

V. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Proteindomänen, welche die subzelluläre Lokalisation des Mdg1-Proteins unter Kontrollbedingungen und nach Hitzeschock kontrollieren, mit Hilfe von molekularbiologischen, zellbiologischen und proteinbiochemischen Methoden zu charakterisieren. Ein zweiter Aspekt dieser Arbeit war die Charakterisierung der Lokalisation des Mdg1-Proteins im adulten Organismus und dessen Beteiligung an der Individualentwicklung mittels immunhistochemischer Methoden.

5.1 Lokalisation des Mdg1-Proteins in der Maus

5.1.1 Lokalisation und Funktion des Mdg1-Proteins während der Embryo- und Organogenese

Das Hitzeschockprotein Mdg1 ist in allen untersuchten Entwicklungsstadien der Maus nachweisbar, jedoch in verschiedenen Organen und Geweben zu verschiedenen Zeiten. Im Gewebe des Nervensystems kann das Mdg1-Protein zu fast jedem Untersuchungszeitpunkt nachgewiesen werden. In der frühen Organogenese am Tag 9 der Entwicklung der Maus weist das Neuralrohr eine starke Mdg1-Lokalisation auf (Abb. 3). Diese ist jedoch abhängig vom Schließungsgrad des Neuralrohrs. Die Abschnitte, welche noch offen sind, zeigen eine gut nachweisbare Konzentration des Proteins. Diese intensiviert sich in jenen Abschnitten, welche sich gerade schließen. Danach nimmt die Konzentration von Mdg1 rasch ab, weshalb in den geschlossenen Abschnitten des Neuralrohrs nur wenig oder gar kein Mdg1-Protein mehr nachzuweisen ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mdg1 eine Rolle beim Schluss des Neuralrohrs spielen könnte.

Der Schluss des Neuralrohrs stellt eine kritische Phase dar und ist sehr störanfällig gegenüber erhöhten Temperaturen. Deshalb ist eine starke Kontrolle der Zellproliferation

und des Zellzyklus notwendig (Walsch und Morris 1989). Dies erklärt eine erhöhte Expressionsrate verschiedener Hitzeschockproteine gerade zum Zeitpunkt des Neuralrohrschlusses um den Tag 9 herum. Eine ebenfalls hohe Expressionsrate in Zellen des Neuralrohrs zum Zeitpunkt Tag 9,5 der Entwicklung weist das Hitzeschockprotein Hsc70 auf. Dieses konstitutiv exprimierte Protein ist vor allem in den migrierenden Zellen der Neuralleiste zu finden (Loones et al. 1997). Das zu der sHSP-Familie zählende Hsp25 spielt beim Schluss des Neuralrohrs ebenfalls eine große Rolle und wird in diesen Zellen am Tag 9,5 nachgewiesen (Gernold 1993). Auch zu späteren Zeitpunkten in der Entwicklung der Maus ist dieses Protein in den Nervenzellen nachweisbar. So finden sich hohe Konzentrationen z.B. im Thalamus (Atkinson 1981).

Am Tag 12 der Entwicklung der Maus lässt sich das Mdg1-Protein im Bereich des Nervensystems in der Auskleidung der Gehirnventrikel finden. Hier zeigen die Ependymzellen eine stark positive Anfärbung (Abb. 6). Diese positive Reaktion der Ependymzellen verschwindet bis zum Ende der Organogenese und ist auch in der adulten Maus nicht mehr zu sehen. Am Tag 18, dem Ende der Organogenese, kann Mdg1 im Nervengewebe nicht mehr nachgewiesen werden.

Zu Beginn der Organogenese ist das Mdg1-Protein auch in den Zellen des Myotoms in hohen Konzentrationen zu finden (Abb. 3). Diese Zellen entstehen aus dem paraxialen Mesoderm, welches zunächst die segmentartig angeordneten, epithelialen Somiten bildet. Diese differenzieren sich in das ventrale Sklerotom und das dorsale Dermomyotom. Letzteres entwickelt sich zu dem Dermatome, welches später die Haut bildet, sowie dem Myotome, aus dem die Skelettmuskulatur des Körpers und einige Kopfmuskeln entstehen (Christ und Ordahl 1995). Eine Expression in den Zellen des Dermomyotoms ist auch für sHSP beschrieben. Dieses Co-Chaperon ist in Myotomzellen im Stadium Tag 10,5 bei der Maus nachweisbar. Auch zu späteren Zeitpunkten ist dieses Protein für die Muskelentwicklung von essentieller Bedeutung, wobei die Expressionsrate mit zunehmendem Alter der Feten ansteigt (Atkinson 1981). Eine Rolle bei der Stabilisierung der Muskelfasern wird für dieses Hitzeschockprotein vermutet (Benjamin et al 1997). Im Gegensatz zu sHSP kann Mdg1 zu späteren Entwicklungszeitpunkten in der Muskulatur nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellt jedoch die Muskulatur der Zunge dar, welche am Tag 18 eine deutliche Mdg1-positive Färbung aufweist (Abb. 9).

