

**Klonierung und cytologisch-biochemische
Charakterisierung von Chaperonen in
*Phytophthora megasperma***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Porschewski

aus Schotten

Marburg/Lahn 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 1997 bis September 2000 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn unter der Leitung von Professor Dr. H. Kindl durchgeführt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als Dissertation angenommen
am: 17.10.2000

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Kindl

Zweitgutachter: Prof. Dr. B. Kadenbach

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2000

Aus den während der Dissertation durchgeführten Arbeiten sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

- Porschewski, P., Kindl, H., 7/2000, *The dual binding sites of a DnaJ-protein characterized by nine TPR domains form a link between the plasma membrane and Hsp70/Hsp90 complexes*, 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK.
- Porschewski, P., Specht, V., Stubner, S. and Kindl, H. (2000) *A tetratricopeptide repeats-containing J-protein localized in a plasma membrane-bound protein complex in the phytopathogenic oomycete *Phytophthora megasperma**. Eur. J. Cell Biol. (Manuskript eingereicht)

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungen	1
1. Einleitung	2
1.1 Das Modell der molekularen Chaperone als Faltungshelfer	2
1.2 Funktion des Hsp70/DnaJ-Systems	4
1.3 Funktionen von Hsp90	9
1.3 <i>Phytophthora</i> , ein pflanzenpathogener Oomycet	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Antikörper	15
2.1.3 Enzyme	16
2.1.4 Fertigsets	16
2.1.5 Radiochemikalien	17
2.1.6 Geräte und Apparaturen	17
2.1.7 Verbrauchsmaterial	17
2.1.8 Pilz- und Bakterienstämme	18
2.1.9 Oligonukleotide und Plasmide	18
2.2 Methoden	20
2.2.1 Kulturen von <i>Phytophthora megasperma</i>	20
2.2.1.1 Inkubation von <i>Phytophthora megasperma</i> mit Radiochemikalien	21
2.2.2 Bakterienkulturen	21
2.2.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen	22
2.3 Präparation und Gelelektrophorese von RNA	22
2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA	22
2.3.2 Anreicherung von Poly(A) ⁺ -RNA	24
2.3.3 Gelelektrophorese von RNA	24
2.4 Präparation und Gelelektrophorese von DNA	25
2.4.1 Präparation von genomischer DNA aus <i>P. megasperma</i>	25
2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab nach Holmes und Quigley (Boiling-Prep)	26
2.4.3 Präparation von Plasmid-DNA mit Fertigsets (Mini- und Midi-Prep)	26
2.4.4 DNA-Agarosegelelektrophorese	27
2.5 Behandlung und Analyse von Nucleinsäuren	28
2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	28
2.5.2 Extraktion mit Phenol/Chloroform	28
2.5.3 Präzipitation von Nucleinsäuren mit Ethanol	29
2.6 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten	29
2.6.1 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	29
2.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
2.6.3 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren	30
2.6.4 Ligation von DNA	30

2.7 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	30
2.7.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	30
2.7.2 Transformation in kompetente Zellen von <i>E. coli</i>	31
2.8 Anwendungen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.8.1 Amplifizierung von DNA mittels PCR	32
2.8.2 Touchdown-PCR (TD-PCR)	33
2.8.3 Inverse PCR (IPCR)	34
2.9 Herstellung einer cDNA-Bibliothek	35
2.9.1 cDNA-Synthese	35
2.9.2 Ligation und Transformation der cDNA in kompetente <i>E. coli</i> Zellen	35
2.9.3 Anfertigung von Master- und Replikplatten	35
2.9.4 Koloniehybridisierung	36
2.10 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylon⁺-Membran und Hybridisierungsverfahren	37
2.10.1 Herstellung von Northern- und Southern- Blot	37
2.10.2 Hybridisierungsverfahren	38
2.11 Radioaktive Markierung von DNA	40
2.11.1 Markierung von dsDNA	40
2.11.2 Markierung synthetischer Oligonukleotide	40
2.12 Sequenzierung von DNA	41
2.13 Bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter Proteine	42
2.13.1 Herstellung des Expressionsplasmids	42
2.13.2 Expression der Fusionsproteine	43
2.13.3 Reinigung der rekombinanten His-Tag Proteine	44
2.13.4 Reinigung rekombinanter GST-Tag Proteine	44
2.14 Transkription und Translation <i>in vitro</i>	45
2.15 Aufarbeitung des Myzels	46
2.15.1 Bildung von Protoplasten	46
2.15.2 Aufschluß durch mechanische Behandlung	47
2.15.3 Subfraktionierung des Gesamtzellextraktes	47
2.15.4 Gleichgewichtsdichte-Zentrifugation	48
2.15.5 Lipidkörper-Präparation aus <i>P. megasperma</i>	48
2.15.6 Behandlung von Membran-Fractionen mit Magnesiumchlorid	49
2.15.7 Proteolyse von Proteinen in Membran-Fractionen	49
2.15.8 Bindungs-Untersuchungen von Jcp mit Hsp70-Isoformen und Hsp90	50
2.16 Enzymtests	51
2.16.1 ATPase EC 3.6.1.35	51
2.16.2 Fumarase EC	52
2.16.3 NADPH-Cytochrom c-Oxidoreduktase EC 1.6.2.3	52
2.16.4 Saure Phosphatase E.C. 3.1.3.2	53
2.17 Proteinbestimmungen	53
2.17.1 Proteinbestimmung nach Bradford	53
2.17.2 Proteinbestimmung nach Lowry	54
2.17.3 Dichtebestimmung der Saccharoselösungen	55
2.18 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.18.1 Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.18.2 Fluorographie	57
2.18.3 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western-Blot)	57

2.19 Immundetektion von Proteinen	58
2.19.1 Immunanfärbung mit Alkalischer Phosphatase	59
2.19.2 Immunanfärbung mit Meerrettich-Peroxidase	59
2.20 Mikroskopische Methoden	60
2.20.1 Präparation von <i>P. megasperma</i> für die Hellfeld- bzw. Fluoreszenzmikroskopie	60
2.20.2 Präparation von <i>P. megasperma</i> für die <i>in situ</i> -Lokalisierung von Proteinen	61
2.20.3 Immunohistochemie und Immunoelektronenmikroskopie	62
3. Ergebnisse	63
3.1 Klonierung und Charakterisierung von <i>PmJcp</i> und möglichen Partnern	64
3.1.1 Klonierung von <i>PmJcp</i> aus <i>P. megasperma</i> und bakterielle Expression des rekombinanten Proteins	64
3.1.1.1 Klonierung des C-Terminus von <i>PmJcp</i> in einen Expressionsvektor	64
3.1.1.2 Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins	64
3.1.2 Anlegen einer cDNA-Bibliothek und Screening nach <i>DnaJ</i> und <i>Hsp90</i>-Homologen cDNAs	67
3.1.2.1 Screening nach <i>PmJcp</i>	67
3.1.2.2 Screening und Klonierung von <i>PmDnaJ</i>	69
3.1.2.3 Sequenz von <i>PmDnaJ</i>	70
3.1.2.4 Screening und Klonierung von <i>PmHsp90</i>	71
3.1.3 Bakterielle Expression der rekombinanten <i>DnaJ</i>- und <i>Hsp90</i>-Homologen aus <i>P. megasperma</i>	74
3.1.3.1 Klonierung der <i>PmDnaJ</i> -cDNA in Expressionsvektoren	74
3.1.3.2 Expression und Reinigung des rekombinanten <i>DnaJ</i> -Homologen aus <i>P. megasperma</i>	75
3.1.3.3 Klonierung der <i>PmHsp90</i> cDNA in einen Expressionsvektor	76
3.1.4 Expression und Klonierung von <i>PmJcp</i>	78
3.1.4.1 Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA aus <i>P. megasperma</i> mit einer <i>PmJcp</i> -Sonde	78
3.1.4.2 Inverse-PCR mit genspezifischen Primern für <i>PmJcp</i>	78
3.1.4.3 Klonierung des codierenden Bereichs von <i>PmJcp</i> unter Kontrolle des SP6-Promotors und Analyse der apparenten Größe	81
3.1.5 Klonierung und Reinigung dreier cytosolischer Isoformen von <i>Hsp70</i> als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase	84
3.1.5.1 Klonierung der cDNA der <i>Hsp70</i> -Isoformen in Expressionsvektoren	84
3.2 Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von <i>PmJcp</i>	86
3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation des <i>PmJcp</i> in <i>P. megasperma</i>	86
3.2.1.1 <i>PmJcp</i> ist Bestandteil eines Protein-Komplexes an der Plasmamembran	87
3.2.1.2 Subfraktionierung peripherer und integraler Plasmamembranproteine nach einer MgCl ₂ -Behandlung	93
3.2.1.3 Verdau der Proteine an der Plasmamembran mit Proteinase K	94
3.2.1.4 <i>PmJcp</i> flotiert mit Membranstrukturen	95
3.2.2. <i>In situ</i> Lokalisierung von <i>Jcp</i> in Hyphen von <i>P. megasperma</i>	97
3.2.2.1 Doppelanfärbung von <i>Jcp</i> und Aktin in Hyphen von <i>P. megasperma</i>	99
3.2.2.2 Untersuchung der Lokalisation von <i>PmJcp</i> in Ultradünnschnitten mit Transmissions-elektronenmikroskopie	102
3.2.2.3 Analyse der durch Hochsalz-Puffer ablösbaren Zellwandproteine	103

3.3 Untersuchung der Wechselwirkungen von Jcp mit drei Isoformen von Hsp70 und Hsp90	105
3.3.1.1 Nachweis der Wechselwirkung von His ₆ -markierten Jcp mit drei Isoformen von Hsp70: Bindung der binären Komplexe an Ni ²⁺ -NTA-Sepharose	106
3.3.1.2 Nachweis der Wechselwirkung von His ₆ -markierten Jcp und GST-Hsp70-Fusionsproteinen: Immobilisierung der binären Komplexe an GSH-Agarose	108
3.3.1.3 Nachweis der Wechselwirkung von His ₆ -markierten Jcp mit <i>PmHsp90</i>	110
3.4 Einfluß von äußeren Faktoren auf <i>PmJcp</i>	111
3.4.1 Einfluß von Hitzeschock auf die Expression von <i>PmJcp</i>	111
3.4.2 Einfluß von phenolischen Phytoalexinen auf <i>PmJcp</i>	112
3.4.3 Einfluß des Aktin-Cytoskeletts auf die Lokalisation von <i>PmJcp</i>	115
4. Diskussion	118
4.1 Lokalisation von <i>PmJcp</i>	118
4.2 Veränderung der Lokalisation und Expression von <i>PmJcp</i> nach Behandlung mit phenolischen Phytoalexinen	122
4.3 Struktur und mögliche Funktion von <i>PmJcp</i>	125
5. Zusammenfassung	134
6. Literaturverzeichnis	136

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute
d	Tage
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiammintetraacetat- Na_2
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Peroxidase aus Meerrettich
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
MCS	Multiple Cloning Site
MES	2-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
min	Minuten
ml	Mililiter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Ni^{2+} -NTA	Ni^{2+} -Nitriloessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylchlorid
poly(A) ⁺ RNA	Ribonukleinsäure
RNA	RNA mit Poly (A)-Schwanz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rt	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-inoyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Das Modell der molekularen Chaperone als Faltungshelfer

Proteine liegen nach ihrer Synthese am Ribosom und der Freisetzung vom Ribosom zum Teil ungefaltet oder als "molten globule" mit Sekundärstrukturen vor. (Anfinsen 1973) etablierte nach den Arbeiten zur Renaturierung von denaturierter Ribonuclease *in vitro* die Hypothese, daß alle Informationen, die zum Erhalt der dreidimensionalen Struktur führen, einzig in der Aminosäuresequenz enthalten sind. Die Faltung eines neusynthetisierten Proteins würde spontan erfolgen. Nach der Entdeckung einer Gruppe von Proteinen, die essentiell für die Faltung von Peptiden sind, wurde dieses Modell durch das Konzept der molekularen Chaperone ergänzt (Ellis und van der Vies 1991), (Hartl 1996). Chaperone sind an der Faltung von Proteinen beteiligt. Daneben schützen sie Proteine unter Streßbedingungen, wie z.B. bei Hitzeschock, vor Aggregation, oder sie stabilisieren Polypeptidketten im ungefalteten Zustand, um deren Transport in Zellkompartimente zu ermöglichen (Brodsky und Shekman 1994), (Schatz and Dobberstein 1996), (Rapoport et al. 1996), (Mayer und Bukau 1998). Während dieser Prozesse kann es dazu kommen, daß Proteine die noch keine endgültige dreidimensionale Struktur haben, ihre hydrophoben AS-Reste, die eigentlich im Inneren des Proteins verborgen sind, dem Lösungsmittel Wasser gegenüber exponieren. Diese Exposition kann sowohl intramolekular als auch intermolekular Wechselwirkungen erzwingen, die in einer fehlerhaften Faltung oder der Aggregation des Proteins resultieren (Dobson und Ellis 1998). Chaperone assistieren der Proteinfaltung nicht nur bei der Neusynthese naszierender Polypeptidketten sondern auch bei der Erkennung denaturierter Proteine. Sie bilden eine Art Prüfsystem für Proteinkonformationen, indem sie die mißgefalteten bzw. zu faltenden Proteine identifizieren und falten, bzw. der Proteolyse zugänglich machen.

Man unterscheidet prinzipiell zwei Chaperon-Familien. Proteine der Hsp70-Familie und deren regulatorische Begleitproteine (Co-Chaperone) sind an der Stabilisierung neu translatierter Proteine beteiligt. Bei einigen Proteinen, vor allem Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen wird die Faltung durch Hsp90 und assoziierter Proteine unterstützt und das Substratprotein wird von dem Hsp70-System auf das Hsp90-System übergeben. Die Partner des Hsp90 üben direkt eine enzymatische Funktion bei der Faltung aus, wie z.B. als Peptidyl-Prolyl-Isomerasen oder Protein-Phosphatasen.

Zu der zweiten Familie gehören die Chaperonine. Diese Gruppe repräsentiert große, oligomere Proteinkomplexe aus zwei übereinandergestapelten Ringen. Im eukaryotischen Cytosol wird dieser Komplex als TRiC bezeichnet (T-Ring containing complex). Die heterooligomeren Ringe bestehen aus 8 Untereinheiten, die jeweils eine Größe von ca. 55 kDa haben. Bei *E. coli* bzw. Prokaryoten und in Mitochondrien setzt sich der Chaperonin-Komplex aus GroEL in Kooperation mit GroES bzw. Hsp60 und Hsp10 zusammen. Beide Systeme übernehmen unterschiedliche Aufgaben bei der Proteinfaltung, sowohl unter normalen wie auch unter Stressbedingungen. Gemeinsam ist beiden, daß sie auf einem ATP-abhängigen Mechanismus basieren. Für GroEL wurde der Faltungsmechanismus bereits gut untersucht. Unter normalen Wachstumsbedingungen erfolgt eine Wechselwirkung mit ca 10-15 % aller neusynthetisierten Proteine. Nach einem Hitzeschock kann diese Zahl auf 30 % ansteigen. Die Ausschlußgröße von Proteinen, die von GroEL und vermutlich auch von TRiC gefaltet werden können liegt bei ca. 55 kDa. In *E. coli* sind ungefähr 1/7 aller Proteine größer als 55 kDa, in Hefe sind es bereits 1/3. Es ist jedoch bekannt, daß Aktin und Tubulin Substrate des TRiC *in vivo* sind (Kubota et al. 1995), (Lewis et al. 1996). In Abbildung 1.1 ist ein Modell dargestellt, das die Faltung eukaryotischer Proteine im Cytosol unter Beteiligung beider Systeme darstellt, des Hsp70-Systems und des Chaperonin-Systems (Netzer und Hartl 1998). Das Chaperonin TRiC unterstützt die Faltung von Proteinen, die instabile Domänen enthalten, besonders des Aktins.

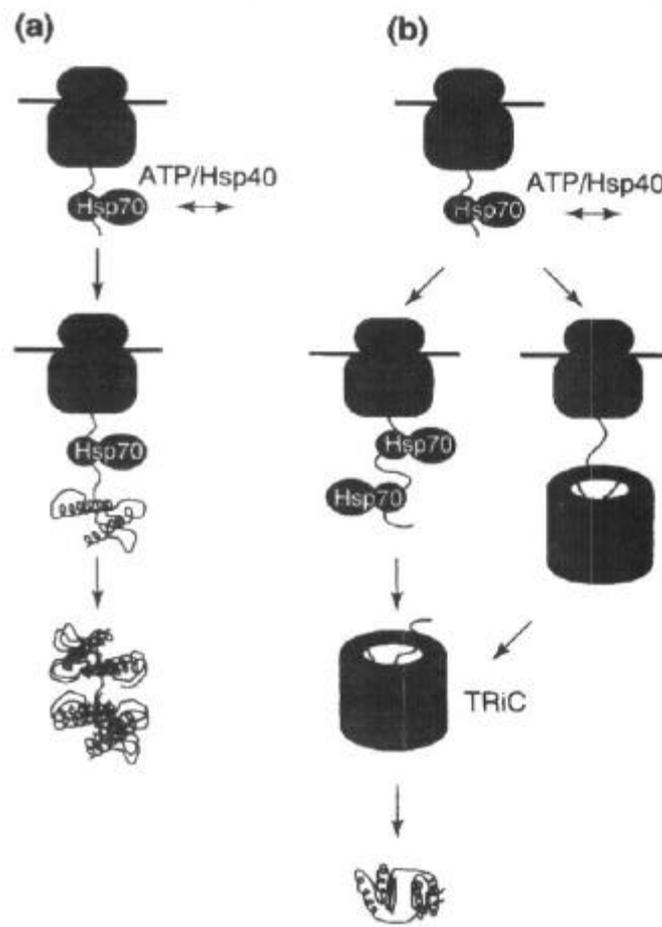


Abb. 1.1: Modell für die Beteiligung von Chaperonen und Chaperoninen bei der Proteinfaltung im eukaryotischen Cytosol (Netzer und Hartl, 1998)

Noch während der Elongation wird die naszierende Polypeptidkette von Hsp70 und Hsp40 gebunden und so vor Aggregation geschützt. Die weitere Faltung des Polypeptids erfolgt Chaperonin unabhängig (a) oder abhängig (b).
 (a) Die Faltung eines modular aufgebauten Polypeptids, bei dem sich einzelne Bereiche sequentiell falten und eine native Tertiärstruktur einnehmen erfolgt co-translational und Chaperonin unabhängig.
 (b) Die Faltung von Proteinen, die eine Domäne bzw. voneinander unabhängige Domänen enthalten, erfolgt auf einem Chaperonin abhängigen Weg. Basierend auf *in vitro* Untersuchungen kann die naszierende Polypeptidkette direkt in den Käfig des TRiC gelangen, wenn es eine Länge von mehr als 150 AS erreicht hat.

1.2 Funktion des Hsp70/DnaJ-Systems

Unter dem Terminus Hsp70 wird eine Familie hochkonservierter Proteine zusammengefasst, die eine molekulare Masse von 70-75 kDa und eine ATPase-Aktivität besitzen (Rassow et al. 1994). Die Mitglieder der Hsp70 sind im Cytosol von Prokaryoten (DnaK in *E. coli*) und Eukaryoten, sowie in den meisten eukaryotischen Zellkompartimenten vorhanden. Eukaryotische Zellen besitzen sehr oft neben einer hitzeinduzierbaren auch eine konstitutiv exprimierte Form von Hsp70 (Hsc70). Die Struktur von Hsp70 lässt sich in funktionelle Bereiche unterteilen. Die 45

kDa große N-terminale ATPase-Domäne ist hochkonserviert und strukturell gut untersucht. Es folgt ein ca. 15-18 kDa großes konserviertes Segment mit der hydrophoben Substratpeptid-Bindungsstelle und der nur wenig konservierte 10 kDa große C-terminale Bereich, der vermutlich für eine Wechselwirkung mit dem Co-Chaperon DnaJ verantwortlich ist (Cyr und Douglas 1994), (Wang et al. 1993). Die cytosolischen Formen von Hsp70 besitzen am extremen C-Terminus ein hochkonserviertes EEVD-Motiv, das einen Einfluß auf die ATPase-Aktivität und auf die Interaktion mit Substratpeptiden hat (Freeman et al. 1996). Der C-Terminus ist auch in der Wechselwirkung mit anderen Co-Chaperonen involviert (Wang et al. 1993), (Cyr et al. 1994), (Scheufler et al. 2000). Obwohl die Hsp70 hochkonserviert sind, besitzen einige unterschiedliche Substratspezifitäten (Gragerov und Gottesman 1994) und sind funktionell nicht austauschbar (Brodsky und Shekman 1994), (Craig et al. 1994). Hsp70 bindet kurze hydrophobe Bereiche (ca. 5 AS) ungefalteter Polypeptide in einem ATP-Hydrolyse abhängigen Reaktionszyklus und kann sie so vor Aggregation schützen (Hartl 1996), (Zhu et al. 1996), (Rüdiger et al. 1997). An der Regulation dieses Zyklus sind weitere Proteine (Co-Chaperone), vor allem die Mitglieder der Hsp40-Familie beteiligt (Cyr und Douglas 1994). In *E. coli* wird die ATPase Aktivität von DnaK durch DnaJ reguliert. Die eukaryotischen Mitglieder der Hsp40 Familie werden auch als DnaJ-Homologe bezeichnet (Kelley 1998), (Kelley 1999). Der Ablauf des ATP-Hydrolyse abhängigen Reaktionszyklus des bakteriellen DnaK, DnaJ, dem Nukleotidaustauschfaktor GrpE und dem ungefalteten bzw. nur teilweise gefalteten Substratpeptid ist gut untersucht worden (Hartl 1996), (Laufen et al. 1999). In Abbildung 1.2 ist der Reaktionsablauf in einem Modell beschrieben. DnaK hat im ATP gebundenen Zustand eine geringe Affinität zum ungefalteten Substratpeptid. Durch DnaJ wird die ATPase-Aktivität gesteigert und es kommt zur Hydrolyse von ATP zu ADP, anschließend bildet sich ein stabiler ternärer Komplex aus dem Substratpeptid, DnaK und DnaJ. Durch die Hydrolyse des ATP erfolgt eine Konformationsänderung der ATPase-Domäne und der Peptidbindungs-Domäne, die es ermöglicht, daß ein Substratpeptid den hydrophoben Bereich der Substratbindestelle von DnaK binden kann. DnaK kann drei verschiedene Konformationen einnehmen; eine Nukleotid freie Form, bzw. eine mit ADP- oder eine mit ATP besetzte Form (Fung et al. 1996). In dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung bewirkt der Nukeotidaustauschfaktor GrpE durch die Wechselwirkung mit der ATPase-Domäne von DnaK die Dissoziation des ADP. Nach der erneuten Bindung von ATP an die Nukleotidbindungsstelle des DnaK zerfällt der ternäre Komplex und es kommt zur Freisetzung des Substratpeptids. Das Substratpeptid hat damit eine Konformation erreicht, die es ihm eralubt sich spontan zur nativen Struktur zu falten oder einen weiteren Zyklus unter Beteiligung der drei Chaperone zu

durchlaufen. Einige Substrate benötigen zusätzlich die Wechselwirkung mit dem Chaperonin GroEL/GroES um einen gefalteten Zustand zu erreichen (Frydman und Hartl 1996).

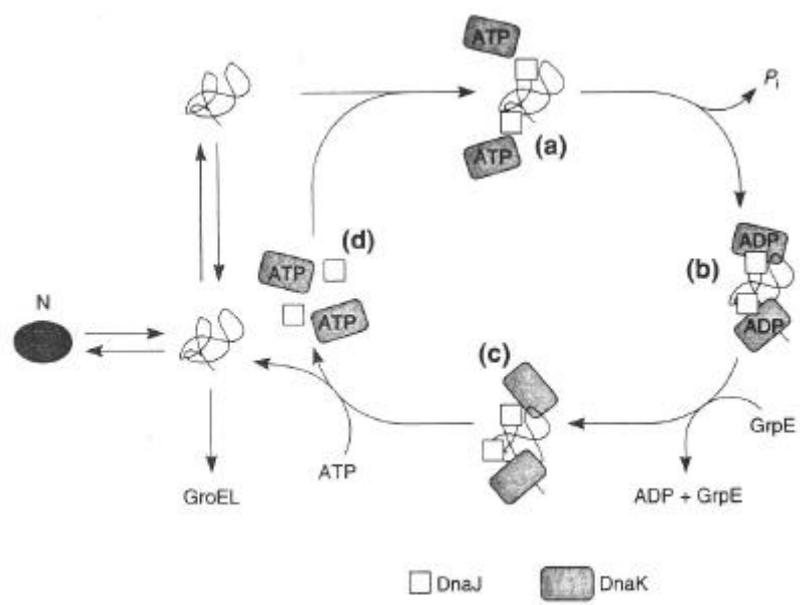


Abb. 1.2 Modell des Reaktionszyklus mit DnaK, DnaJ und GrpE bei der Proteinfaltung in Bakterien

(a) Das ungefaltete Substratpeptid bindet an DnaJ. DnaK interagiert in der ATP gebundenen Form mit DnaJ, wodurch es zur Hydrolyse des ATP zu ADP kommt.

(b) Es bildet sich ein stabiler ternärer Komplex aus dem Substratpeptid, DnaJ und DnaK-ADP.

(c) Der Nukleotidaustauschfaktor GrpE bewirkt im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Dissoziation des ADP.

(d) Die erneute Bindung von ATP an DnaK hat den Zerfall des ternären Komplexes zur Folge. Das Substratpeptid kann sich spontan zum nativen Zustand falten. Es kann in einem weiteren Durchlauf des Zyklus vor Aggregation geschützt werden oder zur weiteren Faltung an das Chaperonin GroEL/GroES übergeben werden (Hartl et al. 1994).

Ein zu dem bakteriellen Nukleotidaustauschfaktor GrpE homologes Protein konnte in Eukaryoten nur in Mitochondrien (Mge1p) und Chloroplasten gefunden werden (Schlicher und Soll 1997), (Padidam et al. 1999). Für das cytosolische Kompartiment konnten insgesamt fünf verschiedene Proteine bzw. Proteinklassen identifiziert werden, die an der Regulation des Hsp70-ATPase-Zyklus beim Menschen beteiligt sind (Gebauer et al. 1998), (Ballinger et al. 1999). Dazu gehören Vertreter der BAG-Familie, die durch Bindung an die ATPase-Domäne von Hsp70 dessen ATPase-Aktivität inhibieren (Takayama, 1997). CHIP (C-terminus of Hsc70 interacting protein) inhibiert die ATPase-Aktivität von Hsc70 durch Bindung an dessen C-Terminus (Ballinger et al. 1999); das Hsc70-interacting protein, Hip, übt eine ähnliche Funktion aus (Höhfeld et al. 1995). Hip bindet an den C-Terminus von Hsc70 und stabilisiert den ADP gebundenen Zustand von

Hsc70 in einem ternären Komplex mit dem Substratprotein als weiterer Komponente. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung von Steroidhomonrezeptoren und einigen Transkriptionsfaktoren durch Hsp70/Hsp90-Komplexe (Prapapanich et al. 1996). An diesen Komplexen ist auch das **Hsp70/Hsp90 organizing protein** Hop beteiligt. Es hat eine Art Adapterfunktion, da es die Bindungsstellen für Hsc70 und Hsp90 auf einer Polypeptidkette enthält (Smith et al. 1993), (Schumacher et al. 1994).

Proteine der Hsp40-Familie steigern nicht nur die ATPase-Aktivität von Hsp70, sie können darüberhinaus aufgrund ihrer Struktur und Lokalisation einem einzigen Hsp70 mehrere Funktionen zuweisen (Rassow et al. 1994), (Kelley 1998), (Kelley 1999). Das charakteristische Merkmal aller zum DnaJ homologen Proteine ist die ca. 70 AS umfassende J-Domäne. Die Aufklärung der Struktur dieser Domäne mit NMR-Spektroskopie zeigte, daß die J-Domäne aus vier α -Helices besteht. Die amphipathischen Helices I, II und III bilden eine kompakte Helix-turn-Helix Struktur aus, in der das hochkonservierte Tripeptid HPD zwischen Helix II und III im Bereich der Schleife exponiert wird. Die Struktur wird durch hydrophobe Seitenreste in der Innenfläche der Helices I, II und III stabilisiert. Durch eine Mutation in den Helices ist das DnaJ oft nur noch eingeschränkt funktionsfähig, während bei Mutationen des Tripeptids HPD die Wechselwirkung mit Hsp70 erst gar nicht zustande kommt (Tsai und Douglas 1996), (Greene et al. 1998), (Kelley 1998). Bei einer Vielzahl der Vertreter der Hsp40-Familie folgt auf die J-Domäne eine ca. 35 AS umfassende G/F reiche Region und ein ca. 75 AS enthaltender cysteinreicher Bereich, der aber nicht in allen Hsp40-Proteinen vorkommt. In Analogie zu DNA bindenden Proteinen mit einem Zinkfinger-Motiv, können in DnaJ-Proteinen zwei Zinkatome über je vier Cysteinreste komplexiert werden. Eine Interaktion von DnaJ mit Substratpeptiden kann über diese Motive stattfinden (Szabo et al. 1996). In Abbildung 1.3 sind Beispiele der Hsp40-Familie und solcher Proteine dargestellt, die als charakteristisches Merkmal die J-Domäne enthalten.

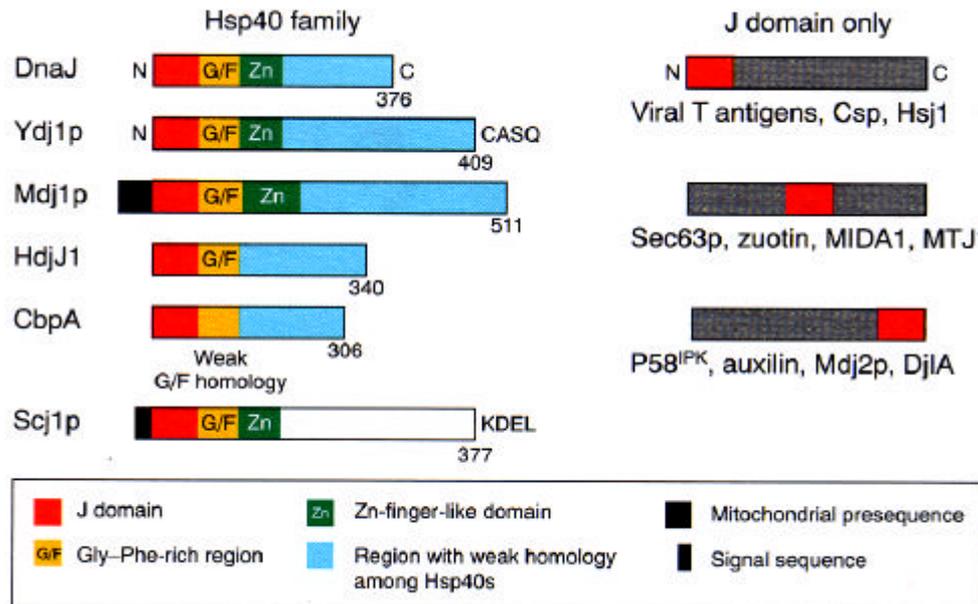


Abb. 1.3 Übersicht über die Primärstrukturen der zum DnaJ homologen Proteine

Auf der linken Seite sind die Mitglieder der Hsp40-Familie abgebildet. Proteine, die nur die J-Domäne als charakteristisches Merkmal haben sind rechts abgebildet (Kelley, 1998).

Als Beispiel für Proteine, die eine J-Domäne enthalten, können Auxilin, das bei der Zerlegung des Clathringerüsts beteiligt ist, und der Inhibitor P58^{IPK} gelten, der die Aktivität der Proteinkinase R aus Mensch (dsPKR) beeinflusst. Die Membranhülle von "coated pits" (mit Clathrin umhüllte Vesikel) wird durch ein Gerüst aus Clathrin und assoziierter Proteine stabilisiert. Anhand von *in vitro* Experimenten mit den gereinigten Komponenten Auxilin und Hsp70 konnte gezeigt werden, daß beide an der Zerlegung des Clathrinmantels beteiligt sind. Auxilin vereint zwei Eigenschaften auf einer Polypeptidkette. Es enthält am extremen C-Terminus eine J-Domäne, die direkt an die Clathrin-Bindestelle angrenzt. Der erste Schritt ist vermutlich die Wechselwirkung zwischen der schweren Kette von Clathrin und Auxilin. Im zweiten Schritt wird Hsp70 über die J-Domäne an den Komplex herangeführt und der Clathrin-Käfig dissoziiert unter ATP-Verbrauch (Holstein et al. 1996), (Jiang et al. 1997), (Barouch et al. 1997).

Das andere Protein, das eine Substratbindungsstelle und eine J-Domäne auf einer Polypeptidkette vereint, ist P58^{IPK} aus Mensch und Rind (Lee und Katze 1994), (Korth et al. 1996). Dieses Protein besitzt am N-Terminus neun TPR-Domänen (tetratricopeptide-repeat) an die sich am C-Terminus eine J-Domäne anschließt. TPR-Motive sind Sequenzabschnitte, mit einer degenerierten Konsensussequenz aus 34 Aminosäuren, die in mehreren Wiederholungen aufeinander abfolgen

können (Goebel und Yanagida 1991). Diese Motive bilden amphipathische α -Helices, die aber auch als Helix-turn-Helix-Motive vorliegen können. Eine direkte Abfolge solcher TPR-Motive kann eine TPR-Domäne formen. Untersuchungen zeigten, daß diese TPR-Domänen in Proteinen eine Bindungsstelle für Interaktionspartner darstellen (Aitken 1996), (Tzivion et al. 1998), (Das et al. 1998), (Scheufler et al. 2000). TPR-Domänen sind in einer Reihe von Proteinen identifiziert worden, die z.B. bei der Zellzykluskontrolle, beim Proteintransport oder bei der Stressantwort unterschiedliche biochemische Funktionen ausüben (Das et al. 1998).

Das cytosolische 58 kDa große Protein ist der Inhibitor der Proteinkinase R. Nach der Aktivierung der PKR durch dsRNA oder Interferone erfolgt eine Phosphorylierung am Ser51 der α -Untereinheit des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF2 α und die Neusynthese von Proteinen kommt zum Erliegen. Im normalen Zustand liegt die PKR als Dimer vor und ist inaktiv. P58^{IPK} wird konstitutiv exprimiert und durch Hdj1p, einem Hsp40-Homologen, wiederum selbst inhibiert. Infolge einer Infektion mit Influenzaviren dissoziiert Hdj1p von P58^{IPK} ab; welcher Mechanismus des Virus diesen Vorgang lenkt ist noch unbekannt. P58^{IPK} kann dann über seine J-Domäne mit Hsp70 interagieren und die PKR wird vermutlich in Folge einer konformationellen Veränderung inhibiert. Obwohl die PKR nach dem Virusbefall aktiv sein sollte um die Neusynthese von Virusproteinen in der Zelle zu unterbinden, kann der Virus diesen Schutzmechanismus der Zelle unter Ausnutzung der zelleigenen Chaperone umgehen.

Bei einigen Proteinen reicht die Wechselwirkung allein mit Hsp70 und Hsp40 nicht aus. Damit Steroidhormonrezeptoren (SHR) oder Proteinkinasen, wie z.B. die cSrc- oder Raf1-Kinase, aktiviert werden können, ist die Wechselwirkung mit Hsp90 und assoziierten Proteinen nötig.

1.3 Funktionen von Hsp90

Hsp90 ist eines der häufigsten cytosolischen Proteine in Eukaryoten. Für *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* war nachgewiesen worden, daß die Homologen des Hsp90 essentiell sind (Borkovich et al. 1989), (Cutforth und Rubin 1994). Die Struktur von Hsp90 läßt sich in eine 25 kDa N-terminale und eine 50 kDa C-terminale Domäne unterteilen, die durch eine flexible Region miteinander verbunden sind. Hsp90 liegt in nativer Form als Homodimer vor, wobei die Dimerisierung über den C-Terminus erfolgt. Sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Domäne können unabhängig voneinander mit Proteinsubstraten interagieren und diese vor

Aggregation schützen. Hsp90 erkennt in Substratproteinen bestimmte Segmente von 9-30 AS-Resten und beeinflusst die Faltung von Proteinen, deren Größe von 33 kDa (MyoD) bis 116 kDa (β -Galaktosidase) reicht (Smith et al. 1995). Keine Einigung konnte bisher über die Frage erzielt werden, ob Hsp90 eine ATPase-Aktivität aufweist. Neue Ergebnisse zeigten, daß Hsp90 ATP bindet. In einer Röntgenstrukturanalyse hatte die N-terminale Domäne für die ATP-Bindungsstelle eine der DNA-Gyrase B vergleichbare Geometrie (Prodromou et al. 1999). Die ATP-Bindungsstelle in Hsp90 befindet sich in einer 15 Å tiefen Tasche. Ein Vergleich von gebundenem ATP mit Hsp70, GroEL und Hsp90 ergab, daß ADP in Hsp70 und GroEL eine ausgedehnte Konformation einnimmt, während es in Hsp90 in einer kompakteren bzw. geknickten Konformation gebunden vorliegt. In einer ähnlichen Weise wird auch Geldanamycin (GA), ein Inhibitor des Hsp90, gebunden. Der N-Terminus von Hsp90 hat im ATP bzw. GA gebundenen Zustand keine Affinität zu Substratproteinen, während Hsp90 ohne ADP das Proteinsubstrat binden kann. Im Verlauf des Reaktionszyklus von Hsp70 und Hsp90 ist es notwendig, daß Hsp90 ATP bindet, damit p23, ein Co-Faktor des Hsp90, binden und Hsp90 seine Funktion als Chaperon entfalten kann (Mayer und Bukau 1998), (Buchner 1999), (Morishima et al. 2000), (Prodromou et al. 1999). In Abbildung 1.4 ist der Reaktionszyklus zur Aktivierung eines Steroidhormonrezeptors unter Beteiligung von Hsp70 und Hsp90 gezeigt (Buchner 1999).

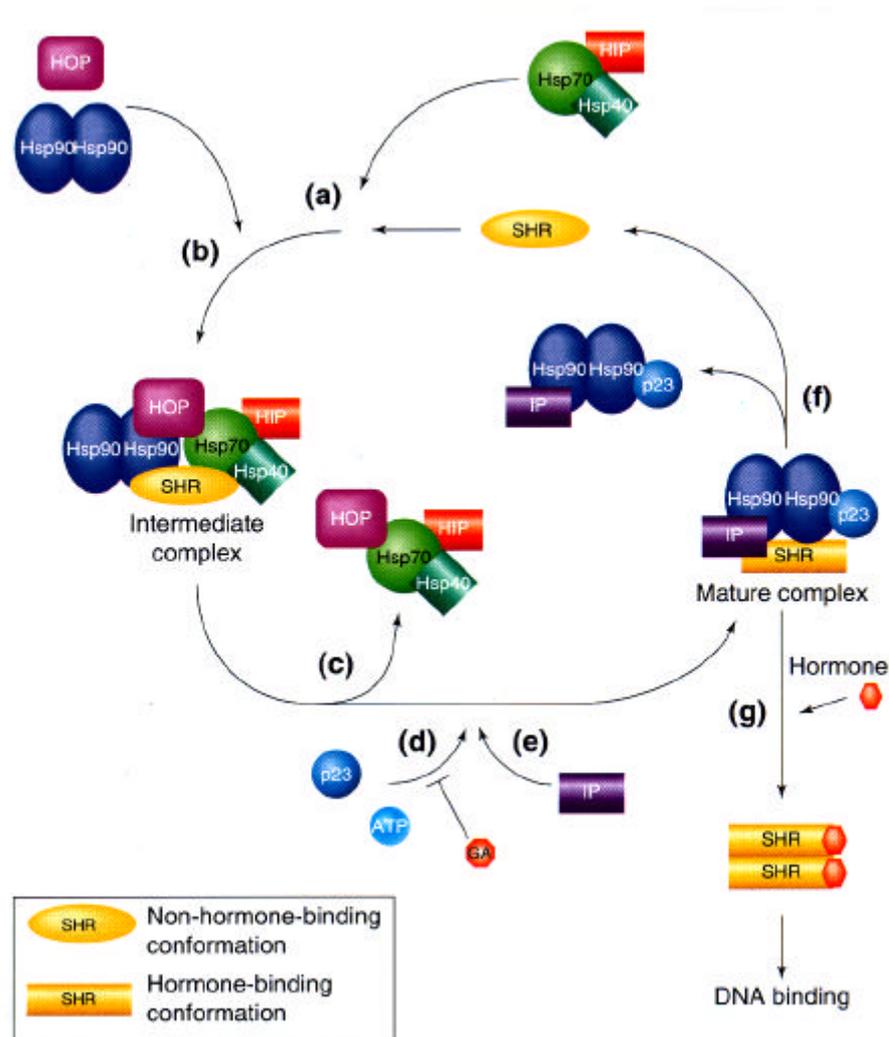


Abb. 1.4: Die Beteiligung von Hsp90 an der Aktivierung eines Steroidhormonrezeptors

Der Steroidrezeptor gelangt im Verlauf der Aktivierung vom Hsp70-Chaperon-System zum Hsp90-Chaperon-System.

(a) Im ersten Schritt erfolgt die Bindung des Rezeptors an Hsp40 und Hsp70. Nach mehreren Reaktionszyklen, die zur Öffnung der Steroidhormon-Bindestelle führen sollen, wird der Komplex durch Hip stabilisiert.

(b) Durch das Adapterprotein Hop werden Hsp70 und Hsp90 in einem Proteinkomplex zusammengeführt.

(c-e) Die Co-Faktoren von Hsp70 dissoziieren von dem Komplex ab. Zum gleichen Zeitpunkt bindet p23 in Anwesenheit von ATP und einem Immunophilin (Cyclophilin oder FK506 bindende Proteine mit Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität, IP) an Hsp90. Geldanamycin (GA) würde die Bindung von p23 an Hsp90 und die weitere Reifung des Steroidrezeptors blockieren.

(f) Der Steroidhormonrezeptor ist nun in der reifen Form und damit in der Lage ein entsprechendes Steroidhormon zu binden.

(g) Nachdem der Rezeptor das Hormon gebunden hat, kann er dimerisieren, in den Kern gelangen und an die DNA binden (Buchner 1999).

Welche Konformationsänderungen in dem Rezeptor erfolgen ist bisher noch unklar. Möglicherweise wird durch die Wechselwirkung mit Hsp70 und Hsp90 die Hormonbindungstasche geöffnet (Bukau et al. 1996), (Morishima et al. 2000).

1.3 *Phytophthora*, ein pflanzenpathogener Oomycet

Phytophthora gehört zu der Klasse der Oomyceten und ist ein Pflanzenpathogen mit einem breiten Wirtsspektrum. Dieser pilzähnliche Protist grenzt sich von den echten Pilzen ab und hat im Gegensatz zu diesen einen überwiegend diploiden Lebenszyklus (Abb. 1.5).

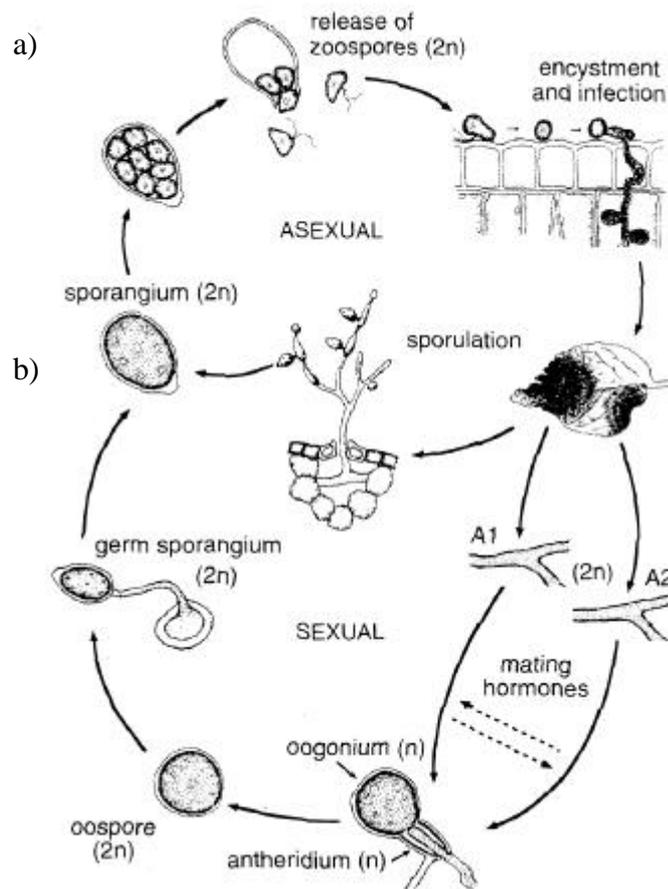


Abb. 1.5. Darstellung des Lebenszyklus von *Phytophthora* am Beispiel von *P. infestans*

(a) Die asexuelle Vermehrung verläuft vegetativ über Zoosporen.

(b) Bei der sexuellen Vermehrung kommt es zur Verschmelzung von Antheridien und Oogonien entsprechender Paarungstypen. Nach der Ausbildung von Oosporen und der Freisetzung von Zoosporen wächst ein neues Myzel heran (Judelson 1997).

In Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen kann die Vermehrung vegetativ über Zoosporen oder sexuell über die Verschmelzung von Antheridien (männliche Geschlechtsorgane) und Oogonien (weibliche Geschlechtsorgane) über die Ausbildung von Oosporen erfolgen. Aus den Zoosporen wächst ein querwandloses Myzel heran, das aus multinukleären Hyphen besteht. Während der Entwicklung des Myzels und der Zoosporen unterliegt das Cytoplasma einem

drastischen strukturellen Wechsel. Die im Wachstum befindlichen Hyphenspitzen und reifende Sporen enthalten das sogenannte funktionelle Cytoplasma, in dem sich die typischen eukaryotischen Zellkompartimente wie Kerne, Mitochondrien, Dictyosomen, rauhes Endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen und ein Sortiment an sekretorischen Vesikeln befinden. In den älteren Bereichen des Myzels, den Sporen und in den voll entwickelten Chlamydosporen und Oosporen erfolgt ein Wechsel zu einem Reservecytoplasma, das durch Lipidkörper und Vakuolen dominiert wird. Die Kerne befinden sich in kleinen Bereichen des Cytoplasma zwischen diesen Lipidreserven. (Hemmes 1983).

Im Gegensatz zu den echten Pilzen enthalten die Zellwände von *Phytophthora* kein Chitin, sondern Cellulose und β -Glucan (Bartnicki-Garcia und Wang 1983). *Phytophthora*-Spezies synthetisieren keine Sterole, benötigen aber eine exogene Quelle von β -Hydroxy-Sterolen für die Sporulation (Elliot 1983). Sie sind im Gegensatz zu anderen Pilzen, die Sterole synthetisieren, resistent gegenüber Polyen-Antibiotika. Die bekanntesten Vertreter dieser Spezies sind *P. infestans* (Erreger der Fäule von Kartoffelknollen und Tomaten) und *P. sojae* (Erreger der Wurzelfäule bei Soja). Da diese Phytopathogene zu hohen Ernteausfällen führen können, hat deren Erforschung und Bekämpfung auch eine wirtschaftliche Relevanz.

Bei dem Kontakt des Pilzes mit der Pflanze bewirken Elizitoren das Einleiten der Abwehrreaktion der Pflanze gegen das Pathogen. Bei *P. infestans* hat Arachidonsäure eine elizitierende Wirkung und induziert Abwehrreaktionen der Pflanze (Bostock et al. 1981). Auch Proteine können eine Wirkung als Elizitoren haben. Vertreter der Klasse der Elicitine aus *Phytophthora* induzieren die Bildung und Akkumulation von Phytoalexinen in der Pflanze, die der Pflanze zur Abwehr des Pathogens dienen. Gentechnisch veränderte Pflanzen, die Phytoalexine wie Resveratrol (Preisig-Müller et al. 1994) produzieren, sind weitgehend resistent gegen Infektionen mit *P. infestans*.

Welche Auswirkungen diese von der Pflanze erzeugten Substanzen auf die Entwicklung von *P. megasperma* haben, sollte auf der Ebene der Chaperone untersucht werden. Dabei wurden den Homologen des DnaJ und deren Interaktion mit anderen Chaperonen besondere Bedeutung eingeräumt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Alle Geräte und hitzebeständigen Lösungen für molekularbiologische Arbeiten und zur Herstellung von Medien wurden im Autoklaven durch Dampfsterilisation bei 120 °C und 1 bar Überdruck für 30 min sterilisiert. Hitzesensitive Lösungen wurden sterilfiltriert. Für Arbeiten mit RNA wurde destilliertes Wasser verwendet, welches zuvor 1 h mit 1/1000 Volumen DEPC gerührt wurde. Sämtliche Zentrifugationen und Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Die jeweilige Angabe der g-Zahl der Zentrifugation bezieht sich auf die Radialbeschleunigung in der Bechermitte.

