

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Fakultät für Chemie  
Lehrstuhl für Biotechnologie

# **Hsp12: Funktion und Struktur eines nativ ungefalteten Proteins aus *S. cerevisiae***

Sylvia Welker

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Chr. F. W. Becker

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Die Dissertation wurde am 24.09.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und wurde durch die Fakultät für Chemie am 23.11.2009 angenommen.

*„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“*

Galileo Galilei

**Für meine Eltern.**

1. Einleitung .....	5
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
1.2. Die Stressantwort in <i>S. cerevisiae</i> .....	5
1.3. Die Zellhülle von <i>S. cerevisiae</i> .....	12
1.3.1. Die Plasmamembran .....	12
1.3.2. Die Lipidzusammensetzung von <i>S. cerevisiae</i> .....	13
1.3.3. Die Zellwand .....	17
1.4. Die Hitzeschockproteine (Hsps) in <i>S. cerevisiae</i> .....	22
1.4.1. Hsp110-Familie .....	23
1.4.2. Hsp90-Familie .....	24
1.4.3. Hsp70-Familie .....	24
1.4.4. Hsp60-Familie .....	25
1.4.5. Hsp40-Familie .....	25
1.4.6. Kleine Hitzeschockproteine .....	25
1.5. Nativ entfaltete Proteine .....	26
1.6. Hsp12 aus <i>S. cerevisiae</i> .....	31
1.7. Fragestellung .....	33
2. Material und Methoden .....	36
2.1. Materialien .....	36
2.1.1. Chemikalien .....	36
2.1.2. Größenstandards und Kits .....	38
2.1.3. Proteine und Antikörper .....	38
2.1.4. Chromatographiematerialien .....	39
2.1.5. Sonstige Materialien .....	39
2.1.6. Geräte .....	39
2.1.7. Computerprogramme .....	42
2.2. Verwendete Organismen und deren Kultivierung .....	42
2.2.1. Stämme .....	42
2.2.2. Medien .....	43
2.2.3. Kultivierung und Konservierung von <i>Escherichia coli</i> .....	45
2.2.4. Kultivierung und Konservierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	45
2.2.5. Temperatur Screen .....	46
2.2.6. Alterung von Hefezellen (Aging) .....	46
2.3. Molekularbiologische Arbeitstechniken .....	46

2.3.1. Plasmide .....	46
2.3.2. Oligonukleotide .....	50
2.3.3. Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	51
2.3.4. Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	53
2.3.5. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	53
2.3.6. Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese .....	53
2.3.7. DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	53
2.3.8. Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten .....	54
2.3.9. DNA-Sequenzanalyse.....	54
2.3.10. Transformation von <i>E.coli</i> .....	54
2.3.11. Lithiumacetat-Methode zur Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	54
2.3.12. PCR-Amplifikation.....	55
2.3.13. DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme.....	56
2.3.14. Dephosphorylierung von DNA-Enden .....	56
2.3.15. Ligieren von DNA-Fragmenten .....	57
2.4. Proteinanalytische Arbeitstechniken.....	57
2.4.1. Lösungen für proteinchemische Methoden .....	57
2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	58
2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)...	58
2.4.4. Färbung nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971) .....	59
2.4.5. Immunoblotting (Western Blot).....	59
2.4.6. Herstellung von Small unilamellar Vesicles (SUV).....	60
2.4.7. Interaktionsanalysen mittels Differentialkalorimetrie (DSC) .....	60
2.4.8. Interaktionsanalyse mittels isothermischer Titrationskalorimetrie (ITC) ...	61
2.5. Chromatographie.....	62
2.5.1. Ionenaustauschchromatographie.....	62
2.5.2. Gelfiltrationschromatographie .....	63
2.6. Präparative Methoden .....	63
2.6.1. Zellaufschluss .....	63
2.6.2. Proteinexpressionsnachweis in Hefe .....	63
2.6.3. Aufkonzentrierung und Dialyse von Proteinen .....	64
2.6.4. Reinigung von Hsp12 und Hsp12-Fragmenten aus <i>E. coli</i> .....	64
2.6.5. Protease Verdau .....	65
2.7. Spektroskopie.....	65

2.7.1. UV-Absorptionsspektroskopie und Bestimmung der Proteinkonzentration .....	65
2.7.2. Fluoreszenzpolarisation und Probenvorbereitung .....	67
2.7.3. Circular dichroismus Spektroskopie .....	68
2.7.3.1. Fern-UV und Nah-UV CD-Spektroskopie .....	69
2.7.3.2. Thermischer Denaturierungsübergang mit CD-Spektroskopie .....	70
2.7.4. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) .....	71
2.7.5. Festkörper (Solid State) NMR .....	72
2.7.6. Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugation mittels analytischer Ultrazentrifugation (SV-AUZ) .....	72
2.7.7. Fluoreszenz-Anisotropie .....	73
2.7.8. Membranfluiditätsmessungen .....	73
2.7.9. Farbstoffaufnahmeexperimente durch Durchflusszytometrie (FACS) .....	73
2.8. Mikroskopie .....	74
2.8.1. Phasenkontrastmikroskopie .....	74
2.8.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	74
2.8.3. Transmission Elektronen Mikroskopie (TEM) .....	75
2.9. Lokalisationsstudien .....	75
2.9.1. Subzelluläre Fraktionierung im Saccharosedichtegradienten .....	75
2.9.2. Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation .....	76
2.9.3. Organellenpräparation .....	77
2.9.4. Importversuche .....	77
2.10. Lipidanalyse .....	78
2.10.1. Probenvorbereitung für die Massenspektrometrische Lipidanalyse .....	78
2.10.2. Lipidanalytik mittels ESI-MS/MS und Gas-Chromatographie .....	79
2.11. GeneChip .....	80
2.11.1. RNA Isolation .....	80
2.11.2. Microarray Assay .....	80
2.11.3. Microarray Datenanalyse .....	80
2.12. Synthetischer Lethalitätsscreen .....	81
3. Ergebnisse .....	82
3.1. Hsp12 entscheidet über das Überleben von <i>S. cerevisiae</i> .....	82
3.2. Die HSP12-Deletion verursacht eine veränderte Zellmorphologie .....	84
3.3. Die Verteilung von Hsp12 in der Zelle .....	84

3.4. Genauerer Lokalisation von Hsp12 in der Zelle.....	85
3.5. Importversuche mit Hsp12.....	86
3.5.1. Translokation von Hsp12 durch die Plasmamembran lebender Hefezellen .....	86
3.5.2. Import von Hsp12 in „Large-Unilamellar Vesicles“ (LUVs).....	88
3.6. Hsp12 ist ein intrinsisch ungefaltetes Protein, das durch Lipid-Interaktion Struktur annimmt.....	89
3.7. Hsp12, ein helikales Protein.....	92
3.8. Die $\alpha$ -helikalen Domänen von Hsp12 sind für die Membraninteraktionen essentiell.....	97
3.9. Hsp12 verändert die Lipidzusammensetzung von Hefe-Membranen nicht... 101	
3.10. Durch die HSP12-Deletion erfolgt die Expression einer großen Anzahl an Genen.....	103
3.11. Hsp12 moduliert Membraneigenschaften.....	106
4. Diskussion.....	115
5. Zusammenfassung.....	120
6. Literatur.....	123
7. Anhang.....	161
8. Abkürzungen.....	173
9. Danksagung.....	177
10. Erklärung.....	179

### 1. Einleitung

#### 1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae*, (*S. cerevisiae*) allgemein als Bäckerhefe bekannt, ist eine einzellige Sprosshefe und gehört der Klasse der Ascomyceten an. *S. cerevisiae* durchläuft den Zellzyklus bei 30 °C in nur 90 Minuten (Brewer et al., 1984) und ist sowohl genetisch als auch molekularbiologisch hervorragend zugänglich und stellt so für die moderne Biologie einen wichtigen Modellorganismus dar. Mit  $1,2 \times 10^7$  Basenpaaren auf 16 Chromosomen besitzt *S. cerevisiae* eines der einfachsten eukaryontischen Genome – das humane Genom umfasst etwa  $3 \times 10^9$  Basenpaare, das Genom von *E. coli* nur etwa  $4 \times 10^6$  Basenpaare. Das gesamte Hefegenom ist sequenziert und in Datenbanken zugänglich (Goffeau et al., 1996). *S. cerevisiae* kommt sowohl in haploider als auch in diploider Form vor. Die diploide Form bildet während der Meiose Sporen, mit deren Hilfe durch Tetradendissektion die Vererbung genetischer Marker und Mutationen untersucht werden kann. Hefezellen nehmen leicht fremde DNA auf und integrieren sie durch homologe Rekombination in ihr Genom. Gleichzeitig sind zahlreiche geeignete Plasmide sowie Methoden und genetische Marker verfügbar, so dass für die Hefe effektive Techniken zur genetischen Manipulation etabliert sind (Guthrie, 1991, Sambrook et al., 1989, Ausubel et al., 1997, Orr-Weaver et al., 1981) und diese für eine Vielzahl an genetischen, molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen verwendet wird.

#### 1.2. Die Stressantwort in *S. cerevisiae*

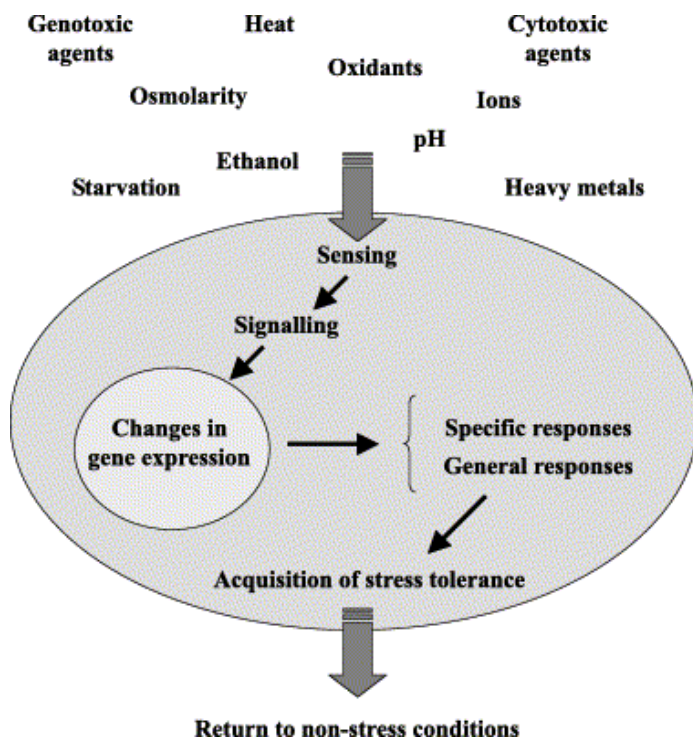
Wachstum und metabolische Aktivitäten einer Hefezelle bei verschiedenen Temperaturen sind nicht nur von ihren genetischen Voraussetzungen abhängig, sondern auch von der Zusammensetzung des umgebenden Mediums und anderen physikalischen und chemischen Parametern. Wie alle lebenden Zellen kann auch *S. cerevisiae* stammabhängig innerhalb bestimmter Bereiche äußerer Bedingungen wie Temperatur (0 °C – 48 °C), pH (4,5 – 6,5) und Osmolarität (minimales Wasserpotential  $\Psi_w$ : -5 bis -20 Mpa, optimales  $\Psi_w$ : -1,5 Mpa) normales Wachstum aufrecht erhalten (Walker, 1999; van Uden et al., 1984 und Lagunas et al., 1986). Wird die Zelle

## 1. Einleitung

---

allerdings Bedingungen ausgesetzt, die außerhalb dieser Bereiche liegen, spricht man von Zellstress.

*S. cerevisiae* ist natürlichen Umgebungsschwankungen besonders stark ausgesetzt, da wegen der Bewegungsunfähigkeit ein aktives Entkommen und aufgrund der geringen Zellgröße eine Abschirmung gegen Umwelteinflüsse unwahrscheinlich ist (Walker, 1999). Derartige Schwankungen können physikalischer oder chemischer Natur sein. Hierzu zählen plötzliche Veränderungen der Temperatur, Austrocknung, oxidativer und osmotischer Stress, Druck, Strahlung, bestimmte Ionen, toxische oder chemische Verbindungen und Nährstoffmangel (Abbildung 1.1.). In der natürlichen Umgebung müssen Organismen häufig Schwankungen mehrerer dieser Parameter gleichzeitig bewältigen (Piper et al., 1997). Allerdings ist unter bestimmten Voraussetzungen eine Adaption an die neuen Wachstumsbedingungen und eine Weiterführung der normalen Zellproliferation möglich (Lindquist et al., 1986).



**Abbildung 1.1. Adaptive Antwort auf Stressbedingungen.** Die Stressantwort führt zum Aktivieren der Signaltransduktionswege, die das genomische Expressionprogramm angleichen. Die Induktion spezifischer und genereller Stressantwort steigert die zelluläre Resistenz (Jamieson, 1998).

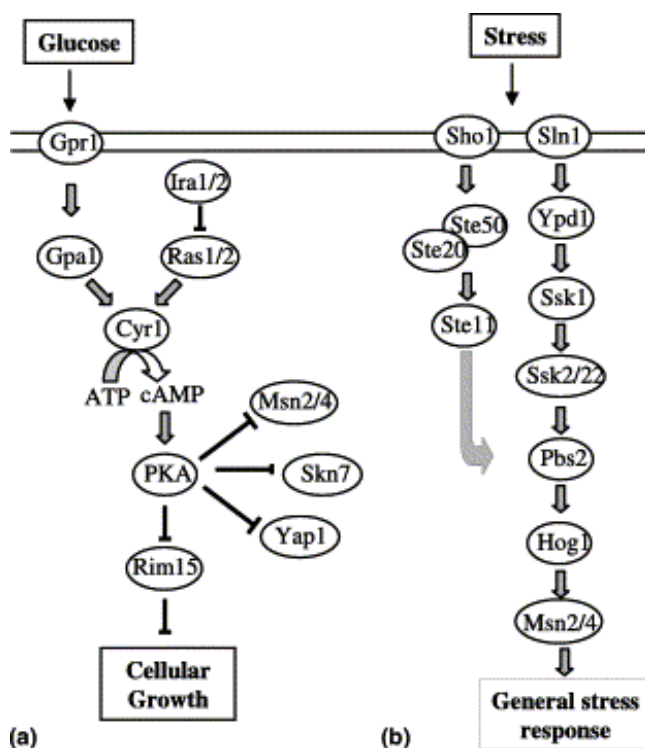
Ein Schutzmechanismus der Hefezellen vor einem Schaden durch äußere Einwirkungen stellt die Initiation eines spezifischen Genexpressionsprogrammes dar (Abbildung 1.2.). Dieses Programm, das als Stressantwort (Environmental Stress Response – ESR) bezeichnet wird, umfasst neben der Expression von 900 Genen, die Repression mehrerer hundert anderer Gene. Die ESR wird grundsätzlich bei plötzlicher Veränderung der Umgebung initiiert (Gasch et al, 2000). Die



## 1. Einleitung

Hochregulation der ESR-Gene unterliegt der Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren: Msn2 und Msn4 induzieren 88% der ESR-Gene, Hsf1 bei Hitzeschock und Hot1 bei osmotischem Schock (Gasch et al., 2000, Gasch, 2007).

Diese Transkriptionsfaktoren regulieren unter anderem Gene, die eine Vielzahl an molekularen Chaperonen codieren oder die bei der Trehalose-Synthese und deren Abbau, bei der oxidativen Stressabwehr und der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Martinez-Pastor et al., 1996; Schmitt und McEntee, 1996; Boy-Marcotte et al., 1998; Gasch et al., 2000; Amoros und Estruch, 2001).



**Abbildung 1.2. Aktivierte Signalwege bei nicht-Stress Bedingungen und bei der generellen Stressantwort.**

(a) Unter physiologischen Bedingungen wachsende Zellen (mit Glukose), enthalten hohe Mengen an cAMP, das die Proteinkinase A (PKA) aktiviert und die generelle Stressantwort inhibiert. Die spezifische Stressantwort wird durch Skn7 und Yap1 ausgelöst. (b) Unter pleiotropischen Stressbedingungen steigen die cAMP-Mengen und PKA-Aktivität, und die generelle Stressantwort wird durch Msn2/4 aktiviert (Martinez-Pastor et al., 1996).

Je nach Art der Stresseinwirkung können in den verschiedenen Kompartimenten der Hefezelle drastische morphologische und molekulare Veränderungen beobachtet werden, wie z.B. die koordinierte Expression bestimmter Gene. Zellen wie auch *S. cerevisiae* reagieren auf plötzliche Umgebungsänderungen in mehr oder minder gut zu unterscheidenden Phasen. In Tabelle 1.1. sind einigen Auswirkungen ausgewählter Stressarten auf die Physiologie der Hefezelle zusammengestellt.

# 1. Einleitung

	Zellmorphologie	Zellwand/ Plasmamembran	Proteinsynthese	Zellteilung/ Zellwachstum
<b>Hitzeschock</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atypische Zellteilung</li> <li>• Irreguläres Wachstum der Zellwand</li> <li>• Zunahme der Zellgröße</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhte Membranfluidität und verringerte Permeabilität für essentielle Nährstoffe</li> <li>• Abnahme an ungesättigten Fettsäuren in der Membran</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verringerte Proteinsynthese</li> <li>• Induktion der Hsp-Synthese</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kein Wachstum &gt; 43°C</li> <li>• Hitzeschock führt zum vorübergehenden Zellzyklusarrest in der G1 Phase</li> </ul>
<b>Kälteschock</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atypische Zellteilung</li> <li>• Neuverteilung der Vakuolen</li> <li>• Schrumpfen der Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verringerte Membranfluidität</li> <li>• Zunahme der mehrfach ungesättigten Membranfettsäuren führt zur Abnahme im Lösungstransport</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verringerte Proteinsynthese</li> <li>• Induktion der Hsp-Synthese</li> <li>• Induktion der Csp-Synthese</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sublethaler Wachstumsstopp während der Zellteilung &lt; 10°C</li> </ul>
<b>Osmotischer Stress</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extreme Ab- oder Zunahme des Zellvolumens</li> <li>• Extreme Veränderung des Vakuolenvolumens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Änderung der Membranfluidität und -permeabilität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion ausgewählter Hsps</li> <li>• Induktion von Proteinen für Glycerinsynthese und -transport</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atypische Zellteilung</li> <li>• Irreguläres Wachstum der Zellwand</li> <li>• Zunahme der Zellgröße</li> </ul>
<b>Oxidativer Stress</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zunahme der gesättigten Fettsäuren</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion der</li> <li>• Aktivierung von Enzymen die zur Apoptose führen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellzyklusarrest in der G2 Phase</li> </ul>
<b>Ethanolstress</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abnahme des Zellvolumens</li> <li>• Induktion morphologischer Übergänge</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Veränderung der Membranzusammensetzung</li> <li>• Erhöhte Ionenpermeabilität</li> <li>• Inhibition der Nährstoffaufnahme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion der Hsp-Synthese</li> <li>• Induktion der Zytochrom P450 Synthese</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allgemeine Inhibition von Zellwachstum und Zellteilung</li> </ul>

**Tabelle 1.1. Auswirkungen verschiedener Stressarten auf physiologische Funktionen von Hefe**

Informationen aus: Piper (1999), Jamieson (1998) und Walker (1999).

In einer ersten Phase treten als unmittelbare Folge äußerer Einwirkungen zelluläre Veränderungen auf. Viele Arten von Stress führen zu einem Verlust der Polarisierung des Aktin Zytoskeletts, die in aktiv wachsenden Zellen die Knospung während der Zellteilung ermöglicht. Die Aktinstränge in der Mutterzelle werden aufgelöst, was mit der Aufgabe der Zellpolarität einhergeht und in letzter Konsequenz zum Wachstumsstopp führt (Chant, 1999). Äußerlich gut erkennbare Auswirkungen werden durch osmotischen Stress herbeigeführt. Werden Hefezellen einer erhöhten externen Osmolarität durch hohe Konzentrationen an Salz und Zucker im Medium

ausgesetzt, verlieren sie unmittelbar an zytosolischem Volumen – die Zellen schrumpfen (Marechal et al., 1995). Das dabei zu beobachtende Schrumpfen und „Einbeulen“ osmotisch geschockter Zellen führt allerdings nicht zu einer Plasmolyse der Zellen, da Zellwand und Protoplast gleichzeitig schrumpfen und die Plasmamembran dabei in einem engen Kontakt zur Zellwand bleibt. Dies ist auf die Elastizität der Hefezellwand zurückzuführen, die somit kaum vor Wasserverlust schützen kann (Rose, 1975; Meikle et al., 1988). Osmotischer Stress führt darüber hinaus zu Veränderungen der Plasmamembran, genauer gesagt deren Struktur, Permeabilität und mechanische Fähigkeiten (Morris et al., 1986). Dies wiederum resultiert aus einer veränderten Expression von am Lipidmetabolismus beteiligten Genen. Veränderungen der Membranen beeinflussen andererseits die Aktivität verschiedener Transmembranproteine, wie Transporter und mechanosensitiver Kanäle, den sogenannten Osmosensoren (Rübenhagen et al., 2000; Sukharev et al., 2001; Hamill und Martinac, 2001; Heide et al., 2001).

Der Hitzestress ist eine andere Art von Stress, der Änderungen in der Ultrastruktur von Hefezellen erzeugen kann. Thermische Schäden in Hefezellen resultieren hauptsächlich aus der Zerstörung von Wasserstoffbrücken und hydrophoben Interaktionen, die zur allgemeinen Denaturierung von Proteinen und DNA führen. Setzt man Zellen intensiver Hitze aus, so kann Proteinaggregation und letztendlich Zelltod beobachtet werden (Parsell et al., 1994). Jedoch führen höhere Temperaturen zunächst zu einem vorübergehenden Wachstumsstillstand in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellteilungszyklus (Johnston und Singer, 1980). Nach nur einer halben Stunde Temperaturerhöhung von 25°C auf 37°C konnten im Elektronenmikroskop eine Volumenabnahme des Nukleolus, Partikel mit hoher Elektronendichte in den Mitochondrien und zytoplasmatische Aggregate kleiner Partikel, sogenannte Hitzeschockgranula, beobachtet werden (Webster und Watson, 1993). Mit der Abnahme der Mitochondrien-Anzahl nehmen Atmung und oxidative Phosphorylierung ab und es tritt eine Entkoppelung dieser beiden Vorgänge auf (Patriarca und Maresca, 1990). Dementsprechend bewirkt der Hitzeschock eine Reduktion des zellulären ATP-Spiegels (Findly et al., 1983). Morphologische Veränderungen im Zellkern sind auf unlösliche Protein- und Nukleinsäureaggregate in Form granulärer Ablagerungen zurückzuführen (Littlewood et al., 1987). Die Denaturierung dieser Proteine muss zwangsläufig zu schwerwiegenden Defekten in der Regulation der Transkription und einer ineffizienten DNA-Reparatur führen.

Weitere Änderungen der Zellmorphologie sind durch Umgestaltung der Zellmembran und Zellwand bedingt. So konnten Änderungen der Membranfluidität und Struktur, beobachtet werden. In *S. cerevisiae* wurde durch Stress, wie zum Beispiel erhöhte Temperatur, eine Zunahme der Membranfluidität und eine Änderung in der Länge der Fettsäureketten, der Lipidzusammensetzung und in der Anzahl an Lipidarten beobachtet. (Suutari et al., 1990; Beney und Gervais, 2001). Ferner wird durch unphysiologisch hohe Temperaturen das Verhältnis von Lipiden zu Proteinen in der Hefemembran beeinflusst (Piper, 1993) und häufig ist die Aggregation integraler Membranproteine zu beobachten (Kruuv et al., 1983). Dies kann einen verheerenden Einfluss auf die Nährstoffaufnahme haben, falls Membranproteine betroffen sind, die für den Transport von essentiellen Bestandteilen des Hefemetabolismus verantwortlich sind. Der Einfluss von Stress führt außerdem neben irregulärem Wachstum und gleichzeitiger Schwächung der Zellwand zu einer Streckung der Plasmamembran. Dies hat womöglich eine erhöhte Permeabilität (Kamada et al., 1995) der Plasmamembran zur Folge.

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

Hefezellen sind nicht nur in der Lage, sich den äußeren Angriffen auf ihre Zellintegrität zu widersetzen, sondern sich darüber hinaus an derart widrige Wachstumsbedingungen zu adaptieren und wieder eine normale Zellproliferation

aufzunehmen (Lindquist, 1986; Lindquist und Craig, 1988; Watson, 1972). Dies geschieht in einer letzten, der sogenannten adaptiven Phase der Stressantwort. Während dieser Phase werden beispielsweise kompatible Solute in der Zelle angehäuft. Diese Verbindungen beeinflussen biochemische Prozesse innerhalb der Zelle nicht, erhöhen aber die interne Osmolarität und ermöglichen so der Zelle, mehr Wasser aus der Umgebung (in einer effizienteren Art und Weise) aufzunehmen (Yancey et al., 1982). Einige dieser Verbindungen vermögen Wasser sogar zu ersetzen oder dessen Oberflächenspannung zu erhöhen und somit die Wasserhülle um Makromoleküle herum zu stabilisieren (Yancey et al., 1982; Wiggins, 1990). Viele verschiedene Verbindungen werden als kompatible Solute genutzt, wobei *S. cerevisiae* ausschließlich Glycerin anhäuft (Brown, 1978; Blomberg und Adler, 1992). Veränderte Stressbedingungen verlangen nach anders gearteten Schutzmechanismen. So finden sich in verschiedenen Stresssituationen große Mengen an Glykogen als Nährstoffreserve (Francois und Parrou, 2001) in der Hefezelle oder Trehalose (Shamrock und Lindsey, 2008). Letztere scheint in *S. cerevisiae* der generellen Protektion zu dienen, da es molekulare Chaperone bei der Kontrolle der Proteindenaturierung und –renaturierung unterstützt (De Virgilio et al., 1994; Singer und Lindquist, 1998a; Singer und Lindquist, 1998b). Trehalose wird kaum in logarithmisch wachsenden Zellen detektiert, umso mehr allerdings in stationären Hefen und Sporen (Kane und Roth, 1974; Lillie und Pringle, 1980). Nach mildem Hitzestress wird das Disaccharid in der Zelle angehäuft, jedoch wieder ziemlich schnell nach der Stresseinwirkung abgebaut (Attfield, 1987; Hottiger et al., 1987; Singer und Lindquist, 1998a). Trehalose stabilisiert Proteine während des Hitzeschocks und ist sogar in der Lage, Proteinaggregation zu reduzieren.

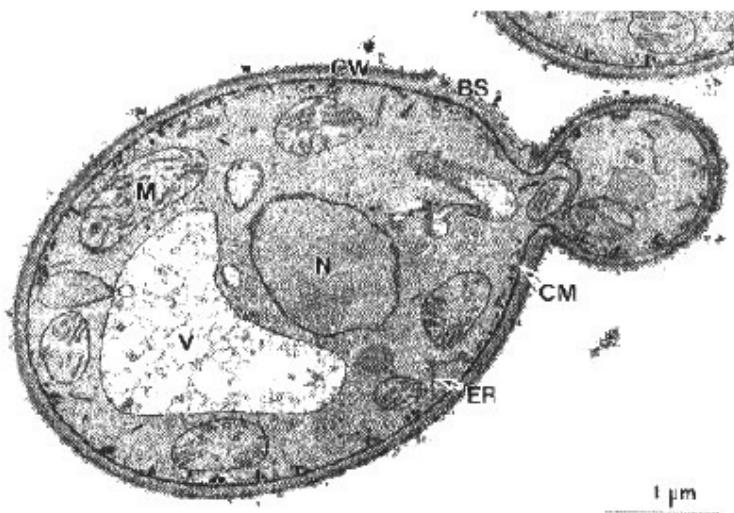
Während der Adaption an veränderte Wachstumsbedingungen, kann eine Veränderung der Membranlipide festgestellt werden. So ändern sich bei verschiedenen Hefen sowohl der Grad der Sättigung als auch die mittleren Kettenlängen der Fettsäuren (Suutari et al., 1990) und die Zusammensetzung der Lipide. Bei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

Sphingolipide auch eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen könnten (Jenkins et al., 1997).

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

### 1.3. Die Zellhülle von *S. cerevisiae*

Die Zellhülle von *S. cerevisiae* wird als Struktur beschrieben, die das Hefezytoplasma von der Umgebung abgrenzt und umschließt. Die Zellhülle umfasst, von Innen nach Außen betrachtet, die Plasmamembran, das Periplasma und die Zellwand (Abbildung 1.3.). In *S. cerevisiae* nimmt die Zellhülle ca. 15 % des gesamten Zellvolumens ein und spielt bei der Kontrolle der Osmose und der Zellpermeabilität eine entscheidende Rolle (Walker, 1999).



**Abbildung 1.3.**

#### **Elektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahme einer Hefezelle.**

CW, Zellwand; P, Periplasma; CM, Plasmamembran; BS, Knospungsnarbe; C, Zytoplasma; N, Zellkern; M, Mitochondrium; ER, Endoplasmatisches Retikulum; G, Golgi-Apparat; S, sekretorisches Vesikel; V, Vakuole; PER, Peroxisom (Walker, 1999).

#### 1.3.1. Die Plasmamembran

Die Plasmamembran besteht aus einer etwa 7,5 nm dicken Lipiddoppelschicht und enthält eine Mischung aus polaren Lipiden und Proteinen, die durch ihre Interaktion

die Struktur der Membran bestimmten (van der Rest et al., 1995). Singer und Nicolson beschrieben 1972 Membranen nach ihrem berühmten Fluid-Mosaik-Modell (Singer und Nicolson, 1972). In diesem Modell werden Lipide als ein homogener See angesehen, in dem hauptsächlich monomere Proteine in niedriger Konzentration wahllos verstreut sind. Heute weiß man, dass Proteine nicht zufällig über die Membran verteilt sind; Membranen weisen eine unregelmäßige Architektur auf. Es gibt abgetrennte Regionen unterschiedlicher Struktur und Funktion, die in Dicke und Zusammensetzung variieren. Außerdem werden viel mehr Proteine in der Plasmamembran beherbergt als vorher angenommen (Engelman, 2005).

### 1.3.2. Die Lipidzusammensetzung von *S. cerevisiae*

Die Lipidzusammensetzung von Membranen ist sehr komplex und darüber hinaus nicht konstant. In *S. cerevisiae* gibt es nicht nur große Unterschiede der Lipidkomponenten zwischen den verschiedenen Wildtypstämmen, sie verändern sich auch in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle und der Kultivierungsbedingungen (Daum et al., 1999) (siehe auch Tabelle 1.2.). Die Lipidkomponenten umfassen Phospholipide (hauptsächlich Phosphatidylcholine und Phosphatidylethanolamine mit geringfügigem Anteil von Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol) und Sterole (hauptsächlich Ergosterol und Zymosterol). Es ist wahrscheinlich, dass die Phospholipide den Membranen Fluidität verleihen und die Sterole die Stabilität. Daraus wird deutlich, wie strikt die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran reguliert wird. Diese Regulation beeinflusst viele Membranproteine, denn Phospholipide und Sterole sind für die optimale Aktivität verschiedener Membranproteine von großer Wichtigkeit (Opekarova und Tanner, 2003).

Lipide	Anteil an Lipidanteil der Hefe (%)		Tabelle 1.2. Lipidzusammensetzung der Plasmamembran von <i>S. cerevisiae</i>
	(Patton und Lester, 1991)	(Zinser et al., 1991)	
Phosphatidylcholin (PC)	17,0	16,8	Nach (Patton und Lester, 1991) und (Zinser et al., 1991); nb: nicht bestimmt.
Phosphatidylethanolamin (PE)	14,0	20,3	
Phosphatidylinositol (PI)	27,7	17,7	
Phosphatidylserin (PS)	3,8	33,6	
Cardiolipin	4,2	0,2	
Phosphatidsäure	2,5	3,9	
Sphingolipide	30,7	Nb	

## 1. Einleitung

---

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

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

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

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

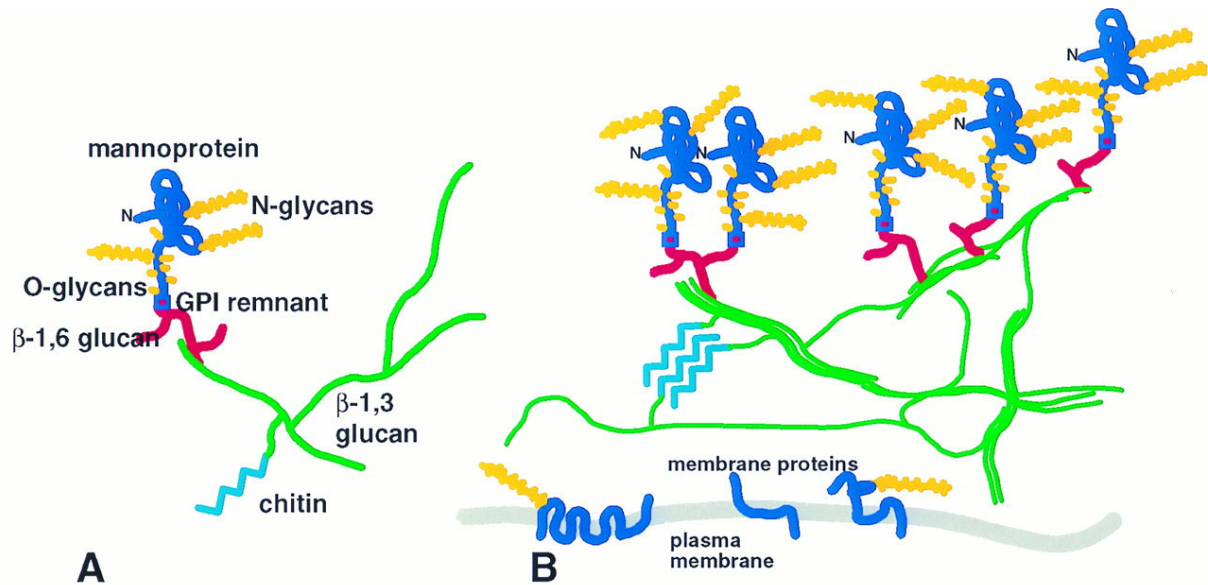


Über die Fettsäureketten und deren Packung wird im Wesentlichen die Membranfluidität bestimmt. Die Packung wird umso dichter, je länger die Fettsäureketten sind und je geringer die Anzahl an Doppelbindungen sind. Dies führt zu einer geordneteren Struktur und einer Abnahme der Fluidität. Kalorimetrische Untersuchungen zeigten, dass weniger Doppelbindungen zu einem höheren Temperaturübergang bei der Phasenumwandlung vom Gel zum Flüssig-kristallinen Zustand des Lipids führen (Huang und Li, 1999). Die Kopfgruppen beeinflussen nicht nur das Oberflächenpotential der Membran (Carbon und Calderon, 1991) sie können auch direkt in die Aktivität von Membranproteinen eingreifen (Chen und Wilson, 1984). Lipide wie PC, PS und PI mit Kopfgruppen und Fettsäureketten, deren Querschnittsfläche vergleichbar ist, besitzen eine zylindrische Struktur und gliedern sich in die Lipiddoppelschicht ein (de Kruijff, 1987). Lipide mit kleineren Kopfgruppen als Fettsäureketten, wie PE und Sterole, sind kegelförmig und stören die Membranorganisation. Hohe Konzentrationen an solchen Lipiden in der Membran können lokal eine starke Membrankrümmung induzieren und zu einem Defekt in der Packung der Lipide führen (Xu et al., 2001), wodurch Proteine beispielsweise leichter inserieren können. PE wird als ein Nicht-Bilayer-Lipid bezeichnet (de Kruijff, 1997), das eine gewisse Diskontinuität in die allgemeine Struktur der Lipiddoppelschicht einbringt und so möglicherweise die Vesikelbildung beeinflusst (de Kruijff, 1987; Dowhan, 1997). PC ist die Hauptkomponente zellulärer Membranen, dient aber auch als Vorläufer verschiedener Lipid-Second-Messenger, wie zum Beispiel bioaktives lyso-Phosphatidylcholin, Phosphatidat und Arachidonsäure und als Sammelstelle für Signalmoleküle wie G-Proteine (Exton, 1994; Bürgermeister et al., 2004). PS ist ein geringerer Bestandteil von Membranen, es ist asymmetrisch über die Doppelschicht verteilt, wobei die Exponierung an der Außenseite Signalfunktion übernehmen kann (Vance, 2003; Vance und Steenbergen, 2005). Wahrscheinlich spielt es eine Rolle bei der Beseitigung apoptotischer Zellen und stellt einen Co-Faktor vieler wichtiger Enzyme dar, die in Signaltransduktionswege involviert sind, außerdem ist PS ein Vorläufer des Phosphatidylethanolamines (Vance und Steenbergen, 2005).

Durch Schwankungen der äußeren Umgebung, der molekularen Zusammensetzung der Membran oder durch Interaktionen von Fremdkörpern mit Membranbestandteilen können dynamische und strukturelle Eigenschaften der Membran verändert werden. In der sogenannten flüssigkristallinen Phase der Membran ist die Anordnung und Orientierung der Lipide ungeordnet, wobei sie gleichzeitig innerhalb der

Doppelschicht diffundieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Phase viele Proteinfunktionen unterstützt (McElhane, 1984). Äußere Parameter, wie Temperatur, Druck und Hydratation können Veränderungen dieser dynamischen Eigenschaften hervorrufen (Luzzati und Husson, 1962; Beney und Gervais, 2001). Beispielsweise führt eine Abnahme der Temperatur oder Erhöhung des Druckes zu einer Abnahme der Mobilität bestimmter Moleküle, was mit der Abnahme der sogenannten Membranfluidität interpretiert wurde (MacDonald et al., 1988). Dementsprechend wird die Membran zunehmend viskos (Sinensky, 1974; Quinn, 1988) und vollzieht bei einer typischen Temperatur ( $T_m$ ) den Phasenübergang zur Gelphase (Beney und Gervais, 2001). Mikroorganismen sind in der Lage, ihre Membranen äußeren Bedingungen anzupassen. So werden Fettsäurekettenlängen und der Sättigungsgrad in Abhängigkeit der Temperatur verändert (Watson, 1978), es kommt zu cis-trans Isomerisierungen von Doppelbindungen (Loffeld und Keweloh, 1996) und zu Änderungen polarer Kopfgruppen (Ramos et al., 1997). Sterole, wie Cholesterin und Ergosterol, führen beispielsweise zu einer Abnahme der Fluidität und üben somit stabilisierende Effekte in Membranen lebender Zellen aus (Parks et al., 1982; Bottema et al., 1985). Die Zucker Saccharose und Trehalose interagieren andererseits mit polaren Gruppen der Phospholipide, halten so den Abstand zwischen den Kopfgruppen aufrecht und stabilisieren die Doppelschicht unter verschiedenen Stressbedingungen (Rudolph et al., 1986). Mit diesen Mechanismen kann ein optimales Maß an Fluidität bewahrt werden und die Zellen können unter Stress überleben. Darüber hinaus kann die Membran äußere Schwankungen über ihre Fluidität wie eine Art Stress-Sensor wahrnehmen. So konnte ein Zusammenhang zwischen dem physikalischen Zustand der Membran und der Expression von Stressproteinen hergestellt werden. Veränderungen in der Membranlipid-Zusammensetzung von *S. cerevisiae* beeinflussten die Temperaturschwelle, die die Hsp-Synthese initiierte (Chatterjee et al., 1997). Auch das Verhältnis zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren hat signifikante Auswirkungen auf die Transkription von Hsps (Carratu et al., 1996; Chatterjee et al., 2000). Außerdem scheint die Plasmamembran im Gegensatz zu Hsps direkt an der hitzeinduzierten Thermotoleranz beteiligt zu sein (Guyot et al., 2005).

Abhängig von den Wachstumsbedingungen macht die Zellwand 10 bis 25% des Zelltrockengewichtes aus. Der Aufbau der Zellwand ist in Abbildung 1.4. schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.4. Zusammensetzung und Struktur der Zellwand von *S. cerevisiae*.** (A) Das Mannoproteinpolypeptid ist in blau dargestellt, und die Oligosaccharide in gelb. Nahe der Plasmamembran (PM) liegen unverzweigte Schichten von Chitinketten (cyan). (B) Zellwanddarstellung, in der  $\beta$ -1,3-Glucan-Ketten (grüne Linien) zu dreifach Helices verwunden sind und Chitin als kristalline Mikrodomäne gezeigt ist. Wechselwirkungen von Mannoproteinen über Disulfidbrücken oder andere Bindungen sind nicht dargestellt (Lipke und Ovalle, 1998).

### 1.3.3. Die Zellwand

Die Zellwand besteht aus einer inneren Schicht aus Polysacchariden, die für die Zellwandstabilität und Widerstandsfähigkeit verantwortlich ist. Diese setzt sich wiederum hauptsächlich aus moderat verzweigtem 1,3- $\beta$ -Glucan zusammen (Manners et al., 1973). Aufgrund der Seitenketten stehen 1,3- $\beta$ -Glucan Moleküle nur über Wasserstoffbrücken in Verbindung. Daraus ergibt sich ein kontinuierliches, hoch elastisches dreidimensionales Netzwerk, das sich unter normalen osmotischen Bedingungen ausdehnen kann. Hypertonische Lösungen hingegen führen zu einem Schrumpfen der Zellen, wobei 60% des Originalvolumens und 40 bis 50% der Oberfläche eingebüßt werden (Morris et al., 1986). An der äußeren Seite, an den nicht reduzierenden Enden des 1,3- $\beta$ -Glucan Netzwerkes sitzen stark verzweigte - und somit wasserlösliche - 1,6- $\beta$ -Glucan-Ketten, die mit GPI-modifizierten Mannoproteinen verbunden sein können (Kollar et al., 1997). An der Innenseite des 1,3- $\beta$ -Glucan Netzwerkes werden in den lateralen Zellwänden, allerdings erst nachdem die Zytokinese stattgefunden hat, Chitinketten angelagert (Shaw et al., 1991; Kollar et al., 1997). Dementsprechend trägt Chitin in sehr jungen Hefezellen nicht zur mechanischen Stabilität lateraler Zellwände bei. In Abhängigkeit vom Zellwandstress kann Chitin allerdings darüber hinaus an 1,6- $\beta$ -Glucan Ketten

glykosidisch verknüpft werden. Normalerweise findet sich Chitin hauptsächlich während der Knospung bei der Bildung des Septums und des Knospungsringes in der Zellwand und wird weniger in laterale Zellwände eingelagert (Shaw et al., 1991). Trotz allem ist Chitin, obwohl es nur in geringen Mengen vorkommt, ein für die Integrität der Zellwand wichtiger Bestandteil (Bulawa, 1993).

Die Mannoproteinschicht ist anders als Glukan und Chitin nicht direkt an der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität beteiligt. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass Hefezellen ihre Form auch nach proteolytischem Verdau der äußeren Zellwandschicht aufrechterhalten können (Koch und Rademacher, 1980; Zlotnik et al., 1984). Je nach Verankerung in der Zellwand lassen sich verschiedene Gruppen von Zellwandproteinen unterscheiden (siehe auch Tabelle 1.2.).

Kovalent mit dem Glukan der Zellwand verbunden sind die Pir-Proteine (proteins with internal repeats) und Proteine mit Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankerrest. Das Hefegenom kodiert für insgesamt 58 Proteine, die neben einem Signalpeptid für die Sekretion, eine hydrophobe Sequenz ( $\omega$ -Motiv) für die Übertragung eines GPI-Ankers aufweisen (Caro et al., 1997). Durch diese C-terminale Modifikation, die in allen höheren Eukaryonten zu finden ist, werden sekretorische Proteine zunächst in der Plasmamembran verankert. 1997 konnten Kollar *et al.* zeigen, dass eine kovalente Bindung an das nicht reduzierende Ende von  $\beta$ -1,6 Glukan über einen Teil des GPI-Ankers erfolgt.

