitze und Schwermetalle sind eine Vielzahl anderer Effektoren, zum Beispiel denaturierte Proteine, oxidativer Streß, veränderte Polyaminkonzentrationen in der Lage, die Synthese von Hitzeschockproteinen zu induzieren. Beim Hitzestreß ist es auch vorstellbar, daß eine Erkennung des Signals «Hitze» sowohl an der Membran, deren Fluidität verändert wird, als auch intrazellulär durch denaturierte Proteine und Beeinflussung von enzymatischen Reaktionen, erfolgt. Für den Fall der Hitzeschockantwort war schon vor einigen Jahren eine Rolle des cytosolischen HSP70 als molekulares Thermometer (CRAIG & GROSS, 1991) vorgeschlagen worden.

Unsere Untersuchungen mit Antagonisten von ATPasen, Ionophoren und EGTA als einem potenten Chelator extrazellulären Calciums ergaben zunächst überraschend den Befund, daß die Expression der kleinen Hitzeschockproteine, die als Marker für eine erfolgreiche Streß-Signaltransduktion in den Zellkulturen verwendet wurden, im Falle des Hitzeschockes durch einige der Inhibitoren und Ionophoren beeinflusst wurde. Das bedeutet, daß ATPasen und Ionenkanäle offenbar an der Erkennung und Wandlung des Signals im Falle des Hitzestresses beteiligt sind.

In Zellkulturen von *Lycopersicon peruvianum* und *Silene vulgaris* hatte Valinomycin als einziger Ionophor Einfluß auf die Expression kleiner Hitzeschockproteine.

Die beiden ATPase-Inhibitoren Carbonylcyanid und Dicyclohexylcarbodiimid waren ebenfalls in der Lage, die Synthese kleiner HSPs zu blockieren. Das Wachstum der Zellkulturen war bei den verwendeten Konzentrationen nicht eingeschränkt.

Nicht alle Ionophoren beziehungsweise ATPase-Antagonisten konnten die Synthese der kleinen Hitzeschockproteine beeinflussen. Dies gilt auch für Ionophoren mit der gleichen Ionenselektivität (vergleiche zum Beispiel  $K^+$ -Ionophor II und Valinomycin). Das liegt möglicherweise an den verwendeten Hemmstoffkonzentrationen beziehungsweise an der unterschiedlichen Löslichkeit der Inhibitoren in der wäßrigen Nährlösung. Für die Stammlösungen wurde DMSO als Lösungsmittel benutzt, da die meisten Inhibitoren nicht in Wasser löslich sind. Es ist durchaus möglich, daß sie in der Nährlösung trotz der hohen Verdünnung wieder ausfielen und somit gar nicht wirksam werden konnten.

Die Hemmung durch Carbonylcyanid, Dicyclohexylcarbodiimid und Valinomycin war reversibel, das heißt nach dem Auswaschen des Hemmstoffes und einer Erholungsphase erfolgte mit der Synthese kleiner Hitzeschockproteine wieder eine Reaktion auf den Stressor Hitze.

Diese Daten legen den Schluß nahe, daß die Erkennung des Signals Hitze in der Zellmembran stattfindet und daß an der Signalwandlung ATPasen und Ionenkanäle beziehungsweise die durch diese bewirkten pH- und Membranpotential-Änderungen

beteiligt sind. Da aber ATPasen auch am Transport einwertiger Kationen und an der Ansäuerung des Cytosols beteiligt sind, können alle beobachteten Effekte einen einzigen Bestandteil der Signaltransduktionskette betreffen. Es ist vorstellbar, daß durch Ionophoren nur Veränderungen aufgehoben werden, die durch die Aktivierung von ATPasen erreicht wurden. In diesem Zusammenhang wäre es aufschlußreich, die Änderung des intrazellulären pH-Wertes auch in Gegenwart von Inhibitoren zu verfolgen. Die Modulation der Hitzeschockreaktion durch diese Hemmstoffe wurde sowohl bei Zellkulturen von *Lycopersicon peruvianum* als auch bei Zellkulturen von *Lycopersicon esculentum* beobachtet.

Aussagen über weitere Komponenten, die an der Übertragung des Signals Hitze beteiligt sind, konnten nicht getroffen werden. Die Aktivierung von MAP-Kinasen in Pflanzen wurde als Antwort auf Pathogene, Verwundung und Trockenstreß gezeigt (WILSON et al., 1997; SEO et al., 1995; BÖGRE et al., 1997; SUZUKI & SHINSHI, 1995). Wir haben in In-Gel-Assays keine aktivierten MAP-Kinasen gefunden. In tierischen Systemen sind durch Hitzestreß aktivierte MAP-Kinase-Kaskaden beschrieben worden (DUBOIS & BENSUADE, 1993, SEGER & KREBS, 1995; ENGEL et al., 1995). In Pflanzen wurde eine durch Hitzeschock inaktivierte MAP-Kinase beschrieben (HEIDER et al., 1998). Die Aktivität von MAP-Kinasen wird also auch in pflanzlichen Systemen in der Antwort auf Hitzestreß reguliert.

Unter Schwermetallstreß zeigen Zellkulturen von Tomate schon nach fünf Minuten eine Ansäuerung des cytosolischen pH-Wertes. Woher die Protonen stammen und welche Membranen dafür verantwortlich sind, kann aus diesen Daten nicht geschlossen werden. Zeitlich spätere Versuche mit ATPase-Hemmstoffen und Ionophoren haben zu keinem Ergebnis geführt, da die Zellkulturen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr mit der Synthese von Hitzeschockproteinen auf den Schwermetallstreß reagierten.