2.1.1 Chemikalien

Adenosin-5'-triphosphat, Natriumsalz	Roche Diagnostics, Mannheim
Adenosin-5'-diphosphat, Natriumsalz	Roche Diagnostics, Mannheim
Agar Typ E	Applichem, Deisenhofen
Agarose Typ I	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin, Natriumsalz	Duchefa, Holland
Amplify™	Amersham, Braunschweig
Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cytochrom c (oxidiert)	Sigma, Deisenhofen
DNA-Längenstandard VII und X	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL™-Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPTG	Duchefa, Holland
Kanamycin, Sulfat-Salz	Duchefa, Holland
Limabean-Agar	Difco, Detroit
NADPH, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen

NBT/BCIP	Promega, Mannheim
Nonidet P-40	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
PCR-Klonierungs-Sets:	
“Zero Blunt TOPO PCR Cloning [®] Kit”	Invitrogen, Leek, Niederlande
“Topo TA PCR Cloning [®] Kit”	Invitrogen, Leek, Niederlande
“PCR-Script [™] Cloning Kit”	Stratagene, Heidelberg
PD10-Säule (Sephadex G25)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenol, TE gesättigt	Roth, Karlsruhe
Protein-A-Sepharose CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-Marker 10 kDa-Leiter	Lifetechnologies, Eggenstein
Rinderserumalbumin BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
RNA-Längenstandard 2 und 3	Roche Diagnostics, Mannheim
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen

Alle Chemikalien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen:

Amersham Pharmacia Biotech, Biomol, Fluka, Merck, Riedel de Häen, Roche Diagnostics, Roth, Serva und Sigma

2.1.2 Antikörper

Konjugat aus Immunoglobulin (Schwein) gegen Kaninchen IgG und Alkalischer Phosphatase	Biorad, München
Konjugat aus Immunoglobulin (Schwein) gegen Kaninchen IgG und Peroxidase (Meerrettich)	Dako, Hamburg
Konjugat aus Immunoglobulin (Schwein) gegen Maus IgG und Peroxidase (Meerrettich)	Dako, Hamburg

Konjugat aus Immunglobulin (Ziege) gegen Kaninchen IgG und Fluoreszenzfarbstoff Cy3	Dianova, Hamburg
Konjugat aus Immunglobulin (Ziege) gegen Maus IgG und Fluoreszenzfarbstoff Cy3	Dianova, Hamburg
Konjugat aus Immunglobulin (Ziege) gegen Maus IgG und Fluoreszenzfarbstoff FITC	Dianova, Hamburg

2.1.3 Enzyme

Driselase	Fluka, Deisenhofen
Lytische Enzyme	Sigma, Deisenhofen
Onozuka R-10 Cellulase	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim

Sonstige Enzyme (Restriktionsendonukleasen, DNA-Polymerasen, etc.) wurden von den folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia Biotech, Life Technologies, MBI Fermentas, New England Biolabs und Qiagen

2.1.4 Fertigsets

ABI PRISM™ DNA-Sequencing-Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
“QIAprep 8 min iprep Kit”	Qiagen, Hilden
“QIAprep Spin min iprep Kit”	Qiagen, Hilden
“QIAGEN Plasmid Midi Kit”	Qiagen, Hilden
“QIAquick PCR Purification Kit”	Qiagen, Hilden
“QIAquick Gel Extraktion Kit”	Qiagen, Hilden
“Random Primer DNA Labeling Kit”	Life Technologies, Eggenstein
“Oligotex dT™ mRNA-Kit”	Qiagen, Hilden
“Superscript™ Plasmid System”	Life Technologies, Eggenstein

2.1.5 Radiochemikalien

γ -[³²P]dATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol)

α -[³²P]dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol)

[³⁵S]-L-Methionin (10 mCi/ml, >1000 Ci/mmol)

Amersham Pharmacia Biotech,
Freiburg

2.1.6 Geräte und Apparaturen

Dichtegradienten-Fraktionierer

Isco, Heidelberg

Elektrophorese-Apparaturen

Keutz, Reiskirchen

Gelvakuumtrockner

Keutz, Reiskirchen

Photometer Uvikon 930

Kontron, Eching

Kühlzentrifuge J-21 B

Beckmann, München

Tischzentrifuge, Biofuge 13

Heraeus, Osterode/Harz

Ultrazentrifuge Spinco L 2-65 B

Beckmann, München

Ultrazentrifuge Centrikon T-2060

Kontron, Eching

Vakuumentischzentrifuge

Bachhofer, Reutlingen

Westernblot-Apparatur

Keutz, Reiskirchen

Szintillationszähler 1900 CA

Canberra Packard, Frankfurt

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Miracloth

Calbiochem, La Jolla, USA

Nitrocellulose Membran BA 85

Schleicher&Schüll, Dassel

0,2 μ m Porengröße

Parafilm

American National Can

Whatman-3MM-Filterpapier

Schleicher&Schüll, Dassel

Tinte, 4001 Königsblau

Pelikan, Hannover

Hyperfilm-ECLTM

Amersham Pharmacia Biotech,
Freiburg

Röntgenfilm X-Omat AR

Entwickler D-19

Fixiersalz Unifix

Kodak, Rochester, USA

(über Siemens, Frankfurt)

2.1.8 Pilz- und Bakterienstämme

Phytophthora megasperma 63697, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Braunschweig

E. coli XL1-Blue (Fa. Stratagene) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^R)*]

E. coli DH5α (Fa. Lifetechnologies) F' Φ80*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1*

E. coli M15[pREP4] (Fa. Qiagen) *Nal^S Str^S rif^S lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺*

E. coli TOP10 (Fa. Invitrogen) F' *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

E. coli TOP10F' (Fa. Invitrogen) F' [*lacI^q Tn10(Tet^R)*] *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

2.1.9 Oligonukleotide und Plasmide

Die nachstehenden Oligonukleotide wurden - wenn nicht anders angegeben - von der Firma Life Technologies synthetisiert. Die Beschreibung erfolgt in 5'→3' Richtung.

M13-Forw./Universal	GTA	AAA	CGA	CGG	CCA	GT			
M13-Reverse	CAG	GAA	ACA	GCT	ATG	AC			
pQE-for.	GAA	TTC	ATT	AAA	GAG	GAG	AAA		
pQE-rev.	CAT	TAC	TGG	ATC	TAT	CAA	CAG	G	
pGEX-5'	GCA	AGC	CAC	GTT	TGG	TG			
pGEX-3'	GCT	GCA	TGT	GTC	AGA	GG			
Scr.DnaJ-1	CTC	AAG	TAC	CAC	CCG	GAC			
Scr.DnaJ-2	CAC	CCG	GAC	AAG	AAC	CCG			
Scr.Hsp90-1	CAC	AAC	GAC	GAC	GAG	CAG	TAC		
Scr.Hsp90-2	AAC	ATG	GAG	CGY	ATY	ATG	AAG		
9.1.1 N-ter. 1a	AAG	TTC	AAG	CTG	GCC	AGC			
9.1.1 C-ter. C1a	CCA	GCG	AGG	AAC	GTC	T			
9.1.1 N-ter. N1b	GCT	GGA	GAT	CAA	GAC	G			
9.1.1 C-ter. C1b	GTC	CAT	GGA	GCT	CGT	G			
9.1.1 N-ter. N2a	GCG	CAC	TTC	TAC	AAG	C			
9.1.1 N-ter. N3(C2a)	AGT	TCA	AGC	TGG	CCA	G			
9.1.1 N-ter. N4(C1a)	CAA	GCT	CGT	GCT	GTT	C			
9.1.1 C-ter. C3a	CGA	TCT	TGG	TGA	AGA	GC			
9.1.1 N-ter. N3b	CTC	AAG	ATC	GAC	GAG	C			
9.1.1 N-t. C3a(a-sense)	TAC	GAC	TCA	CTA	TAG	GG			
9.1.1 N-t. N4(C1a)	CTG	CAG	AAG	GAG	TAC	G			
PmDnaJ PCR(sense) 1	AGC	GAG	CCG	GTA	CCC	AAG	CAG		
PmDnaJ PCR(a-sense)2	CTG	CTT	TCT	AAG	CTT	CCG	TTG	GTCC	
1.9.1 A N-ter. N1a	ACA	AGA	ACC	TGG	AGA	TC			
1.9.1 A C-ter. C1a	TTG	ATT	AGG	CGG	TGG	AT			
1.9.1 N-ter. N2a	GGT	GAA	GAA	GCA	CTC	G			
1.9.1 C-ter. C2a	GAA	CGC	CTT	CTT	CTC	G			
1.9.1 N-ter. N3a	CAT	CAA	GCT	GTA	CGT	GC			
1.9.1 C-ter. C3a	GCT	CAG	CGA	ACA	TCT	C			
1.9.1 N-ter. N5(C2a)	GAC	ACT	GCA	GAA	GCT	C			
1.9.1 N-ter. N6(C1a/C2a)	CAA	GAA	GCG	GTG	GAG	A			
1.9.1 N-ter. N7(C1a)	CGA	GTA	TGG	CTG	GTC	G			
1.9.1 N-t. N4a	GAC	GAC	TAC	ATC	TCG	C			
1.9.1 C-t. C4a	CTT	GTA	GAA	GGA	CGC	G			
1.9.1 N-ter. N5a	GTC	GTC	CAA	GAA	GAC	G			
PmHsp90 PCR(sense) 1	CGC	CCC	GGA	TCC	TGA	GAC	GTT	CG	
PmHsp90 PCR(a-sense) 2	CGC	AAC	GTA	AAG	CTT	CCG	TTG	CAGAC	
pm8.2PCR2(a-sense HindIII)	CGG	AAC	CTG	CAA	GCT	TTT	CTC	TTC	TC
pm8.2PCR2(sense SphI)	CTG	ACG	AGG	CGC	ATG	CGC	ACG	AA	
Sequ.4.8.1/N1a	CTC	CAG	TCA	ACT	CAA	GC			
Sequ.4.8.1/N2a	GTA	CCG	ACA	TGA	CGA	GG			
Sequ.4.8.1/N3a	GTC	GTA	CAA	GAG	GAT	GG			
Sequ.Gen4.8.1/1a	CTG	GTA	CGT	CTT	CAT	GG			
Seq.forw.P4-288	TGC	AGT	GTA	GAT	GAA	GCC			
IPCR1(Jcp)a-sense203-223	GAG	TGC	CAT	CTC	GAG	CGT	GCG		
IPCR2(Jcp)sense296-316	GCC	ATG	CAG	GTG	TGC	TCA	GGC		
GenJcp5' HindIII sense	GTA	AAA	GCT	TAA	TTT	ATT	TAT	GTG	TCG
PCRGenJcp3' NotIa-sense	CAT	GAA	GGA	CGC	GGC	CGC	ACG		
GenKontr5'	GCC	ATG	ACA	ATA	TGG	CTA	CAT	TCG	
GenKontr2 a-sense	GCC	TTT	CTC	TTC	TCT	CTA	GCC	C	

PCR5.2.3 pGEX sense	CGA	CGA	CTG	GAT	CCT	CAG	TGG	G
PCR5.2.3 pGEX a-sense	GAG	GAC	GGC	GAA	TTC	CCG	CCG	
PCR14.1 pGEX sense	AGC	GGA	TCC	CGG	GGC	AGA	GC	
PCR14.1 pGEX a-sense	CCA	CAA	GCG	GCC	GCA	TCC	TCC	
PCR17.1.2 pGEX sense	GTG	TCC	GGA	TCC	TCG	GTC	GGC	
PCR17.1.2 pGEX a-sense	CGT	CTC	CGA	ATT	CTT	AGT	CGA	CC

Plasmide:

pSPORT1	Life Technologies, Eggenstein
pQE-Vektoren	Qiagen, Hilden
pGEX-Vektoren	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pCI	Promega, Mannheim

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturen von *Phytophthora megasperma*

Die Anzucht von *Phytophthora megasperma* als Plattenkultur erfolgte nach Angaben der DSM auf V8-Agar (Campbell's V8-Gemüsesaft) oder auf Limabean-Agar. Für die Anzucht in Flüssigkultur wurde flüssiges V8-Medium verwendet (Nygaard et al. 1989).

Die Stammkultur des Pilzes wurde auf einer Agarplatte (Durchmesser 9,5 cm) unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur gehalten und nach vier Wochen auf frische Platten überimpft. Dazu wurden kleine Würfel aus den Platten herausgeschnitten und auf die neuen Platten gelegt. Um ein Austrocknen der Platten zu verhindern, wurden sie mit Parafilm (American National Can) verschlossen.

V8-Medium:	200 ml V8-Saft 3 g CaCO ₃ mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
V8-Agar:	V8-Medium + 1,5 % (w/v) Agar
Limabean-Agar:	23 g Limabean-Agar

Um Myzel direkt von Agarplatten zu erhalten und Kontaminationen durch anhaftendes Medium zu vermeiden, wurde *Phytophthora megasperma* nach einer Methode von Schmelzer et al. (1996) kultiviert. Dazu wurden Agarplatten mit kommerziell erhältlicher Cellophan-Folie bedeckt. Die Cellophan-Folie wurde 5 min in dest. H₂O gekocht und zwischen Filterpapieren autoklaviert. Nach 2-10 Tagen konnte die Cellophan-Folie zusammen mit dem Myzel von der Agarplatte abgezogen werden. Das Myzel wurde vorsichtig von der Cellophan-Folie entfernt, zweimal mit Wasser gewaschen und durch Miracloth filtriert, wobei ein leichtes Vakuum angelegt wurde.

Die Anzucht von *P. megasperma* in Flüssigkultur erfolgte auf V8-Medium in einem 1,8 l großen Fernbach-Kulturkolben. Die Medien für Flüssigkulturen wurden für 10 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Für eine Flüssigkultur wurden ca. 250 ml des Überstandes verwendet. Zum Überimpfen von Flüssigkulturen wurden aus einer Plattenkultur kleine Würfel herausgeschnitten und in die Flüssigkultur gegeben. Die Anzucht erfolgte unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur für 2 Tage.

Für Experimente, in denen der Einfluß von Hydroxystilbenen auf *P. megasperma* untersucht werden sollte, wurden Resveratrol (3,4',5-Trihydroxystilben) oder Piceatannol (3,3',4',5-Trihydroxystilben) aus einer 100 mM Stammlösung (EtOH) den flüssigen bzw. festen Medien in den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben.

2.2.1.1 Inkubation von *Phytophthora megasperma* mit Radiochemikalien

Die Lokalisierung und Biosynthese von Proteinen sollte mit Hilfe von radioaktiven Markierungen *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden wie unter 2.2.1 beschrieben eine Flüssigkultur mit einem Volumen von 15 ml in einem Erlenmeyerkolben (250 ml) angezogen. Die markierte Aminosäure (Fa. Amersham, Braunschweig) wurde mit 1 ml sterilem Medium gemischt und in das Medium gegeben.

Aminosäure:

[³⁵S]-L-Methionin, 1 mCi / ml

2.2.2 Bakterienkulturen

Die *E. coli*-Medien wurden, wie bei (Sambrook et al. 1989) beschrieben, hergestellt und je nach Versuchsansatz mit Antibiotika und Nachweisreagenzien supplementiert. Zur Kultivierung wurde in der Regel LB-Medium verwendet.

LB-Medium (1 l):	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
LB-Agarplatten:	LB-Medium + 15 g/l Agar

E. coli-Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, aerob bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 225 – 250 rpm gezüchtet.

2.2.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch die Messung der Absorption bei 600 nm (OD_{600}) an einem Uvikon 930 Photometer der Fa. Kontron gemessen.

2.3 Präparation und Gelelektrophorese von RNA

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit autoklavierten Zentrifugenbechern, Pipettenspitzen, Puffern durchgeführt. Glasgeräte wurden bei 180 °C für 4 h erhitzt, und Wasser wurde vor dem Autoklavieren mit DEPC behandelt.

2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA, z. B. als Ausgangsmaterial für cDNA-Synthesen oder Northern-Blot-Analysen, wurde mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion präpariert, die für pflanzliches Material erfolgreich angewendet wurde (Preisig-Müller 1993).

Extraktionspuffer:	50 mM Tricin/NaOH, pH 9,2 100 mM NaCl 10 mM EDTA 5 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
--------------------	--

Phenol/Chloroform:	25 Vol. TE-gesättigtes Phenol
	24 Vol. Chloroform
	1 Vol. Isoamylalkohol
sonstige Lösungen:	3 M Natriumacetat, pH 6,0

Das Myzel (10 g) wurde durch Miracloth abfiltriert und solange mit H₂O gewaschen, bis alle Reste des anhaftenden Mediums entfernt waren. Das Myzel wurde zwischen Miracloth und mehreren Lagen Papierhandtüchern trockengepreßt, anschließend erfolgte die Bestimmung des Trockengewichts. Das Myzel wurde in einem Mörser zusammen mit zwei Löffeln Quarzsand unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver verrieben. Das noch gefrorene Pulver wurde zu 20 ml auf 60 °C vorgewärmtes Extraktionsmedium in einen Glaszentrifugenbecher gegeben. Nach Zugabe von 10 ml Phenol/Chloroform (60 °C) erfolgte die Homogenisation und Extraktion mit einem Ultraturrax für 2 x 30 s auf höchster Stufe. Zur Phasenseparation wurde 15 min bei 2000 x g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgesaugt und in einen neuen Glaszentrifugenbecher überführt. Die Extraktion wurde zwei- bis dreimal wiederholt, bis kein denaturiertes Protein mehr in der Interphase vorhanden war. Es folgte eine 15-minütige, partielle Fällung der Polysaccharide mit 1/10 Volumen Ethanol auf Eis. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C wurde der Überstand in einen JA-14 Zentrifugenbecher überführt. Es folgte eine Ethanol-fällung (Abschnitt 2.5.3). Dazu wurde der Überstand mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 6,0 und 2,5 Volumen Ethanol versetzt, gemischt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Die RNA wurde bei 6000 x g für 15 min bei 4 °C präzipitiert, in 5 bis 10 ml 3 M Natriumacetat, pH 6,0 resuspendiert und 15 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Die erhaltene RNA wurde in 5 ml H₂O resuspendiert, die Lösung in einen JA-14 Zentrifugenbecher überführt und mit 1/10 Volumen Ethanol versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis und einer 15-minütigen Zentrifugation bei 8000 x g und 4 °C wurde der Überstand einer weiteren Ethanol-fällung unterzogen. Die Fällung erfolgte hier mindestens eine Stunde bei -80 °C. Die präzipitierte RNA wurde unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und abschließend mit 80%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 500 µl bis 1 ml H₂O gelöst. Die Analyse der RNA erfolgte durch eine photometrische Bestimmung (2.5.1) und Gelelektrophorese nach 2.3.3. Aus 1 g Myzel resultierten 500 µg bis 1 mg Gesamt-RNA.

2.3.2 Anreicherung von Poly(A)⁺-RNA

Poly(A)⁺-RNA wurde unter Verwendung des "Oligotex-dT mRNA Maxi Kit" der Fa. Qiagen aus 2 mg Gesamt-RNA (2.3.1) angereichert.

Dabei wurde nach dem "Spin Column"-Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Elution der Poly(A)⁺-RNA erfolgte in 50 µl DEPC-behandeltem H₂O. Zur Kontrolle wurde eine Konzentrationsbestimmung (2.5.1) durchgeführt und ein Aliquot gelelektrophoretisch analysiert (2.3.3).

2.3.3 Gelelektrophorese von RNA

RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in 1,3 %igen Agarosegelen mit Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt.

5 x RNA-Laufpuffer:	100 mM MOPS, pH 7,0
	40 mM Natriumacetat
	5 mM EDTA

(MOPS wurde in eine autoklavierte Natriumacetat-Lsg. eingewogen, der pH-Wert eingestellt und EDTA zugefügt)

RNA-Probenpuffer:	50 % (v/v) Glycerin
sterilfiltriert	1 mM EDTA
	0,25 (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylencyanol FF

sonstige Lösungen:	Formaldehyd (37 %ig)
	Formamid (entionisiert)
	1 % (w/v) Ethidiumbromid

0,52 mg Agarose wurden in 25 ml H₂O aufgeschmolzen, mit 7,86 ml 5 x RNA-Laufpuffer sowie 7,14 ml Formaldehyd vermischt und in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in einer Elektrophoreseapparatur mit 1 x Laufpuffer überschichtet.

Probenvorbereitung:	4,5 µl RNA-Lsg. (Bis zu 30 µg)
	2,0 µl 5 x RNA-Laufpuffer

3,5 µl Formaldehyd
10 µl Formamid
1 µl Ethidiumbromid

Die RNA-Proben wurden 10 min auf 65 °C erhitzt und mit 2 µl RNA-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 3-4 V/cm. Als Längenstandard wurde der Molmarker II der Fa. Roche verwendet.

2.4 Präparation und Gelelektrophorese von DNA

2.4.1 Präparation von genomischer DNA aus *P.megasperma*

Die Präparation genomischer DNA wurde nach einer Methode für die Isolierung von Nukleinsäuren aus filamentösen Pilzen durchgeführt (Wendland et al. 1996).

DNA-Extraktions-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
	1 % (w/v) SDS

Zwei Tage alte Myzelien wurden geerntet und gewaschen (2.2.1). Die trocken gepressten Myzelien wurden mit Seesand und unter flüssigem Stickstoff zu einem feinem Pulver zermörstert. Es wurden 500 µl DNA-Extraktions-Puffer zu maximal 200 mg des zermörsterten Myzels gegeben, gevortext und für eine Stunde bei 65 °C inkubiert. Es folgte ein fünfzehnminütige Zentrifugation bei 13000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und zweimal mit dem gleichen Volumen TE-gesättigtem Phenol/Chloroform extrahiert. Zur Entfernung von Phenol-Resten wurde einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) reextrahiert. Die DNA wurde anschließend mit 2,5 Volumen EtOH und 0,3 M NaAcetat präzipitiert, mit 80 % EtOH gewaschen und getrocknet (2.5.3). Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert, RNase A (1 mg/ml) zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Entfernen der RNase A erfolgte durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und einer weiteren Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert, mit 80 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab nach Holmes und Quigley (Boiling-Prep)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* im analytischen Maßstab wurde nach der Methode von Holmes und Quigley (Holmes und Quigley 1981) durchgeführt.

STET-Puffer:	6 % (w/v) Saccharose 50 mM EDTA 5 % (v/v) Triton X-100 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung:	500 µg/ml H ₂ O
RNase A-Lösung:	1 mg/ml RNase A in TE-Puffer
STETL-Lösung	STET-Puffer + 50 µg/ml Lysozym + 10 µg/ml RNase A

Dazu wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur bei 13 000 x g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 200 µl STETL-Puffer suspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei RT inkubiert und 30 s im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen bei 4 °C wurde das Lysat für 15 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 200 µl Isopropanol gefällt und für 20 min bei 4 °C und 13000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl H₂O oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

2.4.3 Präparation von Plasmid-DNA mit Fertigsets (Mini- und Midi-Prep)

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA, die für Sequenzierreaktionen bzw. für Klonierungen eingesetzt werden konnte, wurden verschiedene Fertigsets der Fa. Quiagen verwendet. Bei der

Verwendung des „Plasmid Midi Kit“ konnten, ausgehend von einer 100 ml Übernachtskultur, ca. 100 µg Plasmid-DNA erhalten werden. Für kleinere Mengen Plasmid-DNA wurde das „QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit“ oder das „QIAwell 8 Plus Plasmid Kit“ verwendet. Sämtliche Präparationen wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.4.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Genomische DNA, PCR- oder DNA-Fragmente wurden zur Analyse oder Präparation in Agarosegelen aufgetrennt.

10 x TAE	400 mM Tris/Essigsäure, pH 7,2 200 mM Natriumacetat 1 mM EDTA
Gellösung	0,7-2,0 % (w/v) Agarose in 1 x TAE
10 x Probenpuffer	0,42 % (w/v) Bromphenolblau 0,42 % (w/v) Xylencyanol 25 % (w/v) Ficoll Typ 400
Färbelösung	0,001 % (w/v) Ethidiumbromid

Die Agarose wurde in 1 x TAE zur Homogenität erhitzt, auf ca. 50 °C abgekühlt und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Kamm gezogen und das Agarosegel in einer horizontalen Gelapparatur mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Probenpuffer versetzt, gemischt, kurz abzentrifugiert und in die Taschen pipettiert. Als Größenstandards wurden die Molmarker VII und X der Fa. Roche, Mannheim verwendet. Die Elektrophorese wurde dann für 1-2 h bei einer konstanten Spannung von 10 V pro cm Gellänge durchgeführt. Zum Anfärben der DNA-Fragmente wurde das Gel 5 bis 10 min in Färbelösung inkubiert und anschließend am UV-Transilluminator bei 302 nm analysiert. Nach einer präparativen Agarosegelelektrophorese wurde das Gelstück von Interesse unter energieärmeren UV-Licht von 365 nm mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten.

2.5 Behandlung und Analyse von Nukleinsäuren

Sämtliche Verfahren wurden nach Sambrook *et al.* (Sambrook et al. 1989) durchgeführt.

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren wurden photometrisch in wässriger Lösung bei 260 nm durchgeführt.

1 ml vermessene nukleinsäurehaltige Lösung enthielt bei einer Extinktion von 1:

50 µg Doppelstrang-DNA

40 µg RNA

33 µg Einzelstrang-DNA

Ein Nachweis für die Reinheit der Nukleinsäure war ein Quotient E_{260}/E_{280} von 1,8-2,0.

2.5.2 Extraktion mit Phenol/Chloroform

Phenol/Chloroform	25 Vol. TE-gesättigtes Phenol
	24 Vol. Chloroform
	1 Vol. Isoamylalkohol

Zur Abtrennung der Nukleinsäuren von Proteinen wurde die Lösung mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt, am Vortexer gut gemischt und 5 min zur Phasenseparation bei 10000 x g zentrifugiert.

Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und solange extrahiert, bis kein Protein mehr in der Interphase zu erkennen war. Zur Entfernung des in der wässrigen Phase gelösten Phenols erfolgte eine weitere Extraktion mit dem gleichen Volumen Chloroform. Abschließend wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol aus der wässrigen Phase präzipitiert (2.5.3).

2.5.3 Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol

Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde die Lösung mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 6,0 und 2,5 Vol. Ethanol versetzt, gemischt und mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 10000 x g in einer Tischzentrifuge bei 4 °C wurde das Pellet mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die pelletierte DNA oder RNA wurde ca. 10 min bei 37 °C getrocknet und abschließend in H₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.6 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten

2.6.1 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)

Pro µg gelöster DNA wurden in der Regel 1 bis 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt, wobei die Endkonzentration der Enzymlösung im Reaktionsansatz maximal 10 % (v/v) betrug. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Standardbedingungen waren 37 °C und 1 bis 3 h. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen gemäß den Herstellerangaben. Die Vollständigkeit des Restriktionsverdaus wurde anschließend durch DNA-Agarosegelelektrophorese (2.4.4) überprüft.

2.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des "QIAEX Gel Extraktion Spin KitTM" der Fa. Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 30 µl H₂O eluiert. Ein Aliquot der eluierten DNA wurde anschließend durch eine DNA-Agarosegelelektrophorese (2.4.4) analysiert.

2.6.3 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektoren wurde mit Shrimps Alkalischer Phosphatase der Fa. Amersham nach einem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Im Anschluß wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt (2.5.2).

2.6.4 Ligation von DNA

Die Ligation wurde mit T4-DNA-Ligase der Fa. Amersham nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das molare Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA betrug 3 zu 1 in einem Volumen von 20 µl. Für die Ligation wurden überhängende Enden 2 h bei RT und glatte Enden über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.7 Transformation von *Escherichia coli*

2.7.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen von *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach einem modifiziertem Protokoll nach Hanahan (Hanahan 1983).

TfB I:	90 mM Kaliumacetat/Essigsäure, pH 5,8
	10 mM CaCl ₂
	0,5 mM LiCl
	100 mM RbCl
	50 mM MnCl ₂
	15 % (v/v) Glycerin
	steril filtrieren

TfB II:	10 mM MOPS/NaOH, pH 7,0
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl ₂
	15 % (v/v) Glycerin
	steril filtrieren

400 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur des entsprechenden *E.coli*-Stammes überimpft, im Falle von *E.coli* M15[pREP4] wurde dem Medium zusätzlich 25 µg/ml Kanamycin und bei *E.coli* „XL1-Blue“ 10 µg/ml Tetracyclin hinzugefügt. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD₆₀₀= 0,5-0,6 bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden 10 min bei 1500 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 90 ml eiskaltem TfB I resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 1500 x g und 4 °C, wurden die Bakterien in 12 ml TfB II resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, sofort in Trockeneis/Ethanol eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen erfolgte nach einer Anleitung der Fa. Biorad. Die Anzucht der Bakterien erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bereits oben erwähnt.

Die weitere Behandlung unterschied sich durch das Verwenden anderer Lösungen. Die Zellen wurden bei 4 °C und 1500 x g für 15 min abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit 200 ml sterilem 10 % (v/v) Glycerin und einer weiteren Zentrifugation. Dieser Schritt wurde nochmals mit 100 ml 10 % (v/v) Glycerin wiederholt. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, aliquotiert und im Ethanol/Trockeneis-Gemisch eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

2.7.2 Transformation in kompetente Zellen von *E. coli*

Bei der Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock wurde der Ligationsansatz (10-100 ng) in einem maximalen Volumen von 20 µl zu 120 µl chemisch kompetenten Zellen (DH5α, BL21[pREP4] oder M15[pREP4]) gegeben. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Der Ansatz wurde mit 900 µl eiskaltem LB-Medium vermischt und für 2 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden dann für 1 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt, auf LB-Platten mit entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

Bei der Transformation von *E. coli* durch Elektroporation wurde der zu transformierende Ligationsansatz auf einer Membran (25 nm Porendurchmesser, Fa. Millipore) gegen dest. Wasser dialysiert, um eine geringe Leitfähigkeit zu erhalten. Für die Transformation der Stämme TOP10F' und XL1-Blue wurden Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm benutzt. Ein Aliquot eines Ligationsansatzes (1-4 µl) wurde in die auf Eis vorgekühlten Küvetten gegeben und mit den kompetenten Zellen (100 µl) vermischt. Die Zellen wurden mit einem exponentiell abfallenden Puls elektroporiert (MicroGene PulserApparatus, Fa. BioRad). Bei 2 mm Küvetten wurde eine Spannung von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω angelegt (entspricht Programm Ec2). Nach erfolgtem Spannungsstoß wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium suspendiert und für 45 min bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Nachfolgend wurden Aliquote der Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.8 Anwendungen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.8.1 Amplifizierung von DNA mittels PCR

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde mit Taq-Polymerasen der Firmen Fermentas und Qiagen oder mit der VentTM-Polymerase der Fa. New England Biolabs und den entsprechenden 10 x Puffern nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Durchführung der PCR erfolgte nach Protokollen von Innis et al. (1990). Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-Ansatz (50 µl Volumen):	5 µl 10 x Polymerase-Puffer
	10 µl dNTP-Mix (2 mM)
	bis zu 2,5 mM MgCl ₂
	20 pmol Sense-Primer
	20 pmol Antisense-Primer
	1-500 ng Template-DNA
	0,5-1 U Polymerase

Sämtliche PCR-Reaktionen wurden in einem Perkin-Elmer PCR-Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt. Die PCR-Programme wurden je nach Anwendung in Polymerisationsdauer und Anlagerungstemperatur variiert:

Denaturierungstemperatur/-dauer:	95 °C/30 s
Polymerisationstemperatur/-dauer:	Taq-Pol. 72 °C/[30 s/1 kb] Vent™ 72 °C/[1 min /1 kb]

Die PCR-Reaktion wurde in den meisten Fällen in 25 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und Elongation, durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf 4 °C beendet. Die Temperatur zur Anlagerung der Primer wurde ausgehend von der Schmelztemperatur T_m berechnet:

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\lg [J^+]) + 0,41 (\% G + C) - (600 / l)$$

$[J^+]$ = Konzentration monovalenter Kationen

l = Länge der Oligonukleotide

Erhaltene PCR-Fragmente wurden nach Angaben der Hersteller in folgende Vektoren ligiert:

pCR®-Blunt II-TOPO®	(Fa. Invitrogen)
pCR®-TOPO®	(Fa. Invitrogen)
pPCR-ScriptAmp™	(Fa. Stratagene)

2.8.2 Touchdown-PCR (TD-PCR)

In einigen Fällen unterschieden sich die Schmelztemperaturen des verwendeten Primerpaares deutlich. In diesen Fällen wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt um das gewünschte Amplikon zu erhalten. Bei der TD-PCR wurde während der PCR-Zyklen die Anlagerungstemperatur des Primers mit dem höheren T_m kontinuierlich um 1 °C pro Zyklus auf die Anlagerungstemperatur des zweiten Primers abgesenkt. Im Anschluß folgten noch 25 Zyklen mit der niedrigeren Anlagerungstemperatur des zweiten Primers. Das PCR-Programm wurde wie unter 2.8.1 beschrieben beendet.

2.8.3 Inverse PCR (IPCR)

Mit Hilfe der inversen PCR können unbekannte DNA-Sequenzen auf beiden Seiten einer bekannten Sequenz amplifiziert werden. Die Methode beruht darauf, daß mit einem Restriktionsenzym, welches nur einmal in der bekannten Sequenz eine Erkennungsstelle hat, lineare Restriktionsfragmente erzeugt und anschließend zu Ringen geschlossen werden. Zur Vervielfältigung dieser Ringe, wählt man Primer-Paare aus, die spezifisch für die bekannte DNA-Sequenz und nach außen orientiert sind. In dem Produkt rahmen die bekannten Sequenzen den unbekanntem Sequenzbereich ein. Die Sequenzierung der beiden Enden kann mit einem Primer aus dem bekannten Bereich erfolgen. Gelangt man an die wiederhergestellte Restriktionsschnittstelle, so hat man das äußere Ende der neuen zusammenhängenden Sequenz erreicht. Die IPCR wurde modifiziert nach Triglia et al. 1988 durchgeführt.

In einem Ansatz von 20 µl wurden 10 µg genomische DNA mit *Pst* I geschnitten und lineare Restriktionsfragmente erzeugt. Anschließend wurden die Fragmente mit T4-DNA-Ligase (1 U) in 20 µl Ansätzen bei 16 °C über Nacht zu Ringen ligiert. Dies erfolgte in vier unterschiedlichen Ansätzen, wobei die DNA verdünnt wurde:

Ligations-Ansatz 1:	Verdünnung	1:2 Endkonzentration (0,25 µg/µl)
2:		1:5 Endkonzentration (0,2 µg/µl)
3:		1:20 Endkonzentration (0,025 µg/µl)
4:		1:50 Endkonzentration (0,05 µg/µl)

Die PCR erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben. Als Template-DNA wurden jeweils 2 µl der Ligationsansätze 1 bis 4 eingesetzt.

2.9 Herstellung einer cDNA-Bibliothek

2.9.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „Superscript™ cDNA-Synthese-Kit“ der Firma Lifetechnologies. Die erhaltene cDNA war mit asymmetrischen Enden versehen und konnte gerichtet in den Vektor pSPORT-1 ligiert werden.

Für die cDNA-Synthese wurden 5 µg einer angereicherten Poly(A)⁺-RNA aus 2 d alten Myzelien, die auf einem Oleat enthaltendem Medium kultiviert wurden, als Matrize eingesetzt. Zur Ermittlung der geeigneten Fraktion für die Ligation nach der Größenfraktionierung wurde in den Erststrang zur Kontrolle [α -³²P]dCTP eingebaut. Die Synthese erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Die Größenfraktionierung wurde durch eine Autoradiographie eines Agarose-Gels überprüft (2.4.4).

2.9.2 Ligation und Transformation der cDNA in kompetente *E. coli* Zellen

Nach der Größenfraktionierung wurde die Fraktion mit der größten cDNA für die Ligation eingesetzt. Die cDNA mit asymmetrischen Enden wurde in den *Sal* I, *Not* I geschnittenen Vektor pSPORT-1 ligiert. Die Ligation wurde nach Anleitung des Herstellers mit den entsprechenden Mengen an cDNA und Vektor-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 3 h bei RT durchgeführt. Jeweils 5 µl eines Ligationsansatzes wurden für die Transformation von *E. coli* „XL1-Blue“ (2.7.1) eingesetzt. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation nach Abschnitt (2.7.2). Die Überprüfung der Transformationseffizienz wurde durch Ausstreichen von Aliquoten auf LB/Amp. Platten überprüft. Aus der Zahl der gewachsenen Kolonien konnte die Anzahl der transformierten Bakterien, die Plasmide mit cDNA-Inserts enthielten, abgeschätzt werden.

2.9.3 Anfertigung von Master- und Replikplatten

Es wurde jeweils ein Aliquot der Transformationsansätze pro Agarplatte (15 cm Durchmesser) ausplattiert, so daß die Platte mit ca. 10000 bis 15000 Kolonien bewachsen war.

Dazu wurde ein Nitrocellulosefilter BA 85 (Durchmesser 13,2 cm) auf mehrere Blotpapiere GB002 in einen Büchnertrichter gelegt und mit LB-Medium befeuchtet. Das Aliquot des Transformationsansatzes wurde in 5 ml LB-Medium verdünnt und unter Anlegen eines leichten Unterdruckes gleichmäßig über die Membran verteilt. Die NC-Filter wurden luftblasenfrei auf eine LB/Amp-Platte gelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die so angefertigten NC-Filter werden fortan als Masterfilter bezeichnet. Zur Konservierung der cDNA-Bank wurden die Masterfilter luftblasenfrei auf 10 % (v/v) Glycerin-LB/Amp-Platten gelegt, mit Parafilm verschlossen und bei –20 °C aufbewahrt.

Für die Durchführung einer Koloniehybridisierung wurden zuvor von jeder Masterplatte zwei identische Replikafilter nach der Methode von Hanahan und Meselson (1980) angefertigt. Der entsprechende Masterfilter wurde auf ein Blotpapier GB002 gelegt und darauf ein zuvor auf einer LB-Platte angefeuchteter NC-Filter, der zuletzt mit einem weiteren Blotpapier GB002 abgedeckt wurde. Die Filter wurden nun vorsichtig zwischen zwei Glasplatten zusammengedrückt. Die Lage der Filter zueinander wurde durch drei Einstiche mit einer Kanüle und einem Stift markiert. Der erste Replikafilter wurde nun luftblasenfrei mit den Kolonien nach oben auf eine LB/Amp-Platte gelegt und ein zweiter Replikafilter von derselben Masterplatte unter Berücksichtigung der ersten Markierungen angefertigt. Die Replikafilter wurden 8 bis 10 h bei 37 °C inkubiert.

2.9.4 Koloniehybridisierung

Für die spätere Koloniehybridisierung mußten die Bakterien zuerst lysiert werden, um die Plasmid-DNA auf der Membran zu fixieren.

Denaturierungslösung, P1:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung, P2:	1,0 M Tris/HCl, pH 7,0 1,5 M NaCl

20 x SSPE:	0,2 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
	3,6 M NaCl
	20 mM EDTA
Waschpuffer, P3:	0,45 M NaCl
	0,045 M Natriumacetat, pH 7,0
	0,1 % (w/v) SDS

Zu Beginn wurden je 1 Blotpapier GB002 in den Lösungen P1, P2 und 20 x SSPE getränkt. Zum Denaturieren wurden die Replikafilter zuerst 10 min auf P1 getränktes Blotpapier gelegt, 5 min auf Filterpapier getrocknet und zweimal hintereinander für je 5 min auf P2 getränktem Blotpapier neutralisiert. Danach wurden die Replikafilter 5 min auf mit 20 x SSPE getränktem Blotpapier inkubiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Replikafilter wurden abwechselnd mit jeweils einem Blotpapier GB002 zwischen zwei Glasplatten geschichtet und zum Fixieren der DNA 1 h bei 80 °C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Nach Befeuchten der Filter mit P3 konnten die Filter vorsichtig abgenommen werden. Zum Ablösen der Bakterienzelltrümmer wurden die Replikafilter mehrere Stunden in P3 bei 50 °C unter mehrmaligem Wechsel der Waschlösung gewaschen. Letzte Bakterienreste wurden vorsichtig mit Vliespapier abgewischt. Die Filter wurden an der Luft getrocknet und für Hybridisierungen eingesetzt (2.10.3). Kolonien, die bei der Hybridisierung auf beiden Replikafiltern identische Signale ergaben, wurden von der Masterplatte abgenommen und über Nacht in 3 ml LB/Amp.-Medium bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Konnte das Hybridisierungssignal nicht eindeutig einem Klon zugeordnet werden, mußten die abgenommenen Kolonien vereinzelt und erneut hybridisiert werden („Rescreening“). Dazu wurde aus der Übernachtskultur 1 µl entnommen, 1:3000 mit LB-Medium verdünnt und davon 1 µl auf eine LB/Amp-Platte (9 cm Durchmesser) ausplattiert (2.7.2).

2.10 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylon⁺-Membran und Hybridisierungsverfahren

2.10.1 Herstellung von Northern- und Southern- Blot

Die im Agarosegel aufgetrennte und mit Ethidiumbromid gefärbte DNA oder RNA wurde durch

Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (Chomczynski 1992).

Denaturierungslösung:	3 M NaCl 0,4 M NaOH
Transferpuffer:	3 M NaCl 8 mM NaOH
Neutralisierungslösung:	0,2 M Na-Phosphat, pH 6,8

Im Anschluß an die gelelektrophoretische Trennung wurde das Gel für 30 min in Denaturierungslösung und anschließend für 15 min in Transferlösung inkubiert. Für den Transfer wurden 3 cm saugfähiges Papier und 4 Lagen Whatman-3MM-Papier in der Größe des Gels aufgeschichtet. Hierauf wurde die Nylon-Membran gelegt und darauf das Gel luftblasenfrei plaziert. Auf das Gel wurden 4 Lagen mit Transferlösung getränktes Whatman-Papier gelegt und mit einem längeren Streifen eine Salz-Brücke zu einem Vorratsgefäß gelegt. Um den Aufbau vor Austrocknung zu schützen wurde er mit einem Plastikdeckel abgedeckt. Der Transferprozess betrug für 1 % Gele eine Stunde und entsprechend mehr für höherprozentige Gele. Danach wurde die Membran mit den übertragenen Nukleinsäuren 10 min in Neutralisierungslösung geschwenkt und zusätzlich durch UV-Quervernetzung für 2 min auf der Membran fixiert. Die Nylonmembran wurde entweder getrocknet und gelagert oder direkt für Hybridisierungen eingesetzt.

2.10.2 Hybridisierungsverfahren

Die Hybridisierungen erfolgten nach einer Methode von Gatti et al. (1984).

50 x Denhardt, pro Liter	10 g Ficoll 10 g Polyvinylpyrrolidon, M _r 25000 10 g BSA
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumacetat

20 x SSPE:	0,2 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4 3,6 M NaCl 0,02 M EDTA
sonstige Lösungen:	DNA aus Lachssperm (10 mg/ml) Formamid (entionisiert) 10 % (w/v) SDS

Die Nylonmembran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und in Abhängigkeit der Art und der Homologie der Sonde bei entsprechender Temperatur prähybridisiert bzw. hybridisiert.

Prähybridisierungslösungen für eine:

heterologe DNA-Sonde:	30 % (v/v) Formamid (entionisiert) 10 x Denhardt 5 x SSPE 0,1 % (w/v) SDS 100 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNA Hybridisierungstemperatur 37-39 °C
homologe DNA-Sonde:	50 % (v/v) Formamid (entionisiert) 10 x Denhardt 5 x SSPE 0,1 % (w/v) SDS 100 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNA Hybridisierungstemperatur 42 °C
Oligonukleotid-Sonde:	10 x Denhardt 5 x SSPE 7 % (w/v) SDS 100 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNA Hybridisierungstemperatur T _d - 5 °C

Die Hybridisierungstemperatur bei Oligonukleotiden lag ungefähr 5 °C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur T_d, die sich nach der 2+4-Regel abschätzen ließ:

$$T_d = 4 \text{ °C} \times (\text{Anzahl C} + \text{G}) + 2 \text{ °C} \times (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

Die Nylonmembran wurde 2 bis 6 h in 30 ml Prähybridisierungslösung in einem Hybridisierungssofen bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, anschließend wurde die radioaktiv markierte und denaturierte DNA-Sonde (2.11) zu 10 ml Hybridisierungspuffer gegeben und die Membran für 12 h hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran gewaschen, dabei wurden die Waschbedingungen an die jeweilige Probe angepasst. Erhöhung der Wascht Temperatur und der Salzkonzentration im Puffer erhöhten die Stringenz und ergaben in der Regel spezifischere Hybridisierungssignale. Im Allgemeinen wurden die Membranen nach der Hybridisierung eine halbe Stunde bei 50 °C mit 2 x SSC / 0,1 % (w/v) SDS und dreimal je eine halbe Stunde mit 0,2 x SSC / 0,1 (w/v) SDS gewaschen. Danach wurde die Membran an der Luft getrocknet, in Polyethylen-Folie eingeschlagen und eine Autoradiographie angefertigt. Zum Freiwaschen der Membran wurde diese dreimal mit kochender 0,1 %iger SDS-Lösung behandelt.

2.11 Radioaktive Markierung von DNA

2.11.1 Markierung von dsDNA

Die Markierung der Sonden erfolgte unter Verwendung des „Random Primers DNA-Labeling Kits“ der Fa. Lifetechnologies nach einer Methode von Feinberg und Vogelstein (1983). Der Einbau von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.11.2 Markierung synthetischer Oligonukleotide

Die Markierung synthetischer Oligonukleotide erfolgte durch eine Phosphorylierung am 5'-Ende mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und einer T4-Polynukleotidkinase. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt nach Herstellerangaben zusammen:

Reaktionsansatz:	10 pmol Oligonukleotid
	5 µl 10 x T4-PNP-Puffer
	6 µl [γ - ³² P]dATP (20 pmol)
	mit H ₂ O auf 48 µl auffüllen
	2 µl T4-PNK (6 U)

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde die Markierung durch fünfminütiges Erhitzen bei 65 °C beendet. Der Ansatz konnte direkt für Hybridisierungen eingesetzt werden.

Zur Bestimmung der Einbaurrate der radioaktiv markierten Nukleotide in dsDNA oder Oligonukleotide wurden zwei Aliquote von je 2 µl entnommen und auf DE81-Papierfilter gegeben. Ein Filter wurde dreimal mit 0,5 M NaH₂PO₄, pH 7,4, zweimal mit Wasser, zweimal mit Ethanol, einmal mit Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet. Der andere Filter wurde nur getrocknet. Die Radioaktivität der beiden Filtern wurden in einem Szintillationszähler bestimmt und aus der Differenz die Einbaurrate ermittelt.

2.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde modifiziert nach der Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Es wurden das „ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit™“ und ein ABI 377 Sequenziergerät der Fa. Perkin-Elmer verwendet.

Sequenzieransatz (20 µl):	250 - 500 ng DNA
	5 – 10 pmol Primer
	4 µl Terminator Ready Reaction Mix
	auf 20 µl mit H ₂ O auffüllen
Probeauftragelösung:	5 Vol. Formamid (entionisiert)
	1 Vol. 25 mM EDTA, pH 8,0 mit
	5 % (w/v) Dextran Blau

Der zu analysierende DNA-Strang wurde in 25 Zyklen synthetisiert, wobei die vier Didesoxyanaloga, jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert zum Kettenabbruch führten. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt (2.5.3), das Pellet mit 80 %igem

Ethanol gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 4 µl Probenauflösung resuspendiert und 2 µl davon auf eine Bahn eines Gels aufgetragen. Das Gießen des Geles und die Einstellungen am Gerät erfolgten nach Angaben des Herstellers.

2.13 Bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

Zur Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli* und der anschließenden Reinigung wurden zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet. Bei dem ersten Expressionssystem „QIAexpress“ der Fa.Qiagen wurde der kodierende Bereich der DNA im entsprechenden Leseraster in einen pQE-Expressionsvektor kloniert, wodurch dem rekombinanten Protein amino- oder carboxyterminal ein Fusionspeptid aus sechs Histidinen angefügt wurden. Die Fusionsproteine mit einem 6xHis-Tag konnten durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt werden (2.13.3).

Bei dem zweiten System wurden die pGEX-Expressionsvektoren der Fa.Pharmacia verwendet. Bei diesem System wurde ein Fusionsprotein mit dem N-terminalen Bereich (ca. 26 kDa) der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* hergestellt. Dazu wurde das zu exprimierende Protein im selben Leseraster an den C-Terminus der GST fusioniert. Die Reinigung des GST-Fusionproteins erfolgte über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose (Guan und Dixon 1991); (Simons und Vander Jagt 1977).

2.13.1 Herstellung des Expressionsplasmids

Die Proteine *PmJcp*, *PmDnaJ* (*Pm9.1.1*) und *PmHsp90* (*Pm1.9.1*) wurden als 6xHis-Tag Fusionsproteine konstruiert. Mittels PCR wurde der codierende Bereich amplifiziert und geeignete Schnittstellen eingeführt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden nach Restriktionshydrolyse im korrekten Leseraster in die pQE-Vektoren kloniert. Die Transformation erfolgte in kompetente Zellen des Stammes *E. coli* M15[pREP4]. Positive Kolonien wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) selektiert. Von entsprechenden Kolonien wurde eine Plasmid Präparation im mini-Maßstab durchgeführt (2.4.2/2.4.3) und es erfolgte eine Sequenzierung des Plasmids. Die drei cytosolischen Isoformen von Hsp70 aus *P. megasperma* und *PmDnaJ* (*Pm9.1.1*) wurden als Fusionsproteine mit der

Glutathion-S-Transferase hergestellt. Die Klonierung erfolgte auf dem selben Weg wie für die 6xHis-Tag Fusionsproteine beschrieben. Im Falle des *PmDnaJp* wurde der codierende Bereich der DNA aus dem Vektor pSPORT1 nach Restriktionshydrolyse isoliert.

