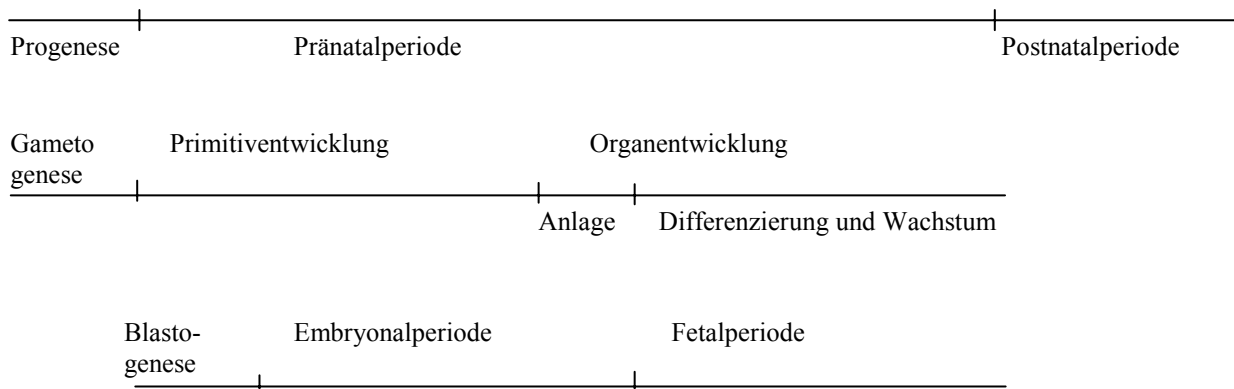


I. Einleitung

1. Embryonalentwicklung

Die molekulare Charakterisierung der Embryonalentwicklung ist von großer Bedeutung, um Rückschlüsse auf die Funktion von Proteinen und deren Rolle während der Individualentwicklung ziehen zu können.

Die Entwicklung des Individuums wird in verschiedene Phasen unterteilt: in die Progenese, welche die Bildung der Keimzellen sowie die Befruchtung umfasst, die Pränatalperiode und die Postnatalperiode. Die Pränatalperiode wiederum besteht aus der Primitiventwicklung und der Organogenese (Schnorr 1996). Die verschiedenen Stadien der Individualentwicklung sind in Schema 1 dargestellt.



Schema 1: Perioden der Individualentwicklung (Ontogenese) nach Schnorr 1996

Die verschiedenen Phasen der Entwicklung sind schematisch dargestellt. Die für diese Arbeit wichtige Pränatalperiode wird in die Primitiventwicklung und die Organentwicklung eingeteilt, wobei ab der Organogenese die Frucht als Fetus, davor als Embryo bezeichnet wird.

Die Primitiventwicklung besteht aus den Phasen der Furchung, der Keimblattbildung (Gastrulation) und der Ausbildung der Primitivorgane und Fruchthüllen. Als Primitivorgane werden die Chorda dorsalis, das Neuralrohr, die Urwirbel und das primitive Darmrohr bezeichnet.

Die Furchung beginnt unmittelbar nach der Befruchtung. Sie verläuft bei den höheren Säugetieren sehr langsam. Bei der Maus dauert die erste Teilung 24 Stunden, jede weitere Furchung benötigt 10 bis 12 Stunden (Schenkel 1995). Nach mehreren Furchungsteilungen entsteht die Morula, welche aus einer inneren und einer äußeren Zellmasse besteht. Lediglich die innere Zellmasse entwickelt sich zum Embryo (Beddington und Robertson 1999). Die äußere Zellmasse bildet das Trophoektoderm, aus dem später das Chorion- und Amnionepithel hervorgehen. Das Morulastadium ist bei der Maus am Tag 2,5 der Entwicklung erreicht (Schenkel 1995). Am Tag 3,5 der Entwicklung der Maus entsteht aus der Morula durch Hohlraumbildung, Flüssigkeitsaufnahme und Zellverlagerungen der Blasenkeim (Blastozyste) (Beddington und Robertson 1999).

Nach dem Schlupf der Blastozyste aus der Zona pellucida findet die Implantation in die Uterusschleimhaut statt. Dieser Vorgang, welcher bei der Maus am Tag 4,5 nach der Befruchtung erfolgt, stellt einen sehr komplexen Prozess dar. Er wird durch einen embryomaternalen Dialog mittels Hormonen (z.B. Östrogen, Progesteron, Interferon π), Proteinen (z.B. Leukaemia inhibitory factor, Laminin, Kollagen), Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Enzymen (z.B. Proteasen) gesteuert (Krüssel et al. 2003, Staun-Ram und Shalev 2005).

Bei der anschließenden Gastrulation, zwischen Tag 6 und Tag 9 bei der Maus, bilden sich die drei Keimblätter, das Ektoderm, das Mesoderm und das Entoderm. Das Ektoderm stellt ein mehrreihiges, hochzylindrisches Epithel dar, während das Entoderm aus kleinen polyedrischen Zellen besteht. Das Mesoderm entwickelt sich zwischen diesen beiden Keimblättern. Tabelle 1 gibt Auskunft über die Herkunft der verschiedenen Organe.