Die Untersuchung der Kulturen mit elektronenmikroskopisch-analytischen Methoden (EDX, EELS) ergab, daß sie beträchtliche Mengen an Kupfer und Zink im Cytoplasma akkumulieren. Diese liegen weit über den physiologischen Konzentrationen. Die Zellkulturen sind offenbar einem Schwermetalldauerstreß ausgesetzt. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Schwermetallexposition nur eine temporäre Expression von HSP17 während der ersten Stunden bewirkt (WOLLGIEHN & NEUMANN, 1999). Das könnte das Ausbleiben der HSP-Synthese in diesen adaptierten Zellkulturen erklären.

## 5 Zusammenfassung

Die Synthese zahlreicher kleiner, Low Molecular Weight (LMW) Hitzeschockproteine ist ein charakteristisches Merkmal der Hitze- und Schwermetallstressantwort pflanzlicher Systeme. Die weitere Charakterisierung dieser Proteine, ihre Funktion *in vitro* und *in vivo* und die Suche nach möglichen Interaktionspartnern waren Gegenstand dieser Arbeit. Außerdem sollte die Signalerkennung in den verschiedenen Stresssituationen untersucht werden.

Das Genom der Wildtomate enthält, wie das anderer höherer Pflanzen, eine Reihe von Genen, die für kleine, cytoplasmatische Hitzeschockproteine kodieren. Das Screening einer Expressions-cDNA Bank der Wildtomate mit einem polyklonalen Antiserum gegen kleine HSPs der Tomate ergab eine Anzahl positiver Klone, von denen vier vollständig sequenziert wurden. Die abgeleiteten Proteinsequenzen zeigen, daß es sich um Vertreter der Klasse I der cytoplasmatischen Low Molecular Weight (LMW) Hitzeschockproteine handelt, die eine hohe Homologie zu einem HSP17 der Kulturtomate und zu anderen Vertretern dieser Gruppe aufweisen.

Eine der cDNAs (Klon 92) wurde für die Expression des rekombinanten Proteins in *Escherichia coli* genutzt. Das rekombinante Protein wurde verwendet, um in *in vitro* Tests Bindungspartner zu suchen und die Chaperoneigenschaften des Proteins zu prüfen.

- Blot-Overlay-Assays und GST-Pull-Down-Assays zeigten keine Wechselwirkung mit Speicherproteinen von Tabak und Leguminosen.
- In modifizierten Blot-Overlay-Assays (Northwestern) wurde keine spezifische Bindung von RNA gefunden.
- Das rekombinante Protein ist in der Lage, Citrat Synthase vor einer Aggregation und vor einer thermischen Inaktivierung zu schützen. Es ist aber allein nicht ausreichend, das chemisch denaturierte Enzym wieder korrekt zu falten. Andere Arbeiten zeigen, daß es dafür weiterer Chaperone und anderer Proteine bedarf.

Das HSP17 der Tomate wird sowohl unter Hitzestress als auch während einer Schwermetalleinwirkung exprimiert. Nach einem Hitzeschock läßt es sich als Multimer aus 12 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von circa 200 kDa isolieren. In Tomatenzellen bilden sich nach Hitze- beziehungsweise Schwermetallstress große cytoplasmatische Komplexe, sogenannte Hitzeschockgranula, die zu einem großen Teil aus HSP17, anderen HSPs und cytosolischen Proteinen bestehen. Obwohl äußerlich ähnlich, sind sie funktionell verschieden. Während die Granula im Falle eines Hitzeschocks mRNA speichern, konnte gezeigt werden, daß sie bei Schwermetallstress

keine RNA enthalten. Auffällig waren auch strukturelle Unterschiede in der Recovery-Phase und nach einem länger andauernden Streß: in hitzestressierten Zellen bilden sich rauhes ER und Golgiapparate in der Nähe der aufgelockerten Granula, während in schwermetall-exponierten Zellen nur eine Auflösung zu beobachten ist. Hitzeschock hat dramatische Auswirkungen auf Struktur und Funktion des Nukleolus, im Gegensatz dazu bewirken Schwermetalle in Tomatenzellkulturen keine strukturellen Veränderungen. Das ist in Übereinstimmung mit Daten zur Expression beziehungsweise Prozessierung ribosomaler RNA. Beide Prozesse sind nur im Falle des Hitzestresses gehemmt. Die Synthese der Haushaltsproteine ist bei Schwermetall-exposition, im Unterschied zum Hitzeschock, kaum eingeschränkt.

Diese Daten zeigen, daß trotz der strukturellen Homologie funktionelle Unterschiede zwischen den Hitzeschockgranula bestehen. Eine Speicherung von mRNA ist unter Schwermetallstreß ohne Bedeutung für die Zelle, unter Hitzestreß möglicherweise eine Notwendigkeit für das Überleben der Zelle. Die unter Schwermetallstreß gebildeten Granula könnten dem Schutz und/oder der Rückfaltung denaturierter Proteine dienen. *In vitro* Assays zeigen eine Chaperonwirkung, wenn auch mit diesen Tests nichts über die natürlichen Substrate ausgesagt werden kann. Das Vorkommen weiterer Hitzeschockproteine (zum Beispiel HSP70) und anderer bisher nicht identifizierter Proteine macht aber eine Funktion der Granula als Faltungsmaschinerie wahrscheinlich.

Die Untersuchungen zur Signaltransduktion in den beiden Streßsituationen legen nahe, daß bei Hitzestreß ATPasen und Ionenkanäle (oder die durch ATPasen bewirkten Ionenflüsse) an der Übertragung des Signals Hitze beteiligt sind. Offenbar erfolgt die Rezeption des Signals an der Plasmamembran.