2.13.2 Expression der Fusionsproteine

Expressionstests

Klone mit dem entsprechendem Expressionsvektor wurden auf ihr Expressionsverhalten hin getestet. Dazu wurden im kleinen Maßstab 15 ml große Testkulturen in LBKanAmp mit 500 µl einer Übernachtskultur im gleichen Medium angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,9 erreicht war. Zur Induktion der Expression des rekombinanten Proteins wurde IPTG in einer Endkonzentration von 0,2 bis 0,5 mM hinzugegeben. Die weitere Inkubation der Kulturen erfolgte jetzt bei 20 °C und 250 rpm für vier bis sechs Stunden. Zur Kontrolle der Expression wurden zu Beginn der Induktion (0 h) und jede weitere Stunde 1 ml der Kultur abgenommen, die Bakterien abzentrifugiert und die Pellets in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zur Überprüfung der Löslichkeit des Proteins wurde der Rest der Testkultur abzentrifugiert (10 min , 10000 x g, 4 °C) und das Bakterienpellet in 2 ml Aufschlußpuffer resuspendiert. Nach zweimaligem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen wurde der Aufschluß der Bakterien durch fünfmaliges Behandeln mit Ultraschall für 7 s im Eiswasserbad vervollständigt, wobei die Proben zwischen den Beschallungen für eine min auf Eis abgekühlt wurden. Es folgte eine Zentrifugation von 30 min bei 16000 x g (Rotor JA 20) und 4 °C. Der erhaltene Niederschlag, in dem unlösliche Proteine enthalten sind, wurde in 1 ml Aufschlußpuffer resuspendiert. Vom resuspendierten Niederschlag und vom Überstand mit den löslichen Proteinen wurden Aliquote mit dem entsprechendem Volumen 4 x SDS-Probenpuffer versetzt. Alle erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Präparative Expression

Im präparativen Maßstab wurden 1000 ml Medium mit 20 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Anzucht und Induktion der Expression erfolgten analog zu den Testkulturen. Die Bakterienkulturen wurden 10 min bei 7000 x g (Rotor JA 10) und 4 °C abzentrifugiert. Das

erhaltene Bakterienpellet wurde zur weiteren Aufarbeitung in dem entsprechenden Aufschlußpuffer resuspendiert oder zur Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.13.3 Reinigung der rekombinanten His-Tag Proteine

Die Reinigung erfolgte unter nativen Bedingungen in Anlehnung an das Protokoll des QIAexpress-Systems.

Aufschlußpuffer:	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,8
	300 mM NaCl

Nach Resuspendieren des Bakterienpellets aus einer 1000 ml großen Expressionskultur in 3 ml Aufschlußpuffer pro Gramm Zellen wurde der Aufschluß und das Abtrennen der unlöslichen Zellbestandteile analog der Aufarbeitung der Testkulturen durchgeführt. Die Ni^{2+} -NTA-Säule (ca. 2 ml Bettvolumen) wurde entsprechend der Vorschrift des Herstellers vorbereitet bzw. regeneriert. Zunächst wurde das Säulenmaterial mit Aufschlußpuffer äquilibriert. Danach wurde das lösliche Zellysats mit einer Peristaltikpumpe auf die Säule aufgetragen, für 1 h über die Säule gepumpt und der Durchbruch in einer Fraktion aufgefangen. Es folgte ein Waschschrift mit 10 ml Auschlußpuffer, danach wurde die Säule an eine Pharmacia FPLC-Anlage angeschlossen und es wurde nochmals mit 10 ml Aufschlußpuffer gewaschen. Das rekombinante Protein wurde mit einem Gradient von 40 ml (10-250 mM Imidazol in Aufschlußpuffer) in Fraktionen von 2 ml eluiert. Der Verlauf der Reinigung wurde durch die Messung der Extinktion bei 280 nm verfolgt. Anschließend wurden Aliquote bestimmter Fraktionen mit 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.13.4 Reinigung rekombinanter GST-Tag Proteine

Die Reinigung wurde unter nativen Bedingungen in Anlehnung an das Protokoll von Guan und Dixon (1991) und Simmons und Van der Jagt (1977) durchgeführt. Die Vorbereitung des löslichen Zellysats erfolgte ebenfalls wie unter 2.13.3 beschrieben, allerdings unter Verwendung des GST-Aufschlußpuffers.

GST-Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM Glutathion (reduziert)
GST-Aufschlusspuffer:	20 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , pH 7,3 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 2 mM EDTA 0,1 % (v/v) Mercaptoethanol 0,2 mM PMSF 5 mM Benzamidin

Je 1 ml des klarzentrifugierten Zelllysates wurden mit 7 mg GSH-Agarose, die zuvor in 100 µl GST-Aufschlusspuffer vorgequollen wurde für 16 h bei 4 °C inkubiert. Die GST-Agarose wurde viermal mit je 10 ml GST-Aufschlusspuffer gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden durch zweimaliges Waschen für 2 min mit 1 ml GST-Elutionspuffer eluiert. Die eluierten GST-Fusionsproteine wurden anschließend über eine PD10-Säule (Fa. Pharmacia) in den jeweiligen Puffer umgepuffert.

2.14 Transkription und Translation *in vitro*

Die Transkription und Translation *in vitro* erfolgte mit dem Fertigset „TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System“ der Fa. Promega. Ein Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Reaktionsansatz:	1 µg Plasmid-DNA 40 µl Retikulozyten-Lysat 2 µl L-[³⁵ S]Methionin mit H ₂ O auf 50 µl aufgefüllt
------------------	--

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Translation erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese nach 2.18.1. Dazu wurden 5 µl entnommen, mit 15 µl Probenauftragepuffer versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert. Zur Entfernung der Ribosomen wurde der Ansatz 1 h bei 130000 x g in der Airfuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz je nach der weiteren Verwendung über Nick Spin Columns (Fa. Pharmacia) umgepuffert. Der

Ansatz wurde mit dem entsprechenden Puffer auf 125 µl aufgefüllt und auf die zuvor äquilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 1000 x g.

2.15 Aufarbeitung des Myzels

2.15.1 Bildung von Protoplasten

Zum schonenden Aufschluß des Myzels sollte dieses zunächst in Protoplasten überführt und anschließend aufgeschlossen werden. Es wurde dabei nach einer Methode von Jahnke et al. (1987) und Pesti und Ferenzy (1979) vorgegangen. Zur Zellwandlyse wurde Onozuka R-10 Cellulase und eine Enzympräparation (Lyse Enzyme, Fa.Sigma) aus dem Pilz *Trichoderma harzianum*, die neben 1,3- α -Glucanase- und 1,3- β -Glucanase-Aktivität auch Laminarase-, Xylanase-, Chitinase- und Protease-Aktivität besitzt, eingesetzt.

Wasch-Lösung:	0,1 M CaCl ₂ mit HCl auf pH 6,2 eingestellt 0,4 M Mannit (autoklavieren)
Lyse-Lösung:	Wasch-Lösung 10 mg/ml Lyse-Enzyme 5 mg/ml Cellulase (filtrieren 0,2 µm)

Zunächst wurde das Myzel (2.2.1) mit Waschlösung gewaschen bis anhaftende Medium-Reste entfernt waren. Das Myzel wurde in 5 ml Lyse-Lösung pro Gramm Zellen aufgenommen und 2 h bei 18 °C in einem Schüttler mit 100 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine weiß-gelbe Trübung festgestellt. Verbliebene Myzel-Reste wurden durch eine Filtration über Miracloth abgetrennt. Die Protoplasten wurden durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 320 x g und 4 °C sedimentiert. Die Protoplasten wurden noch dreimal mit Waschlösung gewaschen und zentrifugiert. Die Freisetzung der Protoplasten konnte im Mikroskop beobachtet werden. Zum Aufschluß wurden die Protoplasten in Aufschluß-Medium aufgenommen und mehrmals durch eine Kanüle aufgesaugt, der so erhaltene Zellextrakt wurde nach 2.15.2 weiterbearbeitet.

2.15.2 Aufschluß durch mechanische Behandlung

Um einen Gesamtzellextrakt aus *P. megasperma* zu gewinnen, wurden die Hyphen durch zermörsern aufgeschlossen.

Aufschluß-Medium:	20 mM HEPES/KOH, pH 7,5
	5 mM MgCl ₂
	10 mM KCl
	1 mM EGTA
	250 mM Saccharose
	0,2 mM PMSF
	2 mM DTT

Eine Flüssigkultur (2.2.1) wurde unter Anlegen eines leichten Vakuums durch Miracloth filtriert. Um möglichst alle Rückstände des Mediums zu entfernen, wurde das Myzel mehrmals mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Myzel mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in einem vorgekühlten Mörser (4 °C), der sich auf Eis befand, mit 3 ml Aufschluß-Medium pro Gramm Myzel versetzt und mit einem Pistill bis zur Homogenität zermörsert. Der erhaltene Zellextrakt wurde durch zwei Lagen Miracloth filtriert und durch Zentrifugation subfraktioniert.

2.15.3 Subfraktionierung des Gesamtzellextraktes

Das Filtrat wurde zunächst einer 15-minütigen Vorzentrifugation bei 2000 x g und 4 °C unterzogen. Der Niederschlag enthielt größere Zelltrümmer und Zellkerne. Der Überstand wird im Weiteren als Rohhomogenat bezeichnet. Das Rohhomogenat wurde für die Dauer von 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. In diesem Niederschlag befanden sich mittelgroße Organellen (Mitochondrien und Peroxisomen) und wird im Weiteren als Sediment der Zentrifugation bei 10000 x g bezeichnet. Die mikrosomalen Membranen (Endoplasmatisches Retikulum und Plasmamembran) wurden nach einer 2-stündigen Zentrifugation bei 100000 x g und 4 °C sedimentiert. Dieser Niederschlag wird im weiteren als Sediment der Zentrifugation bei 100000 x g, der Überstand als Cytosol bezeichnet.

2.15.4 Gleichgewichtsdichte-Zentrifugation

Zur Bestimmung der Gleichgewichtsdichte von Membranen aus *P. megasperma* wurde das Sediment der Zentrifugation bei 100000 x g einer isopyknischen Zentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten unterworfen. Es wurde dabei nach einem modifizierten Verfahren von Sturm (Sturm 1984) vorgegangen.

Gradientenmedium:	20 mM HEPES/KOH, pH 7,5
	5 mM MgCl ₂
	10 mM KCl
	1 mM EGTA
	20 - 56 % (w/w) Saccharose

Zur Auftrennung des Sediments der Zentrifugation bei 100000 x g wurde ein linearer Saccharosegradient mit einem Gehalt von 20 - 56 % (w/w) Saccharose verwendet. Um eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde die Saccharoselösung mit einem doppelt konzentrierten Puffer angesetzt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Zentrifugation wurde bei 100000 x g (26000 x g, Rotor SW 28 bzw. TST 28.3 oder 27000 x g, TH 641) bei 4 °C für die Dauer von 6 h durchgeführt. Auf einen Gradienten wurden die Niederschläge einer Aufarbeitung ausgehend von ~ 25 g (Rotor SW 28 bzw. TST 28.3) oder ~ 10 g (Rotor TH641) Pilzmaterial aufgetragen. Der Gradient wurde mit einem Gradientenfractionierer in 0,6 ml (TH 641) oder 1,2 ml (SW 28/TST 28.3) gesammelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch die Messung der Extinktion bei 280 nm, durch Bestimmung der Dichte (2.17.3) und Bestimmung der Aktivität der Leitenzyme (2.16) charakterisiert.

2.15.5 Lipidkörper-Präparation aus *P. megasperma*

Die Isolierung von Lipidkörpern erfolgte wie die Subfraktionierung des Gesamtzellextraktes nach 2.15.2. Die *in vivo*-Markierung des Myzels mit [¹⁴C]-Natrium-Acetat wurde unter Berücksichtigung der Lipidkörper nach 2.2.1.1 durchgeführt.

Zunächst wurden Lipidkörper aus nicht markierten Myzelien aufgearbeitet. Die Anzucht erfolgte auf V8-Medium, das mit Kaliumoleat supplementiert wurde. Die nach der 2000 x g Zentrifugation flotierte Lipidschicht wurde mit einem Spatel vorsichtig abgenommen und in 1 ml Aufschlußpuffer

resuspendiert. Diese Suspension wurde zu einem Gesamtzellextrakt aus [^{14}C]-markierten Myzelien gegeben, deren Anzucht ebenfalls auf V8-Oleat-Medium erfolgte. Der Zellextrakt wurde gemischt und weiter nach 2.15.2 aufgearbeitet. Die nach der 2000 x g erhaltene Lipidkörperschicht mit den [^{14}C]-markierten Fettsäuren wurden abgenommen und zur weiteren Aufarbeitung und Analyse der enthaltenen Lipide von Christian May (May 1999) bearbeitet.

2.15.6 Behandlung von Membran-Fraktionen mit Magnesiumchlorid

Durch die Behandlung von Membranpräparationen mit salzhaltigen Puffern ist es möglich periphere Membranproteine in Lösung zu bringen (Howell und Pallade 1982) Entsprechende Fraktionen, die Plasma-Membranen enthielten (2.15.4), wurden durch die Zugabe einer 5 M MgCl_2 -Stammlösung auf bis zu 1 M MgCl_2 eingestellt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 1 h bei 100000 x g zentrifugiert (32000 x g, Rotor Ti 55.2) und die im Sediment enthaltenen integrale Proteine mit 80%igem eiskaltem Aceton entfettet, nochmals mit 80%igem Aceton gewaschen und in Probenpuffer aufgenommen (2.18.1). Die solubilisierten Proteine, die sich im Überstand befanden, wurden mit TCA gefällt, gewaschen und in Probenpuffer aufgenommen.

2.15.7 Proteolyse von Proteinen in Membran-Fraktionen

Zur Untersuchung der Topologie des Jcp wurden Plasma-Membran enthaltende Fraktionen (2.15.3) mit Proteinase K behandelt.

Proteinase K-Stammlösung:	1 mg/ml Proteinase K in Saccharoselösung
Saccharoselösung:	20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 10 mM KCl 5 mM MgCl_2 1 mM EGTA 250 mM Saccharose

Der proteolytische Abbau von Proteinen wurde mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 0,1-1 µg/ml durchgeführt. Die Proteolyse erfolgte bei Raumtemperatur für die Dauer von 15 min und wurde durch die Zugabe von PMSF in einer Endkonzentration von 2 mM gestoppt. Nach Beendigung der Proteolyse wurden die Proteine dieses Ansatzes direkt mit TCA gefällt, gewaschen und in Probenpuffer aufgenommen (2.18.1). Die Proteine der erhaltenen Proben wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

2.15.8 Bindungs-Untersuchungen von Jcp mit Hsp70-Isoformen und Hsp90

Die Wechselwirkungs-Experimente wurden mit gereinigten GST- oder His-Tag-Fusionsproteinen (2.13) und mit *in vitro* translatierten radioaktiv markierten Proteinen (2.14) durchgeführt, die zuvor in Bindungspuffer überführt wurden. Die Experimente wurden nach Diefenbach und Kindl (2000) und Minami et al (1996) durchgeführt.

Bindungspuffer:	10 mM HEPES/KOH, pH 7,2 150 mM KCl 3 mM MgCl ₂
Waschpuffer:	50 mM HEPES/KOH, pH 7,5 300 mM NaCl 3 mM MgCl ₂

Die GST-Hsp70 Fusionsproteine (2 µM) oder das *in vitro* translatierte Hsp90 wurden mit 6xHisJcp (1 µM) in 30 µl Reaktionsansätzen ohne Nukleotid oder in Anwesenheit von 2 mM ADP oder ATP für 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand entweder zu 20 µl Ni²⁺-NTA-Agarose oder zu GSH-Agarose gegeben und für 15 min bei 4 °C unter Invertieren inkubiert. Das Trägermaterial wurde abzentrifugiert und fünfmal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend folgte die Elution der gebundenen Proteine mit 20 mM Glutathion (GSH-Affinitätsmaterial) oder 250 mM Imidazol (Ni²⁺-NTA-Affinitätsmaterial). Die eluierten Proteine wurden nach der SDS-PAGE entweder auf Nitrocellulose transferiert oder es wurde eine Fluorographie angefertigt (2.18).

2.16 Enzymtests

Alle beschriebenen Enzymtests wurden in einem Zweistrahlphotometer Uvikon 930 (Fa. Kontron) durchgeführt.

2.16.1 ATPase EC 3.6.1.35

Die Bestimmung der Vanadat-sensitiven (Plasmamembran) und der Azid-sensitiven (Mitochondrien) ATPase-Aktivität erfolgte jeweils durch eine Messung der ATPase-Aktivität mit und ohne Inhibitor (Rojahn 1992). Das Testvolumen betrug 500 μ l.

Testpuffer:	50 mM Mes/Tris, pH 8,5 5 mM MgCl ₂ 5 mM KCl 1 mM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4 H ₂ O
ATP-Lösung:	10 mM ATP, Na-Salz in Testpuffer
Testansatz (Endvolumen 500 μ l):	x μ l Proteinlösung 450 - x μ l Testpuffer 50 μ l ATP-Lösung
Inhibition:	50 μ M NaVO ₃ (Plasmamembran) 5 mM NaN ₃ (Mitochondrien)

Die Reaktion wurde durch die Zugabe der ATP-Lösung gestartet. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C wurde das freigesetzte Phosphat bestimmt. Zur Phosphatbestimmung wurden die Reagenzien 1, 2 und 3 im gleichem Verhältnis gemischt. 500 μ l des erhaltenen Phosphatreagens wurden den Reaktionansätzen zugegeben.

Reagens 1:	40,66 % (v/v) Eisessig p.a. 35,7 mM CuSO ₄ p.a. 100 mM SDS
Reagens 2:	24,3 mM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4 H ₂ O
Reagens 3 (dunkel gelagert, 4 °C)	97,4 mM p-Methylaminophenol 240 mM Na ₂ SO ₃
Reagens 4:	480 mM Tri-Natriumcitrat • 2 H ₂ O

Die Reaktion wurde nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 µl Reagenz 4 gestoppt. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 870 nm in 1 ml Einmal-Kunststoffküvetten gemessen und mit einer Eichkurve, die zuvor mit KH₂PO₄ im Bereich von 0 – 0,2 µmol Phosphat erstellt wurde, verglichen.

2.16.2 Fumarase EC 4.2.1.2

Der Fumarase-Test erfolgte nach einer Methode von (Cooper und Beevers 1969) in einer Quarzküvette.

Testpuffer	100 mM KH ₂ PO ₄ /Na ₂ PO ₄ , pH 7,4 50 mM L-Malat, Na ₂ -Salz
------------	--

Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Probe gestartet und konnte durch die Zunahme der Extinktion bei 240 nm verfolgt werden. Als Referenz diente der Testpuffer.

2.16.3 NADPH-Cytochrom c-Oxidoreduktase EC 1.6.2.3

Die Bestimmung der Aktivität der NADPH-Cytochrom c-Oxidoreduktase erfolgte nach einer Methode von Ray (1977) in einer 1 ml Glasküvette. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe der Proteinlösung. Der Verlauf der Reaktion wurde durch die Zunahme der Extinktion bei 550 nm verfolgt.

Konzentration im Test:	50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , pH 7,5
	0,001 % (w/v) Antimycin
	0,02 mM Cytochrom c (oxidiert)
	1 mM KCN
	0,08 mM NADPH Na-Salz

2.16.4 Saure Phosphatase E.C. 3.1.3.2

Die Aktivität der sauren Phosphatase wurde nach Van Rijn et al. (1971) anhand der Freisetzung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenol-Phosphat gemessen.

Ein Reaktionsansatz enthielt 50 µl p-Nitrophenol-Phosphat (11 µmol/ml) in 0,1 M Natriumacetat (pH 3,8) und 20 µl der zu testenden Lösung. Die Reaktionsansätze wurden für 15 min bei 30 °C inkubiert und durch die Zugabe von 1 ml 0.2 M NaOH gestoppt. Die Freisetzung des p-Nitrophenols wurde durch die Messung der Extinktion bei 401 nm gemessen.

2.17 Proteinbestimmungen

2.17.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte nach einer Methode von Bradford (1976) Der Test wurde mit Reagenzien der Fa. Bio-Rad in 1 ml Einmalküvetten durchgeführt.

Testansatz:	0,002 % Triton X-100
	x µl Proteinlösung
	1000 - x µl Bidest. H ₂ O
	200 µl Bradford-Reagenz

Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Standard diente eine Eichkurve, die mit BSA in einer Konzentration von 0-12 µg/ml erstellt wurde.

2.17.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Für Proteinfraktionen, die Membranbestandteile enthielten, wurde auf eine von Peterson (1977) modifizierte Proteinbestimmung nach Lowry (1951) zurückgegriffen.

Testansatz:	1000 - x μ l Bidest. H ₂ O
	x μ l Proteinlösung
	100 μ l 0,15 % (w/v) DOC
	100 μ l 72 % (w/v) TCA

Zur Entfernung der Membranbestandteile wurden die Proteine zunächst mit 6 % TCA/ 0,125 % DOC für 1 h auf Eis gefällt. Anschließend wurden die Proteine sedimentiert (15 min , 13000 x g) und der Überstand vollständig abgenommen.

Reagenz 1 (dunkel gelagert):	4 mM CuSO ₄ 8,5 mM KNa-Tartrat • 4 H ₂ O
Reagenz 2:	0,8 mM NaOH 10 % (w/v) Na ₂ CO ₃
Reagenz 3:	5 % (w/v) SDS
Lösung A: (Bis zur Verwendung im warmen Wasserbad aufbewahren)	Reagenzien 1, 2 und 3 im Verhältnis 1 : 1 : 2 (v/v/v)
Lösung B:	Folin-Reagenz (Fa. Merck) und bidest. H ₂ O im Verhältnis 1 : 5 (v/v)

Das Protein-Pellet wurde in 400 μ l bidest. H₂O aufgenommen und mit 400 μ l Lösung A 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 μ l Lösung B zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen. Als Standard diente eine Eichkurve, die mit BSA in einer Konzentration von 0-40 μ g/ml erstellt wurde.

2.17.3 Dichtebestimmung der Saccharoselösungen

Die Dichte der Saccharoselösungen wurde durch die Messung des Brechungsindex an einem Refraktometer (Fa. Zeiss, Oberkochen) bestimmt.

2.18 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.18.1 Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine zur Ankonzentrierung gefällt. Wäßrige Proteinlösungen wurden mit 72 %iger TCA (w/v) auf eine Endkonzentration von 7,2 % TCA (w/v) gebracht und für 1 h bei 4 °C gefällt. Die Proteinproben wurden für 20 min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Im Falle von Membranproteinen wurde das TCA-Präzipitat oder der Membranniederschlag zweimal mit 500 µl 80 %igem (v/v) Aceton und einmal mit 500 µl Chloroform/Methanol (Verhältnis 2 : 1) gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde für 20 min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Proteinniederschlag wurde in einer Vakuumschneidzentrifuge 1 h getrocknet und in Probenpuffer aufgenommen. Nach 15-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 min bei 100 °C erhitzt, unmittelbar vor dem Auftragen kurz abzentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Getrocknete Proteinproben wurden direkt in Probenpuffer aufgenommen.

Die analytische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach einer Methode von Laemmli (1975) in einer vertikalen Gelapparatur.

Gelzusammensetzung:	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid in % (w/v)	4	8-15
Puffer	125 mM Tris/HCl, pH 6,8	375 mM Tris/HCl, pH 88 10 % (w/v) Saccharose
SDS in % (w/v)	0,1	0,1
TEMED in % (v/v)	0,001	0,001
Ammoniumperoxodisulfat in % (w/v)	0,1	0,05

Die verwendete Acrylamidlösung wurde in Form einer 30 %-igen (w/v) wäßrigen Lösung eingesetzt. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid betrug jeweils 37,5:1.

Elektrodenpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Probenpuffer:	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 15 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) 2-Mercaptoethanol 4 % (w/v) SDS 0,002 % (w/v) Bromphenolblau
Färber:	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 5 % (v/v) Eisessig 50 % (v/v) Methanol
Entfärber:	5 % (v/v) Eisessig 28 % (v/v) Isopropanol

Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei konstanter Stromstärke, in kleinen Gelen (Laufstrecke < 10 cm) bei 25 mA, in großen (Laufstrecke > 10 cm) bei 30 mA. Die aufgetrennten Proteine wurden entweder direkt im Gel angefärbt oder auf Nitrocellulose übertragen und immundetektiert (2.18.3). Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel 20-30 min in Färber geschwenkt, anschließend wurde der Hintergrund mit Entfärber freigeswaschen. Zur Dokumentation wurde das Gel photographiert (Agfa ortho 25).

Als Protein-Längenstandard wurde eine 10 kDa-Leiter von der Fa. Lifetechnologies eingesetzt:

Proteinmarker in kDa: 200/120/110/100/90/80/70/60/50/40/30/20/10

2.18.2 Fluorographie

Zur Anfertigung einer Fluorographie wurde das Gel mit Coomassie Blue angefärbt und der Hintergrund freigewaschen (2.18.1). Das Gel wurde dann für 30 min in Amplify™-Lösung geschwenkt und auf Whatman GB002 Filterpapier auf einem beheizbaren Gelrockner unter Anlegen eines Vakuums für 1 h getrocknet. Zur Detektion der Radioaktivität wurde ein Röntgenfilm (X-Omat AR, Fa. Kodak) bei Raumtemperatur auf das getrocknete Gel aufgelegt. Der Film wurde anschließend entwickelt (D-19 Entwickler, Fa. Kodak) und fixiert (Unifix, Fa. Kodak).

2.18.3 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western-Blot)

Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose erfolgte direkt nach der Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel (2.18.1) durch das Halbtrockenblotverfahren (Kyhse-Anderson 1984).

Puffer 1:	0,3 M Tris/HCl, pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
Puffer2:	25 mM Tris/HCl, pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
Puffer3:	25 M Tris/HCl, pH 9,4 20 % (v/v) Methanol 40 mM γ -Aminocapronsäure

Für den Transfer wurden die benötigten Filterpapiere (Whatman GB002 Filterpapier) auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten. Es wurden sechs Filterpapiere in Puffer 1 und drei Filterpapiere in Puffer 2 getränkt auf die Graphitanode gelegt. Darauf wurden luftblasenfrei die in Puffer 2 befeuchtete Nitrocellulose und das Gel gelegt. Verbliebene Luftblasen wurden durch Ausstreichen mit einem Glasstab entfernt. Zum Abschluß wurden neun in Puffer 3 getränkte Filterpapiere auf das Gel gelegt und nochmals letzte Luftblasen mit einem Glasstab entfernt. Die Apparatur wurde dann mit der Kathodenplatte verschlossen. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 60-90 min Die auf die Nitrocellulose übertragenen Proteine wurden mit Tinte angefärbt. Die Proteinanfärbung mit Tinte dient zur Kontrolle der Vollständigkeit des Proteintransfers auf die Nitrocellulose und zur Abschätzung der Proteinmenge. Sie ist reversibel

und wurde in einer modifizierten Form nach Hancock und Tsang (1983) durchgeführt.

Tinte:	0,1 % (v/v) Tinte (4001 Königsblau, Fa. Pelikan) 1 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	0,2 M NaOH

Nach dem Blotvorgang wurde die Nitrocellulose 15 min in der Tintenlösung geschwenkt, dabei wurden alle Proteine angefärbt. Der Hintergrund wurde mit Wasser freigewaschen. Anschließend wurde die Proteinfärbung dokumentiert und der Molgewichtsmarker mit einem Kugelschreiber oder einem weichen Buntstift markiert. Die Nitrocellulose wurde dann 5 min in Entfärbelösung geschwenkt und immundetektiert (2.19).

2.19 Immundetektion von Proteinen

Die spezifische Proteindetektion erfolgte mit monoklonalen oder polyklonalen Antisera und einem weiteren Antikörper-Enzymkonjugat.

Block-Puffer 1:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 3 % (w/v) BSA
Block-Puffer 2:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 5 % (w/v) BSA
Puffer A:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 mM NaCl
Puffer A/NP-40	0,05 % (v/v) NP-40 in Puffer A

Die geblokte Nitrocellulose wurde zunächst mit Block-Puffer 1, bei Verwendung des ECLTM-Kits (Fa. Amersham, Braunschweig) mit Block-Puffer 2, über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Nitrocellulose 90 min in einer Verdünnung des CsDnaJ1p- Antiserums (1:1000 in Block-Puffer 1) geschwenkt. Die Nitrocellulose wurde dann viermal je 15 min mit Puffer A, zweimal mit Puffer A/NP-40 und noch einmal mit Puffer A gewaschen.

2.19.1 Immunanfärbung mit Alkalischer Phosphatase

Nach dem ersten Antikörper wurde ein zweiter Antikörper, der gegen die entsprechenden Erstantikörper gerichtet und mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, hinzugegeben. Im Anschluß wurde die Nitrocellulose gefärbt.

2. Antikörper: (Alkalische Phosphatase-Komplex)	0,03 % in Block-Puffer 1
Färbepuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Färbereagenz:	66 µl 10 % NBT in 70 % DMF 33 µl 5 % BCIP in DMF in 10 ml Färbepuffer
Stopp-Lösung:	1 % Essigsäure

Die Nitrocellulose wurde 1 h mit dem zweiten Antikörper in Blockpuffer 1 geschwenkt und anschließend viermal mit Puffer A für je 15 min gewaschen. Im Anschluß färbte man mit 10 ml Färbereagenz und stoppte mit 1 %iger Essigsäure.

2.19.2 Immunanfärbung mit Meerrettich-Peroxidase

Für die Immunanfärbung mit der Meerrettich-Peroxidase wurde nach der Inkubation der Nitrocellulose mit dem ersten Antikörper ein zweiter Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert und gegen die entsprechenden Erstantikörper gerichtet war, verwendet. Die Anfärbung erfolgte mit dem ECLTM-Kit (Fa. Amersham, Braunschweig).

2. Antikörper: 0,1 % in Block-Puffer 1
(Meerrettich-Peroxidase-Komplex)

Die Nitrocellulose wurde 1 h mit dem zweiten Antikörper in Blockpuffer 1 geschüttelt. Es folgten vier Waschschrte mit Puffer A für je 15 min. Im Anschluß wurde die Membran mit 125 µl/cm² eines Gemisches der beiden Lösungen 1 und 2 (Verhältnis 1 : 1) für 30 s inkubiert. Die Lösung wurde dekantiert und die Nitrocellulose in SaranTM-Folie eingeschlagen. Die Detektion der Chemielumineszenz erfolgte mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECLTM) in einer Lichtschutzbox für unterschiedliche Zeiten.

2.20 Mikroskopische Methoden

2.20.1 Präparation von *P. megasperma* für die Hellfeld- bzw. Fluoreszenzmikroskopie

Die Anzucht von *P. megasperma* erfolgte auf sterilen Objektträgern, die mit Limabean-Agar oder 1/10 V8-Agar (in beiden Fällen 1 % Agarose anstelle von Agar) beschichtet und auf zwei Glasstäbe in eine Petrischale überführt wurden. Der Objektträger wurde an einem Ende mit einem Stück Myzel aus einer Plattenkultur inokuliert. Anschließend wurde die Petrischale bis zur Unterkante des Objektträgers mit H₂O befüllt und im Dunkeln bei RT für zwei bis zehn Tage gelagert. Das Inokulum wurde mit einer Rasierklinge von dem Objektträger abgelöst und das Myzel mit einem Deckglas abgedeckt. Die Hellfeld- bzw. Phasenkontrastbilder wurden an einem Lichtmikroskop (Photomikroskop II, Fa. Carl Zeiss) aufgenommen.

2.20.2 Präparation von *P. megasperma* für die *in situ*-Lokalisierung von Proteinen

Die *in situ*-Lokalisierung von Proteinen in Hyphen von *P. megasperma* wurde nach dem Protokoll von Temperli et al. (1990).

Aktin-Stabilisierungs-Puffer:	10 mM Imidazol/HCl, pH 7,0 100 mM KCl 4 mM MgCl ₂ 4 mM EGTA 1 mM Na ₂ ATP
Fixier-Lösung:	Aktin-Stab.-Puf. + 3 % Formaldehyd
Lyse-Puffer:	100 mM MES/KOH, pH 5,8
Lyse-Lösung:	Lyse-Puffer 5 mg/ml Driselase 10 mg/ml Onozuka R-10 Cellulase 10 mg/ml BSA 50 µg/ml Leupeptin
TBS:	20 mM Tris/HCl, pH 7,6 137 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20

Das Myzel wurde für zwei Tage auf Objektträgern angezogen (2.10.1). Zunächst wurde das Inokulum mit einer Rasierklinge entfernt, bevor die Hyphen für 30 min in Fixier-Lösung bei RT inkubiert wurden. Es folgten je zwei Waschschrte mit Aktin-Stabilisierungs-Puffer und mit Lyse-Puffer für jeweils 5 min. Durch einen Verdau mit Lyse-Lösung für 25 min bei RT wurde die Zellwand partiell abgebaut. Zum Entfernen der Driselase und der Cellulase wurde das Myzel zweimal mit Lyse-Puffer und zweimal mit TBS für je 5 min gewaschen. Die Plasmamembran wurde durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,5 % (v/v) Triton X-100/TBS permeabilisiert. Im Anschluß wurde das Detergenz durch fünfmaliges Waschen (5 min) mit TBS entfernt. Nach Inkubation mit 3 % (w/v) BSA/TBS für 10 min und einem Waschschrte mit TBS (10 min) wurde über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper behandelt. Dieser Schrrte erfolgte in einer feucht gehaltenen und mit Parafilm verschlossenen Plastikschrte. Nach sechs Waschschrten mit TBS für je 5 min folgte die Inkubation mit den Farbstoff markierten Zweitantikörper. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei RT in einer feucht gehaltenen Kammer, die zusätzlich mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt wurde. Die Proben wurden noch sechsmal für 5 min mit TBS gewaschen. Die Myzel-Agarose Stücke wurden zum Mikroskopieren auf Objektträger gebracht, mit Vectashield

„Mounting-medium“ betropft und mit Deckgläsern bedeckt. Die Analysen wurden an einem Zeiss-Axiophot- oder Axiovert-Mikroskop durchgeführt. Folgende Zeiss-Filterkombinationen wurden für die entsprechenden Fluoreszenzen verwendet:

Filterkomb. Zeiss Nr	Fluoreszenz-Farbstoff	Anregungsfilter	Farbteilter	Emmisionsfilter
15	Cy3	546 nm	580 nm	590 nm
9	FITC	450-490 nm	510 nm	519 nm
1	DAPI	365 nm	395 nm	397 nm

Die Aufnahmen wurden mit dem 3 CCD INTAS Seescan Videokamera-System dokumentiert (Fa. INTAS, Göttingen).

2.20.3 Immunohistochemie und Immunoelektronenmikroskopie

Die Präparation der Semidünn-Kryoschnitte und der Dünnschnitte für die Elektronenmikroskopie erfolgte nach Aumüller et al. (1997) und wurde in Zusammenarbeit mit A. Dammshäuser und H. Renneberg im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität durchgeführt.

Zwei Tage alte Myzelien wurden in 3 % Formaldehyd in PBS für 12h bei Raumtemperatur fixiert und dreimal in PBS gewaschen. Die Myzelien wurden pelletiert und mit geschmolzener Agarose überschichtet. Die Proben wurden entweder mit dem Jcp-Antiserum oder mit dem Preserum bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde für 2h bei Raumtemperatur mit dem Zweit-Antikörper (Anti-Kaninchen), der mit 10 nm kolloidalen Gold Partikeln dekoriert war, inkubiert. Die Proben wurden für 1h mit 1 %iger OsO₄-Lösung behandelt, mit PBS gewaschen und in Ethanol und Propylenoxid dehydratisiert. Das Einbetten erfolgte in Epon. Die 40 nm Ultra-Dünnschnitte wurden kurz mit Uranylacetat und Bleicitrat behandelt und an einem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop untersucht.

3. Ergebnisse

Eine Vielzahl von homologen Proteinen des DnaJ aus *Escherichia coli* sind aus prokaryotischen und eukaryotischen Zellen untersucht worden. Vor allem bei der Bäckerhefe konnten Homologe des DnaJ hinsichtlich ihrer Struktur, Lokalisation und Funktion gut charakterisiert werden. Bei Oomyceten und filamentösen Pilzen hingegen ist sehr wenig über DnaJ und verwandte Proteine bekannt. Ein dem SIS aus *Saccharomyces cerevisiae* homologen Protein konnte aus *Apiotrichum curvatum* (Specht et al. 1998) und *Phytophthora megasperma* kloniert werden (Specht 1997). Weiterhin wurde bei der Durchmusterung einer cDNA-Bank von *P. megasperma* eine im 5'-Bereich verkürzte cDNA gefunden, die für ein Protein codiert, das eine carboxyterminale J-Domäne besitzt. Es wurde als "J-Domain-containing protein" (*PmJcp*) bezeichnet. Ein weiteres Kennzeichen dieses Proteins ist der N-terminale Bereich mit Tetratricopeptid-Wiederholungen (TPR-repeats).

Zur Charakterisierung des *PmJcp* wurde die cDNA kloniert. Nach der bakteriellen Expression und der Reinigung des rekombinanten Proteins sollte ein polyklonaler Antikörper erzeugt werden, um Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von *PmJcp* durchführen zu können. Durch Vorarbeiten mit Western-Blot-Analysen und einem Antikörper, der gegen das auf der cytosolischen Seite in der glyoxisomalen Membran verankerte DnaJ aus *Cucumis sativus* gerichtet ist (Preisig-Müller und Kindl 1993), konnte in *P. megasperma* bereits ein 53 kDa großes Protein in der mit ER-Membranen angereicherten Fraktion detektiert werden (Porschewski 1997).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte die gesamte cDNA des *PmJcp* kloniert werden. Desweiteren sollte durch Koloniehybridisierung und Screening mit degenerierten Oligonukleotiden als Sonden nach weiteren DnaJ-Homologen und nach möglichen Interaktionspartnern des *PmJcp* gesucht werden.

3.1 Klonierung und Charakterisierung von *PmJcp* und möglichen Partnern

3.1.1 Klonierung von *PmJcp* aus *P. megasperma* und bakterielle Expression des rekombinanten Proteins

Bei der Durchmusterung einer cDNA-Bank aus *P. megasperma* wurde neben dem SIS-homologen Protein die cDNA des *PmJcp* gefunden (Specht 1997). Die cDNA-Sequenz besitzt einen nicht vollständigen, offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid von 339 Aminosäureresten codiert, dies entspricht einer molekularen Masse von 37 kDa. Falls es sich bei dem 53 kDa Protein, das mit *CsDnaJ*-Antiserum in Fraktionen von *P. megasperma* kreuzreagiert, um *PmJcp* handelt, lägen im Falle des *PmJcp* ca. 60 % der Sequenz vor.

3.1.1.1 Klonierung des C-Terminus von *PmJcp* in einen Expressionsvektor

Zur bakteriellen Expression des rekombinanten *PmJcp* wurden die pQE-Vektoren des "QIAExpress"-Systems eingesetzt. Zur Klonierung der cDNA wurde durch PCR mit dem Primerpaar pm8.2PCR1sense(*Sph*I)/pm8.2PCR2antisense(*Hind*III) eine *Sph*I-Schnittstelle im 5' Bereich und eine *Hind*III-Schnittstelle im 3' Bereich der codierenden Region eingeführt. Nach doppelter Restriktionshydrolyse des PCR-Produkts mit *Sph*I und *Hind*III erfolgte die Ligation in den pQE 31-Vektor, so daß eine AS-Sequenz für ein rekombinantes Protein mit der molekularen Masse von 36094 Da resultierte, wobei sich die vorhandene Sequenz N-terminal um die AS-Sequenz MRGSHHHHHHTD verlängerte. Der Expressionsvektor mit der vorhandenen cDNA von *PmJcp* wurde in kompetente Zellen von M15[pREP4] transformiert (2.7.2). Aus positiven Transformanden wurde das Plasmid isoliert und zur Kontrolle des Leserasters sequenziert. Klone mit der richtigen Sequenz wurden zum Test des Expressionsverhaltens des *PmJcp* eingesetzt.

3.1.1.2 Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins

Vorab wurde das Expressions- und Löslichkeitsverhalten des rekombinanten Proteins, im weiteren Verlauf dieser Arbeit als 6xHisJcp bezeichnet, getestet. In Abb. 3.1 ist der zeitliche Verlauf der

Expression zum Zeitpunkt 0 h, vor Zugabe des IPTG, und 5 h nach der Induktion mit IPTG gezeigt. Bereits nach 2-3 h war die maximale Expression erreicht.

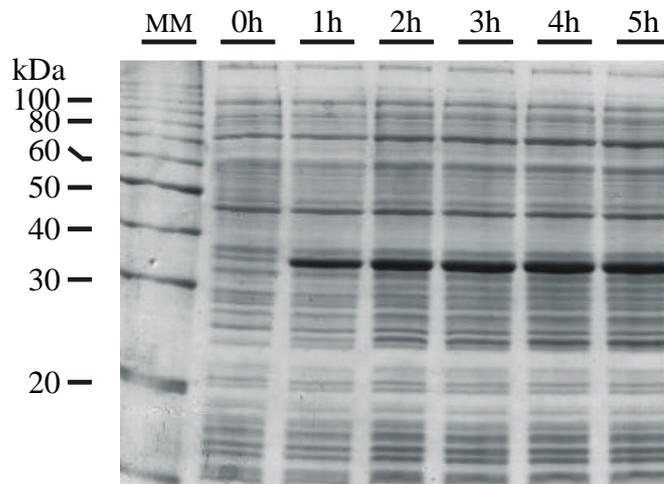


Abb. 3.1: Zeitlicher Verlauf der bakteriellen Expression des rekombinanten His₆-markierten Jcp-Proteins.

Für die Expression wurden 15 ml Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG wurde die Expression induziert. Vor der Induktion (0 h) sowie 1 h bis 4 h nach der Induktion wurden stündlich Aliquote der Bakterienkultur entnommen und durch SDS-PAGE analysiert (2.18).

In Abb. 3.2 ist die Reinigung des His₆-markierten Jcp aus einer 1 l Kultur gezeigt (2.13). Das Löslichkeitsverhalten des rekombinanten Proteins bei der Expression (A, B, Spuren 1, 2) wurde durch Analyse der unlöslichen Bestandteile (A, B, Spur 3) und des löslichen Überstandes (A, B, Spur 4) untersucht. In der Immunanfärbung mit dem gegen die His₆-gerichtete Domäne gerichteten Antikörper (Abb. 3.2 B) ist zu erkennen, daß das His₆-markierte Jcp praktisch vollständig im Überstand vorliegt. In Abb. 3.2 C ist die Reinigung des His₆-markierten Jcp an einer Ni²⁺-NTA-Sepharose-Säule gezeigt. Nach ausgiebigem Waschen wurde das Protein mit einem linearen Gradienten von 20 mM bis 250 mM Imidazol und 40 ml eluiert. Der größte Teil des Proteins wurde bei 70 mM bis 100 mM Imidazol eluiert (Abb. 3.2 C Spur 5-11). Es ließen sich etwa 4 mg rekombinantes 6xHisJcp reinigen. Die Fraktionen 3-13 wurden vereinigt, 16 h bei 4 °C gegen 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,8, 150 mM NaCl dialysiert und in einer Filtron-30-Rührzelle eingengt. Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers wurde das Standardimmunisierungsprogramm der Firma Eurogentec in Anspruch genommen. Als Antigen wurden 1,5 mg des gereinigten His₆-markierten Jcp verwendet.

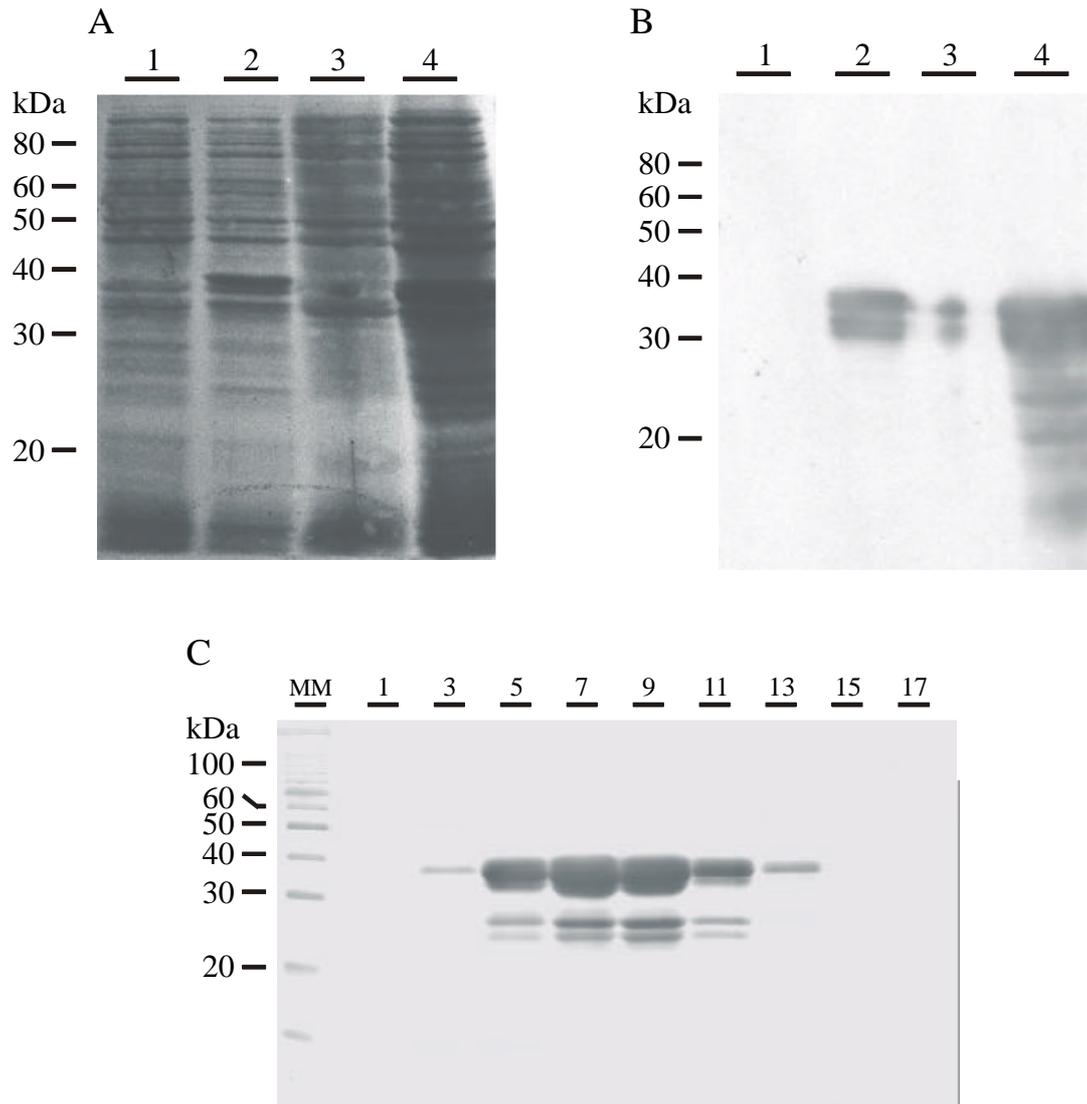


Abb. 3.2: Präparative Reinigung des His₆-markierten Jcp über Ni²⁺-NTA-Sepharose.

Für die Expression wurden eine 1 l Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG wurde die Expression induziert. Vor der Induktion (0 h) sowie 3 h nach der Induktion wurden 500 µl Bakterienkultur entnommen und die Zellen in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach der dreistündigen Induktion wurde die Expressionskultur abzentrifugiert und nach 2.13.2 und 2.13.3 aufgearbeitet. Je 10 µl der 0 h und 3 h Probe, des löslichen Überstandes und der unlöslichen Bestandteile wurden durch SDS-PAGE analysiert und auf Nitrocellulose übertragen. Es folgte eine Immunanfärbung mit His-Tag-Antiserum **B**.

A Tintenanfärbung. (1) 0 h Probe (10 µl). (2) 3 h Probe (10 µl). (3) 10 µl der unlöslichen Bestandteile. (4) 10 µl des löslichen Überstandes. **B** Immunanfärbung mit Antiserum gegen den His-Tag (1:1000). Die Reinigung des 6xHisJcp erfolgte an einer FPLC-Anlage über eine Ni²⁺-NTA-Sepharose-Säule. Nach dem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine mit einem Imidazol-Gradienten von 20 mM bis 250 mM eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert. Die Proteinanfärbung erfolgte mit Coomassie. **C** SDS-PAGE der Reinigung des rekombinanten His₆-markierten Jcp. (1-17) Fraktionen der Reinigung.

3.1.2 Anlegen einer cDNA-Bibliothek und Screening nach DnaJ und Hsp90-Homologen cDNAs

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem SuperScript™ Plasmid System der Firma Life-Technologies, in dem die cDNA asymmetrisch, unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerase Promoters in den Vektor pSPORT kloniert wurde (2.9). Die Präparation der Gesamt-RNA und die Anreicherung der Poly-A⁺-RNA erfolgte nach 2.3.1 und 2.3.2. Die Gesamt-RNA wurde aus einer zwei Tage alten Kultur präpariert. Die Anzucht erfolgte auf Oleat-Medium, um ähnlich wie in Hefen die Proliferation von Peroxisomen zu induzieren (Kunau et al. 1988), bzw. um die Akkumulation von Lipidkörpern als endogene Fettreserven zu erreichen (Feussner und Kindl 1992). Zu einem späteren Zeitpunkt sollte die cDNA-Bibliothek nach Proteinen durchmustert werden, die am Lipidmetabolismus beteiligt sind.