Die meisten Gewebe und Organe lassen eine zyklische Mdg1-Bildung erkennen. Dazu zählen beispielsweise der Magen-Darm-Trakt und die Knorpelzellen (Abb. 15 und 16). In diesen Organen kann Mdg1 in der Mitte der Organogenese nachgewiesen werden, während es zum Abschluss der Entwicklung nicht mehr vorhanden ist. Dieser Befund legt nahe, dass die Bildung von Mdg1-Protein in den Zellen von deren Entwicklungs- und Funktionszustand abhängt. Im Magen findet am Tag 12 die Differenzierung der Zellen in glanduläre und muköse Zellen statt. Diese Entwicklungsphase ist vor allem durch Zellproliferation und Zelldifferenzierung gekennzeichnet. In den Knorpelzellen kann beobachtet werden, dass Mdg1-positive neben Mdg1-negativen Chondrozyten liegen. Zum Ende der Organogenese sind dagegen keine positiven Chondrozyten mehr nachweisbar (Abb. 17). Auch dieser Befund deutet wiederum darauf hin, dass die Bildung von Mdg1 abhängig vom jeweiligen Funktionszustand der Zellen ist. Sich differenzierende Zellen befinden sich im postmitotischen Ruhezustand, das heißt es findet in diesem Stadium keine Zellteilung statt. Die Differenzierungsphase ist eine sehr stoffwechselaktive Phase, welche durch die Synthese von RNA und verschiedenen Proteinen geprägt ist. Die Grundlage für die Differenzierung stellt ein spezifisches Enzymmuster sowie die Bildung spezifischer Proteine dar, was durch die Aktivierung und Deaktivierung spezieller Gene ermöglicht wird. Bei solchen Differenzierungsvorgängen fallen in hohem Maße auch ungefaltete und falsch gefaltete Proteine an, was die Hochregulierung des Chaperons Mdg1 in dieser Phase erklären könnte. Eine mögliche Funktion wäre demnach die Beteiligung von Mdg1 an der Faltung der Proteine, die während der Differenzierung in erhöhtem Maße gebildet werden. Mdg1 könnte andererseits durch Eingriff in den Zellzyklus die Aktivierung spezifischer Gene bewirken.

In früheren Arbeiten wurde bereits eine erhöhte Expressionsrate von Mdg1-Protein in sich differenzierenden Zellen beschrieben, wobei es sich bei diesen Zellen um Endothelzellen handelte (Pröls et al. 2001). Auch für andere Hitzeschockproteine ist eine Hochregulation während der Zelldifferenzierung bekannt. So konnte beispielsweise eine Akkumulation von Hsp27 nach der Induktion der Zelldifferenzierung nachgewiesen werden (Shakoori et al. 1992).

Im Gegensatz zu den vorher genannten Hitzeschockproteinen ist Hsp70 in der frühen Embryonalentwicklung im Mausembryo nicht nachweisbar. Es ist zu diesem Zeitpunkt

lediglich extraembryonal in der Plazenta und im Dottersack zu finden. Erst ab Tag 15 zeigen sich nachweisbare Konzentrationen auch intraembryonal, wobei es in geringem Maße in Epidermis und Mesenchym, in hohen Konzentrationen im Endothel der Blutgefäße nachweisbar ist (Loones et al. 1997). Auch während der Knochenentwicklung und der Neurogenese spielt dieses Hitzeschockprotein eine Rolle (Sistonen et al. 1992).

In der späten Entwicklungsphase, welche in der vorliegenden Arbeit am Tag 18 untersucht wurde, tritt das Mdg1-Protein vor allem in der Zunge, dem Gaumen, den Drüsen der Nasenschleimhaut und den Tasthaaren auf (Abb. 7, 8, 9). Auch in diesem Stadium ist Mdg1 in sich differenzierenden Zellen nachweisbar, wie in den Haaranlagen. Dort entwickeln sich die Matrixzellen zu Mark, Rinde und Wurzelscheide. Außerdem ist das Mdg1-Protein in sekretorisch aktiven Zellen, wie den Drüsenzellen der Nasenschleimhaut zu finden. Eine ähnliche Verteilung findet sich bei dem Hitzeschockprotein Hsp25 in diesem Stadium der Organogenese. Dieses Protein ist hauptsächlich in der Muskulatur, der Nasengrube und der Zunge exprimiert, bei neugeborenen Mäusen auch in den Tasthaaren (Gernold et al. 1993). Von Hsp25 ist bekannt, dass es mit Aktinfasern des Zytoskeletts interagiert und eine Stütz- und Schutzfunktion in den Zellen ausübt.

Ein wichtiger und kritischer Punkt in der Embryonalentwicklung stellt die Implantation und die Bildung der Plazenta dar. Bei der Maus handelt es sich um eine Plazenta haemochorialis, welche starke Umbauvorgänge erfährt (Schnorr 1996). Es kommt zu einer innigen Verbindung zwischen embryonalem und maternalem Gewebe, wobei die Trophoblastzellen eine Schranke zwischen mütterlichen und embryonalen Blutbestandteilen darstellen. Vom Tag 9,5 an ist die Plazenta für die Entwicklung und Ernährung des Embryos essentiell (Voss et al. 2000). Die Plazentation wird von verschiedenen Genen kontrolliert und beeinflusst, wobei vor allem Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, wie *Err2*, *Mash2* und *FGF*, eine Rolle spielen (Luo et al. 1997, Guillemot et al. 1994, Xu et al. 1998). Aber auch Hitzeschockproteine greifen in diesen Regelmechanismus ein, z.B. *Hsp90* und *Mrj*. Das *DnaJ*-Protein *Mrj* ist vor allem in den Trophoblastzellen nachweisbar und für die korrekte Ausbildung des Plazentarlabrynth essentiell (Hunter et al. 1999). Auch außerhalb der Plazenta spielt *Mrj*, welches zu der Familie der HSP40-Chaperone gezählt wird, sowohl während der Embryonalentwicklung

als auch im adulten Organismus eine Rolle und ist unter anderem im Gehirn, den Hoden, dem Nasenepithel und bei adulten Mäusen auch im Uterus und Magen zu finden (Hunter et al. 1999). Das Hitzeschockprotein Hsp90 β ist ebenfalls essentiell für die Plazentation der Maus. Es bewirkt die Bildung der fetalen Blutgefäße und die Differenzierung der Trophoblastzellen (Voss et al. 2000). Neben der Plazenta ist es während der Entwicklung in nahezu allen Organen der Feten nachweisbar. Das Mdg1-Protein kann ebenso wie diese beiden Hitzeschockproteine in hohen Raten in der Plazenta am Tag 9 nachgewiesen werden, was auf eine wichtige Rolle in der korrekten Ausbildung dieses Gewebes hinweist. Es ist vorzugsweise in den Trophoblastriesenzellen und den Blutgefäßen des Dottersacks zu finden, wobei die Lokalisation in den Trophoblastriesenzellen auf die Plasmamembran und eine dem Zellkern benachbarte Struktur beschränkt ist. Mdg1 könnte im Bereich der Plazenta wiederum eine Rolle bei der Differenzierung der Strukturen einnehmen.