## 1. Einleitung

Zellwandproteine von <i>S. cerevisiae</i>	Art der Bindung bzw. Verknüpfung	Funktion
<b>Mannoproteine</b>		
1.) Proteine mit N-Glykosylierung	Alle N-modifizierten Glykoproteine erwerben ihre ersten Oligosaccharide im ER, und bestehen aus 9-13 Mannoseresten.	
2.) Proteine mit O-Mannosylierung	O-verbundene Oligosaccharide bestehen aus kurzen bis zu 5 Mannoseeinheiten.	
<b>GPI (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol) -Zellwandproteine</b>	Verknüpfung an $\beta$ -1,6-Glucan über einen Teil des GPI-Ankers.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellwandstabilität</li> <li>• Quervernetzung der einzelnen Komponenten</li> <li>• strukturelle Funktion</li> </ul>
<b>Lösliche Zellwandproteine</b>	Teilweise über Disulfidbrücken.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glykolytische/Hydrolytische Aktivität</li> <li>• Quervernetzung der Zellwandbestandteile</li> </ul>
<b>Die <i>PIR</i> (Proteins with Internal Repeats) Familie und alkali-extrahierbare Zellwandproteine</b>		
1.) Die <i>PIR</i> Familie	O-mannosyliert mit Verknüpfung an $\beta$ -1,3-Glucan.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protektive Rolle</li> <li>• Zellwandpermeabilität</li> </ul>
2.) Zellwandproteine mit alkali-sensitiver-Verbindung	Zellwandverbunden entweder durch GPI- oder Oligosaccharidkette.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remodellierung der Glucanmatrix</li> </ul>

**Tabelle 1.2. Proteine der Zellwand von *S. cerevisiae*.** Informationen aus Klis et al., 2006; Lesage und Bussey, 2006)

Neben den GPI-Zellwandproteinen gibt es eine kleinere Proteingruppe, die direkt an das 1,3- $\beta$ -Glucan über einen noch unbekanntem Linker, der sich sensitiv gegenüber milden Alkali verhält, verknüpft ist. Diese Proteine werden als ASL (alkali-sensitive-linkage)-Zellwandproteine bezeichnet. Dazu gehört auch die Familie der Pir-Zellwandproteine (Mrsa et al., 1997; De Groot et al., 2005). Während GPI-Zellwandproteine in der äußeren Schicht der Zellwand gefunden werden können,

scheinen Pir-Zellwandproteine innerhalb der inneren Zellwandschicht verteilt zu sein, da sie direkt mit 1,3- $\beta$ -Glukan Molekülen verknüpft sind (Kapteyn et al., 1999). Pir-Proteine werden verstärkt während der frühen G<sub>1</sub>-Phase des Zellzykluses exprimiert, die sich durch eine stark herabgesetzte Permeabilität der Zellwand auszeichnet (De Nobel und Barnett, 1991). Außerdem erfolgt eine verstärkte Synthese dieser Zellwandproteine als Folge von Zellwandstress, weshalb man ihnen eine Rolle bei der Zellwandverstärkung zugesprochen hat (Kapteyn et al., 1999; Boorsma et al., 2004). Dies geht mit der Annahme einher, dass die repetitiven Sequenzen der Pir-Proteine direkt an der Verknüpfung an das 1,3- $\beta$ -Glukan beteiligt sind (Castillo et al., 2003). Demzufolge können Proteine mit mehreren solcher Sequenzen eine entsprechende Anzahl an 1,3- $\beta$ -Glukan Moleküle miteinander verknüpfen, was zu einer Festigung der Zellwand führt (Klis et al., 2006). Dadurch würde auch die Permeabilität derselben herabgesetzt werden.

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

Die Konstruktion der Zellwand wird sehr gut reguliert. Die Polysaccharidzusammensetzung, die Struktur und die Dicke der Zellwand unterliegen sehr großen Variationen, die abhängig von äußeren Bedingungen sind, wie pH-Wert, Medium und Temperatur (Aguilar-Uscanga und Francois, 2003). Dementsprechend strikt wird der Aufbau der Zellwand im Zusammenspiel mit dem Zellzyklus koordiniert. Beispielsweise wird der Großteil der Zellwandprotein codierenden Gene zyklusabhängig reguliert (Smits et al., 1999). So unterscheidet

sich die Zellwand exponentiell wachsender Zellen gravierend von solchen, die gerade die stationäre Phase betreten. In letzteren ist sie bedeutend weniger durchlässig und bei weitem resistenter gegenüber dem Angriff von Glukanasen. Darüber hinaus lässt sich ein sechsfach höherer Level an Disulfidbrücken in derartigen Zellwänden feststellen (De Nobel et al., 1990). Dieses Phänomen geht einher mit radikalen Änderungen im Zellwandproteinmuster (Shimoi et al., 1998). Beispielsweise wird die Expression von Sed1p in der stationären Phase um ein Vielfaches gesteigert, so dass es zum dominantesten Zellwandprotein dieser Wachstumsphase wird. In logarithmisch wachsenden Zellen ist es kaum nachweisbar (Gasch et al., 2000).

Sed1p zeichnet sich durch eine äußerst starke Glykosylierung aus und weist darüber hinaus vier Cysteinreste auf, was die verringerte Permeabilität und erhöhte Festigkeit der stationären Zellwand erklärt (De Nobel et al., 1990; Shimoi et al., 1998). Auch während Zellwandstress, wie Hitzestress, oxidativen und hyperosmotischen Stress, wird Sed1p stark induziert, was diesem Protein eine allgemeine protektive Rolle zusprechen könnte (Gasch et al., 2000; Boorsma et al., 2004; Hagen et al., 2004). Die spezifische Einlagerung von Chitin läuft ebenfalls abhängig vom Zellzyklus ab. Es ist verteilt in der lateralen Zellwand von wachsenden Tochterzellen nach der Zytokinese ( $G_1$ -Zellen), liegt in ringförmiger Anordnung an der mutmaßlichen Knospungsstelle von späten  $G_1$ -Zellen vor und ist im Primärseptum von M/ $G_1$ -Zellen zu finden (Shaw et al., 1991; Cabib und Duran, 2005). Zu einer Umverteilung des Chitins kann es allerdings in Folge von Zellwandstress kommen. Im Falle von Schädigungen der Zellwand wird der sogenannte Zellwand-Integritäts-Weg (cell wall integrity (CWI) pathway) aktiviert (Levin, 2005). Im Zuge dessen kommt es unter anderem zu einer massiven Ablagerung von Chitin in den lateralen Zellwänden der Mutter und sogar der wachsenden Knospe. Gleichzeitig nimmt die Ausbildung von Komplexen aus GPI-Zellwandproteinen und Polysacchariden zu, wobei letztere aus mit Chitin verlinktem 1,6- $\beta$ -Glukanen bestehen. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Resistenz gegen Glukanasen (Kapteyn et al., 1997; Boorsma et al., 2004).

All diese Beobachtungen machen deutlich, dass die Konstruktion der Zellwand von Hefezellen ein hochdynamischer Prozess ist, an dem viele Komponenten beteiligt sind. So wird die Zellwand ständig den äußeren Bedingungen durch Änderungen der

Zellwandorganisation und der Zellwandproteine angepasst, wodurch das Überleben selbst unter widrigen Bedingungen und die Anpassung daran ermöglicht wird.

### **1.4. Die Hitzeschockproteine (Hsps) in *S. cerevisiae***

Unter Hitzeschockproteinen versteht man Proteine, deren Synthese in einer Vielzahl von Zelltypen und Organismen unter Hitzeschockbedingungen induziert oder deutlich erhöht wird (Nover und Scharf, 1984; Lindquist und Craig, 1988; Nover, 1991; Morimoto et al., 1993; Nover und 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 Zellzyklus synthetisiert und übt essentielle Funktionen in der Zelle aus (Zusammenfassungen in Nover und Hightower, 1991; Nover, 1991; Pechan, 1991; Koning et al., 1992; Morimoto et al., 1993; Nover und Scharf, 1997). Hefezellen besitzen ein molekulares Verteidigungssystem, das unmittelbar nach Beginn der Stresseinwirkung induziert wird. Die Hitzeschockantwort ist ein ubiquitäres Regulationselement, das in allen untersuchten Organismen zu finden ist. Ein allgemeines Signal für die Induktion der Hsps ist das Vorhandensein anormaler Proteine, die durch nicht optimale Bedingungen entstehen, z. B. erhöhte Temperatur oder Schwermetallionen (Nover, 1991), aber auch die Anhäufung von denaturiertem Protein kann zur Synthese von Hitzeschockproteinen führen (Werner-Washburne et al., 1989). In *S. cerevisiae* wird der Hitzeschockfaktor Hsf1 aktiviert (Sorger und Pelham, 1988). Hsf1 bindet nicht nur unter Stressbedingungen an seine Hitzeschockelemente (HSE), bestehend aus fünf Basenpaaren in der Promotorregion, sondern auch unter physiologischen Bedingungen (Nieto-Sotelo et al., 1990). Allerdings existiert ein zweiter Weg, der auf eine Vielzahl an zellulären und äußeren Stressbedingungen reagiert. Die beiden Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 binden dabei an ein Sequenzelement, das als „stress response element“ oder STRE bezeichnet wird (Marchler et al., 1993). Die entsprechenden Gene werden negativ durch den Proteinase A Signaltransduktionsweg gesteuert. Die Aktivität der Kinase wird durch den intrazellulären cAMP-Spiegel reguliert (Thevelein und de Winde, 1999). Obwohl einige Hsps wie HSP12, HSP26 und HSP104 zusätzlich durch STRE-Elemente reguliert werden, unterliegen die meisten Gene der Hsps jedoch dem Hsf1. Hsf1 ist hauptsächlich für die Expression von Chaperonen während des Hitzeschocks verantwortlich, Msn2 und Msn4 dagegen regulieren die Expression von Proteinen, die in den Metabolismus involviert sind (DeRisi et al., 1997; Boy-Marcotte et al.,



1999). Gene wie HSP26 und HSP12 werden spezifisch in Abhängigkeit des Stresses aktiviert.

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

### 1.4.1. Hsp110-Familie

Vertreter der Hsp110-Familie (Molekulargewichtsbereich 104-110 kDa) wurden in den meisten Eukaryonten, mit Ausnahme von *Drosophila*, gefunden. In Hefen und Pflanzen gibt es sowohl zytosolische als auch organelläre Formen (Leonhart et al., 1993; Moore und Keegstra, 1993).

Die großen Untereinheiten der bakteriellen ClpP Protease sind die prokaryotischen Homologen dieser Hitzeschockproteine (Maurizi 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 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 und Lindquist, 1990; Sanchez et al., 1993). Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass bei *Drosophila* die Funktionen von Hsp104 von Hsp70 übernommen werden (Sanchez et al., 1993). Hsp104 ist in der Hefe notwendig für das Überleben nach Hitzestress und für den Erwerb der Stresstoleranz (in der Recovery-Phase an der Auflösung aggregierter Proteine beteiligt) (Glover und Lindquist, 1998).

### 1.4.2. Hsp90-Familie

Mitglieder der Hsp90-Familie (Molekulargewichtsbereich von 80 bis 94 kDa), die im Zytosol und im Endoplasmatischen Retikulum (GRP94 - glucose regulated protein, allerdings nicht in Hefe) lokalisiert sind, hat man in allen bisher untersuchten Eukaryonten gefunden. Hsp90 ist in Säugern in einem Komplex mit Steroidhormonrezeptoren isoliert worden und kann offenbar an diese Proteine binden, bis das entsprechende Rezeptor-aktivierende Signal (das Hormon) das Chaperon aus dieser Bindung verdrängt (Hendrick und Hartl, 1993; Pratt und Toft, 2003). Hsp90 bindet ATP mit einer niedrigen Affinität (Csermely et al., 1993). Außerdem wurde gezeigt, dass es mit Aktin und Tubulin wechselwirkt und *in vitro* Chaperonaktivität zeigt (Wiech et al., 1992; Jakob und Buchner, 1994; Jakob et al., 1995, Csermely et al., 1998).

In Hefe ist das Hsp90 Homologe Hsp82, das essentiell für die Zellviabilität und das Wachstum des Organismus bei höheren Temperaturen ist (Borkovich et al., 1989). Auch *E. coli* enthält ein Hsp90 Homologes, das HtpG-Genprodukt (Spence und Georgopoulos, 1989).

### 1.4.3. Hsp70-Familie

Es können zwei Hsp70-Multigenfamilien (Proteine mit einem Molekulargewicht von 63 bis 78 kDa) unterschieden werden, eine eukaryotische, deren Vertreter im Zytosol 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 und Craig, 1984).

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 ist Hsp70 zusammen mit anderen Proteinen (Hsp40, Hsp35, Hsp104) an einer Vielzahl von Proteinfaltungs- und Translokationsprozessen (Rassow, 1997; Miernyk, 1997; Bukau und Horwich, 1998; zum Beispiel in den

Nukleus und in Mitochondrien; Schwarz und Neupert, 1994; Auflösung von Aggregaten, Glover und Lindquist, 1998), an der Reorganisation des Zytoskeletts und an der Autoregulation der Genaktivierung bei Hitzestress beteiligt (Nover und Scharf, 1997). 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 und Horwich, 1998).

### **1.4.4. 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; Martin und Hartl, 1997; Walter und Buchner, 2002) 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 Zytosol 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; Klumpp und Baumeister, 1998).

### **1.4.5. 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 und Horwich, 1998; Kelley, 1998). Das DnaJ, das prokaryotische Hsp40 Homologe aus *E. 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 Dank (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 (Bömer et al., 1997; Bukau und Horwich, 1998).

### **1.4.6. Kleine Hitzeschockproteine**

Die Familie der sHsps (Molekulargewichtsbereich 15-30 kDa) umfasst in *Caenorhabditis elegans* ca. 16 Proteine und in Säugern ca. 10 Proteine, während in

Hefe zwei Proteine identifiziert worden sind (Derocher et al., 1991; Haslbeck et al., 2005a).

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

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

Darüber hinaus gibt es eine Reihe weiterer Stressproteine, deren genaue Aufgaben noch nicht geklärt sind, die aber im allgemeinen Verteidigungssystem eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.

### **1.5. Nativ entfaltete Proteine**

In der Proteinbiochemie hat lange die Meinung vorgeherrscht, dass die Aminosäuresequenz eines Proteins eine bestimmte dreidimensionale Struktur festlegt, welche wiederum die Voraussetzung für die Funktion des Proteins ist. Inzwischen konnte allerdings für viele Proteine und Proteindomänen gezeigt werden,

dass sie zwar keine definierte, gefaltete Struktur besitzen, aber trotzdem eine Funktion im zellulären Kontext erfüllen (Weinreb et al., 1996; Kriwacki et al., 1996; Konno et al., 1997; Daughdrill et al., 1998; Dedmon et al., 2002). Diese auch als intrinsisch ungeordnet bezeichneten Proteine (IUPs) stellen eine große Fraktion innerhalb eukaryotischer Proteine dar. Wahrscheinlich sind mehr als 30% aller eukaryotischen Proteine entweder vollständig oder zumindest teilweise ungefaltet (Dunker et al., 2000). Genomanalysen deuten darauf hin, dass je komplexer der untersuchte Organismus ist, desto größer ist der Anteil an ungefalteten Proteinen (Wright und Dyson, 1999; Dunker et al., 2000; Iakoucheva et al., 2002). So enthält das Genom von *S. cerevisiae* dreimal mehr ungeordnete Strukturen als das von *E. coli* (Tompa et al., 2006).

Die Familie der nativ nicht falteten Proteine definiert sich über eine nicht kompakte Konformation, extreme Flexibilität und lässt unter physiologischen Bedingungen keine Sekundärstruktur erkennen (Uversky, 2002). Da diese Proteine in den meisten, wenn nicht sogar allen Organismen vertreten sind, können sie als eine separate funktionelle und strukturelle Kategorie an Proteinen angesehen werden (Tompa, 2002). Sie lassen sich in zwei verschiedene Gruppen einteilen (Uversky, 2002), einmal in die wirklichen nativ entfaltenen, die über ihre gesamte Länge keine Sekundärstruktur aufweisen und in diejenigen, die große strukturlose Bereiche (> 30 – 40 Reste) innerhalb eines ansonsten gefalteten Proteins besitzen.

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

Allerdings sind nativ ungefaltete Proteine in der Zelle dem proteolytischen Abbau ausgesetzt. Der einfachste Weg, dem zu entgehen, ist die Komplexierung mit einem Partner, wodurch sie zumindest zum Teil Struktur annehmen. Eine Voraussetzung für die Ausübung ihrer Funktion ist die Bindung intrinsisch gefalteter Proteine an einen Partner, wie andere Proteine, DNA oder Membranen. Typisch für diese Interaktion ist die Induktion von Struktur in ursprünglich entfaltenen Proteinen. Ein Beispiel dafür ist Melittin, ein Peptid aus dem Gift der Honigbiene, das als antibakterielles Peptid agiert. Melittin liegt in wässriger Lösung unstrukturiert vor und

bildet bei Bindung an Membranen eine  $\alpha$ -helikale Struktur aus (Goto und Hagihara, 1992; Ladokhin und White, 1999). Ein weiteres Beispiel für ein unstrukturiertes Protein, das bei Bindung an Membranen, genauer gesagt den Myelin-Lipiden, Struktur annimmt, ist das basische Myelin (MBP) (Haas et al., 2004). Auch  $\alpha$ -Synuklein nimmt bei Interaktion mit negativ geladenen, synthetischen Lipidvesikeln  $\alpha$ -helikale Struktur an (Bisaglia et al., 2009). Die sogenannte HMG-Domäne des Transkriptionsfaktors LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor-1) weist hingegen nur gebunden mit DNA Struktur auf (Love et al., 2004). Gleiches gilt unter vielen anderen für den neuronalen Zinkfingerfaktor-1 und den Transkriptionsfaktor ADR1 (Parraga et al., 1988; Berkovits und Berg, 1999). Die meisten bis heute beschriebenen Wechselwirkungen entfalteter Proteine finden zwischen ursprünglich ungefaltetem Protein und Partnerprotein statt. Calmodulin wird beispielsweise erst bei niedrigen Kalziumkonzentrationen *in vitro* sensitiv gegenüber Proteasen (Yazawa et al., 1990). *In vivo* dagegen löst sich Calmodulin bei sinkendem intrazellulärem Kalziumspiegel von seinem enzymatischen Partner und bindet stattdessen an Proteine mit dem sogenannten IQ Motiv (Chakravarthy et al., 1999). Die Calmodulin-Bindedomäne von Calcineurin unterliegt ebenfalls in Anwesenheit von Kalziumionen der Proteolyse, da sie unter diesen Bedingungen keine Struktur aufweist. (Hubbard und Klee, 1989). Durch Bindung von Kalzium kommt es zu konformationellen Änderungen innerhalb der Calcineurin-B-Domäne, was wiederum zur Exponierung der Calmodulin-Bindedomäne und deren Entfaltung führt (Yang und Klee, 2000).

Bei einigen entfalteten Proteinen ist eine erhöhte Sensitivität gegenüber proteolytischem Abbau sogar erwünscht. Dies ist bei Proteinen der Fall, die an kritischen zellulären Kontrollvorgängen beteiligt sind. Ein schneller *turnover* - unterstützt durch den entfalteten Zustand im nichtgebundenen Stadium - gewährleistet eine Kontrolle, die eine schnelle Antwort der Zelle auf wechselnde Umweltbedingungen ermöglicht (Wright und Dyson, 1999; Namba, 2001; Dunker et al., 2002; Tompa, 2002; Fink, 2005; Radivojac et al., 2004).

Innerhalb von Transkriptionsfaktoren sind ungefaltete Bereiche weit verbreitet. Die N-terminale Aktivierungsdomäne des Hefe Hsf1p ist beispielsweise ungefalted und bleibt es überraschender Weise auch nach DNA-Bindung (Cho et al., 1996). Außerdem sind die Aktivierungsdomänen des Transkriptionsfaktors Creb und von p53 intrinsisch ungeordnet, nehmen aber amphipatische, helikale Strukturen an, sobald sie in Kontakt mit ihren Zielproteinen, Cbp (Transkriptions-Koaktivator) bzw.

Mdm2 (Onkoprotein) kommen (Kussie et al., 1996; Radhakrishnan et al., 1997; Radhakrishnan et al., 1998; Dawson et al., 2003). p53, das bei der Zellproliferation, Apoptose und Tumor-Suppression eine große Rolle spielt, stellt dabei ein gutes Beispiel für die Flexibilität der Bindung durch ungefaltete Proteine dar. Der unstrukturierte N-terminale Bereich von p53 und die gefalteten Regionen funktionieren nämlich in der Mdm2-Bindung synergistisch (Dawson et al., 2003).

Welche wichtige Rolle unstrukturierte Domänen in der Transkriptions-Aktivierung spielen können, soll am Beispiel des Transkriptionsfaktors Creb veranschaulicht werden. Die kinaseinduzierbare Aktivierungsdomäne (Kid) von Creb bindet mit hoher Affinität an die Kix-Domäne von Cbp. Cbp ist ein zentraler Vermittler der Transkription, wobei er durch Modifikation des Chromatins und der Transkriptionsfaktoren die selektive Induktion der Genexpression bewirkt (Janknecht und Hunter, 1996; Goodman und Smolik, 2000). Diese Bindung findet nur statt, wenn Kid phosphoryliert ist (pKid). Dabei liegt pKid in Lösung unstrukturiert vor, faltet aber bei Bindung an das Zielprotein (Radhakrishnan et al., 1997). In einem nicht phosphorylierten Zustand ist die Bindung aufgrund mangelnder Wasserstoffbrücken zwischen Kid und Kix sehr schwach, da die geringe Bindeenthalpie den Energieaufwand, der für die Induktion der Faltung nötig ist, nicht kompensieren kann. Damit ist diese Bindung induzierbar und nicht konstitutiv wie bei c-Myc, das als gefaltetes Protein ständig an dieselbe Bindestelle der Kix-Domäne binden kann (Parker und Marqusee, 1999).

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

Weitere interessante Aufgaben übernehmen unstrukturierte Bereiche bei der Vesikelfusion in Eukaryoten. Dieser Prozess wird durch die SNARE Proteine bewältigt. Der Hauptkomplex besteht aus drei Proteinen, die in der Hefe Sso1, Snc1 und Sec9 bezeichnet werden. Die letzten beiden sind außerhalb des Komplexes ungefaltet, wie auch N- und C-terminale Bereiche des monomeren Syntaxin Homologen Sso1, das als partiell gefaltet bezeichnet werden kann. Sowohl Sso1 als auch Snc1 sind jeweils in eine der beiden zu fusionierenden Membranen verankert. Die Assemblierung des Komplexes beinhaltet durch Bindung induzierte Strukturbildung. Dieses Zusammenspiel aus Faltung und Bindung steuert unter Umständen die Assemblierung des ternären Komplexes, der durch Verkürzung ursprünglich ungefalteter, flexibler Bereiche Membranoberflächen in nächste Nähe zueinander bringt. Dadurch wird eine Fusion zweier Lipiddoppelschichten ermöglicht (Fiebig et al., 1999).

In einem weiteren Fall, wie dem der Proteintranslokation durch Membranen, ist ein ungefalteter terminaler Bereich zum einen ein Initiationssignal, zum anderen eine physikalische Voraussetzung, um durch enge Kanäle hindurch zu passen. Beim Import in Mitochondrien zieht die Importmaschinerie die ungefaltete N-terminale Signalsequenz in den Kanal, entfaltet das gesamte Protein während es durch den Kanal gezogen wird (Hebert, 1999; Huang et al., 1999; Pilon und Schekman, 1999; Voisine et al., 1999; Eilers und Schatz, 1986). Innerhalb der mitochondrialen Matrix wird die Signalsequenz abgespalten und das Protein nimmt seine native Struktur an (Schatz und Dobberstein, 1996). Darüber hinaus enthüllten Strukturanalysen, dass Teile der Importmaschinerie ungefaltete Bereiche aufweisen. So liegt die zytosolische Domäne des Tom70 Rezeptors unstrukturiert vor. In dieser Domäne befindet sich das Tor-Motiv, das verantwortlich für die Bindung von Substrat im Zytosol ist. Ähnliches konnte für Tom22, lokalisiert im Intermembranraum beobachtet werden (Beddoe et al., 2004; Perry und Lithgow, 2005). Man geht davon aus, dass sich nach Bindung der Übergang in einen gefalteten Zustand vollzieht. Derartig flexible Domänen in Proteinen können eine große Anzahl an Substraten effizienter binden. Es wird sogar angenommen, dass die Energie, die ein Protein beim Passieren durch die mitochondrialen Membranen benötigt, durch konformationelle Änderungen der Importkomponenten zur Verfügung gestellt wird, die nativ entfaltete Bereiche besitzen. So könnten Translokase-Untereinheiten den Protein-Import Prozess antreiben (Marcos-Lousa et al., 2006).



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

Es existieren außerdem ungefaltete Regionen in vielen Chaperonen, die eventuell einen wichtigen Teil der Funktion erfüllen. So wurden z.B. für Hsp26 26,3%, für Hsp82 24,8% und für Hsp104 aus *S. cerevisiae* 36,7% unstrukturierte Bereiche hervorgesagt (Tompa und Csermely, 2004). Diese kurzen, ungefalteten Segmente könnten für die Bindung und Erkennung falschgefalteter Proteine wichtige flexible und anpassungsfähige Bereiche darstellen (Tompa und Csermely, 2004).

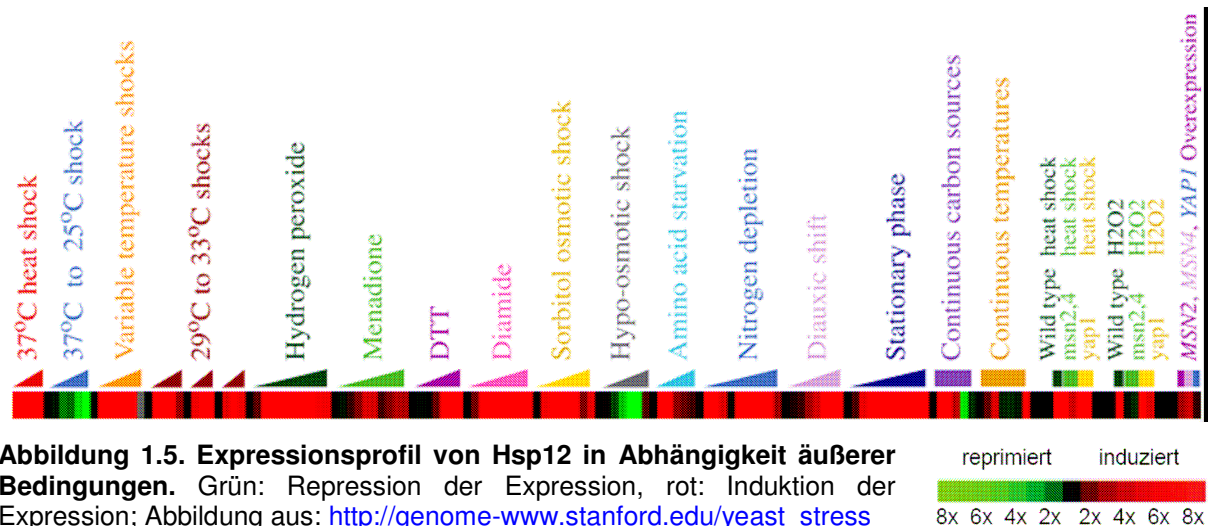
Als letztes sei noch die Beteiligung nativ entfalteter Proteine an Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen erwähnt (Nielsen et al., 2001; Iakoucheva et al., 2002; Lotharius und Brundin, 2002). Bei  $\alpha$ -Synuklein konnte beispielsweise die Bildung von Fibrillen beobachtet werden. Dieses Protein ist normalerweise an der Regulation des präsynaptischen Vesikel-Gleichgewichtes involviert, scheint aber wesentlich an Parkinson und anderen neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt zu sein (Nielsen et al., 2001; Lotharius und Brundin, 2002; Shimizu und Toh, 2009).

### **1.6. Hsp12 aus *S. cerevisiae***

1990 entdeckten Praekelt und Meacock ein etwa 12 kDa großes Protein in *S. cerevisiae*, welches unter Hitzestress stark überexprimiert wird. Genetische Untersuchungen ergaben, dass nur eine Kopie des *HSP12*-Gens auf Chromosom VI vorliegt (Stone et al., 1990). In seine Promotorregion sind neben einem HSE Element, das die starke Expression unter Hitzeschockbedingungen reguliert, mehrere STRE Elemente lokalisiert, die zu einer Repression der Expression von Hsp12 unter fermentativen Bedingungen führen (Varela et al., 1995). In der exponentiellen Wachstumsphase ist Hsp12 nur sehr schwach exprimiert, die Konzentration steigt aber in der stationären Phase oder nach Hitzestress um das 100fache an. Hsp12 scheint das Hsp in Hefe zu sein, bei dem die Expression durch eine Vielzahl an Stressarten am wesentlichsten hochreguliert wird (Ivorra et al., 1999; Simoes et al., 2003; Perez-Torrado et al., 2005). So konnte eine verstärkte Synthese bei hohen EtOH-Konzentrationen, oxidativem Stress, unter

## 1. Einleitung

Glukosemangel, unter Zellwandstress oder unter Einfluss toxischer Substanzen beobachtet werden (Stone et al., 1990; Jamieson et al., 1994; Piper et al., 1994; Varela et al., 1995; Kandrór et al., 2004). Umfassende genomische Expressionsanalysen, denen die Reaktion von *S. cerevisiae* auf veränderte Umweltbedingungen zugrunde lag, ergab, wie zu erwarten, dass Hsp12 ein Teil der allgemeinen Stressantwort (ESR) darstellt (Gasch und Werner-Washburne, 2002). Diese Eigenschaft macht Hsp12 zu einem wichtigen generellen Stressmarker, wie er in diversen Expressionsstudien und Untersuchungen zur Auswirkung von Stress auf Hefezellen genutzt wird (Ivorra et al., 1999; Simoes et al., 2003; Perez-Torrado et al., 2005; Karreman und Lindsey, 2005; Shamrock und Lindsey, 2008). In Abbildung 1.5. ist das Expressionsprofil von Hsp12 in *S. cerevisiae* Zellen dargestellt, die verschiedenen Umweltbedingungen ausgesetzt waren.



Die Funktion von Hsp12 ist bis heute weitgehend ungeklärt. So wiesen *HSP12* Deletionsmutanten keinen Wachstumsdefekt auf und die Deletion hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen (Praekelt und Meacock, 1990). Eine allgemeine Proteinlokalisationsstudie identifizierte Hsp12 ausschließlich im Zytosol (Huh et al., 2003), wohingegen andere Analysen eine Zellwandassoziation feststellten (Motshwene et al., 2004). Aufgrund seiner geringen Größe und der Überexpression unter Hitzestress, wurde Hsp12 neben Hsp26 und Hsp42 in die Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) eingeordnet (Praekelt und Meacock, 1990). Ein Sequenzvergleich mit diesen Proteinen lässt allerdings keine deutlichen Homologien in der für sHsps typischen und hochkonservierten  $\alpha$ -Kristallindomäne erkennen (Stone et al., 1990; Praekelt und Meacock, 1990). Des Weiteren war für Hsp12 keine

für sHsps häufig beschriebene Chaperonfunktion (Jakob et al., 1993) nachzuweisen (Fischer, 1999). Und auch die Ausbildung der für sHsps typischen hocholigomeren Komplexe konnte nicht für Hsp12 gezeigt werden (Fischer, 1999). Untersuchungen zum strukturellen Verhalten von Hsp12 ergaben hingegen, dass sowohl das rekombinante aus *E. coli* als auch das aus *S. cerevisiae* gereinigte Hsp12 in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegt. Dementsprechend konnte Hsp12 den nativ entfalteten Proteinen zugeordnet werden (Fischer, 1999). Erst durch die Bindung von SDS und Derivaten wurde  $\alpha$ -helikale Struktur in Hsp12 induziert (Fischer, 1999; Stromer et al., 2004; Meinschmidt, 2006). Dabei ragen die geladenen Reste der Helices nach außen und interagieren mit den negativen Kopfgruppen des SDS. Ungeladene Aminosäuren sind in die SDS-Mizelle gerichtet, wodurch hydrophobe Interaktionen ermöglicht werden (Dehner, 2004).

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

### 1.7. Fragestellung

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

Ursprünglich zählte es zu der Familie der kleinen Hitzeschockproteine (sHsps), allerdings konnte diese Annahme widerlegt werden. Hsp12 besitzt weder die typische  $\alpha$ -Kristallindomäne noch konnte die Ausbildung hocholigomerer Komplexe beobachtet werden. Auch die für sHsps typische Fähigkeit, Proteinaggregation zu unterdrücken, ließ sich für Hsp12 nicht ausmachen. Stattdessen konnte es der Gruppe der nativ entfalteten Proteine zugeordnet werden (Stromer et al., 2004). Unter physiologischen Bedingungen liegt es unstrukturiert vor und erst durch die

Bindung an SDS bzw. ähnlichen Verbindungen (Meinlschmidt, 2006) nimmt es  $\alpha$ -helikale Struktur an. Dies könnte auf eine *in vivo* Lokalisation an Membranen hindeuten. In dieser Arbeit sollte eine mögliche Bindung an und die Interaktion mit verschiedenen Lipiden und Modellmembranen (Lipid Rafts) genauer analysiert werden. So könnte ein eventueller Zusammenhang zwischen der Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur und der Funktion von Hsp12 hergestellt werden. Dabei sollte untersucht werden, ob Hsp12 in Lipiddoppelschichten integrieren, oder diese durchqueren kann, oder ob es lediglich an die Membranoberfläche bindet. Die Interaktion von Hsp12 mit mizellenartigen und vesikulären Strukturen könnte auf eine Rolle des Proteins bei der Stabilisierung oder der Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen hindeuten. Mit Hilfe von Fluiditätsmessungen von Lipidvesikeln mit und ohne Hsp12 oder der Plasmamembranen ganzer Wildtyp- und  $\Delta HSP12$ -Zellen könnten deren physikalischen Eigenschaften analysiert und miteinander verglichen werden. Eine Lipidanalyse der Gesamtmembranen bei physiologischen Bedingungen und nach Hitzestress von Wildtyp- und  $\Delta HSP12$ -Zellen sollte über mögliche veränderte Lipidzusammensetzungen Aufschluss geben. Vergleichende Proteomanalysen dieser beiden Zelltypen würden darüber hinaus aufzeigen, wie in  $\Delta HSP12$ -Zellen der Verlust von Hsp12 kompensiert wird. Die Induktion anderer Proteine bestimmter Funktionen könnte einen Einblick in den Aufgabenbereich von Hsp12 liefern.

Hsp12 kann bis heute keinem Zellkompartiment in lebenden Hefezellen eindeutig zugeordnet werden. Es wird sowohl im Zytoplasma, an der Plasmamembran als auch in der Zellwand vermutet. Eine Klärung der subzellulären Lokalisierung könnte vielleicht auch die Frage nach der Funktion beantworten. Durch Fraktionierungen ganzer Hefezellen im Saccharosegradienten oder durch differentielle Zentrifugation und anschließender Zuordnung der Fraktionen zu einem Zellkompartiment mittels Markerproteine sollte Hsp12 in lebenden Zellen lokalisiert werden können.

Es ist kein Phänotyp von  $\Delta HSP12$  Zellen bekannt, der die genaue zelluläre Funktion dieses Proteins beschreiben könnte. Selbst eine Aufgabe bei Hitzestress, bei dem es hundertfach überexprimiert wird, ist fraglich. Es besitzt keine Chaperonfunktion, bindet nicht an Aktin oder Ribosomen und es konnten keine Interaktionspartner identifiziert werden (Fischer, 1999; Meinlschmidt, 2006). Allerdings waren morphologische Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu sehen (Haslbeck et al., 2004a). In dieser Arbeit sollten die Struktur und Funktion von Hsp12 und  $\alpha$ -

helikaler Deletionsmutanten mit verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Techniken untersucht werden. Eine nähere Untersuchung der Zellmorphologie mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie, und die Suche nach Wachstumsdefiziten (nach verschiedenen Stressarten) bzw. Lokalisationsstudien mit Hilfe verschiedener Hsp12-Fragmente sollte über die funktionelle Eigenschaften von Hsp12 Auskunft geben. Die morphologischen Veränderungen der  $\Delta HSP12$ -Zellen könnten auf einen Defekt in der Zellhülle hindeuten. Die Deletion oder Mutation bestimmter Sequenzbereiche von Hsp12, die in Anwesenheit von Vesikeln oder SDS  $\alpha$ -helikale Struktur annehmen können, und die *in vivo* und *in vitro* Analyse dieser Hsp12-Fragmente könnte außerdem mögliche strukturell wichtigen Bereiche von Hsp12 identifizieren lassen.

Mit dieser Aufgabenstellung sollte ein außergewöhnliches Hitzeschockprotein und dessen Deletionsmutanten analysiert werden, die sich strukturell und funktionell von allen anderen Hsps stark unterscheiden, da Hsp12 ein nativ nicht gefaltetes Protein ist, das durch Membraninteraktion Struktur annimmt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Acrylamidlösung (38% mit 2% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe, D
Agar Bacteriological	
Agarose	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roche, Mannheim, D
Ammoniumsulfat	VWR, Darmstadt, D
Ampicillin, Na-Salz	Sigma, St. Louis, USA
Becton Agar	
Becton Peptone	Disco, Detroit, USA
Becton Typhoon	Disco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
Calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28)	Sigma, St. Louis, USA
Chaps	Sigma, St. Louis, USA
Chloroform	VWR, Darmstadt, D
Complete Protease Inhibitor Mix G	Serva, Heidelberg, D
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg, D
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt, D
DMPC	Avanti Lipids, USA
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	
DMPG	Avanti Lipids, USA
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]	
Dithiothreit	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, p.a.	Sigma, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Formaldehyd	
Glycerin, 99 %	ICN, Costa Mesa, USA
Glutaraldehyd, 25 %	Serva, Heidelberg, D
Harnstoff	VWR, Darmstadt, D

## 2. Material und Methoden

---

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

## 2. Material und Methoden

---

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN, Costa Mesa, USA
Yeast Nitrogene Base (YNB)	Difco, Detroit, USA

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

### 2.1.2. Größenstandards und Kits

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

### 2.1.3. Proteine und Antikörper

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim, D
Lytikase	Sigma, St. Louis, USA
Pwo-DNA-Polymerase	Sigma, St. Louis, USA
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim, D
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, D
T4-Ligase	Promega, Madison, USA
Hifi-Polymerase	Roche, Mannheim, D
Polyklonales Serum gegen HSp12 (Hase)	Dr. Pineda Antikörper Service, Berlin, D
Polyklonales Serum gegen Aktin (Hase)	Dr. Pineda Antikörper Service, Berlin, D
Polyklonales Serum gegen Pcs60	Prof. Erdmann, Bochum, D
Polyklonales Serum gegen Fbp1	Prof. Erdmann, Bochum, D
Polyklonales Serum gegen Kar2	Prof. Erdmann, Bochum, D
Polyklonales Serum gegen Pep12	Prof. Erdmann, Bochum, D



## 2. Material und Methoden

---

Polyklonales Serum gegen Porin	Prof. Erdmann, Bochum, D
Polyklonales Serum gegen Gas1	Prof. Erdmann, Bochum, D
Ployklonales Serum gegen ALP	Prof. Erdmann, Bochum, D
Monoklonales IgG-POD Konjugat gegen Hasen-IgG (Schaf)	Sigma, St. Louis, USA
Hsp12 und Fragmente	Sylvia Welker (TUM)
C <sub>L</sub>	Matthias Feige (TUM)

### 2.1.4. Chromatographiematerialien

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

### 2.1.5. Sonstige Materialien

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

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

### 2.1.6. Geräte

*Absorptionsspektrophotometer:*

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

Novospec II visible (GE biosciences, Freiburg, D)

## 2. Material und Methoden

---

### *Circulardichroismus-Spektropolarimeter:*

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

### *Fluoreszenz-Spektrophotometer:*

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

### *Chromatographieanlagen:*

FPLC-Anlage (GE Biosciences, Freiburg, D)

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

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

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

FP-1520 Fluoreszenz Detektor (Jasco, Groß-Unstadt, D)

UV-1575 UV-Vis Detektor (Jasco, Groß-Unstadt, D)

### *Gelelektrophorese- und Blotapparaturen:*

RHU10X (Roth, Karlsruhe, D)

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

Fast Blot B44 Apparatur (Biometra, Göttingen, D)

### *Mikrokalorimeter:*

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

Thermo Vac (MicroCal Incorporated, Northampton, USA)

VP-DSC MicroCalorimeter (MicroCal, Northampton, USA)

### *Mikroskopie:*

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Jena, D)

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

CCD-Kamera (Hamamatsu, Herrsching, D)

Rasterelektronenmikroskop (Jeol, Eching, D)

Sputter (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein)

Konvokales Mikroskop

### *Spannungsquellen:*

## 2. Material und Methoden

---

LKB-GPS 200/400 (GE Biosciences, Freiburg, D)

EPS 3500, 301 und 1001 (GE Biosciences, Freiburg, D)

### *Waagen:*

Analysewaage BP 121 S (Sartorius, Göttingen, D)

Halbmikrowaage BL 310 (Sartorius, Göttingen, D)

### *Zentrifugen:*

Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, D)

Rotina 46 R Kühlzentrifuge (Hettich, Tuttlingen, D)

Avanti J25 mit JA-10 und Ja-25.50 Rotoren (Beckman, Wien, Österreich)

Optima™ Max-E Ultrazentrifuge (Beckman, Wien, Österreich)

### *Weitere Geräte:*

-80 °C Kühlschranks CFC Free

Sanyo, München, D

Autoklav-Dampfkessel (TRD) 601 MM

H+P, Oberschleißheim, D

Digitalthermometer mit Thermofühler

Keithley, Cleveland, USA

Elektroporator

Peqlab, Erlangen, D

Eismaschine

Ziegra, Iserhagen, D

Entwicklermaschine Optimax TR

MS Laborgeräte, Heidelberg, D

Eppendorf-Thermomixer

Eppendorf, Hamburg, D

Ettan dalt II

GE Healthcare, Freiburg, D

Geldokumentationssystem Biodoc II

Biometra, Göttingen, D

Kulturschüttler Certomat S

Braun Biotech, Melsungen, D

Magnetrührer Heidolph MR 2000

Heidolph, Kelheim, D

Massenspektrometer Ultraflex

Bruker Daltronics, Bremen, D

(MALDI/TOF/TOF)

Metallthermoblock TB1

Biometra, Göttingen, D

IPGphor

GE Healthcare, Freiburg, D

pH-Meter

WTW, Weilheim, D

Reagenzglasroller

Heidolph, Kelheim, D

Schwenktisch Polymax 1040

Heidolph, Kelheim, D

Thermocycler Primus

MWG, Ebersberg, D

Ultraschallaufschlussgerät Sonifier B-12

Branson, Danbury, USA

## 2. Material und Methoden

---

Ultraschallbad Sonesorex RK 100H	Brandelin, Berlin, D
Umluftinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D
Wasserbad Haake F6-K	Haake, Karlsruhe, D
Zellaufschlussgerät Basic Z	Constant Systems, Warwick, England

### 2.1.7. Computerprogramme

Adobe Photoshop 9.0	Adobe Inc., San Jose, USA
Adobe Illustrator 12.0	Adobe Inc., San Jose, USA
Adobe Reader 7.0	Adobe Inc., San Jose, USA
BLAST	
ClustalW	
Microsoft Office XP	Microsoft, Unterschleißheim, D
Origin 7.5	OriginLab Corp., Northampton, USA
ProtParam Tool Expasy	<a href="http://expasy.org">http://expasy.org</a>

## 2.2. Verwendete Organismen und deren Kultivierung

### 2.2.1. Stämme

Tabelle 2.1. fasst die in dieser Arbeit verwendeten Organismen zusammen.