In schwermetall-exponierten Zellen konnte bereits nach fünf Minuten eine Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes beobachtet werden. In späteren Untersuchungen an schwermetall-gestressierten Zellkulturen wurde keine Expression der kleinen Hitzeschockproteine, die als Marker für eine erfolgte Signaltransduktion dienen, gefunden. Analytische Elektronenmikroskopie zeigte, daß die Zellen ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Kupfer und Zink enthielten, deren Herkunft bisher unklar ist. Offenbar befanden sich die Zellen in einem Dauerstreß und exprimierten keine HSPs mehr, da dies nur eine transiente Reaktion darstellt.

## 6 Literatur

1. Abraham, D. J. und Leo, A. J.(1987) Extension of the fragment method to calculate amino acid zwitterion and side chain partition coefficients. *Proteins* **2**: 130-152.
2. Agard, D. A. (1993) To Fold or Not to Fold.... *Science* **260**: 1903-1904.
3. Altschul, S. F., Boguski, M. S., Gish, W. und Wootton, J. C.(1994) Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genetics* **6**:119-129.
4. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.(1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-10.
5. Amano, M., Toyoda, K., Ichinose, Y., Yamada, T. und Shiraishi, T. (1997) Association between Ion Fluxes and Defense Response in Pea and Cowpea Tissues. *Plant Cell Physiol.* **38**: 698-706
6. Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K. und Sturgill, T. W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**: 651-653.
7. Appel, R. D., Bairoch, A. und Hochstrasser, D. F. (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 258-260.
8. Arrigo, A. P. und Welch, W. J. (1987) Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **262**: 15359-15369.
9. Ausubel, F. M. (Ed.) (1994-1997) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York.
10. Bairoch, A. und Apweiler, R.(1998) The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1998. *Nucleic Acids Res.* **26**: 38-42.
11. Bardwell, J., und Craig, E. (1984) Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat inducible DnaK gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 848-852.
12. Becker, J. und Craig, A. (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* **219**: 11-23.
13. Beissinger, M. und Buchner, J. (1998) How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* **379**: 245-259.

14. Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J. und Lutsch, G. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 20780-20784.
15. Bertsch, U., Soll, J., Seetharam, R., und Viitanen, P. V. (1992) Identification, characterization, and DNA sequence of a functional "double" groES-like chaperonin from chloroplasts of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8696-8700.
16. Bögre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P. J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N. S. und Hirt, H. (1997) Wounding Induces the Rapid and Transient Activation of a Specific MAP Kinase Pathway. *Plant Cell* **9**: 75-83.
17. Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J. und Lindquist, S. (1989) Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3919-3930.
18. Boston, R. S., Viitanen, P. V. und Vierling, E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* **32**: 191-222.
19. Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F. X. und Kiefhaber, T. (1991) GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry* **30**: 1586-1591.
20. Bukau, B. und Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
21. Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., Fitzgerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. M. und Venter, J. C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-73.
22. Cano, E. und Mahadevan, L. C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 117-122.
23. Carranco, R., Almoguera, C. und Jordano, J. (1997) A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *J. Biol. Chem.* **272**: 27470-27475.
24. Chang, C. und Stewart, R. C. (1998) The Two-Component System. *Plant Physiol.* **117**: 723-731.

25. Chang, Z., Primm, T. P., Jakana, J., Lee, I. H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H. F. und Quiocho, F. A. (1996) *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. *J. Biol. Chem.* **271**: 7218-7223.
26. Chen, Q., Osteryoung, K. und Vierling, E. (1994) A 21-kDa chloroplast heat shock protein assembles into high molecular weight complexes *in vivo* and *in Organelle*. *J. Biol. Chem.* **269**: 13216-13223.
27. Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E. M., Hallberg, R. L. und Horwich, A. L. (1989) Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* **337**: 620-625.
28. Chin, D. T., Goff, S. A., Webster, T., Smith, T. und Goldberg, A. L. (1988) Sequence of the lon gene in *Escherichia coli*: a heat-shock gene which encodes the ATP-dependent protease La. *J. Biol. Chem.* **263**: 11718-11728.
29. Christensen, A. H., Sharrock, R. A. und Quail, P. H. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* **18**: 675-689.
30. Christensen, A. H., und Quail, P. H. (1989) Sequence analysis and transcriptional regulation by heat shock of polyubiquitin transcripts from maize. *Plant Mol. Biol.* **12**: 619-632.
31. Clarens, M., Macario, A. J. L. und de Macario, E. C. (1995) The Archaeal dnaK-dnaJ Gene Cluster: Organization and Expression in the Methanogen *Methanosarcina mazei*. *J. Mol. Biol.* **250**: 191-201.
32. Clarke, A. K. und Eriksson, M. J. (1996) The cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 possesses a close homologue to the chloroplast ClpC protein of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **31**: 721-730.
33. Clarke, A. K., und Critchley, C. (1992) The Identification of a Heat-Shock Protein Complex in Chloroplasts of Barley Leaves. *Plant Physiol.* **100**: 2081-2089.
34. Coca, M. A., Almoguera, C. und Jordano, J. (1994) Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Mol. Biol.* **25**: 479-492.