Ein Zusammenhang zwischen Lokalisation von Mdg1 und zellulärem Ursprung des Gewebes besteht nicht, da das Mdg1-Protein in Geweben aller drei Keimblätter zu finden ist. Als Beispiel für ektodermales Gewebe dienen das Neuralrohr und die Haut, welche beide Mdg1-positive Signale aufweisen. Die serösen Häute, Peritoneum und Perikard, als Beispiele mesodermalen Ursprungs, weisen in den Feten des Stadiums Tag 12 eine deutliche Lokalisation von Mdg1 auf. Entodermalen Ursprungs ist der Darm, welcher ebenfalls am Tag 12 eine positive Mdg1-Färbung aufweist.

5.1.2 Lokalisation und Funktion des Mdg1-Proteins im adulten Organismus

Neben der Lokalisation des Mdg1-Proteins während der Entwicklung wurde auch die Verteilung im adulten Organismus untersucht. Die Ergebnisse einer solchen Untersuchung können Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zulassen. In adulten Mäusen ist das Mdg1-Protein in hohem Maße im Magen-Darm-Trakt und in der Harnblase lokalisiert (vergleiche Abb. 10, 11). Auch die Lunge und die Plazenta zeigen Mdg1-positive Signale (vergleiche Abb. 12, 14). Eine vergleichbare Verteilung kann auch bei anderen Hitzeschockproteinen beobachtet werden. So ist beispielsweise Hsp70 vorzugsweise in Magen, Darm, Harnblase, Lunge und Niere zu finden. Hsp25 zeigt eine hohe Expression im Magen-Darm-Trakt und der Harnblase, wohingegen in Leber und Niere keine Expression nachzuweisen ist (Tanguay 1993). Hsp90 ist in fast allen Organen exprimiert, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Hohe Konzentrationen lassen sich im Darm, geringe in Haut und Knochen nachweisen (Lee 1990). Die Übereinstimmung hoher Expressionsraten verschiedener Hitzeschockproteine im Magen-Darm-Trakt und der Harnblase lassen eine spezifische Funktion der Chaperone in diesen Organen vermuten. Auffällig ist, dass alle diese Gewebe in hohem Maße toxischen Substanzen und deren Metaboliten ausgesetzt sein können, welche eine Stressantwort erzeugen können (Tanguay 1993). Durch diese externen Stress-Stimuli werden die Hitzeschockproteine hochreguliert, um falsch gefaltete Proteine zu beseitigen und somit die Zellen vor dem Zelltod zu schützen. Eine Ausnahme stellt hierbei die Niere dar. Die Nierentubuli und -glomeruli kommen ebenfalls mit toxischen Stoffen in Kontakt. In diesem Organ werden jedoch nur einige Hitzeschockproteine in hohen Konzentrationen exprimiert, wie beispielsweise Hsp71 (Tanguay 1993). Andere, wie Hsp25, können in der Niere nicht nachgewiesen werden (Tanguay 1993). Bezüglich der Lokalisation von Mdg1-Protein in der Niere ist keine Aussage möglich. Bereits die Negativkontrolle zeigt im Bereich der Niere eine starke rotbraune Färbung. Ein Vergleich zwischen Negativ- und Positivkontrolle ist bei diesem Organ sehr schwierig und lässt keinen eindeutigen Befund zu. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der immunhistologischen Untersuchung von Mdg1 in Hühnerembryonen gemacht werden. Auch bei dieser Untersuchung färbte sich die Niere in der Negativkontrolle stark rötlich an (Myriam Motyl, persönliche Mitteilung). Bei der Maus zeigt neben der Niere auch die Lunge bereits in der Negativkontrolle rotbraune Bereiche.

Diese nehmen jedoch durch die Inkubation mit dem Mdg1-Antikörper an Intensität zu, so dass eine Aussage über die Verteilung von Mdg1 durch Vergleich der Färbungen möglich ist.

Neben den zuvor genannten Organen, die toxischen Substanzen ausgesetzt sind, wird das Mdg1-Protein vor allem in sekretorisch aktiven Zellen und Geweben nachgewiesen, wie beispielsweise in Enterozyten, Pneumozyten und dem Epithel des Eileiters. Sekretorisch aktive Zellen verfügen über einen erhöhten Grundmetabolismus, was durch ein gut ausgebildetes Endoplasmatisches Retikulum charakterisiert wird. Es werden in hohem Maße Proteine gebildet, aber auch andere Produkte, welche anschließend in die Umgebung sezerniert werden. Zellen, die diese erhöhte Zellaktivität leisten, befinden sich in der G₀-Phase des Zellzyklus. Es finden somit keine Zellteilungen statt. Die Lokalisation von Mdg1 in sekretorisch aktiven Zellen könnte darin begründet sein, dass Mdg1 den Übergang in die G₀-Phase durch Eingriff in den Zellzyklus bewirkt. Andererseits werden von diesen Zellen zahlreiche Proteine synthetisiert. In diesem Prozess könnte Mdg1 eine Rolle bei der Proteinfaltung einnehmen.

Im Bereich des Gehirns sind zwei Strukturen positiv für das Mdg1-Protein: die Pia mater und die Kapillaren. Dabei ist im Bereich der Kapillaren die positive Anfärbung von negativen Abschnitten unterbrochen. Unterhalb der Pia mater ist eine fleckenhafte Verteilung der positiven Anfärbung zu beobachten. Dieses typische Muster lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den positiven Strukturen um Astrozyten handeln könnte. Diese umgeben mit ihren Fortsätzen die Kapillaren des Gehirns als Membrana limitans gliae perivascularis und liegen als Membrana limitans gliae superficialis zwischen Pia mater und Nervengewebe. Im Bereich der Kapillaren sind sie an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Astrozyten haben auf Grund ihres Filamentreichtums vor allem eine Stützfunktion. Außerdem kontrollieren sie durch diverse Transportmechanismen und Ionenkanäle die Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit.