Für das Hyphenwachstum und das Eindringen in die pflanzlichen Zellen sind die Biosynthese von neuen Proteinen, z.B. für die Umstrukturierung des Cytoskeletts, das Überwinden pflanzlicher Abwehrmechanismen und die Zellwandsynthese notwendig. Da Chaperone eine konstitutive Funktion bei der Biosynthese von Proteinen ausüben, erschien deshalb ein frühes Wachstumsstadium als sinnvoll. Die cDNA-Bibliothek wurde in *E. coli* XI-1-Zellen angelegt und umfaßte ungefähr 200000 Klone.

3.1.2.1 Screening nach *PmJcp*

Die Hybridisierung der cDNA-Bibliothek erfolgte mit zwei DNA-Sonden, die aus der bereits vorliegenden Sequenz von *PmJcp* abgeleitet wurde. Das Plasmid pm8.2II/pT7T3 wurde mit *Eco*RII und *Not*I geschnitten. Die beiden daraus resultierenden Fragmente Jcp 868-1222 und Jcp 1267-1902 (die Ziffern beziehen sich auf die Nukleotide in der kompletten Nukleotidsequenz von *PmJcp*) wurden nach der Elektrophorese aus dem Gel eluiert und nach 2.11.1 mit α -[³²P]-dCTP markiert. Die Hybridisierung der A-Filter mit Jcp 868-1222 und der B-Filter mit Jcp 1267-1902 erfolgten unter gleichen Bedingungen mit 50 % Formamid bei 40 °C und ergaben 21 Hybridisierungssignale. Die Southern-Blot-Analyse zeigte, daß alle Klone ein cDNA-Insert enthielten. Nach einem Rescreen wurden die Plasmide von Kolonien, die ein positives Signal ergaben, isoliert und mit den Primern Universal und Reverse ansequenziert. Bei der Sequenzierung zeigte sich bei allen cDNA-Inserts, daß es sich um *PmJcp* handelte. Die beiden

Da die synthetisierte cDNA aufgrund der asymmetrischen Klonierung vor der Ligation in den Vektor mit *NotI* geschnitten wurde, bedeutet dies, daß in dieser cDNA-Bibliothek keine vollständige cDNA von *PmJcp* zu finden war. Das 1500 bp cDNA-Fragment von *Pm4.8.1* umfaßt 457 AS und ergibt rechnerisch ein Molekulargewicht des Proteins von 50130 Da. Die Aufklärung des 5' Bereichs der Nukleotidsequenz erfolgte mit Hilfe der inversen PCR, ausgehend von genomischer DNA (2.8.33.21).

3.1.2.2 Screening und Klonierung von *PmDnaJ*

Da die Homologien von DnaJ-Proteinen nur im Bereich der J-Domäne besonders hoch sind und dort vor allem das HPD-Motiv, wurden Oligonukleotide basierend auf dem Alignment von HPD-Motiven unterschiedlicher DnaJ-Proteine abgeleitet (Abb. 3.3 A). Es ergaben sich zwei markante homologe Bereiche, die fett dargestellt bzw. unterstrichen sind. Die Oligonukleotide ScrDnaJ1 und ScrDnaJ2 wurden entsprechend der Codon-usage von *P. megasperma* abgeleitet (Abb. 3.3 B).

A

	N-term.						C-term.			
<i>ScYdj1p</i>	L	K	Y	H	P	D	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	
<i>ScXdj1p</i>	L	K	H	H	P	D	K	Y	V	
<i>ScScj1p</i>	K	K	Y	H	P	D	K	Y	V	
<i>ScMdj1p</i>	K	K	Y	H	P	D	I	N	K	
<i>CsDnaJ</i>	I	K	N	H	P	D	K	G	G	
<i>AtDnaJ</i>	K	K	F	H	P	D	T	N	R	
<i>EcDnaJ</i>	M	K	Y	H	P	D	R	N	Q	
<i>HsDnaj1</i>	L	K	Y	H	P	D	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	
<i>HsDj2</i>	L	K	Y	H	P	D	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	
<i>HsDnaj2</i>	L	R	Y	H	P	D	K	N	K	
<i>PmSis</i>	L	K	W	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	
<i>PmJcp</i>	L	K	F	H	P	D	R	H	A	

B

Scr.DnaJ-1	CTC	AAG	TAC	CAC	CCG	GAC
	L	K	Y	H	P	D
Scr.DnaJ-2	CAC	CCG	GAC	AAG	AAC	CCG
	H	P	D	K	N	P

Abb. 3.3: Abgeleitete Oligonukleotide aus einem AS-Alignment des HPD-Motivs homologer DnaJ-Proteine

Dargestellt ist das AS-Alignment des HPD-Motivs homologer DnaJ-Proteine, die anhand der Codon-usage-Tabelle von *P. megasperma* in Oligonukleotide umgesetzt wurde. **A** Bereiche, die in sechs AS-Positionen identisch sind, wurden fett bzw. kursiv gekennzeichnet. **B** Abgeleitete Oligonukleotide aus **A**

Die Oligonukleotide wurden nach 2.11.2 mit [γ - 32 P]-dATP markiert. Die Hybridisierung der Filter erfolgte nach 2.10.2 mit 30 % Formamid bei 39 °C. Aus der Hybridisierung der cDNA-Bibliothek resultierten nach dem Rescreen 21 Klone wobei alle cDNA-Inserts mit ScrDnaJ2 ein Hybridisierungssignal ergaben, hingegen der Klon *Pm9.1.1* kein Hybridisierungssignal zeigte. Nach einer Plasmidpräparation aller cDNA-Inserts wurden die Plasmide mit den Primern Universal und Forward ansequenziert. Es handelte sich bei allen Klonen bis auf *Pm9.1.1* um *PmSis*. Der überwiegende Teil davon zeigt die volle Länge der cDNA. Die Sequenz von *Pm9.1.1* ergab, daß der 5' Bereich ebenfalls für eine J-Domäne codiert. Somit gibt es neben dem *PmSis* und *PmJcp* noch mindestens ein weiteres DnaJ-homologes Protein in *P. megasperma*.

3.1.2.3 Sequenz von *PmDnaJ*

Die vollständige Sequenz des Klons *Pm9.1.1* wurde mit den unter 2.1.9 beschriebenen Oligonukleotiden erhalten. Die cDNA codiert für ein Protein von 422 AS mit einem Molekulargewicht von 46640 Da. Bei pH 7,0 hat das Protein eine Nettoladung von -8. In Abb. 3.4 ist die gesamte AS-Sequenz mit der unterstrichenen J-Domäne als charakteristischem Merkmal gezeigt.

```

1 AGCCACC ATG AGC GAG CCC GTG CCC AAG CAG CCC GAG GAG TCC ACG AAC CTG TAC GAG GTG 61
1          M  S  E  P  V  P  K  Q  P  E  E  S  T  N  L  Y  E  V 18
62 CTG GGC GTG GAA AAG TCG GCC AGC GAG CTG GAG ATC AAG ACG GCG TAC CGC AAG CTG GCG 121
19 L  G  V  E  K  S  A  S  E  L  E  I  K  T  A  Y  R  K  L  A 38
122 CTC AAG TAC CAC CCG GAC CGC AAC GCC GGC TCG GCG GAG GCG GCC GAC AAG TTC AAG CTG 181
39 L  K  Y  H  P  D  R  N  A  G  S  A  E  A  A  D  K  F  K  L 58
182 GCC AGC GCC GCG TAC GCC GTG CTG AGC GAC CCC AAT AAG CGG CGC CAG TAC GAC GTG GCC 241
59 A  S  A  A  Y  A  V  L  S  D  P  N  K  R  R  Q  Y  D  V  A 78
242 GGC GAC AGC GGC AAG GAC ATG GAG TTC GAG AGC GTG GAC GTG GAG GCC ATG GGC GGC TTC 301
79 G  D  S  G  K  D  M  E  F  E  S  V  D  V  E  A  M  G  G  F  98
302 GGC CGC GTC GTG GGC GCG CTC TTC ACC AAG ATC GGC ATG CCG ATC CCC ACG CAG ATC TCG 361
99 G  R  V  V  G  A  L  F  T  K  I  G  M  P  I  P  T  Q  I  S  118
362 CAG ACT GTG CTG TCG GCG GCC CGC GAC TTG TGC GAC GAG CGC AAC AAC TCG ACG CAG TTG 421
119 Q  T  V  L  S  A  A  R  D  L  C  D  E  R  N  N  S  T  Q  L  138
422 CCG CAG GTG ACG CAG ATG GTC TTC GGC ATG GAG CGC CAC GCC AAG GTG GAC AAG CAG GAC 481
139 P  Q  V  T  Q  M  V  F  G  M  E  R  H  A  K  V  D  K  Q  D  158
482 GCG CAC TTC TAC AAG CTG CAG GTG GAC AAG GAC CGC GAG TCG GTC GTC TTC ATG TGT CGC 541
159 A  H  F  Y  K  L  Q  V  D  K  D  R  E  S  V  V  F  M  C  R  178
542 TCG GCC ACC AAG AGC AAG TTC AAG CTC GTG CTG TTC GAC CAG CAC GGC GCC GTG CGG ATG 601
179 S  A  T  K  S  K  F  K  L  V  L  F  D  Q  H  G  A  V  R  M  198
602 GTG CAA GAG TCG GTC AAG AAG CCA CGC TGC ACG GCC GCC GAC ATG TAC CTG TCC AGC ACC 661
199 V  Q  E  S  V  K  K  P  R  C  T  A  A  D  M  Y  L  S  S  T  218
662 GTG GAG CTC ATG GAT CTG AAC CCG GAG ATG TGG CCC GGC GCC AAC GGA GAC TCG GAA CTG 721
219 V  E  L  M  D  L  N  P  E  M  W  P  G  A  N  G  D  S  E  L  238

```

722	CCC	GAG	ATC	TTC	AGC	AAA	TTG	TCG	CTC	TTT	GAG	GTG	CGA	CGT	ACC	GTG	GCG	CTC	GAG	AAG	781
239	P	E	I	F	S	K	L	S	L	F	E	V	R	R	T	V	A	L	E	K	258
782	GGC	GAG	CAC	CTC	TTC	TGC	GTC	TAC	GGA	GAC	AAC	TGG	TTG	TCG	GCC	GTC	AAG	TAC	TCG	ATC	841
259	G	E	H	L	F	C	V	Y	G	D	N	W	L	S	A	V	K	Y	S	I	278
842	AAG	TGC	CTC	AAG	ATC	GAC	GAG	CAG	TCG	CCC	GCA	CTG	CAG	AGC	ATC	CAG	CAG	AGC	GAG	CAC	901
279	K	C	L	K	I	D	E	Q	S	P	A	L	Q	S	I	Q	Q	S	E	H	298
902	GAG	CTC	GTA	GGG	ATC	AAG	CAC	GAG	CTC	GAC	TCA	CTG	CAG	AAG	GAG	TAC	GCG	GCG	GCC	AAG	961
299	E	L	V	G	I	K	H	E	L	D	S	L	Q	K	E	Y	A	A	A	K	318
962	AAG	GCG	TTC	GAG	GAA	GTG	TGC	GCC	CGC	GTG	GAG	GCC	AAG	CAG	ATC	CGC	ACG	GAG	GAG	CTG	1021
319	K	A	F	E	E	V	C	A	R	V	E	A	K	Q	I	R	T	E	E	L	338
1022	CTG	CAG	CAG	CGC	GAG	CAG	TCG	TAC	GAG	ACG	TTC	CTC	GCT	GGC	TGC	GAC	CCC	AAC	CAG	GCG	1081
339	L	Q	Q	R	E	Q	S	Y	E	T	F	L	A	G	C	D	P	N	Q	A	358
1082	CTG	GCT	GCC	TTC	GAC	GAA	GGA	CGC	GGA	TCC	AAC	GCG	TCG	CAA	ACC	GGC	CAC	AAG	GGC	TCG	1141
359	L	A	A	F	D	E	G	R	G	S	N	A	S	Q	T	G	H	K	G	S	378
1142	TTG	AGC	GAG	TCT	GCA	AGT	CCC	GCT	GGC	GGC	ATC	CGC	AAC	ATC	TTC	GGC	GGC	TTC	CAG	AAC	1201
379	L	S	E	S	A	S	P	A	G	G	I	R	N	I	F	G	G	F	Q	N	398
1202	CGC	TTC	TTC	GCC	GCT	GGC	AAG	GAG	CGC	ACG	AGC	TCC	ATG	GAC	GCG	GCC	AGC	AAC	GCA	TCA	1261
399	R	F	F	A	A	G	K	E	R	T	S	S	M	D	A	A	S	N	A	S	418
1262	AGC	CAC	AGC	CAT	TAG	AGGGACCAACGGAAGTATAGAAAGCAGTGCAAGAAGCGGCTGACGACCTCAGCGTGGCGA	1336														
419	S	H	S	H	*		423														
1337	ACTGAGAGGGAAGCGACAGTAGGTAGGAGGAGTGACACATTTTAGATTTAGTAGTTAACACTTGGGCTGTGCCTGTAAAA	1416																			
1417	AAAAAAAA	1424																			

Abb. 3.4: Nukleotidsequenz von *PmDnaJ* und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz

Das Stopp-Codon ist mit * markiert, die J-Domäne ist unterstrichen.

Ein Datenbankvergleich mit der abgeleiteten AS-Sequenz ergab die höchste Homologie zu einem ORF hypothetical protein R74.4 aus *Caenorhabditis elegans* (Homologie 52%, Identität 43%). Die J-Domäne von *PmDnaJ* ist zu 40 % mit der J-Domäne von *DnaJ* aus *E. coli* identisch. Der strukturelle Aufbau von *PmDnaJ* ist mit dem von *Hdj1p* aus Mensch zu vergleichen.

3.1.2.4 Screening und Klonierung von *PmHsp90*

In der Gruppe der Hsp90-Proteine finden sich hochkonservierte, molekulare Chaperone, die an der Faltung und Aktivierung einer Reihe von Signaltransduktionsproteinen beteiligt sind. Ein Merkmal dieser Proteine ist, daß sich am C-Terminus eine Bindungsstelle für Hsp90 bindende Proteine mit TPR-Motiven befindet. Bei *PmJcp* könnte es sich möglicherweise um ein Hsp90 bindendes Protein handeln. Zunächst wurden Oligonukleotide anhand konservierter Sequenzmotive von Formen des Hsp90 abgeleitet. In Abb. 3.5 sind die entsprechend der Codon-usage von *P. megasperma* ausgewählten Oligonukleotide gezeigt, die den konservierten Bereich der Hsp90 darstellen.

A

<i>HsHsp90</i>	HNDDEQY	<i>HsHsp90</i>	NMERIMK
<i>ScHsp90</i>	SNDDEQY	<i>ScHsp90</i>	NMERIMK
<i>ZmHsp90</i>	HNDDEQY	<i>ZmHsp90</i>	NMERIMK
<i>SpHsp90</i>	HNDDEQY	<i>SpHsp90</i>	NMERIMK
<i>CaHsp90</i>	HNDDEQY	<i>CaHsp90</i>	NMERIMK
	*****		*****

B

Scr.Hsp90-1	AAC ATG GAG CGY ATY ATG AAG
	N M E R I M K
Scr.Hsp90-2	CAC AAC GAC GAC GAG CAG TAC
	H N D D E Q Y

Abb. 3.5: Oligonukleotidsonden, abgeleitet aus einem AS-Alignment homologer Bereiche von Hsp90 aus Mensch, Bär, Hefe, Mais, Spaltheife und *Candida albicans*

Dargestellt ist das AS-Alignment von zwei homologen Bereichen aus Hsp90, die anhand der Codon-usage-Tabelle von *P. megasperma* in Oligonukleotide umgesetzt wurden. **A** Zwei Bereiche, die in sechs bzw. sieben AS-Positionen identisch sind, **B** Abgeleitete Oligonukleotide aus **A**.

Die Hybridisierung der cDNA-Bibliothek erfolgte mit den nach 2.11.2 markierten Oligonukleotiden ScrHsp90-1 und ScrHsp90-2 mit 30 % Formamid bei 39 °C (2.10.2). Für den Rescreen wurden nur die Klone abgenommen, die mit beiden Nukleotiden Hybridisierungssignale ergaben. Es wurden 18 Klone abgenommen und nach einer Plasmidpräparation ansequenziert. Ein Datenbankvergleich mit den von der cDNA abgeleiteten AS-Sequenzen ergab, daß die Nukleotidsequenzen identisch waren und daß es sich um Hsp90-Homologe handeln. Die Identität des *PmHsp90* zum Hsc80 aus *Lycopersicon esculentum* (Tomate) beträgt 89 %, die Homologie 74 %. Im Vergleich mit dem Hsp82 aus *Oriza sativa* (Reis) ergibt sich eine Identität von 87 % bei einer Homologie von 69 %. Das *PmHsp90* hat als charakteristisches Merkmal für cytosolisch lokalisierte Hsp90-Proteine ähnlich wie die im Cytosol lokalisierten Hsp70-Proteine ein EEVD-Motiv am äußersten C-Terminus. Das cDNA-Insert des Klons *Pm1.9.1* hat eine Größe von 2300 bp. Die in der folgenden Abbildung (Abb. 3.6) gezeigte AS-Sequenz umfasst 706 AS mit einem resultierenden Molekulargewicht von 80355 Da. Bei pH 7,0 hat das Protein eine Nettoladung von -43.

1	AGTCGACGCCCAAGACTCAAGAAACACAGAGAGCACTATG	AGC	GCC	CCG	GAA	GCT	GAG	ACG	TTC	GCC	67	
1		M	S	A	P	E	A	E	T	F	A	10
68	TTC TCG GCC GAC ATC AAC CAG CTG CTG AGT CTG ATC ATC AAC ACG TTC TAC TCG AAC AAG	127										
11	F S A D I N Q L L S L I I N T F Y S N K	30										
128	GAC ATT TTC CTG CGC GAG CTC ATC TCG AAC GCG TCG GAT GCG CTC GAC AAG ATC CGC TAC	187										
31	D I F L R E L I S N A S D A L D K I R Y	50										

188	TCG	TCG	TTG	ACG	GAC	GCC	AGC	GTG	CTG	GAC	ACG	GAC	AAG	AAC	CTG	GAG	ATC	AAG	GTG	ACC	247
51	S	S	L	T	D	A	S	V	L	D	T	D	K	N	L	E	I	K	V	T	70
248	CCG	GAC	AAG	GCC	AAC	GGC	ACG	CTG	ACC	ATC	CAG	GAC	TCG	GGC	ATC	GGC	ATG	ACG	AAG	GCC	307
71	P	D	K	A	N	G	T	L	T	I	Q	D	S	G	I	G	M	T	K	A	90
308	GAC	CTC	ATT	AAC	AAC	CTG	GGT	ACG	ATC	GCC	AAG	TCG	GGC	ACC	AAA	GCC	TTC	ATG	GAG	GCC	367
91	D	L	I	N	N	L	G	T	I	A	K	S	G	T	K	A	F	M	E	A	110
368	CTG	GCC	GCC	GGC	GCC	GAC	ATC	AGC	ATG	ATC	GGC	CAG	TTC	GGC	GTG	GGC	TTC	TAC	TCG	GCC	427
111	L	A	A	G	A	D	I	S	M	I	G	Q	F	G	V	G	F	Y	S	A	130
428	TAC	CTG	GTG	GCC	GAC	AAG	GTG	GTG	GTG	CAC	TCG	AAG	CAC	AAC	GAC	GAC	GAG	CAG	TAC	GTG	487
131	Y	L	V	A	D	K	V	V	V	H	S	K	H	N	D	D	E	Q	Y	V	150
488	TGG	GAG	TCG	GCG	GCC	GGC	GGC	TCG	TTC	ACC	GTG	ACG	CCC	GAC	ACG	ACG	GAG	CCC	ATC	CTG	547
151	W	E	S	A	A	G	G	S	F	T	V	T	P	D	T	T	E	P	I	L	170
548	CGC	GGC	ACG	CGC	ATC	GTG	CTC	AAG	CTC	AAG	GAG	GAC	ATG	CTC	GAG	TAC	CTG	GAG	GAG	CGC	607
171	R	G	T	R	I	V	L	K	L	K	E	D	M	L	E	Y	L	E	E	R	190
608	AAG	CTC	AAA	GAC	CTG	GTG	AAG	AAG	CAC	TCG	GAG	TTC	ATT	GGC	TTC	CCC	ATC	AAG	CTC	TAC	667
191	K	L	K	D	L	V	K	K	H	S	E	F	I	G	F	P	I	K	L	Y	210
668	GTC	GAG	AAG	ACG	GAG	GAG	AAG	GAG	GTG	ACG	GAC	GAC	GAG	GAG	GAG	GAG	GAT	GAG	AAG	GAG	727
211	V	E	K	T	E	E	K	E	V	T	D	D	E	E	E	E	D	E	K	E	230
728	GGC	GAG	GAC	GAC	AAG	CCC	AAG	GTG	GAG	GAG	GTC	GAG	GAG	GAG	GAA	GGC	GAG	AAG	AAG	AAG	787
231	G	E	D	D	K	P	K	V	E	E	V	E	E	E	E	G	E	K	K	K	250
788	AAG	ACG	AAG	AAG	ATC	AAG	GAG	GTG	ACC	CAC	GAG	TGG	GAC	CAC	CTC	AAC	AGC	CAG	AAG	CCC	847
251	K	T	K	K	I	K	E	V	T	H	E	W	D	H	L	N	S	Q	K	P	270
848	ATT	TGG	ATG	CGT	AAG	CCC	GAG	GAC	GTG	ACC	CAC	GAG	GAG	TAC	GCG	TCC	TTC	TAC	AAG	TCG	907
271	I	W	M	R	K	P	E	D	V	T	H	E	E	Y	A	S	F	Y	K	S	290
908	CTG	ACG	AAC	GAC	TGG	GAG	GAG	CAC	GCG	GCT	GTC	AAG	CAC	TTC	TCG	GTG	GAG	GGC	CAG	CTG	967
291	L	T	N	D	W	E	E	H	A	A	V	K	H	F	S	V	E	G	Q	L	310
968	GAG	TTC	AAG	GCC	TGT	CTG	TTT	ACG	CCC	AAG	CGC	GCG	CCG	TTC	GAC	ATG	TTC	GAG	GGC	GGC	1027
311	E	F	K	A	C	L	F	T	P	K	R	A	P	F	D	M	F	E	G	G	330
1028	GCC	AAG	AAG	AAA	GTC	AAC	AAC	ATC	AAG	CTG	TAC	GTG	CGT	CGC	GTG	TTC	ATC	ATG	GAC	AAC	1087
331	A	K	K	K	V	N	N	I	K	L	Y	V	R	R	V	F	I	M	D	N	350
1088	TGC	GAG	GAG	CTC	ATG	CCC	GAG	TAC	CTG	TCG	TTC	GTC	AAG	GGC	GTG	GTC	GAC	TCG	GAG	GAC	1147
351	C	E	E	L	M	P	E	Y	L	S	F	V	K	G	V	V	D	S	E	D	370
1148	CTG	CCG	CTC	AAC	ATT	TCG	CGC	GAG	ACG	CTG	CAG	CAG	AAC	AAG	ATT	CTG	CGC	GTG	ATT	AAG	1207
371	L	P	L	N	I	S	R	E	T	L	Q	Q	N	K	I	L	R	V	I	K	390
1208	AAG	AAT	CTG	GTG	AAG	AAG	TGC	CTC	GAG	ATG	TTC	GCT	GAG	CTG	GCC	GAG	GAC	AAT	GAA	AAG	1267
391	K	N	L	V	K	K	C	L	E	M	F	A	E	L	A	E	D	N	E	K	410
1268	TAC	CAG	AAG	TTC	TAC	GAA	TCC	TTC	TCG	AAG	AAC	CTC	AAG	CTG	GGC	ATC	CAC	GAG	GAC	TCG	1327
411	Y	Q	K	F	Y	E	S	F	S	K	N	L	K	L	G	I	H	E	D	S	430
1328	ACG	AAC	CGC	ACC	AAG	ATC	GCC	AAA	CTG	CTG	CGC	TAC	CAC	TCG	ACC	AAG	TCG	GGC	GAG	GAG	1387
431	T	N	R	T	K	I	A	K	L	L	R	Y	H	S	T	K	S	G	E	E	450
1388	ATG	ACG	TCG	CTG	GAC	GAC	TAC	ATC	TCG	CGC	ATG	CCC	GAG	AGC	CAG	CCT	GGC	ATT	TAC	TAT	1447
451	M	T	S	L	D	D	Y	I	S	R	M	P	E	S	Q	P	G	I	Y	Y	470
1448	GTG	ACG	GGC	GAG	AGC	AAG	AAG	GCG	GTG	GAG	AAC	TCG	CCG	TTC	ATT	GAG	AAG	CTC	AAG	AAG	1507
471	V	T	G	E	S	K	K	A	V	E	N	S	P	F	I	E	K	L	K	K	490
1508	AAG	GGC	TAC	GAG	GTG	CTG	TAC	ATG	GTG	GAG	GCC	ATT	GAC	GAG	TAC	GCT	GTG	CAG	CAG	CTC	1567
491	K	G	Y	E	V	L	Y	M	V	E	A	I	D	E	Y	A	V	Q	Q	L	510
1568	AAG	GAG	TAT	GAG	GGC	AAG	AAG	CTC	ATC	TGC	GCC	ACC	AAG	GAG	GGC	CTC	AAG	ATG	GAG	GAG	1627
511	K	E	Y	E	G	K	K	L	I	C	A	T	K	E	G	L	K	M	E	E	530
1628	ACG	GAG	GAC	GAG	AAG	AAG	GCG	TTC	GAG	GAG	GCC	AAG	GCC	GCC	ACT	GAG	GGC	CTG	TGC	AAG	1687
531	T	E	D	E	K	K	A	F	E	E	A	K	A	A	T	E	G	L	C	K	550
1688	CTC	ATG	AAG	GAG	GTG	CTG	GAT	GAC	AAG	GTG	GAG	AAG	GTG	GAG	ATC	TCG	AAC	CGC	ATT	GTC	1747
551	L	M	K	E	V	L	D	D	K	V	E	K	V	E	I	S	N	R	I	V	570
1748	GAG	TCG	CCC	TGC	GTG	CTC	GTG	ACG	GGC	GAG	TAT	GGC	TGG	TCG	GCC	AAC	ATG	GAG	CGC	ATC	1807
571	E	S	P	C	V	L	V	T	G	E	Y	G	W	S	A	N	M	E	R	I	590

und *NotI* herausgeschnitten und im korrekten Leserahmen in den Vektor pGEX-4T-3 kloniert. Da der Adapter der cDNA und ein Teil des Vektors mitkloniert wurde, entstand ein erweiterter Leserahmen, zwischen den sich vor dem eigentlichen Start-ATG des DnaJ die AS-Sequenz NFRVDPRVRAT anfügte. Dieses Konstrukt wurde ebenfalls in kompetente Zellen von *E. coli* M15[pREP4] transformiert. In beiden Fällen wurden aus positiven Transformanden Plasmidpräparationen durchgeführt und anschließend sequenziert. Entsprechende Klone mit der richtigen Sequenz wurden auf das Expressionsverhalten der beiden rekombinanten Fusionsproteine untersucht.

3.1.3.2. Expression und Reinigung des rekombinanten DnaJ-Homologes aus *P. megasperma*

Zunächst wurde wie bei dem rekombinanten His₆-markierten Jcp das Expressions- und Löslichkeitsverhalten untersucht. In Abb. 3.7 ist der zeitliche Verlauf der Expression des His-Tag DnaJ (Abb. 3.7 A) und des GST-DnaJ (Abb. 3.7 B) gezeigt.

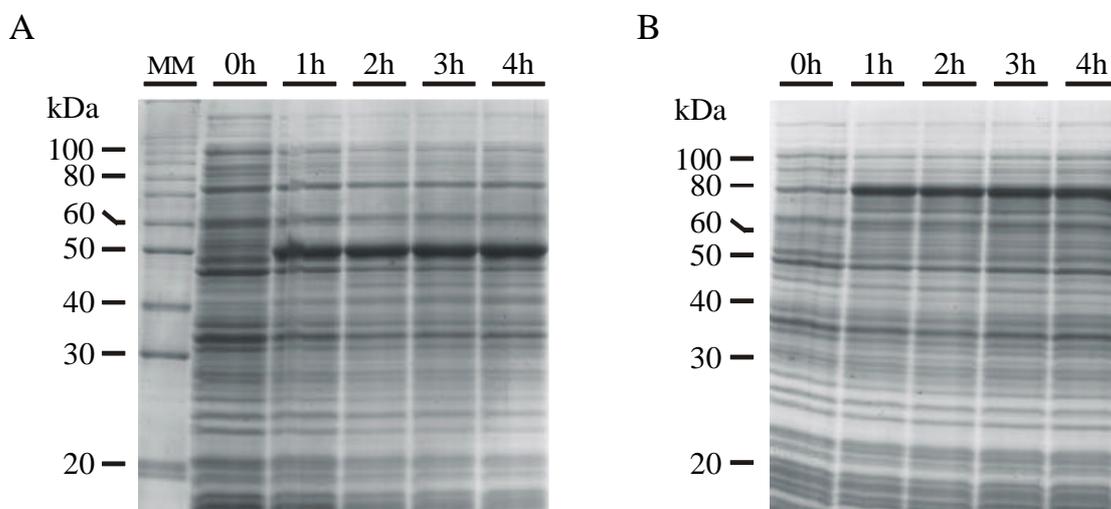


Abb. 3.7: Zeitlicher Verlauf der bakteriellen Expression der rekombinanten Proteine des His₆-markiertem DnaJ und GST-DnaJ

Für die Expression wurden 15 ml Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG wurde die Expression induziert. Vor der Induktion (0 h) sowie 1 h bis 4 h nach der Induktion wurden stündlich 500 µl Bakterienkultur entnommen und je 5 µl durch SDS-PAGE analysiert (2.18). Die Proteinfärbung erfolgte mit Coomassie. **A** Expression des rekombinanten His₆-markierten DnaJ. **B** Expression des rekombinanten GST-DnaJ.

Bereits nach 2 h ist für beide Proteine die maximale Expressionsrate erreicht. Jedoch stellte sich bei der Analyse der unlöslichen Bestandteile und des löslichen Überstandes nach dem Aufschluß

der Zellen heraus, daß beide Fusionsproteine fast ausschließlich unlöslich im Pellet vorlagen. Daraufhin wurde das His₆-markierte DnaJ unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff und pH 8 im Aufschlußpuffer aufgearbeitet. In Abb. 3.8 ist die Reinigung des His₆-markierten DnaJ gezeigt.

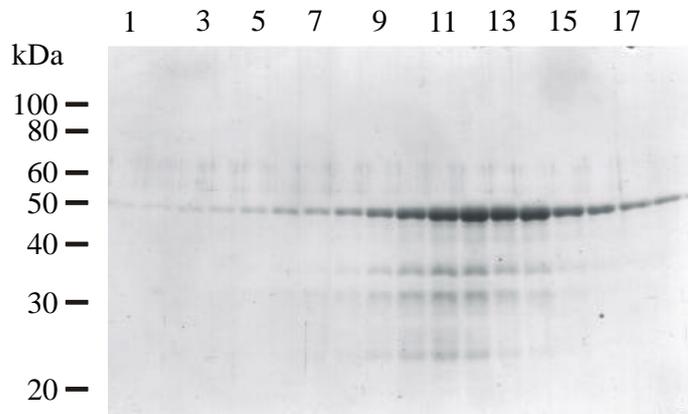


Abb. 3.8: Präparative Reinigung des His₆-markierten DnaJ über Ni²⁺-NTA-Sepharose unter denaturierenden Bedingungen

Eine 1 l große Expressionskultur wurde nach dreistündiger Inkubation mit 0,2 mM IPTG abzentrifugiert und nach 2.13.2 und 2.13.3 unter denaturierenden Bedingungen (Aufschlußpuffer mit 8 M Harnstoff, pH 8) aufgearbeitet. Es folgten zwei Waschschritte bei pH 8 und pH 6,3. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen pH-Gradienten (Vol. 40 ml) von pH 6,3 auf pH 4,5 in 2 ml Fraktionen. Jeweils 10 µl der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die Proteinfärbung erfolgte mit Coomassie.

Nach dem Waschen der Säule mit 8 M Harnstoff/Aufschlußpuffer, pH 8, wurde das Protein mit einem linearen pH-Gradienten von pH 6,3 bis pH 4,5 mit einem Volumen von 40 ml eluiert. Aus einer 1 l großen Expressionskultur ließen sich ca. 20 mg *PmDnaJ* denaturierend reinigen. Die Fraktionen 7-18 wurden vereint, 16 h bei RT gegen 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,8, 150 mM NaCl dialysiert und in einer Filtron-30-Rührzelle eingengt. Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers wurde das Standardimmunisierungsprogramm der Firma Bioscience (Göttingen) in Anspruch genommen. Als Antigen wurden 1,5 mg des gereinigten Proteins verwendet.

3.1.3.3 Klonierung der *PmHsp90* cDNA in einen Expressionsvektor

Zunächst wurde über PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar *PmHsp90*PCR(sense)1/*PmHsp90*PCR(a-sense)2 im 5' codierenden Bereich eine *Bam*HI und im 3' nicht codierenden Bereich hinter dem internen Stop-Codon eine *Hind*III Schnittstelle eingeführt. Dadurch wurden die Aminosäuren M, S und A vom N-Terminus des Hsp90 gegen

den His-Tag mit der AS-Sequenz MRGSHHHHHHTD ausgetauscht. Nach der Restriktionshydrolyse wurde das DNA-Fragment im richtigen Leserahmen in den entsprechend geschnittenen pQE-31-Vektor ligiert und anschließend in kompetente *E. coli* M15[pREP4]-Zellen transformiert. Nach der Plasmidpräparation und der anschließenden Sequenzierung wurde das Expressionsverhalten entsprechender Klone überprüft. Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der Expression mit SDS-PAGE anhand des Proteinmusters analysiert. Da jedoch in der Proteinanfärbung mit Coomassie in der 1 h Probe keine neue Bande bei 90 kDa aufgetreten war, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. In Abbildung 3.9 ist eine Immunanfärbung mit Antiserum gegen das His-Tag-Epitop dargestellt. Das mit dem His-Tag versehene *PmHsp90* hat eine apparente Größe von 90 kDa.

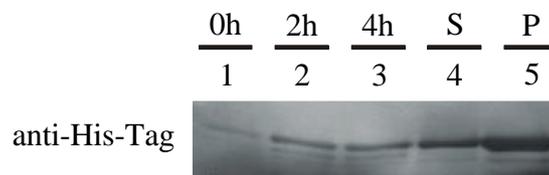


Abb. 3.9: Western-Blot Analyse der bakteriellen Expression von *PmHsp90*

Für die Expression wurden 15 ml Kultur bis zu einer OD_{600} von 1 angezogen. Durch die Zugabe von 0,2 mM IPTG wurde die Expression induziert. Vor der Induktion (0 h) sowie 1 h bis 4 h nach der Induktion wurden stündlich 500 μ l Bakterienkultur entnommen. Nach 4 h Expression wurden die restlichen Bakterienzellen abzentrifugiert, und der lösliche Überstand nach 2.13.2 und 2.13.3 aufgearbeitet. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert und in 500 μ l Aufschlußpuffer resuspendiert. Für die SDS-PAGE wurden je 5 μ l der stündlichen Proben (0 h, 2 h, 4 h) des löslichen Überstandes (S) und der unlöslichen Bestandteile (P) aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und mit His-Tag-Antiserum (1:1000) immundetektiert.

In der 0 h Probe (Spur 1) ist eine basale Expression zu erkennen deren Maximum bereits nach 2 h Induktion mit 2 mM IPTG erreicht ist. Ein Teil des exprimierten Proteins befindet sich im löslichen Überstand (Spur 4). Expressionstests mit anderen positiven Klonen und eine Erhöhung der IPTG-Zugabe auf 3 mM erbrachten das gleiche Ergebnis. Zur weiteren Charakterisierung und zur Feststellung der zellulären Lokalisation wurden zunächst Western-Blot-Analysen mit kommerziell erhältlichen Antiseren gegen Hsp90 durchgeführt, es konnte jedoch keine Kreuzreaktion festgestellt werden.

3.1.4 Expression und Klonierung von *PmJcp*

3.1.4.1 Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA aus *P. megasperma* mit einer *PmJcp*-Sonde

Eine Northern-Blot-Analyse sollte Aufschluß über die Transkriptionsgröße der mRNA von *PmJcp* geben und darüber, wieviele Nukleotide im 5' Bereich von *Pm4.8.1* bzw. *PmJcp* fehlen. Dazu wurden 30 µg Gesamt-RNA von der Präparation eingesetzt, die Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese (2.9.1) war. Die RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylon⁺-Membran transferiert und anschließend hybridisiert (2.10.1). Die Hybridisierung erfolgte mit dem *MvaI* DNA-Fragment von Jcp 1267-1902 unter stringenten Bedingungen mit 50 % Formamid bei 40 °C. Die Markierung der Sonde erfolgte nach 2.11.1. In der Ethidiumbromidanfärbung (Abb. 3.10, Spur 1) ist zu erkennen, daß die aufgetragenen RNA intakt war.

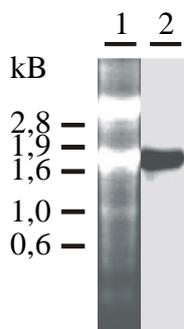


Abb. 3.10: Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA aus *P. megasperma* Kulturen

30 µg Gesamt-RNA von zwei Tage alten Kulturen (2.3.1) wurden auf einem denaturierenden Gel aufgetragen und auf Nylon⁺-Membran übertragen (2.10.1). Die Hybridisierung erfolgte mit dem radioaktiv markierten Fragment von *PmJcp* (2.11.2) in 50 % Formamid bei 40 °C. Die Autoradiographie dauerte 10 h. (1) Ethidiumbromidanfärbung der aufgetrennten Gesamt-RNA (2) Autoradiographie des Northern-Blots.

Die Northern-Blot-Analyse zeigt ein Hybridisierungssignal mit dem Jcp 1267-1902 -Fragment bei 1,7-1,8 kb (Abb. 3.10, Spur 2). Das bedeutet, daß das cDNA-Insert von *Pm4.8.1* im 5' Bereich vor der *NotI*-Schnittstelle um ca. 150-200 bp verkürzt ist.

3.1.4.2 Inverse-PCR mit genspezifischen Primern für *PmJcp*

Unbekannte DNA-Bereiche, die in der Nachbarschaft von bekannten Sequenzen liegen, können mit Hilfe von inverser PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Dazu wurde genomische DNA aus *P. megasperma* präpariert (2.4.1). Durch DNA-Agarosegelelektrophorese (2.4.4) wurde überprüft, daß die DNA während der Präparation nicht übermäßig durch

Scherkräfte fragmentiert wurde. Die genomische DNA (10 µg) wurde mit *PstI* geschnitten und anschließend in einer Verdünnungsreihe mit T4-Ligase religiert. Mit dem genspezifischen Primerpaar IPCR1/IPCR2, das nach außen in Richtung des 5' Bereichs gerichtet ist, wurde eine PCR durchgeführt. In Abb. 3.10.1 ist die Analyse des DNA-Fragments nach der IPCR gezeigt. Mit dem Primerpaar IPCR1/IPCR2 wurde ein Fragment von ca. 700 bp erhalten. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel eluiert, in den Vektor pCR-TOPO-TA (Fa. Invitrogen) kloniert und damit *E. coli* TOP10 transformiert. Nach einem blau/weiß Screening wurden von entsprechenden Klonen Plasmidpräparationen durchgeführt und mit den Primern Universal, Forward und Seq4.8.1N1a sequenziert. Der unbekannte 5' Bereich von *PmJcp* konnte so sequenziert werden.

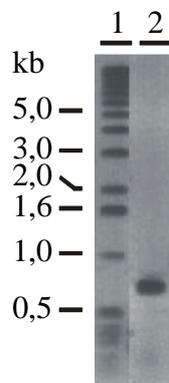


Abb. 3.10.1: Analyse des DNA-Fragments, das durch inverse PCR aus genomischer DNA erhalten wurde

Nach Restriktionshydrolyse von 10 µg genomischer DNA mit *PstI* wurden die erhaltenen Fragmente mit T4-Ligase zirkularisiert. Anschließend wurde mit dem genspezifischen Primerpaar IPCR1/2 die inverse PCR durchgeführt. Es konnte ein 700 bp großes Fragment amplifiziert werden. (1) Molmarker 10 (Fa. Roche) (2) 0,7 kb-Fragment nach inverser PCR mit den Primern IPCR1/2.

Er wird von der IPCR1 Sequenz bzw. von der bekannten Randsequenz von *PmJcp* mit der *NotI*Schnittstelle und der wiederhergestellten *PstI*-Schnittstelle und der dahinterliegenden bekannten Sequenz von *PmJcp* eingerahmt. In Abb. 3.11 ist die Nukleotid- und die abgeleitete AS-Sequenz des mit IPCR erhaltenen genomischen DNA-Fragments abgebildet. Es konnte ein Leserahmen abgeleitet werden, der mit einem ATG an Position 152 beginnt. Dieses Methionin liegt im selben Leserahmen, der für *PmJcp* aus *Pm4.8.1* abgeleitet wurde.

```

1                                     CTGCAGTGTAGATGAAGCCATGACAATATGGCTACATTGCTACTTACCCAAATTAATTTA      60
61 TGTGTAAAACTTAATTTATTTATGTGTGCGAACACTATTCGATGTAGTACACACGCTGGACCAATTTTTTACTTGAGTTGAGTATGCTGGA ATG TTC 157
1                                     M F 2

158 GAG AAA ACT TCC CAC TTG TTG GAT CGT GTT TTG TGT GGG CCA AAG TGG AAA TTG ACT GGG GCT GGC GGC TTC CAG 232
3 E K T S H L L D R V L C G P K W K L T G A G G F Q 27

233 GTG CAC GGG GTG ACG GAC GGA AAC ACA CAG GCA GCC ATG ACG GAC GCG ACG GCC GAG GAG TTC AAA GCG CAG GGC 307
28 V H G V T D G N T Q A A M T D A T A E E F K A Q G 52

308 AAC GAG CTG TAT AAG CGC GGG GAC TAC CAG CGC GCC ATC GAC AAG TAC ACG CAG GCC ATC GAC GCC GCC CCG ACG 382
53 N E L Y K R G D Y Q R A I D K Y T Q A I D A A P T 77

383 GTG GTA GCC TAC TAT GGC AAC CGT GCG GCC GCG TCC TTC ATG CTG GGC AAG CAC AAG GAC GTG ATC ACG GAC TGC 457
78 V V A Y Y G N R A A A S F M L G K H K D V I T D C 102

458 AAC CGT GCC ATC GTC TTC GAC CCG CTG TAT TTC AAG GGT TAC GTG CGC AAG GCC AAG GCG CAG TTG GCA CTG GGT 532
103 N R A I V F D P L Y F K G Y V R K A K A Q L A L G 127

```

```

533 GAC AAT GAT GCC GCC ATG AAG ACG TAC CAG ACC GGA CTG GTG CGC GAC CCC AAC AAC GCC ACG CTG ATC AAC GAG 607
128 D N D A A M K T Y Q T G L V R D P N N A T L I N E 152

608 AAG CGC ACG CTC GAG ATG GCA CTC
153 K R T L E M A L

```

Abb. 3.11: Nukleotidsequenz des mit IPCR erhaltenen genomischen DNA-Fragments und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz

Das Start-Methionin und ATG an Position Nr. 151 sowie das Methionin und ATG an Position Nr. 269 liegen in einem offenen Leserahmen. Sie sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die *NotI*-Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen. Die Lage des Primers IPCR1 ist grau unterlegt. Position Nr. 201 gibt die Stelle () an, an der der G/C-Gehalt stromaufwärts unter 50 % fällt und stromabwärts bei ca. 60 % liegt.

Die gesamte Nukleotid-Sequenz und die abgeleitete Protein-Sequenz von *PmJcp* ist in Abb. 3.11.1 dargestellt.

```

1                                     CTGCAGTGTAGATGAAGCCATGACAATATGGCTACATTGCTACTTACCCAAATTAATTTA 60
61 TGTGTA AAAACTTAATTTATTTATGTGTCGAACACTATTCGATGTAGTACACACGCTGGACCATTTTTTTACTTGAGTTGAGTATGCTGGA ATG TTC 157
1                                     M F 2

158 GAG AAA ACT TCC CAC TTG TTG GAT CGT GTT TTG TGT GGG CCA AAG TGG AAA TTG ACT GGG GCT GGC GGC TTC CAG 232
3 E K T S H L L D R V L C G P K W K L T G A G G F Q 27

233 GTG CAC GGG GTG ACG GAC GGA AAC ACA CAG GCA GCC ATG ACG GAC GCG ACG GCC GAG GAG TTC AAA GCG CAG GGC 307
28 V H G V T D G N T Q A A M T D A T A E E F K A Q G 52

308 AAC GAG CTG TAT AAG CGC GGG GAC TAC CAG CGC GCC ATC GAC AAG TAC ACG CAG GCC ATC GAC GCC GCC CCG ACG 382
53 N E L Y K R G D Y Q R A I D K Y T Q A I D A A P T 77

383 GTG GTA GCC TAC TAT GGC AAC CGT GCG GCC GCG TCC TTC ATG CTG GGC AAG CAC AAG GAC GTG ATC ACG GAC TGC 457
78 V V A Y Y G N R A A A S F M L G K H K D V I T D C 102

458 AAC CGT GCC ATC GTC TTC GAC CCG CTG TAT TTC AAG GGT TAC GTG CGC AAG GCC AAG GCG CAG TTG GCA CTG GGT 532
103 N R A I V F D P L Y F K G Y V R K A K A Q L A L G 127

533 GAC AAT GAT GCC GCC ATG AAG ACG TAC CAG ACC GGA CTG GTG CGC GAC CCC AAC AAC GCC ACG CTG ATC AAC GAG 607
128 D N D A A M K T Y Q T G L V R D P N N A T L I N E 152

608 AAG CGC ACG CTC GAG ATG GCA CTC GAC AAG CTC CAG CGC GGC AAG GAG CAC CTC GCG GCG GGC CGG TTC TCG CAG 682
153 K R T L E M A L D K L Q R G K E H L A A G R F S Q 177

683 GCT GTG AAC GTG TTT GAC AGC GCC ATG CAG GTG TGC TCA GGC TCC AGT CAA CTC AAG CTC ATG CGC AGC GAG GCG 757
178 A V N V F D S A M Q V C S G S S Q L K L M R S E A 202

758 CTG ATC GGC TCC GAG CGT TAC GAC GAG GCT TTC GCT GAG CTG ACG AGG CTC ATG CGC ACG AAC TCG AGC AGC CCC 832
203 L I G S E R Y D E A F A E L T R L M R T N S S S P 227

833 GAG GTG CTT TTC CAA CGT GCA CGC TGC CTG TAC TAC CAG GGC GAG TTC CCC AGC GCC ATT AAG CAC CTG CAG CAG 907
228 E V L F Q R A R C L Y Y Q G E F P S A I K H L Q Q 252

908 GCG CTG CGC TCC GAC CCG GAC AAC AGC AAG TGC ATG AAG GAG ATC AAG CGC ATC CGC AGT CTG GAA AGC AGC AAG 982
253 A L R S D P D N S K C M K E I K R I R S L E S S K 277

983 GAG GGT GCC AAC AAC GCC TTC AAG AGC GGC AAG ATG GCC GAG GCC GTC GAG ATG TAC ACG GAG TGT CTA AAG ATC 1057
278 E G A N N A F K S G K M A E A V E M Y T E C L K I 302

1058 GAC CCG CAG AAC AAA GCG TTC AAC TCG AAG ATC CAC TGC AAC CGA GCC AAC GCG CTG TCC CGG CTG TAC CGA CAT 1132
303 D P Q N K A F N S K I H C N R A N A L S R L Y R H 327

1133 GAC GAG GCC ATC AAG GAC TGC GAC AAG GCC ATC TAC TAC GAC CAC GGC TAC GCC AAG GCA TAC CTC CGC AAG GCG 1207
328 D E A I K D C D K A I Y Y D H G Y A K A Y L R K A 352

1208 GCC TGC TTG AAG GCC CTG GGC GGG CTG GAG AAC CTG GAG CAG GCG CTG CGC GTC TAC GAC CAG GCT TCG AAA CTG 1282
353 A C L K A L G G L E N L E Q A L R V Y D Q A S K L 377

1283 GTG GGC GAC GAC GCC CAG CGC GAC ATC CAG AAC AAC ATT CGC CAG ACC AAG CTG GAC ATC AAG AAG GCC AAG CGC 1357
378 V G D D A Q R D I Q N N I R Q T K L D I K K A K R 402

1358 AAG GAC TAC TAC AAG ATT TTG AAC GTC GCG CAG GGC GCC ACG GAG GCT GAG ATC AAG AAG TCG TAC AAG AGG ATG 1432
403 K D Y Y K I L N V A Q G A T E A E I K K S Y K R M 427

1433 GCG CTC AAG TTC CAC CCG GAT CGT CAC GCG GGC AAG ACG GAC GAG CAG AAA GCT GAG GCC GAG GCG GCC TTC AAG 1507
428 A L K F H P D R H A G K T D E Q K A E A E A A F K 452

1508 GAC GTG GGC GAG GCT TAC GCG GTG CTG TCG GAC CCG CAA AAG CGG CAG CGC TAC GAC TCG GGA GTG GAT CTC GAG 1582
453 D V G E A Y A V L S D P Q K R Q R Y D S G V D L E 477

```

```

1583 GAC CTC GAC AGC GAC TTT GGC GGA GGT GGC ATG GGC GGC GGC ATG GGC GGC GTG GAC CCG TCG CAG ATC TTC CAG 1657
478 D L D S D F G G G G M G G G M G G V D P S Q I F Q 502

1658 ATG TTC TTC GGC GGT GGC GGC GGT ATG GGA GGC ATG GGC GGA ATG GGC GGC ATG GGA GGA ATG GGT GGA GGC ATG 1732
503 M F F G G G G G M G G M G G M G G M G G M G G G M 527

1733 GGT GGT GGC GGC ATG GGC GGT ATG GGC GGC CAG CGA TAC CAC TTC GGC TAG AGAGAAGAGAAAGGCTTGCAGGTTCCGTGTT 1814
528 G G G G M G G M G G Q R Y H F G * 544

1815 GTAGTGTTCGGATACAGACGACAGACAGACAGAAAGTGTAAAGCGCGCATCAATAATAATGGTTCGTGCATGCTTCCGAAAAAAAAA 1902

```

Abb. 3.11.1: Nukleotidsequenz von *PmJcp* und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz

Das Start-Methionin und ATG an Position Nr. 151 sowie das Methionin und ATG an Position Nr. 269 sind durch Fettdruck hervorgehoben. Das Stopp-Codon ist mit * markiert. Die J-Domäne ist unterstrichen.