35. Coleman, J. S., Heckathorn, S. A. und Hallberg, R. L. (1995) Heat-shock proteins and thermotolerance: linking molecular and ecological perspectives. *Trends Ecol. Evol.* **10**, 305-306.
36. Collier, N. C., Heuser, J., Levy, M. A. und Schlesinger, M. J. (1988) Ultrastructural and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* **106**: 1131-1139.
37. Conner, T. W., LaFayette, P. R., Nagao, R. T. und Key, J. L. (1990) Sequence and expression of a HSP83 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **94**: 1689-1695.
38. Craig, E. A. (1993) Chaperones: Helpers Along the Pathways to Protein Folding. *Science* **260**: 1902-1903.
39. Craig, E. A., und Gross, C. A. (1991) Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.* **16**: 135-139.
40. Csermely, P., Kajtar, J., Hollosi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C. R., Gergely Jr., P., Soti, C., Mihaly, K. und Somogyi, J. (1993) ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J Biol Chem* **268**: 1901-1907.
41. Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. und Nardai, G. (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* **79**: 129-168.
42. Cyr, D. M., Langer, T. und Douglas, M. G. (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 176-181.
43. Davis, R. J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **268**: 14553-14556.
44. de Macario, E. C. und Macario, A. J. L. (1994) Heat-shock response in Archaea. *Trends Biochem. Sci.* **12** 512-518.
45. DeRocher, A. und Vierling, E. (1994) Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *Plant J.* **5**: 93-102.
46. Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Stetter, K. O., Huber, H., Huber, R. und Steinbacher, S. (1998) Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT *Cell* **93**: 125-138
47. Djabali, K., Denechaud, B., Landon, F. und Portier, M. M. (1997) alpha B-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J. Cell Sci.* **110**: 2759-2769.
48. Dubois, M. F. und Bensaude, O. (1993) MAP kinase activation during heat shock in quiescent and exponentially growing mammalian cells. *FEBS Lett.* **324**: 191-195

49. Durner, J. und Boger, P. (1995) Ubiquitin in the prokaryote *Anabaena variabilis*. *J. Biol. Chem.* **270**: 3720-3725.
50. Ellis, R. J. (1994) Chaperoning nascent proteins. *Nature* **370**: 96-97.
51. Ellis, R. J. (1994) Molecular chaperones. Opening and closing the Anfinsen cage. *Curr. Biol.* **4**: 633-635.
52. Ellis, R. J., und van der Vies, S. M. (1991) Molecular Chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 321-347.
53. Engel, K., Ahlers, A., Brach, M. A., Herrmann, F. und Gaestel, M. (1995) MAPKAP kinase 2 is activated by heat shock and TNF-alpha: in vivo phosphorylation of small heat shock protein results from stimulation of the MAP kinase cascade. *J. Cell. Biochem.* **57**: 321-30
54. Etzold, T., Ulyanov, A. und Argos, P. (1996) SRS: Information Retrieval System for Molecular Biology Data Banks. *Methods in Enzymology* **266**: 114-128.
55. Forreiter, C., Kirschner, M. und Nover, L. (1997) Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity *in vivo*. *Plant Cell* **9**: 2171-2181.
56. Fray, R. G., Lycett, G. W. und Grierson, D. (1990) Nucleotide sequence of a heat-shock and ripening-related cDNA from tomato. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7148.
57. Freudenreich, A. und Nick, P. (1998) Microtubular organization in tobacco cells: heat shock protein 90 can bind to tubulin *in vitro*. *Bot. Acta* **111**: 1-7.
58. Frydman, J., Nimmegern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J. S., Tempst P. und Hartl, F. U. (1992) Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J* **11**: 4767-4778.
59. Gabarino, J. E., Rockhold, D. R., und Belknap, W. R. (1992) Expression of stress-responsive ubiquitin genes in potato tubers. *Plant Mol. Biol.* **20**: 235-244.
60. Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Casjens, S. R. und Kaiser, A. D. (1973) Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.* **76**: 45-60.
61. Georgopoulos, C. (1992) The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 295-299.
62. Gibbon, B. C. und Kropf, D. L. (1993) Intracellular pH and its regulation in *Pelvetia* zygotes. *Dev. Biol.* **157**: 259-68.
63. Glover, J. R. und Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82.

64. Goldberg, A. L. (1995) Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science* **268**: 522-523.
65. Gottesman, S., Clark, W. P. und Maurizi, M. R. (1990) The ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence of clpA and identification of a Clp-specific substrate. *J. Biol. Chem.* **265**: 7886-7893.
66. Grill, E., Winnacker, E. L. and Zenk, H. (1985) Phytochelatins, the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**, 674-678.
67. Groenen, P. J. T. A., Merck, K. B., de Jong, W. W. und Bloemendal, H. (1994) Structure and modifications of the junior chaperone  $\alpha$ -crystallin. From lens transparency to molecular pathology. *Eur. J. Biochem.* **225**: 1-19.
68. Gupta, R. S. und Singh, B. (1992) Cloning of the HSP70 gene from *Halobacterium marismortui*: relatedness of archaeobacterial HSP70 to its eubacterial homologs and a model for the evolution of the HSP70 gene. *J. Bacteriol* **174**: 4594-4605.
69. Haley, D. A., Horwitz, J. und Stewart, P. L. (1998) The small heat-shock protein, alpha B-crystallin, has a variable quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **277**: 27-35.
70. Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding *Nature* **381**: 571-579.
71. Hartmann, D. J., Dougan, D., Hoogenraad, N. J., und Hoj, P. B. (1992) Heat shock proteins of barley mitochondria and chloroplasts. Identification of organellar hsp10 and 12: putative chaperonin 10 homologues. *FEBS Lett.* **305**: 147-150.
72. Heider, H., Boscheinen, O. und Scharf, K.-D. (1998) A Heat-Stress Pulse Inactivates a 50 kDa Myelin Basic Protein Kinase in Tomato. *Bot. Acta* **111**: 398-401.
73. Helm, K. W., Lee, G. J. und Vierling, E. (1997) Expression and Native Structure of Cytosolic Class II Small Heat-Shock Proteins. *Plant Physiol.* **114**: 1477-1485.
74. Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., und Dennis, D. T. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**: 330-334.
75. Hendrick, J. P. und Hartl, F.-U. (1993) Molecular Chaperone Functions of Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 349-384.
76. Heytler, P. G. (1963) Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Carbonl Cyanide Phenylhydrazones. I. Some Characteristics of m-Cl-CCP Action on Mitochondria and Chloroplasts. *Biochemistry* **2**: 357-361.