Ektoderm	Mesoderm	Entoderm
Zentrales Nervensystem	Bindegewebe, Knorpel, Knochen	Epitheliale Auskleidung des Respirationstrakts
Peripheres Nervensystem	Muskulatur	Parenchym der Tonsillen, Schilddrüse, Leber, Pankreas
Sinnesepithel von Ohr, Nase und Auge	Blutzellen, Milz, Wandung von Herz, Blut- und Lymphgefäßen	Epitheliale Auskleidung des Verdauungstrakts
Epidermis, Haare, Horn	Nieren, Keimdrüsen	Epitheliale Auskleidung der Harnblase und Harnröhre

Tabelle 1: Herkunft der verschiedenen Organe (Schnorr 1996)

Alle Organe lassen sich auf die drei Keimblätter zurückführen. In der Tabelle wird gezeigt, welches Organ aus welchem Keimblatt entsteht.

Der Tag 9 stellt einen sehr kritischen Zeitpunkt in der Entwicklung der Maus dar. Die meisten angeborenen Anomalien, wie Hydrocephalus, Mikrocephalus oder Skelettdeformationen, entstehen in dieser Phase durch die Einwirkung verschiedener Noxen. Zu diesem Zeitpunkt schließt sich die Neuralrinne und bildet das Neuralrohr. Dieser Prozess findet im Embryo an verschiedenen Stellen zeitversetzt statt (Le Douarin 2000). Bei der Maus existieren vier unabhängige Regionen in der cranio-caudalen Achse, in denen die Auffaltung der Neuralrinne und der Schluss des Neuralrohrs jeweils *de novo* initiiert werden. Von diesen Startpunkten aus breitet sich der Neuralrohrschluss bidirektional fort (Gos und Szpecht-Potocka 2002) (vergleiche Abb. 1).

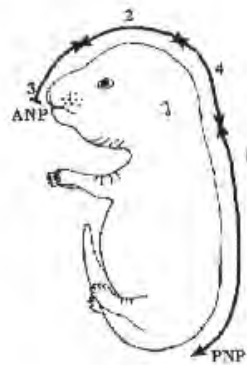


Abb. 1: Initiationspunkte des Neuralrohrschlusses bei der Maus

1 – 4: Initiationspunkte

Der Schluss des Neuralrohrs schreitet von den Initiationspunkten 1, 2 und 4 bidirektional fort, vom Initiationspunkt 3 nur unidirektional

(Gos und Szpecht-Potocka 2002)

Seitlich des Neuralrohrs formen sich aus dem paraxialen Mesoderm die segmental angeordneten Somiten, welche sich in das dorsale Dermomyotom und das ventrale Sklerotom gliedern. Daraus entstehen später einerseits das Haut- und Muskelgewebe und andererseits das Skelettgewebe. Lunge, Leber und Niere werden als Divertikel bzw. Vesikel sichtbar. Der Magen-Darm-Trakt zieht sich als blind endendes Rohr durch den Embryo und kann in drei Abschnitte, den Vorder-, Mittel- und Hinterdarm eingeteilt werden. Es besteht zunächst nur eine einzige Körperhöhle, die Pleuro-Perikardio-Peritoneal-Höhle (Kaufman 1999).

Die Primitiventwicklung ist bei der Maus mit dem Tag 9 abgeschlossen, so dass zu diesem Zeitpunkt die Organogenese beginnt. Bis zum Zeitpunkt, an dem sämtliche Organe angelegt sind, wird die Frucht als Embryo bezeichnet. Danach beginnt die Fetalperiode, in der die Organdifferenzierung stattfindet. Dabei spielen verschiedene Komponenten eine Rolle, welche auf die Zellen einwirken. Dazu gehören unter anderem Wachstumsfaktoren, aber auch Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen. Zellmigration, Zellproliferation und terminale Differenzierung stellen somit essentielle Vorgänge während der Entwicklung dar. Die Organogenese ist mit dem Zeitpunkt der Geburt abgeschlossen. Die Fetalentwicklung findet bei der Maus zwischen Tag 12 und Tag 19 der Entwicklung statt. Am Tag 12 differenziert sich das Epithel des Magens in die glanduläre und kutane Region. Die Entwicklung des Bronchialbaumes der Lunge ist abgeschlossen, die Nephronen der Niere bilden sich, wobei es zur Ausdifferenzierung der Glomeruli und der Tubuli kommt

(Kaufman 1999). Es beginnt die Differenzierung in einen weiblichen bzw. männlichen Organismus. Zum Ende der Fetalentwicklung, welche etwa am Tag 18 erreicht ist, sind die Organe alle nahezu vollständig ausgebildet. Die Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems ist bereits am Tag 17 der Organogenese abgeschlossen, auch das zentrale Nervensystem ist vollständig differenziert. Im Bereich des Respirationstrakts kommt es am Tag 18 zu einer starken Zunahme der Alveolenbildung. In Leber und Milz findet eine intensive Blutbildung statt (Kaufman 1999).