Die gesamte *PmJcp* AS-Sequenz ergibt eine berechnete molekulare Masse von 59531 Da. Bei pH 7,0 hat das Protein eine Nettoladung von +11. Die höchste Ähnlichkeit zeigt *PmJcp*, unter Berücksichtigung der Gesamtsequenz, zu P58 aus Mensch. Die Homologie beträgt 40 % und die Identität 27 %. Die Charakterisierung der TPR-Domäne wird eingehender in 4.3 beschrieben. Der N-terminale Bereich von *PmJcp* mit den TPR-Domänen hat im Vergleich zu Sti1p aus Hefe eine Homologie von 38 % und eine Identität von 18 %.

3.1.4.3 Klonierung des codierenden Bereichs von *PmJcp* unter Kontrolle des SP6-Promotors und Analyse der apparenten Größe

Durch PCR-Amplifikation wurde der noch fehlende 5'-Bereich von *PmJcp* mit dem Primerpaar GenJcp5'HindIII(sense)/PCRGenJcp3'NotI(a-sense) amplifiziert. Die Lage des Primers im 5' Bereich wurde so gewählt, daß noch ca. 50 bp des 5' nicht codierenden Bereichs im PCR-Produkt vorhanden waren. Das erhaltene Produkt wurde nach Klonierung in den pCR-TOPO-TA (Fa. Invitrogen) und Sequenzierung mit *HindIII* und *NotI* herausgeschnitten und in pSL1180 kloniert (pSL-Jcp1-400). Danach wurde ein *NotI/PstI*-Fragment aus *Pm4.8.1* in pSL-Jcp1-400 kloniert und als pSL-Jcp1-800 bezeichnet. Der noch fehlende 3' Bereich wurde mit *PstI* und *EcoRI* aus pmII8.2 herausgeschnitten und in pSL-Jcp-1-800 kloniert. Das Plasmid mit der kompletten Sequenz wurde mit pSL-Jcp bezeichnet. Damit die cDNA *in vitro* transkribiert und die resultierende mRNA translatiert werden kann, wurde der codierende Bereich aus pSL-Jcp mit *HindIII* und *EcoRI* herausgeschnitten und unter Kontrolle des SP6-Promotor in pSPORT1 kloniert. Nach der Transformation dieses Plasmids und anschließender Sequenzierung wurden Plasmide mit der korrekten Sequenz für die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation eingesetzt (2.14). Von einem Standardtranslationsansatz (50 µl) wurden 5 µl für eine SDS-PAGE und anschließende Fluorographie eingesetzt (Abb. 3.12). Als Größenstandards wurden folgende,

radioaktiv markierte Proteine auf das Gel aufgetragen: Luciferase aus *Photinus pyralis* (61 kDa, Spur 3), Thiolase aus *Cucumis sativus* (48 kDa, Spur 2) und Sis1p aus *P. megasperma* (39 kDa, Spur 1). In Spur 4 sind zwei Banden mit den apparenten Größen von 59 kDa und 55 kDa zu erkennen. Das Laufverhalten im Gel stimmt mit den berechneten Molekulargewichten für die beiden offenen Leserahmen von *PmJcp* überein. Mit dem Antiserum von *PmJcp* sollte die apparente Größe von *PmJcp* in Extrakten von *P. megasperma* mit den *in vitro* translatierten Proteinen verglichen werden. In Abbildung 3.12, Spur 5-8 ist die Immunanfärbung von *PmJcp* zu sehen. In der Fraktion P100 (Spur 5) wird Jcp bei 55 kDa angefärbt. Wie erwartet werden die zwei Proteine bei 59 und 55 kDa in der Probe mit dem *PmJcp*-Translationsansatz angefärbt (Spur 6). Als Negativkontrollen wurden 5 µl von Retikulozytenlysat (mit SP6-RNA-Polymerase) ohne *PmJcp*-Plasmid (Spur 7) und 5 µl eines Standardtranslationsansatzes von Retikulozytenlysat (mit T7-RNA-Polymerase) mit *PmJcp*-Plasmid aufgetragen (Spur 8).

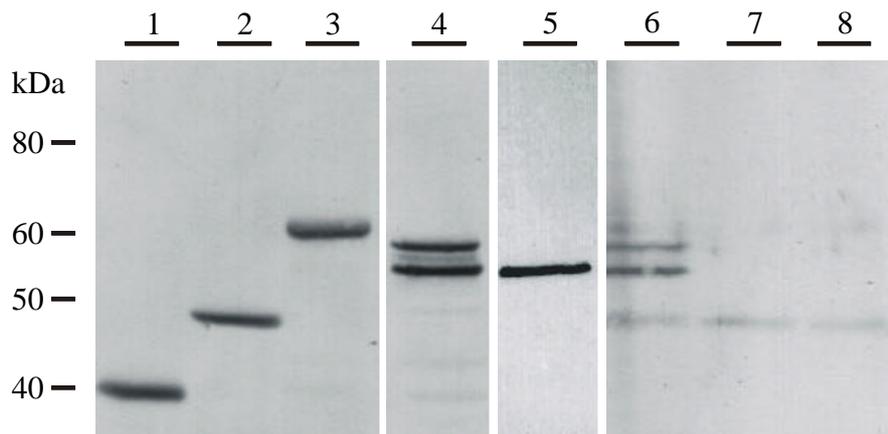


Abb. 3.12: Western-Blot-Analyse und Vergleich der apparenten Größe von *PmJcp* und Markerproteinen nach der Translation *in vitro*.

Das Konstrukt von Jcp in pSPORT1 wurde durch gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert (2.14). Auf die gleiche Weise wurden Luciferase aus *Photinus pyralis*, CsThiolase und *PmSis* hergestellt. Die Proteine wurden durch SDS-Page aufgetrennt und über Fluorographie analysiert. Auf dem Gel wurde 1/10 eines Translationsansatzes aufgetragen (Spuren 1-4). In Spur 5 wurde ein Aliquot des Niederschlags einer 100000 x g Zentrifugation (P100) aufgetragen und in einer Immunanfärbung mit 1/10 des *PmJcp*-Translationsansatzes (Spur 6) verglichen. In Spur 7 und 8 sind Retikulozytenlysat mit der SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase zur Kontrolle aufgetragen. (1) SIS aus *P. megasperma*. (2) Thiolase aus *C. sativus*. (3) Luciferase aus *Photinus pyralis*. (4) *PmJcp*. (5-8) Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum. (5) P100 (50 µg Protein). (6) *PmJcp* 1/10 des Transationsansatzes. (7) und (8) Retikulozytenlysat je 1/10 eines Normalansatzes.

Es ist keine Anfärbung zu erkennen. Demzufolge handelt es sich bei den beiden detektierten Proteinen in Spur 6 der Abbildung 3.12 um die gleichen wie auch in der Fluorographie in Spur 4. Das bedeutet, daß der zweite Leserahmen in der Sequenz von *PmJcp* mit dem Start-ATG an

Position 151 und das daraus resultierende Peptid die vollständige Sequenz von *PmJcp* enthält. Um die Stabilität der Produkte und eine mögliche Schnittstelle für eine Protease, die das 59 kDa große Jcp in die 55 kDa-Form umwandelt, zu überprüfen, wurden je 5 µl eines Translationsansatzes nach Beendigung der Translation mit 20 µl Rohextrakt aus einer *P. megasperma* Aufarbeitung inkubiert. In einem zweiten Versuch wurde der Translationsansatz über die normale Inkubationszeit von 1 h hinaus noch für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. In Abbildung 3.13 ist das Ergebnis dargestellt. Die Spuren 1-6 zeigen die Reaktionsansätze des *in vitro* translatierten Jcp nach Inkubation mit Rohextrakt. Die Proben des Translationsansatzes, die ohne Rohextrakt für weitere 2 h inkubiert wurden, sind in den Spuren 7-12 aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß sowohl die 59 kDa-Form von Jcp als auch die 55 kDa-Form nicht proteolytisch abgebaut wird, sondern stabil vorliegt. Aufgrund der Western-Blot-Analyse in Abb. 3.13 ist davon auszugehen, daß die 55 kDa-Form des Jcp mit dem ATG-Codon an Position 269 dem im Rohextrakt zu erkennenden *PmJcp* (55 kDa) entspricht.

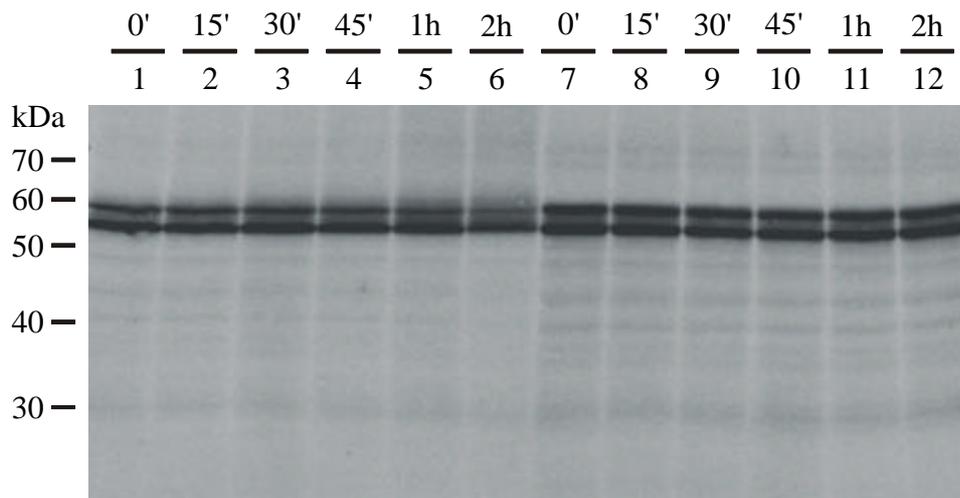


Abb. 3.13: Fluorographie des *in vitro* translatierten Jcp nach Inkubation mit und ohne Zugabe eines Rohextraktes von *P. megasperma*.

Jeweils 5 µl eines radioaktiv markierten (^{35}S -Methionin) Translationsansatzes von Jcp wurde für die angegebenen Zeiten mit (1-6) und ohne 20 µl Rohextrakt (7-12) bei 30 °C inkubiert. Die Proteine der Ansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und über Fluorographie ausgewertet.

3.1.5 Klonierung und Reinigung dreier cytosolischer Isoformen von Hsp70 als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase

Für das P58 aus Mensch konnte eine Interaktion mit Hsp70 gezeigt werden; es konnte auch die ATPase-Aktivität von Hsp70 steigern (Melville et al. 1999). Eine ähnliche Funktion ist für das *PmJcp* denkbar. Für die Untersuchungen standen drei cytosolische Hsp70-cDNA-Klone aus *P. megasperma* zur Verfügung. Diese wurden in den Expressionsvektor pGEX kloniert, bakteriell exprimiert und anschließend als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase über Glutathion-Agarose gereinigt.

3.1.5.1 Klonierung der cDNA der Hsp70-Isoformen in Expressionsvektoren

Über PCR-Amplifikation wurden in die jeweiligen cDNA-Iserts geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Restriktionsschnittstellen und Primer für die Klonierung der Hsp70 cDNA

Hsp70-Isoform	Schnittstellen		Primer	pGEX-Vektor
	5'	3'		
Hsp70-1 (<i>Pm5.2.3</i>)	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	PCR5.2.3pGEXsense PCR5.2.3pGEXa-sense	pGEX-4T-3
Hsp70-2(<i>Pm14.3</i>)	<i>Bam</i> HI	<i>Not</i> I	PCR14.1pGEXsense PCR14.1pGEXa-sense	pGEX-5X-2
Hsp70-3 (<i>Pm17.1.2</i>)	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	PCR17.1.2pGEXsense PCR17.1.2pGEXa-sense	pGEX-4T-3

Nach der Klonierung in den pPCR-Vektor (Fa. Stratagene) und Transformation in *E. coli* XI-10, wurden von positiven Transformanden Plasmidpräparationen im Midi-Maßstab gemacht und die Hsp70-cDNA mit den vorgesehenen Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden in die entsprechend geschnittenen pGEX-Vektoren ligiert. Als Wirtszellen für die hergestellten Expressionsvektoren dienten *E. coli* M15[pREP4]. Nach der Transformation der Expressionsplasmide wurde das Expressions- und Löslichkeitsverhalten der rekombinanten Proteine überprüft. Die Abbildung 3.14 A zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression zum Zeitpunkt 0 h vor Zugabe des IPTG (Spuren 1, 5 und 9) und 3 h nach der Induktion mit IPTG (Spuren 2, 6 und 10).

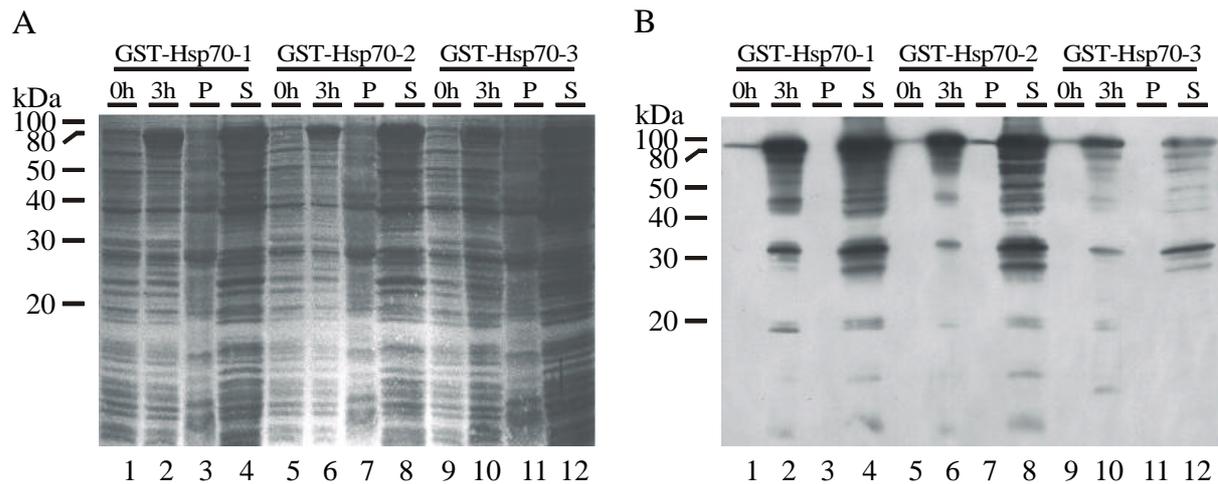


Abb. 3.14: Analyse der bakteriellen Expression der drei GST-Hsp70 Fusionsproteine.

Zur Expression von Hsp70 wurden Kulturen (1 l) bis zu einer OD_{600} von 1 angezogen. Vor der Induktion mit IPTG wurden 1 ml Bakterienkultur abgenommen, die Bakterien sedimentiert, in 100 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 μ l auf ein SDS-Gel aufgetragen (0 h). Nach der Induktion mit 0,2 mM IPTG für 3 h bei 20°C wurden die Zellen abzentrifugiert, in 10 ml Aufschlußpuffer resuspendiert und aufgeschlossen (2.13.4). Zuvor wurde wieder 1 ml Kultur entnommen und das Bakterienpellet in 100 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen (3 h). Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert, in 3 ml Aufschlußpuffer resuspendiert (P) und 10 μ l auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Überstand (S) wurde für die weitere Reinigung verwendet. Für die SDS-PAGE wurden vom Überstand 10 μ l auf das Gel aufgetragen. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose erfolgte eine Immunanfärbung mit GST-Antiserum. **A** Tintenanfärbung. **B** Immunanfärbung mit GST-Antiserum (1:1000).

Das Löslichkeitsverhalten der rekombinanten Proteine während der Expression wurde durch Analyse der unlöslichen Bestandteile (P) (Spuren 3, 7 und 11) und der löslichen Überstände (S) (Spuren 4, 8 und 12) untersucht. In der Immunanfärbung (Abb. 3.14 B) mit dem GST-Antikörper ist zu sehen, daß die GST-Hsp70-Fusionsproteine praktisch vollständig löslich im Überstand (B, Spuren 4, 8 und 12) vorliegen. Die Reinigung erfolgte nach 2.13.4. Die gereinigten Proteine sind in Abb. 3.15 A dargestellt. Es wurden Immunanfärbungen mit den CsHsp70- (B) und DnaK-Antiseren (C) durchgeführt. Bei den Fragmenten bei 32 kDa, 45 kDa, 52 kDa und 62 kDa handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte, die auch vom GST-Antikörper erkannt werden (Abb. 3.14 B, Spuren 4, 8 und 12) aber nicht vom CsHsp70-Antikörper, der gegen ein 16 kDa Fragment des C-Terminus einschließlich des EEVD-Motivs gerichtet ist.

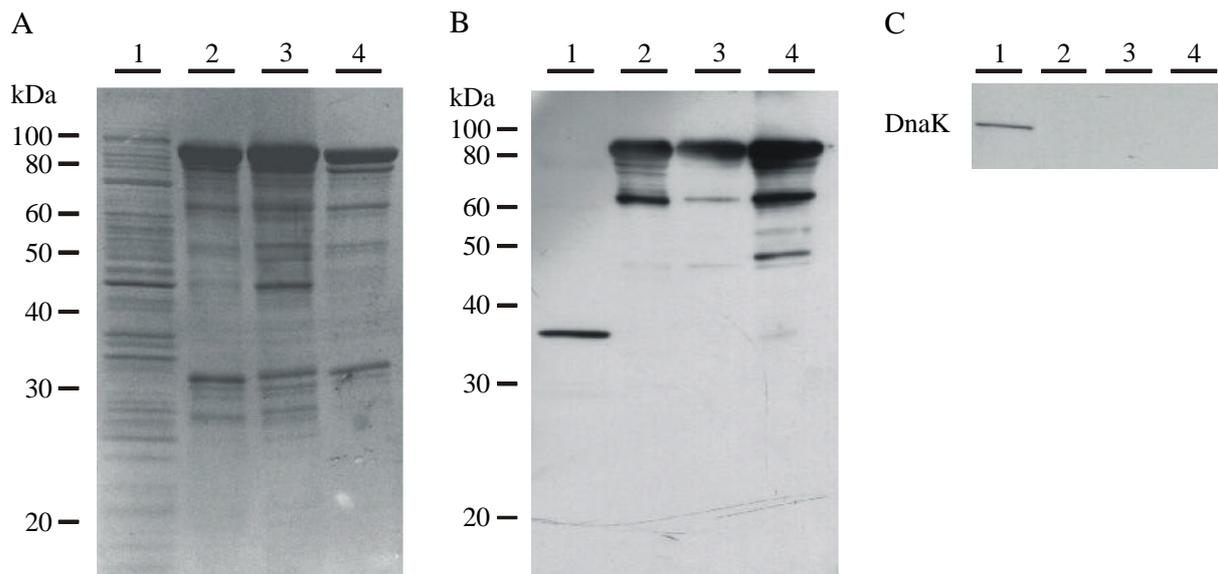


Abb. 3.15: Analyse der über GSH-Agarose gereinigten GST-Hsp70-Fusionsproteine.

Bakterienkulturen (1 l) wurden mit 0,2 mM IPTG induziert und für 3 h bei 20°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, aufgeschlossen und der klare Überstand für 16 h bei 4°C mit GSH-Agarose inkubiert. Danach wurde das Affinitätsmaterial in eine Säule überführt, gewaschen und die gebundenen Proteine mit 50 mM reduzierten Glutathion eluiert (2.13.4). Die gereinigten Proteine wurden über eine PD-10-Säule in Bindungspuffer überführt. Es wurden 5 µg der gereinigten Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf Nitrocellulose transferiert. Danach folgte eine Immunanfärbung mit CsHsp70- und DnaK-Antiserum. **A** Tintenanfärbung. **B** Immunanfärbung mit CsHsp70-Antiserum (1:1000). **C** Immunanfärbung mit DnaK-Antiserum (1:1000). (1) Bakterieller Extrakt M15[pREP4]. (2) 5 µg GST-Hsp70-1, (3) 5 µg GST-Hsp70-2, (4) 5 µg GST-Hsp70-3.

3.2 Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von *PmJcp*

3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation des *PmJcp* in *P. megasperma*

Mit dem erhaltenen Antiserum gegen *PmJcp* sollte zunächst durch Zellfraktionierung und anschließender Western-Blot-Analyse dessen intrazelluläre Lokalisation bestimmt werden. Biochemische Untersuchungen zur Lokalisation des P58 in Mensch ergaben, daß der größte Teil im Cytosol vorlag. Daneben wurden geringe Mengen von P58 an Mitochondrien und im Kern gefunden. Der Zellaufschluß und die Fraktionierung von *P. megasperma* erfolgten daher mit dem Ziel, möglichst intakte Organellen und Membranstrukturen anzureichern. Im weiteren Verlauf sollten die biochemischen Ergebnisse mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

3.2.1.1 *PmJcp* ist Bestandteil eines Protein-Komplexes an der Plasmamembran

Zunächst wurde die Verteilung von *PmJcp* in den verschiedenen Zellfraktionen untersucht. Dafür wurden 10 g Myzel einer zwei Tage alten auf V8-Medium gewachsenen Kultur aufgearbeitet (2.15 und Abb. 3.16). Nach dem Aufschluß der Hyphen durch zehnmütiges Mörsern und einer Vorzentrifugation bei 600 x g, wurde das Rohhomogenat bei 2000 x g, 10000 x g und 100000 x g zentrifugiert. Der Zellaufschluß der Hyphen durch Mörsern ist eine übliche Methode zur Zellfraktionierung und zur Anreicherung von Organellen aus filamentösen Pilzen (Philippi et al. 1975). In Abbildung 3.16 ist die Western-Blot-Analyse der erhaltenen Fraktionen mit *PmJcp*-Antiserum gezeigt. In den Fraktionen, die Membranstrukturen enthalten (Spuren 2-4) ist eine Bande bei 55 kDa zu erkennen. Die Anfärbung in der Fraktion mit Rohextrakt (Spur 1) und der Fraktion mit dem Überstand der 100000 x g Zentrifugation (Spur 5) ist nur sehr schwach. Somit liegt der überwiegende Teil des *PmJcp* im Gegensatz zum P58 entweder als Matrixprotein in einem Organell oder peripher als Teil eines Membran-gebundenen Proteinkomplexes vor. Um zu kontrollieren, ob während der Präparation die Proteolyse von Proteinen nur gering ist, wurden Immunanfärbungen mit einem Aktin-Antiserum (Abb. 3.16 C) und einem Tubulin-Antiserum (D) durchgeführt. Der Aktin-Antikörper erkennt eine Bande bei ca. 46 kDa mit der intensivsten Anfärbung in Spur 4. Der Tubulin-Antikörper zeigt ebenfalls in der Fraktion P100 (Abb. 3.16 D, Spur 4) die intensivste Anfärbung mit einem Protein bei 53 kDa. Beide Größen stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten für diese Protein-größe gut überein. Vom Aktin ist bekannt, daß die Ausbildung der Aktinfilamente von Zentren ausgeht, die z.T. mit der Plasmamembran assoziiert sind. Teile des Tubulin-Cytoskeletts dagegen sind in *P. megasperma* mit dem rauhen endoplasmatischen Retikulum assoziiert (Hemmes 1983). Es schien daher sinnvoll, die in P100 enthaltenen Mikrosomen eingehender zu analysieren.

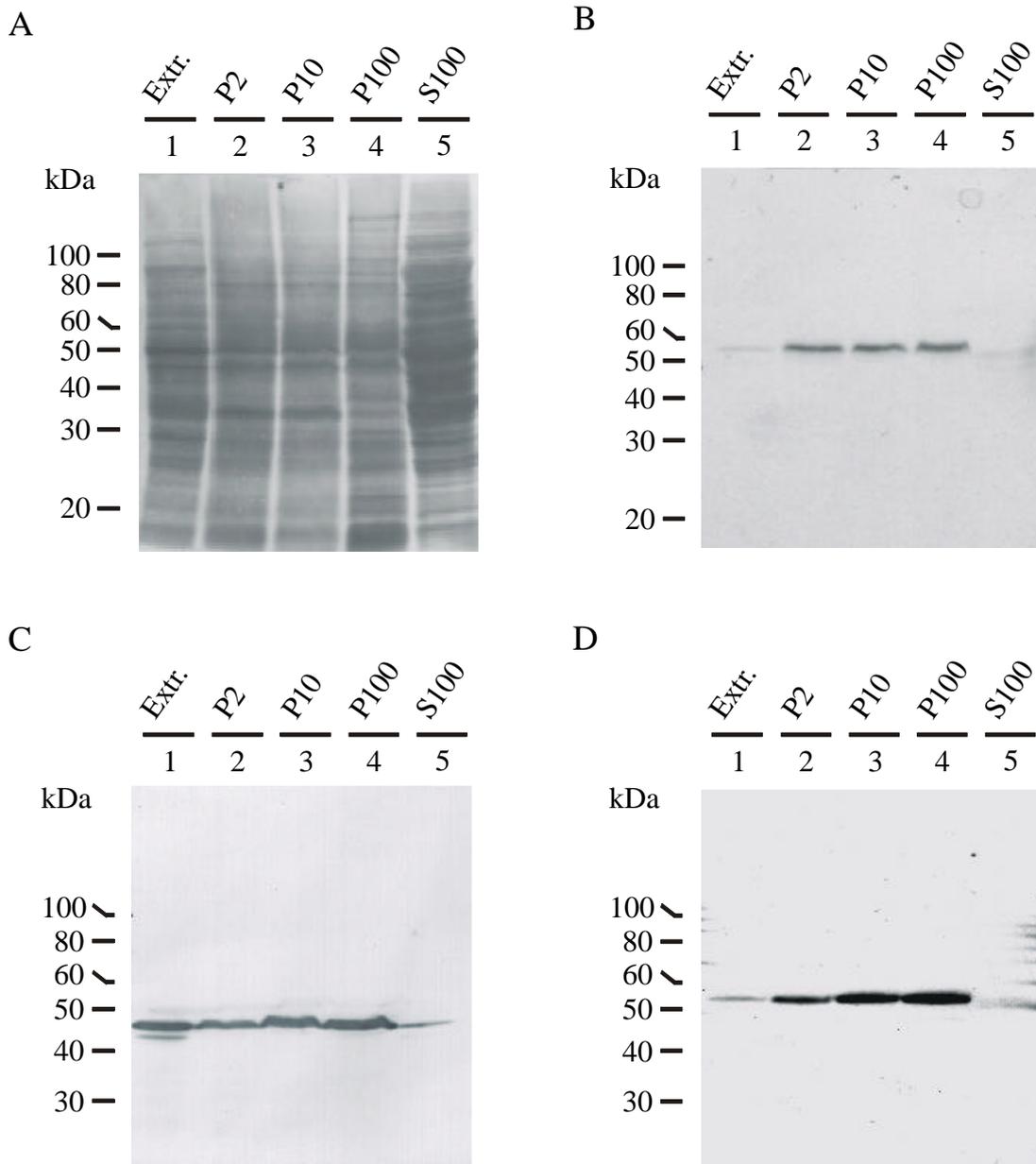


Abb. 3.16: Western-Blot Analyse der nach Differentialzentrifugation erhaltenen Fraktionen mit *PmJcp*-Antiserum

Myzel einer 2 d alten Kultur wurde nach 2.15.2 aufgearbeitet und durch Zentrifugation bei 2000 x g, 10000 x g und 100000 x g subfraktioniert. Je 50 µg der erhaltenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Es folgte eine Immunafärbung mit dem *PmJcp*-Antiserum (1:1000) und mit Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper. **A** Tintenanfärbung der Proteine. **B** Immunafärbung mit *PmJcp*-Antiserum (1:1000). **C** Immunafärbung mit Aktin-Antiserum (1:1000). **D** Immunafärbung mit Tubulin-Antiserum (1:1000). (1) Rohextrakt. (2) Niederschlag der Zentrifugation bei 2000 x g (P2). (3) Niederschlag der Zentrifugation bei 10000 x g (P10). (4) Niederschlag der Zentrifugation bei 100000 x g (P100). (5) Überstand der Zentrifugation bei 100000 x g (S100).

Wie bereits erwähnt, konnte mit dem *CsDnaJ1*-Antikörper eine ca. 53 kDa große Bande in den mit rER angereicherten Fraktionen detektiert werden (Porschewski 1997). Die etablierte Methode wurde genutzt, um die in P100 enthaltenen Membranen durch Gleichgewichtsdichte-Zentrifugation zu subfraktionieren. Die Fraktionen wurden anschließend mit Markerenzymen und im Western-Blot analysiert. Der Niederschlag einer 100000 x g Zentrifugation (500 µg Protein) aus einer Aufarbeitung von 20 g Myzel (2.15 und Abb. 3.17) wurde in 500 µl Aufschlußpuffer resuspendiert, auf einen linearen Saccharosegradienten (Vol 11,5 ml) von 20 bis 50 % (w/w) aufgetragen und 10 h bei 100000 x g zentrifugiert. Der Gradient wurde anschließend in 18 Fraktionen von je 600 µl geteilt, dabei wurde der Proteingehalt bei 280 nm gemessen. Von jeder Fraktion wurden 300 µl für SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen mit TCA gefällt (2.18.1). Die restlichen 300 µl der einzelnen Fraktionen wurden auf die Aktivität von Leitenzymen hin untersucht. In Abb. 3.17 A-E sind die Proteinfärbung mit Coomassie, sowie die Immunfärbung mit Antiseren gegen *PmJcp*-, Aktin-, *CsHsp70* und Tubulin gezeigt. Da über die J-Domäne eine Interaktion mit Hsp70 und die Steigerung der ATPase-Aktivität von Hsp70 erfolgt, konnte das Auftreten von Hsp70 in den Fraktionen (Abb. 3.17 D) in denen *PmJcp* und andere DnaJ-Proteine vorliegen, erwartet werden.

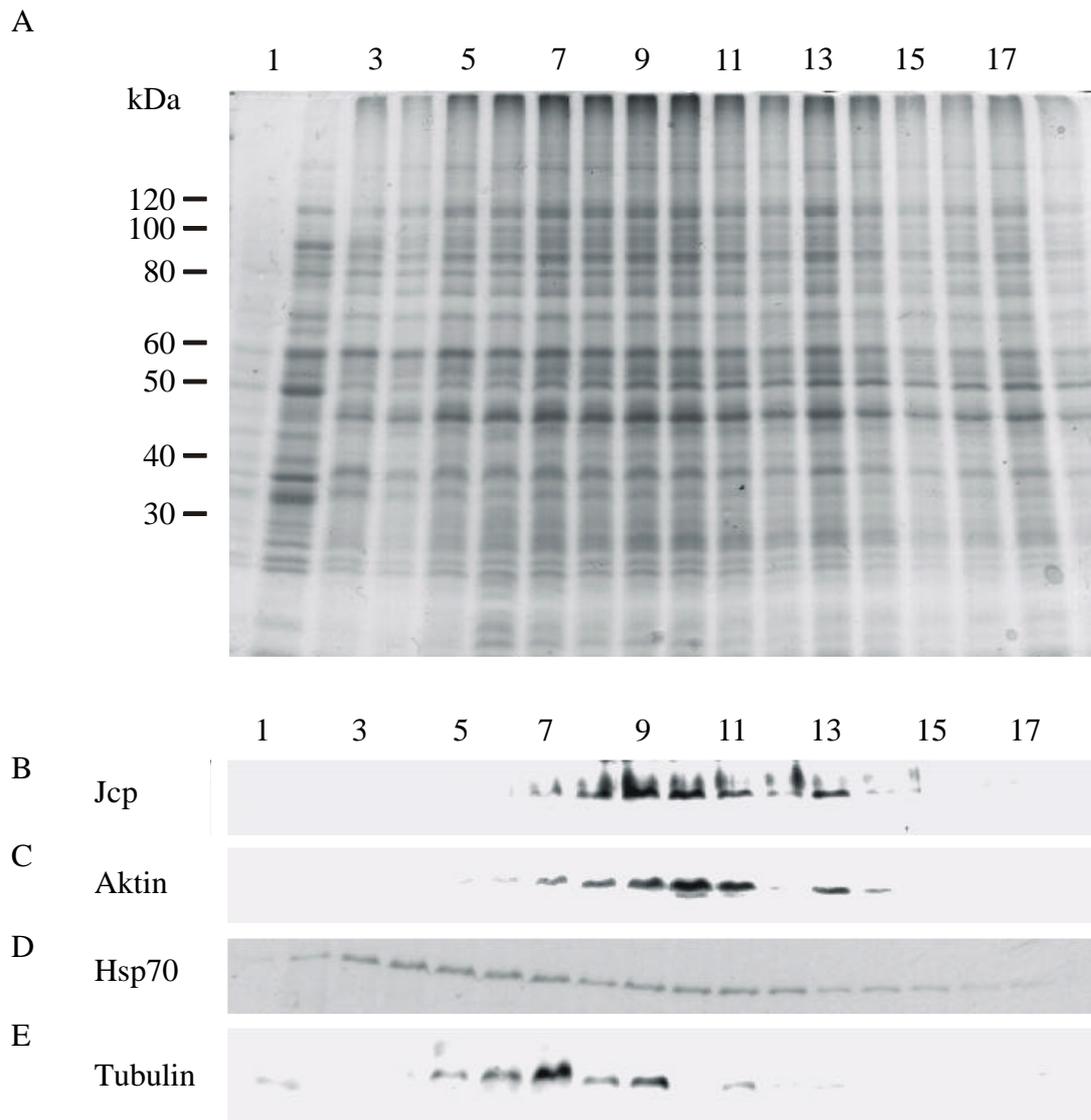


Abb. 3.17: Western-Blot-Analyse der Subfraktionen nach einer Auftrennung von P100 durch Gleichgewichtsdichtezentrifugation.

500 μ g Protein (500 μ l) des im Aufschlußpuffer resuspendierten 100000 x g Niederschlags (P100) wurden auf einen linearen Saccharosegradienten (Vol 11 ml, 20-50 % (w/w)) aufgetragen und für 10 h bei 100000 x g zentrifugiert. Die Auftragstelle der Probe befand sich in Fraktion 1 und 2. Die anschließende Fraktionierung erfolgte in 18 Fraktionen von 0,6 ml und die jeweiligen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt oder auf Nitrocellulose übertragen. **A** Coomassie Anfärbung. **B** Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum (1:1000). **C** Immunanfärbung mit Aktin-Antiserum (1:500). **D** Immunanfärbung mit *CsHsp70*-Antiserum (1:1000). **E** Immunanfärbung mit Tubulin-Antiserum (1:500).

Die Coomassieanfärbung (3.17 A) zeigt ein sehr einheitliches Proteinmuster, das sich nur in der Intensität unterscheidet. Auffallend ist in den Fraktionen 5-7 der niedermolekulare Bereich um 20 kDa, der vermutlich ribosomale Proteine enthält. In den Fraktionen 2-8 kann eine Aktivität der Antimycin-insensitiven NADPH-abhängigen Cytochrom c-Reduktase, einem Leitenzym des ER, gemessen werden (Abb.3.18 B). Die Profile der Leitenzymaktivitäten sind in Abb. 3.18 in relativen Aktivitäten angegeben.

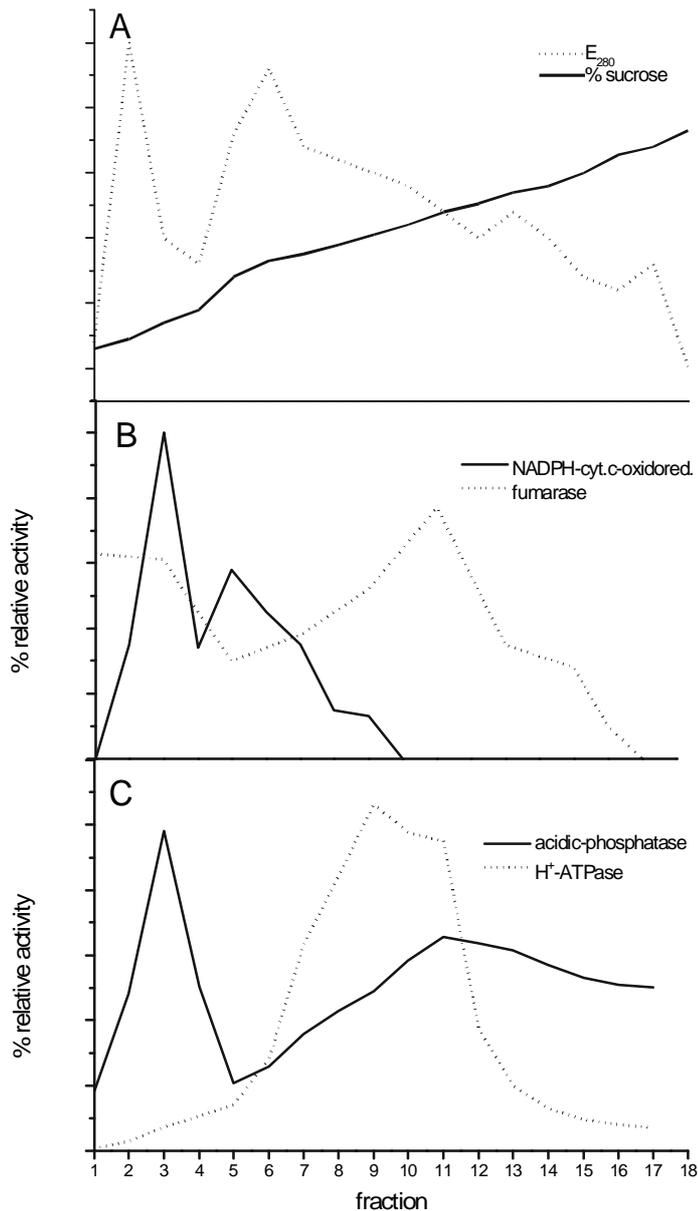


Abb. 3.18: Charakterisierung der Fraktionen von P100 nach Gleichgewichtsdichtezentrifugation

Von der unter 3.5 beschriebenen Aufarbeitung und Subfraktionierung eines 10000 x g Niederschlags, wurden Aliquots für die Messung verschiedener Leitenzyme verwendet. In Teil **A** der Abbildung ist das Proteinprofil und die Saccharosekonzentration aufgetragen. **B** Als Marker für das ER wurde die NADH-cyt. c-abhängige Oxidoreduktase und für die Mitochondrien die Fumarase verwendet. **C** Die Plasmamembran wurde mit der Vanadat-sensitiven H⁺-ATPase detektiert und Dictyosomen bzw. secretorische Vesikel mit der sauren Phosphatase . Dargestellt sind die relativen Aktivitäten.

Die Maxima der Aktivität dieses Enzyms liegen in den Fraktionen 3 und 6. Diese Fraktionen haben einen Saccharosegehalt von 27 % (w/w) und 35 % (w/w), welche eine Dichte von 1,11 g/cm³ und 1,15 g/cm³ entsprechen. Diese Werte können gut mit Angaben für Pflanzen verglichen werden, die für das glatte ER bei einer Dichte von 1,11-1,12 g/cm³ und für das rauhe ER bei einer Dichte von 1,15-1,18 g/cm³ liegen (Quail 1979). Somit könnte der niedermolekulare Bereich in den Fraktionen 5-7 von ribosomalen Proteinen und den vorhandenen Ribosomen am rauhen ER stammen. Die Immunanfärbung des *PmJcp* war in den Fraktionen 7-11 zu beobachten (Abb. 3.18 B). Diese Fraktionen haben einen Saccharosegehalt von 36 % bis 44 % (w/w) und entsprechen einer Dichte von 1,15-1,19 g/cm³. In den Fraktionen 5-12 wurde auch Aktivität der Vanadat-sensitiven H⁺-ATPase, einem Leitenzym der Plasmamembran, gemessen (C). Diese Fraktionen

haben einen Saccharosegehalt von 34 % bis 45 % (w/w) und entsprechen einer Dichte von 1,14-1,20 g/cm³. Für die Dichte von Plasmamembranen aus Pflanzen wurden Werte von 1,18-1,19 g/cm³ angegeben (Quail 1979). Bei Giannini et al. (1988) wird beschrieben, daß die Plasmamembran-Vesikel eine Dichte von 1,08–1,15 g/cm³ haben, die anhand der Vanadat-sensitiven H⁺-ATPase aus Fraktionen nach einer Saccharose-Gleichgewichtsdichte-Zentrifugation charakterisiert wurden, während bei Meyer et al. (1976) die Plasmamembran anhand der Aktivität der Thiaminpyrophosphatase in allen Fraktionen detektiert wurde. Sowohl die Werte der Dichte für pflanzliche Plasmamembran als auch die Werte von Gianini et al. (1988) können mit den ermittelten Werten verglichen werden. Anhand dieser Angaben ist festzustellen, daß das *PmJcp* vermutlich an der Plasmamembran lokalisiert ist. In der Immunanfärbung (Abb. 3.17 C) mit Aktin-Antiserum ist die stärkste Anfärbung in den Fraktionen 7-11 zu beobachten. Dieser Sachverhalt wird in Kap. 4.1 eingehender diskutiert. In der Immunanfärbung mit dem Tubulin-Antiserum (Abb. 3.17 E) konnte eine Anfärbung in den Fraktionen 5-9 beobachtet werden. Wie bereits erwähnt, können Teile des Tubulin-Cytoskeletts assoziiert mit ER vorliegen. Als Marker für sekretorische Vesikel und Mitochondrien wurde saure Phosphatase bzw. Fumarase getestet. Für saure Phosphatase konnten in den Fraktionen 2-4 und 9-13 zwei Maxima der Enzymaktivität festgestellt werden. Diese Fraktionen haben eine Saccharosekonzentration von 24-28 % (w/w) und 39-44 % (w/w) und entsprechen Dichten von 1,04-1,11 g/cm³ und 1,17-1,19 g/cm³. Die in den Fraktionen 2-4 meßbare saure Phosphatase stammt vermutlich von zerstörten Vesikeln und ist auf der Auftragstelle verblieben. Bei Meyer et al. (1976) ist die Verteilung von saurer Phosphatase in einem linearen Urografin-Gradienten, der von 1,05-1,24 g/cm³ reicht, und die Lokalisation anhand einer histochemischen Anfärbung in Dünnschnitten von Hyphen beschrieben. In dem Gradienten ist die saure Phosphatase in den Fraktionen mit der Dichte von 1,05-1,08 g/cm³ und von 1,17-1,24 g/cm³ zu detektieren. In der histochemischen Anfärbung an Dünnschnitten von Hyphen wurde die saure Phosphatase in den Dictyosomen vorgefunden. Die Lage intakter Mitochondrien im Gradienten wurde durch die Messung der Fumarase-Aktivität ermittelt. Ein großer Teil der Aktivität verblieb auf der Auftragstelle in den Fraktionen 1-2. Das zweite Maximum liegt in den Fraktionen 10-12. Sie haben einen Saccharosegehalt von 40-43 % (w/w), was einer Dichte von 1,17-1,19 g/cm³ entspricht. Diese Werte lassen sich gut mit den Werten von 1,18-1,20 g/cm³ für pflanzliche Mitochondrien vergleichen. Bei Gianini et al. (1988) befinden sich die Mitochondrien nach Subfraktionierung eines 80000 x g Niederschlags auf einem linearen Saccharosegradienten (20-50 % (w/w)) in den Fraktionen mit einer Dichte von 1,12-1,20 g/cm³ und einem Maximum bei 1,19 g/cm³.

3.2.1.2 Subfraktionierung peripherer und integraler Plasmamembranproteine nach einer $MgCl_2$ -Behandlung

Zur weiteren Charakterisierung der Lokalisation wurden über Gleichgewichtsdichtezentrifugation angereicherte, Plasmamembran enthaltende Fraktionen mit $MgCl_2$ behandelt, was zum Ablösen von assoziierten und peripheren Membranproteinen führte (2.15.6). Integrale Membranproteine, die über eine Transmembrandomäne oder über einen Isoprenoidrest als Membrananker verfügen, verbleiben nach der Ultrazentrifugation im Niederschlag. Gleiche Volumenanteile der im Niederschlag verbliebenen Membranproteine und der ablösbaren, im Überstand befindlichen peripheren Membranproteine wurden mit Hilfe von Western-Blot analysiert. In Abb. 3.19 ist die Coomassieanfärbung der Proteine (A) und die Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum (B) zu sehen.

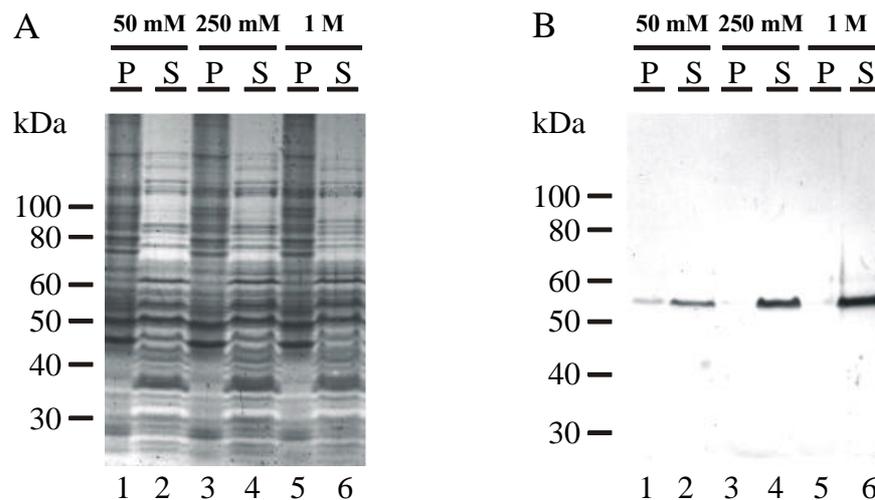


Abb. 3.19: Western-Blot-Analyse von Membranproteinen nach Salzbehandlung

Der Niederschlag einer $100000 \times g$ Zentrifugation (P100) aus einer Aufarbeitung von 25 g Myzel wurde auf einem linearen Saccharosegradienten subfraktioniert. Anschließend wurden die Plasmamembran enthaltenden Fraktionen nach Behandlung mit $MgCl_2$ in ablösbare Proteine, die sich nach der Salzbehandlung im löslichen Überstand (S) befanden, und Membranproteine, die nach der Salzbehandlung im Niederschlag (P) verblieben, subfraktioniert. Gleiche Volumenanteile der erhaltenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt **A**, bzw. auf Nitrocellulose transferiert **B**. (1) Membranassoziierte Proteine (P) nach der Behandlung mit 50 mM $MgCl_2$. (2) Nach Salzbehandlung (50 mM $MgCl_2$) ablösbare Proteine (S). (3), (5) wie Spur (1) mit jeweils 250 mM $MgCl_2$ und 1 M $MgCl_2$ (4), (6) wie Spur (2) mit jeweils 250 mM $MgCl_2$ und 1 M $MgCl_2$.

Es wurde festgestellt, daß sich der größte Teil des *PmJcp* nach der Behandlung mit 50 mM $MgCl_2$ im Überstand befand und nach Behandlung mit 1 M $MgCl_2$ nur noch im Überstand zu detektieren war. Das *PmJcp* verhält sich somit wie ein peripheres Membranprotein. Es ist aber ebenso

möglich, daß das *PmJcp* durch Protein-Protein-Interaktion mit einem peripheren oder integralen Membranprotein assoziiert ist und auf diese Weise an der Plasmamembran vorliegt.

3.2.1.3 Verdau der Proteine an der Plasmamembran mit Proteinase K

Der Verdau mit Proteinase K sollte Aufschluß darüber geben, ob *PmJcp* möglicherweise von Membranstrukturen umgeben ist, die an der Plasmamembran vorliegen. In *Phytophthora* und anderen Oomyceten ist das Auftreten sogenannter peripherer Vesikel beschrieben (Hemmes 1983). Diese Vesikel entstehen an bis heute unbekannt Stellen in den Hyphen und im kortikalen Cytoplasma von keimenden Chlamydosporen und Oosporen. Wenn die Zoosporen freigesetzt werden, fusionieren die peripheren Vesikel mit der Plasmamembran und setzen den Inhalt, darunter auch Glykoproteine, nach außen frei. In Abb. 3.20 ist das Ergebnis des Proteinase K-Verdaus abgebildet.