Bakterienstämme	Geno-/Phänotyp	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>araD</i> 139Δ( <i>ara leu</i> ) 7697Δ <i>lacX74 galU galK</i> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr- hsdRMS-</i> <i>mcrBC</i> ) <i>rpsL decR</i> 380 Δ <i>lacZ</i> ΔM15 <i>endA1 nupG recA1</i>	(Jessee, 1986)
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (rR- mR-) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1</i> <i>galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	(Bolivar und Backman, 1979) 1979; (Roulland-Dussoix und Boyer,

## 2. Material und Methoden

		1969)
<i>E.coli</i> BL21DE3	F-omp T lon(rB-mB-)	Stratagene, La Jolla, USA
<b>Hefestämme</b>		
BY4741	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0	Euroscarf
$\Delta$ Hsp12 BY4741	BY4741; Mat a; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YFL014w::kanMX4	Euroscarf
Y2454	Mat $\alpha$ ; mfa1 $\Delta$ ::MFA1pr- HIS3 can1 $\Delta$ ; lys2 $\Delta$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0	Tong et al., 2001
$\Delta$ Hsp12 Y2454	Mat $\alpha$ ; mfa1 $\Delta$ ::MFA1pr- HIS3 can1 $\Delta$ ; lys2 $\Delta$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YFL014w::kanMX4::natMX	diese Arbeit

**Tabelle 2.1. Bakterien- und Hefestämme**

### 2.2.2. Medien

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

LB <sub>0</sub> :	Bacto Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
	Mit NaOH auf pH 7,2 einstellen.	
	Für LB <sub>0</sub> -Platten: 15 g Bacto Agar zusätzlich!	

Selektion bei *E.coli*:

Ampicillin	100 $\mu$ g/ml
Kanamycin	35 $\mu$ g/ml

Folgende Medien wurden zur Anzucht von Hefestämmen verwendet:

YPD:	Hefeextrakt	5 g
------	-------------	-----

## 2. Material und Methoden

---

Bacto Pepton	10 g
Glukose	20 g
1 M NaOH	1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Für YPD-Platten: 15 g bacto Agar zusätzlich!	

CSM:	Yeast Nitrogen Base	6,7 g
	Selektiv-Aminosäure-Mix	1,4 g
	Glukose	20 g
	1 M NaOH	1 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Für Platten: 20 g Bacto Agar zusätzlich!		

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

Uracil	2,0 g
Valin	2,0 g

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

### 2.2.3. Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli*

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

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

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

### 2.2.4. Kultivierung und Konservierung von *S. cerevisiae*

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

Das Wachstum der Zellen wurde photometrisch bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) verfolgt. Dabei entspricht eine OD<sub>600</sub> von eins etwa  $10^8$  Zellen/ml (Walker, 1999). Die Hefestämme wurden für kurze Zeit als stationäre Flüssigkulturen bei 4 °C oder Raumtemperatur gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden 700 µl einer exponentiell

## 2. Material und Methoden

---

wachsenden Flüssigkultur mit 300 µl sterilem 50%igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.5. Temperatur Screen

Hefezellen wurden in YPD Medium bei 30 °C bis zur mittelexponentiellen Phase ( $OD_{600} = 0.6$ ) kultiviert. Nach 48 h wurden die Hefezellen auf morphologische Veränderungen mikroskopisch untersucht. Das Zellwachstum von Wildtyp- und  $\Delta$ Hsp12-Zellen wurde untersucht, indem man jeweils 3 µl einer 10-fach Verdünnungsreihen der entsprechenden exponentiell wachsenden Zellen auf Agaroseplatten aufbringt, und diese bei unterschiedlichen Temperaturen (z.B. 8 °C, 20 °C) kultiviert. Um das Überleben nach einem Hitzeschock zu untersuchen, wurden die Zellen bei 30 °C bis zur exponentiellen Phase herangezogen und danach für 20 min bei 58 °C inkubiert und bei 30 °C auf Agaroseplatten ausplattiert.

### 2.2.6. Alterung von Hefezellen (Aging)

Die Zellmenge eines Aliquots einer Zellkultur wurde in einer Neubauerzählkammer gezählt und 1:10000 mit destilliertem Wasser verdünnt. 1000 Zellen wurden auf eine YPD Platten ausplattiert und bei 30 °C für 24 h inkubiert, danach bei 4 °C über 90 Tage gelagert. Die Anzahl der überlebenden Kolonien wurde alle zwei Tage aufgenommen.

## 2.3. Molekularbiologische Arbeitstechniken

### 2.3.1. Plasmide

Folgende Plasmide wurden verwendet bzw. in dieser Doktorarbeit hergestellt.

Vektor	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pET21a	AmpR, lac Promotor/Operator-Element	EMD Bioscience inc, San Diego, USA
pET21a-A84P	Hsp12 mit A84P Mutation; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert	diese Arbeit
pET21a- $\Delta$ N10	Hsp12 mit N-terminaler Deletion von 10	diese Arbeit



## 2. Material und Methoden

	Aminosäuren; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert	
pET21a- ΔN24	Hsp12 mit N-terminaler Deletion von 24 Aminosäuren; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert	diese Arbeit
pET21a- ΔN39	Hsp12 mit N-terminaler Deletion von 39 Aminosäuren; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert	diese Arbeit
pET21a- ΔC13	Hsp12 mit C-terminaler Deletion von 13 Aminosäuren; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert	diese Arbeit
pET21a- ΔC36	Hsp12 mit C-terminaler Deletion von 36 Aminosäuren; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert	diese Arbeit
pET21a- ΔC54	Hsp12 mit C-terminaler Deletion von 54 Aminosäuren; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert	diese Arbeit
p2UGPD	pRS426, GPD Promotor EcoR1/BamHI inseriert	(Christianson et al., 1992)
pMH1	<i>HSP12</i> über BamHI/NotI inseriert in p2UGPD	(Haslbeck, 2001)
pMH2	<i>HSP12</i> über NdeI/XbaI in p11395 inseriert	(Haslbeck, 2001)

## 2. Material und Methoden

p2Unp <i>HSP12</i>	natürlicher Promotor von <i>HSP12</i> aus <i>S. cerevisiae</i> über EcoR1/BamHI inseriert in pMH1	diese Arbeit
Synthetic lethal screen: $\Delta$ Hsp12		diese Arbeit
p2Unp – $\Delta$ N8	AS 9 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – $\Delta$ N10	AS 11 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – $\Delta$ N23	AS 24 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – $\Delta$ N24	AS 25 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – $\Delta$ N39	AS 40 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – $\Delta$ N49	AS 50 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über	diese Arbeit

## 2. Material und Methoden

	BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	
p2Unp – ΔN56	AS 57 – 109 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔC9	AS 1 – 100 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔC13	AS 1 – 96 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔC27	AS 1 – 82 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔC35	AS 1 – 74 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔC36	AS 1 – 73 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit
p2Unp – ΔC52	AS 1 – 57 von Hsp12;	diese Arbeit

## 2. Material und Methoden

	Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	
p2Unp – ΔC54	AS 1 – 55 von Hsp12; Nukleotidsequenz über BamHI/NotI inseriert in p2U mit natürlichem <i>HSP12</i> Promotor	diese Arbeit

**Tabelle 2.2. Plasmide**

### 2.3.2. Oligonukleotide

In Tabelle 2.3. sind die für PCR-Reaktionen und für Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWGBiotech (Ebersberg, D) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' 3')
Hsp12-BamHI-5'	GATCGGATCCATGCTTCTTGGTTGGGT CTTCTTC
Hsp12-NotI-3'	ATG CGG CCG CTT ACT TCT TGG TTG GGT C
ΔN8-Hsp12-BamHI	TA GGA TCC ATG GGA TTC GGT GAA AAA
ΔN10-Hsp12-BamHI	TAG GAT CCA TGG AAA AAG CTT CTG AAG C
ΔN23-Hsp12-BamHI	TA GGA TCC ATG AAG TCA TAC GCT GAA
ΔN24-Hsp12-BamHI	TAG GAT CCATG T ACG CTG AAC AAG GTA AG
ΔN39-Hsp12-BamHI	TAG GAT CCA TGG TCG CTG GTA AGG TTC AAC
ΔN49 -Hsp12-BamHI	TA GGA TCC ATG AAC AAG GGT GTC TTC
ΔN56-Hsp12-BamHI	TA GGA TCC ATG GTC CAC GAC TCT

## 2. Material und Methoden

	GCC
$\Delta$ C9-Hsp12-NotI	ATG GCG GCC GC T TA C ACC CGC CCC GAC ACG TA
$\Delta$ C13-Hsp12-NotI	ATG GCG GCC GC T TA G GAA ACA TAT TCG ACG GC
$\Delta$ C27-Hsp12-NotI	ATGC GGC CGC TT A TCC CAT GTA ATC TCT AGC
$\Delta$ C35-Hsp12-NotI	ATGC GGC CGC TT A TGC CAA AGA TTC ACC
$\Delta$ C36-Hsp12-NotI	ATG GCG GCC GC T TA C AAA GAT TCA CCT TGA CCT TC
$\Delta$ C52-Hsp12-NotI	ATGC GGC CGC TT A GTC GTG GAC ACC TTG
$\Delta$ C54-Hsp12-NotI	ATG GCG GCC GCT TA GAAGACACCCTT GTTGTCTTG
T7-prom (Sequenzierung)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7-term (Sequenzierung)	CAC ACA GGA AAC AGC TAT

**Tabelle 2.3. Für PCR-Reaktionen bzw. Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide**

### 2.3.3. Lösungen für molekularbiologische Methoden

TAE (50x):	Tris/Acetat pH 8,0	2 M
	EDTA pH 8,0	50 mM
Gelauftragspuffer (10x):	Glycerin	50 % (v/v)
	EDTA (pH 8,0)	10 mM
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Xylencyanol	0,2 % (w/v)
1 % ige Agarose-Lag:	Agarose	1 g
	TAE (1x)	100 ml
	Ethidiumbromid	1 $\mu$ l
Lyselösung:	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)

## 2. Material und Methoden

---

dNTP-Mix:	dATP	10 mM
	dGTP	10 mM
	dCTP	10 mM
	dTTP	10 mM
Lösung A:	3 M NaAc (pH 5,5)	13 ml
	1 M CaCl <sub>2</sub>	100 ml
	2,8 M MnCl <sub>2</sub>	25 ml
	H <sub>2</sub> O	862 ml
	sterilfiltriert	
Lösung A - Glycerin:	Glycerin (87%)	69 ml
	Lösung A	331 ml
Suspensions- Puffer:	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
	Lytikase	4,5 U/μl
	Triton X-100	2 % (v/v)
Lyse-Puffer:	SDS	1 % (v/v)
	NaCl	100 mM
	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
TE 10.1:	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
Glass Beads (425-600 μm):	5 h in HNO <sub>3</sub> konz. waschen; mit H <sub>2</sub> O spülen und bei 180 °C trocknen	
Puffer 1:	Tris/HCl (pH 7,4)	10 mM
	EDTA	2 mM
Puffer 2:	PEG 3350	35 % (w/v)
	Ethylenglycol	5 % (v/v)

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

### **2.3.4. Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae***

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

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

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

### **2.3.6. Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese**

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

### **2.3.7. DNA-Isolierung aus Agarosegelen**

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

### **2.3.8. Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten**

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

### **2.3.9. DNA-Sequenzanalyse**

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

### **2.3.10. Transformation von *E. coli***

Für die Transformation von *E. coli* wurden die zu transformierenden Stämme nach Sambrook *et al.* (1989) kompetent gemacht (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde eine frische 100 ml *E. coli*-Flüssigkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 1,0 mit 2 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> versetzt und 10 min weiter inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 60 min auf Eis gekühlt, 5 min bei 4°C abzentrifugiert, das Sediment in 20 ml Lösung A resuspendiert und weitere 60 min auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4°C wurde das Sediment in 2 ml Lösung A - Glycerin aufgenommen und die Zellen in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden entweder direkt mit Plasmid-DNA transformiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden je 100 µl kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA vermischt und 15 - 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend einem einminütigen Hitzeschritt bei 42°C unterzogen, wieder auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 900 µl LB<sub>0</sub>-Medium 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen, das Bakteriensediment im verbliebenen Medium resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

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

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



## 2. Material und Methoden

---

kompetenten Zellen wurden schließlich in 1 ml 0,1 M LiAc/TE 10.1 resuspendiert und innerhalb der nächsten 5 h verarbeitet.

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

### 2.3.12. PCR-Amplifikation

Mit der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wurden gezielt DNA-Bereiche aus dem Hefegenom oder aus plasmidcodierten cDNAs amplifiziert. Diese wurden in der Folge für die Klonierung in verschiedene Plasmide verwendet. Um die Fehlerrate bei der PCR zu minimieren wurden Polymerasen mit 3`-5` Exonukleaseaktivität (*proof reading*-Aktivität; *Pwo*-DNA-Polymerase) verwendet.

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

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

Template DNA	1 µl (ca. 50 ng)
10 x Reaktionspuffer	10 µl
dNTP-Mix	2 µl
Primer(50 pmol/µl)	je 1 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	85 µl

## 2. Material und Methoden

---

Grundsätzlich wurde die sogenannte *hot start* Methode verwendet. Hierbei wurde die DNA-Polymerase erst zugegeben, wenn der Ansatz bereits auf 95 °C erhitzt war. Die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte wurde auf diese Art vermindert und die Ausbeute an PCR-Produkten erhöht.

Die PCR-Amplifikationen wurden im Thermocycler Primus durchgeführt. Die Einstellungen des Thermocyclers wurden je nach Primerpaar und verwendeter DNA-Polymerase variiert. In der Regel wurden 35 Zyklen durchlaufen, wobei folgende Standardbedingungen verwendet wurden:

Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	60 °C	30 s
Synthese	72 °C	etwa 1,5 min pro 1 kB Insertgröße

### 2.3.13. DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Sowohl zur analytischen Kontrolle eines Plasmids, als auch zur präparativen Gewinnung von geschnittenen DNA-Fragmenten wurden Restriktionsverdau durchgeführt. Je nach Zielsetzung wurden unterschiedliche Ansatzvolumina gewählt. Für die analytische Spaltung wurden 10 µl Plasmid-DNA mit 3 Units (meist 0,3 µl) des jeweiligen Restriktionsenzym versetzt. Die Spaltung erfolgte unter Zusatz von 0,1 Ansatzvolumina des entsprechenden, vom Hersteller beigefügten 10x Restriktionspuffers. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gewählt. Im Anschluss wurde die Spaltung durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.3.7.) verifiziert.

Für die präparative Spaltung von DNA wurde etwa 30 µl Plasmid-DNA oder gereinigte PCR-DNA mit 20 Einheiten des Restriktionsenzym und 0,1 Ansatzvolumina 10x Restriktionspuffer versetzt und das gewünschte Spaltprodukt nach Ablauf der Inkubationszeit gereinigt.

### 2.3.14. Dephosphorilierung von DNA-Enden

Um das Religieren von geschnittenen Plasmiden (Vektoren) auszuschließen, wurden diese im Anschluss an den Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase behandelt. Hierfür wurde eine Unit (meist 4 µl) Alkalische Phosphatase und 0,1 Ansatzvolumina 10x Phosphatase-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde 60 min bei

## 2. Material und Methoden

---

37 °C inkubiert und das DNA-Fragment anschließend mit Hilfe des *PCR Produkt Purification Kits* gereinigt.

### 2.3.15. Ligieren von DNA-Fragmenten

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

## 2.4. Proteinanalytische Arbeitstechniken

### 2.4.1. Lösungen für proteinchemische Methoden

Laufpuffer (10x)	Tris	0,25 M
	Glycin	2 M
	SDS	1 % (w/v)
5x-Laemmli Auftragspuffer	SDS	10 % (w/v)
	Glycerin	50 % (w/v)
	Tris	300 mM
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Trenngelpuffer (4x)	SDS	0,8 %
	Tris/HCl, pH 8,8	5 M
Sammelgelpuffer (2x)	SDS	0,4 %
	Tris/HCl, pH 6,8	0,25 M
	Acrylamid Acrylamid/Bisacrylamid (38:2)	40 % (w/v)
Transferpuffer	Glycin	36 g
	Tris	7,6 g
	Methanol	500 ml
	SDS	0,3% (w/v)
	H <sub>2</sub> O	ad 2,5 l

## 2. Material und Methoden

---

TBS (-T)	Tris	6 g
	NaCl	20 g
	H <sub>2</sub> O	ad 2,5 l
	→ mit HCl pH 7,6 einstellen	
	(Tween-20	2,5 ml)
PBS (-T)	NaCl	5,84 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,96 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
	(Tween-20	1 ml)
Stripping Puffer	SDS	2 %
	Tris/HCl (pH 6,7)	62,5 mM
	2-Mercaptoethanol	100 mM

### 2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

Die Auftrennung erfolgt auf vertikalen 7 x 9 x 0,075 cm großen SDS-PAGE-Gelen in einer SDS-PAGE-Elektrophoreseapparatur 45 min bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA je Gel. Die Proteinlösungen wurden vor der Elektrophorese mit 0,2 Volumen 5x Laemmli- Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt.

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurde je nach Größe entweder LMW-Standard oder HMW-Standard mit auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

### 2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung eines Farbstoffes vor allem an basische und aromatische Aminosäuren in Proteinen. Aus der Bindung resultiert eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm (rot-violett) nach 595 nm (blau). Die kommerziell erhältliche Färbelösung (Coomassie Protein Assay Reagent; Pierce, Rockford, USA) wurde vor Gebrauch 1:1 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt. Je 1 ml dieser Lösung wurden mit 100 µl Probe versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm

bestimmt. Die Proteinkonzentration kann dann über eine BSA-Eichgerade ermittelt werden. Dabei wird angenommen, dass der Farbstoff mit dem untersuchten Protein in der gleichen Effizienz wechselwirkt wie mit BSA.

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

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

Verwendete Lösungen:

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

### 2.4.5. Immunoblotting (Western Blot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer *Semi Dry* Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen, Deutschland) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Für den Übertragungsvorgang wurde ein Stapel aus 3× Whatman 3MM Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, SDS-PAGE-Gel, 3× Whatman 3MM Filterpapier in die Blot-Apparatur eingespannt. Alle Komponenten wurden vorher 10 min in Transferpuffer eingelegt. Die Übertragung erfolgte 1 h bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup> SDS-PAGE-Gel (72 mA je Gel). Der Transfer wurde durch transiente Färbung mit Ponceau S (1 min färben, mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O) überprüft.

Um unspezifische Bindestellen abzudecken wurde die Nitrocellulose-Membran mit den transferierten Proteinen mind. 30 min in PBS-T mit 1% Magermilchpulver inkubiert. Die Membran wurde dann mit primärem Antikörper in PBS-T/1% Magermilchpulver überschichtet und 60 min inkubiert. Die verwendete Konzentration des primären Antikörpers richtet sich nach dem Antikörpertyp und wurde individuell eingestellt. Die Membranen wurden anschließend 3× 5 min mit PBS-T gewaschen.

## 2. Material und Methoden

---

Nun wurde der primäre Antikörper 60 min mit einem sekundären Antikörper (meist Kaninchen-antiMaus-IgG-Antikörper-Peroxidase-Konjugat, Sigma, St. Louis, USA; 1:4000 verdünnt) komplexiert.

Nach mehreren Waschschritten wurde dieses Antikörper-Enzym-Konjugat mittels ECL nachgewiesen. Bei dieser Reaktion katalysiert die Peroxidase in Anwesenheit von  $H_2O_2$  die Oxidation von zyklischem Diacylhydrazin-Luminol, wobei Licht freigesetzt wird (Chemolumineszenz). Jede Nitrocellulose-Membran wurde dazu mit 2 ml einer 1:1 Mischung aus  $H_2O_2$ -Lsg. (ECL2) und Luminol (ECL1) überschichtet, zwischen Plastikfolien gelegt und ein bis 60 min exponiert. Die Lichtreaktion wurde auf Röntgenfilmen (X-Omat, Kodak, Rochester, USA) detektiert.

### **2.4.6. Herstellung von Small unilamellar Vesicles (SUV)**

Jeweils 3 mg Lipid wurden in Chloroform/Methanol (1:1 (v/v)) in einem Glasgefäß gelöst, mit Hilfe von Stickstoff abgedampft und im Vakuumschrank (Kendro, München, D) bei 700 Torr und Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Derart getrocknete Lipidproben wurden abgewogen und konnten sofort weiter verarbeitet, oder bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

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

### **2.4.7. Interaktionsanalysen mittels Differentialkalorimetrie (DSC)**

Energie, die als Wärme übertragen wird, kann mittels eines Kalorimeters gemessen werden. Wird eine Lipiddoppelschicht einer sukzessiven Temperaturerhöhung ausgesetzt, so vollzieht sich ein thermotroper Phasenübergang vom Gel zum flüssig-kristallinen Zustand (Beney und Gervais, 2001). Diese Phasenumwandlung ist mit der Entstehung von Wärme verbunden und kann mittels DSC dargestellt werden. Bekanntermaßen beeinflusst die Art und Weise der Interaktion mit Lipid und das Maß der Penetration eines Proteins in eine Lipiddoppelschicht das

thermotropische Verhalten des Lipid-Phasenübergangs (Papahadjopoulos et al., 1975; Ghosh et al., 1997). Aus diesem Grund wurde die DSC benutzt, um Bindung von Hsp12 an anionische oder zwitterionische Membranen zu messen.

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

### 2.4.8. Interaktionsanalyse mittels isothermischer Titrationskalorimetrie (ITC)

Kalorimetrie beruht auf der Detektion von Wärmeunterschieden, die durch thermodynamische Prozesse verursacht werden. Die Bindung zweier Substanzen aneinander ist häufig mit der Entstehung von Wärme oder der Absorption von Wärme verbunden. Somit kann die Analyse der Wechselwirkung zweier Substanzen durch kalorimetrische Methoden erfolgen kann (Jelesarov und Bosshard, 1999).

ITC wurde verwendet, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden oder zwischen zwei Proteinen thermodynamisch zu analysieren. Dazu wurden üblicherweise 2 ml einer etwa 20 µM Proteinlösung in der Messzelle temperiert und eine etwa 200 µM Lösung des anderen Proteins bzw. des Liganden in der Injektionsspritze vorgelegt. Die Injektionsspritze wurde in die Messzelle eingeführt. Nach Abschluss der Temperierungsphase wurde das Experiment gestartet und dabei 30-40 Injektionen des Liganden in die Messzelle vorgenommen. Die Analyse der dabei entstandenen Bindungsisotherme erfolgte mit Hilfe der Instrumentensoftware. Dieser liegen im wesentlichen folgende Gleichungen zugrunde:

$$Q_i = V_0 \cdot \Delta H \cdot \frac{1}{2} \left( (L_i + M_i + K_D) - \sqrt{(L_i + M_i + K_D)^2 - 4 \cdot L_i \cdot M_i} \right)$$

$$dQ = Q_i + dV \cdot \frac{Q_i + Q_{i-1}}{2 \cdot V_0} - Q_{i-1}$$

Dabei ergeben sich die Werte  $M_i$  und  $L_i$  aus den jeweiligen Konzentrationen der beiden Bindungspartner bei der  $x$ -ten Injektion, wie sie aus dem Experimentverlauf errechnet werden können. Der Wert  $dV$  entspricht dem Injektionsvolumen der  $x$ -ten Injektion und  $V_0$  dem Zellvolumen. Der Wert  $dQ$  ergibt sich somit als die Wärme, die bei der  $x$ -ten Injektion aufgrund der Bindungsreaktion freigesetzt wird.

Dieses Experiment wurde je nach den Erfordernissen der jeweiligen Wechselwirkung modifiziert. So erfordern insbesondere schwach affine Bindungen deutlich höhere Ligandenkonzentrationen als in obigem Standardprotokoll vorgesehen. Die jeweiligen Konzentrationen sind deshalb bei der Darstellung der Experimente erwähnt.

### **2.5. Chromatographie**

Die im Folgenden beschriebenen chromatographischen Methoden fanden bei der durchgeführten Proteinreinigung von Hsp12A<sub>84P</sub> Anwendung. Der Reinigungserfolg wurde nach jedem Schritt durch SDS-PAGE (siehe 2.4.2.) kontrolliert.

#### **2.5.1. Ionenaustauschchromatographie**

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

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



### **2.5.2. Gelfiltrationschromatographie**

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

### **2.6. Präparative Methoden**

#### **2.6.1. Zellaufschluss**

Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einer Zellaufschlussmaschine (BasicZ, Constant Systems, Warwick, England) mittels Prallstrahlverfahren. Dabei wird eine Suspension mittels einer Hochdruckpumpe auf Drücke von bis zu 2,5 kbar verdichtet und dann durch eine Düse entspannt. Nach dem Durchtritt durch die Düse wird die Suspension im Freistrahlfeld auf eine Prallplatte geführt, wo sie mit hoher Geschwindigkeit auftrifft. Die Beanspruchung der Zellen erfolgt sowohl durch Kavitationen im Bereich der Düse, als auch durch die schlagartige Verzögerung auf die Prallplatte. Der Aufschluss von Hefezellen erfolgte mit einem Druck von 2,5 kbar und einem Düsendurchmesser von 35 µm, der Aufschluss von *E. coli*-Zellen erfolgte mit einem Druck von 1,8 kbar. Vorhandene genomische DNA wurde beim *E. coli*-Aufschluss durch 20 s Ultraschall (Sonifier B-12, Branson, Danbury, USA) zerkleinert. Zur Abtrennung intakter Zellen, unlöslicher Bestandteile und von Zell- und Membrantrümmern wurde der *E. coli*-Zellaufschluss anschließend 60 min bei 30000 x g und 4 °C abzentrifugiert.

#### **2.6.2. Proteinexpressionsnachweis in Hefe**

Zum Nachweis der Hsp12-Expression in Hefe wurden Zellen bei 5000 Upm (TZ) für 5 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 50 µl 2 M NaOH resuspendiert und 10 min auf

## 2. Material und Methoden

---

Eis inkubiert. Dann wurden 50 µl 50%ige TCA zugegeben und das Sediment weitere 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 10 000 Upm (TZ) zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Sediment vollständig getrocknet. Danach wurde die Probe in 70 µl 1 x Laemmli resuspendiert und so lange 1 M Tris zugegeben, bis die Farbe von gelb nach blau umschlug. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot.

### 2.6.3. Aufkonzentrierung und Dialyse von Proteinen

Zur Aufkonzentrierung von Volumina über 5 ml wurde eine Amicon-Ultrafiltrationszelle (50 ml) eingesetzt. Als Membran dienten dabei für Hsp12 Fragmente Amicon YM3-Membranen mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa. Der Überdruck der Stickstoffbegasung von etwa 3 bar presst die Proteinlösung durch die Membran, wobei allerdings nur die Pufferlösung passieren kann und das Protein in der Zelle verbleibt. Um eine Erwärmung der Proteinlösung zu vermeiden, wurde die Amicon-Zelle auf Eis gekühlt.

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

### 2.6.4. Reinigung von Hsp12 und Hsp12-Fragmenten aus *E. coli*

Die Hsp12-Reinigung erfolgte leicht modifiziert nach dem bekannten Protokoll (Fischer, 1999). Hsp12 und Fragmente wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert. Zur Reinigung wurde der *E. coli*-Stamm BL21 DE3 verwendet, der mit dem Expressionsplasmid pET21a-Fragment transformiert war. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 angezogen und durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach einer vierstündigen Expression bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 5500 Upm, 8 °C; JA-10-Rotor; Beckman, Wien, Österreich) geerntet, in Aufschlusspuffer (10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) resuspendiert und wie unter 2.6.1 beschrieben aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Anionenaustauscherchromatographie (Q-Sepharose) aufgereinigt (Gradient von 10 bis 500 mM NaCl), die Hsp12 Fragmente enthaltenden Fraktionen gesammelt und einem Hitzeschritt für 18 Minuten bei 80 °C unterzogen. Die denaturierten, aggregierten Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (40 min, 14 000 Upm,

8°C; JA-25.50-Rotor; Beckman, Wien, Österreich). Die Hsp12 Fragmente blieben unter diesen Bedingungen fast ausschließlich im löslichen Überstand. Dieser Überstand wurde durch Ultrafiltration aufkonzentriert und in einem letzten Reinigungsschritt, der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75PG, GE Healthcare, Freiburg, D) sauber aufgereinigt.

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

### **2.6.5. Protease Verdau**

Zur Analyse der Proteinstabilität gegen proteolytischen Abbau wurde die Serin-Endopeptidase Proteinase K verwendet (Sigma, St Louis, USA). Dazu wurde Hsp12 (0.5 mg/ml) in An- oder Abwesenheit von DMPG mit Proteinase K (0.5 µg/ml) bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF gestoppt und anschließend durch MALDI Massenspektrometrie (MALDI MS; Ultraspec TOF/TOF, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) analysiert. Die durch BiTools Software detektierten Peptide wurden zur Hsp12-Proteinsequenz in Beziehung gesetzt (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

### **2.7. Spektroskopie**

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

#### **2.7.1. UV-Absorptionsspektroskopie und Bestimmung der Proteinkonzentration**

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

## 2. Material und Methoden

---

liegen als die des Phenylalanins und der Disulfidbrücken. In der folgenden Liste sind die molaren Extinktionskoeffizienten und die Wellenlänge maximaler Absorption der freien Aminosäuren in Wasser zusammengestellt (Cantor und Schimmel, 1980):

Aminosäure	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
Tryptophan	280	5600
Tyrosin	274	1400
Phenylalanin	257	200
Disulfidbrücke	250	300
Peptidbindung	190	~7000

Die UV-Absorptionsspektroskopie wurde vor allem verwendet, um die Konzentration von Proteinlösungen zu bestimmen. Dazu kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei bekanntem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1\%}$  die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm errechnet werden.

$$c = \frac{A}{\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1\%} \cdot d}$$

Dabei entspricht A der Absorption bei 280 nm,  $\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1\%}$  dem molaren Extinktionskoeffizienten, c der Proteinkonzentration in mol/l und d der Schichtdicke der Küvette in Zentimetern. Der Extinktionskoeffizient lässt sich für Proteine aus der Aminosäurezusammensetzung ermitteln. Dazu wurde das Programmpaket ProtParam verwendet. Dieses führt die Berechnung basierend auf der Methode nach Wetlaufer (Wetlaufer, 1962) automatisch durch. Nach diesem Verfahren wird  $\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1\%}$  aus den bekannten Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bestimmt, wobei der Beitrag der Aminosäuren Phenylalanin und Cystein vernachlässigt wird.

$$\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1\%} = \frac{Anz_{Trp} \cdot \epsilon_{280 \text{ nm}, Trp} + Anz_{Tyr} \cdot \epsilon_{280 \text{ nm}, Tyr}}{M}$$

Dabei entsprechen die Koeffizienten  $Anz_{Trp}$  und  $Anz_{Tyr}$  der Anzahl der jeweiligen Aminosäure im Protein. Die molaren Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin ergeben sich bei 280 nm in wässriger Lösung zu  $5600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  bzw.  $1340 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

In allen UV-Absorptionsexperimenten wurden Quarzglas Suprasil Küvetten (Starna GmbH, Pfunderstadt, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1-10 mm verwendet.

### 2.7.2. Fluoreszenzpolarisation und Probenvorbereitung

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

Bei Fluoreszenzanisotropie- oder Fluoreszenzpolarisations-Messungen werden herkömmliche Fluorimeter verwendet, bei denen sowohl in den Anregungs- als auch in den Emissionsstrahlengang zusätzlich zum Monochromator je ein Polarisator installiert ist. Die Anregung der Moleküle/Proteine erfolgt mit monochromatischem, vertikal linear polarisiertem Licht. Mit Anisotropiemessungen wird die durchschnittliche Winkelverschiebung des Emissionsdipolmomentes im Zeitraum zwischen Absorption und anschließender Emission von Photonen erfasst. Diese Verschiebung ist abhängig von der Rotationsdiffusion des Fluoreszenzfarbstoffes während der Lebenszeit des angeregten Zustandes.

Um dies zu bestimmen wird die Fluoreszenzintensität einmal bei vertikal und einmal bei horizontal gestelltem Emissionspolarisation gemessen. Die Membranfluidität ganzer Zellen wurde mittels Fluoreszenzanisotropie unter Verwendung des spezifischen Plasmamembran-Fluoreszenzfarbstoffes Diphenylhexatrien (DPH) bestimmt. Dieses Molekül taucht zum einen tief in die Lipiddoppelschicht ein (Kaiser und London, 1998), zum anderen wird die Fluoreszenz von DPH durch die Interkalation in die Membran massiv verstärkt wird, während sie in wässriger

Umgebung vernachlässigbar gering ist. Die Fluoreszenzanisotropie dieses Chromophors korreliert umgekehrt mit der Membranfluidität (Lentz, 1993).

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

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

### 2.7.3. Circular dichroismus Spektroskopie

Circular dichroismus (CD) ist die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle, links- und rechts-circular-polarisiertes Licht gleicher Wellenlänge unterschiedlich stark zu absorbieren. Die optische Aktivität von Proteinen tritt in Form von asymmetrischen Kohlenstoffatomen und/oder aromatischen Aminosäuren auf. Proteine weisen Circular dichroismus auf, da sie sich aus einer großen Anzahl von optisch aktiven Aminosäuren zusammensetzen und darüber hinaus Sekundärstrukturen ausbilden.

Die Elliptizität  $\Theta$  (in Grad) wird als quantitatives Maß für die Größe des Circular dichroismus verwendet. Die Berechnung der molaren Elliptizität, d.h. der Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren  $\Theta_{MRW}$ , erfolgt nach folgender Formel (Schmid, 1997):

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M}{c \cdot d \cdot N_{AS}}$$

Dabei ist  $\Theta$  die gemessene Elliptizität,  $M$  das Molekulargewicht des Proteins,  $c$  die Proteinkonzentration,  $d$  die Schichtdicke der Küvette in Zentimeter und  $N_{AS}$  die Anzahl der Aminosäuren im Protein.

### 2.7.3.1. Fern-UV und Nah-UV CD-Spektroskopie

CD-Spektroskopie kann angewandt werden, um eine Aussage über die Strukturbildung eines Proteins zu erhalten. Dazu unterscheidet man je nach Wellenlängenbereich zwei Verfahren, die unterschiedliche Aussagen über die Struktur erlauben. Die Nah-UV-Region umfasst den Bereich zwischen 250 nm und 300 nm. In diesem Bereich sind asymmetrisch angeordnete aromatische Aminosäuren für das Signal verantwortlich. Die Umgebung dieser Aminosäuren ist von der Tertiärstruktur des Proteins abhängig. Ein Signal in diesem Bereich stellt einen „Fingerabdruck“ des Proteins dar (Schmid, 1997). Denaturierte Proteine hingegen weisen in diesem Bereich kein Signal auf, da ihre aromatischen Aminosäuren nicht mehr in asymmetrischer Umgebung vorliegen.

In der Fern-UV-Region (190-250 nm; Amidregion) erzeugt die Konformation der Polypeptidkette ein charakteristisches CD-Signal.  $\alpha$ -Helices ergeben zwei benachbarte Minima bei 208 nm und 222 nm.  $\beta$ -Faltblattstrukturen zeigen ein weniger deutlich ausgeprägtes Signal mit einem einzigen Minimum bei 218 nm. Das Fern-UV-CD-Signal liefert daher Informationen über die Sekundärstruktur der untersuchten Proteine.

Eine Zusammenfassung der Messparameter für die CD-Messungen (in J-715, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) findet sich in folgender Liste.

<b>Messparameter</b>	<b>Fern-UV</b>	<b>Nah-UV</b>
Startwellenlänge	250 nm	300 nm
Endwellenlänge	195 nm	250 nm
Auflösung	0,2 nm	0,2 nm
Geschwindigkeit	10 nm/min	10 nm/min
Response	1,0 s	1,0 s
Akkumulation	16	10
Schichtdicke	0,1 cm	0,5 cm
Proteinkonzentration	0,15mg/ml	0,5mg/ml

Innerhalb gewisser Genauigkeitsgrenzen lässt sich aus dem Fern-UV CD-Spektrum eine Aussage über prozentuale Sekundärstrukturanteile im Protein machen. Dazu wurde das Programm CDNN (*CD deconvolution based on neuronal networks*) verwendet. Dieses Programm verwendet Beispielspektren von Proteinen mit bekannter Struktur und erhält so charakteristische spektroskopische Merkmale für die einzelnen Sekundärstrukturklassen. Unter Verwendung dieser Ergebnisse ermittelt das Programm dann aus dem gemessenen Spektrum die Zusammensetzung der Sekundärstruktur des strukturell unbekanntes Proteins.

### **2.7.3.2. Thermischer Denaturierungsübergang mit CD-Spektroskopie**

Da die molare Elliptizität nicht von der Temperatur der Lösung abhängig ist, lässt sich CD-Spektroskopie sehr gut zur Messung der thermischen Stabilität von Proteinen einsetzen. Die Messungen wurden in einer 0,1 cm Küvette mit einem thermostatisierbaren Küvettenhalter mit Hilfe der PTC343 Peltier-Temperiereinheit (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden dabei von 20 °C bis 90 °C mit einer Heizrate von 30 °C/h aufgeheizt und wieder abgekühlt. Dabei wurde die Entfaltung durch Aufzeichnung der Elliptizität bei 220 nm kontinuierlich verfolgt. Weiterhin wurde in 20 °C-Schritten ein Fern-UV-CD-Spektrum aufgenommen. Um ein Verdampfen des Lösungsmittels während des Aufheizvorganges zu verhindern, wurde eine verschließbare Küvette verwendet. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 150 µg/ml eingesetzt. Als Kontrolle wurden Thermoübergänge mit Dialysepuffer anstelle des Proteins vermessen.



## 2. Material und Methoden

---

Generell wurde in Phosphatpuffer gemessen, da andere Puffer, wie Hepes oder Tris, eine deutliche Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes zeigen.

Sofern die temperaturinduzierten Entfaltungsübergänge reversibel waren, wurde mit Hilfe folgender Formel eine Aussage über die thermodynamischen Parameter des Proteins getroffen:

$$\Theta = \Theta_n + m_n \cdot T - (\Theta_n + m_n \cdot T - \Theta_d + m_d \cdot T) \cdot \frac{1}{1 + e^{-\frac{1}{R \cdot T} \left( \Delta H_M \left( 1 - \frac{T}{T_M} \right) - \Delta C_p \left( T_M - T + T \cdot \ln \frac{T}{T_M} \right) \right)}}$$

Dabei werden die beiden Grundlinien des Übergangs von den Parametern  $\Theta_n$ ,  $m_n$ ,  $\Theta_d$ , und  $m_d$  bestimmt.  $T_M$  ist die Temperatur am Übergangsmittelpunkt,  $\Delta H_M$  ist die Änderung der Enthalpie am Übergangsmittelpunkt und  $\Delta C_p$  die Änderung der Wärmekapazität der Lösung durch den Entfaltungsvorgang.

### 2.7.4. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Isotopen-markiertes Hsp12 wurde rekombinant in dem *E. coli* Stamm HB101 mit dem Helferplasmid pUBS520 exprimiert. Die Bakterien wurden in M9-Medium (Sambrook and Russel, 2001) kultiviert, das  $^{15}\text{N}$ -markiertes  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $^{13}\text{C}_6$ -Glucose (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) enthielt.

Die Proben für die NMR-Experiments wurden auf 1,2 mM in 10 mM Natrium-Phosphate, pH 7,5 konzentriert.

Zur Vorbereitung der SDS-Mizellenprobe wurden 300 mM  $d_{25}$ -SDS (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) zu einer 1,2 mM Lösung aus  $^{15}\text{N}$ -markiertem Hsp12 gegeben. Fast water exchange rates von Amidprotonen wurden mit new-MEXICO (Gemmecker et al., 1993) Experimenten bei 37°C für das SDS-gefaltete Hsp12 und ungefaltete Hsp12 gemessen. Temperaturabhängige random coil hydrogen exchange rates wurden theoretisch mit der Methode berechnet, die in Bai et al. (1993) beschrieben ist.

Spin-echo-Diffusionsmessungen wurden bei 30 °C mit nicht gefalteten Hsp12 ohne SDS Mizellen durchgeführt wie bereits beschrieben (Dehner and Kessler, 2005).

Hydrodynamische Kalkulationen wurden mit der HYDRONMR Version 5a (de la Torre et al., 2000) gemacht und die „random coil“ Modellstruktur von Hsp12 wurde in XPLOR-NIH (Schwieters et al., 2003) generiert.

Alle bearbeiteten Experimente wurden mit XWinNMR 3.5 oder Topspin 1.3 erstellt, und mit Sparky 3.1 (Goddard und Kneller, (2002), SPARKY3, University of California, San Francisco) analysiert. Sequenz-spezifische Resonanzassignments wurden mit Hilfe des Assignmentprogramms PASTA (Leutner et al., 1998) erstellt.

Für die paramagnetischen Relaxation Enhancement (PRE) Messungen wurde eine 600  $\mu\text{M}$  Hsp12 Probe (in 300 mM  $\text{d}_{25}$ -SDS, 10 mM Natrium-Phosphat pH 7,5) mit 5-doxyl-stearic acid oder 16-doxyl-stearic acid Lösung (in  $\text{d}_4$ -methanol) bis zu einer Konzentration von 5 mM titriert. Das entspricht einem Spin-label/Mizelle Verhältnis von 1. Außerdem wurde eine Probe mit 1 mM  $\text{MnCl}_2$  hergestellt. Ein Referenz  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum und  $^{15}\text{N}$ -HSQCs von der Hsp12 Probe mit 5-doxyl-stearic acid, 16-doxyl-stearic acid, und  $\text{MnCl}_2$  wurden jeweils gemessen. Durch den Vergleich der Peakintensitäten der HSQC-Spektren mit paramagnetischen Agent und dem Referenzexperiment wurde eine Evaluation durchgeführt.

### 2.7.5. Festkörper (Solid State) NMR

Die Proben für Festkörper-NMR-Spektroskopie wurden als kollabierten DMPG Vesikel vorbereitet. 500  $\mu\text{l}$  (= 14 mg Lipid) einer 40 mM 827,6 mg/ml) DMPG Vesikellösung wurde unter Vakuum getrocknet. Für die Proteinprobe, wurde eine entsprechende Menge Hsp12 vor der Evaporation der Lösung zugegeben, um Proben ohne Protein, oder eine Mischung aus Protein und Lipid (molares Verhältnis: 1:50 oder 1:10) zu erhalten.

Statische Festkörper  $^{31}\text{P}$ -NMR Experimente wurden an einem Bruker Avance 600 Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) bei 242,9 MHz durchgeführt. Festkörper  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden, wie in Bennett et al. (1995) beschrieben, aufgenommen. Für jedes molare Protein:Lipid Verhältnis wurde eine Serie von Messungen aufgenommen, die bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 15  $^{\circ}\text{C}$  bis 35  $^{\circ}\text{C}$  durchgeführt wurden. Dieser Bereich liegt im Phasenübergang des Lipids.

### 2.7.6. Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugation mittels analytischer Ultrazentrifugation (SV-AUZ)

Analytische Ultrazentrifugationsexperimente wurden mit einer ProteomLab XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman, Krefeld) aufgenommen, die mit einer Absorptionsoptik ausgestattet ist. 400  $\mu\text{l}$  der Probe und 410  $\mu\text{l}$  Phosphat-Puffer wurden in mit Aktivkohle gefüllte Epon Zweikanalmittelstücke mit Quarzfenstern und

## 2. Material und Methoden

---

12 mm Weglänge geladen. Die Zentrifugation wurde in einem 8-Loch Beckman-Coulter AN60-Ti Rotor bei 42000 Upm durchgeführt. Die Sedimentation wurde bei 280 nm beobachtet und kontinuierlich mit einer radialen Auflösung von 30 Mikrometern gescannt, drei Wiederholungen wurden gemessen. Die Daten wurden mit Sedfit (Peter Schuck, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) analysiert. Es wurde eine modellunabhängige kontinuierliche Svedberg Verteilungsmethode  $c(S)$  mit Zeit- (TI) und radial unabhängigem Rauschen (RI) gewählt. Zur Verbesserung der kleinsten quadratischen Abweichung wurde die Monte Carlo Simulation verwendet.

### 2.7.7. Fluoreszenz-Anisotropie

Fluoreszenz-Anisotropie wurde an einem FluoroMax-3 (Spex, Edison, NJ) gemessen. 3  $\mu$ l einer Stocklösung (0,14mg/ml) 1,6-Diphenyl-1,3,5, Hexatrien in DMSO wurde 1,5 ml PBS Puffer zugesetzt und bei 30 °C in einer Rührküvette gemischt. PBS-gewaschene Wildtyp- oder  $\Delta$ Hsp12-Zellen wurde zugegeben, um einen  $OD_{600}$  –Endwert von 0,2 zu erhalten. Die Fluoreszenz-Anisotropie (Anregung, 340 nm, Emission, 432 nm) der Probe wurde solange beobachtet, bis eine Sättigung erreicht war (Kaiser und London, 1998). Fluoreszenz-Spektren wurden bei 10 bis 45 °C gemessen.