Die verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus sind in Tabelle 2 nochmals in der Übersicht dargestellt.

Tag der Entwicklung	Stadium	Vorgang
0,5	Einzellstadium	Befruchtung der Eizelle
1,5	Zweizellstadium	Proliferation
2,5	Morula	Proliferation
3,5	Blastozyste	
4,5		Implantation
6-9	Gastrulation	Differenzierung in, Ektoderm, Mesoderm und Entoderm
9-19	Organogenese	
9-12		Entstehung der primären Körperachse, Anlage der Organsysteme
9,5		Beginn der Lungenentwicklung
10,5		Anlage der Sinnesorgane
11		Beginn der Genitalentwicklung
12		Beginn der sexuellen Differenzierung
12-19	Fetalentwicklung	Wachstum und Differenzierung der Organe
12,5		Bronchialbaum mit Segmentalbronchien
14		Beginn der Urinproduktion

Tabelle 2: Übersicht über die Entwicklungsstadien der Maus (Schenkel 1995 und Kaufman 1999).

Die wichtigsten Stadien sowie die entsprechenden Vorgänge während der Embryonal- und Fetalentwicklung der Maus sind mit Angaben des Zeitpunktes aufgeführt.

2. Zellkompartimente

Im Organismus lassen die Zellen der verschiedenen Organe und Gewebe eine große Variation bezüglich Form, Größe, Funktion und strukturellem Aufbau erkennen. Diese individuelle Ausstattung ermöglicht eine Spezialisierung hinsichtlich bestimmter Stoffwechsellleistungen wie Sauerstofftransport, Sekretbildung oder Reizleitung. Der Grundaufbau aller Zellen ist gleich. Eukaryontische Zellen sind etwa 10 bis 100 µm groß und werden von einer Zellmembran umschlossen. Die verschiedenen membranumschlossenen Zellorganellen, wie der Zellkern, die Mitochondrien, das glatte und raue Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, die Lysosomen und die Peroxisomen füllen fast die gesamte Zelle aus (Görlich 1998). Diese Kompartimentierung innerhalb des Zytoplasmas dient der Schaffung von Reaktionsräumen, in denen verschiedene Stoffwechsellleistungen getrennt voneinander ablaufen können. Das Zytoplasma ist somit das Medium, in das alle Zellbestandteile eingelagert sind (Lüllmann-Rauch 2003). Daneben dient es als Lösungsmittel für Stoffwechselprodukte und beinhaltet verschiedene Enzyme.

2.1 Zellkern

Im Zellkern ist die genetische Erbinformation in Form von DNA gespeichert und geschützt. Die Replikation der Erbinformation und die Synthese der RNA finden in diesem Zellorganell statt. Der Zellkern wird von einer Membran aus zwei Lipiddoppelschichten umgeben, in der sich die Kernporen befinden (Görlich 1998). Diese regulieren den Stoffaustausch mit dem Zytoplasma der Zelle und bestehen aus einem zylindrischen Zentrum, einem zytoplasmatischen Ring mit Filamenten und einem nukleären Ring (Fahrenkrog 2006). Der Transport von Makromolekülen kann durch diese Kernporen gehemmt oder beschleunigt werden. Im Kerninneren befindet sich ein den gesamten Kern durchziehendes Kerngerüst, welches aus Laminin besteht. Hier liegt außerdem das Euchromatin, die transkriptionsaktive DNA.

Der Nukleolus ist das prominenteste Gebilde innerhalb des Zellkerns, welcher eine dynamische Struktur darstellt. Während der Mitose zerfällt er und bildet sich schließlich