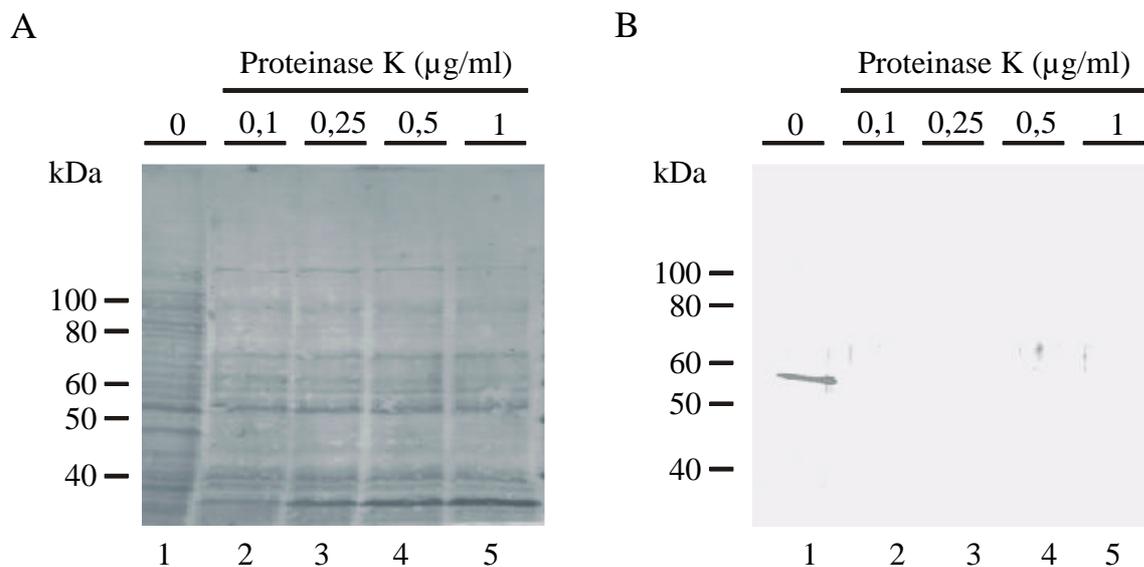


Abb. 3.20: Western-Blot-Analyse von Membranproteinen nach Proteinase K-Verdau

Ausgehend von 20 g Myzel wurde der Niederschlag einer Zentrifugation bei 100000 x g (2.15.3) auf einem linearen Saccharosegradienten subfraktioniert (2.15.4). Die Plasmamembran enthaltenden Fraktionen wurden mit zunehmenden Konzentrationen an Proteinase K inkubiert (2.15.7). Gleiche Volumenanteile wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. **A** Tintenanfärbung. **B** Immunanfärbung mit Antiserum gegen *PmJcp* (1:1000). (1) Membranproteine. (2) Membranproteine behandelt mit 0,1 µg/ml Proteinase K, (3) 0,25 µg/ml Proteinase K, (4) 0,5 µg/ml Proteinase K, (5) 1 µg/ml Proteinase K.

In der Immunanfärbung (B) ist zu erkennen, daß bereits bei Zugabe von 0,1 µg/ml Proteinase K (Abb. 3.20 B, Spur 2) kein *PmJcp* zu detektieren ist. Das bedeutet, daß es wahrscheinlich nicht von einer Membran umgeben ist. Sollte *PmJcp* an der Innenseite der Membran eines Organells lokalisiert sein, würde dies bedeuten, daß praktisch alle Organellen bei der Präparation zerstört worden wären. Wahrscheinlicher ist eher, daß das *Jcp* an der cytosolischen Seite der Plasmamembran als Teil eines Protein-Komplexes oder als Partner eines Membranproteins vorliegt.

3.2.1.4 *PmJcp* flotiert mit Membranstrukturen

Um zu kontrollieren, ob *PmJcp* mit Membranstrukturen assoziiert ist und nicht als Partikel in einem Komplex im Sedimentationsgradienten wandert, wurde der Niederschlag einer 100000 x g Zentrifugation durch einen Flotationsgradienten analysiert. Der Niederschlag wurde in 500 µl 50 % (w/w) Saccharose-Gradientenpuffer resuspendiert und auf ein 1 ml 60 % (w/w) Saccharosepolster aufgetragen. Die Probe wurde mit einem linearen Saccharosegradienten (Vol. 10 ml), der von 45-25 % (w/w) reichte, überschichtet. Anschließend wurde bei 100000 x g für 24 h zentrifugiert. Der Gradient wurde in Fraktionen von 600 µl gesammelt, wobei die Auftragstelle der Probe in Spur 9 war. Die Proteine zweier aufeinanderfolgender Fraktionen wurden vereint, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert (Abb. 3.21). In der Immunanfärbung mit Antiseren gegen *PmJcp* (B) und Aktin (C) ist zu erkennen, daß das *PmJcp* mit den Membranstrukturen zu den Fraktionen 9-14 coflotiert ist. Diese Fraktionen hatten einen Saccharosegehalt von 38-43 % (w/w) und korrelieren mit den Fraktionen, in denen *PmJcp* im Sedimentationsgradienten vorzufinden ist. Weiterhin ist zu beobachten, daß offensichtlich das Aktin ebenfalls mit diesen Membranstrukturen assoziiert ist. Ein großer Teil der aufgetragenen Probe ist auf der Auftragstelle verblieben, bzw. befand sich als Niederschlag im Zentrifugenbecher wieder. Vermutlich handelte es sich dabei um aggregierte Membranbestandteile, die nicht richtig resuspendiert waren. Das *PmJcp* ist in diesem Niederschlag (P, Spur 11) nicht zu detektieren.

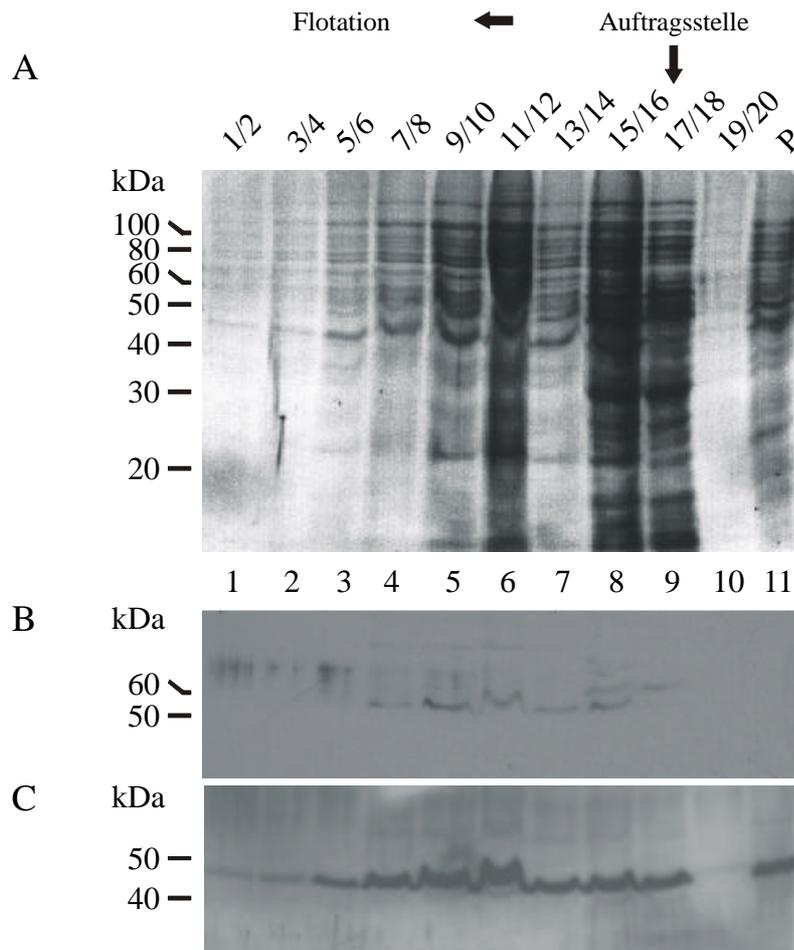


Abb. 3.21. Flotation der im 100000xg Niederschlag enthaltenen Membranen

Der Niederschlag einer Zentrifugation bei 100000xg (P100) wurde nach 2.15.3, ausgehend von 20 g Myzel präpariert und in 500 μ l 50 % (w/w) Saccharose-Gradienten-Puffer resuspendiert (ca. 200 μ g Protein). Die Suspension wurde auf ein Poster von 60 % Saccharose (1 ml) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 45-25 % Saccharose überschichtet. Nach einer Zentrifugation von 100000xg für 2 h wurde der Gradient in Fraktionen von 600 μ l eingeteilt. Die Proteine wurden mit TCA gefällt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die anschließende Immunanfärbung erfolgte mit Antiserum gegen *PmJcp* und Aktin. **A** Tintenanfärbung. **B** Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum (1:1000). **C** Immunanfärbung mit Aktin-Antiserum. Die Ziffern oberhalb der Abbildungen geben die jeweiligen Fraktionen an.

3.2.2. *In situ* Lokalisierung von Jcp in Hyphen von *P. megasperma*

Mit Hilfe des *PmJcp*-Antiserums war es möglich, die Lokalisation nicht nur *in vitro* mit biochemischen Methoden, sondern auch *in situ* unter Anwendung der Epifluoreszenz- und konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie zu untersuchen. Zunächst wurde Myzel von *P. megasperma* auf Objektträgern für einen bzw. zwei Tage angezogen und anschließend mit Primär- und mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zweitantikörpern inkubiert (2.20.2). Zur Kontrolle wurden Anfärbungen mit einem Tubulin- und Aktin-Antikörpern durchgeführt, um die Erhaltung der Zellstrukturen zu zeigen. Die Anfärbung von *PmJcp* (Abb. 3.22 C, D) zeigt eine “patch-artige” Verteilung entlang des Kortex bzw. der Plasmamembran.

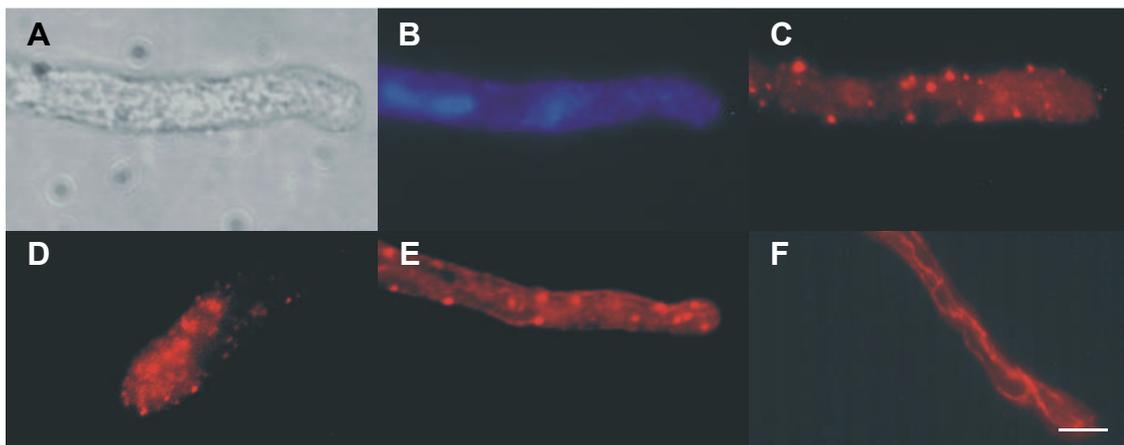


Abb. 3.22: *In situ* Lokalisierung von *PmJcp*, Aktin und Tubulin in Hyphen von *P. megasperma*

Myzel von *P. megasperma* wurde auf Objektträgern angezogen und für die sekundäre Immunfluoreszenz mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert (2.20.3) A Phasenkontrastbild einer Hyphenspitze. B DAPI-Färbung des Zellkerns. C-F Sekundäre Immunfluoreszenz-Anfärbung mit *PmJcp*- C, D, Aktin- E und Tubulin-Antiseren F. Der Größenbalken entspricht 5 μm .

Diese Verteilung ist vergleichbar mit der kortikalen Verteilung der sogenannten Aktin-“Patches” (Abb. E) (Temperli et al. 1990). In Teil F der Abbildung 3.22 ist die Anfärbung des Tubulin-Cytoskeletts zu sehen. Die Negativkontrollen sind in Abbildung 3.23 gezeigt. Eine Lokalisation des *PmJcp* am Kern, ER und den Mitochondrien ist anhand der Fluoreszenzaufnahmen auszuschließen. Ein weitere Aussage, ob sich das Protein an sekretorischen Vesikeln oder an den Peroxisomen ähnlichen Organellen befindet, kann aufgrund der geringen Auflösung der Strukturen mit Fluoreszenzmikroskopie nicht getroffen werden.

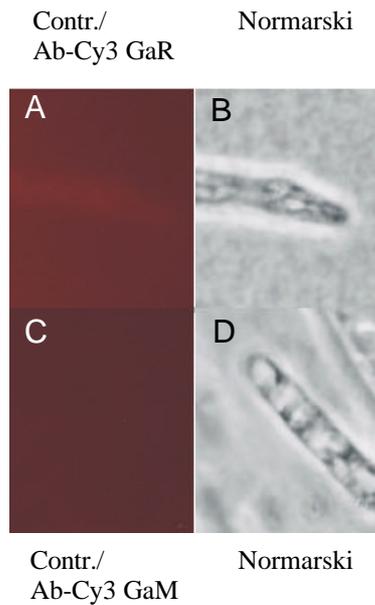


Abb. 3.23: Kontrolle unter Verwendung der Cy3-gekoppelten Zweitantikörper

Um zu kontrollieren, ob die Sekundärantikörper unspezifische Signale zeigen, wurden Hyphen unter ausschließlicher Verwendung der Anti-Kaninchen-Cy3 **A, B** und Anti-Maus-Cy3-Antikörper **C, D** inkubiert (2.20.3). **B, D** Normarski-Abbildung der Hyphen.

Die Spezifität des Antikörpers wurde durch einen Wettbewerbsversuch überprüft. Vor dem Inkubationsschritt mit dem Primärantikörper wurde das *PmJcp*-Antiserum mit bakteriell überexprimiertem und gereinigtem His₆-markiertem Jcp für 30 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde für 30 min bei 4 °C und 13000 x g zentrifugiert und der Überstand für den ersten Inkubationsschritt eingesetzt. Das Ergebnis des Wettbewerbsversuchs in den Teilen C und D der Abbildung 3.24 zeigt, daß das *PmJcp* so nicht mehr zu detektieren ist.

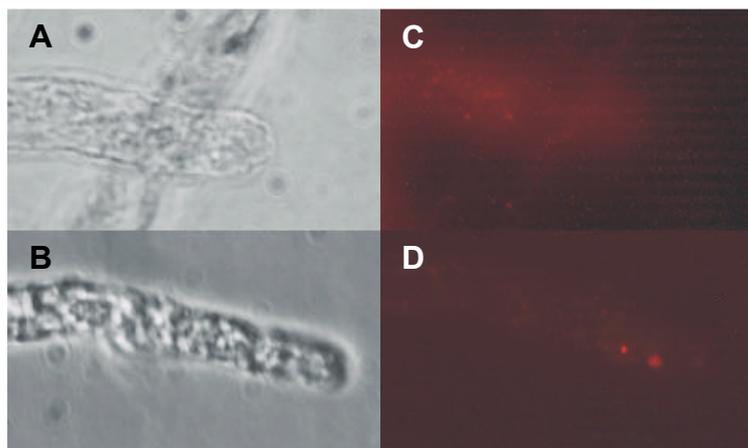


Abb. 3.24: Konkurrenz der Lokalisation von *PmJcp*

Für die Konkurrenz der Lokalisation *in situ* von *PmJcp* wurde das *PmJcp*-Antiserum zuvor mit 200 µg in TBS umgepuffertem His₆-markiertem Jcp für 30 min bei RT unter Invertieren inkubiert. Nach einer dreißigminütigen Zentrifugation (13000 x g) wurde die Lösung für den ersten Inkubationsschritt eingesetzt (2.30.3). **A, C** Phasenkontrastbilder zweier Hyphenspitzen. **B, D** Detektion von *PmJcp*.

3.2.2.1 Doppelfärbung von Jcp und Aktin in Hyphen von *P. megasperma*

Wegen der dem Aktin ähnlichen Verteilung des *PmJcp* wurde eine Doppelfärbung durchgeführt. Zur Unterscheidung der *PmJcp*-Anfärbung von der Aktin-Anfärbung wurde ein Cy3-gekoppelter Anti-Kaninchen- (rote Färbung) und ein FITC-gekoppelter Anti-Maus-Zweitantikörper verwendet. In Abbildung 3.25 ist die Aktin- (A) und *PmJcp*-Anfärbung (B) zu sehen.

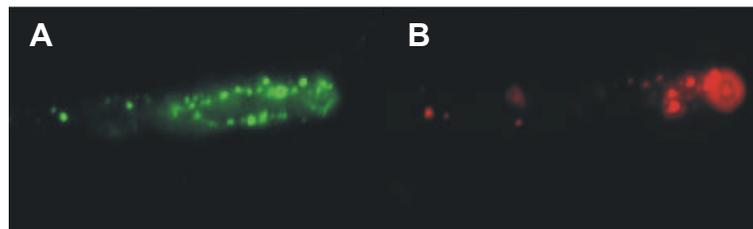


Abb. 3.25: Doppelfärbung von *PmJcp* und Aktin in Hyphenspitzen

Myzel von *P. megasperma* wurde auf einem Objektträger angezogen und für die Doppelfärbung mit *PmJcp*- und Aktin-Antiserum vorbereitet (2.20.3). Die Sekundäre Immunfluoreszenz-Anfärbungen zeigen die Verteilung von Aktin in **A** und *Jcp* in **B** in einer Hyphenspitze. Die Detektion von *PmJcp* erfolgte mit Cy3-gekoppeltem Zweitantikörper und die Anfärbung des Aktin mit FITC-gekoppelten Zweitantikörper.

Eine genaue Aussage über eine Lokalisation ist mit der Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie nicht zu machen. Entsprechende Kontrollen (Abb. 3.26) zeigen, daß es zu keinen unspezifischen Anfärbungen durch die Zweitantikörper kam.

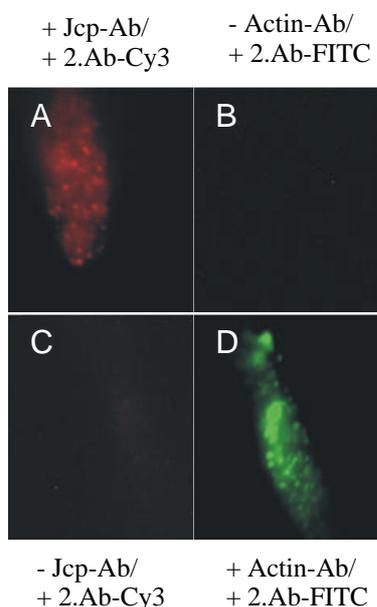


Abb. 3.26: Kontrolle bei der Doppelfärbung von Hyphen ohne die beiden Primärantikörper

Zur Unterscheidung der Lokalisation von *Jcp* **A** und Aktin **D** wurden ein Anti-Kaninchen-Cy3- und ein Anti-Maus-FITC-gekoppelter Zweitantikörper verwendet. Die Anfärbungen wurden jeweils unter Ausschluß des Aktin-Antikörpers **A**, **B** oder des *PmJcp*-Antikörpers **C**, **D** durchgeführt. Beide Ansätze wurden anschließend mit beiden Sekundärantikörpern behandelt.

Die Serie der Aufnahmen beginnt im oberen Bereich einer Hyphe (A1) und endet im Bereich der Unterseite (A8). In Abbildung A1 ist die punktförmige Verteilung von *PmJcp* (rote Anfärbung) und die Aktin-Patches (grüne Anfärbung) zu erkennen. Geht man entlang der z-Achse von der Oberseite mit den Anfärbungen der Plasmamembran in die mittleren Ebenen des Cytoplasmas, so ist zu beobachten, daß die *PmJcp*-Anfärbungen (Dreiecke) und die Aktin-Anfärbungen (Pfeile) entlang der Plasmamembran intensiver werden (A2-A7). Gelangt man zur Unterseite (A8) werden diese Signale schwächer und die Anfärbungen im Bereich der Plasmamembran auf der Unterseite der Hyphen werden sichtbar. In Abbildung B ist ein Stapelbild aus 16 Einzelaufnahmen einer Hyphe zu sehen. Die intensivsten Signale befinden sich auf der Oberseite bzw. Unterseite der Hyphen. Deutlich zu erkennen sind die Anfärbungen von *PmJcp* und Aktin entlang des Kortex der Hyphe. In Abbildung 3.28 A, B und C, D ist die Verteilung von *PmJcp* und Aktin in einer mittleren Ebene einer Hyphe (A) (vergleichbar mit Teilbild A5 in Abb. 3.27) und in einem Stapelbild (C) entlang einer Geraden analysiert worden.

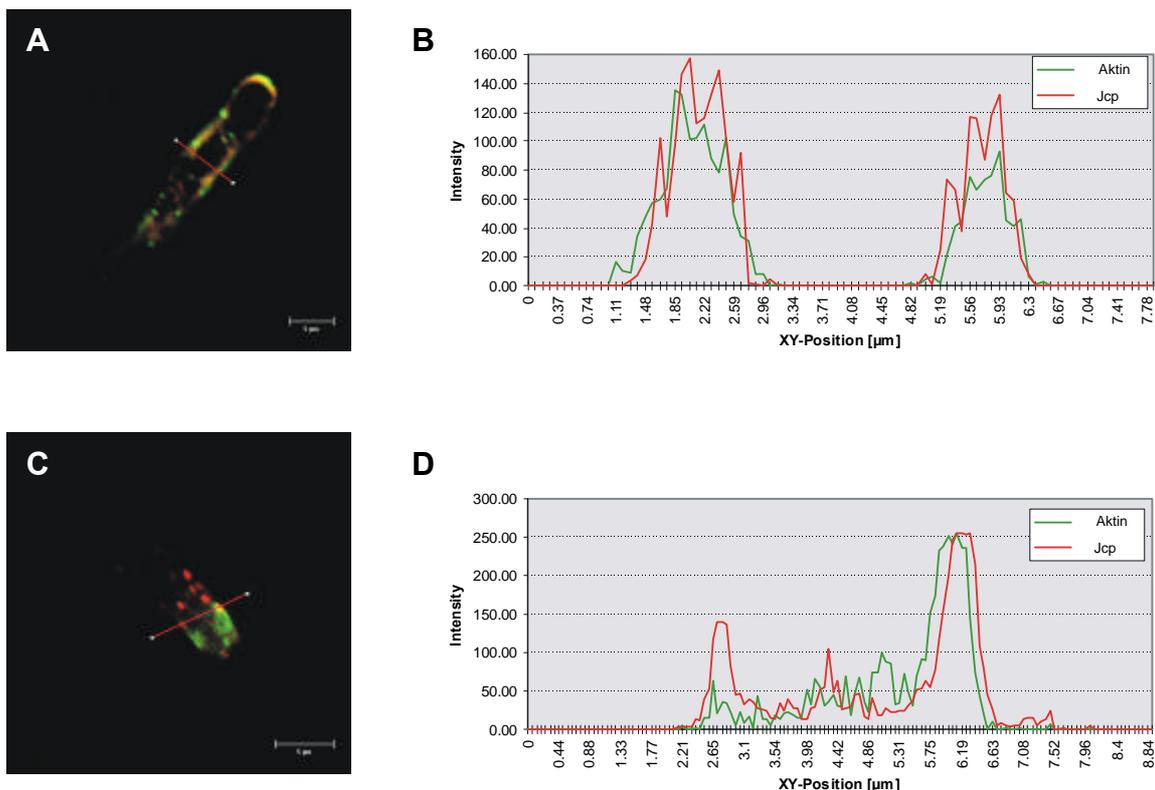


Abb. 3.28: Analyse der *in situ* Lokalisation von *PmJcp* und Aktin mit konfokaler Lasermikroskopie

Die Verteilung von *PmJcp* und Aktin wurde in einer einzelnen Ebene (A) und in einem Stapelbild (C) entlang einer geraden durch die Hyphe anhand der Signalintensitäten in relativen Einheiten quantifiziert (B) und (D). Der Größenbalken entspricht 5 μm.

Die Signale wurden jeweils als relative Intensitäten in einem Diagramm in Bezug zur Länge der Geraden dargestellt (Abb. 3.28 C, D). Es ist zu erkennen, daß beide Proteine vor allem entlang des Kortex und im Bereich der Plasmamembran gefunden wurden (Balken in A). Die kortikale Verteilung von *PmJcp* und Aktin ist auch in einem zusammengesetzten Bild (C) von Aufnahmen aus sechzehn Einzelebenen entlang der z-Achse zu erkennen. Allerdings zeigt sich hier, daß eine Lokalisation von *PmJcp* und Aktin nur an wenigen Stellen (D) vorliegt, jedoch die punktförmige Verteilung von *PmJcp* deutlich zu erkennen ist.

3.2.2.2 Untersuchung der Lokalisation von *PmJcp* in Ultradünnschnitten mit Transmissions-elektronenmikroskopie

Für die anschließende Untersuchung von Hyphen mit dem Transmissionselektronenmikroskop wurde in Vorversuchen zunächst Myzel in einer Epon-Kunststoffmatrix eingebettet (2.20.3) und Semidünnschnitte angefertigt. Die *in situ* Lokalisierung mit dem *PmJcp*-Antiserum und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte in Zusammenarbeit mit H. Renneberg und A. Dammshäuser am Institut für Anatomie und Zellbiologie, der Philipps-Universität Marburg. In den Dünnschnitten ist *PmJcp* entlang der Plasma-Membran zu erkennen (Abb. 3.29 B). Die Kontrolle mit den Zweitantikörpern zeigte keine Anfärbung (A).

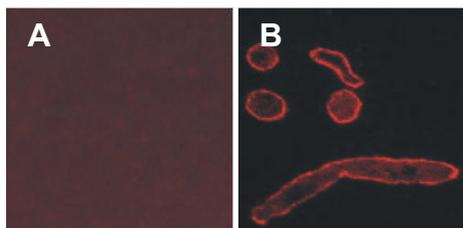


Abb. 3.29: Detektion von *PmJcp* in Dünnschnitten von Myzel, das in Eponharz fixiert worden war

Die Hyphen wurden in Epon-Kunstharz eingebettet und an einem Ultramikrotom mit einer Schichtdicke ca. 50 µm geschnitten. Die Dünnschnitte wurden mit *PmJcp*-Antiserum und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper behandelt. A Negativkontrolle, B Anfärbung von *PmJcp*.

Nach diesem Vorversuch konnten Ultradünnschnitte für die Immunogoldmarkierung angefertigt werden, die mit dem *PmJcp*-Antiserum und dem entsprechenden mit Gold markierten Zweitantikörper behandelt wurden. In der Negativkontrolle (Abb. 3.30 A) ist kein Signal zu erkennen. Die Hyphen von *P. megasperma* zeigten eine sehr schwache Signalverteilung entlang der Plasmamembran (B). Aufgrund der sehr schwachen Kontrastierung lässt sich keine Aussage darüber machen, ob das Protein direkt an der Plasmamembran lokalisiert ist oder mit Vesikeln assoziiert vorliegt, die dort angeordnet sind. Da jedoch im Cytosol kein Signal zu beobachten war, kann man davon ausgehen, daß *Jcp* ausschließlich an der Plasmamembran vorliegt.

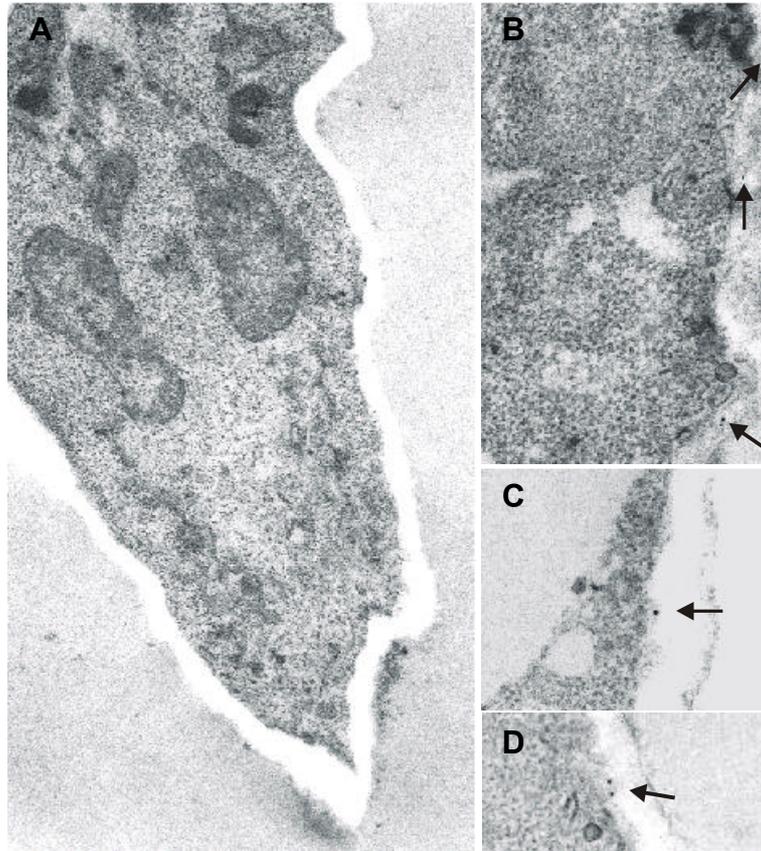


Abb. 3.30: Immunogoldmarkierung von *PmJcp* in Hyphen von *P. megasperma*

Mit zwei Tage altem Myzel wurde eine Immunogoldmarkierung durchgeführt. Die Goldpartikel des zweiten Antikörpers haben einen Durchmesser von ca. 10 nm. **A** Negativkontrolle unter ausschließlicher Verwendung des Zweitantikörpers (x6800). **B** Immunogoldmarkierung mit *PmJcp*-Antiserum (1:50) (x14 000), **C** (x16 700), **D** (x16 700).

3.2.2.3 Analyse der durch Hochsalz-Puffer ablösbaren Zellwandproteine

Durch eine Behandlung der Zellwand mit 0,2 M CaCl_2 sollte untersucht werden, ob *PmJcp* extrazellulär an der Zellwand lokalisiert ist. Dazu wurden 20 g zwei altes Myzel mit 50 ml CaCl_2 für 30 min bei RT geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend durch einen 0,2 μm Filter filtriert und in einem Dialyseschlauch gegen dest. H_2O für 12 h dialysiert. Der Dialyseschlauch wurde mit trockenem Sephadex-Material bedeckt und die Lösung auf 5 ml eingengt. Die Proteine wurden mit TCA gefällt und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Coomassie-Anfärbung ist in Abbildung 3.32 zu sehen. Zum Vergleich und zur Kontrolle wurde ein Extrakt aus einer Protoplastenpräparation (Abb. 3.31) aufgetragen (2.15.1).

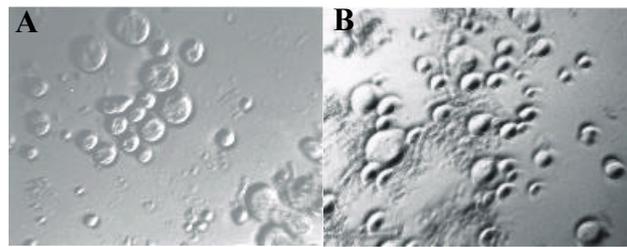


Abb. 3.31: Bildung von Protoplasten aus zwei Tage altem Myzel von *P. megasperma*

Aus 10 g Myzel zwei Tage alter Kulturen wurden nach (2.15.1) Protoplasten präpariert. **A, B** jeweils unterschiedliche Präparationen.

Die Fraktion der salzablösbaren Zellwandproteine wurde mit Western-Blot analysiert und mit einem Rohextrakt aus einer Protoplastenpräparation bzw. aus einer Aufarbeitung nach mechanischem Aufschluß (2.15.2) verglichen (Abb. 3.32). Neben der Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum (B) wurde eine Immunanfärbung mit *CsHsp70*-Antiserum (C) durchgeführt, da in der Tintenanfärbung (A) zu erkennen ist, daß neben den salzablösbaren Proteinen offensichtlich auch aus Hyphen ausgetretene cytosolische Proteine in dieser Fraktion enthalten sind. In der Fraktion der salzablösbaren Fraktion ist kein *Jcp* und *Hsp70* zu detektieren. Falls *PmJcp* extrazellulär an der Zellwand vorliegt, müßte die Konzentration dort am höchsten sein. Bei Protoplasten sind die Zellwände nicht mehr vorhanden und in einem Extrakt sollte nur noch der Pool an *PmJcp* zu detektieren sein, der aus der Hyphe sekretiert wird. Da die Immunanfärbung von *PmJcp* in der Protoplastenpräparation (Abb. 3.32, C Spur 2) mit der Anfärbung im Rohextrakt (Spur 3) vergleichbar ist, kann man daraus schließen, daß *PmJcp* nur intrazellulär an der Plasmamembran vorliegt. Dieses Ergebnis wird auch durch die Immunogoldmarkierung bestätigt.

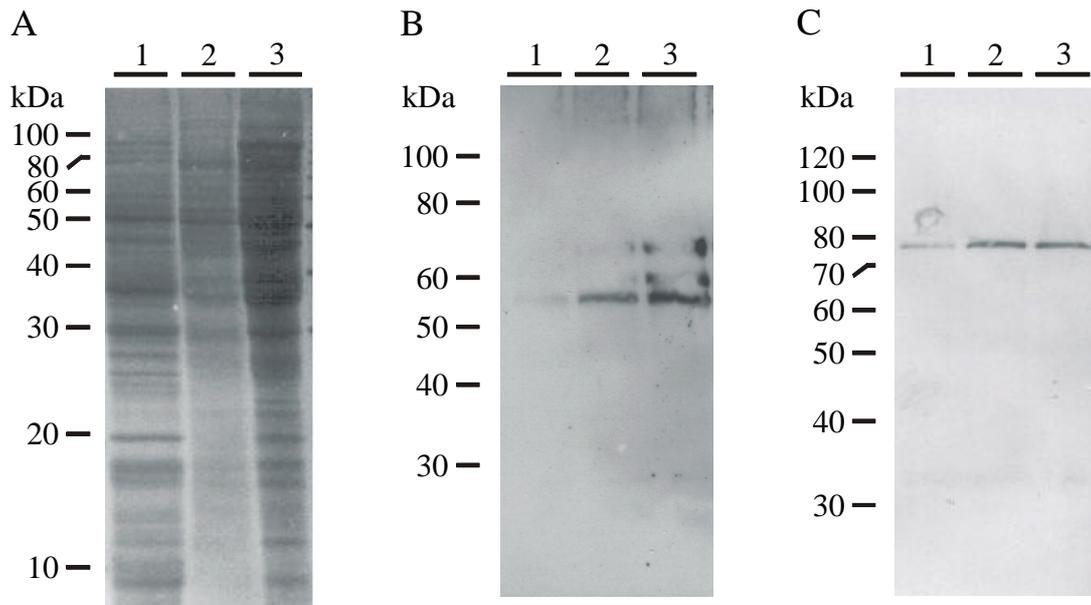


Abb. 3.32: Analyse der mit Ca^{2+} abgelösten Zellwandproteine

Für die Ablösung von Zellwandproteinen von *P. megasperma* wurden 20 g Myzel mit 50 ml einer 0,2 M CaCl_2 -Lösung für 30 min bei RT geschüttelt. Die Lösung wurde für 12 h gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend auf Sephadex-Säulenmaterial eingeeengt. Die Proteine wurden mit TCA gefällt, mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. **A** Tintenanfärbung. **B** Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum (1:1000). **C** Immunanfärbung mit *CsHsp70*-Antiserum (1:2000). (1) Ca^{2+} -ablösbare Proteinfraction (75 μg). (2) Protoplasten (50 μg). (3) Rohextrakt (75 μg).

3.3 Untersuchung der Wechselwirkungen von Jcp mit drei Isoformen von Hsp70 und Hsp90

Für eine Reihe von DnaJ-Proteinen ist die Wechselwirkung mit Isoformen von Hsp70 in Anwesenheit von ADP oder ATP gezeigt worden (Diefenbach 1999). Neben der für DnaJ-Proteine charakteristischen und für Interaktionen mit Hsp70 notwendigen J-Domäne, enthält *PmJcp* weitere Protein-bindende Bereiche mit sogenannten TPR-Domänen, die auch in Hsp90-bindenden Proteinen vorkommen (Höfeld und Jentsch 1997), (Buchner 1999). Die Bildung eines Komplexes zwischen *in vitro* translatierten Hsp70 bzw. GST-Hsp70-Fusionsproteinen und *PmJcp* untersucht werden. Die Isolierung dieser Komplexe erfolgte durch Immobilisierung an Ni^{2+} -Agarose-Affinitätsmaterial. Desweiteren sollte die Wechselwirkung von *PmJcp* mit *in vitro* translatierten *PmHsp90* untersucht werden.

3.3.1.1 Nachweis der Wechselwirkung von His₆-markierten Jcp mit drei Isoformen von Hsp70: Bindung der binären Komplexe an Ni²⁺-NTA-Sepharose

Für die Wechselwirkungsexperimente wurde, wie unter 2.13.3 beschrieben, His₆-markiertes Jcp bakteriell exprimiert und gereinigt. In Abbildung 3.33, Spur 1 ist die Tintenanfärbung und in Spur 2 eine Immunanfärbung des gereinigten 6xHisJcp mit His-Tag-Antiserum zu sehen.

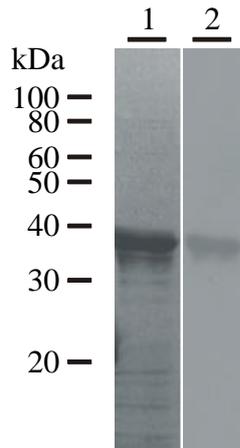


Abb. 3.33: Analyse des bakteriell exprimierten und gereinigten His₆-markiertem Jcp

Analog zu 2.13.3 und 3.1.2 wurde aus dem klarzentrifugierten bakteriellen Extrakt aus 1 l Kultur das 6xHisJcp über eine Ni²⁺-NTA-Sepharose-Säule aufgereinigt. In Spur 1 ist die Tintenanfärbung des gereinigten 6xHisJcp und in Spur 2 die Immunanfärbung mit dem gegen den His-Tag gerichteten Antiserum (1:1000) zu sehen.

Für den Nachweis der Wechselwirkungen von His₆-markierten Jcp mit den *in vitro* translatierten Hsp70-Isoformen (Abb.3.34) wurden von den Hsp70-Translationsansätzen die Ribosomen und andere Aggregate durch eine einstündige Zentrifugation bei 100000 x g abzentrifugiert.

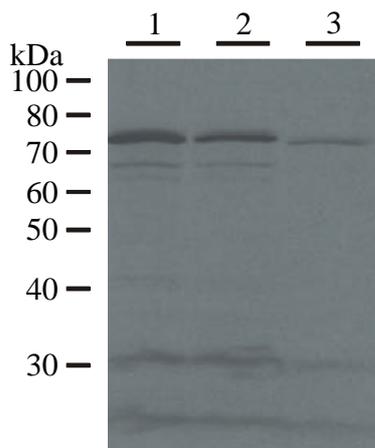


Abb. 3.34: Analyse von radioaktiv markiertem *Pm*Hsp70-Isoformen nach *in vitro* Transkription/Translation

Die *in vitro* Transkription/Translation erfolgte mit Plasmiden, die die cDNA-Inserts der drei cytosolischen Hsp70 enthalten und unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Jeweils 5 µl der Translationsansätze wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Auf der Fluorographie sind die drei Bahnen der drei cytosolischen Hsp70-Isoformen Hsp70-3/*Pm*17.1.2 (Spur1), Hsp70-2/*Pm*14.1 (Spur 2) und Hsp70-1/*Pm*5.2.3 (Spur 3) zu sehen.

Der Überstand wurde über eine Nick-Spin-Säule (Fa. Pharmacia) in Bindungspuffer überführt; dabei wird das Creatinphosphat als Substrat für die Creatinkinase abgetrennt und das ATP-Regenerationssystem inaktiviert.

Das bakteriell exprimierte His₆-markierte Jcp (2 mM) wurde mit gleichen Mengen radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70-Isoformen in Ansätzen mit und ohne 2 mM ADP in Bindungspuffer inkubiert. Die entstandenen Komplexe wurden anschließend durch Bindung des His-Tags am Jcp an Ni²⁺-NTA-Sepharose aus dem Reaktionsansatz isoliert. Von dem Affinitätsmaterial wurden die immobilisierten Proteine mit 250 mM Imidazol eluiert und mit SDS-PAGE und anschließender Fluorographie analysiert. Alle drei Hsp70-Isoformen binden das His₆-markierte Jcp (Abb. 3.35). Die Bindung erfolgt bereits in geringem Maß auch in Abwesenheit von ADP und ist in Anwesenheit von 2 mM ADP deutlicher zu erkennen.

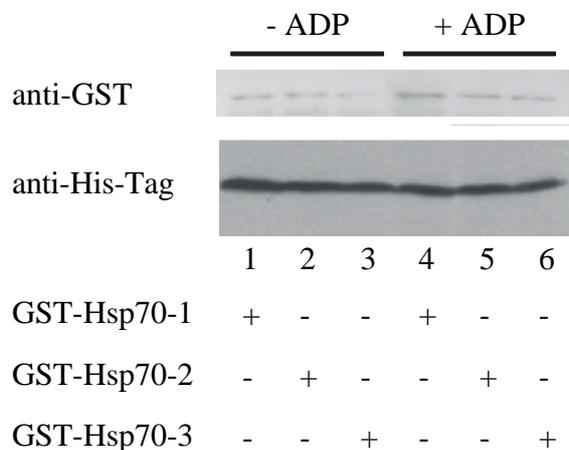
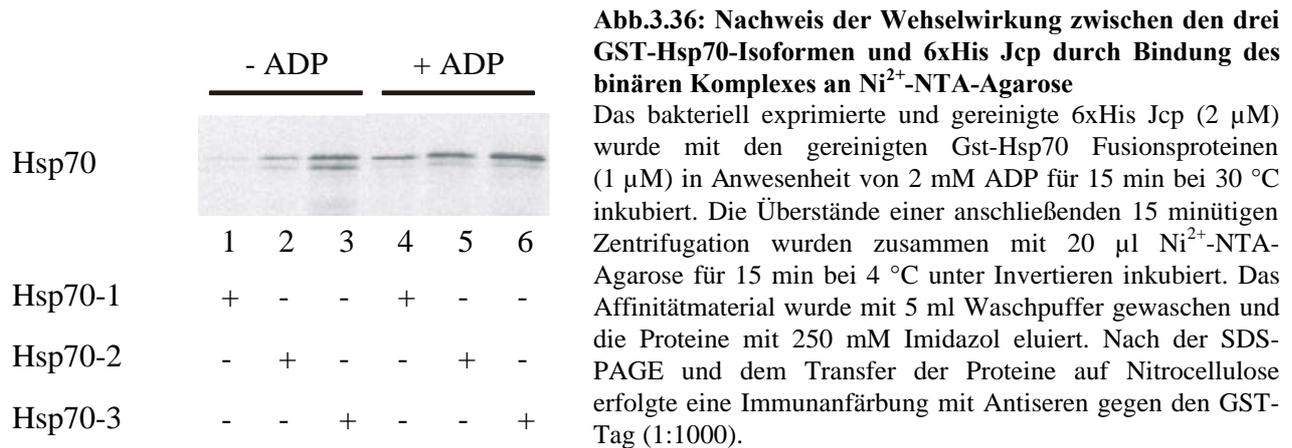


Abb. 3.35: Nachweis der Wechselwirkung zwischen 6xHis Jcp und *in vitro* translatiertem Hsp70-Isoformen

Die drei cytosolischen Hsp70-Isoformen wurden *in vitro* translatiert und in Bindungspuffer umgepuffert (2.14). Es folgte eine 15 minütige Inkubation von 6xHis DnaJ (2 µM) mit gleichen Mengen radioaktiv markierter Hsp70-Isoformen (³⁵S]-Methionin) bei 30 °C. Nach der Zentrifugation für 15 min wurden die Überstände abgenommen und mit 20 µl Ni²⁺-NTA-Agarose für 15 min bei 4 °C unter Invertieren inkubiert. Das Affinitätsmaterial wurde mit 5 ml Waschpuffer gewaschen und die Proteine mit 250 mM Imidazol eluiert. Nach der SDS-PAGE wurde eine Fluorographie angefertigt.

Wiederholt man dieses Experiment mit den unter 3.1.5 beschriebenen gereinigten GST-Hsp70-Fusionsproteinen, ergibt sich ein ähnliches Bild. Dazu wurde in Ansätzen mit und ohne ADP His₆-markiertes Jcp mit den drei GST-Hsp70-Fusionsproteinen inkubiert. Die an der Ni²⁺-NTA-Sepharose immobilisierten Proteine wurden mit 250 mM Imidazol eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Abbildung 3.36 zeigt eine Immunanfärbung der gebundenen GST-Hsp70-Fusionsproteine mit Antiserum gegen des GST-Tag.



In diesem Experiment ist zu erkennen, daß sich auch ohne ADP offensichtlich ein Komplex aller drei GST-Hsp70-Isoformen mit dem 6xHisJcp ausbildet. In Anwesenheit von 2 mM ADP ist wie mit dem *in vitro* translatierten Hsp70 eine etwas stärkere Komplexbildung zu erkennen. Um zu kontrollieren, daß die GST-Hsp70-Fusionsproteine bzw. die *in vitro* translatierten Proteine nicht unspezifisch binden, wurden die gleichen Experimente in Abwesenheit von 6xHisJcp bzw. mit einem His-Tag-Fusionsprotein des 14-3-3 Protein aus *P. megasperma* getestet (Binnewies 1999). Es wurde keine unspezifische Bindung der Hsp70-Proteine an das Ni²⁺-NTA-Affinitätsmaterial festgestellt. Es wurde auch keine Bindung der Hsp70-Proteine mit dem 14-3-3 Protein beobachtet.

3.3.1.2 Nachweis der Wechselwirkung von His₆-markierten Jcp und GST-Hsp70-Fusionsproteinen: Immobilisierung der binären Komplexe an GSH-Agarose

Bei dem Wechselwirkungsexperiment mit den gereinigten GST-Hsp70-Fusionsproteinen ist zu erkennen, daß alle drei Isoformen ähnlich gut binden (Abb. 3.36). Im Vergleich mit dem Experiment, in dem die *in vitro* translatierten Hsp70-Proteine eingesetzt wurden (Abb. 3.35), gewinnt man den Eindruck, daß auch in Abwesenheit von ADP eine Wechselwirkung zu erkennen ist (Abb. 3.35 Spur 1-3). Deshalb sollte die Komplexbildung zwischen His₆-markiertem Jcp und den drei GST-Hsp70-Fusionsproteinen mit Hilfe der Immobilisierung der entstandenen Komplexe an GSH-Agarose überprüft werden. In verschiedenen Ansätzen wurde His₆-markiertes Jcp (2 µM) mit den drei GST-Hsp70-Fusionsproteinen (1 µM) ohne Nukleotid, mit 2 mM ADP und 2 mM ATP im Bindungspuffer inkubiert. Die Isolierung der Komplexe von His₆-markiertem Jcp

und GST-Hsp70 erfolgte durch Immobilisierung des GST-Tags an GSH-Agarose und die immobilisierten Proteine wurden mit 20 mM Glutathion eluiert. Es folgte eine Immunanfärbung mit CsHsp70- und His-Tag-Antisera. Bei der Isolierung binärer Komplexe von 6xHisJcp und GST-Hsp70 an GSH-Agarose (Abb. 3.37) ergibt sich ein deutlicheres Bild im Vergleich zu den in 3.3.1.1 beschriebenen Ergebnissen. Ohne Nukleotid ist eine schwache Wechselwirkung von 6xHisJcp mit allen drei GST-Hsp70-Isoformen zu beobachten (Abb. 3.37 Spuren 1-3). Die Kontrollen mit dem Affinitätsmaterial und der 26 kDa Domäne des GST-Tags zeigten kein gebundenes His₆-markiertes Jcp (B, Spuren 4, 5, 9).