### 2.7.8. Membranfluiditätsmessungen

Stationäre Hefezellen wurden gewaschen und mit PBS soweit verdünnt bis ein  $OD_{600}$  Wert von 0.3 erreicht wurde. Steady-state Fluoreszenz-Anisotropie wurde wie in Kaur und Bachhawat (1999) beschrieben mit 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) gemessen. Die DPH-Endkonzentration war 1  $\mu$ M. Nach 20 min Anisotropie-Messung wurde Benzylalkohol in den Endkonzentrationen 5, 10, 15 und 20 mM zugegeben.

### 2.7.9. Farbstoffaufnahmeexperimente durch Durchflusszytometrie (FACS)

Das Protokoll zur Färbung von Hefezellen mit Propidiumiodid zur Markierung von bakteriellen Zellen entspricht dem beschriebenen (Deere et al., 1995 und Porter et al., 1996). Eine 1 mg/ml Stocklösung aus Propidiumiodid in PBS-Puffer wurde hergestellt. Zur Färbung wurden die Hefezellen in PBS-Puffer resuspendiert, bis eine Zelldichte von  $10^7$  Zellen/ml erreicht war. Dann wurde 1,2  $\mu$ l der Stocklösung zu 200  $\mu$ l der Zellsuspension gegeben und diese Mischung für 10 min im Dunkel auf Eis

inkubiert. FACS Messungen wurden an einem FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) durchgeführt.

### **2.8. Mikroskopie**

#### **2.8.1. Phasenkontrastmikroskopie**

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

#### **2.8.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

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

Zur Probenvorbereitung wurden die Hefezellen aus der gewünschten Wachstumsphase abzentrifugiert (5000 Upm; 5 min, RT, Tischzentrifuge), mit PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 270 µl PBS aufgenommen, zur Fixierung mit 30 µl 25 % igem Glutaraldehyd versetzt und eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation und erneutem Waschen mit PBS-Puffer wurde das Pellet je nach Zelldichte in einer entsprechenden Menge PBS aufgenommen, 30 µl dieser Suspension auf runde Plastikobjektträger (Thermanox Coverslips, Nunc, Wiesbaden, D) aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, ohne die Zellen völlig auszutrocknen. Nun erfolgte eine Entwässerung durch sukzessives Waschen (jeweils ca. 5 Minuten) mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %; 70 %; 80 %, 95 % und dreimal 100 % (v/v)). Anschließend wurden die Präparate im Vakuumtrockenschrank (Kendro, München, D) bei 700 Torr und Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Die Objektträger wurden mit Klebstoff auf 5 x 12,5 mm zylindrische Präparatsträger (Plano, Wetzlar, Deutschland) aufgeklebt und getrocknet. Die getrockneten

## 2. Material und Methoden

---

Präparate wurden dann mit einem Beschichter (Sputter, SCD 005, Bal-Tec, Balzer, Lichtenstein) mit Gold unter Vakuum für mindestens 100 Sekunden beschichtet, in die Vakuumkammer des Rasterelektronenmikroskopie (5900 LV, Joel, Eching, D) eingebracht und bei 20 kV Hochspannung mikroskopiert.

### **2.8.3. Transmission Elektronen Mikroskopie (TEM)**

Proben mit 10 mg/ml DMPG oder DMPG/Hsp12 im Verhältnis von 1:20 (w/w) in 10 mM Natriumphosphat mit 100 mM NaCl, pH 7,5, wurden für 30 min bei der gewünschten Temperatur inkubiert und sofort zwischen Gold Doppelträgern in flüssigem Ethan eingefroren. Das Gefrierbruchexperiment wurde in einer BAF-400 Apparatur (BAL-TEC, Vaduz, Liechtenstein) bei  $-105^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Replikas wurden durch Schrägbeschattung mit Platin/Kohle bei einem Winkel von  $35^{\circ}$  hergestellt. Die Schichtdicke (10-15 Å) wurde dabei mit Hilfe eines Quarzkristall-Oszillator bestimmt. Nach Bedampfung der Specimen mit Kohle (Schichtdicke 30-40 Å) wurden die Replikas auf Wasser abflotiert und für die Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop auf Kupfernetzchen aufgenommen.

Elektronenmikroskopische Bilder wurden bei 20000- oder 33000-facher Vergrößerung an einem JEOL 100CX Transmissions-Elektronenmikroskop (JEOL, Tokio, Japan) aufgenommen.

## **2.9. Lokalisationsstudien**

### **2.9.1. Subzelluläre Fraktionierung im Saccharosedichtegradienten**

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

Dazu wurden 250 ml bis zur stationären Phase in YPD gewachsene Wildtypzellen geerntet (2500 x g, 10 min, RT), mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden zum einen in einer möglichst kleinen Menge SET-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,2 M Sorbit, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) aufgenommen, mit Proteaseinhibitoren (1:100) (Complete Protease Inhibitor Mix G Serva, Heidelberg, D) versetzt und mit

Hilfe der Zellaufschlussmaschine, wie unter 2.6.1 beschrieben, aufgeschlossen. Zum anderen wurden geerntete und gewaschene Zellen in osmotisch stabilisiertem SPM Puffer (50 mM K-Phosphat, pH 7,3, 1,2 M Sorbitol) aufgenommen mit 400 Units der Endoglukanase Lytikase aus *Arthrobacter luteus* (in 50 mM Tris/HCl, pH 8,2, 10% Saccharose (w/v)) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Schrittes sollte die Zellwand der Hefen durch Hydrolyse des  $\beta$ -1,3-Glukan abgelöst werden. Die Umwandlung in sogenannte Spheroblasten wurde mikroskopisch überprüft. Nach Zentrifugation (2500 x g, 10 min RT) wurde der Überstand abgezogen, das Pellet in SET-Puffer aufgenommen und mit Proteaseinhibitoren versetzt. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels eines Glaspotters (100 x pottern). Sowohl diese Zell-Lysat als auch das mit Hilfe der Aufschlussmaschine erhaltene wurden 10 min bei 600 x g und 8°C zentrifugiert, um ganze Zellen zu entfernen. Das so gewonnene Gesamt-Zell-Lysat ( je 800  $\mu$ l) wurde auf einen Saccharose/EDTA-Stufengradienten geladen (0,5 ml 55%; 1 ml 45%; 0,8 ml 30 %; 0,5 ml 20 % und 0,5 ml 10 % Saccharose (w/w) in 20 mM Triethanolamin, pH 7,2, 5 mM EDTA) und bei 100 000 x g für 2,5 h zentrifugiert (Optima™ Max-E Ultrazentrifuge (Beckman, Wien, Österreich). 500  $\mu$ l Fraktionen wurden von oben beginnend abgenommen, mit dem gleichen Volumen eiskaltem 20 % igem TCA in Aceton, 0,2 % DTT versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13 000 Upm (TZ) wurde das Pellet mit Aceton, 0,2 % DTT gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Nach Aufnahme in 1 x Laemmli erfolgte eine 5 minütige Erhitzung bei 96 °C. Über SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (siehe 2.4.2 und 2.4.5).

### **2.9.2. Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation**

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

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

Membranfraktion von der zytosolischen Fraktion getrennt. Letztere wurde so abgenommen (700 µl), dass Kontaminationen durch das Pellet auszuschließen waren. Das Pellet wurde erneut mit SET-Puffer gewaschen, zentrifugiert (12000 x g) und in 70 µl SET-Puffer aufgenommen, der zytosolischen Fraktion.

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

### **2.9.3. Organellenpräparation**

Die Präparation von Hefespheroblasten, Zellhomogenisat, und die Isolation von zellfreiem Lysat erfolgt wie bereits beschrieben (Erdmann et al., 1989). Die Organellen wurden auf einem linearen 2,25 %-24,0 % OptiPrep (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg) Dichtegradienten isoliert. OptiPrep ist ein 60 % ige Lösung aus Iodixanol in sterilem Wasser. Der Gradient wurde in einem vertikalen Rotor bei 48000 x g für 1,5 h zentrifugiert (TV860; Sorvall; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Die Fraktionen wurden vom Boden der Zentrifugenbecher gesammelt. Die Organellen wurden durch Western Blot mit Antikörpern gegen spezifische Organellenproteine identifiziert: polyklonale Hasen oder Mausantikörper Pcs60, Fbp1, Pep12, Porin, Kar2, Gas1 und ALP (Molecular Probes, Leiden, Die Niederlande). Hsp12 wurde mit einem anti-Hsp12-Antikörper identifiziert (Dr. Pineda Antikörper Service, Berlin).

### **2.9.4. Importversuche**

Für Importversuche durch synthetische Membranen wurden POPC und POPG (10 mg) im Verhältnis 3:1 wie unter 2.4.6 und 2.4.7. beschrieben miteinander gemischt und getrocknet. Das getrocknete Lipid wurde in 1 ml 40 mM HEPES pH 7,4 aufgenommen und für 1 min gevortext. Aus der Lipidsuspension wurden mittels Extrusion 400 nm große unilamellare Vesikel hergestellt (MacDonald et al., 1991). Dazu presste man die Lösung 40-mal durch einen Polycarbonatfilter mit 400 nm Porengröße eines Extruders (LiposoFast, Avestin, Mannheim, D). Die Importreaktion wurde durch Zugabe von Hsp12 zu den LUVs im Verhältnis 1:25 gestartet, nach 10

## 2. Material und Methoden

---

min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben auf Eis abgekühlt und in mehrere Aliquots aufgeteilt. Eine Probe (je 100 µl) blieb unbehandelt, eine andere wurde mit 0,5 µl Proteinase K (13,3 mg/ml) versetzt und eine letzte wurde mit 2 % SDS und Proteinase K behandelt. Zugabe der Proteinase K und Inkubation auf Eis (30 min) führte zum Abbau ungeschützter Proteine, gleichzeitige Zugabe von SDS zur Auflösung der Vesikel. Proteinase K Verdau wurde durch Proteaseinhibitoren gestoppt. Die Proben wurden wie unter 2.9.1. beschrieben gefällt und analysiert. Für Importversuche mit ganzen Hefezellen wurden logarithmische  $\Delta HSP12$ -Zellen mit doppelter Menge an Lytikase versetzt (800 U), so zumindest zum Teil innerhalb von 2 – 3 h in Spheroplasten überführt und diese erneut in SPM-Puffer aufgenommen (siehe 2.9.1). Je 100 µl Zellsuspension wurden mit 80 µg Protein versetzt, 2 h bei 30 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Ein Ansatz blieb unbehandelt, einer wurde wie oben beschrieben mit Proteinase K, ein weiterer mit SDS und Proteinase K behandelt. Die Degradation durch Proteinase K wurde mittels Proteaseinhibitoren gestoppt (siehe oben), die Ansätze wurden zentrifugiert und nach Fällung sowohl Überstand als auch Zellpellet analysiert.

### 2.10. Lipidanalyse

#### 2.10.1. Probenvorbereitung für die Massenspektrometrische Lipidanalyse

Die Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen von Wildtyp- und  $\Delta HSP12$ -Zellen wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Dazu wurden zunächst 150 bis 250 ml spät stationäre (mindestens 48 h) oder früh logarithmische ( $OD_{600} < 1$ ) in YPD gewachsene Hefezellen durch Zentrifugation (2500 x g, 10 min, RT) geerntet, mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 10 ml SET-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 0,2 M Sorbit, 1 mM  $MgCl_2$ ) aufgenommen und nach Zugabe von Proteaseinhibitoren (1:100) (Complete Protease Inhibitor Mix G Serva, Heidelberg, D) mit Hilfe der Zellaufschlussmaschine, wie unter 2.6.1. beschrieben, aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde mikroskopisch überprüft und unter Umständen wiederholt. Nun folgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 600 x g und 8 °C, um ganze Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde einer erneuten Zentrifugation bei 12000 x g und 8 °C für 30 min unterzogen. Dies sollte die Membranen und Zellwandbruchstücke vom löslichen Teil trennen. Das Pellet wurde in SET-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die so gewonnene Gesamtmembranfraktion wurde in maximal 800 µl SET-Puffer aufgenommen und der



## 2. Material und Methoden

---

Proteingehalt nach Bradford (siehe 2.4.3) bestimmt. Die minimale Proteinkonzentration sollte 100 µg betragen.

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

### **2.10.2. Lipidanalytik mittels ESI-MS/MS und Gas-Chromatographie**

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

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

Die Gas-Chromatographie (GC) trennt flüchtige Verbindungen eines Gemisches nach ihrer relativen Tendenz, sich in dem inerten Material, mit dem die Chromatographiesäule gepackt ist, zu lösen bzw. sich zu verflüchtigen und im Strom eines inerten Gases, wie Helium, durch die Säule zu wandern. Für die Analyse der Fettsäuren aus den extrahierten (siehe 2.10.6.) Lipidproben wurden diese zunächst

## 2. Material und Methoden

---

zum Methylester derivatisiert und mittels GC analysiert (Shimadzu GCMS-QP2010 mit Autosampler und Injektor AOC-20si; Säule: HP-5MS).

Die Vermessungen der Lipidproben wurde in Regensburg von Dr. Gerhard Liebisch in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Schmitz (1984) am Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin durchgeführt.

### 2.11. GeneChip

#### 2.11.1. RNA Isolation

Die gesamt RNA wurde aus 90 ml der spät stationären Wachstumsphase einer Hefezellkultur extrahiert entsprechend des Herstellerprotokolls RNeasy Mini Yeast III Protokoll (Qiagen, Hilden). Die Zellen wurden zweimal für 45 s bei 6500 Upm mit einem Precellys-24 Homogenisator und 0,5 mm Glasperlen aufgeschlossen mit einer 10 s Pause zwischen den Zyklen (Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich). Die Reinheit der RNA wurde durch den Agilent 2100 Bioanalyzer mit dem RNA 6000 Nano LabChip Reagent set kontrolliert (Agilent technologies, Santa Clara, CA). Die RNA wurde spektrophotometrisch quantifiziert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.11.2. Microarray Assay

Zur Erforschung der Transkriptionsantwort im  $\Delta\text{HSP12}$  Stamm wurde die Geneexpression analysiert. Hierzu wurde der Affymetrix Yeast Genom expression GeneChip 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) verwendet. Alle Analysen wurden als Triplet durchgeföhrt und jeweils wurden Wildtyp- mit Knock-out-Zellen verglichen. Die Probenvorbereitung für die Mikroarrayhybridisierung wurde, wie im Affymetrix GeneChip Expression Analysis Handbuch beschrieben, durchgeführt.

#### 2.11.3. Microarray Datenanalyse

Affymetrix GeneChip Operation Software (GCOS) 1.4 wurde zur Arrayanalyse verwendet.

Eine globale Normierungsstrategie wurde erarbeitet, durch die überdurchschnittliche Signalintensitäten aller Arrays auf einen Wert von 100 festgelegt wurden. Nach der Normierung wurden die Expressionssignalwerte kalkuliert und detektierbare Expressionstranskripte als P-, M- oder A- definiert (entsprechend dem Affymetrix Algorithmus MAS5). Um sich auf starke regulatorische Effekte zu konzentrieren, wurde ein Minimum der Expressionsänderungsrate zwischen Wildtyp und Knock-

Out-Stamm als Cut-Off festgelegt (2,5 fache Änderung). In Übereinstimmung mit ihren funktionellen Beschreibungen (FunCat Datenbank; <http://mips.gsf.de/projects/funcat>), wurden die Gene in verschiedene funktionelle Kategorien eingeordnet, in der jedes Gene ein oder mehrere Hits repräsentiert, unabhängig seiner funktionellen Erläuterung. Die Anzahl an Hits in der entsprechenden Kategorie wurde gegen die gesamte Anzahl an FunCat Hits in dieser Kategorie korrigiert.

RNA Isolation, Qualitätskontrolle der isolierten RNA, Probenaufbereitung, und Eingangsdatenkontrolle wurde bei einem regionalen deutschen Affymetrix Service Anbieter durchgeführt (KFB-Center of Excellence for Flourescent Bioanalysis; [www.kfb-regensburg.de](http://www.kfb-regensburg.de)).

### **2.12. Synthetischer Lethalitätscreen**

Im *MAT $\alpha$*  Stamm wurde *Hsp12* durch Standardtechniken entfernt (Goldstein und MCCusker, 1999). Die Deletion wurde an den dominant selektiven Marker natMX (Nourseothricin-resistance Marker) gekoppelt und trägt den Reporter, MFApr-HIS3. Dieser Stamm wurde mit einem Array von MATa lebensfähigen Hefedeletionsmutanten gekreuzt, die jeweils eine Gendeletionsmutation besitzen, die mit dem dominant selektiven Marker kanMX (kanamycin resistance Marker) verbunden ist. Die heterozygoten Diploiden wurden auf einem Medium selektiert, dass sowohl Kanamycin und Nourseothricin enthielt, und auf dem die Sporulation induziert war. Die haploiden meiotischen Sporennachkommen wurden auf synthetisches Medium transferiert, welchem Histidin fehlte, was eine Selektion nach Keimlingen von MATa erlaubte. Der MATa Nachkommen wurde wiederum auf ein Medium transferiert, was auf das Wachstum von doppelt meiotischen Nachkommen selektierte. Der erhaltene haploide Knock-Out Stamm wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet, um Wachstumsdefekte unter diesen Bedingungen zu finden (Tong et al., 2001).

## 3. Ergebnisse

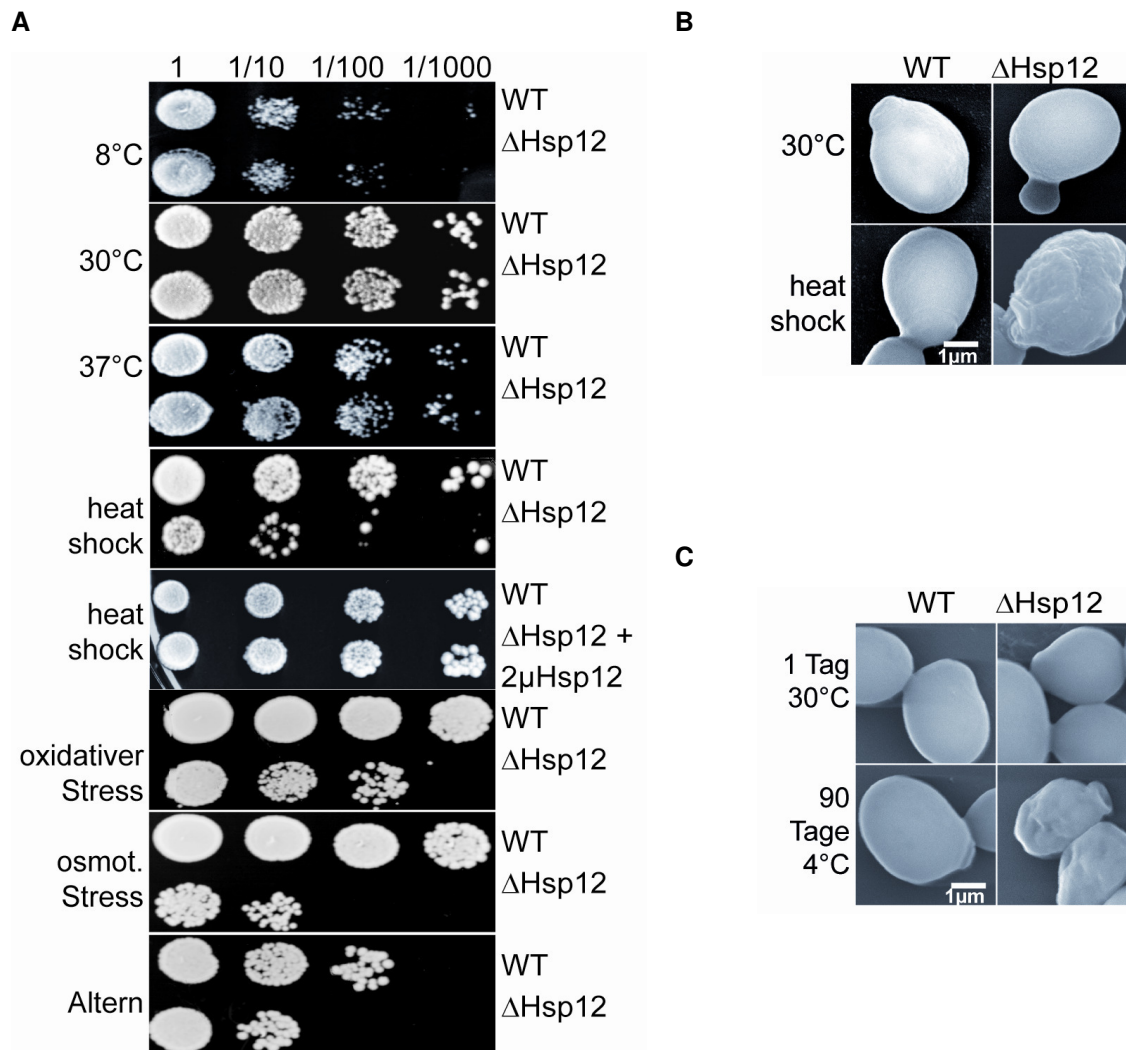
### 3.1. Hsp12 entscheidet über das Überleben von *S. cerevisiae*

Die bezeichnenden Eigenschaften von Hsps sind deren steigende Expression unter Stressbedingungen und die schützende Rolle beim Überleben von Zellen. Dies wurde bereits für viele Hsps aus *S. cerevisiae* gezeigt, zum Beispiel für Hsp104 (Lindquist und Kim, 1996) und auch für die Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (Haslbeck et al., 2005). Hsp12 wird in der logarithmischen Wachstumsphase unter physiologischen Bedingungen nur schwach exprimiert, unter Stressbedingungen jedoch sehr stark (Preakelt und Meacock, 1990). In der stationären Phase wurde ein Hsp12-Gehalt von 2,4 % der gesamten zellulären Proteinmenge bestimmt. Das entspricht 740.000 Molekülen pro Zelle. Für das Chaperon Hsp90 wird im Vergleich nur ein Gehalt von 1,3 % und 420.000 Moleküle pro Zelle bestimmt (Ghaemmaghami et al., 2003).

Um den Effekt von Hsp12 auf das Überleben von Zellen bei nicht-physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde das Wachstum von Wildtyp *S. cerevisiae* mit dem *HSP12* Deletionsstamm bei verschiedenen Stressbedingungen auf Agarplatten verglichen (Abbildung 3.1. A). Die Deletion von *HSP12* beeinflusst das Wachstum bei 30 °C und 37 °C nicht und bei niedrigen Temperaturen (8 °C) wird das Wachstum leicht inhibiert. Allerdings konnte ein starker Wachstumseffekt beobachtet werden, wenn die Zellen einem kurzen Hitzeschock für 20 min bei 58 °C ausgesetzt wurden. Die hitzegeschockten Wildtypzellen produzierten die gleiche Anzahl an Kolonien wie Kulturen, die bei 30 °C gewachsen waren. Allerdings zeigte der Deletionsstamm einen drastischen Verlust der Viabilität nach einer Behandlung bei 58 °C. Dies zeigt die eine protektive Funktion von Hsp12 bei Hitzeschockbedingungen.

Um herauszufinden, ob diese protektive Funktion nur spezifisch für Hitzestress war, wurde der Wachstumseffekt des Deletionsstamms unter oxidativen Stressbedingungen geprüft. Der Wildtyp- und der Deletionsstamm wurden in Anwesenheit von 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 30 °C kultiviert. Vergleichbar mit den hitzegeschockten Zellen beeinflusste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Wachstum der Wildtypzellen nicht, dafür aber das Wachstum der Deletionsmutante (Abbildung 3.1. A). Untersucht wurde außerdem der Einfluss von Hsp12 auf das Wachstum osmotisch gestresster Zellen. Das Wachstum des Deletionsstamms war in Anwesenheit von 0,4 M NaCl reduziert, wohingegen das Wachstum des Wildtypstamms nicht beeinflusst wurde.

### 3. Ergebnisse



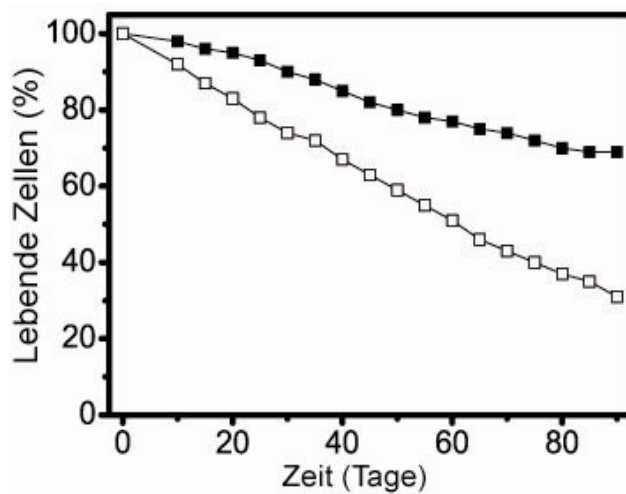
**Abbildung 3.1. Deletionseffekte des *HSP12*-Gens auf die Hefephysiologie.** (A) Zellwachstum auf Agarplatten bei verschiedenen Temperaturen und Stressbedingungen. Der Wildtypstamm (WT) und der *HSP12* Deletionsstamm ( $\Delta Hsp12$ ) wurden bei 8 °C, 30 °C, oder 37 °C und nach einem Hitzeschock (Inkubation für 20 min bei 58 °C) auf YPD-Platten für 48 h kultiviert. Der Hitzeschockeffekt wurde ebenso im Deletionsstamm mit dem *HSP12* auf einem 2μ Plasmid (Komplementierung) analysiert. In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von oxidativem Stress auf YPD-Agarplatten mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 30 °C, der Einfluss von osmotischem Stress bei 30°C und 0,4 M NaCl und der von Altern nach 90 Tagen, getestet. (B) Rasterelektronenmikroskopie von Wildtyp (WT) und  $\Delta Hsp12$  Stämmen bei 30 °C und nach Hitzeschock für 20 min bei 58 °C. (C) Rasterelektronenmikroskopie von Wildtyp (WT) und  $\Delta Hsp12$  Stämmen bei 30 °C und nach 90 Tagen bei 4 °C.

Schließlich analysierten wir den Alterungseffekt auf Hefezellen (MacLean et al., 2001). Dazu wurden Hefezellen für 90 Tage kultiviert und die Viabilität auf Agarplatten quantifiziert. Auch wenn der Wildtypstamm eine kleine Abnahme der

### 3. Ergebnisse

---

Viabilität nach den 90 Tagen zeigte, verlor der Deletionsstamm im Vergleich dazu wesentlich schneller die Lebensfähigkeit (Abbildung 3.1. und 3.2.).



**Abbildung 3.2. Alterung von Wildtypzellen und Deletionzellen.** Wir kultivierten Wildtyp- und Knock-Out-Hefezellen für 90 Tage und quantifizierten die Viabilität auf Agarplatten bei 30°C. Dann wurde die Zahl der lebenden Zellen in % gegen die Zeit in Tagen aufgetragen.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass Hsp12 einen signifikanten protektiven Effekt auf *S. cerevisiae* unter verschiedenen Stressbedingungen hat.

#### 3.2. Die *HSP12*-Deletion verursacht eine veränderte Zellmorphologie

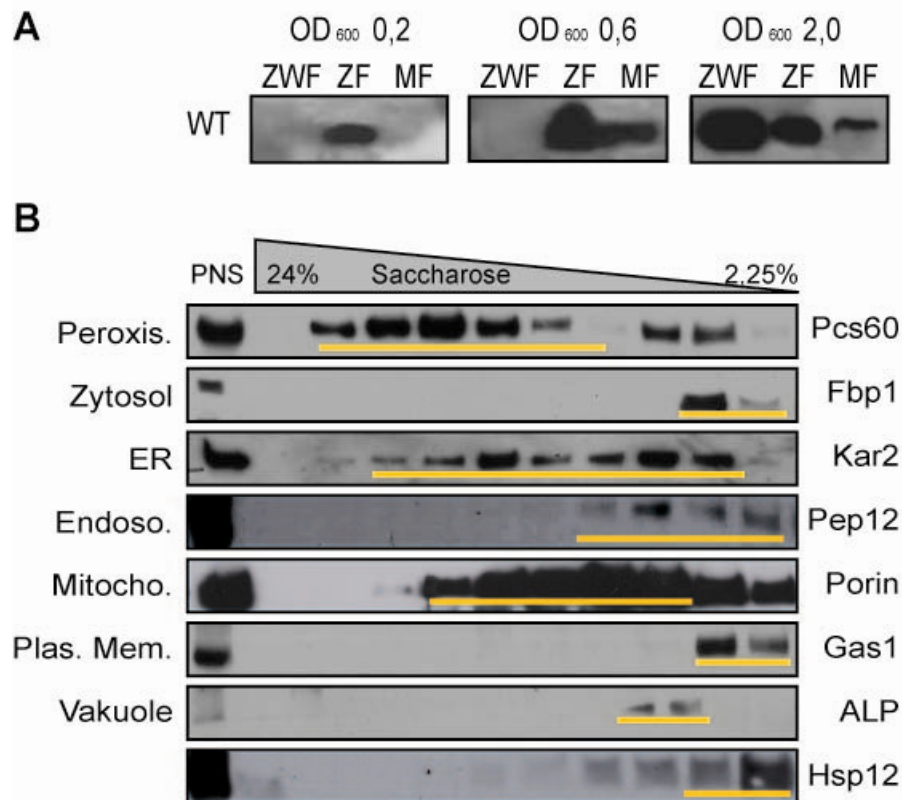
Um etwas über den Mechanismus des protektiven Effekts von Hsp12 zu erfahren, wurde der Einfluss der *HSP12*-Deletion auf die gesamte Zellmorphologie unter Stressbedingungen untersucht. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ergab für den Deletionsstamm eine veränderte Morphologie nach dem Hitzeschock bei 58 °C (Abbildung 3.1. B). Die Zellen zeigten eine raue und irreguläre Oberfläche, während die Wildtypzellen keine Änderung aufweisen. Zusätzlich wurde das Zellaltern mittels REM aufgenommen und gleiche Veränderungen der Zellmorphologie für den Deletionsstamm festgestellt (Abbildung 3.1. C).

#### 3.3. Die Verteilung von Hsp12 in der Zelle

Des Weiteren interessierten wir uns für die intrazelluläre Lokalisation des Proteins. Dazu wurden Wildtyp *S. cerevisiae* Zellen in Flüssigkultur bei 30 °C zu unterschiedlichen Wachstumsphasen herangezogen, was durch die Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt wurde. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Zytosol wurde von der Membran- und Zellwandfraktion getrennt (Abbildung 3.3. A). Die Westernblotanalysen zeigten, dass Hsp12 in der Tat mit steigender Zelldichte exprimiert wird. Bei niedriger optischer Dichte, während der frühen logarithmischen

### 3. Ergebnisse

Phase, wird Hsp12 ausschließlich in der zytosolischen Fraktion (ZF) detektiert. Weiteres Wachstum führte zu zusätzlicher Akkumulation von Hsp12, zuerst in der Membranfraktion (MF) und danach in der Zellwandfraktion (ZWF). Dieses Verteilungsmuster zeigt, dass das Protein sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vorliegen kann.



**Abbildung 3.3. Verteilung von Hsp12 in der Hefezelle.** (A) Verteilung von Wildtyp-Hsp12. Die Zellen wurden bei 30 °C bis zu verschiedenen ODs herangezogen. Dann erfolgte der Zellaufschluss und zur Fraktionierung wurde eine differenzielle Zentrifugation durchgeführt. Die Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert. ZWF – Zellwandfraktion; ZF – zytosolische Fraktion; MF – Membranfraktion. (B) Organellenpräparation von Wildtyp *S. cerevisiae*. Die Organellen wurden mit einem linearen 2,25 % - 24 % OptiPrep Saccharose Gradienten separiert. 1 ml Fraktionen wurden vom Boden des Gradienten aus gesammelt. Proteine von jeder 2. Fraktion wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot analysiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: PCS60 (Peroxisomen), Fbp1 (Zytosol), Pep12 (Endosomen), Porin (Mitochondrien), Kar2 (Endoplasmatisches Retikulum), Gas1 (Plasmamembran), ALP (Vakuolen), anti-Hsp12 Antikörper (Hsp12). Der gelbe Balken zeigt den Hauptteil der Verteilung (—).

#### 3.4. Genauere Lokalisation von Hsp12 in der Zelle

Um das Verteilungsmuster besser beurteilen zu können, wurden Zellorganellen aus *S. cerevisiae* isoliert, die bis zur stationären Phase kultiviert wurden (Erdmann et al.,

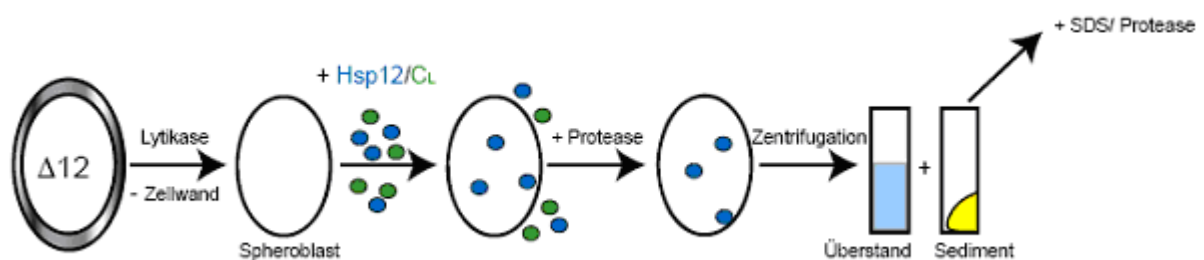
### 3. Ergebnisse

1989). Die Zellorganellen wurden in unterschiedlichen Fraktionen des Dichtegradienten gesammelt und mittels Immunoblot analysiert, indem Antikörper gegen Markerproteine für die Peroxisomenmembran (Pcs60), Zytosol (Fbp1), endoplasmatisches Retikulum (Kar2), Endosomen (Pep12), Mitochondrien (Porin), Plasmamembran (Gas1) und Vakuolenmembranen (ALP) verwendet wurden; verwendet wurde außerdem Hsp12 mit einem polyklonalen Hsp12-Antikörper (Abbildung 3.3. B). Den Markern entsprechend ist Hsp12 im Zytosol, der Plasmamembran, den Endosomen und vielleicht auch in den Vakuolen lokalisiert.

#### 3.5. Importversuche mit Hsp12

##### 3.5.1. Translokation von Hsp12 durch die Plasmamembran lebender Hefezellen

Hsp12 scheint in der Lage zu sein, die Plasmamembran von Hefezellen zu durchqueren, da es in der stationären Phase hauptsächlich in der Zellhülle zu finden ist (Abbildung 3.3. A). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es sich dabei um einen Prozess in eine Richtung, also unter Mitwirkung spezifischer, zellulärer Translokationsmechanismen handelt, oder ob Hsp12 davon unabhängig die Lipidmembran durchqueren kann. Folglich wurden die Bindung an und die Translokation von gereinigtem Hsp12 durch die Plasmamembran durch die Zellmembran wie folgt getestet (Abbildung 3.4.).



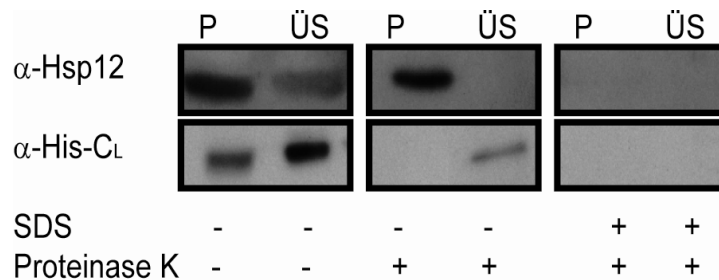
**Abbildung 3.4. Schematische Darstellung des Translokationsversuchs von Hsp12 durch die Zellmembran lebender  $\Delta$ Hsp12-Zellen nach Meinschmidt (2006).** Oval:  $\Delta$ Hsp12-Zellen mit (dicke, graue Umrandung) oder ohne Zellwand; (●): gereinigtes, rekombinantes Hsp12; (●):  $C_L$ , konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers (ca. 12 kDa).

$\Delta$ Hsp12-Zellen wurden zunächst mit Hilfe von Lytikase in Spheroplasten konvertiert. Die zellwandlosen, lebenden Zellen wurden mit gereinigtem, rekombinanten Hsp12 zehn Minuten bei Raumtemperatur osmotisch stabilisiert inkubiert. Als Kontrolle diente der gleiche Zellansatz versetzt mit gereinigtem  $C_L$ , der konstanten Domäne



### 3. Ergebnisse

der leichten Kette eines Antikörpers, das mit etwa 12 kDa der Größe von Hsp12 entspricht. Zugabe von Proteinase K nach der Importreaktion sollte zum Abbau aller ungeschützten Proteine führen, die nicht in der Lage waren, in die Zellmembran einzutauchen oder diese zu durchqueren. Nach Zentrifugation der Ansätze wurden sowohl die Überstände als auch die sedimentierten und daraufhin aufgeschlossenen Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Western Blot analysiert (Abbildung 3.5.).

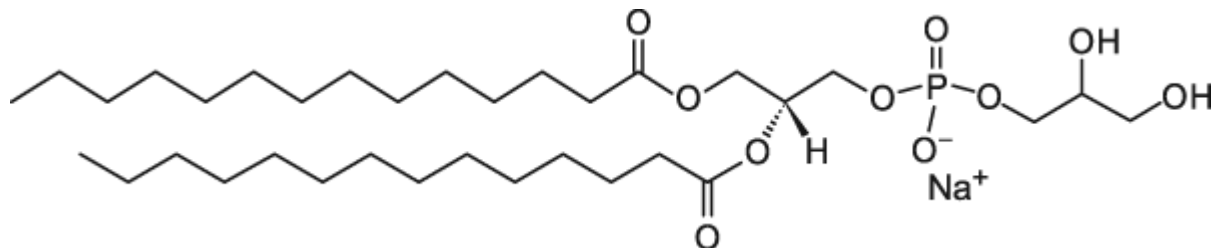


**Abbildung 3.5. Western Blot gegen Hsp12 bzw. C<sub>L</sub> nach dem Translokationsversuch durch die Plasmamembran von  $\Delta$ Hsp12-Zellen** Linke Spalte: Western Blot nach Importreaktion von Hsp12 bzw. C<sub>L</sub> durch die Membran zellwandloser  $\Delta$ Hsp12-Zellen und Zentrifugation; mittlere Spalte: Western Blot nach Importreaktion, Inkubation mit Protease (Proteinase K) und Zentrifugation; rechte Spalte: Western Blot nach Importreaktion, Inkubation mit SDS und Protease und nach Zentrifugation. Benutzung des spezifischen Antikörpers gegen Hsp12 bzw. des monoklonalen Antikörpers gegen den Histidin-Tag von C<sub>L</sub> (die konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers); ÜS (Überstand, zellfrei), P (Pellet, sedimentierte Spheroblasten).

Zentrifugation der Zellen nach erfolgter Importreaktion sollte zunächst nicht an die Membran gebundene Proteine von gebundenen trennen. Da Hsp12 sowohl im Überstand als auch im Sediment nachweisbar war (Abbildung 3.5., linke Spalte), schien zumindest eine Bindung an die Plasmamembran der Spheroblasten möglich. Ähnlich verhielt sich allerdings das ebenfalls ca. 12 kDa schwere Kontrollprotein C<sub>L</sub>, wobei das Signal im Pellet bedeutend schwächer erschien. Nach Proteasezugabe ließ sich das sehr stabile C<sub>L</sub> zwar noch im Überstand nachweisen, aus dem Pellet war das Signal allerdings verschwunden. Ein gewisser Teil des eingesetzten Hsp12 hingegen war trotz der Proteasebehandlung ausschließlich im Zellpellet detektierbar (Abbildung 3.5., mittlere Spalte) und wurde erst nach Lyse der Zellen mit SDS vollständig durch die Proteinase K abgebaut (rechte Spalte). Dementsprechend darf davon ausgegangen werden, dass dieser Hsp12 Anteil aufgrund tiefen Eindringens in die Membran bzw. durch eventuelles Durchqueren derselben vor der Protease geschützt war.

#### 3.5.2. Import von Hsp12 in „Large-Unilamellar Vesicles“ (LUVs)

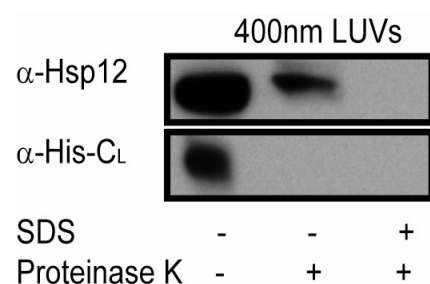
Zur Überprüfung, ob gereinigtes Hsp12 synthetische Lipiddoppelschichten - Modellmembranen - passieren kann, wurden zunächst große Phospholipidvesikel präpariert. Diese setzte sich aus DMPG zusammen (siehe Abbildung 3.6.).



**Abbildung 3.6. Struktur von DMPG.**

DMPG: 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)]

Dieses Lipid wurde mittels eines Extruders durch einen Polycarbonat-Filter definierter Porengröße gepresst. Dabei entstanden große unilamellare Vesikel (LUVs) mit einem Durchmesser von 400 nm durch Extrusion (MacDonald et al., 1991). Eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur mit gereinigtem Hsp12 bzw.  $C_L$  als Kontrolle sollte ein mögliches Durchqueren durch die synthetische Membran der Liposomen gewährleisten. Ungeschütztes Protein wurde daraufhin, oder nach Auflösung der Lipidvesikel durch Detergenz, von der Proteinase K abgebaut. Die Ansätze wurden nach Auftrennung über SDS-PAGE mit Western Blot analysiert (Abbildung 3.7.).



**Abbildung 3.7. Western Blot der Importversuche von Hsp12 bzw.  $C_L$  durch 400nm LUV-Membranen.** Linke: Western Blot nach Inkubation von Hsp12 bzw.  $C_L$  mit LUVs im Verhältnis 1:25; Mitte: nach Importreaktion und Inkubation mit Protease; rechte Seite: nach Importreaktion und Inkubation mit SDS und Protease; LUVs, bestehend aus DMPG im Verhältnis 1:3.

Nach Inkubation von Hsp12, beziehungsweise dem Kontrollprotein  $C_L$ , mit den großen Lipidvesikeln konnten beide Proteine im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 3.7., links). Im Anschluss an die Behandlung mit Proteinase K war nur noch ein, wenn auch kleinerer, Anteil an Hsp12 detektierbar; das Kontrollprotein ist vollständig abgebaut worden (Abbildung 3.7., Mitte). Diese nach der Importreaktion

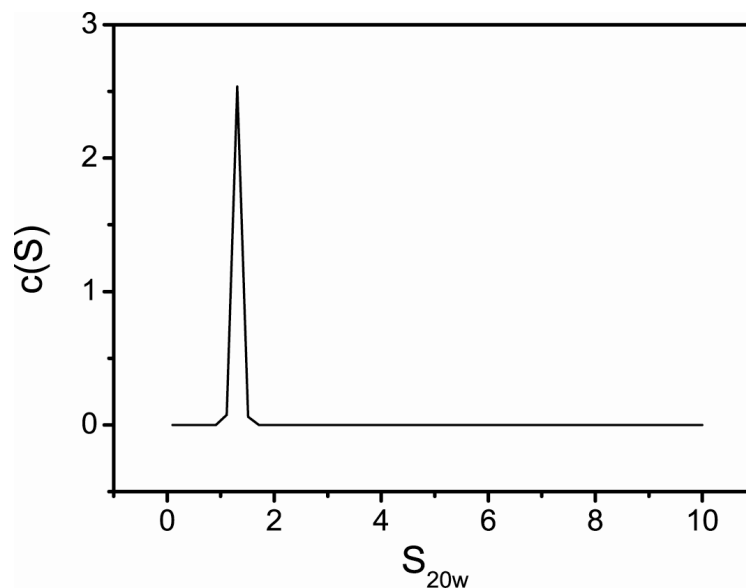
### 3. Ergebnisse

---

proteaseresistente Fraktion an Hsp12 wurde erst nach Auflösung der Vesikelmembran mit Hilfe von SDS abgebaut (Abbildung 3.7., rechts). Demnach war zumindest ein gewisser Anteil von Hsp12 in der Lage, derartige Modellmembranen eventuell zu durchqueren oder in sie einzutauchen und sich dem Proteaseangriff zu entziehen.