5.2 Subzelluläre Lokalisation von Mdg1

Die Zelle wird in verschiedene Kompartimente unterteilt, die unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Hitzeschockproteine und Co-Chaperone kommen in allen Zellkompartimenten vor, wobei die Lokalisation häufig stressabhängig reguliert wird. TOM70 beispielsweise ist in der Mitochondrienmembran verankert und am Transport in die und aus den Mitochondrien beteiligt (Young et al. 2003). Zu den Proteinen des Endoplasmatischen Retikulums zählt hSec63p, welches bei der Translokation von Proteinen eine Rolle spielt (Kelley 1998). Hsp70 kommt im Zytosol und Zellkern vor, je nach äußeren Bedingungen, und ist an der Proteinfaltung und der Verhinderung der Proteinaggregation beteiligt (Michels et al. 1997, Pelham 1984). Neben Hsp70 zeigt auch Hdj2 eine stressabhängige Translokation in den Zellkern und eine nukleoläre Assoziation (Davis et al. 1998). Zu den Stressauslösern gehören beispielsweise Aminosäuremangel, ER-Stress oder auch Hitzeschock.

Für die Untersuchung der Lokalisation von Mdg1 wurde dieses an das grün fluoreszierende EGFP ligiert, um es in der Zelle sichtbar zu machen. EGFP alleine zeigt eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Zelle. Somit lassen Lokalisationsänderungen der Fusionsproteine eine Aussage über den Einfluss des Mdg1 zu. Außerdem wurde Mdg1 mit einem internen myc-tag verwendet. In diesem Konstrukt liegen sowohl der N- als auch der C-Terminus frei und unmaskiert vor.

In früheren Lokalisationsstudien wurde unter Kontrollbedingungen bei 37°C eine retikuläre Verteilung des Mdg1-Proteins innerhalb des Zytoplasmas beobachtet (Pröls et al. 2001, Berger et al. 2003). Eine solche retikuläre Lokalisation findet man normalerweise nicht bei löslichen, zytosolischen Proteinen, sondern nur bei ER-assoziierten Proteinen oder bei Proteinen, welche mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Zu den Chaperonen, die eine Assoziation mit dem Zytoskelett aufweisen, gehören beispielsweise Hsp25 und das DnaJ-Protein Mrj. Mrj interagiert mit Keratinfilamenten (Izawa et al. 2000), während Hsp25 an Aktin bindet und dadurch die Aggregation von Aktin verhindert. Hsp25 wird auf Grund seiner Funktion auch als zytoprotektives Protein bezeichnet (Bryantsev et al. 2002). Die Membranassoziation von Mdg1 an ER und Golgi-Apparat wurde durch Waschungen mit verschiedenen Puffern und Western-Blot-Analysen bestätigt. Dabei wurde eine zytosolische Ausrichtung des Mdg1-Proteins in der Membran postuliert (Czarnecki et al.

submitted). Andere Arbeitsgruppen vermuten jedoch, dass Mdg1 über den N-Terminus in der ER-Membran verankert ist und sich der C-Terminus luminal befindet (Shen et al. 2002). Auf Grund dieser Tatsache wird das Mdg1-Protein zu der Klasse der ER-lokalisierten DnaJ-Proteine gezählt. Zu dieser Klasse zählen: Mtj1 (Erdj1) (Dudek et al. 2002), hSec63p (Erdj2) (Corsi und Scheckmann 1997), HEDJ (Erdj3) (Yu et al. 2000), Mdg1 (Erdj4) (Shen et al. 2002) und Erdj5 (Cunnea et al. 2003). Nach Hitzeschock zeigt sich eine Veränderung der subzellulären Lokalisation von Mdg1. Das Protein ist danach vorwiegend im Zellkern zu finden (Pröls et al. 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Mdg1-myc-intern, bei dem sowohl N- als auch C-Terminus frei vorliegen, in allen Zellkompartimenten in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommt. Dies gilt sowohl für die Untersuchungen bei 37°C als auch für jene bei 43°C. Diese Befunde deuten darauf hin, dass es unterschiedliche Proteinpools für das Mdg1-Protein gibt. Dies wurde bereits für andere Proteine beschrieben. So kommt beispielsweise das Protein Polyduktin in verschiedenen Isoformen in der Plasmamembran, in primären Zilien und im Zytosol vor (Menezes et al. 2004). Hsc70 findet sich unter Kontrollbedingungen im Zytosol und an Keratinfilamenten, nach Hitzeschock im Zellkern (Michels et al. 1997, Liao et al. 1995). Auch Hsp25 liegt zytosolisch, aber auch im Zellkern und am Zytoskelett assoziiert vor (Bryantsev et al. 2002).

Im Kern sind bei der Untersuchung von Mdg1-myc-intern zwei Banden erkennbar, eine bei etwa 27 kDa und eine kleinere Bande bei 20 kDa (Abb. 28). Die Bande des Mdg1-myc-intern (26,9 kDa) im Zellkern nimmt in ihrer Intensität nach Hitzeschock zu. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Mdg1 unter Hitzeschock in den Zellkern transloziert, wie von einigen Hitzeschockproteinen bekannt (Hsp70, Hdj2). Das Vorhandensein von zwei Banden im Zellkern weist darauf hin, dass Mdg1 im Kern rasch abgebaut wird. Die kleinere Kernbande ist bei 43°C deutlich schwächer ausgebildet als bei 37°C. Dies kann ein Hinweis auf die Funktion von Mdg1 sein, die durch die Halbwertszeit des Proteins reguliert wird. Eine andere Möglichkeit ist, dass die geringere Degradation bei 43°C auf einer Stabilisierung des Proteins durch Hitzeschock oder auf der nukleolären Assoziation beruht.