wieder um die rRNA-Genregionen (Shaw und Jordan 1995). Er ist aus drei verschiedenen Kompartimenten aufgebaut: den fibrillären Zentren (FC), den dichten fibrillären Komponenten (DFC), welche die fibrillären Zentren umgeben, und den granulären Komponenten (GC). Bei den granulären Komponenten wird vermutet, dass es sich um pro-ribosomale Partikel handelt (Zimber et al. 2004). Die Hauptaufgabe des Nukleolus liegt vermutlich in der Biosynthese der Ribosomen. Er bildet den Ort der Transkription der ribosomalen DNA, der Entstehung der prä-rRNA und der Bildung der prä-ribosomalen Partikel. Die Transkription und Prozessierung der rRNA reflektiert sich in der Struktur des Nukleolus (Hyttel et al. 2000). In den fibrillären Zentren befinden sich die Proteine der Transkription (z.B. Topoisomerase I, RNA Polymerase I) und der frühen rRNA Prozessierung (z.B. Fibrillarin) sowie die Nukleolus-Organisator-Regionen, welche die ribosomalen RNA-Gene enthalten. In den DFCs finden sich neben den primären rRNA-Transkripten ebenfalls Proteine der frühen Prozessierung (Scheer und Hock 1999). Zu den Markerproteinen der granulären Komponenten gehören die ribosomalen Untereinheiten und die Proteine der späten Prozessierung (z.B. Nucleophosmin und Nucleolin) (Aitchison und Rout 2000). Eine weitere Aufgabe des Nukleolus ist die Beteiligung an dem intranukleären und nukleär-zytoplasmatischen Transport (Olson 2000). Eine wichtige Rolle spielt der Nukleolus bei der Zellproliferation und in der Kontrolle des Zellzyklus durch Regulation des Abbaus bestimmter Proteine, wie Cdc14 oder pRb1, die wichtige Funktionen im Zellzyklus, der Differenzierung und Proliferation einnehmen (Pederson 1998). Nach bestimmten Stressbedingungen, wie Hitzeschock, können einige interessante strukturelle Veränderungen festgestellt werden. Das Protein Nucleolin findet sich danach hauptsächlich im Nukleoplasma, in geringeren Konzentrationen im Nukleolus und verhindert dort die DNA-Replikation (Daniely et al. 2002). Des Weiteren treten Stress-induzierte Kernkörperchen auf, die dem Zellkern benachbart liegen. Diese bestehen aus Anhäufungen von Perichromatin und Transkriptionsprodukten, welche unter Stressbedingungen vermehrt synthetisiert werden (Denegri et al. 2001).

2.2 Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Komplex

Diese beiden Zellkompartimente werden bei der Zellfraktionierung gemeinsam in der Fraktion der Mikrosomen gewonnen. Das Endoplasmatische Retikulum wird in raues und glattes ER eingeteilt, je nachdem, ob an der Oberfläche Ribosomen gebunden werden oder nicht. Es besteht aus einem engmaschigen Netzwerk aus verzweigten Röhren und abgeflachten Säckchen und erstreckt sich über das gesamte Zytoplasma. Es stellt ein multifunktionales System dar, an dem die Bildung von Lipiden und Proteinen stattfindet. Eine weitere Aufgabe des ER ist die Regulation des intrazellulären Kalziumhaushalts (Baumann und Walz 2001).

Am rauhen ER werden vor allem die transmembranen Proteine und die extrazellulären Proteine synthetisiert und gespeichert. Außerdem finden dort die posttranslationale Proteinmodifikation und die Faltung der Proteine statt.

Am glatten ER werden die Lipide und Steroide synthetisiert. Die an der zytosolischen ER-Membran gebildeten Proteine lassen sich in Transmembranproteine und luminaire Proteine einteilen. Transmembranproteine durchqueren die ER-Membran nur teilweise und werden in diese eingebettet (Rapoport et al. 2004). Luminaire Proteine werden dagegen vollständig durch die ER-Membran transportiert, im ER-Lumen gefaltet und modifiziert. Korrekt gefaltete Proteine werden anschließend in Transportvesikel verpackt und zum Golgi-Apparat weitergeleitet.

Der Golgi-Komplex besteht aus flachen, parallel angeordneten, membranumhüllten Zisternen, die eine stapelförmige Struktur bilden (Griffiths et al. 1989). Er befindet sich meist in Kernnähe und dient der Verteilung und Sortierung von Proteinen. Der Golgi-Apparat besitzt eine funktionale Polarität und wird in die cis-, trans- und mediane Region eingeteilt. Neben dieser funktionalen Polarität hat er auch eine morphologische Polarität, bei der die cis- und die trans-Seite unterschieden wird. Die dem Zellkern zugewandte Seite wird dabei als cis-Seite oder auch Bildungsseite bezeichnet, die dem Zellkern abgewandte trans-Seite wird auch Reifungsseite genannt (Griffiths et al. 1989). Vom ER zum Golgi-Apparat transportierte Proteine werden hier weiterverarbeitet und sortiert. Dabei finden unter anderem die O-Glykosylierung, Membrantransformation und Sphingolipid-Synthese statt (Holthuis et al. 2001). Bei der Reifung werden Proteine verändert, wodurch sie funktionsfähig werden (Farquhar und Palade 1981). So wird z.B. Präproinsulin am Golgi-

Apparat zunächst in Pro-Insulin und später zum Insulin umgewandelt. Bei diesen Reifungsprozessen werden, wie auch bei Sortierungsvorgängen, Seitenketten verändert, entfernt oder neu gefaltet.

2.3 Zytoskelett

Das Zytoskelett besteht aus Filamenten, welche auf Grund ihres Durchmessers in drei Klassen eingeteilt werden: die Mikrofilamente (5-6 nm), die Intermediärfilamente (7-10 nm) und die Mikrotubuli (25 nm). Das Zytoskelett bildet das Gerüst der Zelle im Zytoplasma und sorgt für deren Stabilität und Form. Außerdem übernimmt es weitere wichtige Aufgaben wie Beteiligung an Transportprozessen, Abtrennung verschiedener Organellen und aktive Zellbewegung (Liang und MacRae 1997).