#### 3.6. Hsp12 ist ein intrinsisch ungefaltetes Protein, das durch Lipid-Interaktion Struktur annimmt

Die erhaltenen *in vivo* Ergebnisse waren der Anlass, mehr über die strukturellen Eigenschaften von Hsp12 *in vitro* herauszufinden. Hsp12 konnte sowohl aus der löslichen Fraktion von Wildtyp-Hefezellen isoliert werden als auch rekombinant aus *E. coli* Zellen. Durch die Massenspektrometrie wurde die erwartete molekulare Masse bestätigt und gezeigt, dass keine post-translationalen Modifikationen von Hsp12 in der Hefe detektierbar sind. Die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation bestätigten, dass Hsp12 als Monomer vorliegt.

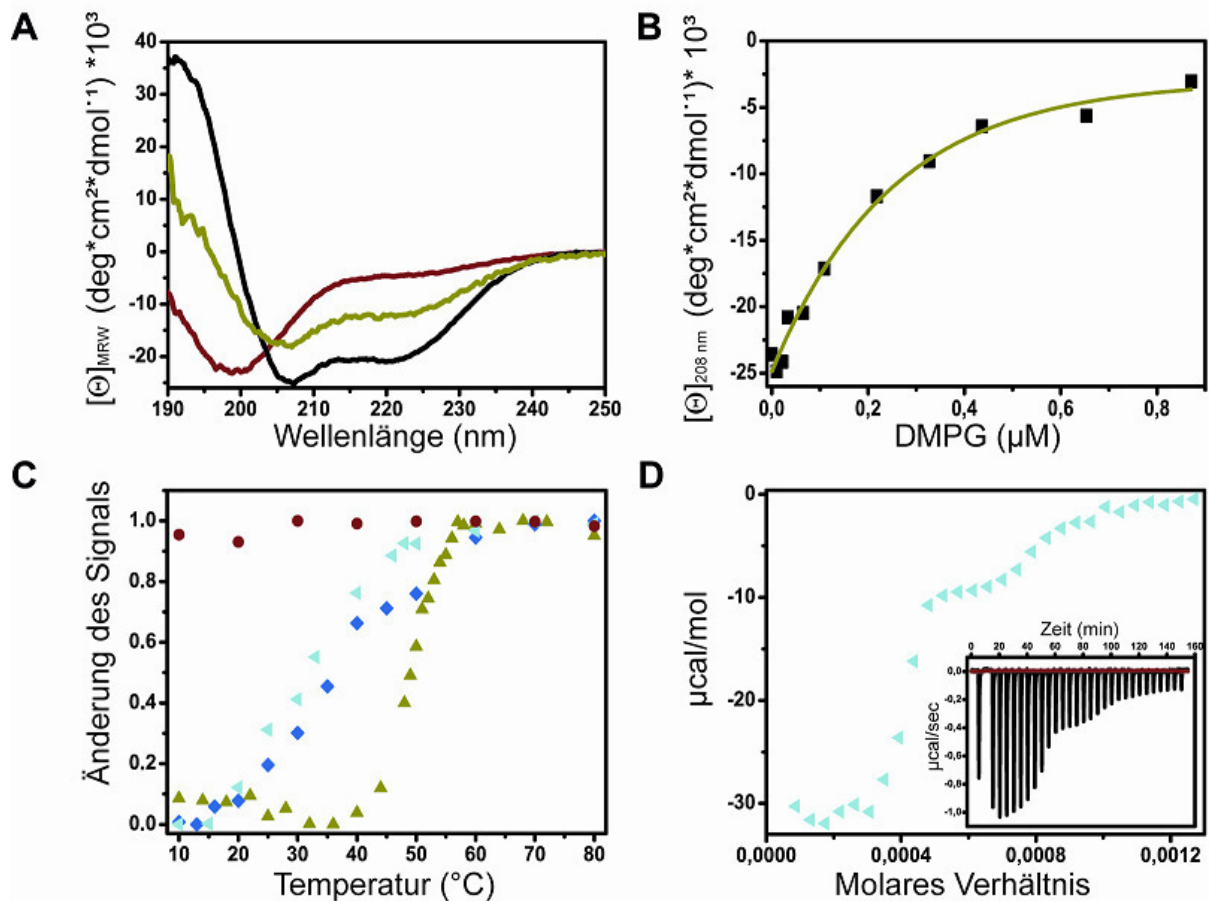


**Abbildung 3.8. C (s) Verteilungs- Plot.** Die C (s) Analyse von Hsp12 (0,5 mg/ml) zeigt deutlich eine Species mit einem S<sub>20</sub> –Wert von 1,3 S.

Die Untersuchung der Struktur von Hsp12 durch Circular dichroismus (CD) im Fern-UV Bereich bestätigte, dass Hsp12 keine messbare Sekundärstruktur zeigt, dies bedeutet, dass das Protein in Lösung komplett ungefaltet vorliegt (Abbildung 3.9. A). Aufgrund seiner Interaktion mit Membranen wurde untersucht, ob die Zugabe von

### 3. Ergebnisse

Lipidmembranen oder Lipid-ähnlichen Molekülen einen Einfluss auf die Struktur von Hsp12 haben könnte. Auffallenderweise zeigte Hsp12 sowohl nach Zugabe von DMPG als auch SDS im Fern-UV Spektrum die Struktur eines  $\alpha$ -helikalen Proteins (Abbildung 3.9. A).



**Abbildung 3.9. Lipidbindungseigenschaften von Hsp12.** (A) Fern-UV CD-Spektroskopie von 0,13  $\mu\text{M}$  Hsp12. Die CD-Spektren wurden bei 20  $^{\circ}\text{C}$  in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4 in Abwesenheit (–) oder Gegenwart von SDS (–), bzw. in Gegenwart von 4,3 mM SUV-DMPG (–). (B) Die DMPG-Titration wurde am CD-Spektrometer aufgenommen. Die CD-Signale bei 208 nm wurden gegen die DMPG-Konzentration aufgetragen und einfach exponentiell gefittet (–), um die entsprechenden  $K_D$ -Werte zu erhalten (Tabelle 3.1.). (C) Thermische Übergänge von Hsp12 im Bereich von 10  $^{\circ}\text{C}$  bis 80  $^{\circ}\text{C}$  bei verschiedenen Pufferbedingungen und einer Wellenlänge von 208 nm. Hsp12 in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4 (•), mit 4,3 mM DMPG (▲), POPG (◊) oder DPPG (▲) versetzt. Das Signal des ungefalteten Proteins wurde auf 1 normalisiert. (D) Lipidbindungsanalyse durch ITC. Die Änderung der Proben temperatur durch Zugabe von Hsp12 zu POPC/POPG-SUVs wurde bei 28  $^{\circ}\text{C}$  gemessen. Die integrierten Peaks des ITC-Signals wurde gegen das molare Verhältnis aufgetragen (◊). Innen: Wärmekapazität aufgenommen während der Titration.

### 3. Ergebnisse

Dieser Effekt auf die Hsp12-Struktur ist konzentrationsabhängig und ist für beide, Lipid und SDS, sättigungsfähig, wie hier für DMPG gezeigt wird (Abbildung 3.9. B). Die lipidinduzierte Stabilität wurde durch thermische Entfaltungsexperimente analysiert (Abbildung 3.9. C). In Anwesenheit von DMPG war die Sekundärstruktur von Hsp12 bis 40 °C stabil und schmolz dann in einem kooperativen Übergang mit einem Schmelzpunkt von 49 °C. Es konnte kein struktureller Übergang von Hsp12 in Abwesenheit von Lipiden gemessen aufgezeichnet werden. In Anwesenheit von Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerol (DPPG) oder 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (POPG) resultierte die thermische Entfaltung von Hsp12 in Schmelzpunkten von etwa 35 °C.

Lipid-Vesikel oder Mizellen	oder SDS	Temperatur (°C)	$k_D$ (μM)
POPC/POPG 3:1 synthetisch		28	413.3 <sup>a</sup>
SDS		20	384.9 <sup>b</sup>
POPG synthetisch		20	241.0 <sup>a</sup>
DMPG synthetisch		20	4.1 <sup>b</sup>
DMPG natürlich		20	4.0 <sup>b</sup>
PI		20	4.0 <sup>b</sup>
DMPC/DMPG synthetisch		20	1.9 <sup>b</sup>
DMPC/DMPG natürlich		20	1.9 <sup>b</sup>
DMPA synthetisch		20	Keine detektierbare Binding <sup>b</sup>
DMPC synthetisch		20	Keine detektierbare Binding <sup>b</sup>
DMPE synthetisch		20	Keine detektierbare Binding <sup>b</sup>
DMPS synthetisch		20	Keine detektierbare Binding <sup>b</sup>
PE		20	Keine detektierbare Binding <sup>b</sup>
POPC synthetisch		20	Keine detektierbare Binding <sup>b</sup>
POPS synthetisch		20	Keine detektierbare Binding <sup>b</sup>
Lipid rafts <sup>c</sup>		20	Keine detektierbare Binding <sup>b</sup>
POPC/POPG 10:1 synthetisch		28	Keine detektierbare Binding <sup>a</sup>

**Tabelle 3.1. Bindungskonstanten für SDS und verschiedene Lipide an Hsp12.** Natürlich: isoliert aus Organellen; synthetisch: chemisch synthetisiert (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama).

<sup>a</sup>Gemessen mittels ITC. <sup>b</sup>Gemessen mittels CD. <sup>c</sup>Lipid rafts wie durch Simons and Toomre (2000) definiert.

### 3. Ergebnisse

---

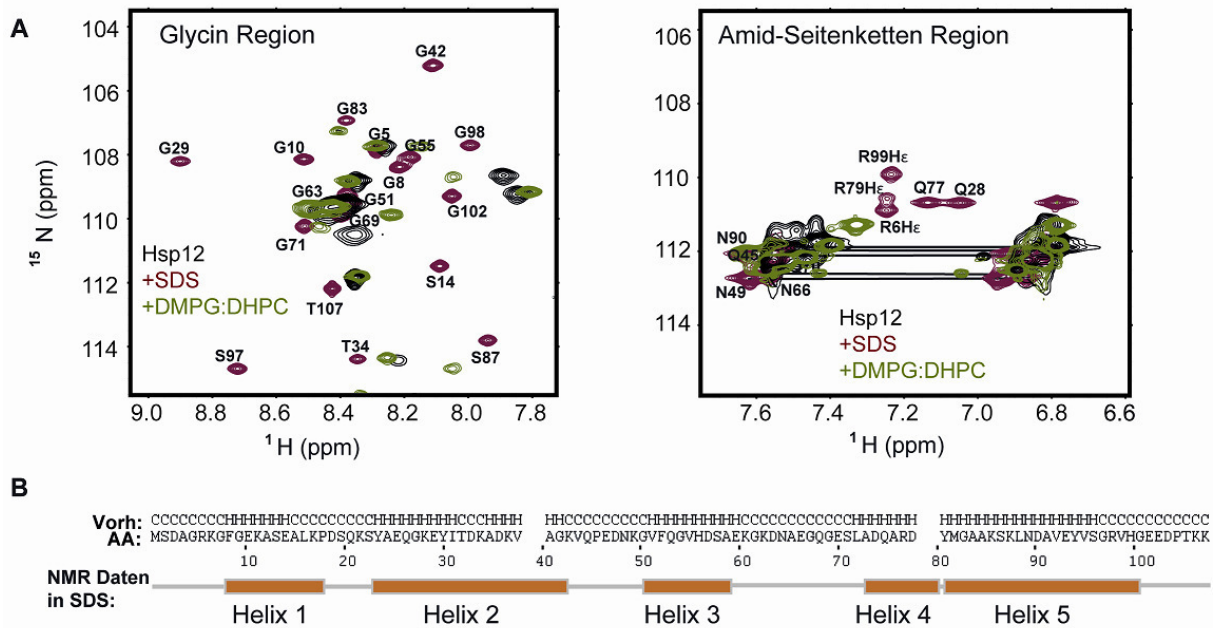
Um die Interaktion von Lipiden mit Hsp12 quantitativ zu untersuchen, bestimmten wir die Bindungskonstanten für SDS und verschiedene Lipide an Hsp12 durch CD Spektroskopie oder isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) (Abbildung 3.9. D und Tabelle 3.1.).

Die so ermittelten  $K_D$ -Werte liegen im Rahmen von 2  $\mu\text{M}$  für eine Mischung aus Dimyristoyl-phosphatidylcholin (DMPC) und DMPG, und 385  $\mu\text{M}$  für SDS. Die biphasische ITC-Titrationskurve spiegelt vielleicht eine Änderung der Membraneigenschaften während des Übergangs wider oder zeigt, dass die Vesikeloberfläche mit Hsp12 gesättigt ist, was allerdings untypisch für das verwendete Lipid Protein Verhältnis wäre. Hinsichtlich der Lipidspezifität kann gesagt werden, dass Hsp12 mit einigen, allerdings nicht mit allen Lipiden interagiert, die eine negative Kopfgruppe besitzen (Tabelle 3.1.). Positiv geladene oder zwitterionische Lipide induzieren bei Hsp12 keine detektierbare Struktur, und die ITC-Experimente zeigten, dass Hsp12 im messbaren Bereich dieses Experiments nicht an diese Lipide binden kann.

#### **3.7. Hsp12, ein helikales Protein**

Um detailliertere Einblicke in die Struktureigenschaften von Hsp12 zu bekommen, wurde die Struktur mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Kessler analysiert. Die  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Hsp12 zeigten eine kleine Dispersion der Amidprotonen Resonanz im spektralen Bereich von 7,7 bis 8,7 ppm (Abbildung 3.10. A) und die Akkumulation von  $\text{NH}_2$ -Seitenkettensignalen in ihren unstrukturierten Bereichen von 7,5 bis 6,8 ppm, was mit der Vorstellung eines großen, nativ nicht gefalteten Protein übereinstimmt.

### 3. Ergebnisse

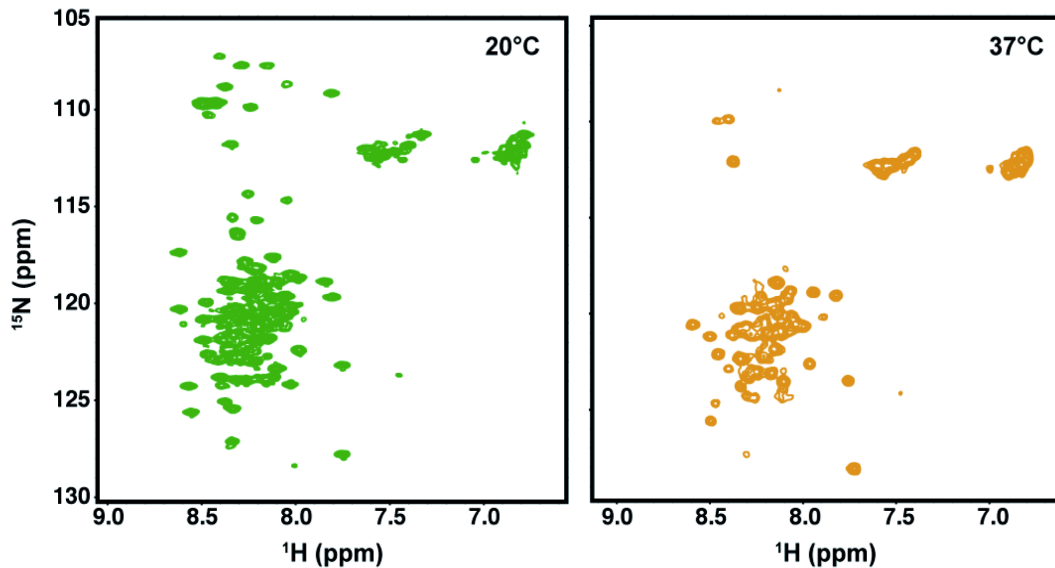


**Abbildung 3.10. NMR-Analyse von Hsp12.** (A) Ausschnitte von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC von ungefaltetem Hsp12 (schwarz), SDS-gefaltetem Hsp12 (rot) und Hsp12 in Gegenwart von Phospholipidbizellen (grün). Das Lösungsmittel SDS induziert die größten chemischen Verschiebungen und führt zur Ausbildung eines hohen Anteils an Sekundärstruktur. (B) Die Sekundärstrukturvorhersage (Vorh) mittels PSI-PRED (Jones, 1999) zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Positionen der Helices, die durch NMR-Daten mit SDS gewonnen wurden (AA). Daten von Franz Hagn und Prof. Kessler.

Die Titrationen von Hsp12 mit  $d_{25}$ -SDS veränderte das Signalverteilungsmuster vom  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum signifikant (Abbildung 3.10., rot), was zu einer erhöhten Signaldispersion führte. Dies wird am deutlichsten, wenn man die Glycinreste und die  $\text{NH}_2$ -Seitenkettensignale vergleicht. So konnte gezeigt werden, dass ungefaltetes Hsp12 durch Zugabe von SDS Struktur annimmt.

Zusätzlich konnte durch eine Phospholipidmischung (255 mM 1,2-Dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DHPC), 45 mM DMPG), die Bizellen mit einem Durchmesser von 70 Å ausbildet, auch eine gesteigerte Signaldispersion im Vergleich zum ungefalteten Protein festgestellt werden (Abbildung 3.10., grün). Im Gegensatz zu ungefaltetem Hsp12 zeigt an Mizellen gebundenes Hsp12 eine schmalere Linienbreite, ein indikatives Merkmal für einen definierten strukturellen Zustand. Der chemische Austausch bei höheren Temperaturen (37 °C) ist oberhalb des Lipidphasenübergangs signifikant verstärkt, wo Hsp12 ein Intermediataustausch zwischen seiner freien und gebundenen Form zeigt. Dies führt zu breiteren Linien und abnehmenden Signalen (Abbildung 3.11.).

### 3. Ergebnisse

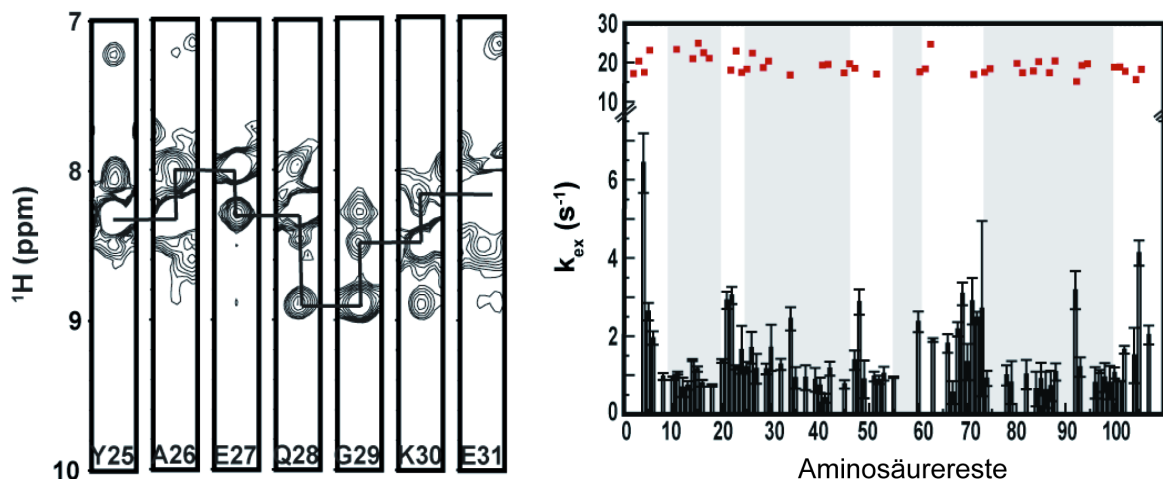


**Abbildung 3.11.**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektren von Hsp12 in 300 mM Phospholipidbizellen (255 mM DHPC, 45 mM DMPG,  $q=0.15$ ) bei 20 °C (links) und 37 °C (rechts). Die Signaldispersion in Bizellen der HN Resonanzen ist viel geringer als in SDS. Dennoch deuten die vorhandenen schmale Linienbreiten bei 20 °C auf einen definierten strukturierten Zustand hin, ohne jegliche Linienverbreiterung, die durch chemische Austauschprozesse verursacht wurden, wie es für ungefaltetes Hsp12 der Fall ist. Bei 37 °C, nach dem Phasenübergang der Lipide, zeigen eine signifikante Linienverbreiterung und der Signalverlust einen Austausch zwischen der gebundenen und freien Form deutlich an.

Da SDS die ausgeprägtere Signaldispersion und die bessere spektrale Qualität induzierte, haben wir die Analyse zur genauen Positionsbestimmung der Helices mit dem SDS-gefalteten Hsp12 fortgesetzt. Es wurden chemische Verschiebungswerte von  $\text{C}\alpha$ ,  $\text{C}\beta$ , CO und  $\text{H}\alpha$  ebenso verwendet wie auch Kern-Overhauser-Effektmuster (NOE), um die Sekundärstrukturelemente zu identifizieren (Abbildung 3.12., links). Ein typisches NOE-Muster für eine  $\alpha$ -helikale-„Backbone“-Geometrie konnte so bestimmt werden. Wir identifizierten zwei größere Helices, H2 und H5, die durch die Reste 24-45 und 83-100 gebildet werden und drei kleinere, H1, H3 und H4, ausgebildet jeweils durch die Reste 9-18, 50-56 und 74-81. Für diese Bereiche wurde eine Präferenz für eine helikale Geometrie vorhergesagt (Abbildung 3.10. B) (Jones, 1999). Die Helixgrenzen wurden durch die Wasserstoff-Verschiebungsrate von Amidprotonen mittels NEW MEXICO Experimenten (Gemmecker et al., 1993) für gefaltetes und unstrukturierte Hsp12 bestimmt (Abbildung 3.12., rechts).



### 3. Ergebnisse

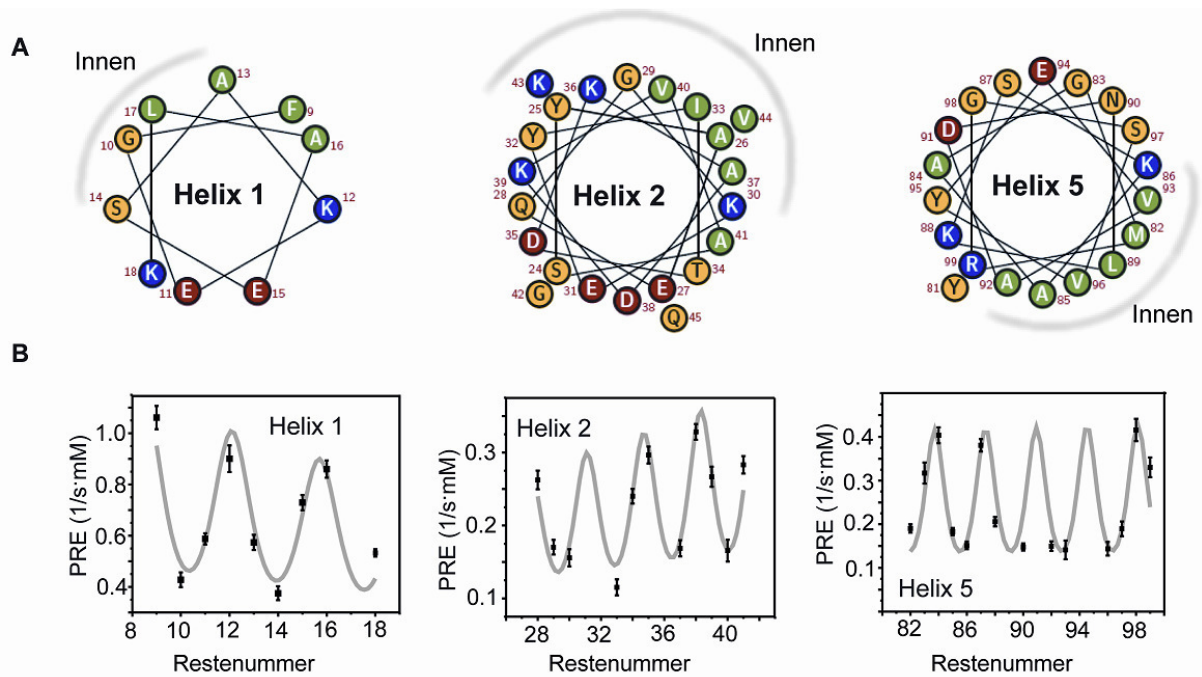


**Abbildung 3.12. Analyse der Sekundärstruktur von Hsp12 in SDS-Mizellen.** Links: Beispiel für ein typisches NOE  $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$  Muster für eine  $\alpha$ -helikale Geometrie. Diese NOE Muster wurden zu exakten Bestimmung der Helixgrenzen in Hsp12 verwendet. Ein typisches NOE-Muster für eine  $\alpha$ -helikale "backbone"-Geometrie ist an der Stelle zu erkennen, an der die starken sequenziellen  $^{\text{N}}\text{H}\text{-}^{\text{N}}\text{H}$  NOE-Kontakte durch schwarze Linien beschrieben sind. Rechts: Die Wasserstoff-Austauschraten sind für unstrukturierte Peptidbereiche hoch, weisen aber geringe Werte auf, wenn die Amide Wasserstoffbrücken bilden, was in regulären Sekundärstrukturelementen der Fall ist. In der hier gezeigten Abbildung für Hsp12 stellen die roten Quadrate die Austauschraten für die ungefaltete Form dar; die Balken die Raten für die SDS-gefaltete Form, welche innerhalb der Helices sehr niedrig waren ( $\sim 1\text{Hz}$ ).

Interessanterweise zeigen alle Helices amphipathische Eigenschaften. Hydrophobe Reste häufen sich hauptsächlich an einer Seite der Helix, was in Abbildung 3.13. A zu erkennen ist, wohingegen die polaren und geladenen Reste auf der entgegengesetzten Seite jeder Helix lokalisiert sind. Nur die längeren Helices sind hier gezeigt (mehr als 7 Reste).

Um weitere Informationen über die Position der amphipathischen Hsp12-Helices in der SDS-Mizelle zu erhalten, wurden paramagnetische Relaxationsverstärkungsexperimente (PRE) durchgeführt. Die Zugabe von steigenden Mengen an paramagnetischen Substanzen (Pintacuda und Otting, 2002; Respondek et al., 2007) resultierte in einer verstärkten Protonenrelaxation in Abhängigkeit der Einwirkung des Lösungsmittels. Diese PREs wurden gegen die entsprechenden Aminosäurereste geplottet (Abbildung 3.13. B).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.13. Helikale Rad-Darstellung der durch NMR identifizierten großen Helices 1, 2 und 5.** (A) Diese Helices zeigen die amphipatische Eigenschaften mit einer polaren/geladenen Seite und einer hydrophoben Seite deutlich. Rot/blau stellt die negative/positive Ladung dar; gelb/grün: bedeutet polar/nicht-polar. Für eine Evaluation der Eintauchtiefe konnten die PRE-Mittelwerte jeder Helix verwendet werden. Helix 1 zeigte einen Durchschnitt von ungefähr  $0,7 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ , dagegen sind die längeren Helices 2 und 5 weniger betroffen (Durchschnittswert  $0,25 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ). Das graue Band gehört zum Inneren der Membran. (B) Paramagnetische Relaxationsverstärkungs-Experimente (PRE) von Hsp12 in Anwesenheit von wasserlöslicher paramagnetischer Substanz (Pintacuda und Otting, 2002; Respondek et al., 2007) nehmen kleine Werte an, wenn das Protein-„Backbone“ von der Lösung geschützt ist und hohe Werte, wenn es der Umgebung frei ausgesetzt ist. Diese Daten machen deutlich, dass die hydrophoben Seiten der Helices nach innen gerichtet sind und die geladene Oberfläche nach außen zeigt oder in die polaren Kopfgruppen der Mizellen. Zusätzlich zeigen die PRE-Mittelwerte das Helix 1 auf der Oberfläche liegt und die Helices 2 und 5 tiefer in die Mizelle eintauchen. Die kleineren Helices 3 und 4 konnten auf Grund mangelndem Signals und spektraler Überlappung nicht berechnet werden. Allerdings weisen die PRE-Mittelwerte ( $0,5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) für diese Helices auf eine oberflächenexponierte Position hin.

Die hydrophoben Seiten der amphipatischen Helices stecken in der SDS-Mizelle und erfahren somit nur unbedeutende Auswirkungen der paramagnetischen Substanz, was an den niedrigen PRE-Werten erkennbar ist. Im Gegensatz dazu zeigen die polaren Seiten der Helices verstärkte PRE-Reaktionen, was auf einen erhöhten Kontakt mit dem Lösungsmittel (und der paramagnetischen Substanz darin) hindeutet. Diese Abhängigkeiten können durch eine helikale Welle gefittet werden, die dem Lösungsmittel ausgesetzt (hohe PRE-Werte) bzw. abgewandte (niedrige

PRE-Werte) Seiten der Helices darstellt. So scheint es, dass Helix 2 und 5 tiefer in die Mizelle eintauchen, während die Helices 1, 3 und 4 auf der Oberfläche der Mizelle liegen. Wie in Abbildung 3.13. A gezeigt, überspannt die hydrophobe Oberfläche der längeren Helices die Hälfte der Helix, während in Helix 1 ein kleinerer hydrophober Oberflächenbereich vorhanden ist, übereinstimmend mit den PRE-Daten.

#### **3.8. Die $\alpha$ -helikalen Domänen von Hsp12 sind für die Membraninteraktionen essentiell**

In einem weiteren Experiment wurde die Proteasestabilität von Hsp12 in An- und Abwesenheit von Lipidvesikeln untersucht (Abbildung 3.14., unten). Während Hsp12 durch Inkubation mit Proteinase K innerhalb von 20 min in Fragmente abgebaut wird, resultierte die Vorinkubation von Hsp12 mit Lipiden (DMPG) in einen signifikanten Schutz vor proteolytischem Abbau. Eine Analyse der Hsp12-Fragmente nach dem Proteaseverdau in Anwesenheit von Lipidvesikeln ließ erkennen, dass die Sequenzabschnitte, für die eine helikale Struktur durch Membraninteraktion vorhergesagt wurde, besonders vor Proteaseverdau geschützt wurden.

Um zu klären, ob die Membrananhaftung eine phänotypische Relevanz hat, wurden mehrere Hsp12-Fragmente hergestellt, in denen strukturelle Elemente vom N- oder C-Terminus entfernt wurden (Abbildung 3.14.). Dazu wurden komplett unstrukturiert Bereiche oder ganze Helices ( $\Delta C9$ ,  $\Delta C27$ ,  $\Delta C35$ ,  $\Delta C52$ ,  $\Delta N8$ ,  $\Delta N23$ ,  $\Delta N49$  und  $\Delta N56$ ) entfernt oder zerschnitten, indem nur Teile der Helices oder Teile des unstrukturierten Bereichs entfernt wurden ( $\Delta C13$ ,  $\Delta C36$ ,  $\Delta C54$ ,  $\Delta N10$ ,  $\Delta N24$  und  $\Delta N39$ ).

Das Wachstum von Wildtyp *S. cerevisiae* mit dem eines *HSP12* Deletionsstamms, der unterschiedliche Fragmente exprimiert, wurde verglichen, um zu erfassen, ob die Hsp12-Fragmente das Überleben nach einem kurzen, sublethalen Hitzeschock (20 min 58 °C) beeinflussen (Abbildung 3.14. und 3.15. A, D). Das Wachstum wurde durch die Deletion des unstrukturierten C-terminalen Bereichs +/- der Helix 5 ( $\Delta C9$ ,  $\Delta C13$  und  $\Delta C27$ ) oder des N-terminalen unstrukturierten Bereichs und Helix 1 ( $\Delta N8$ ,  $\Delta N10$  und  $\Delta N23$ ) nur geringfügig beeinträchtigt. Auch das Entfernen des zweiten N-terminalen unstrukturierten Bereichs und einer einzelnen Aminosäuren der Helix 2 ( $\Delta N24$ ) hatte nur eine geringfügige Beeinträchtigung zur Folge. Starke Wachstumsdefekte wurden bei Deletionen gefunden, die die Helices 4 und 5 und den

### 3. Ergebnisse

unstrukturierten Mittelteil von Hsp12 beinhalteten ( $\Delta C35$ ,  $\Delta C36$  und  $\Delta C52$ ) und eine Teildeletion von Helix 3 ( $\Delta C54$ ), ebenso wie die Helices 2 und 3 ( $\Delta N49$  und  $\Delta N56$ ).

	Schematische Ansicht von Hsp12					Wachstum	Morphologie			Zelluläre Verteilung		
	1	2	3	4	5	Hitzestress	Hitzestress	0,4 M NaCl	5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Zwf	Zf	mf
WT	1	2	3	4	5	+++	WT	WT	WT	ja	ja	ja
$\Delta C9$	1	2	3	4	5	++	WT	WT	WT	ja	ja	ja
$\Delta C13$	1	2	3	4	5	++	WT	WT	WT	ja	ja	ja
$\Delta C27$	1	2	3	4		++	runzelig	WT	WT/runzelig	nein	ja	ja
$\Delta C35$	1	2	3			+	runzelig	runzelig	runzelig	nein	ja	ja
$\Delta C36$	1	2	3			+	runzelig	runzelig	runzelig	nein	ja	ja
$\Delta C52$	1	2	3			+	runzelig	runzelig	runzelig	nein	ja	nein
$\Delta C54$	1	2	3			+	runzelig	runzelig	runzelig	nein	ja	nein
$\Delta N8$	1	2	3	4	5	++	WT	WT	WT	ja	ja	ja
$\Delta N10$	1	2	3	4	5	++	WT	WT	WT	ja	ja	ja
$\Delta N23$		2	3	4	5	++	WT	WT	WT	ja	ja	ja
$\Delta N24$		2	3	4	5	++	WT	WT	WT	ja	ja	ja
$\Delta N39$		2	3	4	5	+	runzelig	runzelig	runzelig	nein	ja	nein
$\Delta N49$			3	4	5	+	runzelig	runzelig	runzelig	nein	ja	nein
$\Delta N56$				4	5	+	runzelig	runzelig	runzelig	nein	ja	nein

MS-Peptide:

**Abbildung 3.14. Analyse der Hsp12 Fragmente.** (A) Schematische Ansicht von Hsp12 (die oben genannten  $\alpha$ -helikalen Domänen sind in schwarz dargestellt) und die designten Fragmente des Proteins werden hier mit den Fragmenten verglichen, die in der Massenspektrometrie nach einem Proteaseverdau gefunden wurden. (B) Zusammenfassung der Phänotypisierung der Wildtyp- (WT) und  $\Delta$ Hsp12-Stämme im Vergleich mit den jeweiligen Deletions-Fragmenten. Das Zellwachstum wurde auf Agarplatten bei 30 °C nach einem kurzen, sublethalen Hitzeschock (58 °C für 20 min) beobachtet (Abbildung 3.15. A, D), oder nach osmotischem oder oxidativem Stress (Abbildung 3.15. A). Die Wachstumslevel: +++, Wachstum wie der WT-Stamm; ++, leicht reduziertes Wachstum; +, stark reduziertes Wachstum. Die Hefemorphologie wurde außerdem durch REM nach Hitzeschock bei 58 °C für 20 min untersucht, nach osmotischem Stress (0,4 M NaCl), und nach oxidativem Stress (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Zellen wiesen eine Wildtyp-gleiche (WT) oder runzelige Oberfläche (runzelig) auf. Die Bilder dazu sind in Abbildung 3.15. B und D dargestellt. Zur Bestimmung der zellulären Verteilung wurden die Zellen bei 30 °C bis zur stationären Phase kultiviert. Dann wurden die Zellen aufgeschlossen und durch differentielle Zentrifugation fraktioniert und die Fraktionen mittels Western-Blot-Analyse und SDS-PAGE aufgetrennt. ZWF, Zellwandfraktion; ZF, zytosolische Fraktion; MF, Membranfraktion.

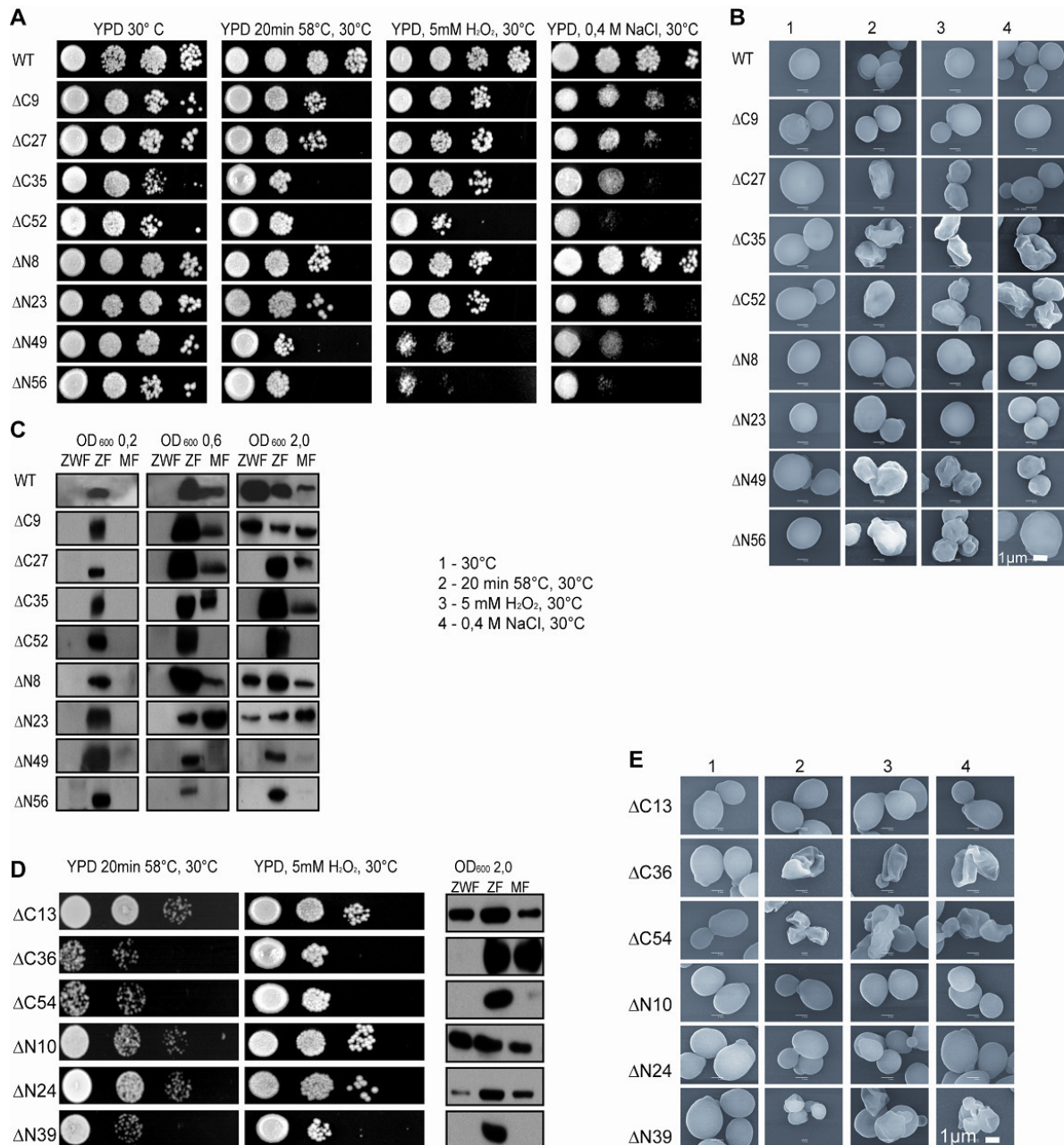
### 3. Ergebnisse

---

Auch eine Deletion der Helix 1 und eine teilweise Deletion der Helix 2 ( $\Delta N39$ ) führte zu starken Wachstumsdefiziten. Des Weiteren untersuchten wir, ob diese Hsp12-Fragmente imstande sind, die Wachstumsdefekte der *HSP12* Deletion unter osmotischen und oxidativen Bedingungen zu kompensieren. Fragmente, denen Sequenzen des N- und C-Terminus einschließlich der Helix 1 ( $\Delta N23$ ) oder Helix 5 ( $\Delta C27$ ) fehlen, zeigen nur schwache Wachstumsdefekte (Abbildung 3.15. A). Durch die Raster-Elektronenmikroskopie (REM) konnte für die Fragmente, denen Sequenzbereiche des N- und C-Terminus einschließlich der Helix 1 ( $\Delta N23$ ) und einschließlich eine Aminosäure der Helix 2 ( $\Delta N24$ ) fehlen, eine Wildtyp-ähnliche Morphologie nach Hitzestress gezeigt werden. Kleinere Fragmente zeigen eine runzelige Morphologie (Abbildung 3.14. und 3.15. B, E). Nach oxidativem Stress zeigten die Deletionsfragmente nahezu die gleiche Morphologie, die auch nach dem Hitzestress oder dem osmotischen Stress festgestellt wurde. Die einzige Ausnahme war das  $\Delta C27$ -Fragment, das Wildtyp-ähnliche Struktur unter osmotischen Stressbedingungen zeigte, aber eine veränderte Morphologie nach Einfluss von Hitze- und oxidativem Stress (Abbildung 3.15. B). Auch eine 2/3-Deletion der Helix 2 ( $\Delta N39$ ) führte zu einer runzeligen Morphologie der Hefezelle (Abbildung 3.15. E).

Als nächstes wurde die Lokalisation der Hsp12-Fragmente untersucht. Lagen diese in den lebenden Zellen nach wie vor im Bereich der Plasmamembran vor? Dazu wurde der *HSP12* Deletionsstamm, komplementiert mit den entsprechenden Hsp12-Fragmenten, in Flüssigmedium bei 30 °C bis zur stationären Phase kultiviert. Dies wurde durch die Kontrolle der optischen Dichte (OD) bestimmt. Nach dem Zellaufschluss wurde das Zytosol von der Membran- und Zellwandfraktion getrennt (Abbildung 3.14. und 3.15. C und D). Western Blot Analysen detektierten die Hsp12-Fragmente  $\Delta C9$ ,  $\Delta C9$ ,  $\Delta N8$ ,  $\Delta N10$ ,  $\Delta N23$  und  $\Delta N24$  im Zytosol (ZF), in der Membran- (MF) und Zellwandfraktion (ZWF). Wenn die Helix 5 +/- 4 und Teile der unstrukturierten Mitte ( $\Delta C27$ ,  $\Delta C35$  und  $\Delta C36$ ) entfernt wurden, konnten die Hsp12-Fragmente nicht mehr in der Zellwandfraktion nachgewiesen werden.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.15. Zellwachstum und Morphologie unter Stress und zelluläre Verteilung von Wildtyp und Hsp12-Fragmenten.** (A) Zellwachstum auf Agarplatten. Der Wildtypstamm (WT) und die Hsp12-Fragmentstämme (mit Deletionen jeweils genau vor oder nach der Helix) wurden auf Agarplatten bei 30 °C nach einem kurzen Hitzeschock (20 min Inkubation bei 58 °C), unter oxidativem Stress (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und unter osmotischem Stress (0,4 M NaCl) kultiviert. (B) Rasterelektronenmikroskopie zeigt die Hefemorphologie von Wildtypstamm (WT) und der Hsp12-Fragmentstämme (mit Deletionen jeweils genau vor oder nach der Helix) bei 30°C (1), nach Hitzeschock bei 58°C für 20 min (2), unter osmotischem Stress (0,4 M NaCl) (3), und unter oxidativen Stressbedingungen (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (4). Die Zellen zeigen eine Wildtyp-gleiche oder eine runzelige Morphologie. Der Balken zeigt die Größe 1 µm. (C) Die zelluläre Verteilung von Hsp12-Wildtyp und Hsp12-Fragmenten mit Deletionen jeweils genau vor oder nach der Helix. Die Zellen wuchsen bei 30 °C bis zu unterschiedlichen Wachstumsphasen, die durch die entsprechenden OD-Werte ermittelt wurden. Die Zellen wurden dann aufgeschossen und durch differentielle Zentrifugation fraktioniert,

### 3. Ergebnisse

---

und durch Western Blot und SDS-PAGE analysiert. Zwf zeigt die Zellwandfraktion, zf die zytosolische Fraktion und mf die Membranfraktion. (D) Zellwachstum auf Agarplatten, Hefemorphologie und zelluläre Verteilung von Hsp12-Fragmenten, die innerhalb oder in unstrukturierten Bereichen zwischen den Helices eine Deletion aufweisen. Diese Hsp12-Fragmentstämme wurden auf Agarplatten bei 30 °C nach einem kurzen Hitzeschock (20 min Inkubation bei 58 °C) kultiviert. Die zelluläre Verteilung von den Hsp12-Fragmenten mit Deletionen zwischen oder innerhalb der  $\alpha$ -helikalen Domäne. Die Zellen wuchsen bei 30 °C bis zur stationären Wachstumsphasen ( $OD_{600}$  2,0). Die Zellen wurden dann aufgeschlossen, durch differentielle Zentrifugation fraktioniert, und die Fraktionen wurden durch Western Blot und SDS-PAGE analysiert. Zwf zeigt die Zellwandfraktion, zf die zytosolische Fraktion und mf die Membranfraktion. (E) Die Rasterelektronenmikroskopie zeigt die Hefemorphologie der Hsp12-Fragmentstämme nach einem Wachstum bei 30 °C (1), nach Hitzeschock bei 58 °C für 20 min (2), unter osmotischem Stress (0,4 M NaCl) (3), und unter oxidativen Stressbedingungen (5 mM  $H_2O_2$ ) (4).