Mdg1-myc-intern ist durch die proteinbiochemische Methode auch im ER-/Golgi-Kompartiment nachweisbar (Abb. 28). Fusionsproteine des Gesamt-Mdg1 an EGFP verlieren diese Assoziation nahezu vollständig und zeigen eine vornehmlich zytosolische

Lokalisation, wobei die Ausrichtung des EGFP an Mdg1 keine Rolle spielt (Abb. 26 und 27). Eine mikrosomale Bande ist bei den EGFP-Fusionsproteinen nur in geringen Konzentrationen detektierbar. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sowohl N- als auch C-terminal Sequenzen für die Membranassoziation vorhanden sind, welche aber für die Lokalisation im ER- und Golgi-Kompartiment beide vorliegen müssen. Andererseits könnten diese Domänen für die Stabilisation des Proteins notwendig sein. Die C-terminale Sequenz CSGQ ist bereits bei anderen Proteinen als Membrananker beschrieben worden (Li 2006). Auf diese Sequenz wird später näher eingegangen. Auch das Konstrukt aus den N-terminalen 26 Aminosäuren, fusioniert an EGFP, ist im Golgi-Apparat zu finden, was fluoreszenzmikroskopisch durch Gegenfärbung mit Golgi-Markern bereits zuvor in der Arbeitsgruppe untersucht wurde (Tina Müller, persönliche Mitteilung). Deshalb kann dieser Sequenz ebenfalls eine membranverankernde Wirkung zugesprochen werden. Auch die Sequenzanalyse ergab einen Hinweis darauf, dass diese hydrophobe Aminosäuresequenz des N-Terminus ein Signalpeptid ist, welches als Membrananker dienen könnte.

Die beiden Mdg1-EGFP-Fusionsproteine sind bei 37°C vor allem im Zytosol und im Zytoskelett zu finden. Nach Hitzeschock nimmt die zytoskelettale Bande an Intensität zu, was bei EGFP-Mdg1(1-222) deutlicher ausgeprägt ist. Die beiden Mdg1-EGFP-Fusionsproteine zeigen auch eine Bande im Zellkern. Die Lokalisation im Zellkern bei 43°C kann auch in der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Dort finden sich beide Fusionsproteine im Zellkern, wobei die Fluoreszenz bei EGFP-Mdg1(1-222) stärker ist und die Nukleoli deutlich größer erscheinen als bei Mdg1(1-221)-EGFP. Die Diskrepanz in der Fluoreszenz kann durch die freie CSGQ-Domäne verursacht werden, welche eventuell eine Rolle bei der nukleären Lokalisation einnimmt oder das Mdg1-Protein durch Interaktion mit Membranen stabilisiert. Dass Mdg1(1-221)-EGFP in der proteinbiochemischen Nachweismethode nicht im Zellkern nachweisbar ist, kann eventuell darin begründet sein, dass nur ein geringer Anteil der Zellen diese Translokation aufweisen, der Hauptanteil des Proteins jedoch in den anderen Fraktionen verbleibt.

5.3 Identifizierung der Kompartiment-spezifischen Proteindomänen

5.3.1 Mdg1-Proteindomänen, welche für die Lokalisation am Zytoskelett notwendig sind

Die Lokalisation am Zytoskelett konnte sowohl bei 37°C als auch bei 43°C bei allen untersuchten Konstrukten des gesamten Mdg1-Proteins (mit myc-tag oder EGFP-fusioniert) beobachtet werden. Um die relevanten Proteindomänen analysieren zu können, wurden Deletionskonstrukte des Mdg1-Proteins untersucht. Die proteinbiochemische Methode zeigt, dass Mdg1(96-221)-EGFP und EGFP-Mdg1(96-222) in der zytoskelettalen Fraktion zu finden sind (Abb. 29). Aber auch die Fluoreszenzmikroskopie ergibt Hinweise auf eine zytoskelettale Assoziation von Mdg1(96-221)-EGFP und EGFP-Mdg1(96-222). In dieser Untersuchung finden sich die Fusionsproteine in rundlichen Strukturen im Zytoplasma der Zelle (Abb. 21). Dies kann ein Hinweis auf Aggregatbildung sein. Eine andere Erklärung für diese Verteilung ist die zytoskelettale Assoziation dieser Proteine. Ähnliche Befunde wurden von Liao et al. 1995 für Hsp70 und Hsc70 beschrieben. Die Lokalisation von Hsp70 und Hsc70 wurde dabei elektronenmikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Proteine in kleinen rundlichen Partikeln innerhalb der Zelle vorlagen, was als eine Interaktion mit dem Zytoskelett interpretiert wurde. Durch weitere Untersuchungen konnte für beide Proteine eine Assoziation an Keratinfilamenten nachgewiesen werden, die durch Hitzeschock intensiviert wird. Diese Intensivierung der zytoskelettalen Bande nach Inkubation der Zellen bei 43°C zeigt sich auch bei EGFP-Mdg1(1-222). Eine weitere Eingrenzung der für die Assoziation am Zytoskelett wichtigen Bereiche wurde durch Untersuchung der Lokalisation von jeweils etwa 60 AS großen Abschnitten des C-Terminus bewirkt. Dabei zeigt sich, dass lediglich die vorderen und hinteren Abschnitte, welche etwa 60 Aminosäuren umfassen, eine Assoziation am Zytoskelett aufweisen, der mittlere Abschnitt nicht (Abb. 30). Auffällig ist, dass bei EGFP-Mdg1(96-222) und Mdg1(154-221)-EGFP außer der Bande des Fusionsproteins noch weitere Banden in der Fraktion des Zytoskeletts auftauchen. Diese Banden entstehen vermutlich durch Abbauprodukte der Fusionsproteine. Diese Abbauprodukte haben eine Größe von 30 kDa bis 37 kDa. Demnach müssen die Sequenzen, die für die Interaktion mit

zytoskelettalen Strukturen relevant sind, in den Aminosäureabschnitten 96-122 und 195-221 liegen. Diese Vermutung setzt jedoch voraus, dass der Proteinabbau auf der Seite des Mdg1 stattfindet. Auch Mdg1(96-221)-EGFP zeigt Banden von Abbauprodukten, wobei diese nicht mehr am Zytoskelett assoziiert vorliegen, sondern zytosolisch lokalisiert sind. Diese Abbauprodukte liegen zwischen 30 kDa und 35 kDa. Vermutlich verliert das Protein die zytoskelettale Assoziation dadurch, dass die N-terminalen Sequenzen, welche die Interaktion bewirken (AS 96-125), abgebaut werden und anschließend die Sequenzen für die zytosolische Lokalisation überwiegen.