Die Mikrofilamente, welche auch als Aktinfilamente bezeichnet werden, bestehen aus dem 43 kDa großen, globulären Protein Aktin, welches unter ATP-Verbrauch polymerisiert. Die Aktinfilamente sind funktionell polarisiert, das heißt eine Verlängerung des Filaments ist nur an einer Seite möglich. Die Mikrofilamente bilden eine netzartige Struktur im Zytoplasma der Zelle, welche zur Formstabilität beiträgt (Mitchison 1992). Sie halten membranständige Proteine an ihrem Platz und sind durch Interaktion mit Myosin an der Muskelbewegung beteiligt. Die Hauptaufgabe der Aktinfilamente besteht jedoch in der koordinierten Bewegung der Zelle.

Die Intermediärfilamente tragen hauptsächlich zur Stabilität der Zelle bei. Sie sorgen für deren mechanische Belastbarkeit. Die Proteine dieser Klasse des Zytoskeletts lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen: die Zytokeratin-, die Lamin-, die Vimentin-, die Desmin-, die Neuro- sowie die Gliafilamente (Lüllmann-Rauch 2003). Alle diese Proteine besitzen eine zentrale α -helikale Domäne, welche durch Bildung von Doppelhelices aus den Monomeren Protofilamente bildet. Intermediärfilamente bestehen aus mehreren Protofilamenten (Herrmann und Aebi 2004).

Die dritte Klasse, die Mikrotubuli, stellt aus dem Protein Tubulin zusammengesetzte Röhren dar (Sackett 1995). Man unterscheidet die beiden Untereinheiten α - und β -Tubulin, welche durch Polymerisation die Protofilamente bilden. Jeweils 13 Protofilamente bilden

einen Mikrotubulus. In der Zellteilung übernehmen die Mikrotubuli eine wichtige Funktion, da sie den Spindelapparat während der Mitose bilden (Maiato et al. 2004). Außerdem sind sie gemeinsam mit den Motorproteinen Dynein und Kinesin an intrazellulären Transportprozessen beteiligt. Des Weiteren sind Mikrotubuli für die Bewegung der Zilien der Flimmerepithelien verantwortlich.

3. Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone spielen bei der korrekten Faltung der Proteine eine entscheidende Rolle. Dabei wirken sie nicht nur direkt posttranslational an frisch synthetisierten Proteinen, sondern in allen Situationen, in denen es zur Proteinauffaltung kommt (Ellgard 2003). Informationen für die Faltung zum fertigen Protein sind zwar in der Aminosäuresequenz enthalten (Anfinsen 1973), die Spontanfaltung *in vivo* wird aber durch vielfältige innere und äußere Faktoren mitbestimmt. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem die Salz- und Protonenkonzentrationen, die Proteindichte im Zytosol und die Temperatur (Goodsell 1991). Hydrophobe Bereiche, die an Seitenketten exponiert sind, tendieren zur Interaktion mit ähnlichen Strukturen benachbarter Proteine, um die dem wässrigen Milieu des Zytosols ausgesetzte Proteinoberfläche zu minimieren. Dadurch ist jedoch die Ausbildung der nativen Proteinstruktur nicht möglich (Jaenicke 1998). Des Weiteren beginnt die Proteinfaltung bereits zu einem Zeitpunkt, an dem die Synthese des Polypeptids am Ribosom noch nicht vollständig abgeschlossen ist, das heißt sie verläuft vektoriell (Bukau et al. 2000). Damit die Vielzahl dieser Faktoren nicht dazu führt, dass die Proteinfaltung zu einem störanfälligen und langwierigen Prozess wird, entstanden schon sehr früh in der Evolution die molekularen Chaperone (engl.: molekulare Anstandsdamen) (Ellis 1987). Sie binden an un- oder falsch gefaltete Proteine, stabilisieren diese und katalysieren die korrekte Faltung. Weiterhin sind Chaperone am Abbau von Proteinen (Lemmon 2001) und deren Translokation über Membranen hinweg beteiligt (Jensen und Johnson 1999), wie beispielsweise Vertreter der HSP70-Familie. Die Rückfaltung und der Proteinabbau finden im Zytoplasma unter Mitwirkung von Vertretern der HSP101-Familie statt. Die verschiedenen Funktionen der Chaperone und Hitzeschockproteine sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die Gruppe der molekularen Chaperone stellt eine große Familie dar, welche sich hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion stark unterscheiden. Die meisten Chaperone wurden als so genannte Hitzeschockproteine entdeckt. Die durch den Hitzeschock ausgelöste thermische Bewegungsenergie führt zur Denaturierung und Aggregation von Proteinen, wodurch Chaperone in der Zelle induziert werden. Auch heute noch werden diese Chaperone unter der Abkürzung 'Hsp' (Hitzeschockproteine) geführt (Gething und Sambrook 1992).