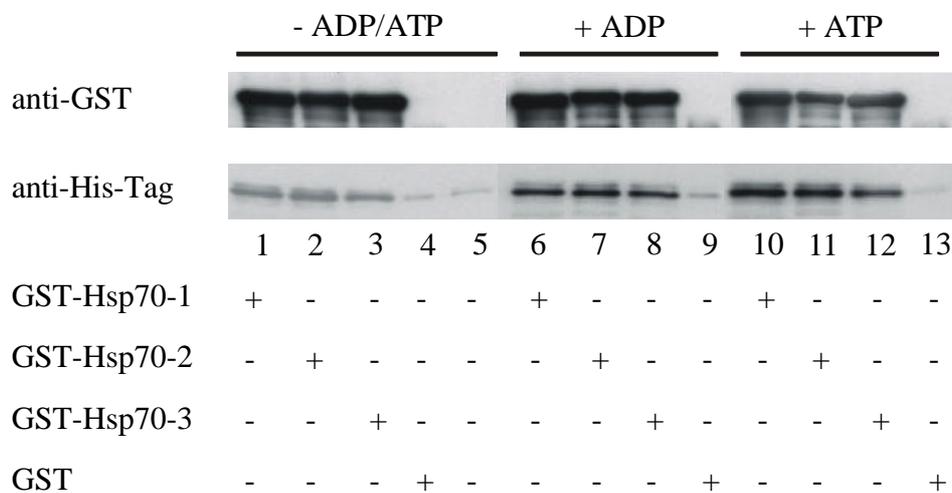


Abb. 3.37: Nachweis der Wechselwirkung zwischen 6xHisJcp und den drei GST-Hsp70-Isoformen durch Bindung des binären Komplexes an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die drei GST-Hsp70-Isoformen und das His₆-markierte Jcp wurden in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Jeweils 1 μM der GST-Hsp70 Proteine wurden mit 2 μM His₆-markierten Jcp in Anwesenheit von 2 mM ADP oder ATP für 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Ansätze wurden für 15 min zentrifugiert und die Überstände mit 20 μl GST-Agarose für 15 min bei 4 °C unter Invertieren inkubiert. Das Affinitätsmaterial wurde mit 5 ml ADP oder ATP enthaltendem Waschpuffer gewaschen und anschließend die gebundenen Proteine mit 20 mM Glutathion eluiert. Nach der SDS-PAGE und dem Transfer auf Nitrocellulose erfolgte eine Immunanfärbung der Proteine mit Antisera gegen den GST-Tag (1:1000) und den His-Tag (1:2000).

Bei Anwesenheit von 2 mM ADP bzw. 2 mM ATP findet eine Komplexbildung statt. Alle drei GST-Hsp70-Fusionsproteine binden 6xHisJcp in vergleichbarer Intensität, wobei der Unterschied zwischen Anwesenheit von ADP oder ATP im Bindungspuffer keinen großen Einfluß auf die Komplexbildung zu haben scheint. Demnach ist der C-terminale Bereich von *PmJcp* mit der TPR-Domäne und der J-Domäne ausreichend, um in Anwesenheit von 2mM ADP oder 2 mM ATP *in vitro* einen binären Komplex mit cytosolischen Hsp70-Isoformen zu bilden.

3.3.1.3 Nachweis der Wechselwirkung von His₆-markierten Jcp mit *PmHsp90*

Die Wechselwirkungsexperimente von His₆-markiertem Jcp mit *PmHsp90* wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie mit den cytosolischen Hsp70-Isoformen. In Abb. 3.38 ist eine Fluorographie mit dem *in vitro* translatierten Hsp90 zu sehen, das eine apparente Größe von ca. 88 kDa zeigt.

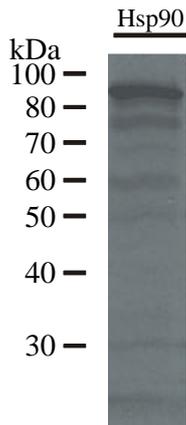


Abb. 3.38: Analyse von radioaktiv markierten *PmHsp90* nach *in vitro* Transkription/Translation

Die *in vitro* Transkription/Translation wurde mit dem Plasmid pCI/*Pm1.9.1* durchgeführt. Das cDNA-Insert mit dem kodierenden Bereich von Hsp90 steht unter der Kontrolle des T7-Promotors. Von dem Translationsansatz wurden 5 µl auf ein Gel aufgetragen.

Der Translationsansatz des *PmHsp90* wurde von Ribosomen befreit und anschließend über eine Nick-Spin-Säule (Fa. Pharmacia) umgepuffert. Geiche Anteile von *PmHsp90* wurden mit His₆-markiertem Jcp (2 µM) mit und ohne ATP (2 mM) im Bindungspuffer inkubiert. Die entstandenen Komplexe wurden durch den His-Tag des His₆-markiertem Jcp an Ni²⁺-NTA-Sepharose immobilisiert. Die gebundenen Proteine wurden mit 250 mM Imidazol eluiert und nach der SDS-PAGE durch Fluorographie sichtbar gemacht (Abb. 3.39).

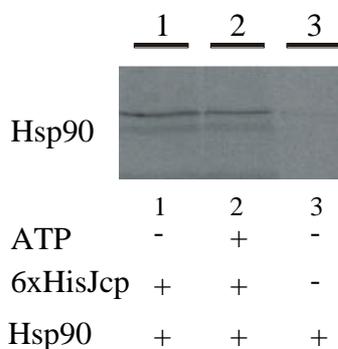


Abb. 3.39: Nachweis der Wechselwirkung zwischen 6xHisJcp und *in vitro* translatierten Hsp90

Das *PmHsp90* wurde durch gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation als radioaktiv markiertes Protein ([³⁵S]-Methionin) hergestellt und in Bindungspuffer überführt (2.18). Anschließend wurde es mit 2 µM 6xHisDnaJ für 15 min bei 30 °C mit und ohne ATP inkubiert. Nach einer fünfzehnminütigen Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und mit 20 µl Ni²⁺-NTA-Agarose für 15 min bei 4 °C unter Invertieren inkubiert. Danach wurde das Affinitätsmaterial mit 5 ml Waschpuffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit 250 mM Imidazol eluiert. Nach der SDS-PAGE wurde eine Fluorographie angefertigt.

Das *PmHsp90* kann offensichtlich His₆-markiertes Jcp binden; Dabei ist die Komplexbildung ohne ATP stärker (Abb. 3.39 Spur 1) als in Anwesenheit von 2 mM ATP (Spur 2). Keine Affinität zeigt *PmHsp90* zu dem Affinitätsmaterial (Spur 3). Das 14-3-3-Protein aus *P. megasperma* zeigt ebenfalls keine Affinität zu *PmHsp90*. Das 6xHisJcp ist daher in der Lage, über die TPR-Domänen eine Wechselwirkung mit *PmHsp90* einzugehen und möglicherweise eine dem Sti1p ähnliche Funktion als Organisations- oder Adapterprotein für Hsp70 und Hsp90 auszuüben.

3.4 Einfluß von äußeren Faktoren auf *PmJcp*

3.4.1 Einfluß von Hitzeschock auf die Expression von *PmJcp*

Die meisten Mitglieder der Hsp70- und Hsp90-Familie sind, neben einigen konstitutiv exprimierten Vertretern, durch Hitzeschock induzierbar. Dies konnte auch für eine Reihe von DnaJ-Homologen gezeigt werden. Im Fall des P58^{IPK} aus Mensch findet durch Hitzeschock keine Induktion statt. Da keine Aussagen darüber getroffen werden konnten, ob im Promotorbereich von *PmJcp* ein sogenanntes Hitze-Schock-Element (HSE) vorliegt, wurde auf Western-Blot-Ebene verglichen, wie sich ein Hitzeschock auf *PmJcp* gegenüber Hsp70 auswirkt. Zunächst wurden 50 ml Kulturen von *P. megasperma* für 2 d unter normalen Wachstumsbedingungen angezogen. Für die Hitzeschockinduktion wurden die Kulturen in einem auf 50 °C vorgewärmten Wasserbad für 20, 40 und 60 min inkubiert. Von den einzelnen Kulturen wurden Rohextrakte hergestellt (2.15) und im Western-Blot untersucht. In Abbildung 3.40 sind neben der Tintenanfärbung der Proteine nach Hitzeschock (A), die Immunanfärbungen mit *PmJcp*- (B) und CsHsp70- Antiseren (C) zu sehen.

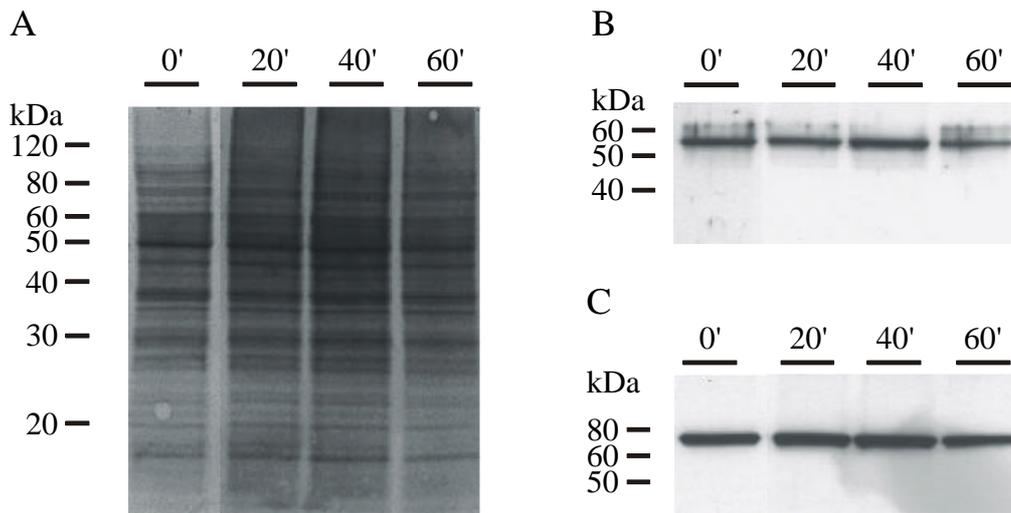


Abb. 3.40: Western-Blot-Analyse von Gesamtprotein-Extrakten nach Hitzeschockinduktion

P. megasperma Kulturen wurden für 20, 40, und 60 min einem Hitzeschock bei 50 °C in einem Wasserbad ausgesetzt. Eine Kultur wurde sofort aufgearbeitet (0'). Für die Analyse der Rohextrakte wurden jeweils 50 µg Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und immundetektiert. **A** Tintenanfärbung der auf Nitrocellulose übertragenen Proteine. **B** Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum (1:1000). **C** mit *CsHsp70*-Antiserum (1:1000).

In der Immunanfärbung mit dem *CsHsp70*-Antiserum ist eine Zunahme der Anfärbung nach 20 bzw. 40 min zu erkennen, die nach 60 min wieder auf ein Niveau zurückgeht, die der 0 min Probe entspricht; Dies entspricht einem schwachen transienten Verlauf in der Bildung von Hsp70. Eine Zunahme in der Immunanfärbung von *PmJcp* (Abb. 3.40, C) nach 20 bzw. 40 min Hitzeschock ist nicht eindeutig zu erkennen. Allerdings ist die Anfärbung nach 60 min Hitzeschock schwächer, als in der 0 min Probe ohne Hitzeschock. Anhand der Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, daß *PmJcp* nicht durch Hitzeschock induzierbar ist.

3.4.2 Einfluß von phenolischen Phytoalexinen auf *PmJcp*

Eine der vielen elizitierbaren Reaktionen von Pflanzen nach Befall z.B. durch einen phytopathogenen Pilz, ist der Aufbau von chemischen Barrieren aus Phenolen, Lignin und anderen Substanzen. Zu der Gruppe der stark hydrophoben Phenole gehören auch die Hydroxystilbene Resveratrol und Piceatannol ((Melchior und Kindl 1991), (Preisig-Müller et al. 1997), (Preisig-Müller et al. 1999)). Diese Phytoalexine können auch noch in den abgestorbenen Resten von Stilbenen-produzierenden Pflanzen nach Pilzbefall vorliegen und ihre antibiotische Wirkung auf Bodenpilze wie z.B. *P. megasperma* ausüben. Durch die Inkubation von *P. megasperma* mit

Resveratrol und Piceatannol sollte der Einfluß auf die Expression und Lokalisation von *PmJcp* untersucht werden. Dazu wurde zunächst das Wachstum von Plattenkulturen in Anwesenheit von Resveratrol und Piceatannol getestet. In Abbildung 3.41 ist der Einfluß von 1 mM Piceatannol (C, F, I) im Vergleich zu Kontrollen (A, D, G) gezeigt. Nach zwei Tagen Wachstum ist deutlich zu erkennen, daß die Kultur in Anwesenheit von 1 mM Piceatannol (C) im Vergleich zu 1 mM Resveratrol (B) und ohne Phytoalexine (A) langsamer wächst. Nach vier Tagen ist ebenfalls noch ein Einfluß auf das Wachstum von *P. megasperma* zu erkennen (D-F). In der Anwesenheit von 5 mM Piceatannol wächst der Pilz nicht mehr. Neben der Wachstumsgeschwindigkeit unterscheidet sich auch das Wachstum im Randbereich eines Myzels (G-I). Während die Kontrollkultur (G) und die bei 1 mM Resveratrol gewachsenen Kultur (H) keinen Unterschied zeigen, so sind die Hyphen eines bei 1 mM Piceatannol gewachsenen Myzels wesentlich stärker verzweigt. Dadurch kann das kompakte Wachstum des Myzels erklärt werden.

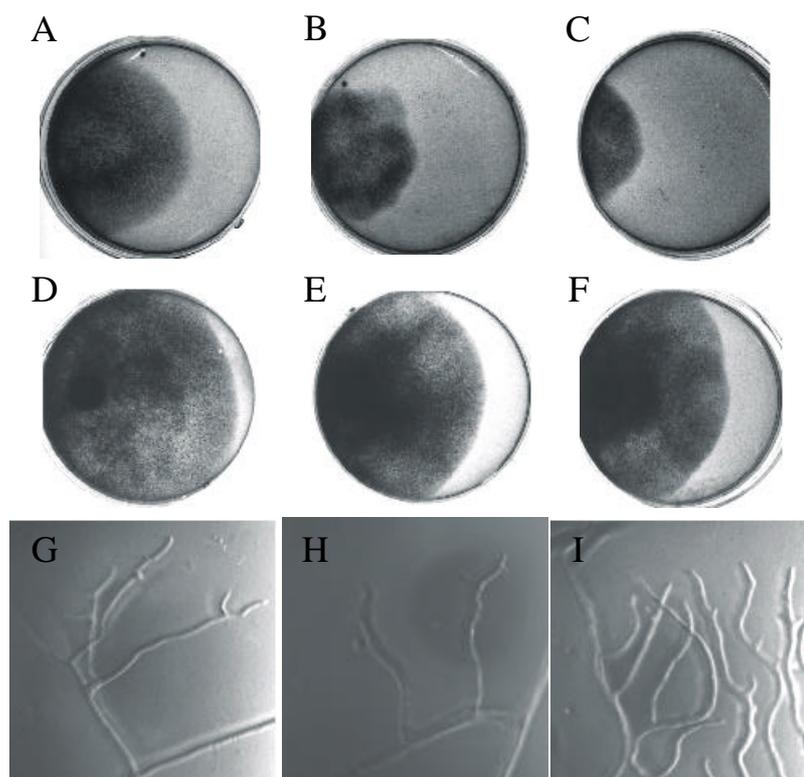


Abb. 3.41: Wachstum von *Phytophthora megasperma* auf Platten-Kulturen und Darstellung des Myzelwachstum im Randbereich nach Inkubation mit Resveratrol und Piceatannol

Die Kulturen (A-F) wurden auf V8-Medium für 2 d (A-C) bis 4 d (D-F) bei 25 °C angezogen. Für die Untersuchung des Randbereichs des Myzels wurden die Kulturen auf Objektträger mit V8-Medium für 2 d bei 25°C angezogen (G-I). Der Einfluß von 1 mM Resveratrol (B, E, H) und Piceatannol (C, F, I) auf das Wachstum ist im Vergleich zu Kontrollen, die nur mit dem Lösungsmittel inkubiert wurden, zu sehen (A, D, G).

Ob die Behandlung mit den Hydroxystilbenen einen Einfluß auf die Expression von *PmJcp* hat, sollte durch eine Western-Blot-Analyse untersucht werden. Dazu wurden Rohextrakte von Kulturen hergestellt, die für 2 d mit 1 mM Resveratrol oder Piceatannol inkubiert wurden. Die Immunanfärbung mit *PmJcp*- (B) und *CsHsp70*- Antiseren (C) ist in Abbildung 3.42 zu sehen.

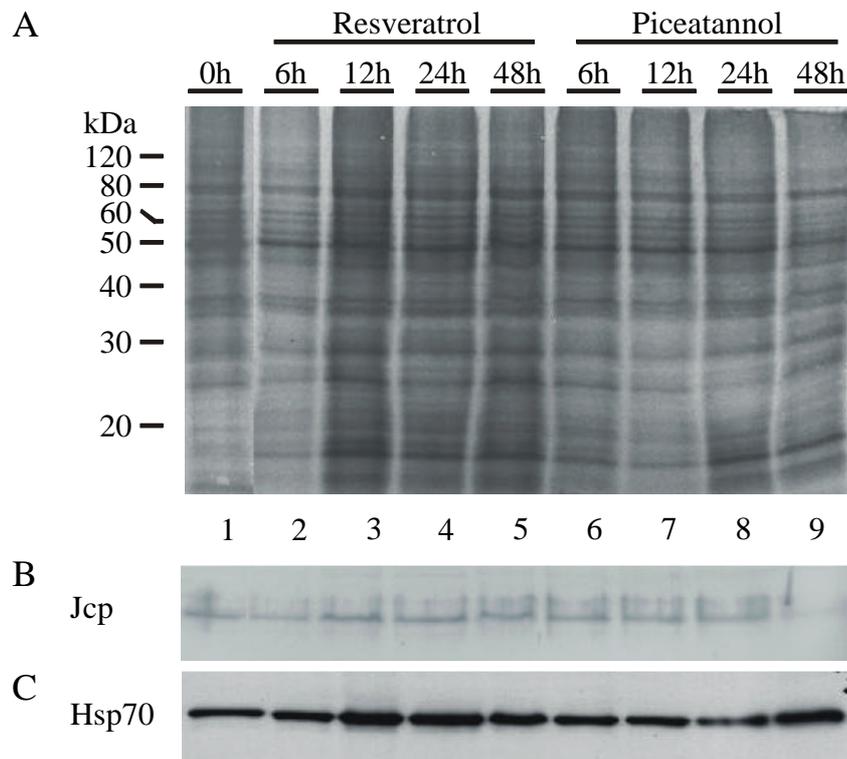


Abb. 3.42: Einfluß von Resveratrol und Piceatannol auf die Expression von *PmJcp* und *Hsp70*

Kulturen von *P. megasperma* wurden für die angegebenen Zeiten mit 1 mM Resveratrol (Spuren 2-5) oder 1 mM Piceatannol (Spuren 6-9) inkubiert. Die Kulturen wurden nach 2.13.3 aufgearbeitet. Aliquote der erhaltenen Rohextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf Nitrocellulose übertragen. Anschließend wurde eine Immunanfärbung mit Antiseren gegen *PmJcp* und *CsHsp70* durchgeführt. **A** Tintenanfärbung der auf Nitrocellulose übertragenen Proteine. **B** Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum (1:1000), **C** mit *CsHsp70*-Antiserum (1:1000).

Während bei der Inkubation mit Resveratrol die Bandenintensität der Immunanfärbung sowohl bei *PmJcp* als auch bei *Hsp70* ähnlich ist, nimmt die Intensität der Anfärbung von *PmJcp* nach 24 h und 48 h Inkubation mit 1 mM Piceatannol leicht ab und die Intensität der Anfärbung mit *Hsp70* etwas zu. Offensichtlich verursacht Piceatannol eine Stresssituation in *P. megasperma*, die sich neben dem veränderten Wachstum (Abb. 3.41) auch in der Expression von *PmJcp* und *Hsp70* ausdrückt. Ob Resveratrol bzw. Piceatannol sich auf die Lokalisierung von *PmJcp* auswirken, wurde mit Fluoreszenzmikroskopie überprüft (Abb. 3.43).

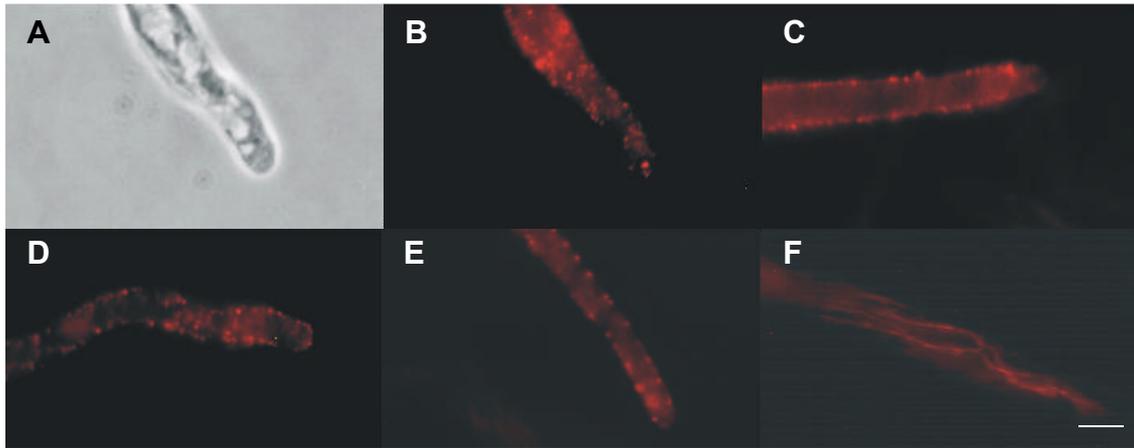


Abb. 3.43: Einfluß von Resveratrol und Piceatannol auf die Lokalisation von *PmJcp*

Myzel wurde auf Objektträgern in Anwesenheit von 1 mM Resveratrol **C** und 1 mM Piceatannol **B** für 1 d angezogen. Anschließend wurde die *in situ* Lokalisierung von *PmJcp* überprüft B-D. **A** Phasenkontrastbild einer Hyphenspitze. **B** Kontrollanfärbung von *PmJcp* ohne Inkubation mit Stilbenen. **C**, **D** *In situ* Lokalisation von *PmJcp* mit 1 mM Resveratrol bzw. 1 mM Piceatannol. **E**, **F** Detektion von Aktin und Tubulin in Anwesenheit von 1 mM Piceatannol. Der Größenbalken entspricht 5 µm.

Neben der Kontrollanfärbung von *PmJcp* ohne Inkubation mit Stilbenen (**B**), ist die Anfärbung und Lokalisation in Anwesenheit von 1 mM Resveratrol identisch (**C**). Im Vergleich dazu hat sich die Lokalisation von *PmJcp* in Anwesenheit von 1 mM Piceatannol auch nicht verändert. Man gewinnt allerdings den Eindruck, daß die Intensität der Anfärbung geringer geworden ist (**D**). Keinen Einfluß hat die Inkubation mit 1 mM Piceatannol auf das Aktin- und Tubulin-Cytoskelett (**F**). auch bei Inkubation mit 1 mM Resveratrol ist keine Veränderung zu beobachten.

3.4.3 Einfluß des Aktin-Cytoskeletts auf die Lokalisation von *PmJcp*

Eine mögliche Funktion von *PmJcp* könnte die Beteiligung zusammen mit anderen Chaperonen bei der Assemblierung der Aktin-Filamente oder der mit Aktin assoziierten Proteine sein. Obwohl mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie festgestellt wurde, daß *PmJcp* nicht mit Aktin kolokalisiert vorliegt, wurde überprüft, ob die Zerstörung der Aktin-Filamente und der Aktin-“patches” einen Einfluß auf die Lokalisation von *PmJcp* hat. Die Bildung der Aktin-Filamente kann durch Substanzen wie Cytochalasin D und Latrunculin A inhibiert werden. Myzel wurde mit 0,5 µg/µl Latrunculin A im Kulturmedium für 30 min behandelt. Die Kulturen wurden aufgearbeitet und in einen 100000 x g Niederschlag und Überstand fraktioniert (2.15).

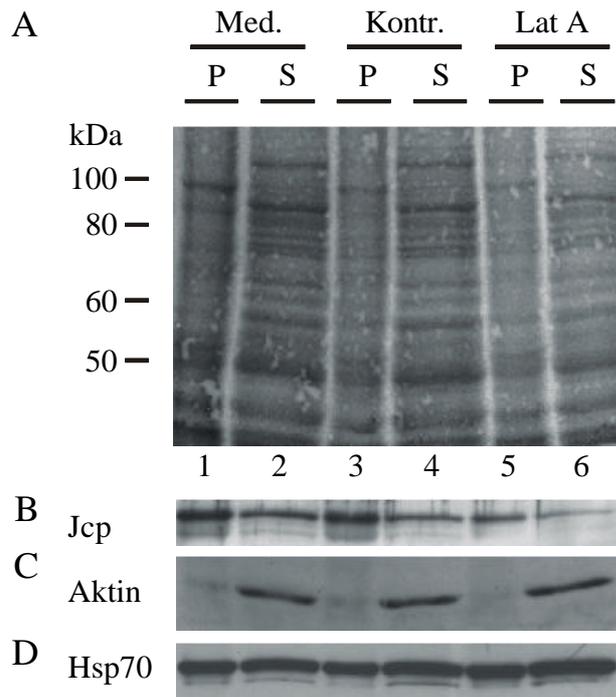


Abb. 3.44: Einfluß von Latrunculin A auf die Lokalisation von Jcp und Aktin in *P. megasperma*

Von drei *P. megasperma* Kulturen, die unter normalen Bedingungen (2.2.1) angezogen wurden, wurden Rohextrakte hergestellt, die für 30 min mit DMSO oder 0,5 µg/µl Latrunculin A (Lat A) inkubiert wurden. Die Myzelien wurden nach 2.14 aufgearbeitet, wobei sich an die Zentrifugation bei 600xg unmittelbar eine Zentrifugation bei 100000xg anschloß. Die Proteine im Niederschlag (P) und die Proteine des Überstandes (S) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit Tinte gefärbt. Anschließend wurde eine Immunanfärbung durchgeführt. **A** Tintenanfärbung der Proteine auf Nitrocellulose. **B** Immunanfärbung mit *PmJcp*-Antiserum (1:1000). **C** mit Aktin-Antiserum (1:500). **D** mit *CsHsp70*-Antiserum (1:1000).

Die Disassemblierung der Aktin-Filamente und der Einfluß von Latrunculin A auf die Lokalisation von *PmJcp* wurde durch Immunanfärbungen mit dem *PmJcp*- (B) und dem Aktin-Antiserum (C) überprüft (Abb. 3.44). Durch den Aufschluß des Myzels mit einem Ultraturrax für 4 mal 15 sec ist der größte Teil des Aktins, wie in der Immunanfärbung zu erkennen ist, in den Überständen (Spur 2, 4, 6) zu finden. Ein Teil der Aktin-Filamente ist trotzdem zusammen mit Membranen sedimentiert (Spur 1, 3). Im Vergleich zu Kulturen, die unter normalen Bedingungen gewachsen sind, und Kulturen, die zur Kontrolle mit DMSO inkubiert wurden (Spuren 3, 4), ist in keiner der Immunanfärbungen ein Unterschied zu erkennen. Im Vergleich zu den Fraktionen, die mit Latrunculin A behandelt wurden, nimmt die Aktin-Anfärbung im Überstand (Spur 6) trotz geringerer Proteinmenge zu und im Niederschlag (Spur 5) ab. Das ist ein Anzeichen dafür, daß die Mikrofilamente bereits vor der Aufarbeitung des Myzels depolymerisiert waren. Im Fall der *PmJcp*-Anfärbung (B) ist bei allen drei Proben das Verhältnis der Anfärbung in den Fraktionen mit den Niederschlägen und den Überständen gleich. Verhältnismäßig ist die Anfärbung in der Fraktion des Überstandes der Latrunculin A-Probe nicht stärker geworden. Das bedeutet, daß die Depolymerisation der Aktin-Filamente keinen Einfluß auf die Lokalisation von *PmJcp* hat. Die Immunanfärbung von Hsp70 nimmt in der mit Latrunculin A behandelten Probe sowohl im Niederschlag als auch im Überstand zu. Dies ist als Anzeichen für eine Streßsituation zu werten. Das Ergebnis dieser biochemischen Daten konnte durch fluoreszenzmikroskopische

Untersuchungen bestätigt werden. Dazu wurden Kulturen, die auf einen Objektträger gewachsen waren mit DMSO oder mit Kulturmedium und 0,5 µg/ml Latrunculin A betropft und für 30 min inkubiert. In Abbildung 3.45 ist die Lokalisierung von *PmJcp* *in situ* dargestellt und zwar in Kulturen, die mit Latrunculin A behandelt wurden (A,B), und von Kontrollkulturen, die nur mit DMSO inkubiert wurden (C,D).

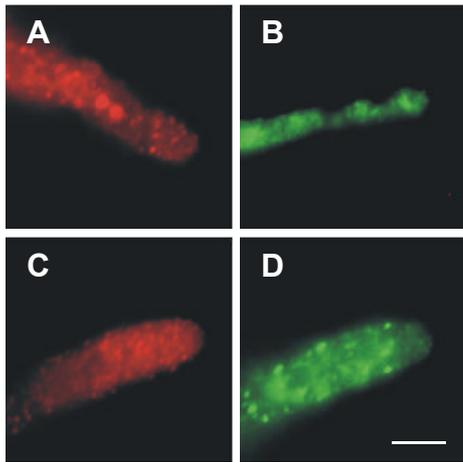


Abb. 3.45: *In situ*-Lokalisierung von *PmJcp* und Aktin nach Inkubation des Myzels mit Latrunculin A

Eine zwei Tage alte 5 ml Kultur von *P. megasperma* wurde für 30 min mit 0,5 µg/ml Latrunculin A inkubiert. Anschließend wurde die Lokalisation von *PmJcp* und Aktin überprüft. **A** Lokalisation von *PmJcp* nach Behandlung mit Lat A. **B** Lokalisierung von Aktin nach Behandlung mit Lat A. **C, D** Kontrollanfärbung von *PmJcp* und Aktin in nicht behandeltem Myzel (DMSO). Der Größenbalken entspricht 5 µm.

In beiden Anfärbungen ist die kortikale Verteilung von *PmJcp* zu sehen. In der mit Latrunculin A behandelten Probe ist die typische punktförmige Verteilung von Aktin (B) verschwunden, während in der mit DMSO behandelten Kontrollkultur die kortikale Verteilung des Aktins (D) weiter zu beobachten ist. Demzufolge ist ein Zusammenhang zwischen der Lokalisierung von *PmJcp* und dem Aktin-Cytoskelett auszuschließen.

4. Diskussion

4.1 Lokalisation von *PmJcp*

Bei dem neuartigen Protein *PmJcp*, das sowohl TPR-Motive, als auch eine J-Domäne besitzt, sind vorerst keine Daten über die Funktion vorhanden. Es ist zu erwarten, daß sich mit der Kenntnis der intrazellulären Lokalisation auch Hinweise über die Funktion ergeben. Die Untersuchungen zur Lokalisation wurden mit Hilfe unabhängiger Methoden durchgeführt. Zellfraktionierung (3.5), Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie (3.6) ergaben, daß das Protein vorwiegend an der Plasmamembran zu finden ist. Hierdurch unterscheidet sich *PmJcp* zu seinem nächsten Homologen, P58^{IPK}, für das eine Lokalisation im Cytosol und in geringen Mengen auch an Mitochondrien und im Kern beschrieben wird (Korth et al. 1996). Die biochemische Charakterisierung der Membranstrukturen, an die *PmJcp* gebunden ist, erfolgte durch Subfraktionierung der P100-Fraktionen mit einer Gleichgewichtsdichtezentrifugation auf einem linearen Saccharosegradienten. Das *PmJcp* cosedimentierte mit Membranen, die eine Dichte von 1,15-1,19 g/cm³ haben. Um zu kontrollieren, daß es sich dabei um Membranen handelt, wurde ein Flotationsexperiment durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß *PmJcp* mit den Membranen coflotierte. Neben *PmJcp* konnte in den gleichen Fraktionen auch Aktin detektiert werden. Eine Charakterisierung der Fraktionen des Sedimentationsgradienten mit Leitenzymen ergab, daß diese Fraktionen die höchsten Aktivitäten für die gegenüber Vanadat-sensitiven H⁺-ATPase zeigten, einem in der Plasmamembran lokalisiertem Protein (Giannini et al. 1988). Die ermittelten Werte für die Dichte der Plasmamembranen (1,15-1,19 g/cm³) stimmen gut mit bereits bekannten Werten für Plasmamembranen aus *Phytophthora* und Pflanzen überein (Giannini et al. 1988), (Meyer et al. 1976) bzw. (Quail 1979). Das Auftreten von Aktin in diesen Fraktionen kann als weiterer Hinweis auf die Lokalisation von *PmJcp* an der Plasmamembran gewertet werden. Aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen war bekannt, daß das Aktin-Cytoskelett von filamentösen Pilzen aus Strängen und aus punktförmigen Anhäufungen, den sogenannten "Aktin-patches" besteht, die entlang des Kortex von Hyphen angeordnet sind (Heath 1990). Sowohl die "Aktin-patches" als auch die Aktinfilamente des Aktin-Cytoskeletts sind wichtig für die Exo- und Endocytose in filamentösen Pilzen. Die gerichtete Bewegung der beteiligten Vesikel zur Plasmamembran wird durch die Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts und seiner assoziierten Motorproteine vermittelt (Steinberg 1998). Welche Rolle die "Aktin-patches" dabei spielen ist

noch nicht vollständig geklärt. Für *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* konnte gezeigt werden, daß sie vor allem an den Orten aktiver Zellwandsynthese zu finden sind (Marks and Hyams 1985). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Hefe zeigten, daß die Plasmamembran z.T. mit den "Aktin-patches" assoziiert ist (Mulholland et al. 1994). Dies könnte auch das Auftreten von Aktin in Plasmamembran-enthaltenen Fraktionen von *P. megasperma* erklären.

Bei dem Oomyceten *Saprolegnia ferax* bildet sich an der Hyphenspitze eine apikale Kappe aus Aktinfilamenten, die direkt an die Plasmamembran angrenzt. Protoplasten von *S. ferax* sind in der Lage eine tubuläre Hyphe zu regenerieren, was mit einer auskeimenden Spore vergleichbar ist. In den Protoplasten ist das Aktin sowohl als Filament als auch als punktförmige Anhäufung in der Peripherie der Zelle, direkt an die Plasmamembran angrenzend, zu finden. In der sich regenerierenden Hyphe bildet sich das Aktin-Cytoskelett wieder normal aus (Heath et al. 2000).

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (3.6) konnte *PmJcp* ebenfalls in einer dem Aktin ähnlichen, punktförmigen Verteilung entlang des Kortex in Hyphen detektiert werden. Die Integrität des Aktin- und Tubulin-Cytoskeletts war erhalten geblieben und die Anfärbungen waren mit denen vergleichbar, die auch in *P. infestans* und *P. cinnamomi* beobachtet werden konnten (Temperli et al. 1990), (Jackson und Hardham 1998). Allerdings konnte eine Co-Lokalisation von *PmJcp* und Aktin nicht beobachtet werden. Ein direkter Zusammenhang oder eine enge funktionelle Beziehung des *PmJcp* zum Aktin-Cytoskelett ist deshalb auszuschließen. Auch die Inhibierung der Aktinfilamentbildung durch Latrunculin A hatte keinen Einfluß auf die Lokalisation von *PmJcp* (3.11). Der Einfluß von Latrunculin A auf die Bildung der Aktinfilamente war am Beispiel von *S. cerevisiae* beobachtet worden (Ayscough et al. 1997). Nach der Behandlung mit Latrunculin A waren weder Aktinfilamente noch punktförmige Aktin-Anhäufungen zu erkennen. Die Zellen sind nicht in der Lage ihr Aktin-Cytoskelett zu reorganisieren. Allerdings hat die Behandlung keinen Einfluß auf die Lokalisation von Cdc42, Bem1 und Septinen. Diese Proteine sind an den Stellen notwendig, wo neue Tochterzellen gebildet werden. Aufgrund des nicht intakten Aktin-Cytoskeletts kann sich jedoch keine Zellachse bilden, und die Bildung der Tochterzelle wird gestört. Zudem erfolgt auch kein Transport von sekretorischen Vesikeln zu der neu entstehenden Tochterzelle.

Für eine Reihe von DnaJ-Homologen ist die Lokalisation an einer Membran oder in einem Organell gezeigt worden. Das DnaJ-Homologe aus *Cucumis sativus* besitzt am extremen C-Terminus ein 'CaaX'-Motiv, das posttranslational mit einem Farnesylrest modifiziert wird. Über diesen Farnesylrest ist es auf der cytosolischen Seite der Membran von Glyoxysomen verankert

(Preisig-Müller et al. 1994b). Das DnaJ-Homologe in *S. cerevisiae* Yd1jp hat am extremen C-Terminus ebenfalls ein 'CaaX'-Motiv und kann nach der posttranslationalen Modifikation mit einem Farnesylrest mit der ER-Membran assoziieren (Caplan and Douglas 1991), (Caplan et al. 1992). Beide Proteine verhalten sich bei einer Salzbehandlung wie integrale Membranproteine und können durch Salzbehandlung nicht von der Membran abgelöst werden. In Hefe sind auch DnaJ-Homologe bekannt, die Transmembran-Domänen enthalten und so an der Membran verankert sind. So ist das Sec63p Bestandteil des Sec-Translokationskomplexes im ER. Es besitzt eine in das Lumen des ER ragende J-Domäne und ist zusammen mit Kar2p, dem BiP-Homologen aus *S. cerevisiae* an der Faltung von importierten Proteinen beteiligt (Musch et al. 1992), (Feldheim et al. 1992). Es wird für Sec63p und Kar2p auch eine Beteiligung bei dem retrograden Transport von fehlerhaften Proteinen aus dem ER zurück in das Cytoplasma diskutiert (Plempner et al. 1997). Neben Sec63p ist ein weiteres DnaJ-ähnliches Protein am ER von Hefe lokalisiert: Jem1p. Es besitzt eine Transmembran-Domäne und die J-Domäne ist wie bei dem Sec63p in das Lumen des ER ausgerichtet. Eine Wechselwirkung mit Kar2p ist noch nicht gezeigt worden. Jedoch zeigen $\Delta jem1$ -Mutanten einen Defekt bei der Kernfusion und der anschließenden Karyogamie (Nishikawa und Endo 1997). Ein solcher Defekt ist auch bei Kar2p-Mutanten gezeigt worden ((Latterich und Schekman 1994), (Ng und Walter 1996). Somit ist eine Interaktion von Jem1p mit Kar2p nicht auszuschließen. Im Vergleich zu den beschriebenen DnaJ-Proteinen verfügt *PmJcp* weder über einen Farnesylierungsmotiv noch über eine Transmembrandomäne bzw. über ausgeprägte hydrophobe Bereiche, die für eine Membranassoziiierung verantwortlich sein könnten. Darüber hinaus läßt es sich bereits mit 50 mM $MgCl_2$ von der Membran ablösen (3.2.1.2). Eine Lokalisierung im Inneren eines Zellkompartiments läßt sich auch ausschließen, da die Behandlung einer Membranpräparation mit Proteinase K zum völligen Abbau von *PmJcp* führt (3.2.1.3). Dies spricht dafür, daß *PmJcp* auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist. Weiterhin deuten die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie auch auf eine Lokalisation des *PmJcp* an der Plasmamembran hin (3.2.2.2)

Bei Djp1p aus *S. cerevisiae* handelt es sich um ein DnaJ-Protein, das vermutlich beim Import von Proteinen in die Peroxisomen beteiligt ist (Hettema et al. 1998). Neben der J-Domäne hat Djp1p weitere Bereiche, deren Funktionen noch nicht beschrieben wurden. Der größte Teil des Proteins liegt im Cytosol vor, ein geringer Teil ist mit Membranen assoziiert, wobei eine Lokalisation an Mitochondrien, Peroxisomen und ER ausgeschlossen wird. Weiterhin ist der an Membranen assoziierte Teil des Djp1p komplett zugänglich für Proteinase K, für die Autoren ein Anzeichen dafür, daß Djp1p cytosolisch orientiert ist und als Teil eines Protein-Komplexes mit diesen

Membranen oder mit Membranproteinen assoziiert ist. Ein möglicher Interaktionspartner ist bis heute nicht beschrieben. Es gibt zwei Vorgänge, die in räumlicher Beziehung zur Plasmamembran stattfinden und mit der Beteiligung von DnaJ-Proteinen ablaufen. Im Fall der Clathrin umhüllten Vesikel (coated pits) erfolgt die Dissoziation der Clathrinhülle unter Beteiligung von Auxilin und Hsp70. In einem *in vitro* Ansatz mit gereinigten Komponenten konnte gezeigt werden, daß die J-Domäne am extremen C-Terminus von Auxilin für die Dissoziation der Clathrin-Untereinheiten notwendig ist. Zunächst erfolgte eine Wechselwirkung von Auxilin mit der schweren Kette von Clathrin. Die für die Interaktion notwendige Region grenzt direkt an die J-Domäne an. Als nächster Schritt bindet Hsp70 die J-Domäne von Auxilin, und in einer ATP abhängigen Reaktion erfolgt die Dissoziation des Clathrin-Gerüsts (Holstein et al. 1996), (Cheetham et al. 1996), (Jiang et al. 1997). Ein weiteres DnaJ-Protein, nämlich das Cystein-String-Protein p34 (Csps), ist auf der Oberfläche von unterschiedlichen sekretorischen Vesikeln in Nervenzellen lokalisiert. Dieses Protein spielt vermutlich eine Rolle bei der Freisetzung von Neurotransmittern, der Exocytose von Neuroendokrinen und könnte generell an der Sekretionsmaschinerie in Nervenzellen beteiligt sein. *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß beide Csps aus Mensch die ATPase-Aktivität von Hsp70 steigern konnten. Mutationen im HPD-Motiv verhinderten die Wechselwirkung mit Hsp70 (Braun und Scheller 1995), (Braun et al. 1996), (Chamberlain und Burgoyne 1997). So wie die Ausschüttung von Neurotransmittern aus den endständigen Synapsen von Nervenzellen und der gerichtete Transport dorthin erfolgt, so findet in filamentösen Pilzen und Oomyzeten der Transport von Vesikeln aus distalen Bereichen der Hyphe zur Hyphenspitze statt.

Für das polarisierte Wachstum von Hyphen, Sekretion von Exoenzymen und Positionierung von Organellen ist ein intaktes Cytoskelett notwendig (Steinberg 1998), (Heath et al. 2000). Dabei ist die Exocytose von Proteinen und die Zellwandausdehnung der wachsenden Hyphe offensichtlich miteinander gekoppelt. Bei *S. cerevisiae* zeigten temperatursensitive Sec-Mutanten sowohl bei der Proteinsekretion als auch beim Wachstum der Zellwand unter normalen Anzuchttemperaturen einen Defekt (Schekman 1985). In *S. cerevisiae* variiert der Grad der Aktin-Polymerisation während des Zellzyklus in Abhängigkeit verschiedener Cycline und Cyclin-abhängiger Proteinkinasen (CDKS). Dabei ist interessant, daß die Verteilung des Aktins mit den Orten der Zellwandexpansion und Exocytose korreliert (Lew und Reed 1993). Im Zusammenhang mit dem Wachstum von Hyphenspitzen wird auch diskutiert, ob ein Ca^{2+} -Gradient in der Hyphe eine Rolle spielt. Einen Beweis für einen Ca^{2+} -Gradienten konnte in Untersuchungen an *Saprolegnia ferax* gezeigt werden. In echten Pilzen ist dieser Zusammenhang noch nicht gezeigt worden (Jackson

und Heath 1993). Ionenkanäle, über die z.B. der Ca^{2+} -Transport erfolgt, sind im Plasmalemma von *S. cerevisiae* und auch bei *Saprolegnia ferax* gefunden worden. Es handeln sich dabei um mechano-sensitive Kanäle, die in patch-clamp Experimenten aktiviert werden konnten (Jackson und Heath 1993), (Garrill et al. 1993). Ein Zusammenhang mit dem Ca^{2+} -Fluß und der Freisetzung von Sporen wurde für *Phytophthora parasitica* beschrieben (Morris und Sigurdson 1989), (Warburton und Deacon 1998). Morris und Sigurdson haben (1989) untersucht, ob eine mögliche Aktivierung solcher mechano-sensitiven Kanäle einen Einfluß auf die Aktivität integraler Membranproteine haben könnte. Eine Beteiligung des *PmJcp* an einem der beschriebenen Prozesse ist aufgrund der Lokalisierung an der Plasmamembran vorstellbar.

4.2 Veränderung der Lokalisation und Expression von *PmJcp* nach Behandlung mit phenolischen Phytoalexinen

Die Anpassung eines Organismus an eine neue Situation im jeweiligen Lebensraum, wie z.B.: Nährstoffmangel, Hitzeschock oder chemischer Streß verlangt sehr oft die Neubildung von Proteinen und deren gerichteten Transport zu den verschiedensten Orten in der Zelle. Chaperone nehmen an diesen Prozessen teil, da sie maßgeblich an der Faltung der Proteine beteiligt sind und für die richtige Lokalisierung der funktionstüchtigen Proteine sorgen. Wird eine Pflanze von einem pathogenen Pilz befallen, so kann sie sich wehren, indem sie Phytoalexine an den Ort des Befalls sekretiert und auf diese Weise eine chemische Barriere gegen den Eindringling aufbaut. Ob diese chemischen Produkte Auswirkungen auf Chaperone oder auf Abläufe haben, die unter 4.1 beschrieben sind, ist bisher noch nicht ausreichend untersucht.

Für das Hydroxystilben Resveratrol konnte gezeigt werden, daß transgene Tabak-, Reis- und Tomatenpflanzen, die entsprechende Stilbensynthasen enthielten, resistenter gegen *P. infestans* und *Magnaporthe grisea* waren (Melchior und Kindl 1990), (Hain et al. 1993), (Preisig-Müller et al. 1997), (Stark-Lorenzen et al. 1997), (Thomzik et al. 1997). Das Wachstum von *Botrytis cinerea* wird durch Resveratrol nicht nur *in vitro* sondern auch *in planta* inhibiert (Hoos und Blauch 1990), (Jeandet et al. 1995). Eine vergleichbare Situation ist bei *P. megasperma* nach Inkubation mit Resveratrol bzw. Piceatannol zu beobachten. Hierbei ist der Effekt mit Piceatannol wesentlich deutlicher als bei einer Behandlung mit Resveratrol. Kulturen, die nicht mit Stilbenen behandelt wurden, wuchsen nach zwei Tagen doppelt so schnell im Vergleich zu Kulturen, die mit Resveratrol behandelt wurden, und dreimal so schnell im Vergleich zu Kulturen, die Piceatannol

ausgesetzt wurden. Nach zwei Tagen Inkubation mit Piceatannol ist ein leichter Rückgang der Expression von *PmJcp* und eine geringere Anfärbung an der Plasmamembran in den Hyphen zu sehen (3.4.2). Im Fall des *Sis1p* aus *Apitotrichum curvatum* (Specht et al. 1998) ist durch die Behandlung mit 1 mM Resveratrol eine Abnahme der Konzentration von *Sis1p* an Ribosomen zu beobachten. Einen Einfluß auf die Expression von *Sis1p* war nicht zu erkennen (M. Lubeck, persönliche Mitteilung).

Bei der Inkubation mit Resveratrol ist der Effekt auf die Expression von *PmJcp* deutlich geringer. Im Vergleich zu den Kontrollkulturen und der mit Resveratrol behandelten Kultur erscheint das Myzel der Kultur, die mit Piceatannol inkubiert wurde, im Randbereich wesentlich kompakter und die Hyphen sind verzweigter. *P. megasperma* zeigt hierbei ähnliche Wachstumseigenschaften wie *B. cinerea*, der eine chemische Barriere aus Resveratrol durch die Sekretion von Laccasen, die vermutlich beim Abbau des Resveratrols beteiligt sind, überwindet. Eine Wachstumshemmung ist jedoch auch hier zu beobachten. In Flüssigmedium wurde ebenfalls der Abbau von Resveratrol beschrieben, allerdings wurde keine Wuchshemmung festgestellt. Die unterschiedlichen Effekte von Resveratrol auf das Wachstum von *B. cinerea* auf festem und flüssigem Nährmedium können durch den geringen Diffusionsradius der Laccase auf festem Substraten erklärt werden (Hoos und Blauch 1990). Eine Entgiftungsreaktion von Resveratrol und Piceatannol durch Laccasen ist auch für *P. megasperma* vorstellbar, da sich bei längerem Wachstum (4 d) die Ausbreitung der Hyphen mit und ohne Resveratrol kaum unterschied. Ein weiteres Beispiel für die Überwindung der pflanzlichen Abwehr ist die Detoxifizierung von Pisatin aus Erbsen durch die Pisatin-Demethylase aus *Nectria hämatococca*, einem Ascomyceten (VanEtten et al. 1989), (Wasmann und VanEtten 1996). Neben der Möglichkeit, Fungizide oder Phytoalexine durch Enzyme abzubauen, verfügen Pilze über Mechanismen, solche Substanzen aus der Zelle zu transportieren. An dem Transport dieser Substanzen sind maßgeblich ABC-Transporter beteiligt. Eine *AtrB*-Mutante von *Aspergillus nidulans* zeigt eine Wachstumshemmung auf festem Nährmedium bei Anwesenheit von 1,3 mM Resveratrol. Es handelt sich dabei um eine Mutante des ABC-Transporters, der bei der Resistenz gegen toxische Substanzen ("Multi-Drug-Resistance") eine Rolle spielt. Bei einer Überexpression von *AtrB* zeigt die Mutante mit Resveratrol keine Wachstumshemmung mehr. Das bedeutet, daß Resveratrol ein Substrat für diesen Transporter darstellt (Andrade et al. 2000). Welche Ziele Resveratrol oder Piceatannol in pilzlichen Zellen haben, ist bisher noch unklar.