Ein Chaperon mit zytoskelettaler Assoziation, das ebenfalls zu der HSP40-Familie gezählt wird, ist Mrj. Dieses DnaJ-Protein bindet über den C-Terminus an Keratinfilamente und interagiert über die J-Domäne mit Hsc70 (Izawa et al. 2000). Auch Hsp25 zeigt eine Assoziation an Proteinen des Zytoskeletts. Dieses Chaperon liegt bei Kontrollbedingungen zytosolisch vor und ist nach Einfluss verschiedener Stressoren im Zellkern und am Zytoskelett nachweisbar, wobei es an Aktin bindet. Dadurch stabilisiert es die Aktinfilamente und schützt diese vor Zerstörung und Denaturierung durch Stress, wie beispielsweise Hitzeschock (Bryantsev et al. 2002). Auch für Mdg1 ist eine solche zytoprotektive Funktion denkbar, da sich die Bande der Fraktion des Zytoskeletts nach Hitzeschock intensiviert.

5.3.2 Mdg1-Proteindomänen, welche für die Lokalisation in der mikrosomalen Fraktion notwendig sind

Keines der verwendeten Deletionskonstrukte ließ sich durch die proteinbiochemische Methode in der mikrosomalen Fraktion nachweisen. Auch die Fluoreszenzmikroskopie ergab keine Hinweise auf eine Lokalisation am ER-/Golgi-Kompartiment dieser Konstrukte. Somit sind für diese subzelluläre Lokalisation die N-terminalen hydrophoben 26 Aminosäuren von entscheidender Bedeutung. Lediglich Konstrukte, welche diese Sequenz beinhalten, zeigen eine Assoziation an mikrosomalen Strukturen. Dies konnte mit dem Konstrukt Mdg1-myc-intern nachgewiesen werden. Schon zuvor wurde auf die

Bedeutung dieser Sequenz hingewiesen und die mikrosomale Lokalisation diskutiert (S. 107).

5.3.3 Mdg1-Proteindomänen, welche für die Kernlokalisation notwendig sind

Fluoreszenzmikroskopische und proteinbiochemische Untersuchungen zeigen, dass der C-Terminus (96-221) bei der Translokation in den Zellkern eine entscheidende Rolle spielt. Im Western-Blot kann Mdg1-EGFP nicht im Zellkern nachgewiesen werden, wohingegen EGFP-Mdg1 nach Hitzeschock eine deutliche Bande in der Kernfraktion erkennen lässt (Abb. 26 und 27). Demgegenüber zeigen beide Konstrukte in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine Lokalisation in den Nukleoli nach Hitzeschock. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Befunde in Proteinbiochemie und Fluoreszenzmikroskopie kann darin liegen, dass nur ein geringer Anteil des Mdg1-EGFP in den Zellkern transloziert, was im Western-Blot nicht sichtbar gemacht werden kann. Ein vergleichbares Ergebnis kann mit den beiden Konstrukten des C-Terminus [Mdg1(96-221)] erzielt werden. Das Protein, welches eine freie, funktionsfähige CSGQ-Domäne enthält, weist eine stärkere Fluoreszenz auf und die Nukleoli erscheinen größer, als bei jenem mit maskierter CSGQ-Domäne (Abb. 21). Somit kann der CSGQ-Domäne eine wichtige Signalfunktion bei der Lokalisation in den Nukleoli zugeschrieben werden. Es ist jedoch auch denkbar, dass die Domäne CSGQ das Protein stabilisiert, indem es mit Membranen interagiert und somit zu einer stärkeren Fluoreszenz führt. Die Rolle der CSGQ-Domäne zeigt sich besonders deutlich beim Vergleich der Proteine, welche lediglich aus dem hinteren Abschnitt des C-Terminus [Mdg1(154-221)-EGFP und EGFP-Mdg1(154-222)] bestehen. Das Protein mit freier C-terminaler Domäne zeigt eine sehr starke Fluoreszenz, wobei das mit maskierter Domäne nur eine geringgradige Fluoreszenz in den Nukleoli aufweist (Abb. 23). Außerdem erscheinen bei diesem Konstrukt die Nukleoli kleiner. Dies kann wiederum entweder ein Hinweis auf die Bedeutung der Sequenz CSGQ für die Translokation oder lediglich in einer erhöhten Proteinstabilität durch eine freie CSGQ-Domäne begründet sein.

Außer der CSGQ-Domäne sind noch weitere Sequenzabschnitte für die Lokalisation im Zellkern wesentlich. Es kann jedoch nicht einem einzelnen kurzen Sequenzabschnitt diese

Information zugeordnet werden. Sowohl der vordere (Aminosäurebereich 96-153) als auch der hintere Abschnitt (Aminosäurebereich 154-222) des C-Terminus zeigt in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine Assoziation an die Nukleoli (Abb. 22), also auch wenn die Domäne CSGQ durch EGFP maskiert wird. Diese fällt jedoch wesentlich deutlicher aus, wenn beide Sequenzabschnitte zusammenspielen [Mdg1(96-221)-EGFP und EGFP-Mdg1(96-222)]. Es liegt demnach nahe, dass wichtige Sequenzen, welche die Translokation in die Nukleoli bewirken, sowohl im vorderen als auch im hinteren Abschnitt des C-Terminus liegen. Das Fusionsprotein aus dem mittleren Bereich dieses C-terminalen Endes von Mdg1 mit EGFP zeigt keinerlei Fluoreszenz in den Nukleoli. Dies legt nahe, dass in diesem Abschnitt keine Sequenzen für die Nukleolusassoziation vorhanden sind. Auch für die Lokalisation von Mdg1 bei 37°C konnte diesem Aminosäurebereich keinerlei Bedeutung zugeschrieben werden. Dies verstärkt die zuvor geäußerte Vermutung, dass dieser Abschnitt bei der Target-Interaktion eine Rolle spielen könnte.