Die Hitzeschockproteine werden ihrer Größe und Funktion entsprechend in verschiedene Familien eingeteilt. Die HSP-Familien sowie einige Vertreter mit deren Lokalisation und Funktion in der Zelle sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Diese Tabelle bietet lediglich einen Überblick, wobei vor allem die Hitzeschockproteine aufgenommen wurden, welche in dieser Arbeit angesprochen werden.

Hitzeschockproteine kommen in verschiedenen Zellkompartimenten vor. Einige ändern ihre Lokalisation abhängig von den Umgebungsbedingungen. Hsp70 liegt beispielsweise vorwiegend zytosolisch in der Zelle vor, transloziert jedoch unter Hitzeschock in den Zellkern (Tsukahara und Maru 2004). Das gleiche Verhalten zeigt Hsc70, welches konstitutiv in den Zellen exprimiert wird. Demgegenüber sind einige Chaperone nur in einem spezifischen Zellkompartiment zu finden. So liegt BiP/Grp78 (Immunglobulin-bindendes Protein oder Glukose-regulierendes Protein 78) lediglich im ER (Sullivan et al. 2003) und Grp74 (Glukose-regulierendes Protein 74) in den Mitochondrien (Horst et al. 1996) vor. Auxilin, ein Vertreter der J-Protein Familie, welches an der Dissoziation von Clathrinstrukturen mitwirkt, kommt ausschließlich im Zytosol vor (Smith 2004), während hSec63p als Transmembranprotein einen Teil der ER-Membran darstellt (Kelley 1998).

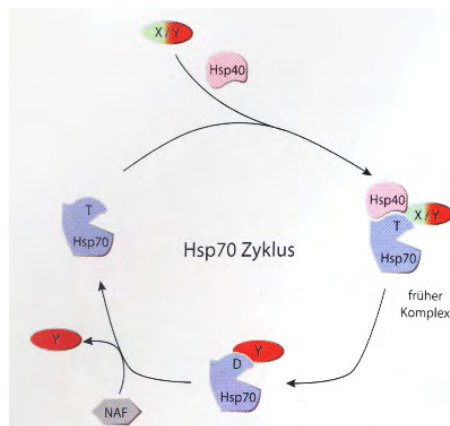
Molekulare Chaperone/Hitzeschockproteine

HSP-Familie	Vertreter (Beispiele)	Literatur	Zelluläre Lokalisation	Zelluläre Funktion
HSP10	Hsp10	Snoeckx et al. 2001	Mitochondrien	Cofaktor und Regulator von Hsp60
sHSP	Hsp27, Hsp25	Bryantsev et al. 2003	Zytoplasma Kern (bei Stress)	Stabilisierung, Funktionsregulation, variable, proteinspezifische Aufgaben
HSP40	Hdj1, 2 Mtj1 hSec63 HDEJ Mdg1 ERdj5 Hsp47	Michels et al. 1997 Dudek et al. 2002 Kelley et al. 1998 Yu et al. 2000 Pröls et al. 2001 Cunnea et al. 2003 Snoeckx et al. 2001	Zytoplasma Kern (bei Stress) ER, Kern ER ER ER, Kern ER ER	Proteinfaltung und Bindung denaturierter Proteine, Co- Faktor von Hsp70
HSP60	Hsp60 TCP1	Snoeckx et al. 2001 Liang und MacRae 1997	Mitochondrien Zytoplasma	Mitochondrialer Proteinimport, Substratfreisetzung, Proteinfaltung
HSP 70	Hsp70, Hsc70 BiP/Grp78 Grp74	Tsukahara und Maru 2004 Sullivan et al. 2003 Horst et al. 1996	Zytoplasma Kern (bei Stress) ER Mitochondrien	Bildung und Stabilisierung neu synthetisierter Proteine, Proteintransport, Regulation der Hitzeschockantwort
HSP90	Hsp90 α , β Grp94	Voss et al. 2000 Snoeckx et al. 2001	Zytoplasma Kern (bei Stress) ER	Aggregationsverhinderung, Bereithaltung und Regulation zytosolischer Proteine
HSP101	Hsp101 Hsp104	Snoeckx et al. 2001	Zytoplasma	Rückfaltung und Abbau von Proteinen

Tabelle 3: Molekulare Chaperone und Hitzeschockproteine. Beispiele wichtiger Vertreter der einzelnen HSP-Familien mit Lokalisation innerhalb der Zelle und Funktion.