77. Heytler, P. G. und Prichard, W. W. (1962) A New Class of Uncoupling Agents - Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**: 272-275.
78. Hightower, L. E. (1991) Heat Shock, Stress Proteins, Chaperones, and Proteotoxicity. *Cell* **66**: 1-7.
79. Horwich, A. L., Low, K. B., Fenton, W. A., Hirshfield, I. N., und Furtak, K. (1993) Folding *In Vivo* of Bacterial Proteins: Role of GroEL. *Cell* **74**: 909-917.
80. Horwitz, J. (1992)  $\alpha$ -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**: 10449-10453.
81. Hsieh, M.-H., Chen, J.-T., Jinn, T.-L., Chen, Y.-M., und Lin, C.-Y. (1992) A Class of Soybean Low Molecular Weight Heat Shock Proteins. *Plant Physiol.* **99**: 1279-1284.
82. Huang, L. S. und Berry, E. A. (1990) Purification and characterization of the proton translocating plasma membrane ATPase of red beet storage tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1039**: 241-252.
83. Ibelgaufts, H. (1990) *Gentechnologie von A bis Z*. Verlag Chemie, Weinheim.
84. Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T. und Kato, K. (1997) Phosphorylation of alpha B-crystallin in response to various types of stress. *J. Biol. Chem.* **272**: 29934-29941.
85. Jaenicke, R. (1996) How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability?. *Naturwissenschaften* **83**: 544-554.
86. Jakob, U. und Buchner, J. (1994): Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 205-211.
87. Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., und Buchner, J. (1993) Small Heat Shock Proteins Are Molecular Chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1517-1520.
88. Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. und Buchner, J. (1995) Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**: 7288-7294.
89. Janin, J. (1979) Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* **277**: 491-492.
90. Kelley, W. L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power *Trends Biochem. Sci.* **23**: 222-227.
91. Kim, K. K., Kim, R. und Kim, S. H. (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**: 595-599.

92. Kim, K. K., Yokota, H., Santoso, S., Lerner, D., Kim, R. und Kim, S. H. (1998) Purification, crystallization, and preliminary x-ray crystallographic data analysis of small heat shock protein homolog from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *J. Struct. Biol.* **121**: 76-80.
93. Klumpp, M. und Baumeister, W. (1998) The thermosome: archetype of group II chaperonins *FEBS Lett* **430**: 73-77.
94. Klumpp, M., Baumeister, W. und Essen, L. O. (1997) Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin *Cell* **91**: 263-270.
95. Koning, A. J., Rose, R., und Comai, L. (1992) Developmental Expression of Tomato Heat-Shock Cognate Protein 80. *Plant Physiol.* **100**: 801-811.
96. Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203-209.
97. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
98. LaFayette, P. R., Nagao, R. T., O'Grady, K., Vierling, E. und Key, J. L. (1996) Molecular characterization of cDNAs encoding low-molecular-weight heat shock proteins of soybean. *Plant Mol. Biol.* **30**: 159-169.
99. Landry, J., Crete, P., Lamarche, S. und Chretien, P. (1988) Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent processes during heat shock: role in cell thermoresistance. *Radiat. Res.* **113**: 426-36.
100. Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A. und Anderson, C. W. (1992) Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J. Biol. Chem.* **267**: 794-803.
101. Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W. und Hartl, F. U. (1992) Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity *EMBO J* **11**: 4757-4765
102. Larsen, J. K., Yamboliev, I. A., Weber, L. A. und Gerthoffer, W. T. (1997) Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *Amer. J. Physiol.-Lung Cell. M. Ph.* **17**: L930-L940.

103. Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D., und Finch, J. T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**: 416-420.
104. Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A. und Landry, J. (1993) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* **268**: 24210-24214.
105. Lee, G. J. (1995) Assaying proteins for molecular chaperone activity *Methods Cell Biol.* **50**: 325-334
106. Lee, G. J., Pokala, N. und Vierling, E. (1995) Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**: 10432-10438.
107. Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. R. und Vierling, E. (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state *EMBO J* **16**: 659-671.
108. Lee, J. H., Hübel, A. und Schöffl, F. (1995) Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* **8**: 603-612.
109. Legendre, L., Yueh, Y. G., Crain, R., Haddock, N., Heinsteins, P. F. und Low, P. S. (1993) Phospholipase C Activation during Elicitation of the Oxidative Burst in Cultured Plant Cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 24559-24563.
110. Leonhardt, S. A., Fearson, K., Danese, P. N. und Mason, T. L. (1993) HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6304-6313.
111. Lindquist, S. und Craig, E. A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
112. Luan, S. (1998) Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends Plant Sci.* **3**: 271-275.
113. Luan, S., Albers, M. W. und Schreiber, S. L. (1994a) Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 984-988.
114. Luan, S., Lane, W. S. und Schreiber, S. L. (1994b) pCyP B: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean. *Plant Cell* **6**: 885-892.
115. Madhani, H. D. und Fink, G. R. (1998) The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet.* **14**: 151-155.