Die Information für die Lokalisation des Mdg1-Proteins in den Nukleoli bei 43°C kann somit den Sequenzabschnitten der Aminosäuren 96 bis 125 und 180 bis 222 zugeordnet werden, wobei bei letzterem die C-terminal gelegene Sequenz CSGQ scheinbar eine Rolle einnimmt. Diese C-terminale Sequenz des Mdg1-Proteins wird auch als CaaX-Domäne bezeichnet. Eine solche Sequenz kann im Rahmen der posttranslationalen Modifikation von Proteinen farnesyliert werden.

Farnesylierte Proteine sind in verschiedene zelluläre Abläufe eingebunden, wie Signaltransduktion (Ras) (Malumbres und Barbacid 2003), Organisation des Zytoskeletts (Rho, Rac) (Cordle et al. 2005, Settleman 2001, Hall 1998), vesikulären Transport (Rab-Proteine) (Larijani et al. 2003, Pfeffer 2001, Zerial und MacBride 2001) oder Ausbildung der Kernstruktur (Lamine) (Young et al. 2005, Moir et al. 2000). Bei der Farnesylierung werden zunächst die drei C-terminalen Aminosäuren proteolytisch abgespalten. Bei Mdg1 handelt es sich um die Aminosäuren Serin, Glycin und Glutamin. Das nun C-terminale Prenylcystein wird durch Carboxymethylierung modifiziert, wobei diese Reaktion durch das Enzym Farnesyltransferase katalysiert wird (Parish und Rando 1996). Auf die Farnesylierung können verschiedene weitere Modifikationen der Proteine erfolgen, welche zur Membranassoziation oder korrekten Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle beitragen. Zu diesen Modifikationen gehören Proteolyse, welche die letzten drei C-

terminalen Aminosäuren betrifft, und Carboxymethylierung des Cysteins. Die Bedeutung der CaaX-Domäne bei der Verankerung an Membranen, wie sie hier für das Mdg1-Protein am Zytoskelett unter Kontrollbedingungen beschrieben wurde, ist bereits bekannt. Die Rolle dieser Domäne bei der Translokation und der dabei zugrunde liegende Mechanismus sind bisher noch nicht geklärt.

Transportprozesse für Proteine innerhalb der Zelle erfolgen durch verschiedene Mechanismen.

Der Transport in das Endoplasmatische Retikulum oder in Mitochondrien geschieht zum Beispiel über spezifische Sequenzen, welche während des Transports entfernt werden. Aus diesem Grund ist dieser Vorgang nicht reversibel, das heißt einmal in die Zellkompartimente gelangte Proteine können normalerweise nicht mehr in das Zytoplasma zurückkehren (Rapport et al. 1996). Eine Ausnahme stellt der retrograde Transport aus dem ER dar, welcher im Rahmen der Proteindegradation eine Rolle spielt. Dabei gelangen falsch oder ungefaltete Proteine über einen speziellen Kanal, welcher Sec61 als zentrale Komponente enthält und in der ER-Membran liegt, aus dem ER ins Zytoplasma, wo sie anschließend in Proteasomen abgebaut werden (Plemper und Wolf 1999). Demgegenüber ist jedoch sowohl der Transport in den Zellkern, als auch aus dem Zellkern, ein sehr wichtiger Vorgang (Görlich 1998). Einige Proteine pendeln sogar kontinuierlich zwischen Zytoplasma und Zellkern. Deshalb liegt dem Kerntransport ein anderer Mechanismus zugrunde.

Der Transport von Molekülen vom Zytoplasma in den Zellkern und vice versa wird von dem so genannten Kernporenkomplex (NPC) vermittelt, welcher einen 9 nm breiten Kanal bildet und für Moleküle bis zu einer Größe von 60 kDa passierbar ist (Doye und Hurt 1997). Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Transporttypen: die eingeschränkte Diffusion, die erleichterte Diffusion und den unidirektionalen Ran-abhängigen Transport (Suntharalingham und Went 2003). Solche Moleküle, die nicht mit spezifischen Kernstrukturen interagieren, durchdringen die Kernmembran abhängig von ihrer Molekülgröße, weshalb dieser passive Transport nur entlang eines Konzentrationsgefälles möglich ist (Peters 1986). Andere Moleküle besitzen ein so genanntes nukleäres Lokalisationssignal (NLS), welches aus einer Sequenz von basischen Aminosäuren oder zwei kurzen Sequenzen von basischen Aminosäuren mit einer Lücke variabler Länge besteht. Das NLS bindet an Transportproteine, die im Zytoplasma gelöst sind. Diese Komplexe

gelangen durch die Kernmembran und werden im Zellkern wieder durch Bindung an RanGTP voneinander abgespalten. Dieser Transportmechanismus ist auch entgegen Konzentrationsgefällen möglich (Kubitschek et al. 2005). Der Mechanismus der Translokation des Mdg1-Proteins unter Hitzeschock ist noch unklar. In Sequenzanalysen konnte kein nukleäres Lokalisationssignal charakterisiert werden. Zwei mögliche Erklärungen für die Translokation von Mdg1 sind denkbar. Zunächst kann Mdg1, wenn es unter Kontrollbedingungen bei 37°C im ER-Kompartiment lokalisiert ist, bei Hitzeschock durch retrograden Transport aus dem ER heraus und in Proteasomen transportiert werden, wo es dann abgebaut wird. Neu synthetisiertes Mdg1-Protein gelangt dann bei 43°C nicht mehr ins ER-Kompartiment, sondern in den Zellkern. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass Mdg1 an der ER-Membran zytosolisch ausgerichtet ist und mit den N-terminalen 26 Aminosäuren in der Membran verankert ist. Diese könnten abgespalten werden und anschließend erfolgt der Kernshuttle. Dabei wäre das im Kern lokalisierte Mdg1-Protein um etwa 3 kDa kleiner, was jedoch in der Western-Blot-Analyse nicht nachvollzogen werden kann.