3.1 Das HSP70/HSP40 System

Molekulare Chaperone der HSP70- und HSP40-Familien sind maßgeblich an der Proteinfaltung, Proteintranslokation durch biologische Membranen, proteolytischen Degradation und Modulation funktionaler Aktivität regulatorischer Prozesse beteiligt (Bukau und Horwich 1998). HSP70-Proteine besitzen eine ATPase-Aktivität, welche durch Interaktion mit HSP40-Proteinen stimuliert wird. Aus diesem Grund werden HSP40-Chaperone auch als Co-Chaperone bezeichnet. HSP40 assoziiert an das Substrat und leitet dieses an HSP70 weiter. Über die J-Domäne kommt es zu Wechselwirkungen mit dem im ATP-Zustand befindlichen HSP70, wodurch das Substrat auf die offene Substratbindungstasche des HSP70 übertragen wird. Diese Vorgänge sind für die Stimulation der ATPase-Aktivität und der Stabilisation des HSP70/Substrat-Komplexes verantwortlich. Der anschließenden ATP-Hydrolyse folgt die Dissoziation des HSP40 von dem HSP70/Substrat-Komplex auf Grund verminderter Affinität von HSP40 zur ADP-gebundenen Form. Den Abschluss des Zyklus bilden eine erneute ATP-Bindung und die Freisetzung des Substrats. HSP70 kann nun eine erneute Bindung eines HSP40/Substrat-Komplexes eingehen (Minami 1996). Die Substratspezifität wird durch den C-Terminus des HSP40-Proteins bestimmt, während die J-Domäne über HSP70 die Energie für die Rückfaltung zur Verfügung stellt.



*Schema 2: **Modell für den HSP70/HSP40-Zyklus**
Falsch gefaltete Proteine (X/Y) werden über HSP40 an HSP70 geleitet. Dort erfolgt die korrekte Faltung. Nach ATP-Hydrolyse werden das Protein (X) und ADP mit Hilfe des Nukleotidaustauschfaktors (NAF) freigesetzt.*

3.2 Das HSP40-Chaperon Mdg1

Bei der Untersuchung molekularer Mechanismen der Angiogenese wurde ein neuer Vertreter der HSP40-Familie entdeckt (Pröls et al. 1996). Dabei wurden mit der „Differential-Display“-Methode rein proliferierende und terminal differenzierende mikrovaskuläre Ratten-Endothelzellen (RFC) verglichen. Unter einer Vielzahl isolierter cDNA-Spezies, welche bei der Differenzierung und Proliferation verschiedene Expressionsmuster aufwiesen, wurde ein Klon näher betrachtet, dessen Gen bei der Differenzierung hochreguliert und aus diesem Grund mikrovaskuläres Differenzierungsgen 1 (Mdg1) genannt wurde. Mittels FISH-Technik (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) konnte Mdg1 bei der Ratte der Chromosomenbande 6q16 → q23 und später im menschlichen Genom dem Chromosom 14q24.2 → q24.3 zugeordnet werden (Pröls et al. 1996, Pröls et al. 1997). Durch Northern-Blot-Analysen konnte eine Hochregulation von Mdg1 in differenzierenden gegenüber proliferierenden mikrovaskulären Endothelzellen bestätigt werden. Außerdem konnte eine Abhängigkeit der Mdg1-Expression von physikalischen (Hitzeschock) und osmotischen (Ethanol, Methanol) zellulären Stress-Stimuli nachgewiesen werden. Untersuchungen mittels „Real-time“-PCR zeigten, dass Mdg1 auf RNA-Ebene speziell durch ER-Stress hochreguliert wird (Berger et al. 2003, Kurisu et al. 2003). ER-Stress ist durch eine erhöhte Proteinkonzentration im ER gekennzeichnet. Diese entsteht beispielsweise durch Hemmung des Proteinexports, Störung der Kalzium-Homöostase, Hypoxie, Glukosemangel oder Tunikamycinbehandlung, die die Glykosylierung hemmt. Mittels in-situ-Hybridisierungen konnte herausgefunden werden, dass Mdg1 in verschiedenen Geweben exprimiert wird, wobei die Expression nicht nur auf Endothelien beschränkt ist, sondern auch in Epithelien und lymphatischem Gewebe nachgewiesen werden kann. Dabei kommen Mdg1-positive neben -negativen Gefäßen vor. Diese Diversität der Mdg1-Expression weist auf eine Korrelation zwischen der Expression und dem Aktivierungszustand des jeweiligen Gefäßes hin (Pröls et al. 2001). In Lokalisationsstudien lag Mdg1 bei 37°C membranassoziiert vor (Pröls et al. 2001, Berger et al. 2003). Es zeigte ein retikuläres Verteilungsmuster. Durch Gegenfärbung mit Golgi-Markern konnte eine Assoziation an das ER und den Golgi-Apparat nachgewiesen werden.