- 
116. Marrs, K. A., Casey, E. S., Capitant, S. A., Bouchard, R. A., Dietrich, P. S., Mettler, I. J. und Sinibaldi, R. M. (1993) Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis, and pollen development. *Dev. Genet.* **14**: 27-41.
117. Mayhew, M., Da Silva, A. C., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Hartl, F. U. (1996) Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex *Nature* **379**: 420-426.
118. McKersie, B. D. und Leshem, Y. Y. (1994) Heat stress. In: *Stress and stress coping in cultivated plants*. Kluwer, Dordrecht: 181-193
119. Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Munoz-Blanco, J. und Caballero, J. L. (1998) Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Mol. Biol.* **36**: 33-42.
120. Miernyk, J. A. (1997) The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends Plant Sci.* **2**: 180-187.
121. Mizoguchi, T., Ichimura, K. und Shinozaki, K. (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol.* **15**: 15-19.
122. Moore, T. und Keegstra, K. (1993) Characterization of a cDNA clone encoding a chloroplast-targeted Clp homologue. *Plant Mol. Biol.* **21**: 525-537.
123. Morimoto, R. I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**: 1409-1410.
124. Morimoto, R. I., Tissieres, A. und Georgopoulos, C. (1994) Progress and Perspectives on the Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: 1-36.
125. Netzer, W. J. und Hartl, F. U. (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 68-73.
126. Neumann, D., Nover, L., Parthier, B., Rieger, R., Scharf, K. D., Wollgiehn, R. und zur Nieden, U. (1989) Heat shock and other stress response systems of plants *Results Probl. Cell Differ.* **16**: 1-155.
127. Neumann, D., Scharf, K. D. und Nover, L. (1984) Heat shock induced changes of plant cell ultrastructure and autoradiographic localization of heat shock proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **34**: 254-264.

128. Neumann, D., Scharf, K. D. und Nover, L. (1985) Hitzeschock und Ultrastruktur pflanzlicher Zellen. *Biol. Rdsch.* **23**: 201-206.
129. Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K. und Nover, L. (1994) Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* **194**: 360-367.
130. Nover, L. (ed.). (1984). *Heat Shock Response of Eukaryotic Cells*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
131. Nover, L. (1990a) Molekulare Zellbiologie der Hitzestreßantwort, Teil I. *Naturwissenschaften* **77**: 310-316.
132. Nover, L. (1990b) Molekulare Zellbiologie der Hitzestreßantwort, Teil II. *Naturwissenschaften* **77**: 359-365.
133. Nover, L. (1991) *Heat Shock Response*. CRC Press, Boca Raton.
134. Nover, L. und L. Hightower (1991) Heat shock and development. Introduction. *Results Probl. Cell Differ.* **17**: 1-4.
135. Nover, L. und Scharf, K.D. (1984) Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur. J. Biochem.* **139**: 303-313.
136. Nover, L. und Scharf, K. D. (1997) Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**: 80-103.
137. Nover, L., Munsche, D., Neumann, D., Ohme, K. und Scharf, K. D. (1986) Control of ribosome biosynthesis in plant cell cultures under heat-shock conditions. Ribosomal RNA *Eur. J. Biochem.* **160**: 297-304.
138. Nover, L., Neumann, D., und Scharf, K.-D. (eds.) (1989) *Heat Shock und Other Stress Response Systems of Plants*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
139. Nover, L., Scharf, K. D. und Neumann, D. (1983) Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1648-1655.
140. Nover, L., Scharf, K.-D., und Neumann, D. (1989) Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and contain a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1298-1308.
141. O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
142. Ostersetzer, O., Tabak, S., Yarden, O., Shapira, R. und Adam, Z. (1996) Immunological detection of proteins similar to bacterial proteases in higher plant chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **236**: 932-936.

143. Parsell, D. A., Sanchez, Y., Stitzel, J. D. und Lindquist, S. (1991) Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* **353**: 270-273.
144. Pearson, W. R. (1990) Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA *Methods in Enzymology* **183**: 63- 98.
145. Pechan, P. M. (1991) Heat shock proteins und cell proliferation. *FEBS Lett.* **280**: 1-4.
146. Petko, L. und Lindquist, S. (1986) HSP26 is not Required for Growth at High Temperatures, nor for Thermotolerance, Spore Development, or Germination. *Cell* **45**: 885-894.
147. Petrasek, J., Freudenreich, A., Heuing, A., Opatrny, Z. und Nick, P. (1998) Heat-shock protein 90 is associated with microtubules in tobacco cells. *Protoplasma* **202**: 161-174.
148. Phipps, B. M., Hoffmann, A., Stetter, K. O. und Baumeister, W. (1991) A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *EMBO J.* **10**: 1711-1722.
149. Posada, J., Sanghera, J., Pelech, S., Aebersold, R. und Cooper, J. A. (1991) Tyrosine phosphorylation and activation of homologous protein kinases during oocyte maturation and mitogenic activation of fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2517-2528.
150. Pressman, B. C. (1976) Biological Applications of Ionophores. *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 501-530.
151. Qin, W., Smith, J. B. und Smith, D. L. (1992) Rates of carbamylation of specific lysyl residues in bovine alpha- crystallins. *J. Biol. Chem.* **267**: 26128-26133.
152. Rassow, J., Ahsen, O. von, Böhmer, U. und Pfanner, N. (1997) Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends Cell Biol.* **7**: 129-133.
153. Richardson, A., Landry, S. J. und Georgopoulos, C. (1998) The ins and outs of a molecular chaperone machine. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 138-143.
154. Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-573.
155. Robinson, D. G. (1981) The ionic sensitivity of secretion-associated organelles in root cap cells of maize. *Eur. J. Cell Biol.* **23**: 267-272.