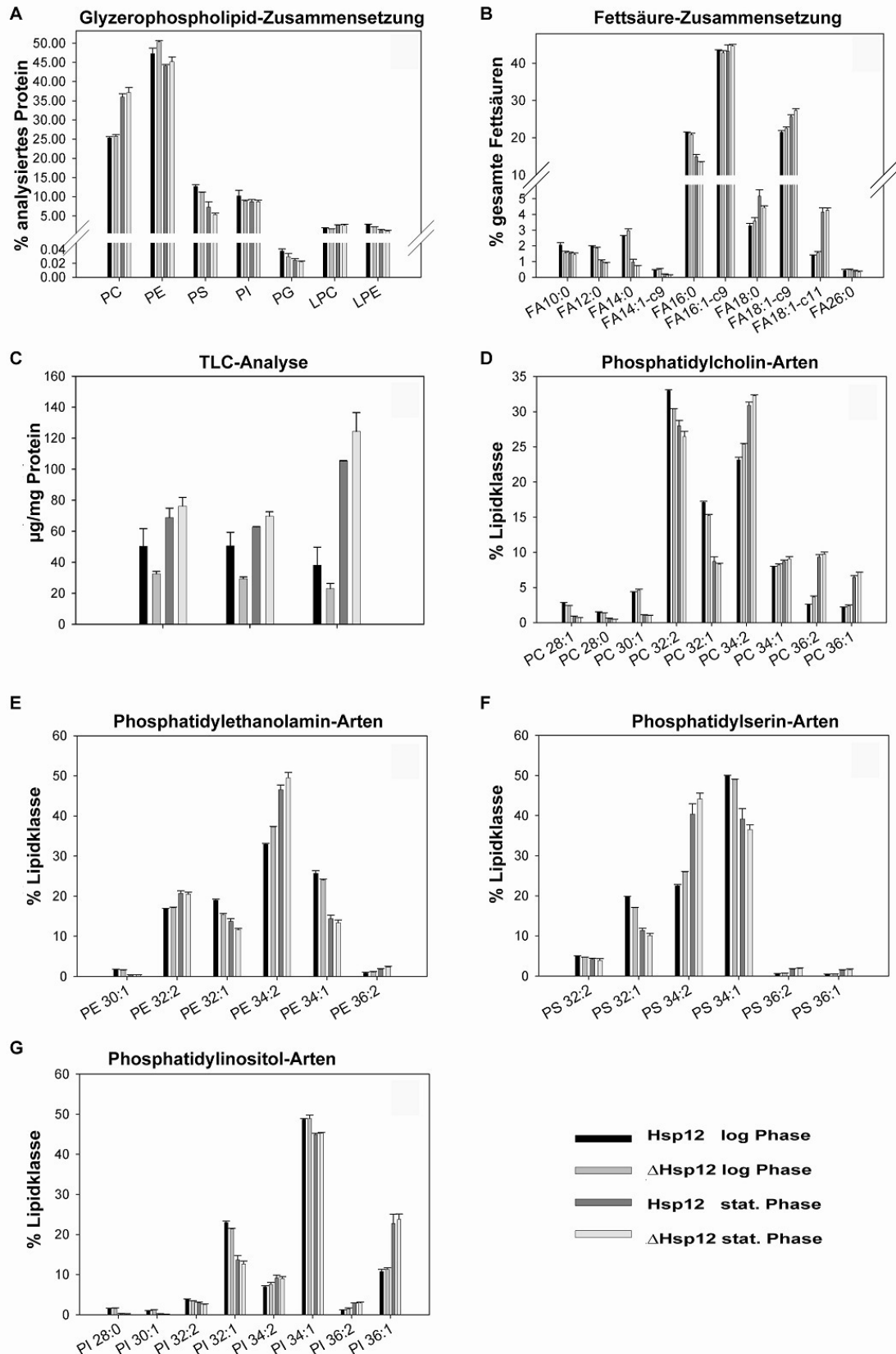
Eine zusätzliche Deletion des gesamten unstrukturierten Mittelstücks +/- Teilen der Helix 3 führte dazu, dass das Fragment ( $\Delta C52$  und  $\Delta C54$ ) nur noch im Zytosol erkennbar war. Gleiche Effekte konnten gezeigt werden, wenn die N-terminalen Bereiche, Helices 1 und 2/3 der Helix 2 ( $\Delta N39$ ) oder die gesamten Helices 1 und 2 ( $\Delta N49$ ) und Helix 3 ( $\Delta N56$ ) entfernt wurden.

Demzufolge scheinen die terminalen Helices für die Zellwandlokalisierung wichtig zu sein. Für den Verlust der Membraninteraktion sind allerdings größere Deletionen nötig.

#### **3.9. Hsp12 verändert die Lipidzusammensetzung von Hefe-Membranen nicht**

Da Hsp12 mit der Peripherie von Lipidvesikeln mit negativ geladenen Kopfgruppen interagiert, stellte sich die Frage nach dem Einfluss der Hsp12-Expression auf die Lipidzusammensetzung der Hefemembranen. Um diese Frage zu beantworten, wurden Wildtyphefen und der *HSP12* Deletionsstamm, nach Wachstum bis zur stationären Phase, als Membranfraktion isoliert. Die Lipidzusammensetzung wurden dann mittels Elektronenspray Ionisation (ESI) Tandem Massenspektrometrie, Gaschromatographie und Dünnschichtchromatographie in Kooperation mit Dr. Liebisch analysiert. Der Vergleich der beiden Datensätze zeigte, dass die meisten Lipide in ähnlicher Menge sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Wachstumsphase vorlagen (Abbildung 3.16. A-G).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.16. Die Lipidkomposition und die Profile der Glycerophospholipidspezies aus *HSP12*- und  $\Delta$ *Hsp12*-Stämmen.** (A) Glycerophospholipidprofile wurden mittels Elektronenspray-Ionisations-Tandem Massenspektrometrie in  $\Delta$ *Hsp12*- und Wildtypzellen des BY4741 Hefestammes ermittelt. Gezeigt werden Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin



### 3. Ergebnisse

---

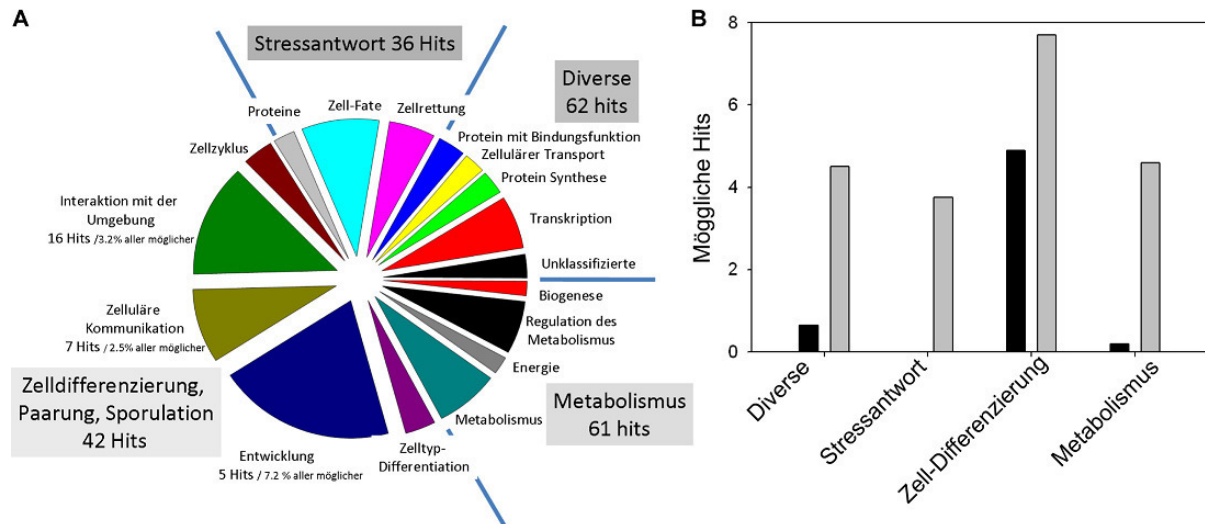
(PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylglycerol (PG), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Lysophosphatidylethanolamin (LPE) in Prozent der analysierten Glycerophospholipide. (B) Fettsäureprofile von  $\Delta$ Hsp12 und Wildtypzellen aus BY4741 wurden mittels Gaschromatographie, verbunden mit der Massenspektrometrie der Fettsäuremethylderivate, ermittelt. (C) Ergosterol, freie Fettsäuren und Triglyzeride wurden mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt. Die Profile der Glycerophospholipidspezies wurden mit Elektronenspray-Ionisations-Tandem Massenspektrometrie in  $\Delta$ Hsp12 und Wildtypzellen aus BY4741 untersucht. (D) Phosphatidylcholinarten (PC) aus BY4741. (E) Phosphatidylethanolaminsorten (PE) aus BY4741. (F) Phosphatidylserine (PS) aus BY4741. (G) Phosphatidylinositol (PI) aus BY4741. (C–G) Alle Werte sind in % betreffend der gesamten Lipidklasse und  $\pm$  SD bedeutet der Mittelwert der drei unabhängigen Proben.

Nur einige kleine Unterschiede in der Menge spezifischer Lipide konnte erfasst werden. Da die Lipidzusammensetzung besonders stamm-spezifisch ist, untersuchten wir in identischer Weise einen zweiten Stamm, SEY6211. Diese Analyse lieferte kein anderes Bild. Demzufolge verändert die Interaktion von Hsp12 mit Membranlipiden die Lipidzusammensetzung in Hefezellen nicht.

#### **3.10. Durch die *HSP12*-Deletion erfolgt die Expression einer großen Anzahl an Genen**

Um die Funktion von Hsp12 weiter zu charakterisieren, wurde eine Systemanalyse durchgeführt. Als erstes ermittelten wir Änderungen in der Genexpression von der *HSP12* Deletion mittels handelsüblicher *S. cerevisiae* Gene-Arrays. Es wurden annähernd 80 Gene gefunden, die sich aus 192 Hits entsprechend ihrer funktionellen Erläuterung ergaben (FunCat Datenbank; <http://mips.gsf.de/projects/funcat>), und die durch einen Faktor von mehr als 2,5 in Abwesenheit von Hsp12 in der stationären Phase entweder „up“- oder „down“-reguliert wurden (Abbildung 3.17. und Anhang Tabelle 7.1.).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.17. Differentielle Genexpressionsanalyse von *HSP12* und  $\Delta$ *Hsp12*-Stämmen bei 30 °C.** (A) Die Änderungen in der Genexpression in  $\Delta$ *Hsp12* wurden mittels Gen-Arrays untersucht. Die Genexpression wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, indem jeweils die  $\Delta$ *Hsp12*- mit den Wildtypzellen bei 30°C verglichen wurden. Für die Analyse wurde eine umfassende Normierungsstrategie erarbeitet, in der die durchschnittlichen Signalintensitäten auf einen Wert von 100 festgelegt wurden. Um einen signifikanten Regulationseffekt zu erhalten, wurde ein Minimum von einer 2,5 fachen Änderung der Expressionsprofile zwischen dem Knock-Out und dem WT-Stamm festgelegt. Entsprechend der jeweiligen Proteinfunktion (FunCat-Datenbank), wurden 192 Hits detektiert, die eine Änderung der Regulation innerhalb dieses Rahmens zeigen. Die Funktion der betroffenen Gene erlaubte eine Einteilung in 4 (in grau hinterlegte Bereiche) und mehrere Unterklassen. Die Abbildung zeigt die Anteile der entsprechenden Untergruppen, normalisiert auf 1 entsprechend der FunCat-Einteilung. Für einige der betroffenen Klassen sind außerdem Werte in % entsprechender der FunCat-Kommentierung angegeben. (B) Um ein besseres Verständnis der Genregulationsprozesse zu erhalten, wurden die Hits der 4 Hauptgruppen entsprechend der Regulationsrichtung getrennt: „Up“- (grau) und „Down“-Regulation (schwarz). Die entsprechenden Anteile sind in Prozent aller möglichen Hits angegeben.

Dieser hohe Grenzwert deutet auf eine massive Veränderung des gesamten Genexpressionsprofils der Hefezellen hin. Falls ein niedrigerer Grenzwert verwendet wird, zum Beispiel 2,0, war das Genexpressionsprofil von mehr als 1000 Genen betroffen. In Übereinstimmung mit den funktionellen Beschreibungen wurden diese stark betroffenen Gene in folgende Gruppen eingeteilt: Gene mit diverser Funktion (37 %) und drei spezifischen Bereichen wie Metabolismus (29 %), Stressantwort (11 %), und Differenzierung und Fortpflanzung (22 %). Bei der Einteilung der funktionellen Hits nach der Regulationsrichtung stellte sich interessanterweise heraus, dass die *Hsp12*-abhängigen Gene, die in die Stressantwort oder den Metabolismus verwickelt waren, hauptsächlich hochreguliert wurden, wohingegen die

### 3. Ergebnisse

Gene, die an der Differenzierung beteiligt waren nahezu gleichwertig „up“- und „down“-reguliert wurden.

Gendeletion <sup>a</sup>	Wachstum <sup>b</sup>	Gene Function <sup>a</sup>
SPR6	0 0	Involviert in Sporulation, molekulare Funktion unbekannt
MF(ALPHA)1	w w	Alpha mating Factor, Pheromon-Antwort, Pheromone, extrazellulär
MF(ALPHA)2	w w	Alpha mating Factor, Pheromon-Antwort, Pheromone, extrazellulär
FAT1	0 w	Fettsäuretransporter, Lipidtransport*, lange-Kette-Fettsäure-CoA-Ligase*, Plasmamembran*
VID22	w w	Vakuolenimport und Degradation, molekulare Funktion unbekannt
OPI1	w w	Negativ-Regulator der Phospholipidbiosynthese, Phospholipid metabolism
POX1, FOX1	w w	Fatty-acyl Coenzyme A Oxidase, Fettsäure-beta-Oxidation, Acyl-CoA Oxidase, peroxisomal
LPD1, HPD1	0 0	Dihydrolipoamiddehydrogenaseprekursor (mature Protein ist die E3 Komponente des alpha-Ketoaziddehydrogenase Komplexes), Serinbiosynthese*, Dihydrolipoamiddehydrogenase, mitochondriale Matrix*
GND1	0 0	6-Phosphoglukonatdehydrogenase, Decarboxylierung 1
MET17, MET15, MET25	w w	O-Acetylhomoserin-O-Acetylserin Sulfhydrylase, Methioninmetabolismus, O-acetylhomoserin (thiol)-Lyase, zytosolisch
IES2	0 0	Biologischer Prozess unbekannt, molekulare Funktion unbekannt
MDJ1	w w	DnaJ Homologes involviert in mitochondriale Biogenese und Proteinfaltung, Proteinfaltung*, Hitzeschockprotein, mitochondriale Innenmembran

**Tabelle 3.2. Synthetischer Letalitätsscreen.** Der Screen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der graue Hintergrund beschreibt die vier Hauptfunktionen der Gruppen (entsprechend der FunCat Datenbank). Der skalierte graue Hintergrund zeigt die Abgrenzung der entsprechenden Genfunktion in Korrelation zur Gen Chip Analyse (Abbildung 3.17.). Von hell- zu dunkelgrau sind Zelldifferenzierung, Metabolismus, verschiedene und Stressantwort. <sup>a</sup>Gennamen und Funktionen wie bei Euroscarf beschrieben. <sup>b</sup>0 bedeutet kein Wachstum; w bedeutet schwaches Wachstum.

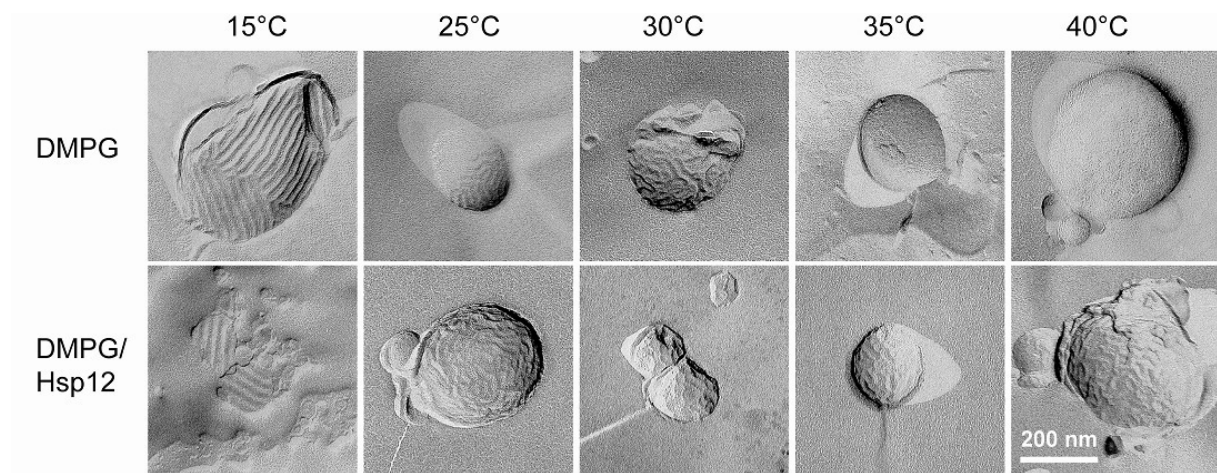
In einem zweiten Ansatz wurde ein Screen auf synthetische Letalität durchgeführt, bei dem normalerweise Gendeletionen überlebensfähig sind, wenn sie mit einem HSP12 „Knock-Out“ kombiniert werden (Tong et al., 2001). Die Gene, die auf diese Weise identifiziert wurden, sollten funktionell Hsp12 zugeordnet sein. In diesem Experiment wurden nur 12 Gene gefunden, die mit der *HSP12* Deletion zusammen letal waren (Tabelle 3.2.). Interessanterweise konnten alle von diesen in die gleichen funktionellen Bereiche eingeordnet werden. 7 Gene sind in den Metabolismus involviert, 3 in die Zelldifferenzierung, ein Gen kann dem Zellstress zugeordnet werden, und zwei Genen konnte bis jetzt keine Funktion zugeordnet werden.

Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass ein Mangel an Hsp12 zu einer breiten Reprogrammierung der Genexpression in Hefezellen führt, um deren Metabolismus und die Stressantwort anzupassen. Außerdem sind die Veränderungen der Genexpressionslevel, die aus der Sporulation und Paarung erhalten wurden, in einer auffallenden Weise betroffen, was eventuell auf eine Tendenz zur Vorbereitung auf Dauerformen der Zelle in Abwesenheit von Hsp12 hindeutet.

#### **3.11. Hsp12 moduliert Membraneigenschaften**

Um die schützende Funktion von Hsp12 weiter zu definieren, analysierten wir dessen Einfluss auf die Organisation von Lipiden. Es wurden verschiedene Methoden zur Beschreibung des Lipidphasenübergangs verwendet. Als erstes wurden DMPG-Vesikel bei verschiedenen Temperaturen in An- und Abwesenheit von Hsp12 mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie charakterisiert. Unterhalb des Schmelzpunkts bildet DMPG charakteristische „Rippel“-Strukturen aus, welche bei Temperaturen oberhalb des Schmelzpunkts wieder verschwinden (Heimburg, 2000). Dieser Effekt trat in unserem Experiment bei 35 °C auf (Abbildung 3.18., obere Reihe). Im Vergleich dazu konnte eine „Rippel“-Struktur in Anwesenheit von Hsp12 bei Temperaturen von bis zu 40 °C detektiert werden (Abbildung 3.18., untere Reihe).

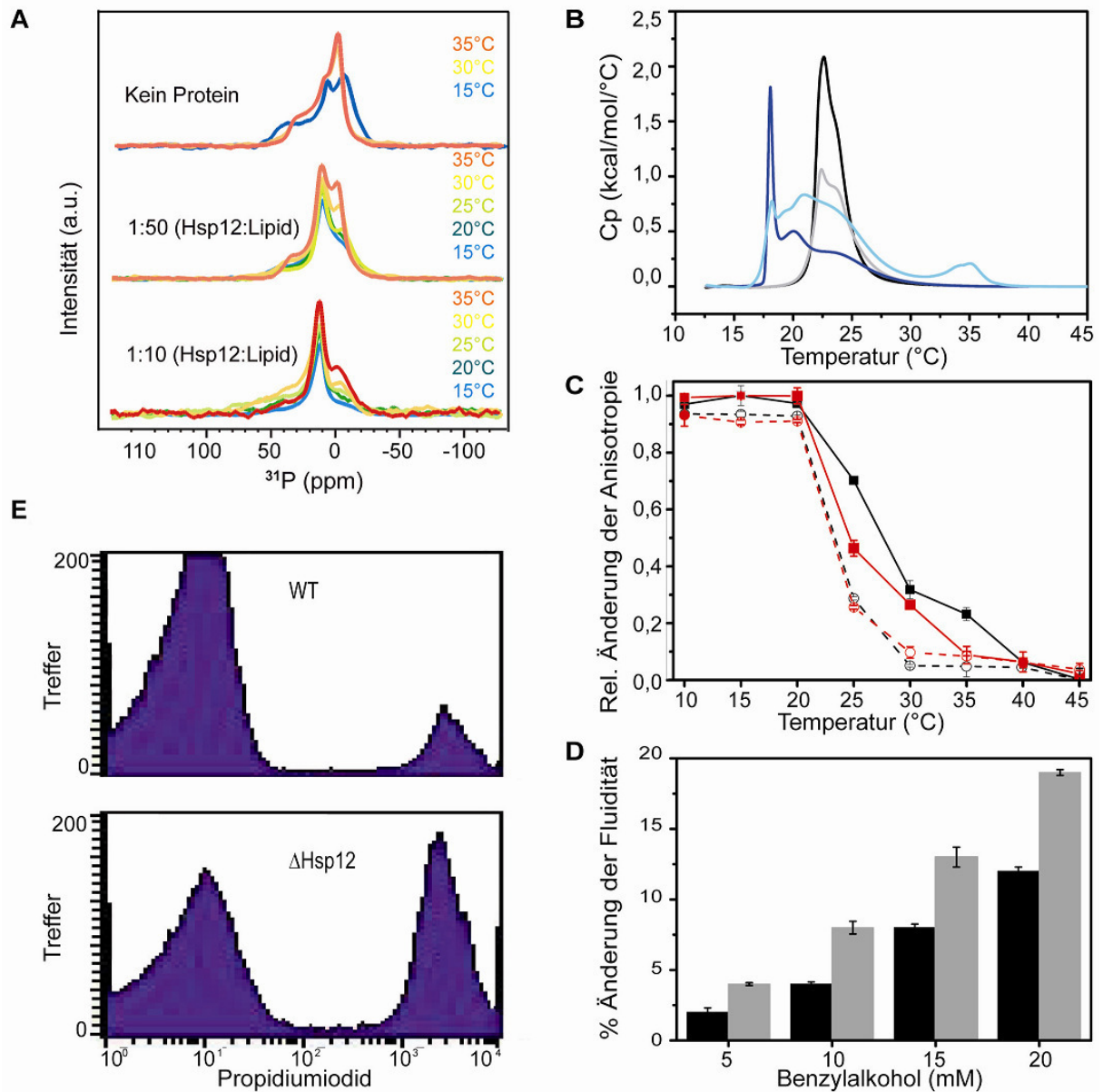
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.18. Einfluss von Hsp12 auf Membranstrukturen.** Elektronenmikroskopiebilder von gefriergebrochenen DMPG-Vesikeln (oben) bei verschiedenen Temperaturen. Die Proben ohne oder mit Hsp12 (Verhältnis 1:20 (w/w)) in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, pH 7,5 wurden bei den beschriebenen Temperaturen für 30 min inkubiert, schnell gefroren, gefriergebrochen und unidirektional mit Platin/Kohle in einem Winkel von  $35^\circ$  beschattet. Die „Rippel“-Phase verschwand in Abwesenheit von Hsp12 bei  $40^\circ\text{C}$  (oben, letzte Abbildung rechts).

Als zweites Experiment untersuchten wir die Interaktion von Hsp12 und DMPG mit Festkörper-NMR in Kooperation mit Prof. Reif. Statische Spektren für das Lipid DMPG zeigten einen Phasenübergang von der Gel- zur flüssig-kristallinen Phase bei  $25^\circ\text{C}$ , was durch einen Anstieg des chemischen Verschiebungsanisotropietensors („chemical shift anisotropy“, CSA) begleitet wurde (z.B. der Bereich des Spektrums in ppm) von 60 zu 40 ppm (Abbildung 3.19. A, oben). Mit steigender Proteinkonzentration (Abbildung 3.19. A, Mitten und unten) wurde dieser Phasenübergang zu höheren Temperaturen verschoben, wahrscheinlich deshalb, weil durch die Zugabe von Hsp12 die Mobilität der Lipidmoleküle verringert wurde.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.19. Einfluss von Hsp12 auf die Zellmorphologie und Membransysteme.** (A)  $^{31}\text{P}$ -NMR. Statische  $^{31}\text{P}$  Spektren von Hsp12 allein (oben) und in Gegenwart von einem molaren Verhältnis von Hsp12 zu Lipid von 1:50 (Mitte) oder 1:10 (unten) bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 15 °C bis 35 °C. Der Phasenübergang von der Gel- zur Flüssigkristallinen-Phase verschob sich zu höheren Temperaturen bei Zugabe ansteigender Hsp12-Mengen. Zusätzlich ist die Mobilität der Lipide in Gegenwart von Hsp12 herabgesetzt. (B) Differentialkalorimetrie von 3 mg/ml DMPG (–) oder Hsp12/DMPG (–) in einem Verhältnis von 1:10 (w/w) in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 3 mg/ml DMPG (–) oder Hsp12/DMPG (–) in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mit 100 mM NaCl, pH 7,5. Die Scanrate betrug 10 °C/h. (C) Temperaturabhängige Fluoreszenzpolarisation von DPH in DMPG-Vesikeln mit Hsp12 (!) (Verhältnis 1:10 (w/w) in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, pH 7,5) und in Abwesenheit von Hsp12 (–); in *S. cerevisiae* Wildtypzellen (!), und in  $\Delta\text{Hsp12}$ -Zellen (–). In jedem Fall wurden drei verschiedene Experimente gemessen, daher die Werten  $\pm$  SD (durch Fehlerbalken dargestellt). (D) Durch verschiedene Mengen an Benzylalkohol wurde die Messung der Membranfluidität von *S. cerevisiae*

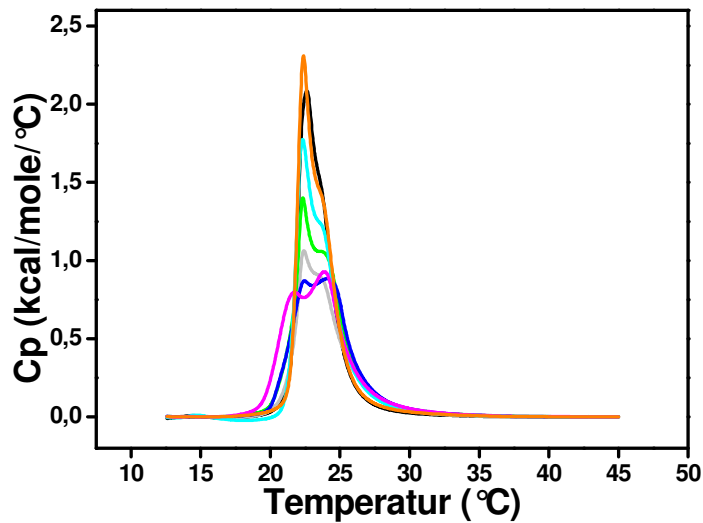
### 3. Ergebnisse

---

Widtyp (schwarz) und  $\Delta$ Hsp12-Zellen (grau) induziert. Die Fluidität wurde durch die Messung der „steady-state“ Fluoreszenzpolarisation mit DPH als Fluorophor bestimmt mit einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 360 nm und 450 nm. Es wurden je drei verschiedene Experimente gemessen, dargestellt durch die Werten  $\pm$  SD (in Fehlerbalken dargestellt). (E) FACS-Messungen in propidiumiodid-gefärbten Widtyp (WT) und  $\Delta$ Hsp12-Zellen nach Hitzeschock (20 min, 58°C).

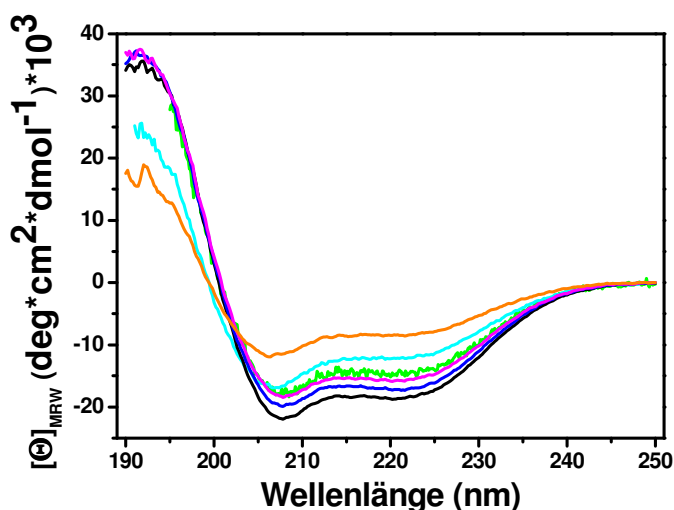
Mittels Differentialkalorimetrie wurde in einem dritten Experiment die Hitzekapazität von DMPG-Dispersionen mit und ohne Hsp12 bei verschiedenen Ionenkonzentrationen gemessen. Das geladene Lipid DMPG zeigt bei niedriger Ionenstärke (0 mM NaCl) ein ausgedehntes und komplexes Schmelzverhalten mit drei Maxima in der Schmelzkurve (Abbildung 3.19. B, blau), was vergleichbar mit Daten aus der Literatur ist (Schneider et al., 1999). Mit steigender NaCl-Konzentration findet der Übergang in einem engeren Temperaturintervall statt. Bei 100 mM NaCl kann nur noch ein einziger, fast kooperativer Hitzekapazitätsspeak gefunden werden (Abbildung 3.19. B, schwarz). Die Zugabe von Hsp12 verursachte dramatische Veränderungen in den Hitzekapazitätskurven der DMPG-Dispersionen. Bei niedriger Ionenstärke verursachte die Zugabe von Hsp12 eine Verbreiterung des Phasenübergangs und eine Verschiebung der drei Maxima zu höheren Temperaturen (Abbildung 3.19. B, cyan). Die Anwesenheit von Hsp12 bei hoher Ionenstärke resultierte in einer Abnahme des Hitzekapazität-Maximums und einer Verschiebung des Phasenübergangs zu höheren Temperaturen (Abbildung 3.19. B, grau). Auch die Deletionsmutanten  $\Delta$ C13 (-),  $\Delta$ N10 (-) und  $\Delta$ N24 (-) führten bei hoher Ionenstärke zu einer starken Abnahme des Hitzekapazitätmaximums und einer Verbreiterung der Peaks ähnlich dem vollständigen Hsp12 (Abbildung 3.20.). Die großen Deletionen führten zu leichter Abnahme des Maximums  $\Delta$ N39 (-), oder verhielten sich wie die Kurve für DMPG allein und  $\Delta$ C54 (-).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 3.20. Differentialkalorimetrie** von 3 mg/ml DMPG (–) oder der entsprechenden Mutante  $\Delta$ Hsp12/DMPG (–),  $\Delta$ C13/DMPG (–),  $\Delta$ C54/DMPG (–),  $\Delta$ N10/DMPG (–),  $\Delta$ N24/DMPG (–),  $\Delta$ N39/DMPG (–), in einem Verhältnis von 1:10 (w/w) in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mit 100 mM NaCl, pH 7,5. Die Scannrate betrug 10 °C/h.

Aufgrund der Interaktion von Hsp12 mit Membranen oder Membran-ähnlichen Systemen wie zum Beispiel SDS-Mizellen, wurde untersucht, ob die Zugabe der Deletionsmutanten einen Einfluss auf die Sekundärstruktur im Vergleich zu Hsp12 haben könnte. Auffallenderweise zeigte alle Deletionsmutanten von Hsp12 sowohl durch Zugabe SDS im Fern-UV Spektrum die Struktur eines  $\alpha$ -helikalen Proteins (Abbildung 3.21.). Dieser Effekt auf die Hsp12-Struktur ist konzentrationsabhängig und ist für SDS sättigungsfähig (Tabelle 3.3.).



**Abbildung 3.21. Bindungseigenschaften von Hsp12 an SDS-Mizellen.** (A) Fern-UV CD-Spektroskopie von 0,13  $\mu\text{M}$  Hsp12 und den entsprechenden Deletionsmutanten. Die CD-Spektren wurden bei 20 °C in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4 in Gegenwart von SDS für Hsp12 (–),  $\Delta$ C13 (–),  $\Delta$ C54(–),  $\Delta$ N10(–),  $\Delta$ N24 (–),  $\Delta$ N39 (–).

Auch ist hier deutlich erkennbar, dass bei Vergrößerung der Deletionsbereiche der Anteil an  $\alpha$ -helikalem Protein deutlich abnimmt und die Affinität für Lipide und SDS niedriger wird ( $\Delta$ C54 und  $\Delta$ N39). Im Vergleich dazu zeigen die Proteine mit einer



### 3. Ergebnisse

kleinen Deletion Spektren, die dem Wildtyp-Hsp12 Spektrum sehr nahe kommen und auch ähnliche Bindeeigenschaften aufweisen ( $\Delta C13$ ,  $\Delta N10$  und  $\Delta N24$ ) (Tabelle 3.3.).

Protein	Temperatur (°C)	$k_D$ ( $\mu M$ )
WT	20	384,9
$\Delta C13$	20	301,2
$\Delta C54$	20	78,5
$\Delta N10$	20	324,7
$\Delta N24$	20	243,1
$\Delta N39$	20	118,9

**Tabelle 3.3. Bindungseigenschaften von Hsp12 und den entsprechenden Deletionsfragmenten an SDS-Mizellen.**

Die SDS-Titration wurde am CD-Spektrometer aufgenommen. Die CD-Signale bei 208 nm wurden gegen die SDS-Konzentration aufgetragen und einfach exponentiell gefittet, um die entsprechenden  $k_D$ -Werte zu erhalten.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von Hsp12 auf die Fluidität von DMPG-Vesikeln und Hefemembranen *in vivo* mittels Diphenylhexatrien (DPH) Fluoreszenz-Anisotropie untersucht (Haque und Lentz, 2004). DPH ist ein Fluorophor, das die nicht-polare hydrophobe Umgebung der Membran unabhängig derer Fluidität bindet. Dazu wurden DMPG-Vesikel präpariert und die relative Änderung der Anisotropie bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Bei niedrigen Temperaturen zeigten die Vesikel gleiche Anisotropiewerte in Ab- (–) und Anwesenheit (!) von Hsp12 (Abbildung 3.19. C). Bei Temperaturen im Bereich von 20 °C bis 35 °C entwickelten sich allerdings die Anisotropiewerte unterschiedlich. In Vesikel mit Hsp12 war die Abnahme der Anisotropie im Vergleich mit den leeren Vesikeln verlangsamt, was zu einer Verschiebung des Übergangmittelpunkts zu höheren Temperaturen führte. Der gleiche Effekt wurde auch bei den entsprechenden Deletionsmutanten gefunden. Hier verhalten sich Proteine mit einer kurzen Deletion ( $\Delta C13$ ,  $\Delta N10$  und  $\Delta N24$ ) ähnlich dem Effekt von Hsp12 mit DMPG-Vesikel bei 25 °C (Tabelle 3.4.). Größere Deletionen reagierten mit einer Verschiebung bzw. Abnahme der Werte in Richtung der DMPG-Vesikel ohne Hsp12 bei 25 °C (Tabelle 3.4.).

Ein gleicher Effekt mit einer stärkeren Verschiebung des Übergangmittelpunkts in Anwesenheit von Hsp12 wurde bei Hefezellen gefunden (Wildtyp (!) im Vergleich zu  $\Delta Hsp12$ -Zellen (–)). Folglich imitieren die DMPG-Effekte die *in vivo* Situation in lebenden Hefezellen.

### 3. Ergebnisse

Hsp12, $\Delta$ Hsp12 und entsprechende Deletionsmutanten	Relative Änderung der Anisotropiewerte in Hefezellen bei 25 °C	Relative Änderung der Anisotropiewerte in DMPG-Vesikeln bei 25 °C
Hsp12	0,72	0,53
$\Delta$ Hsp12	0,25	0,21
$\Delta$ C9	0,28	Nicht gemessen.
$\Delta$ C13	0,31	0,22
$\Delta$ C27	0,54	Nicht gemessen.
$\Delta$ C35	0,55	Nicht gemessen.
$\Delta$ C36	0,52	0,38
$\Delta$ C52	0,69	Nicht gemessen.
$\Delta$ C54	0,71	0,55
$\Delta$ N8	0,24	Nicht gemessen.
$\Delta$ N10	0,26	0,23
$\Delta$ N23	0,26	Nicht gemessen.
$\Delta$ N24	0,28	0,25
$\Delta$ N39	0,71	0,51
$\Delta$ N49	0,73	Nicht gemessen.
$\Delta$ N56	0,72	Nicht gemessen.

**Tabelle 3.4. Diphenylhexatrien (DPH) Fluoreszenz-Anisotropie der Deletionsmutanten.**

Fluoreszenzpolarisation von DPH in *S. cerevisiae* Wildtypzellen (Hsp12), in  $\Delta$ Hsp12-Zellen ( $\Delta$ Hsp12) und den entsprechenden Deletions-Hefezellen; in DMPG-Vesikeln mit Hsp12, in Abwesenheit von Hsp12 (DMPG-Vesikel allein) und den entsprechenden Deletionsmutanten gemessen bei 25 °C.

Diese Experimente weisen zusammengefasst stark darauf hin, dass Hsp12 die Membranfluidität beeinflusst.

Des Weiteren wurde untersucht, in welcher Form Wildtyp- und  $\Delta$ Hsp12-Zellen auf die Störung der Membranfluidität reagieren. Induzierte Änderungen mit dem bekannten Membranfluidizer Benzylalkohol (BA) wurden dazu verwendet (Sinicrope et al., 1992). Die maximale Änderung der Fluidität in Anwesenheit von BA war 12 % in den Wildtyp-Zellen und 19 % in  $\Delta$ Hsp12-Zellen (Abbildung 3.19. D und Tabelle 3.5.). Auch anhand der Deletionsmutanten wird sichtbar, dass die Membranfluidität mit der

### 3. Ergebnisse

Größe der Deletion zunimmt (Tabelle 3.5.). Während in den kurzen Deletionen ( $\Delta C9$ ,  $\Delta C13$ ,  $\Delta N8$ ,  $\Delta N10$  und  $\Delta N23$ ) das Verhalten dem Wildtyp ähnlich ist, verändert sich das Fluiditätsverhalten bei größeren Deletionen ( $\Delta C52$ ,  $\Delta C54$ ,  $\Delta N39$ ,  $\Delta N49$  und  $\Delta N56$ ) dem des Knock-Out-Stamms.

Deletionsmutanten	Maximale Änderung der Fluidität (%)
WT	12,0 ± 2,1
$\Delta Hsp12$	19,2 ± 1,3
$\Delta C9$	12,8 ± 1,9
$\Delta C13$	13,1 ± 0,5
$\Delta C27$	15,3 ± 1,1
$\Delta C35$	14,9 ± 1,4
$\Delta C36$	16,2 ± 0,7
$\Delta C52$	18,1 ± 1,5
$\Delta C54$	18,4 ± 2,6
$\Delta N8$	13,2 ± 1,4
$\Delta N10$	13,5 ± 1,2
$\Delta N23$	13,4 ± 2,2
$\Delta N24$	13,8 ± 2,7
$\Delta N39$	17,8 ± 1,1
$\Delta N49$	18,5 ± 0,7
$\Delta N56$	19,0 ± 0,3

**Tabelle 3.5. Maximale Änderung der Fluidität (%) der Deletionsmutanten von Hsp12.** Durch verschiedene Mengen an Benzylalkohol wurde die Messung der Membranfluidität von *S. cerevisiae* Wildtypzellen und Zellen der Deletionsmutanten induziert. Die Fluidität wurde durch die Messung der „steady-state“ Fluoreszenzpolarisation mit DPH as Fluorophor bestimmt mit einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 360 nm und 450 nm. Es wurden je drei verschiedene Experimente durchgeführt, dargestellt durch die Werten ± SD.

Zur Analyse der funktionellen Auswirkungen der Hsp12-Insertion in Membranen, wurde die „Leakiness“ der Zellen durch Propidiumiodid-Aufnahme mittels Durchflusszytometrie nach Hitzeschock für 20 min bei 58 °C gemessen. Propidiumiodid (PI) lagert sich in die doppelsträngigen Nukleinsäuren ein. PI wird von lebensfähigen Zellen ausgeschlossen, kann aber die Zellmembranen beschädigter Zellen durchdringen (Moore et al., 1998). Nach einem Hitzeschock wurden ~11 % der Wildtypzellen gefärbt (Abbildung 3.19. E, oben). Im Vergleich dazu allerdings ~43 %

### 3. Ergebnisse

---

der  $\Delta$ Hsp12 Hefezellen markiert, übereinstimmend mit dem dramatischen Verlust der Viabilität nach der Behandlung mit 58 °C.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen klar, dass die Interaktion von Hsp12 mit Lipiden die Fluidität der Lipiddoppelschicht durch Änderung des Phasenübergangs herabsetzt.