Die Mdg1-cDNA hat ein offenes Leseraster von 669 Basenpaaren. Daraus errechnet sich für das Mdg1-Protein eine Größe von 222 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 25,7 kDa. Der isoelektrische Punkt liegt bei 8,78. Die N-terminal gelegene Region von Aminosäure 26 bis 90 weist eine Ähnlichkeit zur J-Domäne von DnaJ-homologen Proteinen auf, weshalb Mdg1 in die Klasse der DnaJ/Hsp40-Familie eingeordnet wird. DnaJ stellt den „Prototyp“ dieser Familie dar und ist das Hsp40-Homolog in *Escherichia coli*. Diese Familie der DnaJ-Proteine wird auf Vorschlag von Cheetham und Caplan (1998) in drei Klassen (I bis III) unterteilt. Die Mitglieder der Klasse I-Proteine zeichnen sich neben dem Vorhandensein der J-Domäne durch eine G/F-reiche Domäne und eine cysteinreiche Zn^{2+} -bindende Domäne aus. Den Klasse II-Proteinen fehlt diese cysteinreiche Region, die Homologie beschränkt sich auf die J-Domäne und die G/F-reiche Sequenz. Proteine der Klasse III besitzen lediglich eine J-Domäne. Zu dieser Klasse wird auch das molekulare Chaperon Mdg1 gezählt (Pröls et al. 2001). Die J-Domäne besteht aus vier α -Helices mit einer internen HPD-site, welche die Stimulation der ATPase-Aktivität der HSP70-Chaperone katalysieren kann. Diese katalysierende Wirkung des Mdg1-Proteins konnte *in vivo* in einem bakteriellen Modell nachgewiesen werden, indem die J-Domäne von Mdg1 an J-defizientes DnaJ-Protein ligiert wurde (Pröls et al. 2001).

In der Sequenzanalyse ergaben sich zwei Regionen, welche für die Lokalisation des Mdg1-Proteins interessant sein könnten. Am N-terminalen Ende befindet sich eine hydrophobe Sequenz von 26 Aminosäuren, welche eventuell als Membrananker dient. Das C-terminale Ende des Proteins wird von den Aminosäuren Cystein, Serin, Glycin und Glutamin gebildet, welche eine mögliche Farnesylierungssequenz darstellen. Eine solche Sequenz wird auch als CaaX-Domäne bezeichnet und findet sich in verschiedenen Proteinen. Sie ist für die posttranslationale Modifikation der Proteine von Bedeutung. C stellt dabei die Aminosäure Cystein dar, an der die Modifikationen stattfinden; a steht für zwei aliphatische Aminosäuren, während X für die Aminosäure Serin, Alanin, Methionin, Glutamin oder Leucin stehen kann. Im Falle von Leucin wird das entsprechende Protein geranylgeranyliert; bei allen anderen Aminosäuren findet eine Farnesylierung statt. Durch die Farnesylierung wird eine Interaktion mit zellulären Membranen und anderen Proteinen vermittelt. Damit das Protein farnesyliert werden kann, muss diese Domäne jedoch frei und unmaskiert vorliegen.

3.3 Hitzeschockproteine in der Individualentwicklung

Die Embryo- und Organogenese stellt einen Vorgang dar, welcher einer starken Kontrolle und Regulation unterworfen ist. Zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung können bei Störungen dieser Kontrolle Fehlentwicklungen mit Fehlbildungen entstehen oder der embryonale oder fetale Tod folgen. Durch Zellproliferation und Differenzierung kommt es zu einem sich ständig verändernden Proteinrepertoire in den Zellen mit Wechsel von Proteinbiosynthese und Proteindegradation. Hitzeschockproteine, welche bei der Proteinfaltung essentiell sind, spielen während der Entwicklung aller Organismen, von Pflanzen über Einzeller bis hin zu Säugetieren, eine wichtige Rolle (Gernold 1993, Loones et al. 1997). Dabei werden sie nicht nur unter Stressbedingungen, sondern auch konstitutiv exprimiert, wobei die Expressionsrate vom jeweiligen Organtyp und dem Entwicklungsstadium abhängt. Eine Überexpression von Hitzeschockproteinen kann bei erhöhter Temperatur beobachtet werden. Thermische Stabilität ist für die Entwicklung der Organsysteme sehr wichtig (Edwards 1989), kann aber während der Schwangerschaft nicht garantiert werden. So kommt eine fieberhafte Infektion bei schwangeren Frauen mit einem Prozentsatz von 2,5 % bis 8 % vor (Layde et al. 1980, Lipson 1988). Angaben über die Häufigkeit eines solchen Temperaturanstiegs bei Tieren gibt es nicht. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass es sich dort ähnlich verhält. Eine solche Hyperthermie kann zu verschiedenen Reaktionen, wie embryonalem oder fetalem Tod, pränataler Entwicklungsverzögerung oder Fehlbildung führen (Edwards 1986). Durch Hochregulierung der Hitzeschockproteine werden die Zellen vor den schädlichen Einflüssen, die durch Hitzeschock entstehen, wie beispielsweise Proteinaggregatbildung, geschützt.

In der Entwicklung der Maus treten Hitzeschockproteine, wie Hsp70 und Hsp25, erst ab dem Blastozystenstadium auf (Wittig et al. 1983, Mezger et al. 1991), das heißt ab Tag 3,5 nach der Befruchtung.