- 
156. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. und Nebreda, A. R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**: 1027-1037.
157. Roy, H. (1989) Rubisco assembly: a model system for studying the mechanism of chaperonin action. *Plant Cell* **1**: 1035-1042.
158. Sachs, J. (1864) Über die obere Temperatur-Grenze der Vegetation. *Flora* **47**: 5-12.
159. Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989, 2nd ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
160. Sanchez, Y. und Lindquist, S. L. (1990) HSP104 required for induced thermotolerance *Science* **248**: 1112-1115
161. Sanchez, Y., Parsell, D. A., Taulien, J., Vogel, J. L., Craig, E. A. und Lindquist, S. (1993) Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J. Bacteriol.* **175**: 6484-6491.
162. Scharf, K. D., Rose, S., Zott, W., Schöffl, F. und Nover, L. (1990) Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF. *EMBO J.* **9**: 4495-4501.
163. Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. und Lindquist, S. (1996) HSP100/Cip proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 289-296.
164. Schmitt, M., Neupert, W. und Langer, T. (1995) Hsp78, a Cip homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *EMBO J.* **14**: 3434-3444.
165. Schmitz, G., Schmidt, M. und Feierabend, J. (1996) Characterization of a plastid-specific HSP90 homologue: identification of a cDNA sequence, phylogenetic descendance and analysis of its mRNA and protein expression. *Plant Mol. Biol.* **30**: 479-492.
166. Schöffl, F., Baumann, G. und Raschke, E. (1988) The Expression of Heat Shock Genes - A Model for Environmental Stress Response. In Verma, D. P. S. und Goldberg, R. B. (Eds.) *Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*. Springer-Verlag, Wien, New York: 253-273.
167. Schöffl, F., Prandl, R. und Reindl, A. (1998): Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.* **117**: 1135-1141.

168. Schwarz, E. und Neupert, W. (1994) Mitochondrial protein import: mechanisms, components and energetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**: 270-274.
169. Seger, R. und Krebs, E. G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**: 726-35
170. Selye, H. (1984) Streß - mein Leben. Fischer-Taschenbuch-Verlag, Frankfurt/Main.
171. Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H. und Ohashi, Y. (1995) Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* **270**: 1988-1992.
172. Seufert, W. und Jentsch, S. (1992): *In vivo* function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J.* **11**: 3077-3080.
173. Shanklin, J., DeWitt, N. D. und Flanagan, J. M. (1995) The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* **7**: 1713-1722.
174. Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D. und Reeve, J. N. (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH*: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**: 7135-7155.
175. Smulders, R. H. P. H., van Boekel, M. A. M. und de Jong, W. W. (1998) Mutations and modifications support a 'pitted-flexiball' model for  $\alpha$ -crystallin. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**: 187-196.
176. Solioz, M. (1984) Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **8**: 309-312.
177. Sorger, P. K. (1991) Heat Shock Factor and the Heat Shock Response. *Cell* **65**: 363-366.
178. Spence, J., und Georgopoulos, C. (1989) Purification and Properties of the *Escherichia coli* Heat Shock Protein, HtpG. *J. Biol. Chem.* **264**: 4398-4403.
179. Squires, C. L., Pedersen, S., Ross, B. M. und Squires, C. (1991) ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* **173**: 4254-4262.
180. Stoesser, G., Moseley, M. A., Sleep, J., McGowran, M., Garcia-Pastor, M. und Sterk, P. (1998) The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* **26**: 8-15.

181. Stratmann, J. W. und Ryan, C. A. (1997) Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 11085-11089.
182. Suzuki, T. C., Krawitz, D. C. und Vierling, E. (1998) The chloroplast small heat-shock protein oligomer is not phosphorylated and does not dissociate during heat stress *in vivo*. *Plant Physiol.* **116**: 1151-1161.
183. Sykes, K., Gething, M. J. und Sambrook, J. (1993) Proline isomerases function during heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**: 5853-5857.
184. Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
185. Tissieres, A., Mitchell, H. K., und Tracy, U. M. (1974.) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**: 389-398.
186. Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**: 4350-4354.
187. Trent, J. D., Kagawa, H. K., Yaoi, T., Olle, E. und Zaluzec, N. J. (1997) Chaperonin filaments: the archaeal cytoskeleton? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 5383-5388.
188. Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishishama, R. und Machida, Y. (1995) Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 8660-8664.
189. van Tubergen, R.P. (1961) The use of radioautography and electron microscopy for the localization of tritium label in bacteria. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 219-22.
190. Vara, F. und Serrano, R. (1982) Partial purification and properties of the proton-translocating ATPase of plant plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **257**: 12826-12830.
191. Varshavsky, A. (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 383-387.
192. Verkleij, J. A. C. und Schat, H. (1990) Mechanisms of Metal Tolerance in Higher Plants. In: Shaw, A. J. (Ed.) *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press: 179-193.

- 
193. Vierling, E. (1990). Heat Shock Proteins. Function and Expression in Plants. In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. Wiley-Liss: 357-375.
194. Vierling, E. (1991) The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* **42**: 579-620.
195. Wagner, I., Arlt, H., Dyck, L. van, Langer, T und Neupert, W. (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* **13**: 5135-5145.
196. Wang, K. und Spector, A. (1996)  $\alpha$ -crystallin stabilizes actin filaments and prevents cytochalasin-induced depolymerization in a phosphorylation-dependent manner. *Eur. J. Biochem.* **242**: 56-66.
197. Waters, E. R., Lee, G. J. und Vierling, E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**: 325-338.
198. Wehmeyer, N., Hernandez, L. D., Finkelstein, R. R. und Vierling, E. (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* **112**: 747-757.
199. Weissman, J. S., Rye, H. S., Fenton, W. A., Beechem, J. M. und Horwich, A. L. (1996) Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* **84**: 481-490.
200. Weitzel, G., Pilatus, U. und Rensing, L. (1985) Similar dose response of heat shock protein synthesis and intracellular pH change in yeast. *Exp. Cell Res.* **159**: 252-256.
201. Welch, W. J. und J. P. Suhan (1985) Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol.* **101**: 1198-1211.
202. Welch, W. J. und Feramisco, J. R. (1985) Disruption of the three cytoskeletal networks in mammalian cells does not affect transcription, translation, or protein translocation changes induced by heat shock. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1571-1581.
203. Welch, W. J. und Feramisco, J. R. (1985): Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1229-1237.

204. Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K. und Maurizi, M. R. (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12218-12222.
205. Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. und Jakob, U. (1992) Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature* **358**: 169-170.
206. Wilson, C., Voronin, V., Touraev, A., Vicente, O. und Heberle-Bors, E. (1997) A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* **9**: 2093-2100.
207. Wolf, S., Lottspeich, F. und Baumeister, W. (1993) Ubiquitin found in the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett.* **326**: 42-44.
208. Wollgiehn, R., Neumann, D., zur Nieden, U., Müsch, A., Scharf, K.-D. und Nover, L. (1994) Intracellular Distribution of Small Heat Stress Proteins in Cultured Cells of *Lycopersicon esculentum*. *J. Plant Physiol.* **144**: 491-499.
209. Wollgiehn, R. und Neumann, D. (1995) Stress Response of Tomato Cell Cultures to Toxic Metals and Heat Shock: Differences and Similarities. *J. Plant Physiol.* **146**: 736-742.
210. Wollgiehn, R. und Neumann, D. (1999) Metal Stress Response and Tolerance of Cultured Cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: Role of Heat Stress Proteins. *J. Plant Physiol.*, in Druck.
211. Wu, C. (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 441-469.
212. Xu, Z., Yang, S. und Zhu, D. (1997) GroE assists refolding of recombinant human pro-urokinase. *J. Biochem. (Tokyo)* **121**: 331-337.
213. Yaffe, M. B., Farr, G. W., Miklos, D., Horwich, A. L., Sternlicht, M. L. und Sternlicht, H. (1992) TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* **358**: 245-248.
214. Yeh, C. H., Chang, P. F., Yeh, K. W., Lin, W. C., Chen, Y. M. und Lin, C. Y. (1997) Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10967-10972.
215. Yeh, K. W., Jinn, T. L., Yeh, C. H., Chen, Y. M. und Lin, C. Y. (1994) Plant low-molecular-mass heat-shock proteins: their relationship to the acquisition of thermotolerance in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**: 41-49.

216. Zoeger, D., Beyersmann, D., Rensing, L., und Hagemann, M. (1992) Streßverarbeitung in der Zelle. *Naturwiss. Rundsch.* **45**: 9-16.
217. Zur Nieden, U., Neumann, D., Bucka, A., und Nover, L. (1995) Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta* **196**: 530-538.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 1994 bis Dezember 1998 in der Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie des Institutes für Pflanzenbiochemie Halle angefertigt.

Herrn Dr. D. Neumann möchte ich für die Überlassung des Themas, anregende Diskussionen und kritische Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Den Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenbiochemie Halle gebührt Dank für die Hilfe bei der Einarbeitung in vielfältige Methoden, für das Interesse an meiner Arbeit und für ein angenehmes Arbeitsklima. Besonders Frau U. Andreas bin ich zu Dank verpflichtet für die Einführung in die Kunst der elektronenmikroskopischen Präparation. Frau B. Werner und Frau K. Ohme danke ich für ihre unermüdliche Geduld mit den pflanzlichen Zellkulturen. Herrn Dr. O. Lichtenberger bin ich dankbar für viele anregende Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und ermuntert haben.

Meinen Freunden bin ich zutiefst dankbar für ihre Unterstützung, Aufmunterung und Anregungen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale, Dezember 1998

Alexander Bucka

Lebenslauf

## Persönliches

Alexander Bucka  
geboren am 29. April 1967 in Halle/Saale  
ledig  
deutsch

## Ausbildung

Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1988-1993)  
Studienschwerpunkte: molekulare Biologie und Genetik, Genetic Engineering, Stressphysiologie, Biochemie der Pflanzen  
Abschluß mit dem Diplom, Prädikat «Sehr gut»  
  
Erweiterte Oberschule "Karl Marx" Halle (1983-1985), Abitur 1985, Prädikat "Ausgezeichnet"

Polytechnische Oberschule Halle-Neustadt (1973-1983)

## Praktische Qualifizierung

Arbeit am Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung für Streß- und Entwicklungsbiologie, seit Januar 1994

Teilnahme am EMBO Short Course «In Situ Hybridization in Plants» in Wageningen, Niederlande, November 1995

Diplomarbeit im Institut für Pflanzenbiochemie Halle, 1993, Thema: "Charakterisierung genomischer HSP 68-Clone"

Laborpraktikum am Department of Biochemistry, University of the Witwatersrand, Johannesburg, Südafrika (August bis Oktober 1992)

Laborpraktikum im Institut für Pflanzenbiochemie (Dezember 1991 bis Februar 1992 und Februar/März 1991)

Tätigkeit als gärtnerische Hilfskraft in der Gärtnerei des Institutes für Biochemie der Pflanzen der Akademie der Wissenschaften der DDR (August 1985 bis Oktober 1986 und Mai bis August 1988)

Wehrdienst

Nationale Volksarmee (November 1986 bis April 1988)