### 4. Diskussion

Die Hitzeschockantwort ist ein evolutionär gut-konservierter Mechanismus um toxische Stressbedingungen zu bekämpfen. Die bedeutendsten konservierten Klassen der Hitzeschock- oder auch Hitzestressproteine verhindern die nicht-spezifische Aggregation von Proteinen unter Stressbedingungen. Außerdem assistieren sie bei der Proteinfaltung, in vielen Fällen auch unter physiologischen Bedingungen. Diese schützende Funktion der Hsps ist etabliert. Viele von ihnen, wie zum Beispiel sHsps, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und die Hsp100s sind allgemeine molekulare Chaperone, die die produktive Faltung einer großen Zahl von Partnerproteinen unterstützen. Allerdings gibt es weitere Klassen von Hitzeschockproteinen, die zum Beispiel Proteasen sind (Suzuki et al., 1997) oder redox-regulierte Chaperone (Jakob et al., 1999). Vor diesem Hintergrund definiert Hsp12 eine neue Klasse von Stressproteinen. Wie die anderen sHsps auch, besitzt Hsp12 eine schützende Funktion unter Stressbedingungen, speziell für das Überleben von extremen Hitzeschockbedingungen. Auf den ersten Blick könnte Hsp12 zur Familie der molekularen Chaperone der sHsps gehören, da es eine ähnliche kleine molekulare Masse und die generelle schützende Funktion aufweist. Allerdings zeigten die hier vorgelegten Analysen, dass Hsp12 in allen anderen strukturellen und funktionellen Eigenschaften von den sHsps abweicht. Am meisten fällt auf, dass die sHsps große homo-oligomere Komplexe ausbilden. Im Gegensatz dazu ist Hsp12 ein Monomer und ohne messbare Chaperonfunktion *in vitro*. Überraschenderweise ist Hsp12 in Lösung, im Gegensatz zu allen anderen bis heute untersuchten Hsps, ein gänzlich unstrukturiertes Protein. Folglich ist es das erste Hsp, das zur Gruppe der nativ ungefalteten Proteine gehört. Hsp12 zeigt typische Eigenschaften dieser Gruppe (Dunker et al., 2008; Daughdrill et al., 2005), wie zum Beispiel einen niedrigen Gehalt an aromatischen Aminosäuren und das gänzliche Fehlen von Tryptophan. Hsp12 besitzt keine Cysteine und 50 % der Sequenz besteht aus fünf Aminosäuren (Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin und Lysin). Die Lokalisation von Hsp12 in der Hefezelle deutet darauf hin, dass Hsp12 sowohl in einer löslichen als auch in einer membrangebundenen Form vorliegt und dass die membrangebundene Form für den Schutzmechanismus wichtig ist. Die Membranassoziation selbst wird vor diesem Hintergrund wahrscheinlich durch die Hsp12-Konzentration reguliert. Wenn nur geringe Hsp12-Konzentrationen in der

## 4. Diskussion

---

Zelle vorhanden sind (z. B. in der logarithmischen Wachstumsphase mit einer geschätzten zellulären Konzentration von  $\sim 50$  nM Hsp12), können die erhaltenen Bindungskonstanten für Lipide die Membrananlagerung limitieren. Unter Stressbedingungen (z. B. in der stationären Phase) führt die erhöhte Hsp12-Expression (geschätzte zelluläre Hsp12-Konzentration  $\sim 260$   $\mu$ M) zu einer Membranassoziation. Hsp12 scheint selektiv an DMPG und Phosphatidylinositol zu binden. Diese Lipide haben eine neutrale Kopfgruppe und eine negativ geladene Phosphatgruppe. Geladene Kopfgruppen und die Natur der Fettsäure scheinen einen Einfluss auf die Bindung von Hsp12 zu haben. In Hefezellen repräsentieren negativ geladene Lipide wie Phosphatidylinositol näherungsweise 20 %-25 % der gesamten Lipidmenge und steuern so einen großen Bereich der Membranoberfläche bei (Tabelle 3.1.). Hsp12 ist nur in spezifischen Membranen vorhanden; der Plasmamembran, in den Endosomen und möglicherweise auch in der Vakuolenmembran. Nicht vorhanden ist Hsp12 in den Mitochondrien und den Peroxisomen.

Zusammen definieren diese Eigenschaften ein neues Konzept für eine Hsp Familie, in der die Struktur und Funktion mit der Membranassoziation korrelieren. Passend zu der generell schützenden Funktion sind die Expressionslevel von Hsp12 sehr hoch und übersteigen sogar die des hoch exprimierten Hsp90.

Ein detailliertes Bild der Struktur von Hsp12 wurde durch die NMR-Spektroskopie erhalten. Die chemische Verschiebungsverteilung von Hsp12 erlaubt eine Definition der Position der individuellen Helices. Ohne Lipide bildet Hsp12 eine typische unstrukturierte Konformation („random coil“) eines ungefalteten Proteins aus. In Gegenwart von SDS zeigen die NMR-Daten zuverlässlich 5 ausgeprägte  $\alpha$ -helikale Bereiche (Aminosäuren 9-18, 24-45, 50-56, 74-81 und 83-100). Paramagnetische Proben wurden inner- und außerhalb der Mizellen platziert, um die relative Position der Helices bezüglich der Mizellenoberfläche zu identifizieren; die Ergebnisse dieser Experimente deuten darauf hin, dass alle 5 Helices teilweise in die Membran eintauchen. Die amphipathischen Eigenschaften der Helices 1, 3 und 4 stimmen mit der Annahme überein, dass nur eine Seite der Helix in das hydrophobe Innere der Mizelle eingelagert ist, und dass die andere Seite in der Nähe der polaren Kopfgruppe liegt. Es gibt einige Lysin- und Argininreste auf der polaren Seite aller fünf Helices. Diese positiven Ladungen können vielleicht bei der Assoziation mit negativ geladenen Membranlipiden mitwirken. In den vorhergesagten Helices sind

die negativ geladenen Reste an der polaren Oberfläche angehäuft und die positiven Reste liegen zwischen den polaren und nicht-polaren Bereichen, was charakteristisch für amphipathische Helices ist. Bemerkenswert ist auch, dass sowohl im CD- als auch im NMR-Experiment stärkere helikale Signale in Gegenwart von SDS im Vergleich zum Lipid erhalten wurden. Das könnte implizieren, dass entweder der helikale Anteil unterschiedlich ist oder dass die Helixgeometrie in gewissem Rahmen verändert ist. Die Ergebnisse aus dem Fragmentierungsmuster und die *in vivo* Analyse der Hsp12-Fragmente, die nach den im NMR definierten Helixgrenzen „designt“ wurden, deuten darauf hin, dass aber die Lokalisation der Helices in Hsp12 durch die SDS-Struktur angemessen repräsentiert wird.

Man könnte vermuten, dass diese Interaktionen eine lipid-selektierende Funktion haben, die die Zusammensetzung der Membranen beeinflussen. Allerdings schließen unsere massenspektrometrischen Studien diese Möglichkeit aus, da die Lipide in den Wildtyp- und  $\Delta$ Hsp12-Stämmen keine signifikanten Veränderungen zeigten. Es scheint eher, dass die Interaktionen von Hsp12 mit den Membranlipiden die Organisation der Membran an sich beeinflussen, da die elektronenmikroskopische Analyse der Lipide in Gegenwart von Hsp12 bei höheren Temperaturen ein ausgeprägtes „Rippel“-Muster zeigte, als in Abwesenheit von Hsp12. Diese Morphologie ist indikativ für eine Veränderung in der Schmelztemperatur der Lipide (Heimburg, 2000). Zusammen mit den Ergebnissen aus der Veränderung der Lipidphasenübergänge deuten die Daten auf einen Hsp12-Effekt bei der Organisation und Stabilität von Membransystemen in *S. cerevisiae* hin. Dass Hsp12 die Membranfluidität und Integrität beeinflusst, wurde auch deutlich durch die Anisotropieexperimente der Hefezellen in Gegenwart eines „Membranfluidizers“ gezeigt und durch die steigende Aufnahme eines Farbstoffs in den Hsp12-Deletionszellen, die bestimmten Stresssituationen ausgesetzt waren. Die beobachteten Phänotypen des  $\Delta$ Hsp12 Stamms, speziell die morphologischen Veränderungen, die auf den REM-Bildern sichtbar sind, stimmen mit dieser Vorstellung überein. Theoretischerweise könnten auch die Interaktionen von Hsp12 mit Proteinkomponenten der Membranen den Effekt von Hsp12 auf die Lipidorganisation beeinflussen.

Der  $\alpha$ -helikale Teil von Hsp12 ist essentiell für die Membraninteraktion, was durch Analysen von Hsp12-Mutanten bei einem Überlebenstest nach einem Hitzeschock gezeigt wurde. Starke Wachstumsdefekte konnten beobachtet werden, wenn die

#### 4. Diskussion

---

Deletion die ersten beiden oder die letzten beiden Helices mit einschloss. Die Hefezellen, die diese Fragmente exprimierten, zeigten ebenfalls, wie die *HSP12*-Deletionszellen, eine runzelige Oberfläche nach dem Hitzeschock oder nach anderen Stresseinwirkungen. Interessant war, dass der Verlust der Lokalisation in der Zellwand und der Membranassoziation unterschiedlich betroffen, was darauf schließen lässt, dass verschiedene Teile von Hsp12 für diese Prozesse wichtig sind. Eine globale Analyse der  $\Delta$ Hsp12-Deletionseffekte zeigte, dass die Expression einer großen Anzahl an Genen betroffen ist. Dies steht in einem merkwürdigen Gegensatz zu den anderen Mitgliedern des Hitzeschocksystems aus der Hefe so zum Beispiel ST11 (ein stress-induzierbares Protein, Nicolet und Craig, 1989; Wandinger et al., 2008). Die Deletion dieses Co-Chaperons von Hsp70 und Hsp90 bewirkt nur die Expression einiger Gene. Diese Unterschiede können vielleicht durch den globalen Schutzeffekt von Hsp12 auf die Hefephysiologie erklärt werden. Zusätzlich zur Stressantwort sind diese deregulierten Gene in den Metabolismus und die Zelldifferenzierung involviert. Übereinstimmend erhielten wir aus einem synthetischen Letalitätsscreen Hits im selben funktionellen Bereich. Wenn die Hsp12-Menge verringert wird, stellen die Zellen ihren Metabolismus um, um dann sogenannte Dauerformen auszubilden, was durch die Veränderung der Gene, die in die Zelldifferenzierung involviert sind, angezeigt wird. Die Gegenwart von Hsp12 scheint die Zelle in Stresssituationen zu stabilisieren und das fortlaufende Wachstum zu gewährleisten, in dem es akute Stresssymptome puffert und der Zelle die Zeit gibt, die adaptive Stressantwort anzuschalten. Die Funktion von Hsp12 ist zum Teil mit der Trehalosestressantwort vergleichbar (Singer und Lindquist, 1998a). Ein interessanter Unterschied ist, dass die Trehalose für die Stabilisierung der zytosolischen Proteinhomöostase nötig ist, während Hsp12 für den Schutz von Membranen wichtig ist. Dies ist von spezieller Wichtigkeit, da zelluläre Membranen durch Stressbedingungen stark beansprucht werden (Horváth et al., 2008).

Ist Hsp12 ein „Unikat“ der Hefe *S. cerevisiae*? Eine bioinformatische Suche nach Homologen in andere Organismen zeigte ihre Gegenwart in anderen Pilzen. In *Candida albicans* zum Beispiel ist WH11 ein Mitglied der Hsp12-Familie (47 % Homologie zum aminoterminalen Bereich von Hsp12; Praekelt und Meacock, 1990). Erste Untersuchungen an gereinigtem WH11 Protein zeigten, dass es ebenfalls ein nativ ungefaltetes Protein ist und durch Lipidassoziation Struktur annimmt. Das



WH11 Gen ist in die phänotypische Veränderung in *C. albicans* involviert (Park et al., 2004).

Außerhalb der Welt der Pilze konnten keine Proteine mit auffällender Sequenzhomologie gefunden werden. Entweder existieren diese Homogene nicht, oder die Sequenzhomologie ist zu gering. Es ist zu vermuten, dass die Eigenschaften, die für Hsp12 beschrieben wurden, keine konservierte Aminosäuresequenz erfordern, sondern stattdessen bestimmte Eigenschaften von Seitenketten. Da eine große Anzahl an Sequenzen ein Muster produziert, welches für die Membranassoziation ausreichend ist, kann es aber auch sein, dass die Suche nach sequenz-basierter Homologie solche Verwandten nicht auffinden konnte. Auffallend ist dabei ein potentiell homologes Protein mit gewisser Übereinstimmung:  $\alpha$ -Synuklein (< 20 % Homologie). Interessanterweise beinhaltet das Reinigungsprotokoll von  $\alpha$ -Synuklein einen hohen Temperaturschritt, vergleichbar mit unserer Reinigungsstrategie für Hsp12 (Martinez et al., 2003). Dieses Protein ist ein nativ nicht gefaltetes Protein in humanen Neuronen, dass durch Membrananlagerung strukturiert wird (Ulmer et al., 2005).  $\alpha$ -Synuklein bildet zwei Helices aus, die auf der Oberfläche von SDS-Mizellen liegen. Die restlichen Aminosäuren behalten ihre hohe Dynamik wie es auch für Hsp12 gezeigt wurde. Während diese Eigenschaften denen von Hsp12 sehr ähnlich sind, gibt es auch deutliche Unterschiede. Für  $\alpha$ -Synuklein ist bekannt, dass es Fibrillen ausbildet, die im Zusammenhang mit der Erkrankung an Parkinson stehen (Dev et al., 2003). Für Hsp12 konnten keine Anzeichen für Aggregation oder Fibrillenbildung gefunden werden, auch nicht bei Konzentrationen von 50 mg/ml. Auch die Expression von  $\alpha$ -Synuklein in *S. cerevisiae* ergab andere Ergebnisse als die erhaltenen für Hsp12 (Outeiro und Lindquist, 2003). Leider ist die physiologische Funktion von  $\alpha$ -Synuklein noch unbekannt (Dev et al., 2003).

### 5. Zusammenfassung

Hefezellen aus *S. cerevisiae* reagieren auf plötzliche Umgebungsänderung (Hitzeschock, oxidativer oder osmotischer Stress etc.) mit der Expression einer Vielzahl verschiedener Gene. Dies stellt einen Schutzmechanismus der Hefezellen vor einem Schaden durch äußere Einwirkungen dar. Hsp12, ein kleines Hitzeschockprotein aus *S. cerevisiae*, wird unter sehr vielen verschiedenen Arten von Stress außergewöhnlich stark exprimiert (100 fach). Dieses Protein gehört einer neuen Familie von Hitzeschockproteinen an, da es nativ nicht gefaltet vorliegt. Die Lokalisation und Funktion des in wässriger Lösung unstrukturierten Proteins sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

*In vitro* Analysen zeigten, dass das Protein Hsp12 vollständig ungefaltet ist, jedoch in Gegenwart von Lipidvesikeln und SDS-Mizellen Struktur annimmt und 5 amphipathische Helices ausbildet, die unterschiedlich in die Membran eintauchen. Auch eine Simulation berechnete die Helices in denselben Bereichen, wie im NMR mit SDS und DMPG gezeigt werden konnte. Anhand dieser Ergebnisse wurden verschiedene *HSP12*-Fragmentmutanten erzeugt. Die Analysen dieser Hsp12-Fragmente ergaben, dass die *in vitro* Funktion dieses Proteins relativ abhängig von den  $\alpha$ -helikalen Bereichen ist.

*HSP12*-Fragmentmutanten, denen große Teile der Helices fehlen, und der „Knock-Out“  $\Delta$ Hsp12 erwiesen sich in *in vivo* Experimenten als äußerst thermosensitiv, osmosensitiv und sensitiv gegen oxidativen Stress und zeigten hierbei ein deutlich reduziertes Wachstum und eine veränderte Zellmorphologie. Im Vergleich zum Wildtyp konnte hier eine runzelige Oberfläche beobachtet werden. Hsp12 ließ sich mittels verschiedener Fraktionierungsmethoden neben einem Anteil im Zytosol vor allem in der Zellwand und der Plasmamembran, den Endosomen und vielleicht in den Vakuolenmembranen nachweisen. Die Lokalisation von Hsp12 Wildtyp zeigte sich als abhängig von den Wachstumsstadien, da sich mit fortschreitendem Alter der Kultur eine zunehmende Menge an Hsp12 in der Zellhülle befand. Diese Beobachtung korrelierte direkt mit einer Beeinträchtigung der Zellmorphologie von der *HSP12*-Deletionsmutante, die sich in der runzeligen Oberfläche zeigte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -helikalen Bereiche entscheidend für die Lokalisation von Hsp12 in der Zelle ist, für einen Verlust der Membraninteraktion sind größere Deletionen nötig. Western Blot Analysen detektierten die Hsp12-Fragmente

$\Delta C9$ ,  $\Delta C9$ ,  $\Delta N8$ ,  $\Delta N10$ ,  $\Delta N23$  und  $\Delta N24$  im Zytosol, in der Membran- und Zellwandfraktion. Wenn die Helix 5 +/- 4 und Teile der unstrukturierten Mitte ( $\Delta C27$ ,  $\Delta C35$  und  $\Delta C36$ ) entfernt wurden, konnten die Hsp12-Fragmente nicht mehr in der Zellwandfraktion nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Deletion des gesamten unstrukturierten Mittelstücks +/- Teilen der Helix 3 führte dazu, dass das Fragment ( $\Delta C52$  und  $\Delta C54$ ) nur noch im Zytosol erkennbar war. Gleiche Effekte konnten gezeigt werden, wenn die N-terminalen Bereiche, Helices 1 und 2/3 der Helix 2 ( $\Delta N39$ ) oder die gesamten Helices 1 und 2 ( $\Delta N49$ ) und Helix 3 ( $\Delta N56$ ) entfernt wurden.

Eine Veränderung der Lipidzusammensetzung in der Plasmamembran durch Hsp12 konnte nicht beobachtet werden, allerdings konnten Veränderungen in der Membranorganisation und eine Steigerung der Membranstabilität gezeigt werden. Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen klar, dass die Interaktion von Hsp12 mit Lipiden die Fluidität der Lipiddoppelschicht durch Änderung des Phasenübergangs herabsetzt und somit die Membraneigenschaften moduliert.

Zusammengefasst haben wir eine neue Klasse der Hsps mit einer Schutzfunktion für die Zellmorphologie in Hefen identifiziert. Die Hsp12 Proteinfamilie stabilisiert Membranen durch die Regulierung der Membranfluidität. Das Konzept eines nativ ungefalteten Proteins, das mit Membranen interagiert, scheint im Laufe der Evolution an anderer Stelle verwendet worden sein, obwohl eine klare Linie bisher noch nicht entdeckt wurde. Es bleibt die Frage, ob höhere Eukaryonten eine konservierte Funktion wie bei Hsp12 zum Schutz der Zellmembran unter Stressbedingungen besitzen, die durch ein nicht-streng-konserviertes Protein vermittelt wird.

### **5. Summary**

Hsp12 of *S. cerevisiae* is up-regulated several hundred-fold in response to stress. Our phenotypic analysis showed that this protein is important for survival of a variety of stress conditions including high temperature. In the absence of Hsp12 or deletion of  $\alpha$ -helical parts of Hsp12, we observed changes in cell morphology under stress conditions. Surprisingly, in the cell, Hsp12 exists both as a soluble cytosolic protein and associated to the plasma membrane. The in vitro analysis revealed that Hsp12, unlike all other Hsps studied so far, is completely unfolded, but in the presence of lipids, it adopts a well-defined structure with five amphipathic helical elements. The presence of Hsp12 does not alter the overall lipid composition of the plasma membrane but affects its organization and increases membrane stability.

## 6. Literatur

Aguilar-Uscanga, B., François, J.M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* 37, 268-274.

Amorós, M., and Estruch, F. (2001). Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol.* 39,1523-1532.

Andreeva, L., Motterlini, R., Green, C.J. (1997). Cyclophilins are induced by hypoxia and heat stress in myogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 237, 6-9.

Attfield, P.V. (1987). Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett.*225, 259-263.

Ausubel, L.J., Krieger, J.I., Hafler, D.A. (1997). Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myelin basic protein peptide 85-99. *J Immunol.* 159, 2502-2512.

Bai, Y.W., Milne, J.S., Mayne, L. and Englander, S.W. (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen-exchange. *Protein. Struct. Funct. Genet.* 17, 75-86.

Bardwell, J.C., and Craig, E.A. (1984). Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible dnaK gene are homologous. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 848-852.

Basha, E., Lee, G.J., Breci, L.A., Hausrath, A.C., Buan, N.R., Giese, K.C., Vierling, E. (2004). The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J Biol Chem.* 279, 7566-7575.

## 6. Literatur

---

Beddoe, T., Bushell, S.R., Perugini, M.A., Lithgow, T., Mulhern, T.D., Bottomley, S.P., Rossjohn, J. (2004). A biophysical analysis of the tetratricopeptide repeat-rich mitochondrial import receptor, Tom70, reveals an elongated monomer that is inherently flexible, unstable, and unfolds via a multistate pathway. *J Biol Chem.* 279, 46448-46454.

Beney, L., and Gervais, P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57, 34-42.

Bennett, A.E., Rienstra, C.M., Auger, M., Lakshmi, K.V., and Griffin, R.G. (1995). *J. Chem. Phys.* 103, 6951-6958.

Berkovits HJ, Berg JM. (1999). Metal and DNA binding properties of a two-domain fragment of neural zinc finger factor 1, a CCHC-type zinc binding protein. *Biochemistry* 38,16826-16830.

Bisaglia, M., Mammi, S., Bubacco, L. (2009). Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. *FASEB J.* 23, 329-340.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37, 911-917.

Blomberg A, Adler L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol.* 33, 145-212.

Bömer, U., Meijer, M., Maarse, A.C., Hönlinger, A., Dekker, P.J., Pfanner, N., Rassow, J. (1997). Multiple interactions of components mediating preprotein translocation across the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 16, 2205-2216.

Boorsma, A., de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K.J., Klis, F.M. (2004). Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 413-427.

## 6. Literatur

---

Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J., and 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.

Bösl, B., Grimminger, V., and Walter, S. (2006). The molecular chaperone Hsp104--a molecular machine for protein disaggregation. *J Struct Biol.* 156, 139-148.

Botha, A., and Kock, J.L. (1993). Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. *Int J Food Microbiol.* 19, 39-51.

Bottema, C.D., Rodriguez, R.J., and Parks, L.W. (1985). Influence of sterol structure on yeast plasma membrane properties. *Biochim Biophys Acta* 813, 313-320.

Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacquet, M., Labarre, J. (1999). The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol.* 33, 274-283.

Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., and Jacquet, M. (1998). Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 180, 1044-1052.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Brewer, B.J., Chlebowicz-Sledziowska, E. and Fangman, W.L. (1984). Cell cycle phases in the unequal mother/daughter cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2529-2531.

Brown, A.D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. *Adv Microb Physiol.* 17, 181-242.

## 6. Literatur

---

Buchner, J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* 10, 10-9.

Bulawa, C.E. (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol.* 47, 505-534.

Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.

Bürgermeister, M., Birner-Grünberger, R., Heyn, M., and Daum, G. (2004). Contribution of different biosynthetic pathways to species selectivity of aminoglycerophospholipids assembled into mitochondrial membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1686, 148-160.

Cabib, E., and Durán, A. (2005). Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J Biol Chem.* 280, 9170-9179.

Cantarelli, C., Martini, A. (1969). On the pellicle formation by "flor" yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 35, 35-36.

Cantor, C.R., Schimmel P.R. (1980). *Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function (Their Biophysical Chemistry; PT. 2)*.

Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., and Tanner, W. (1994). Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J.* 13, 4737-4744.

Cappellaro, C., Mrsa, V., and Tanner, W. (1998). New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol.* 180, 5030-5037.



## 6. Literatur

---

Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1997). In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1477-1489.

Carratù, L., Franceschelli, S., Pardini, C.L., Kobayashi, G.S., Horvath, I., Vigh, L., and Maresca, B. (1996). Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3870-3875.

Castillo L, Martinez AI, Garcerá A, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. (2003). Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan. *Yeast* 20, 973-983.

Cerbón, J., and Calderón, V. (1991). Changes of the compositional asymmetry of phospholipids associated to the increment in the membrane surface potential. *Biochim Biophys Acta.* 1067, 139-144.

Chant, J. (1999). Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15, 365-391.

Chakravarthy, B., Morley, P., Whitfield, J. (1999). Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends Neurosci.* 22,12-16.

Chatterjee, M.T., Khalawan, S.A., and Curran, B.P. (1997). Alterations in cellular lipids may be responsible for the transient nature of the yeast heat shock response. *Microbiology* 143, 3063-3068.

Chatterjee, M.T., Khalawan, S.A., and Curran, B.P. (2000). Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology* 146, 877-884.

Chen, C.C., and Wilson, T.H. (1984). The phospholipid requirement for activity of the lactose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 259, 10150-10158.

Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L., Horwich, A.L. (1989). Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 337, 620-625.

Cho, H.S., Liu, C.W., Damberger, F.F., Pelton, J.G., Nelson, H.C., Wemmer, D.E. (1996). Yeast heat shock transcription factor N-terminal activation domains are unstructured as probed by heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci.* 5, 262-269.

Cleves, A.E., Cooper, D.N., Barondes, S.H., and Kelly, R.B. (1996). A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 133, 1017-1026.

Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* 13, 289-302.

Csermely, P., Kajtár, J., Hollósi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C.R., Gergely, P. Jr, Söti, C., Mihály, K., and Somogyi, J. (1993). ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J Biol Chem.* 268, 1901-1907.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohászka, Z., and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 79,129-168.

Cyr, D.M., Langer, T., Douglas, M.G. (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci.* 19, 176-181.

Daughdrill, G.W., Hanely, L.J., Dahlquist, F.W. (1998). The C-terminal half of the anti-sigma factor FlgM contains a dynamic equilibrium solution structure favoring helical conformations. *Biochemistry* 37, 1076-1082.

Daughdrill, G.W., Pielak, G.J., Uversky, V.N., Cortese, M.S., and Dunker, K.A. (2005) Natively disordered proteins. In *Protein Folding Handbook*, J. Buchner and T.K. Kiefhaber, eds. (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH), Vol. 3, pp. 275-357.

Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 822, 1-42.

Daum, G., Tuller, G., Nemeč, T., Hraštnik, C., Balliano, G., Cattell, L., Milla, P., Rocco, F., Conzelmann, A., Vionnet, C., Kelly, D.E., Kelly, S., Schweizer, E., Schüller, H.J., Hojad, U., Greiner, E., and Finger, K. (1999). Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast* 15, 601-614.

David, D.C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., Spillantini, M.G. (2002). Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem.* 83,176-185.

Dawson, R., Müller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H., Buchner, J. (2003). The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol.* 332, 1131-1141.

Dedmon, M.M., Patel, C.N., Young, G.B., Pielak, G.J. (2002). FlgM gains structure in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12681-12684.

Deere, D., Porter, J., Edwards, C., Pickup, R. (1995). Evaluation of the suitability of bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, (diBA-C4(3)-), for the flow cytometric assessment of bacterial viability. *FEMS Microbiol Lett.* 130, 165-169.

Dehner, A. (2004). Dissertation.

Dehner, A. and Kessler, H. (2005). Diffusion NMR spectroscopy: folding and aggregation of domains in p53. *ChemBioChem* 6, 1550–1565.

Dennis, E.A., and Kennedy, E.P. (1972). Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *J Lipid Res.* 13, 263-267.

## 6. Literatur

---

DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.

Derocher, A.E., Helm, K.W., Lauzon, L.M., Vierling, E. (1991). Expression of a Conserved Family of Cytoplasmic Low Molecular Weight Heat Shock Proteins during Heat Stress and Recovery. *Plant Physiol.* 96, 1038-1047.

Dev, K.K., van der Putten, H., Sommer, B., and Rovelli, G. (2003). Part I: Parkin-associated proteins and Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 45, 14-44.

Divecha, N., and Irvine, R.F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell* 80, 269-278.

Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem.* 66, 199-232.

Dunker, A.K., Brown, C.J., Obradovic, Z. (2002). Identification and functions of usefully disordered proteins. *Adv Protein Chem.* 62, 25-49.

Dunker, A.K., Oldfield, C.J., Meng, J., Romero, P., Yang, J.Y., Chen, J.W., Vacic, V., Obradovic, Z., Uversky, V.N. (2008). The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics.* 9, 1-2.

Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C., Brown, C.J. (2000). Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.* 11, 161-171.

Eilers, M., Schatz, G. (1986). Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* 322, 228-232.

Engelman, D.M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438, 578-580.

Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M., Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16, 221-229.

Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D., and Kunau W.H. (1989). Isolation of peroxisome-deficient mutants of *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5419-5423.

Exton, J.H. (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1212, 26-42.

Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.

Fiebig R, Gore MT, Ji LL. (1999). Exercise attenuates nuclear protein binding to gene regulatory sequences of hepatic fatty acid synthase. *J Appl Physiol.* 87, 1009-1015.

Findly, R.C., Gillies, R.J., and Shulman, R.G. (1983). In vivo phosphorus-31 nuclear magnetic resonance reveals lowered ATP during heat shock of *Tetrahymena*. *Science* 219,1223-1225.

Fink, A.L. (2005). Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 15, 35-41.

Finley, D., Chau, V. (1991). Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol.* 7, 25-69.

Fischer, E. (1999). Dissertation zu Hsp12.

Fling, S.P., Gregerson, D.S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem.* 155, 83-88.

François, J., and Parrou, J.L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 25, 125-145.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J.S., Tempst, P., and 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.

Gancedo, C., Gancedo, J.M., and Sols, A. (1968). Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *Eur J Biochem.* 5, 165-172.

Gasch, A.P. (2007). Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* 24, 961-976.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 11, 4241-4257.

Gasch, A.P., and Werner-Washburne, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct. Integr. Genomics* 2, 181-92.

Gemmecker, G., Jahnke, W., and Kessler, H. (1993). Measurement of fast proton-exchange rates in isotopically labeled compounds. *J. Amer. Chem. Soc.* 115, 11620-11621.

Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Casjens, S.R., and Kaiser A.D. (1973). Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J Mol Biol.* 76, 45-60.

Georgopapadakou, N.H., Walsh, T.J. (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother.* 40, 279-291.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.

Ghosh AK, Rukmini R, Chattopadhyay A. (1997). Modulation of tryptophan environment in membrane-bound melittin by negatively charged phospholipids: implications in membrane organization and function. *Biochemistry* 36, 14291-14305.

## 6. Literatur

---

Glover, J.R., and Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73-82.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 563-567.

Goddard, T.D., and Kneller, D.G. (2002). Sparky 3. University of California, San Francisco. <http://cgl.ucsf.edu/home/sparky>.

Goldstein, A.L., and McCusker, J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553.

Goodman, R.H., Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 14, 1553-1577.

Goto, Y., Hagihara, Y. (1992). Mechanism of the conformational transition of melittin. *Biochemistry* 31, 732-738.

Groot, de, P.W., Ram, A.F., and Klis, F.M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol.* 42, 657-675.

Gunasekaran, K., Tsai, C.J., Kumar, S., Zanuy, D., Nussinov, R. (2003). Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. *Trends Biochem Sci.* 28, 81-85.

Gunkel, K., Veenhuis, M., and van der Kleij, I.J. (2005). Protein translocation machineries: how organelles bring in matrix proteins. *FEMS Yeast Res.* 5, 1037-1045.

Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 1264-1300.

Guthrie, C. (1991). Messenger RNA splicing in yeast: clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein. *Science* 253, 157-63.

Guyot, S., Ferret, E., and Gervais, P. (2005). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to thermal stress. *Biotechnol Bioeng.* 92, 403-409.

Haas, H., Oliveira, C.L., Torriani, I.L., Polverini, E., Fasano, A., Carlone, G., Cavatorta, P., Riccio, P. (2004). Small angle x-ray scattering from lipid-bound myelin basic protein in solution. *Biophys J.* 86, 455-460.

Hagen, I., Ecker, M., Lagorce, A., Francois, J.M., Sestak, S., Rachel, R., Grossmann, G., Hauser, N.C., Hoheisel, J.D., Tanner, W., and Strahl, S. (2004). Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in multiple GPI-anchored mannoproteins. *Mol Microbiol.* 52, 1413-1425.

Hamill, O.P., and Martinac, B. (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev.* 81,685-740.

Haque, E., and Lentz, B.R. (2004). Roles of curvature and hydrophobic interstice energy in fusion: studies of lipid perturbant effects. *Biochemistry* 43, 3507-3517.

Hardy, S.J., Randall, L.L. (1989). Biochemical investigation of protein export in *Escherichia coli*. *J Cell Sci Suppl.* 11, 29-43.

Hartl, F.U., Neupert, W. (1990). Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247, 930-938.

Haslbeck, M., Braun, N., Stromer, T., Richter, B., Mode, I. N., Weinkauff, S., and Buchner, J. (2004a). Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23, 638-649.



Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D., and Buchner, J. (2005a). Some like it hot. The structure and function of small heat shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 842-846.

Haslbeck, M., Ignatiou, A., Saibil, H., Helmich, S., Frenzl, E., Stromer, T., Buchner, J. (2004b). A domain in the N-terminal part of Hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization. *J Mol Biol.* 343, 445-455.

Haslbeck, M., Miess, A., Stromer, T., Walter, S., Buchner, J. (2005b). Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J Biol Chem.* 280 23861-2388.

Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R., Buchner, J. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* 18, 6744-6751.

Hebert, D.N. (1999). Protein unfolding: mitochondria offer a helping hand. *Nat Struct Biol.* 6, 1084-1085.

Heide, van der, T., Stuart, M.C., and Poolman, B. (2001). On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.* 20, 7022-7032.

Heijne, von, G. (1990). The signal peptide. *J Membr Biol.* 115, 195-201.

Heimburg, T. (2000). A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophys. J.* 78, 1154-1165.

Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., and Ellis, R.J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-334.

Hendrick, J.P., and Hartl, F.U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 62, 349-384.

## 6. Literatur

---

Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., and Vígh, L., (2008). Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Review Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1653-1664.

Horwitz, J. (2003). Alpha-crystallin. *Exp Eye Res.* 76, 145-153.

Hottiger, T., Boller, T., and Wiemken, A. (1987). Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.* 220, 113-115.

Huang, C., and Li, S. (1999). Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1422, 273-307.

Huang S, Ratliff KS, Schwartz MP, Spenner JM, Matouschek A. (1999b). Mitochondria unfold precursor proteins by unraveling them from their N-termini. *Nat Struct Biol.* 6, 1132-1138.

Hubbard, M.J., Klee, C.B. (1989). Characterization of a high-affinity monoclonal antibody to calcineurin whose epitope defines a new structural domain of calcineurin A. *Eur J Biochem.* 185, 411-418.

Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.

Iakoucheva, L.M., Brown, C.J., Lawson, J.D., Obradović, Z., Dunker, A.K. (2002). Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol.* 323, 573-584.

Ivorra, C., Pérez-Ortín, J.E., and del Olmo, M. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 698-708.

## 6. Literatur

---

Jakob, U., and Buchner, J. (1994). Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci.* 19, 205-211.

Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem.* 268,1517-1520.

Jakob, U., Meyer, I., Bügl, H., André, S., Bardwell, J.C., and Buchner, J. (1995). Structural organization of procaryotic and eucaryotic Hsp90. Influence of divalent cations on structure and function. *J Biol Chem.* 270, 14412-14419.

Jakob, U., Muse, W., Eser, M., and Bardwell, J.C. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96, 341-352.

Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.

Jamieson, D.J., Rivers, S.L., and Stephen, D.W. (1994). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* 140, 3277-3283.

Janknecht, R., Hunter, T. (1996). Transcription. A growing coactivator network. *Nature* 383, 22-23.

Jelesarov, I., Bosshard, H.R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit.* 12, 3-18.

Jenkins, G.M., Richards, A., Wahl, T., Mao, C., Obeid, L., and Hannun, Y. (1997). Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 272, 32566-32572.

Johnson, D.G., Walker, C.L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39, 295-312.

## 6. Literatur

---

Johnston, G.C., and Singer, R.A. (1980). Ribosomal precursor RNA metabolism and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 178,357-360.

Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195-202.

Kaiser, R.D., and London, E. (1998). Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37, 8180-8190.

Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., and Levin, D.E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 9, 1559-1571.

Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D., and Goldberg, A.L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn 2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol. Cell* 13, 771-781.

Kane, S.M., and Roth, R. (1974). Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. *J Bacteriol.* 118, 8-14.

Kapteyn, J.C., Ram, A.F., Groos, E.M., Kollar, R., Montijn, R.C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E., and Klis, F.M. (1997). Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol.* 179, 6279-6284.

Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H., and Klis, F.M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta*;1426, 373-383.

Karreman, R.J., and Lindsey, G.G. (2005). A rapid method to determine the stress status of *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring the expression of a Hsp12:green fluorescent protein (GFP) construct under the control of the Hsp12 promoter. *J. Biomol. Screen.* 10, 253-259.

Kaur, R., and Bachhawat, A.K. (1999). The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in *erg* mutants of *S. cerevisiae*. *Microbiology* 145, 809-818.

Kelley, W.L. (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci.* 23, 222-227.

Kim, K.K., Kim, R., Kim, S.H. (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* 394, 595-599.

Klebl, F., and Tanner, W. (1989). Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 171, 6259-6264.

Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202.

Klumpp, M., and Baumeister, W. (1998). The thermosome: archetype of group II chaperonins. *FEBS Lett.* 430, 73-77.

Kneller, D.G., and Kuntz, I.D. (1993). Ucsf Sparkyan Nmr display, annotation and assignment tool. *J. Cell Biochem.* 53, 254.

Koch, Y., and Rademacher, K.H. (1980). Chemical and enzymatic changes in the cell walls of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* by scanning electron microscopy. *Can J Microbiol.* 26, 965-970.

Kohlwein, S.D., Daum, G., Schneider, R., and Paltauf, F. (1996). Phospholipids: synthesis, sorting, subcellular traffic - the yeast approach. *Trends Cell Biol.* 6, 260-266.

Koide, S., Dyson, H.J., Wright, P.E. (1993). Characterization of a folding intermediate of apoplastocyanin trapped by proline isomerization. *Biochemistry* 32, 12299-12310.

## 6. Literatur

---

Kokke, B.P., Leroux, M.R., Candido, E.P., Boelens, W.C., de Jong, W.W. (1998). Caenorhabditis elegans small heat-shock proteins Hsp12.2 and Hsp12.3 form tetramers and have no chaperone-like activity. FEBS Lett. 433, 228-232.

Kollár, R., Reinhold, B.B., Petráková, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M, and Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin. J Biol Chem. 272, 17762-17775.

Koning, A.J., Rose, R., and Comai, L. (1992). Developmental Expression of Tomato Heat-Shock Cognate Protein 80. Plant Physiol. 100, 801-811.

Konno, T., Kamatari, Y.O., Kataoka, M., Akasaka, K. (1997). Urea-induced conformational changes in cold- and heat-denatured states of a protein, Streptomyces subtilisin inhibitor. Protein Sci. 6, 2242-2249.

Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I., Wright, P.E. (1996). Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. Proc Natl Acad Sci U S A 93,11504-11528.

Kruijff, de, B. (1987). Polymorphic regulation of membrane lipid composition. Nature 329, 587-588.

Kruijff, de, B. (1997). Lipid polymorphism and biomembrane function. Curr. Opin. Chem. Biol. 1, 564-569.

Kruuv, J., Glofcheski, D., Cheng, K.H., Campbell, S.D., Al-Qysi, H.M., Nolan, W.T., and Lepock, J.R. (1983). Factors influencing survival and growth of mammalian cells exposed to hypothermia. I. Effects of temperature and membrane lipid perturbers. J Cell Physiol. 115, 179-185.

Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. Science 274, 948-953.

Ladokhin AS, White SH. (1999). Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *J Mol Biol.* 285, 1363-1369.

Lagunas, R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *S. cerevisiae*. *Yeast* 2, 221-228.

Lee, G.J., Vierling, E. (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122, 189-198.

Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M. (1998). *Prinzipien der Biochemie.*, H. Tschesche, ed., Heidelberg: Spektrum Verlag GmbH.

Lentz, B.R. (1993). Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem Phys Lipids* 64, 99-116.

Leonhardt, S.A., Fearson, K., Danese, P.N., and Mason, T.L. (1993). HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol Cell Biol.* 13, 6304-6313.

Lesage, G., Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70, 317-343.

Leutner, M., Gschwind, R.M., Liermann, J., Schwarz, C., Gemmecker, G., and Kessler, H. (1998). Automated backbone assignment of labeled proteins using the threshold accepting algorithm. *J. Biomol. NMR* 11, 31-43.

Levin, D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69, 262-291.

Li, H.M., Theg, S.M., Bauerle, C.M., Keegstra, K. (1990). Metal-ion-center assembly of ferredoxin and plastocyanin in isolated chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6748-6752.

Liebisch, G., Drobnik, W., Lieser, B., and Schmitz, G. (2002). High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 48, 2217-2224.

Liebisch,G., Lieser,B., Rathenberg,J., Drobnik,W., and Schmitz,G. (2004). High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *Biochim. Biophys. Acta* 1686, 108-117.

Lillie, S.H., and Pringle, J.R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol.* 143, 1384-1394.

Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 55, 1151-1191.

Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.

Lindquist, S., and Kim, G. (1996). Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5301-5306.

Lipke, P. and Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180, 3735-3740.

Littlewood, T.D., Hancock, D.C., and Evan, G.I. (1987). Characterization of a heat shock-induced insoluble complex in the nuclei of cells. *J Cell Sci.* 88, 65-72.

Loffeld, B., Keweloh, H.(1996). cis/trans isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids* 31, 811-815.



Lotharius, J., Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci.* 3, 932-942.

Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*. Berlin, Spektrum Verlag.

Love, J.J., Li, X., Chung, J., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2004). The LEF-1 high-mobility group domain undergoes a disorder-to-order transition upon formation of a complex with cognate DNA. *Biochemistry* 43, 8725-8734.

Luzzati, V., and Husson, F. (1962). The structure of the liquid-crystalline phasis of lipid-water systems. *J Cell Biol.* 12, 207-219.

MacDonald, A.G., Wahle, K.W., Cossins, A.R., and Behan, M.K. (1988). Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes. *Biochim Biophys Acta* 938, 231-242.

MacDonald, R.C., MacDonald, R.I., Menco, B.P., Takeshita, K., Subbarao, N.K., Hu, L.R. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1061, 297-303.

MacLean, M., Harris, N., and Piper, P.W. (2001). Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast* 18, 499-509.

Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C., Björndal, H., and Lindberg, B. (1973). The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J.* 135, 31-36.

Marchler G, Schüller C, Adam G, Ruis H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12, 1997-2003.

## 6. Literatur

---

Marcos-Lousa, de C., Sideris, D.P., Tokatlidis, K. (2006). Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends Biochem Sci.* 31, 259-267.

Marechal, P.A., de Maranon, I.M., Molin, P., and Gervais, P. (1995). Yeast cell responses to water potential variations. *Int J Food Microbiol.* 28, 277-287.

Martin, T.F. (2001). PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 493-499.

Martin J, Hartl FU. (1997). The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1107-1112.

Martinez, J., Moeller, I., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Luring, B. (2003). Parkinson's Disease-associated  $\alpha$ -Synuclein Is a Calmodulin Substrate. *J. Biol. Chem.* 278, 17379-17387.

Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO* 15, 2227-2235.

Maurizi, M.R., Clark, W.P., Kim, S.H., and Gottesman, S. (1990). Clp P represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem.* 265, 12546-12552.

Mayer, M.P., Schröder, H., Rüdiger, S., Paal, K., Laufen, T., and Bukau, B. (2000). Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol.* 7, 586-593.

McElhaney, R.N. (1984). The structure and function of the *Acholeplasma laidlawii* plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 779, 1-42.

Meikle, A.J., Reed, R.H., and Gadd, G.M. (1988). Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Microbiol. 134, 3049-3060.

Meinlschmidt, B. (2006). Disseration zu Hsp12.

Merchant, S., Bogorad, L. (1986). Rapid degradation of apoplastocyanin in Cu(II)-deficient cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biol Chem. 261, 15850-15853.

Miernyk, J.A., and Hayman, T.G. (1997). ATPase activity and molecular chaperone function of the stress70 proteins. Plant Physiol. 110, 419-424.

Mogk, A., and Bukau, B. (2004). Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase. Curr Biol. 14, R78-80.

Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., Bukau, B. (2003). Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. Mol Microbiol. 50, 585-595.

Molina, M., Gil, C., Pla, J., Arroyo, J., and Nombela, C. (2000). Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. Microsc Res Tech. 51, 601-612.

Montijn, R.C., van Rinsum, J., van Schagen, F.A., and Klis, F.M. (1994). Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. J Biol Chem. 269, 19338-19342.

Moore, A., Donahue, C.J., Bauer, K.D., and Mather J.P., (1998). Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. Methods Cell Biol. 57, 265-278.

Moore, T., and Keegstra, K. (1993). Characterization of a cDNA clone encoding a chloroplast-targeted Clp homologue. Plant Mol Biol. 21, 525-537.