Bei Metalaxyl handelt es sich um ein Fungizid, das in *P. infestans* selektiv die rRNA-Synthese inhibiert (Bruck et al. 1980), (Lee et al. 1999). *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß Resveratrol als Agonist des Östrogens wirken kann und in Zellkulturen die Östrogen-Rezeptor vermittelte

Transkription steigern kann (Gehm et al. 1997). Steroidhormon-Rezeptoren liegen in der inaktiven Form an Hsp90 gebunden vor. Nach der Bindung des Hormons löst sich Hsp90 ab, und der Rezeptor bindet in dimerer Form im Zellkern an die DNA. Die Beteiligung von *PmHsp90* an ähnlichen Prozessen ist vorstellbar. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch, daß in dem heterothallischen Oomyceten *Achlya ambisexualis* die sexuelle Vermehrung durch das steroidähnliche Antheridiol vermittelt wird und dabei sowohl als Hormon und als Pheromon wirkt. Antheridiol induziert die sexuelle Fortpflanzung und es kommt zu einer verstärkten Ausbildung und Verzweigung von Hyphen, resultierend in der Ausbildung von Antheridien und Oogonien in den männlichen und weiblichen Hyphen. Die Antheridien und Oogonien verwachsen miteinander und bilden Oosporen aus. Während der Ausbildung und der vermehrten Verzweigung der Hyphen ist eine Erhöhung der Expression von Hsp70 und Hsp90 festzustellen. In dem 5'-flankierenden Bereich der beiden Hsp90-Gene in *A. ambisexualis* wurden Sequenzmotive gefunden, die ähnlich zu Steroidhormon-bindenden Elementen (HRE) in Säugern sind, an die z. B. Glucocorticoid- oder Östrogenrezeptoren binden (Brunt et al. 1998b). Interessant ist auch, daß zumindest eine Hsp90-Isoform in einem 9S Proteinkomplex enthalten ist, der Antheridiol binden kann. In diesem Komplex sind neben Hsp70 noch Homologe des FKBP51 und des p23 aus Säugern, sowie drei weitere Proteine mit den Massen 110 kDa, 61 kDa und 27 kDa enthalten. Anders als die erwähnten Proteine konnte das 61 kDa Protein nur aus Antheridiol induziertem Myzel zusammen mit Hsp90 coimmunpräzipitiert werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um den Antheridiol Rezeptor (Brunt et al. 1998a). Offensichtlich hat Hsp90 eine Funktion bei der Reifung dieses Rezeptors, d.h. es ist daran beteiligt, das Rezeptorprotein in eine Konformation zu bringen, daß Antheridiol gebunden werden kann. Die Beteiligung von Hsp90-Proteinen an der Reifung von Steroidhormon-Rezeptoren wird in 4.3 diskutiert. Desweiteren ist Hsp90 nach der Antheridiolinduktion aufgrund einer gesteigerten Expression möglicherweise auch an der Faltung einer Reihe anderer Proteine beteiligt, bei denen es sich um weitere Transkriptionsfaktoren oder Proteinkinasen handeln könnte. Eine ähnliche Funktion ist auch für *PmHsp90* zusammen mit *PmJcp*, Hsp70 und weiteren beteiligten Proteinen in *P. megasperma* denkbar.

Loubradou et al. (1997) beschreiben, daß eine Mutation in einem Hsp90-Gen von *Podospora anserina* die sexuelle Fortpflanzung beeinflusst, so daß Hsp90 für bestimmte Funktionen notwendig ist.

Auf welche Weise Resveratrol bzw. Piceatannol auf Ziele in *P. megasperma* einwirken, ist unbekannt. Es muß daher noch untersucht werden, ob Vorgänge wie Hyphenwachstum und Vesikeltransport beeinflusst werden, oder ob Phytoalexine eine antagonistische Wirkung als

Hormon haben und die Transkription beeinträchtigen. Desweiteren ist auch unklar, ob *P. megasperma* möglicherweise über ein Transportsystem verfügt, um die Stilbene in der Zelle abzubauen zu können, oder ob Laccasen sekretiert werden, um die Stilbene extrazellulär zu detoxifizieren. Um die Frage zu klären, welche Ziele von Resveratrol betroffen sind, und welche Abwehrreaktionen bei dem Pilz ausgelöst werden, könnten Methoden wie Differential Display oder das Erstellen einer differentiellen cDNA-Bibliothek, mit der Transkripte eines bestimmten Stadiums identifiziert werden können, angewendet werden. Das Einführen von Mutationen in Gene von *Phytophthora* und eine anschließende Untersuchung der Phenotypen ist bisher noch nicht beschrieben worden.

4.3 Struktur und mögliche Funktion von *PmJcp*

Daß *PmJcp* eine dem P58^{IPK} vergleichbare Funktion hat, ist nicht auszuschließen, erscheint aber infolge der Lokalisation an der Plasmamembran unwahrscheinlich. Aufgrund der Ergebnisse der Wechselwirkungsexperimente mit Hsp70 und Hsp90 ist hingegen die Beteiligung von *PmJcp* bei der Faltung bzw. bei der Aktivierung eines Proteins innerhalb eines Komplexes an der Plasmamembran vorstellbar. In dazu durchgeführten Bindungsversuchen (3.3.1.1-3) mit einem Fusionsprotein, bestehend aus einem His-Tag und dem C-terminalen Bereich von *PmJcp*, einschließlich der TPR-Motive 5-9 und der J-Domäne, konnte *in vitro* eine Wechselwirkung von *PmJcp* mit den drei cytosolischen Hsp70-Isoformen und Hsp90 aus *P. megasperma* festgestellt werden. Diese Wechselwirkung erfolgte in Anwesenheit von ADP und ATP, eine geringe Wechselwirkung war allerdings auch ohne Zugabe von ADP bzw. ATP zu beobachten. Die Bildung eines stabilen Komplexes aus *PmJcp* und den Hsp70-Isoformen in Anwesenheit von ADP bzw. ATP steht im Einklang mit Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen DnaJ- und Hsp70-Proteinen (Minami et al. 1996), (Hartl 1996). Auch wenn es Unterschiede im ATP-Hydrolysezyklus molekularer Chaperone zwischen Prokaryoten und Eukaryoten gibt, (Mayer und Bukau 1998), haben doch alle die Gemeinsamkeit, einen stabilen, ternären Komplex aus DnaJ, Hsp70 und dem Substratpeptid zu bilden, und zwar dann, wenn Hsp70 in der ADP-gebundenen Form vorliegt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im ATPase-Zyklus eukaryotischer Hsp70-Proteine ist nicht die Dissoziation des ADP sondern die Hydrolyse des ATP. Bei Säugern ist die Dissoziation des ADP von Hsp70 durch das 41 kDa Protein Hip reguliert. Es bindet an die ATPase-Domäne von Hsp70, verzögert die Dissoziation des ADP und kann so die

durch eine Graunterlegung markiert.

Für die Funktion von *PmJcp* ist eine genauere Betrachtung der TPR-Domäne und der Vergleich der TPR-Domänen von P58^{IPK} und Hop/Sti1p notwendig. In den Abb. 4.3 und 4.4 wurden die TPR-Motive von *PmJcp* mit denen von Hip und aus Ratte bzw. mit den TPR-Motiven von P58^{IPK} verglichen.

Konsensussequenz	W W F F F A YK RA Y KL Y A DY KAL L P
<i>RnHip</i> (TPR 1)	A NEK K GA A IDALNDGELQ K AIDLFTD A IK L NPRL
<i>PmJcp</i> (TPR 7)	LESSKEGANN A FKSGKMA E AV E MYTECLKID P Q N : . . * . * : * : . . * : : * : : : * : . : * : * :
<i>RnHip</i> (TPR 2)	A ILY A K R AS V F V KLQ K PN A AIRDCDRA I EIN P DS
<i>PmJcp</i> (TPR 8)	SKIHCN R ANALSRLYRHDE A IK D CD K AIYYDHGY : : . . : * * . . : * : : : * : * * * : * * : .
<i>RnHip</i> (TPR 3)	A Q P Y K W R GKAHRL L GH W E E AARDLAL A CK L DYDE
<i>PmJcp</i> (TPR 9)	A KAYLR K AACL K ALGGLENLEQALRVYDQASKLV * : . * . . . : * * * : : * : : : .
<i>RnHop</i> (TPR 1)	VNEL K EKG N KALSAGNID D ALQCYSE A IK L D P Q N
<i>PmJcp</i> (TPR 1)	A EEF K AQGNELY K RGDY Q RAID K Y T Q A IDA A PT V . : * * * : * * : . * : : * : : * * * * . *
<i>RnHop</i> (TPR 2)	HV L YSNRSAAY A K K GDY Q K A YEDGCKT V D L K P D W
<i>PmJcp</i> (TPR 2)	VAYYGN R AAAS F MLGKHKDVIT D CN R AI V FD P LY . * . * * : * * * * . * : . . . * : : : : * : :
<i>RnHop</i> (TPR 3)	G K GYSRKAAALE F L N R F EE A K R T Y EEGLKHEANN
<i>PmJcp</i> (TPR 3)	FKGYVRKAKAQLALGDND A AM K T Y Q T GLV R D P NN * * * * * * * * . : * : * * : * * : . * * *
<i>RnHop</i> (TPR 4)	A L K E K ELGN D AY K KK D F D K A L K H Y D K A K EL D PT N
<i>PmJcp</i> (TPR 7)	LESSKEGANN A FKSGKMA E AV E MYTECLKID P Q N . . * * . * : * * * . . : * : : * : . : * * * *
<i>RnHop</i> (TPR 5)	MTYIT N Q A AVHF E KGD Y N K CREL C E K A I EV G REN
<i>PmJcp</i> (TPR 8)	SKIHCN R ANALSRLYRHDE A IK D CD K AIYYDHGY . * * * . . . : : . : * * * * . :
<i>RnHop</i> (TPR 6)	RED Y RQ I A K AYARIGNSYF K E E RY K D A IHF Y N K S
<i>PmJcp</i> (TPR 9)	A KAYLR K AACL K ALGGLENLEQALRVYDQASKLV : * : * . : * . : * : . : : : :

Abb. 4.3: Vergleich der TPR-Motive von *PmJcp* mit Hip und Hop

Gezeigt werden die TPR-Motive 7-9 von *PmJcp* im Vergleich mit den TPR-Motiven von Hip, sowie die TPR-Motive 1-3 bzw. 7-9 von *PmJcp* im Vergleich mit den ersten sechs TPR-Motiven von Hop. Die für diese Motive charakteristischen Aminosäurereste wurden durch Fettdruck hervorgehoben und richten sich in ihrer Auswahl nach der Konsensussequenz aus Frydman und Höfeld (1997). Identische AS-Reste sind mit * gekennzeichnet, ähnliche AS-Reste mit einem : bzw. .

		W	W			
		F	F	F		
Konsensussequenz	A	YK	RA	Y	KL	Y A DY KAL L P
<i>HsP58</i> (TPR 1)		VEKHLELGK	LLAAGQLAD	ALSQ	FHAAVDGDP	PDN
<i>PmJcp</i> (TPR 1)		A EEF K AQGNEL	YKRGDY	Q R AIDKY	T Q AIDAAPT	V
		. * . .	* : : *	* :	* : . : :	* : * . *
<i>HsP58</i> (TPR 2)		YIAY Y RRATV	F L AMGKSKA	ALPDLTK	VIQLK	MDF
<i>PmJcp</i> (TPR 2)		VAY Y GN R AAAS	F M L G KHKDVIT	DCN R AIV	FDPLY	
		* . * : . .	: : * * *	* . . : *	. . : *	. . : *
<i>HsP58</i> (TPR 3)		TAARL Q RGHLL	L K Q G KLDE	A E DD F K V L	KSN P SE	NEEK E AQ S QLIK S DE
<i>PmJcp</i> (TPR 3)		FKG Y VR K A K AQ	LAL G DNDA	A M K T Y Q T	GLVRD P NN	ATLINE K RT L EM
		. : : : . :	* * . * *	. : : . *	* : * . :	: . : : :
<i>HsP58</i> (TPR 4)		M Q RLRS Q AL	NAFGSGD Y T	A A IAFLD	K I LEVCV	WD
<i>PmJcp</i> (TPR 4)		A LDKL Q R G KEH	LAAG R F S Q	AVNV F D	S A M Q V C S	GS
		: : : : *	: : : * :	* : . : *	: : * * .	.
<i>HsP58</i> (TPR 5)		A ELREL R A E C	F I KEG E PR K A	I S DL K A A S	K L KND N	
<i>PmJcp</i> (TPR 5)		S Q L K LM R SEAL	I G S E R Y D E	A F A E L T RL	M R T N SS S	
		: : * : * : * . :	. . : * : : * .	: : : * .	: : : . . .	
<i>HsP58</i> (TPR 6)		TEAF Y K I STL	Y Y Q L G D	HEL S LSEV	RE C L K L D Q	DH
<i>PmJcp</i> (TPR 6)		PEV L F Q R A R	CL Y Y Q G E	F P S A I K H	L Q Q A L R S	DPN
		. * . : : : :	: * * : .	: : . : : : * :	* * :	: : * : : .
<i>HsP58</i> (TPR 7)		LN K L I ES A E	L I R D G R Y	T D A T S K Y E S	V M K T E P S I	A E Y T
<i>PmJcp</i> (TPR 7)		LES S KE G A	N A N A F K S	G K M A E A V	E M Y T E C L	K I D P Q N
		* : . * . : :	: : * : :	: : * . . *	. : * : *	: .
<i>HsP58</i> (TPR 8)		VR S K E R I CH	C F S K D E	K P V E A I R	V C SEV L Q	M E P D N
<i>PmJcp</i> (TPR 8)		SK I H C N R A	N A L S R L Y	R H D E A I K	D C D K A I Y	D H G Y
		: : . . : : * :	: * * * :	* . : : :	: .	
<i>HsP58</i> (TPR 9)		V N AL K D R A E A	Y L I E E M	Y D E A I Q	D Y E T A Q	E H N E N D
<i>PmJcp</i> (TPR 9)		A K A Y L R K A	A CL K AL	G G L EN L E	Q AL R V D Q	A S K L V
		. : * : * .	: * : :	* : : : :	* : * . :	

Abb. 4.4: Vergleich der TPR-Motive von *PmJcp* mit P58^{IPK}

Gezeigt werden die TPR-Motive 1-9 von *PmJcp* mit den neun Motiven von P58^{IPK}. Die für TPR-Motive charakteristischen Aminosäurereste wurden durch Fettdruck hervorgehoben und richten sich in ihrer Auswahl nach der Konsensussequenz aus Frydman und Höfeld (1997). Identische AS-Reste sind mit * gekennzeichnet, ähnliche AS-Reste mit einem : bzw. .

Die Übereinstimmung der TPR-Motive mit denen von Hip, Hop und P58^{IPK} ist relativ gut. Ein Sequenzvergleich von *PmJcp* mit dem menschlichen P58^{IPK} ergibt eine Homologie von 41 % und eine Identität von 27 %. Der Vergleich der TPR-Motive von *PmJcp* mit den TPR-Motiven von Hip (Homologie 47 %, Identität 18 %) und Hop (Homologie 38 %, Identität 18 %) zeigt auch ähnliche Bereiche an. Ein Vergleich von Hop und P58^{IPK} über die gesamte Aminosäuresequenz ergibt eine Homologie von 30 % und eine Identität von 18 %.

Für P58^{IPK} ist bekannt, daß das TPR-Motiv Nr.6 für die Wechselwirkung mit Hsc70 wichtig ist, um eine Inhibitorin mit der PKR zu erreichen (Melville et al. 1999). Hop/Sti1p übt dagegen eine Art Adapterfunktion aus. Es vereint die Bindungsstellen für die beiden Chaperone Hsp70 und Hsp90 auf einer Polypeptidkette. Dabei bildet sich ein Multiproteinkomplex aus, in dem ein Substratprotein von dem Hsp70-System mit Cofaktoren auf das Hsp90-System übergeben wird (Frydman und Höhfeld 1997), (Buchner 1999), (Mayer und Bukau 1999). Hop übernimmt selbst dabei keine Funktion als Chaperon (Freeman et al. 1996). Es enthält neun TPR-Motive, die in zwei TPR-Domänen unterteilt werden. Aus Experimenten mit Deletionsmutanten von Hop/Sti1p ist bekannt, daß die N-terminale TPR-Domäne 1 (TPR-Motive 1-3) für eine Wechselwirkung mit dem C-Terminus von Hsc70 notwendig ist und die TPR-Domäne 2 (TPR-Motive 4-6) mit dem C-Terminus von Hsp90 wechselwirkt (Chen et al. 1996), (Lassle et al. 1997), (Demand et al. 1998). Für die Wechselwirkung mit Hop/Sti1p ist das konservierte C-terminale EEVD-Motiv von Hsp90 essentiell (Chen et al. 1998). Hop/Sti1p inhibiert die ATPase-Aktivität von Hsp90 und blockiert auch den Zugang von ATP und dem Inhibitor Geldanamycin in die N-terminale ATP-Bindungstasche (Prodromou, 1999). Scheufler et al. konnten in Cokristallisationsexperimenten aufklären, daß die TPR-Domäne 1 von Hop ein Heptapeptid des C-Terminus von Hsp70 spezifisch bindet (Scheufler et al. 2000). Cytosolische Hsp70-Proteine besitzen am C-Terminus ebenfalls, wie cytosolische Hsp90-Proteine, ein konserviertes EEVD-Motiv. Die TPR-Domäne 2a bindet dagegen spezifisch das C-terminale Pentapeptid MEEVD von Hsp90. In den beiden Kristallstrukturen liegen die beiden Peptide in jeweils einer gestreckten Konformation vor und durchspannen eine von der TPR-Domäne gebildete Furche. Die Bindung erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem EEVD-Motiv, wobei das C-terminale Aspartat mit der Carboxylgruppe als Anker dient. Die weiteren AS-Reste in der TPR-Domäne von Hop, die für die Wechselwirkung mit dem EEVD-Motiv wichtig sind, sind auch in der Aminosäuresequenz von *PmJcp* unter Berücksichtigung der Lage der TPR-Domäne eingezeichnet (Abb. 4.5). Die Übereinstimmung dieser Aminosäuren ist vor allem im N-terminalen Bereich mit den ersten drei TPR-Motiven sehr groß. In dem Bereich der TPR-Domäne 2a von Hop und den TPR-Motiven 7-9 von *PmJcp* ist die Übereinstimmung geringer und die Position von Lys301 und Arg305 in Hop unterscheidet sich in *PmJcp* um 7 AS. Eine Bindung des *PmHsp90* über das C-terminale EEVD-Motiv an die TPR-Motive 7-9 von *PmJcp* ist nicht auszuschließen. Mit dem Programm "Predator" (ExPaSy, Schweiz) wurde die mögliche Lage von Helices im *PmJcp* bestimmt. In Abbildung 4.5 ist die Aminosäuresequenz von *PmJcp* unter Voraussage der Positionen der Helices dargestellt. Zur Verdeutlichung wurde die Lage der TPR-Motive und der AS-Reste, die in

Die Voraussage der Helices für *PmJcp* läßt sich mit der Lage der TPR-Motive in Einklang bringen. In den meisten TPR-Motiven liegen zwei Helices vor, die durch eine Schleife miteinander verbunden sind. In einigen dieser Schleifen sind Glycin und Prolin-Reste vorhanden. Diese beiden Aminosäuren liegen vor allem da vor, wo eine Polypeptidkette eine Biegung macht, wie z.B. bei einem Helix-turn-Helix-Motiv. Ob *PmHsp90* über ein EEVD-Motiv mit *PmJcp* wechselwirkt, müßte durch Experimente mit C-terminal verkürzten *PmHsp90*-Mutanten überprüft werden. Ein weiterer Aspekt ist, daß *PmHsp90* in Anwesenheit von ATP *PmJcp* schwächer bindet. Für Hsp90 wird angenommen, daß es ATP-unabhängig als Chaperon wirkt (Freeman et al. 1996). Bis heute wurde angenommen, daß ausschließlich die Interaktion mit p23 möglicherweise ATP-abhängig ist. Kommt es nicht zur Wechselwirkung von p23 mit Hsp90, so kann z.B. ein Steroidhormon-Rezeptor nicht vollständig in einen Hormon-bindenden Zustand überführt werden (Pratt 1998). Morishima et al. (2000) postulieren einen Mechanismus zur Steroidrezeptor-Aktivierung, der von zwei ATP-abhängigen Schritten ausgeht. Zunächst bindet Hsp70 im ATP-gebundenen Zustand den Rezeptor, die hydrophobe Steroidhormon-Bindungstasche ist in einem gefalteten Zustand. Nach der ATP-Hydrolyse, unterstützt durch Hsp40, erfolgt eine Konformationsänderung des Hsp70. Die Autoren nehmen an, daß sich die Hormon-Bindungstasche öffnet und hydrophobe Reste mit Hsp70 interagieren. Möglicherweise erfolgt dieser Schritt zur Öffnung der Hormon-Bindungstasche auch mehrmals. Für den zweiten ATP-abhängigen Schritt wird die Beteiligung von Hsp90 notwendig. Damit der Rezeptor das Steroidhormon binden kann, muß Hsp90 und wahrscheinlich auch Hsp70 im ATP-gebundenen Zustand vorliegen. In diesem Zustand kann die Wechselwirkung von p23 mit Hsp90 erfolgen und der Rezeptor kann das Steroidhormon binden. Möglicherweise ist die Interaktion von *PmHsp90* und *PmJcp* mit einer Situation vergleichbar bei der $P58^{IPK}$ mit $P52^{rIPK}$ interagiert, bei diesem Protein handelt es sich um den Inhibitor von $P58^{IPK}$ (Gale et al. 1998). Es zeichnet sich durch eine Homologie zu der ATPase-Domäne von Hsp90 aus.

```

PmHsp90      MSAPEAETFAFSADINQLLSLIINTFYSNKDIFLRELISNASDALDKIRYSSLTDASVLD 60
HsP52        -----MPNFCAAPNCTRKSTQSDLAFFR 23
              : . * . * : * * : * : . :

PmHsp90      TDKNLEIKVTPDKANGTLTIQDSGIGMTKADLINNLGTIAKSGTKAFMEALAGADISMI 120
HsP52        FPR-----DPAQCQKWVENCRRADLEDKTPDQLNKHYRLCAKHFETSMIC----- 68
              :      * * . : : . . : . : * . . : * * : : .

PmHsp90      GQFGVGFYSAYLVADKVVVHSHKHNDDQYVWESAAGGSFTVTPDTEPILRGTRIVLKLK 180
HsP52        -----RTSPYRTVLRDNAIPTIFDLTSHLNNPHSRHRKRIKELS 107
              : . . . : : * * * . . : * * : : * .

```

<i>PmHsp90</i>	EDMLEYLEERKLDLVKKHSEFIGFPIKLYVEKTEEKEVTDDEEEDEKEGEDDKPKVEE	240
<i>HsP52</i>	EDEIRTLKQK-----KIDETSEQEQKHKETNNSNAQN	139
	** :. *:::	*: .*::* * ::::..
<i>PmHsp90</i>	VEEEEGEKKKTKKIKEVTHEWDHLSQKPIWMRKPEDVTHEEYASFYKSLTNDWEEHAA	300
<i>P52</i>	PSEEEGEGQ-----DEDILPLTLEEKENKEYLKSLEFILLMKGQNIP	182
	.***** :	:. : : * . : * *::: * ::: .
<i>PmHsp90</i>	VKHFSVEGQLEFKACLFTPKRAPFDMFEGGAKKKVNNIKLYVRRVFIMDNCEELMPEYLS	360
<i>P52</i>	LDGHEAD---EIP EGLFTP----DNFQALLECRINSGEVLRKRKFETTAVNTLFCSTQ	234
	:. . . : * : **** * * . : : : * . : : * * : * : . .	
<i>PmHsp90</i>	FVKGVDSEDLPLNISRETLOQNKILRVIKKNLVKKCLEMFAELAEDNEKYQKFYESFSK	420
<i>P52</i>	QRQ-----MLEICESCIREETLREVRDSSHFFSIITDDVVDIAG-----EE	274
	: * : * . . : : : . * : . : : * : . :	
<i>PmHsp90</i>	NKLGIHEDSTNRTKIAKLLRYHSTKSGEEMTSLDDYISRMPESQPGIYYVTGESKKAVE	480
<i>P52</i>	HLPVLRVRFVDESHNLREEFIGFLPYEADAEILAVKFHTMITEKWGLNMEYCRG--QAYIV	332
	: * : : : . . : . : : : . : * : : : : : : . : * * : : :	
<i>PmHsp90</i>	NSPFIEKLLKKGYEVLYMVEAIDEYAVQQLKEYEGKKLICATKEGLKMEETEDE-KKAFE	539
<i>P52</i>	SSGFSSMK-----VVASRLLEKYPQAIYTLCSALNMWLAKSVPVMGVS	378
	. * * . * : * * : * : * : * : * : . . . * : * : : . . .	
<i>PmHsp90</i>	EAKAATEGLCKLMKEVLDDKVEKVEISNRIVESPCVLVTGEYGWSANMERIMKAQALRDS	599
<i>P52</i>	VALGTIEEVCSFFHRSPQLLELDNVISVLFQN-----SKERGKELKEI	422
	* . : * : * : : : . : : * : : . : : . : : : : : : : : * : * :	
<i>PmHsp90</i>	STSAYMSSKKTMEINPLHPIIKSLREKAEADKSDKTVKDLIWLLYDTSLLTSGFSLDEPT	659
<i>P52</i>	CHSQWTGRHDAFEI--LVELLQALVLCLDGINSDTNIR-----WNNYIAGRAFLCSAV	474
	. * : . : : : * * * : : : * : . : * * . : : : : : : . : * * . . .	
<i>PmHsp90</i>	TFANRIHRLIKLGLSIDDDDDADETMDLPPLEGEDEEEESTMEEVD	706
<i>P52</i>	SDFDFIVTIVLKNKI-----	492
	: : * : : * . *	

Abb. 4.6 Gegenüberstellung der abgeleiteten AS-Sequenzen von *PmHsp90* und *P52*^{H₁PK}
 Identische AS-Reste sind mit * gekennzeichnet, ähnliche AS-Reste mit einem : bzw. ..

Ein Sequenzvergleich von *P52*^{H₁PK} mit *PmHsp90* ergab eine Homologie von 43 % und eine Identität von 16 %. Welche Bereiche von *PmJcp* an der Wechselwirkung mit den drei Hsp70-Isoformen und dem *PmHsp90* beteiligt sind, müßte durch die Verwendung der jeweiligen Deletionsmutanten überprüft werden. Eine Aussage darüber, ob *PmJcp* auch *in vivo* zusammen mit Hsp70 und Hsp90 an der Plasmamembran vorliegt, kann aufgrund der Ergebnisse nicht gemacht werden.

Zusammenfassung

Phytoalexine können von Pflanzen als Antwort auf Pilzbefall synthetisiert und sekretiert werden. Sie lösen beim phytopathogenen Pilz eine Stresssituation aus und verändern die Lokalisation von Aktin, Tubulin und Chaperonen.

Es wurde eine cDNA-Bibliothek erstellt, die die Genexpression eines zwei Tage alten Myzels des pflanzenpathogenen Oomyceten *Phytophthora megasperma* repräsentiert. Bei ihrer Durchmusterung mit homologen Sonden konnten cDNAs für PmJcp, für ein DnaJ-Protein und für ein Hsp90 gefunden werden.

Im Falle von PmJcp wurde der fehlende 5'-Bereich der cDNA über inverse PCR aus genomischer DNA erhalten. Die so konstruierte cDNA codiert für ein Polypeptid mit 543 AS-Resten und einer molekularen Masse von 59 kDa. Durch Northern-Blot-Analyse konnte ein Transkript mit einer Größe von 1,75 kb nachgewiesen werden. Das abgeleitete Protein enthält eine C-terminale J-Domäne und eine Tetratricopeptid-Repeat (TPR)-Domäne mit 9 TPR-Motiven, von denen bekannt ist, daß sie an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind. Die Analyse der DnaJ cDNA ergab ein Protein mit einem offenen Leserahmen mit 422 AS-Resten und einer Masse von 46,6 kDa. Die *PmHsp90* cDNA codiert für ein 706 AS großes Polypeptid mit einer molekularen Masse von 80,4 kDa.

Die für den C-terminus codierende cDNA von PmJcp wurde bakteriell exprimiert. Das gereinigte Protein wurde zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern eingesetzt. Damit ließ sich die Lokalisation von *PmJcp* an der Plasmamembran mit biochemischen Methoden nachweisen. Konfokale Laser-Scan Mikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie bestätigten die intrazelluläre Lokalisation von Jcp in Proteinkomplexen, die mit der Plasmamembran assoziiert sind. Es wurde der Einfluß äußerer Faktoren auf die Lokalisation von *PmJcp* getestet. Eine Inkubation des Myzels mit Latrunculin A verhinderte die Polymerisation der Aktin-Filamente und hatte die Abnahme der "Aktin-patches" zur Folge. Die Lokalisation von *PmJcp* blieb unbeeinflusst. Die Behandlung von *P. megasperma* mit den Phytoalexinen Resveratrol und Piceatannol führte zu einer Wachstumshemmung, hatte aber nur einen geringen Einfluß auf die Lokalisation von PmJcp. Es konnte nach zwei Tagen Inkubation mit Piceatannol eine

geringere Expression von *PmJcp* festgestellt werden. Ein Hitzeschock hatte keine Erhöhung der Expression von *PmJcp* zur Folge.

Der C-terminale Bereich von *PmJcp*, einschließlich der J-Domäne und der TPR-Motive 5-9, wurde als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-Tag exprimiert und gereinigt. In Bindungsversuchen mit den gereinigten Fusionsproteinen dreier cytosolischer Hsp70 aus *P. megasperma* mit Glutathion-S-Transferase wurden, bei Anwesenheit von 2 mM ADP bzw. ATP, alle drei Isoformen in binären Komplexen gefunden. Mit radioaktiv markierten cytosolischen Hsp70 und Hsp90 konnte auf die gleiche Weise ein stabiler Komplex zwischen *PmJcp* und Hsp70 bzw. zwischen *PmJcp* und Hsp90 nachgewiesen werden.

Literatur:

- Aitken A (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. Trends in Cell Biology 6:341-347
- Andrade AC, Del Sorbo G, Van Nistelrooy JG, Waard MA (2000) The ABC transporter AtrB from *aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. Microbiology 146:1987-1997
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. Science 181:223-230
- Aumüller G, Renneberg H, Hasilik A (1997) Distribution and subcellular localization of a lysosome-associated protein in human genital organs. Cell Tissue Res 287:335-342
- Ayscough KR, Stryker J, Pokala N, Sanders M, Crews P, Drubin DG (1997) High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. J Cell Biol 137:399-416
- Ballinger CA et al. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. Mol Cell Biol 19:4535-4545
- Barouch W, Prasad K, Greene L, Eisenberg E (1997) Auxilin-induced interaction of the molecular chaperone Hsc70 with clathrin baskets. Biochemistry 36:4303-4308
- Bartnicki-Garcia S, Wang MC (1983) Biochemical Aspects of Morphogenesis in *Phytophthora*. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH (eds) *Phytophthora-Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, pp 121-139
- Binnewies A (1999) Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg
- Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, 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
- Bostock RM, Kuc J, Laine R (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in potato. Science 212:67-69
- Bradford MM (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
- Braun JE, Scheller RH (1995) Cysteine string protein, a DnaJ family member, is present on diverse secretory vesicles. Neuropharmacology 34:1361-1369

- Braun JEA, Wilbanks SM, Scheller RH (1996) The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase. *J Biol Chem* 271:25989-25993
- Brodsky JL, Shekman R (1994) Heat shock cognate proteins and polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 85-109
- Bruck RI, Fry WE, Apple AE (1980) Effect of metalaxyl, an acylalanine fungicide, on developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 22:253-257
- Brunt SA, Borkar M, Silver JC (1998a) Regulation of hsp90 and hsp70 genes during antheridiol-induced hyphal branching in the oomycete *Achlya ambisexualis*. *Fungal Genet Biol* 24:310-324
- Brunt SA, Perdew GH, Toft DO, Silver JC (1998b) Hsp90-containing multiprotein complexes in the eukaryotic microbe *Achlya*. *Cell Stress Chaperones* 3:44-56
- Buchner J (1999) Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 24:136-141
- Bukau BT, Hesterkamp T, Lührink J (1996) Growing up in a dangerous environment: a network of multiple targeting and folding pathways for nascent polypeptide in the cytosol. *Trends Cell Biol.* 6
- Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG (1992) YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* 71:1143-1155
- Caplan AJ, Douglas MG (1991) Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. *J Cell Biol* 114:609-621
- Chamberlain LH, Burgoyne RD (1997) The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins. *J Biol Chem* 272:31420-31426
- Cheetham ME, Anderton BH, Jackson AP (1996) Inhibition of hsc70-catalysed clathrin uncoating by Hsj1 proteins. *Biochem J* 319:103-108
- Chen MS, Silverstein AM, Pratt WB, Chinkers M (1996) The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J Biol Chem* 271:32315-32320
- Chen S, Sullivan WP, Toft DO, Smith DF (1998) Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress Chaperones* 3:118-129
- Chomczynski P (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* 201:134-139

- Cooper TG, Beevers H (1969) Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J Biol Chem* 244:3507-3513
- Craig EA, Baxter BK, Becker J, Halladay J, Ziegelhoffer T (1994) Cytosolic Hsp70's of *Saccharomyces cerevisiae*: Roles in Protein Synthesis, Protein translocation, Proteolysis and regulation. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 31-52
- Cutforth T, Rubin GM (1994) Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Cell* 77:1027-1036
- Cyr DM, Douglas MG (1994) Differential regulation of Hsp70 subfamilies by the eukaryotic DnaJ homologue YDJ1. *J Biol Chem* 269:9798-9804
- Cyr DM, Langer T, Douglas MG (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci* 19:176-181
- Das AK, Cohen PW, Barford D (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *Embo J* 17:1192-1199
- Demand J, Luders J, Höhfeld J (1998) The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol Cell Biol* 18:2023-2028
- Diefenbach J (1999) Dissertation. In: Philipps-Universität Marburg, Marburg
- Diefenbach J, Kindl H (2000) The membrane-bound DnaJ protein located at the cytosolic site of glyoxysomes specifically binds the cytosolic isoform 1 of Hsp70 but not other Hsp70 species. *Eur J Biochem* 267:746-754
- Dobson CM, Ellis RJ (1998) Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *Embo J* 17:5251-5254
- Elliot C, G. (1983) Physiology of Sexual Reproduction in *Phytophthora*. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH (eds) *Phytophthora-Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, St. Paul, Minnesota, pp 71-80
- Ellis RJ, van der Vies SM (1991) Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 60:321-347
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13
- Feldheim D, Rothblatt J, Schekman R (1992) Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol Cell Biol* 12:3288-3296

- Feussner I, Kindl H (1992) A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. *FEBS Lett* 298:223-225
- Freeman BC, Toft DO, Morimoto RI (1996) Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein . *Science* 274:1718-1720
- Frydman J, Hartl FU (1996) Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms . *Science* 272:1497-1502
- Frydman J, Höhfeld J (1997) Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci* 22:87-92
- Fung KL, Hilgenberg L, Wang NM, Chirico WJ (1996) Conformations of the nucleotide and polypeptide binding domains of a cytosolic Hsp70 molecular chaperone are coupled. *J Biol Chem* 271:21559-21565
- Gale MJ, Jr., Korth MJ, Katze MG (1998) Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 10:157-162
- Garrill A, Jackson SL, Lew RR, Heath IB (1993) Ion channel activity and tip growth: tip-localized stretch-activated channels generate an essential Ca^{2+} gradient in the oomycete *Saprolegnia ferax*. *Eur J Cell Biol* 60:358-365
- Gebauer M, Melki R, Gehring U (1998) The chaperone cofactor Hop/p60 interacts with the cytosolic chaperonin- containing TCP-1 and affects its nucleotide exchange and protein folding activities. *J Biol Chem* 273:29475-29480
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14138-14143
- Giannini JL, Holt JS, Briskin DP (1988) Isolation of sealed plasma membrane vesicles from *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea. I. Characterization of proton pumping and ATPase activity. *Arch Biochem Biophys* 265:337-345
- Goebel M, Yanagida M (1991) The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem Sci* 16:173-177
- Gragerov A, Gottesman ME (1994) Different peptide binding specificities of hsp70 family members. *J Mol Biol* 241:133-135
- Greene MK, Maskos K, Landry SJ (1998) Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6108-6113

- Guan KL, Dixon JE (1991) Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* 192:262-267
- Hain R et al. (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361:153-156
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
- Hanahan D, Meselson M (1980) Plasmid screening at high colony density. *Gene* 10:63-67
- Hancock K, Tsang VC (1983) India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal Biochem* 133:157-162
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-579
- Heath IB (1990) The roles of actin in tip growth of fungi. *Int. Rev. Cytol.* 123:95-127
- Heath IB, Gupta G, Bai S (2000) Plasma membrane-adjacent actin filaments, but not microtubules, are essential for both polarization and hyphal tip morphogenesis in *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 30:45-62
- Hemmes DE (1983a) Cytology of *Phytophthora*. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH (eds) *Phytophthora*. The american phytopathology society, St. Paul, Minnesota, pp 9-41
- Hemmes DE (1983b) Cytology of *Phytophthora*. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH (eds) *Phytophthora-Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. The american phytopathology society, St. Paul, Minnesota, pp 9-41
- Hettema EH et al. (1998) The cytosolic DnaJ-like protein djp1p is involved specifically in peroxisomal protein import. *J Cell Biol* 142:421-434
- Höhfeld J, Jentsch S (1997) GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *Embo J* 16:6209-6216
- Höhfeld J, Minami Y, Hartl FU (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83:589-598
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114:193-197
- Holstein SE, Ungewickell H, Ungewickell E (1996) Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin. *J Cell Biol* 135:925-937
- Hoos G, Blaich R (1990) Influence of Resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *J. Phytopathology* 129

- Howell E PG (1982) Hepatic golgi fractions resolved into membrane and content subfractions. *J Cell Biol* 92:822-832
- Jackson SL, Hardham AR (1998) Dynamic rearrangement of the filamentous actin network occurs during zoosporogenesis and encystment in the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. *Fungal Genet Biol* 24:24-33
- Jackson SL, Heath IB (1993) Roles of calcium ions in hyphal tip growth. *Microbiol Rev* 57:367-382
- Jahnke KD, Leipoldt G, Prell HH (1987) Studies on Preparation and Viability of *Phytophthora parasitica* Spheroplasts. *Transactions of the British Mycological Society* 89:213-220
- JeanDET P, Bessis R, Sbaghi M, Meunier P (1995) Production of the phytoalexin resceratrol by grapes as a response to *Botrytis cinerea* under natural conditions. *J. Phytopathol.* 143:135-139
- Jiang RF, Greener T, Barouch W, Greene L, Eisenberg E (1997) Interaction of auxilin with the molecular chaperone, Hsc70. *J Biol Chem* 272:6141-6145
- Judelson HS (1997) The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genet Biol* 22:65-76
- Kelley WL (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* 23:222-227
- Kelley WL (1999) Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr Biol* 9:R305-308
- Korth MJ, Edelhoff S, Disteché CM, Katze MG (1996a) Chromosomal assignment of the gene encoding the human 58-kDa inhibitor (PRKRI) of the interferon-induced dsRNA-activated protein kinase to chromosome 13q32. *Genomics* 31:238-239
- Korth MJ, Lyons CN, Wambach M, Katze MG (1996b) Cloning, expression, and cellular localization of the oncogenic 58-kDa inhibitor of the RNA-activated human and mouse protein kinase. *Gene* 170:181-188
- Kubota H, Hynes G, Willison K (1995) The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur J Biochem* 230:3-16
- Kunau WH et al. (1988) Comparative enzymology of beta-oxidation. *Biochem Soc Trans* 16:418-420
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

- Kyhse-Andersen J (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10:203-209
- Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR (1997) Stress-inducible, murine protein mSTII. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases *J. Biol. Chem.* 272: 1876-84
- Latterich M, Schekman R (1994) The karyogamy gene KAR2 and novel proteins are required for ER-membrane fusion. *Cell* 78:87-98
- Laufen T et al. (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5452-5457
- Lee TG, Katze MG (1994) Cellular inhibitors of the interferon-induced, dsRNA-activated protein kinase. *Prog Mol Subcell Biol* 14:48-65
- Lee TY, Mizubuti E, Fry WE (1999) Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet Biol* 26:118-130
- Lew DJ, Reed SI (1993) Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* 120:1305-1320
- Lewis SA, Tian G, Vainberg IE, Cowan NJ (1996) Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol* 132:1-4
- Loubradou G, Begueret J, Turcq B (1997) A mutation in an HSP90 gene affects the sexual cycle and suppresses vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina*. *Genetics* 147:581-588
- Marks J, Hyams JS (1985) Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol.* 39:27-32
- May C (1999) Dissertation. FB: Chemie Philipps-Universität Marburg
- Mayer MP, Bukau B (1998) Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol Chem* 379:261-268
- Melchior F, Kindl H (1990) Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme. *FEBS Lett* 268:17-20
- Melchior F, Kindl H (1991) Coordinate- and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. Optima. *Arch Biochem Biophys* 288:552-557

- Melville MW, Tan SL, Wambach M, Song J, Morimoto RI, Katze MG (1999) The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *J Biol Chem* 274:3797-3803
- Meyer R, Parish RW, Hohl HR (1976) Hyphal tip growth in *Phytophthora*. Gradient distribution and ultrahistochemistry of enzymes. *Arch Microbiol* 110:215-224
- Minami Y, Höhfeld J, Ohtsuka K, Hartl FU (1996) Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem* 271:19617-19624
- Morishima Y, Kanelakis KC, Silverstein AM, Dittmar KD, Estrada L, Pratt WB (2000a) The Hsp organizer protein hop enhances the rate of but is not essential for glucocorticoid receptor folding by the multiprotein Hsp90-based chaperone system. *J Biol Chem* 275:6894-6900
- Morishima Y, Murphy PJ, Li DP, Sanchez ER, Pratt WB (2000b) Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. *J Biol Chem* 275:18054-18060
- Morris CE, Sigurdson WJ (1989) Stretch-inactivated ion channels coexist with stretch-activated ion channels. *Science* 243:807-809
- Mulholland J, Preuss D, Moon A, Wong A, Drubin D, Botstein D (1994) Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J Cell Biol* 125:381-391
- Musch A, Wiedmann M, Rapoport TA (1992) Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 69:343-352
- Netzer WJ, Hartl FU (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci* 23:68-73
- Ng DT, Walter P (1996) ER membrane protein complex required for nuclear fusion. *J Cell Biol* 132:499-509
- Nishikawa S, Endo T (1997) The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion. *J Biol Chem* 272:12889-12892
- Nygaard SL, Elliott CK, Cannon SJ, Maxwell DP, (1989) Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology* 79: 773-780
- Padidam M, Reddy VS, Beachy RN, Fauquet CM (1999) Molecular characterization of a plant mitochondrial chaperone GrpE. *Plant Mol Biol* 39:871-881
- Pesti M, Ferenzy L (1979) Formation and Regeneration of Protoplasts from *Phytophthora infestans*. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 14:1-5

- Philippi ML, Parish RW, Hohl HR (1975) Histochemical and biochemical evidence for the presence of microbodies in *Phytophthora palmivora*. Arch Microbiol 103:127-132
- Plempner RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. Nature 388:891-895
- Porschewski P (1997) Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg,
- Prapapanich V, Chen S, Toran EJ, Rimerman RA, Smith DF (1996) Mutational analysis of the hsp70-interacting protein Hip. Mol Cell Biol 16:6200-6207
- Pratt WB (1998) The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. Proc Soc Exp Biol Med 217:420-434
- Preisig-Müller R, Gehlert R, Melchior F, Stietz U, Kindl H (1997) Plant polyketide synthases leading to stilbenoids have a domain catalyzing malonyl-CoA:CO₂ exchange, malonyl-CoA decarboxylation, and covalent enzyme modification and a site for chain lengthening. Biochemistry 36:8349-8358
- Preisig-Müller R, Gühneemann-Schäfer K, Kindl H (1994a) Domains of the tetrafunctional protein acting in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. Demonstration of epimerase and isomerase activities on a peptide lacking hydratase activity. J Biol Chem 269:20475-20481
- Preisig-Müller R, Kindl H (1993) Plant dnaj homologue: molecular cloning, bacterial expression, and expression analysis in tissues of cucumber seedlings. Arch Biochem Biophys 305:30-37
- Preisig-Müller R, Muster G, Kindl H (1994b) Heat shock enhances the amount of prenylated Dnaj protein at membranes of glyoxysomes. Eur J Biochem 219:57-63
- Preisig-Müller R, Schwekendiek A, Brehm I, Reif HJ, Kindl H (1999) Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. Plant Mol Biol 39:221-229
- Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co chaperones. Embo J 18 754-62
- Quail PH (1979) Plant Cell Fractionation. Ann. Rev.Plant Physiol. 30:425-484
- Rapoport TA, Jungnickel B, Kutay U (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. Annu Rev Biochem 65:271-303

- Rassow J et al. (1994) Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol* 127:1547-1556
- Rojahn B (1992) , Dissertation, FB Chemie. Philipps-Universität Marburg
- Rüdiger S, Buchberger A, Bukau B (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* 4:342-349
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Schatz G, Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271:1519-1526
- Schekman R (1985) Protein localization and membrane traffic in yeast. *Annu Rev Cell Biol* 1:115-143
- Scheufler C et al. (2000a) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101:199-210
- Scheufler C et al. (2000b) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101:199-210
- Simons PC VJD (1977) Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal Biochem* 82:334-341
- Schlicher T, Soll J (1997) Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol Biol* 33:181-185
- Schumacher RJ, Hurst R, Sullivan WP, McMahon NJ, Toft DO, Matts RL (1994) ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 269:9493-9499
- Smith DF et al. (1993) Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol Cell Biol* 13:869-876
- Smith DF, Whitesell L, Nair SC, Chen S, Prapapanich V, Rimerman RA (1995) Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol* 15:6804-6812
- Specht V (1997) Dissertation. FB: Chemie, Philipps-Universität Marburg
- Specht V, Lubeck M, Kindl H (1998) Heat shock transiently enhances the synthesis rate of Sis1p, a ribosome-associated DnaJ protein in the oleagenous yeast *Apiotrychum curvatum*. *Yeast*

- Stark-Lorenzen P, Nelke B, Hänssler G, Mühlbach A, Thomzik J (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryzae sativa*). Plant Cell Rep. 16:668-673
- Steinberg G (1998) Organelle transport and molecular motors in fungi. Fungal Genet Biol 24:161-177
- Sturm AJ (1984) Dissertation, FB Chemie. Philipps-Universität Marburg
- Szabo A, Korszun R, Hartl FU, Flanagan J (1996) A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. Embo J 15:408-417
- Takayama S, Bimston DNF, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Sie Z, Morimoto RI, Reed JC (1997) BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. Embo J 16:4887-96
- Tang NM, Ho CY, Katze MG (1996) The 58-kDa cellular inhibitor of the double stranded RNA-dependent protein kinase requires the tetratricopeptide repeat 6 and DnaJ motifs to stimulate protein synthesis in vivo. J Biol Chem 271:28660-28666
- Temperli E, Roos UP, Hohl HR (1990) Actin and tubulin cytoskeletons in germlings of the oomycete fungus *Phytophthora infestans*. Eur J Cell Biol 53:75-88
- Thomzik JE, Stenzel K, Stocker RH, Schreier PH, Hain R, Stahl DJ (1997) Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 51:265-278
- Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. Nucleic Acids Res 16:8186
- Tsai J, Douglas MG (1996) A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. J Biol Chem 271:9347-9354
- Tzivion G, Luo Z, Avruch J (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. Nature 394:88-92
- VanEtten H, Matthews P, Tegtmeier K, Deitert MF, Stein JI (1989) Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. Annu. Rev. Phytopathol. 27:143-164
- Wang TF, Chang JH, Wang C (1993) Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. J Biol Chem 268:26049-26051

- Warburton AJ, Deacon JW (1998) Transmembrane Ca^{2+} fluxes associated with zoospore encystment and cyst germination by the phytopathogen *Phytophthora parasitica*. Fungal Genet Biol 25:54-62
- Wasmann CC, VanEtten H (1996) Transformation mediated chromosome loss and disruption of a gene for pisatin demethylase decreases the virulence of *Nectria haematococca* on pea. Mol Plant-Microbe Interact. 9
- Wendland J, Lengeler K, Kothe E (1996) An instant preparation method for nucleic acids of filamentous fungi. Fungal Genetics Newsletter 43:54-55
- Zhu B, Chen TH, Li PH (1996) Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. Planta 198:70-77

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. H. Kindl danke ich für die interessante Themenstellung, seine ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft und für die Freiheit bei der Gestaltung dieser Arbeit.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das angenehme Arbeitsklima, fachliche Gespräche und das Interesse an meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Petra Gnau und Dr. Michaela Höhne. Bei Markus Lubeck bedanke ich mich für das kritische Lesen und die Korrektur meiner Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Martina Korfei, Patrick Supp und Elmar Hjorth für das heitere Laborklima.

Jochen Sohn und Katja Kräling danke ich für die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei meinen Praktikanten Roland Dersch, Steffen Krätzig und Johannes Warmbold für ihr Engagement.

Für die Einführung und Unterstützung bei der Arbeit am Fluoreszenzmikroskop bedanke ich mich bei Dr. Marvin Karos und PD Dr. Reinhard Fischer. Bei Dr. Stephan Stubner bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit am LSM.

Dr. Heiner Renneberg und Anneliese Dammshäuser sei gedankt für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Familie und ganz besonders Ruth, die immer für mich da waren und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.