## 6. Literatur

---

Morimoto, R.I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259,1409-1410.

Morris, G.J., Winters, L., Coulson, G.E., and Clarke, K.J. (1986). Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* 132, 2023-2034.

Motshwene, P., Karreman, R., Kgari, G., Brandt, W., and Lindsey, G. (2004). LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 377, 769-774.

Mrsă, V., Seidl, T., Gentsch, M., and Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1145-1154.

Namba, K. (2001). Roles of partly unfolded conformations in macromolecular self-assembly. *Genes Cells* 6, 1-12.

Nes, W.D., Janssen, G.G., Crumley, F.G., Kalinowska, M., Akihisa, T. (1993). The structural requirements of sterols for membrane function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* 300, 724-733.

Nicolet, C.M., and Craig, E.A. (1989). Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 9, 3638-3646.

Nielsen, M.S., Vorum, H., Lindersson, E., Jensen, P.H. (2001). Ca<sup>2+</sup> binding to alpha-synuclein regulates ligand binding and oligomerization. *J Biol Chem.* 276, 22680-22684.

Nieto-Sotelo, J., Wiederrecht, G., Okuda, A., Parker, C.S. (1990). The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* 62, 807-817.

## 6. Literatur

---

Nobel, de, J.G., and Barnett, J.A. (1991). Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* 7, 313-323.

Nobel, de, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T., and van den Ende, H. (1990). The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 491-499.

Nover, L. (1991). HSFs and HSPs--a stressful program on transcription factors and chaperones. *Stress Proteins and the Heat Shock Response*, sponsored by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY USA, April 29-May 2, 1991. *New Biol.* 3, 855-859.

Nover L, and Hightower L. (1991). Heat shock and development. Introduction. *Results Probl Cell Differ.* 17, 1-4.

Nover, L., and Scharf, K.D. (1984). Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur J Biochem.* 139, 303-313.

Nover, L., and Scharf, K.D. (1997). Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 53, 80-103.

Opekarová, M., and Tanner, W. (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta* 1610, 11-22.

Orlandi, I., Cavadini, P., Popolo, L., and Vai, M. (1996). Cloning, sequencing and regulation of a cDNA encoding a small heat-shock protein from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* 1307, 129-131.

Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., and Rothstein, R.J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78,6354-6358.

## 6. Literatur

---

Ostersetzer, O., Tabak, S., Yarden, O., Shapira, R., and Adam, Z. (1996). Immunological detection of proteins similar to bacterial proteases in higher plant chloroplasts. *Eur J Biochem.* 236, 932-936.

Outeiro, T.F., and Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpa-synuclein biology and pathobiology. *Science* 302, 1772-1775.

Papahadjopoulos, D., Moscarello, M., Eylar, E.H., Isac, T. (1975). Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 401, 317-335.

Parag, H.A., Raboy, B., Kulka, R.G. (1987). Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *EMBO J.* 6, 55-61.

Park, Y.N., Strauss, A., and Morschhäuser, J. (2004). The white-phase-specific gene WH11 is not required for white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Genet. Genomics* 272, 88-97.

Parker MJ, Marqusee S. (1999). The cooperativity of burst phase reactions explored. *J Mol Biol.* 293, 1195-1210.

Parks, L.W., McLean-Bowen, C., Bottema, C.K., Taylor, F.R., Gonzales, R., Jensen, B.W., and Ramp, J.R. (1982). Aspects of sterol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in *Phytophthora*. *Lipids* 17, 187-196.

Párraga, G., Horvath, S.J., Eisen, A., Taylor, W.E., Hood, L., Young, E.T., Klevit, R.E. (1988). Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1. *Science* 241, 1489-1492.

Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* 372, 475-478.

Parsell, D.A., Sanchez, Y., Stitzel, J.D., and Lindquist, S. (1991). Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* 353, 270-273.

Patriarca, E.J., and Maresca, B. (1990). Acquired thermotolerance following heat shock protein synthesis prevents impairment of mitochondrial ATPase activity at elevated temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res.*190, 57-64.

Patton JL, Lester RL. (1991). The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J Bacteriol.* 173, 3101-3108.

Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* 287, 821-828.

Pearl, L.H., and Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem.* 75, 271-294.

Pechan PM. (1991). Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Lett.* 280, 1-4.

Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, J.M., and Matallana, E. (2005). Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6831-6837.

Perry, A.J., Lithgow, T. (2005). Protein targeting: entropy, energetics and modular machines. *Curr Biol.* 15, 423-425.

Phipps, B.M., Hoffmann, A., Stetter, K.O., 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.

Pilon M, Schekman R. (1999). Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell* 97, 679-682.

## 6. Literatur

---

Pintacuda, G., and Otting, G. (2002). Identification of protein surfaces by NMR measurements with a paramagnetic Gd(III) chelate. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 372-373.

Piper, P.W. (1993). Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 11,339-355.

Piper, P.W. (1999). Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radic Biol Med.* 27,1219-1227.

Piper, P.W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P., Cole, M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones* 2, 12-24.

Piper, P.W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas-Ferreira, P., Byrne, K., Praekelt, U.M., Meacock, P., Récnacq, M., and Boucherie, H. (1994). Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology* 140, 3031-3038.

Porter, J., Deere, D., Pickup, R., Edwards, C. (1996). Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry* 23, 91-96.

Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., and Ariño, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem.* 275, 17249-17255.

Posas, F., and Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276,1702-1705.

Praekelt, U.M., and Meacock, P.A. (1990). HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol. Gen. Genet.* 223, 97-106.



Pratt, W.B., Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med.* 228, 111-133.

Quinn, P.J. (1988). Effects of temperature on cell membranes. *Symp Soc Exp Biol.* 42, 237-258.

Radhakrishnan, I., Pérez-Alvarado, G.C., Dyson, H.J., Wright, P.E. (1998). Conformational preferences in the Ser133-phosphorylated and non-phosphorylated forms of the kinase inducible transactivation domain of CREB. *FEBS Lett.* 430, 317-322.

Radhakrishnan, I., Pérez-Alvarado, G.C., Parker, D., Dyson, H.J., Montminy, M.R., Wright, P.E. (1997). Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell* 91, 741-752.

Radivojac, P., Obradovic, Z., Smith, D.K., Zhu, G., Vucetic, S., Brown, C.J., Lawson, J.D., Dunker, A.K. (2004). Protein flexibility and intrinsic disorder. *Protein Sci.* 13, 71-80.

Ramos, J.L., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Godoy, P., Haïdour, A., Reyes, F., and Fernández-Barrero, A. (1997). Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J Biol Chem.* 272, 3887-3890.

Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., and Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem.* 275, 8290-8300.

Respondek, M., Madl, T., Gobl, C., Golser, R., and Zangger, K. (2007). Mapping the orientation of helices in micelle-bound peptides by paramagnetic relaxation waves. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5228-5234.

## 6. Literatur

---

Rest, van der, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev.* 59, 304-322.

Rose, D. (1975). Physical responses of yeast cells to osmotic shock. *J Appl Bacteriol.* 38,169-175.

Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R., Morbach, S. (2000). Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J Biol Chem.* 275, 735-41.

Rudolph, A.S., Crowe, J.H., and Crowe, L.M. (1986). Effects of three stabilizing agents--proline, betaine, and trehalose--on membrane phospholipids. *Arch Biochem Biophys.* 245, 134-143.

Ryder, N.S., and Dupont, M.C. (1985). Inhibition of squalene epoxidase by allylamine antimycotic compounds. A comparative study of the fungal and mammalian enzymes. *Biochem J.* 230, 765-770.

Saiardi, A., Caffrey, J.J., Snyder, S.H., and Shears, S.B. (2000). Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 468, 28-32. Erratum in: *FEBS Lett* 469, 213.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning.* (New York: Cold Spring Harbor Press).

Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sanchez, Y., and Lindquist, S.L. (1990). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248, 1112-1115.

## 6. Literatur

---

Sanchez, Y., Parsell, D.A., Taulien, J., Vogel, J.L., Craig, E.A., and Lindquist, S. (1993). Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J Bacteriol.* 175, 6484-6491.

Schatz, G., Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.

Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 21, 289-296.

Schmid, F.X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: A Practical Approach Series*, Kap. 11, 261-297. Oxford university Press Inc., New York, 2.Aufl.

Schmitt, A.P., and McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5777-5782.

Schmitt, M., Neupert, W., and Langer, T. (1995). Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *EMBO J.* 14, 3434-3444.

Schmitz, G., Assmann, G., and Bowyer D.E. (1984). A quantitative densitometric method for the rapid separation and quantitation of the major tissue and lipoprotein lipids by high-performance thin-layer chromatography: I. Sample preparation, chromatography, and densitometry. *J. Chromatogr.* 307, 65–79.

Schneider, M.F., Marsh, D., Jahn, W., Kloesgen B., and Heimburg T. (1999). Network formation of lipid membranes: Triggering structural transitions by chain melting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14312-14317.

Schwarz, E., and Neupert, W. (1994). Mitochondrial protein import: mechanisms, components and energetics. *Biochim Biophys Acta* 1187, 270-274.

Schwieters, C.D., Kaszewski, J.J., Tjandra, N., and Clore, G.M. (2003). The Xplor-NIH NMR structure determination package. *J. Magn. Res.* 160, 66-74.

Seigneuret, M., Zachowski, A., Hermann, A., and Devaux, P.F. (1984). Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. *Biochemistry* 23, 4271-4275.

Shamrock, V.J., Lindsey, G.G. (2008). A compensatory increase in trehalose synthesis in response to desiccation stress in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the heat shock protein Hsp12p. *Can J Microbiol.* 54, 559-568.

Shanklin, J., DeWitt, N.D., and 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.

Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Durán, A., and Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 114, 111-123.

Shields, D., and Arvan, P. (1999). Disease models provide insights into post-golgi protein trafficking, localization and processing. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 489-494.

Shimizu K, Toh H. (2009). Interaction between Intrinsically Disordered Proteins Frequently Occurs in a Human Protein-Protein Interaction Network. *J Mol Biol.* [Epub ahead of print].

Shimoi, H., Kitagaki, H., Ohmori, H., Iimura, Y., and Ito, K. (1998). Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J Bacteriol.* 180, 3381-3387.

Simoës, T., Teixeira, M.C., Fernandes, A.R., Sá-Correia, I. (2003). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, mediated

## 6. Literatur

---

by Msn2p- and Msn4p-regulated genes: important role of SPI1. *Appl Environ Microbiol.* 69, 4019-4028.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.

Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 522-525.

Singer, M.A., and Lindquist, S. (1998a). Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell* 1, 639-648.

Singer, M.A., and Lindquist, S. (1998b). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16, 460-468.

Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.

Sinicrope, F.A., Dudeja, P.K., Bissonnette, B.M., Safa, A.R., and Brasitus, T.A. (1992). Modulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by alterations in lipid fluidity of rat liver canalicular membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 267, 24995-25002.

Smits, G.J., Kapteyn, J.C., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol.* 2, 348-352.

Sorger, P.K., and Pelham, H.R. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855-864.

Spector, D.L., Lodmann, R.D., and Leinwand, L.A. (1998). Preparative methods for scanning electron microscopy. In *Cells*, D.L. Spector, ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 122.1-123.27.

## 6. Literatur

---

Spence, J., and Georgopoulos, C. (1989). Purification and properties of the *Escherichia coli* heat shock protein, HtpG. *J Biol Chem.* 264, 4398-4403.

Squires, C.L., Pedersen, S., Ross, B.M., and Squires, C. (1991). ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J Bacteriol.* 173, 4254-4262.

Stone, R.L., Matarese, V., Magee, B.B., Magee, P.T., and Bernlohr, D.A. (1990). Cloning, sequencing and chromosomal assignment of a gene from *Saccharomyces cerevisiae* which is negatively regulated by glucose and positively by lipids. *Gene* 96, 171-176.

Stromer, T., Fischer, E., Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J. (2004). Analysis of the regulation of the molecular chaperone Hsp26 by temperature-induced dissociation: the N-terminal domain is important for oligomer assembly and the binding of unfolding proteins. *J Biol Chem.* 279, 11222-11228.

Sukharev, S., Durell, S.R., and Guy, H.R. (2001). Structural models of the MscL gating mechanism. *Biophys J.* 81, 917-936.

Sutherland, F.C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B.A., and Kilian, S.G. (1997). Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 179, 7790-7795.

Suutari, M., Liukkonen, K., and Laakso S. (1990). Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J Gen Microbiol.* 136, 1469-1474.

Suzuki, C.K., Rep, M., van Dijl, J.M., Suda, K., Grivell, L.A., and Schatz, G. (1997). ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 22, 118-123.

Thevelein, J.M., and de Winde, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 33, 904-918.

Tompa P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci.* 27, 527-533.

Tompa, P., Csermely, P. (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* 18, 1169-1175.

Tompa, P., Dosztanyi, Z., Simon, I. (2006). Prevalent structural disorder in *E. coli* and *S. cerevisiae* proteomes. *J Proteome Res.* 5, 1996-2000.

Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Pagé, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., et al. (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294, 2364-2368.

Torre, de la J.G., Huertas, M.L., and Carrasco, B. (2000). HYDRONMR: Prediction of NMR relaxation of globular proteins from atomic-level structures and hydrodynamic calculations. *J. Magn. Res.* 147, 138-146.

Uden, N., van (1984). Temperature profiles of yeast. *Adv. Microb. Physiol.* 25, 195-251.

Ulmer, T.S., Bax, A., Cole, N.B., and Nussbaum, R.L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human  $\alpha$ -synuclein. *J. Biol. Chem.* 280, 9595-9603.

Uversky, V.N., Permyakov, S.E., Zagranichny, V.E., Rodionov, I.L., Fink, A.L., Cherskaya, A.M., Wasserman, L.A., Permyakov, E.A. (2002). Effect of zinc and temperature on the conformation of the gamma subunit of retinal phosphodiesterase: a natively unfolded protein. *J Proteome Res.* 1, 149-159.

Valentín, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F., and Sentandreu, R. (1987). Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 148, 88-94.

Vance JE. (2003). Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 75, 69-111.

Vance, J.E., Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res.* 44, 207-234.

Vanden Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J., and Coene, M.C. (1990). Biochemical basis for the activity and selectivity of oral antifungal drugs. *Br J Clin Pract Suppl.* 71, 41-46.

Varela, J.C., Praekelt, U.M., Meacock, P.A., Planta, R.J., and Mager, W.H. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* 15, 6232-6245.

Virgilio, de, L., Narducci, M.G., Isobe, M., Billips, L.G., Cooper, M.D., Croce, C.M., and Russo, G. (1994). Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12530-12534.

Voisine, C., Craig, E.A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., Voos, W. (1999). The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* 97, 565-574.

Walker, G.M. (1999). *Yeast- Physiology and Biotechnology.* (John Wiley and Sons Ltd., West Sussex, England).

Walter, S., and Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1098-1113.

Wandinger, S.K., Richter, K., and Buchner, J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283, 18473-18477.

Watson, K. (1972). The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 55, 721-726.



## 6. Literatur

---

Watson K. (1978). Thermal adaptation in yeasts: correlation of substrate transport with membrane lipid composition in psychrophilic and thermotolerant yeasts [proceedings] Biochem Soc Trans. 6, 293-296.

Webster, D.L., and Watson, K. (1993). Ultrastructural changes in yeast following heat shock and recovery. Yeast 9, 1165-1175.

Weinreb, P.H., Zhen, W., Poon, A.W., Conway, K.A., Lansbury, P.T. Jr. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. Biochemistry 35, 13709-13715.

Werner-Washburne, M., Becker, J., Kosic-Smithers, J., Craig, E.A. (1989). Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. J Bacteriol. 171, 2680-2688.

Wetlaufer, D. B. (1962). Ultraviolet Spectra of Proteins and Amino Acids. Advanc. Protein Chem. 17, 303-390.

Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K., and Maurizi, M.R. (1994). A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 12218-12222.

Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., and Jakob, U. (1992). Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*. Nature 358, 169-170.

Wiggins, P.M. (1990). Role of water in some biological processes. Microbiol Rev. 54, 432-449.

Wright, P.E., Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. J Mol Biol. 293, 321-331.

Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., London, E. (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and

## 6. Literatur

---

disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *J Biol Chem.* 276, 33540-33546.

Xu, Z., Horwich, A.L., Sigler, P.B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature* 388, 741-750.

Yaffe, M.B., Farr, G.W., Miklos, D., Horwich, A.L., Sternlicht, M.L., and Sternlicht, H. (1992). TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* 358, 245-248.

Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217,1214-1222.

Yang, S.A., Klee, C.B. (2000). Low affinity Ca<sup>2+</sup>-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochemistry* 39, 16147-16154.

Yazawa, M., Matsuzawa, F., Yagi, K. (1990). Inter-domain interaction and the structural flexibility of calmodulin in the connecting region of the terminal two domains. *J Biochem.* 107, 287-291.

Zara, S., Antonio Farris, G., Budroni, M., Bakalinsky, A.T. (2002). HSP12 is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*. *Yeast* 19, 269-276.

Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 173, 2026-2034.

Zlotnik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B., Cabib, E. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol.* 159, 1018-1026.

## 7. Anhang

### 7. Anhang

**Tabelle 7.1. Genexpressionsanalyse bei 30 °C.**

ID	Expression	Gene <sup>a</sup>	Regulation	Identity of function <sup>b</sup>	Function <sup>c</sup>
41	1962.17	Silenced copy of a1 at HMR	Up	18.02.09	Regulator of transcription factor
41	1962.17	Silenced copy of a1 at HMR	Up	34.11.03.07	Pheromone response
41	1962.17	Silenced copy of a1 at HMR	Up	41.01.01	Mating (fertilization)
41	1962.17	Silenced copy of a1 at HMR	Up	11.02.03.01	General transcription activities
42	1185.26	Alpha aminoadipate reductase	Up	01.01.06.06.01.03	Aminoadipic acid pathway
1	817.96	Hsp12	Down	34.11.09	Temperature perception and response
1	817.96	Hsp12	Down	32.01.01	Oxidative stress response
1	817.96	Hsp12	Down	32.01.03	Osmotic and salt stress response
1	817.96	Hsp12	Down	34.11.03.13	Osmosensing and response
1	817.96	Hsp12	Down	32.01.05	Heat shock response
1	817.96	Hsp12	Down	10.01.05.01	DNA repair
1	817.96	Hsp12	Down	34.07	Cell adhesion
1	817.96	Hsp12	Down	01.05.01	
1	817.96	Hsp12	Down	01.06.07	
254	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	11.02.03.04	Transcriptional control
2	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	11.02.03.04	Transcriptional control
254	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	18.02.09	Regulator of transcription factor
2	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	18.02.09	Regulator of transcription factor
254	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	34.11.03.07	Pheromone response
2	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	34.11.03.07	Pheromone response
254	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	41.01.01	Mating (fertilization)
2	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	41.01.01	Mating (fertilization)
2	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	11.02.03.01	General transcription activities
254	297.43	Silenced copy of ALPHA1 at HML	Down	11.02.03.01	General transcription activities
3	77.60	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase	Down	01.01.06.05	Metabolism of methionine
3	77.60	O-acetyl homoserine-O-	Down	01.01.09.03.01	Biosynthesis of cysteine

## 7. Anhang

		acetyl sulfhydrylase	serine			
3	77.60	O-acetyl sulfhydrylase	homoserine-O- serine	Down	01.02.01	
43	52.28	Mating factor	pheromone a- Up	Up	30.05	Transmembrane signal transduction
43	52.28	Mating factor	pheromone a- Up	Up	34.11.03.07	Pheromone response, mating-type determination, sex-specific proteins
44	14.57	Identified trapping	by gene- Up	Up	99	Unclassified proteins
45	11.33	Receptor for pheromone	alpha-factor Up	Up	18.01.07	Regulation by binding / dissociation
45	11.33	Receptor for pheromone	alpha-factor Up	Up	34.11.03.07	Pheromone response, mating-type determination, sex-specific proteins
45	11.33	Receptor for pheromone	alpha-factor Up	Up	30.05.02.24	G-protein coupled receptor signalling pathway
45	11.33	Receptor for pheromone	alpha-factor Up	Up	40.01.03	Directional cell growth (morphogenesis)
46	10.36	Protein that signaling from Ste4p	regulates a G protein beta subunit Up	Up	34.11.03.07	Pheromone response, mating-type determination, sex-specific proteins
46	10.36	Protein that signaling from Ste4p	regulates a G protein beta subunit Up	Up	41.01.01	Mating (fertilization)
4	7.83	Mating alpha-factor	pheromone Down	Down	30.05	Transmembrane signal transduction
4	7.83	Mating alpha-factor	pheromone Down	Down	34.11.03.07	Pheromone response
5	7.72	Mating alpha-factor	pheromone Down	Down	30.05	Transmembrane signal transduction
5	7.72	Mating alpha-factor	pheromone Down	Down	34.11.03.07	Pheromone response
47	7.56	Aspartyl secreted into the periplasmic space of mating type a cells	protease Up	Up	34.11.03.07	Pheromone response
47	7.56	Aspartyl secreted into the periplasmic space of mating type a cells, helps cells find mating partners	protease Up	Up	14.13.01	Cytoplasmic and nuclear protein degradation
48	6.85	Mating factor	pheromone a- Up	Up	30.05	Transmembrane signal transduction
48	6.85	Mating factor	pheromone a- Up	Up	34.11.03.07	Pheromone response
49	6.52	Putative unknown function	protein of Up	Up	99	Unclassified proteins

## 7. Anhang

6	5.15	Receptor for a factor receptor	Down	18.01.07	Regulation by binding / dissociation
6	5.15	Receptor for a factor receptor	Down	34.11.03.07	Pheromone response
6	5.15	Receptor for a factor receptor	Down	30.05.02.24	G-protein coupled receptor signalling pathway
50	4.95	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II	Up	02.16.01	Alcohol fermentation
50	4.95	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II	Up	01.05.01.01.03	
50	4.95	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase II	Up	01.05.01.03.03	
51	4.54	Protein containing zinc fingers	Up	11.02.03.04	Transcriptional control
51	4.54	Protein containing zinc fingers	Up	11.02.03.01	General transcription activities
51	4.54	Protein containing zinc fingers	Up	01.05.01	
51	4.54	Protein containing zinc fingers	Up	01.05.04	
52	4.43	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor	Up	20.01.01	Ion transport
53	4.36	Putative protein of unknown function; identified by fungal homology and RT-PCR	Up	99	Unclassified proteins
7	4.01	Adenine deaminase (adenine aminohydrolase)	Down	01.03.01.01	Purine nucleotide/nucleoside/nucleobase catabolism
54	4.01	Cell wall mannoprotein of the Srp1p/Tip1p family of serine-alanine-rich proteins	Up	32.01	Stress response
55	3.86	Mannoprotein that is incorporated into the cell wall via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor	Up	20.01.01	Ion transport
56	3.84	Omega class glutathione transferase	Up	99	Unclassified proteins
57	3.81	EIF4E-associated protein	Up	12.07	Translational control
57	3.81	EIF4E-associated protein	Up	12.04.01	Translation initiation
58	3.72	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	Up	20.01.03.01	Sugar transport
58	3.72	High-affinity glucose transporter of the major	Up	20.09.18	Cellular import

## 7. Anhang

facilitator superfamily					
59	3.53	Dihydroxyacetone kinase	Up	32.01	Stress response
59	3.53	Dihydroxyacetone kinase	Up	01.06	Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism
59	3.53	Dihydroxyacetone kinase	Up	01.04.01	
59	3.53	Dihydroxyacetone kinase	Up	01.05.01	
60	3.36	Transcription factor involved in glucose repression	Up	11.02.03.04	Transcriptional control
60	3.36	Transcription factor involved in glucose repression	Up	11.02.03.01	General transcription activities
60	3.36	Transcription factor involved in glucose repression	Up	01.05.04	
60	3.36	Transcription factor involved in glucose repression	Up	01.05.01	
61	3.33	Essential protein with two zinc fingers	Up	16.01	Protein binding
61	3.33	Essential protein with two zinc fingers	Up	10.03.01	Mitotic cell cycle and cell cycle control
62	3.22	One of two <i>S. cerevisiae</i> homologs (Sds23p and Sds24p) of the Schizosaccharomyces pombe Sds23 protein	Up	14.13	Protein/peptide degradation
62	3.22	One of two <i>S. cerevisiae</i> homologs (Sds23p and Sds24p) of the Schizosaccharomyces pombe Sds23 protein	Up	10.03.02	meiosis
62	3.22	One of two <i>S. cerevisiae</i> homologs (Sds23p and Sds24p) of the Schizosaccharomyces pombe Sds23 protein	Up	20.09.18.09.01	Endocytosis
62	3.22	One of two <i>S. cerevisiae</i> homologs (Sds23p and Sds24p) of the Schizosaccharomyces pombe Sds23 protein	Up	10.01	DNA processing
62	3.22	One of two <i>S. cerevisiae</i> homologs (Sds23p and Sds24p) of the Schizosaccharomyces pombe Sds23 protein	Up	01.03.16.03	DNA degradation
63	3.18	Putative protein of unknown function	Up	99	
64	3.16	Glycogen debranching	Up	02.19	Metabolism of energy reserves (e.g.

## 7. Anhang

		enzyme containing glucanotransferase and alpha-1,6- amyloglucosidase activities				glycogen, trehalose)
64	3.16	Glycogen debranching enzyme containing glucanotransferase and alpha-1,6- amyloglucosidase activities	Up	01.05.01.03.02		
64	3.16	Glycogen debranching enzyme containing glucanotransferase and alpha-1,6- amyloglucosidase activities	Up	01.05.01.01.02		
65	3.09	Putative channel-like protein	Up	20.01.13		Lipid/fatty acid transport
65	3.09	Putative channel-like protein	Up	20.03.01		Channel / pore class transport
66	3.09	Protein of unknown function	Up	34.11.03.07		Pheromone response
67	3.09	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1- tetrahydrofolate synthase	Up	11.06.02		tRNA modification
67	3.09	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1- tetrahydrofolate synthase	Up	01.03.01.03		Purinucleotide/nucleoside/ nucleobase anabolism
67	3.09	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1- tetrahydrofolate synthase	Up	16.21.07		NAD/NADP binding
67	3.09	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1- tetrahydrofolate synthase	Up	02.04		Glyoxylate cycle
67	3.09	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1- tetrahydrofolate synthase	Up	01.07.01		Biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
67	3.09	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1- tetrahydrofolate synthase	Up	01.01		Amino acid metabolism
67	3.09	Cytoplasmic trifunctional enzyme C1- tetrahydrofolate synthase	Up	01.05.01.07.03		
68	3.03	Part of actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p-Sla1p- End3p	Up	16.01		Protein binding
68	3.03	Part of actin cytoskeleton-regulatory	Up	20.09.18.09.01		Endocytosis

## 7. Anhang

		complex	Pan1p-Sla1p- End3p				
68	3.03	Part of actin cytoskeleton-regulatory complex	Pan1p-Sla1p- End3p	Up	10.03.03	Cytokinesis (cell division)/septum formation and hydrolysis	
68	3.03	Part of actin cytoskeleton-regulatory complex	Pan1p-Sla1p- End3p	Up	43.01.03.05	Budding, cell polarity and filament formation	
68	3.03	Part of actin cytoskeleton-regulatory complex	Pan1p-Sla1p- End3p	Up	14.10	Assembly of protein complexes	
68	3.03	Part of actin cytoskeleton-regulatory complex	Pan1p-Sla1p- End3p	Up	42.04.03	Actin cytoskeleton	
8	3.01	Putative protein of unknown function		Down	99	Unclassified proteins	
69	2.98	Protein of unknown function that may interact with ribosome		Up	99	Unclassified proteins	
9	2.95	Putative protein of unknown function		Down	99	Unclassified proteins	
70	2.95	Putative protein of unknown function		Up	99	Unclassified proteins	
71	2.95	RNA polymerase II largest subunit B220		Up	11.02.03.01	General transcription activities	
71	2.95	RNA polymerase II largest subunit B220		Up	16.03.01	DNA binding	
72	2.94	Negative regulator of the glucose-sensing signal transduction pathway		Up	20.01.03.01	Sugar transport	
72	2.94	Negative regulator of the glucose-sensing signal transduction pathway		Up	30	Cellular communication	
72	2.94	Negative regulator of the glucose-sensing signal transduction pathway		Up	01.05.04		
73	2.92	Fungal-specific protein of unknown function		Up	99	Unclassified proteins	
256	2.92	Fungal-specific protein of unknown function		Up	99	Unclassified proteins	
74	2.90	Subunit, with Yme1p		Up	99	Unclassified proteins	
75	2.88	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell wall endoglucanase required for proper cell separation after		Up	10.03.01	Mitotic cell cycle and cell cycle control	



## 7. Anhang

		cytokinesis			
75	2.88	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell wall endoglucanase required for proper cell separation after cytokinesis	Up	10.03.03	Cytokinesis (cell division)/septum formation and hydrolysis
75	2.88	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell wall endoglucanase required for proper cell separation after cytokinesis	Up	40.01	Cell growth / morphogenesis
75	2.88	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell wall endoglucanase required for proper cell separation after cytokinesis	Up	01.05.01.01.02	
76	2.88	Protein involved in clathrin cage assembly	Up	16.01	Protein binding
76	2.88	Protein involved in clathrin cage assembly	Up	20.09.18.09.01	Endocytosis
76	2.88	Protein involved in clathrin cage assembly	Up	14.10	Assembly of protein complexes
77	2.86	ER localized, heme-binding peroxidase	Up	32.07.07.05	Peroxidase reaction
77	2.86	ER localized, heme-binding peroxidase	Up	01.07	Metabolism of vitamins
77	2.86	ER localized, heme-binding peroxidase	Up	01.20.19.01	Metabolism of porphyrins
77	2.86	ER localized, heme-binding peroxidase	Up	34.01.01.01	Homeostasis of metal ions
77	2.86	ER localized, heme-binding peroxidase	Up	16.21.01	Heme binding
77	2.86	ER localized, heme-binding peroxidase	Up	01.20.50	
78	2.84	Member of the Sir2 family of NAD(+)-dependent protein deacetylases	Up	11.02.03.04	Transcriptional control
78	2.84	Member of the Sir2 family of NAD(+)-dependent protein deacetylases	Up	01.06	Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism
78	2.84	Member of the Sir2 family of NAD(+)-dependent protein deacetylases	Up	10.01.09.05	DNA conformation modification (e.g. chromatin)
78	2.84	Member of the Sir2 family of NAD(+)-dependent protein deacetylases	Up	16.03.01	DNA binding

## 7. Anhang

		family of NAD(+)-dependent protein deacetylases			
10	2.79	Essential nuclear protein	Down	12.01	Ribosome biogenesis
10	2.79	Essential nuclear protein	Down	10.03.01	Mitotic cell cycle and cell cycle control
85	2.77	Protein kinase that regulates signal transduction activity and G1 progression	Up	32.01.01	Oxidative stress response
85	2.77	Protein kinase that regulates signal transduction activity and G1 progression	Up	14.07.03	Modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation
85	2.77	Protein kinase that regulates signal transduction activity and G1 progression	Up	10.03.01	Mitotic cell cycle and cell cycle control
85	2.77	Protein kinase that regulates signal transduction activity and G1 progression	Up	40.01.05	Growth regulators / regulation of cell size
85	2.77	Protein kinase that regulates signal transduction activity and G1 progression	Up	40.20	Cell aging
85	2.77	Protein kinase that regulates signal transduction activity and G1 progression, controls cAPK activity	Up	34.11.03.01	
85	2.77	Protein kinase that regulates signal transduction activity and G1 progression	Up	01.04.01	
86	2.77	Putative protein of unknown function	Up	99	Unclassified proteins
87	2.77	Ferro-O2-oxidoreductase required for high-affinity iron uptake	Up	20.01.01.01.01.01	Siderophore-iron transport
87	2.77	Ferro-O2-oxidoreductase required for high-affinity iron uptake	Up	01.20.19.01	Metabolism of porphyrins
87	2.77	Ferro-O2-oxidoreductase required for high-affinity iron uptake	Up	32.05.01.03.03	Inorganic chemical agent resistance
87	2.77	Ferro-O2-oxidoreductase required for high-affinity iron uptake	Up	34.01.01.01	Homeostasis of metal ions (Na, K, Ca etc.)
87	2.77	Ferro-O2-oxidoreductase	Up	20.09.18	Cellular import

## 7. Anhang

		required for high-affinity iron uptake			
88	2.74	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	Up	01.07	Metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups
88	2.74	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	Up	01.01.09.01.02	Degradation of glycine
88	2.74	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	Up	01.05.01.01.05	
89	2.72	Protein of unknown function	Up	99	Unclassified proteins
90	2.71	Protein of unknown function	Up	14.07.09	Posttranslational modification of amino acids (e.g. hydroxylation, methylation)
90	2.71	Protein of unknown function	Up	42.10.03	Organization of chromosome structure
90	2.71	Protein of unknown function	Up	14.07.05	Modification by ubiquitination, deubiquitination
90	2.71	Protein of unknown function	Up	10.03.02	Meiosis
90	2.71	Protein of unknown function	Up	40.01.05	Growth regulators / regulation of cell size
91	2.69	RNA binding protein that negatively regulates growth rate	Up	12.07	Translational control
91	2.69	RNA binding protein that negatively regulates growth rate	Up	11	Transcription
91	2.69	RNA binding protein that negatively regulates growth rate	Up	16.03.03	RNA binding
91	2.69	RNA binding protein that negatively regulates growth rate	Up	40.01.03.01	Regulation of directional cell growth
91	2.69	RNA binding protein that negatively regulates growth rate	Up	42.16	Mitochondrion
91	2.69	RNA binding protein that negatively regulates growth rate	Up	16.03.01	DNA binding
92	2.68	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression	Up	11.02.03.01.01	Transcription initiation
92	2.68	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression	Up	11.02.03.04.01	Transcription activation

## 7. Anhang

92	2.68	Transcriptional activator of genes involved in nitrogen catabolite repression	Up	01.02.04.01	
93	2.68	Glycosylphosphatidylinositol-dependent cell wall protein	Up	99	Unclassified proteins
94	2.67	Lipase, required for intravacuolar lysis of autophagic bodies	Up	01.06	Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism
94	2.67	Lipase, required for intravacuolar lysis of autophagic bodies	Up	42.02	Eukaryotic plasma membrane
94	2.67	Lipase, required for intravacuolar lysis of autophagic bodies	Up	14.07.11.01	Autoproteolytic processing
95	2.62	Transcription factor required for full Ty1 expression	Up	11.02.03.04	Transcriptional control
95	2.62	Transcription factor required for full Ty1 expression	Up	11.02.03.01	General transcription activities
95	2.62	Transcription factor required for full Ty1 expression	Up	43.01.03.05	Budding, cell polarity and filament formation
96	2.59	Protein of unknown function	Up	10.01.05.03.01	Meiotic recombination
11	2.57	Putative protein of unknown function	Down	99	Unclassified proteins
97	2.57	Putative kinase of unknown function	Up	14.07.03	Modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation
97	2.57	Putative kinase of unknown function	Up	01.04.01	
98	2.57	1,3-beta-glucanosyltransferase	Up	42.01	Cell wall
98	2.57	1,3-beta-glucanosyltransferase	Up	01.05.01.03.02	
79	2.56	Pta1p Interacting protein	Up	11.02.03.01.07	Transcription termination
79	2.56	Pta1p Interacting protein	Up	11.04.03.01	Splicing
79	2.56	Pta1p Interacting protein	Up	16.03.03	RNA binding
79	2.56	Pta1p Interacting protein	Up	11.04.03.05	3'-End processing
80	2.56	Probable transcriptional repressor involved in response to toxic agents	Up	11.02.03.04.03	Transcription repression
80	2.56	Probable transcriptional repressor involved in response to toxic agents	Up	11.02.03.01.01	Transcription initiation
80	2.56	Probable transcriptional repressor involved in response to toxic agents	Up	32.01.09	DNA damage response

## 7. Anhang

		repressor involved in response to toxic agents			
80	2.56	Probable transcriptional repressor involved in response to toxic agents	Up	16.03.01	DNA binding
81	2.56	mRNA-binding protein expressed during iron starvation	Up	11.06.02	tRNA modification
99	2.55	Nonfunctional protein with homology to IMP dehydrogenase	Up	99	Unclassified proteins
257	2.55	Nonfunctional protein with homology to IMP dehydrogenase	Up	01.03.01.03	Purine nucleotide/nucleoside/nucleobase anabolism
99	2.55	Nonfunctional protein with homology to IMP dehydrogenase	Up	01.03	Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism
100	2.55	Protein required for cytochrome c oxidase assembly	Up	20.01.01.01	Cation transport (H+, Na+, K+, Ca2+, NH4+, etc.)
100	2.55	Protein required for cytochrome c oxidase assembly	Up	14.10	Assembly of protein complexes
101	2.55	Protein localized in the bud neck at G2/M phase	Up	10.03.01.01	Mitotic cell cycle
101	2.55	Protein localized in the bud neck at G2/M phase	Up	10.03.01.03	Cell cycle checkpoints (checkpoints of morphogenesis, DNA-damage,-replication, mitotic phase and spindle)
102	2.55	L-ornithine transaminase (OTase)	Up	01.01.05.03	Metabolism of urea (urea cycle)
102	2.55	L-ornithine transaminase (OTase)	Up	01.01.03.03	Metabolism of proline
102	2.55	L-ornithine transaminase (OTase)	Up	01.01.03.05.02	Degradation of arginine
102	2.55	L-ornithine transaminase (OTase)	Up	01.02.01	
103	2.52	Subunit of the anaphase-promoting complex (APC)	Up	10.01.05.03.01	Meiotic recombination
103	2.52	Subunit of the anaphase-promoting complex (APC)	Up	10.03.01.01.09	G2/M transition of mitotic cell cycle
104	2.50	Cystathionine gamma-lyase	Up	01.01.06.05.01.01	Biosynthesis of homocysteine
104	2.50	Cystathionine gamma-lyase	Up	01.01.09.03.01	Biosynthesis of cysteine
105	2.50	Phosphatidylinositol transfer protein with a potential role in lipid	Up	20.01.13	Lipid/fatty acid transport

## 7. Anhang

---

---

		turnover			
105	2.50	Phosphatidylinositol transfer protein with a potential role in lipid turnover	Up	42.01	Cell wall

---

Aufgelistet sind alle 192 Hits entsprechend der bezeichneten Proteinfunktion (FunCat Datenbanke), mit Änderungen eines größeren Faktors als 2,5 des Expressionslevels. ID kennzeichnet das entsprechende Gen im kompletten Screen. Expression bedeutet der Faktor bzw. die Atärke der Genexpression. Regulation bezeichnet die „up“- oder „down“-Regulation der entsprechenden Gene.

<sup>a</sup>Gen-Name.

<sup>b</sup>Identitätscode der Funktion.

<sup>c</sup>Functionelle Beschreibung der Gene entsprechend der FunCat-Datenbank.

### 8. Abkürzungen

A	Alanin
Å	Angström
Ade	Adenin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
CD	Circulardichroismus
C <sub>L</sub>	konstante Domäne der leichten Kette eines Aks
Δ	Deletion
Da	Dalton
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3- Phosphocholine
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> - (1-glycerol)]
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Differentialkalorimetrie
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo.	Endosomen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisierungsquelle
FACS	Durchflusszytometrie
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatographie“
g	Gramm
G	Glycin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsre
HSE	Hitzeschockelement
Hsf	Hitzeschockfaktor

## 8. Abkürzungen

---

Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunoglobulin G
IPC	Inositolphosphatceramid
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galaktopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K	Lysin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB <sub>0</sub>	“lysogeny broth” Nährmedium
Log	logarithmische Wachstumsphase
LPC	Lyso-PC
LPE	Lyso-PE
LUV	Large unilamellar vesicle
M	molar
MF, Mf	Membranfraktion
min	Minute
Mitocho.	Mitochondrien
ml	Milliliter
mM	millimolar
$\mu$ M	mikromolar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OD	optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphaditylethanolamin
Peroxis.	Peroxisomen
pH	Potentia Hydrogenii



## 8. Abkürzungen

---

PI	Phosphatidylinositol
pl	isoelektrischer Punkt
Plas. Mem.	Plasmamembran
PNS	„postnuclear supernatant“
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
PPI	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
Ppm	„parts per million“
PS	Phosphatidylserin
Q	Glutamin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese
sHsp	kleines Hitzeschockprotein
stat.	Stationäre Wachstumsphase
SUV	small unilamellar vesicle
STRE	„stress responsive element“
TEM	Transmission Elektronen Mikroskopie
TEMED	N, N ,N´,N´-Tetramethylethyldiamin
Tris-HCl	Trihydroxymethylammoniumethan Hydrochlorid
Trp	Tryptophan
U	unit
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
URA	Uracil

## 8. Abkürzungen

---

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
YPD	Yeast Peptone Dextrose
ZF, Zf	Zytosolische Fraktion
ZWF, Zwf	Zellwandfraktion

### **9. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2005 bis Oktober 2009 im Department Chemie der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Biotechnologie unter Leitung von Prof. Dr. Johannes Buchner angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner für die Bereitstellung dieses äußerst interessanten und zugleich herausfordernden Themas, für seine große Diskussionsbereitschaft, den kreativen Freiraum in seiner Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit, Versuche auch an anderen Lehrstühlen durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Martin Haslbeck für jegliche Unterstützung, für die Beantwortung vieler meiner Fragen, für wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Außerdem danke ich Büro 6: Dr. Daniel Weinfurthner, Dr. Marco Retzlaff, Andreas Schmid, Eva Herold, Dr. Roger Müller, Matthias Feige, Moritz Marcinowski für die vielen fachlichen und v.a. auch nicht-fachlichen Gespräche, die den Laboralltag erheiterten. Ohne die gute Zusammenarbeit wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Herzlichen Dank auch an Dr. Birgit Rudolph, deren Thema ich weiter bearbeiten durfte und die mit guten Ratschlägen zur Verfügung stand.

Bettina Richter möchte ich herzlich für die vielen REM-Aufnahmen danken; Helmut Krause für die MS-Analysen und Alexander Bepperling für die UZ-Messungen; Thomas Kriehuber für die Hilfe bei der Auswertung des Genchips.

Ein großes Dankeschön auch an das „Hefe-Team“, Julia Rohrberg und Christoph Kaiser, die immer dann weiter wussten, wenn einem selbst nichts mehr einfiel.

Ein großer Dank auch an die TAs Bianca Ludwig und Anja Osterauer für die Unterstützung im Laboralltag, und die Systemadministratoren Christoph Kaiser und Thomas Kriehuber für Ihre große Hilfe bei der Computerbetreuung.

## 9. Danksagung

---

Ein großer Dank gilt auch Dr. Gerhard Liebisch für die Lipidanalysen und die wertvollen Anregungen.

Weiterhin danke ich Frau Susanne Hilber, die bei allen organisatorischen Dingen stets mit großem Engagement geholfen hat und unterstützend zur Seite stand.

Außerdem möchte ich allen Danken, die mir Ihre Labore zur Verfügung gestellt haben und mir bei für mich neuen Techniken mit Rat und Tat zur Seite standen: Prof. Erdman und Sabrina Mindthoff bei der Organellenpräparation; Prof. Jentsch und Michael Schwarz bei der Erstellung des synthetischen Lethalitätsscreen; Prof. Deuerling und Dr. Yulia Ilina bei den FACS-Messungen; Prof. Weinkauff und Dr. Johannes Scheuring für die Gefrierbruchexperimente und die Hilfe bei der Veröffentlichung des Hsp12-Papers, Prof. Kessler, Prof. Reif und Franz Hagn für die große Hilfe bei den NMR-Experimenten und deren Auswertung.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Buchner, Richter und Winter bedanken, die immer hilfsbereit waren und stets für eine gute Atmosphäre beim Arbeiten gesorgt haben.

Am Ende möchte ich mich noch herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt und gefördert hat und auch dann Zeit hatte, wenn mal gejammert werden musste. Ein großer Dank gilt auch meinem Mann Daniel, der immer Verständnis hatte, wenn am Wochenende gearbeitet werden „musste“ und der mir immer mit unendlicher Geduld und Unterstützung zur Seite stand.

**10. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt, und auch nicht veröffentlicht.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Walker', is centered on the page.

Garching, September 2009