Die Lokalisation im ER und Golgi-Apparat sowie die Translokation in die Nukleoli finden sich auch bei Hsp70 (Welch et al. 1983). Dieses Hitzeschockprotein ist bisher bezüglich der Funktion der nukleären Fraktion am besten untersucht. Es reichert sich unter Stressbedingungen im Zellkern an, wobei der Mechanismus der Translokation von Hsp70 in den Zellkern ebenfalls noch unklar ist. Eine nukleäre Lokalisationssequenz konnte bisher, ebenso wie für Mdg1, nicht gefunden werden. Deshalb ist zu vermuten, dass sich diese Proteine an andere Proteine binden und dieser Komplex in den Zellkern transloziert, wo die Proteine voneinander gespalten werden. Eine solche Rolle für die subzelluläre Lokalisation durch Komplexbildung spielen beispielsweise Proteine, welche eine PDZ-Domäne beinhalten. Dabei bindet die PDZ-Domäne an Proteine, welche am C-Terminus ein X-T/S-X-a- oder C-S/T-X-X-Motiv tragen und leiten diese ihrem Zielkompartiment zu. Das Motiv muss dabei nicht frei vorliegen, auch Sequenzen im Innern des Proteins werden von der Domäne erkannt. Wichtig für die Interaktion ist die Aminosäure Serin oder Thymin an der drittletzten Position. Bei Mdg1 liegt an dieser Position die Aminosäure Serin. Es wird vermutet, dass Proteine mit einer CaaX-Domäne, welche mit PDZ-Proteinen interagieren, zunächst durch PDZ ihrem Zielkompartiment zugeführt werden und anschließend eine Farnesylierung stattfindet. Diese endet dann mit der

Membranassoziation der Proteine, wodurch die endgültige Lokalisation erreicht wird (Li 2006). Da der CSGQ-Domäne von Mdg1 eine Bedeutung bei der nukleären Translokation zugeschrieben werden kann, ist auch für dieses Protein ein solcher Prozess denkbar.

Für Hsp70 wird eine Beteiligung an der Rückfaltung denaturierter Proteine des Proteinbiosyntheseapparates wie ribosomale Proteine, Ribonukleoproteine (RNPs) oder ganzer Ribosomenuntereinheiten diskutiert (Pelham 1984; Lewis und Pelham 1985). Falsch gefaltete Proteine fallen unter ER-Stress in hohem Maße in den Zellkernen an. Ebenso wird davon ausgegangen, dass zahlreiche, primär nicht nukleäre Proteine, die unter Hitzeschock in ihrer Konformation veränderten werden, in den Zellkern transportiert und dort nach Abklingen der Stressreaktion durch Hsp70-abhängige Prozesse zurückgefaltet werden (Nollen et al. 2001; Olson et al. 2000).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die charakteristische Lokalisation des Mdg1-Proteins durch verschiedene Sequenzabschnitte bestimmt wird:

Die N-terminalen hydrophoben 26 Aminosäuren bedingen die Assoziation an Mikrosomenmembranen. Für die Lokalisation am Zytoskelett sind die Aminosäureabschnitte 96 bis 125 und 180 bis 222 des C-Terminus verantwortlich. Die Translokation in die Nukleoli nach Hitzeschock wird ebenfalls durch die Aminosäureabschnitte 96 bis 125 und 180 bis 222 des C-Terminus bewirkt. Der Bereich der Aminosäuren 125 bis 154 hat für die Lokalisation des Mdg1-Proteins keinerlei Bedeutung. Diese Region könnte eine Rolle bei der Target-Interaktion spielen.

5.4 Funktionen des Mdg1

Über die Funktion von Mdg1 ist bisher wenig bekannt. Eine Rolle bei der Angiogenese wird diskutiert, da das Protein erstmals bei der Differenzierung von Endothelzellen während der Blutgefäßbildung entdeckt wurde. Durch die Translokation in die Nukleoli als Reaktion auf exogene Stimuli kann auf verschiedene Funktionen geschlossen werden. Die Nukleoli dienen als Orte der Bildung der ribosomalen RNA. Darüber hinaus übernehmen sie regulatorische Aufgaben, wie bei der Kontrolle des Zellzyklus (Visintin und Amon 2000) und der DNA-Replikation (Scheer und Hock 1999).

Mdg1 könnte beispielsweise in die Transkription und RNA-Prozessierung eingreifen und als Indikator der Zellzyklusarretierung in Folge von Hitzeschock und der damit vermehrt auftretenden denaturierten und falsch gefalteten Proteinen dienen. Auch von anderen Hitzeschockproteinen, vor allem solchen der HSP70- und HSP90-Familie, ist eine Beteiligung an der Kontrolle des Zellzyklus bekannt (Helmbrecht et al. 1999). Dieser Eingriff in den Zellzyklus könnte auch bei Differenzierungsvorgängen und Sekretionsaktivitäten der Zellen eine Rolle spielen. Solche Zellen befinden sich in der G0-Phase, in der keine Zellteilungen mehr stattfinden. Mdg1 könnte somit den Zellzyklus arretieren und den Zellen dadurch ermöglichen, in die Differenzierungs- oder die Sekretionsphase überzugehen.

Aufgrund der Sequenz und des Vorhandenseins einer J-Domäne wird Mdg1 den DnaJ-homologen Proteinen und der Klasse der DnaJ/HSP40-Familie zugeordnet. Deshalb wird es auch als Co-Chaperon bezeichnet. Co-Chaperone spielen bei der Faltung von Proteinen eine Rolle. Bei der Differenzierung und Sekretion werden in hohem Maße Proteine gebildet, weshalb eine Beteiligung an deren Faltung als weitere Funktion von Mdg1 denkbar ist. Andererseits ist es auch denkbar, dass es eine Schutzfunktion einnimmt, indem es Zellen vor dem Zelltod durch toxische Stoffe schützt. Toxische Substanzen können eine Stressantwort mit Proteindenaturierung und Anhäufung falsch gefalteter Proteine erzeugen. Mdg1 könnte einerseits in den Proteinabbau und andererseits in die Korrektur der Proteinfaltung eingreifen.

5.5 Ausblick

Die für die Lokalisation am Zytoskelett und die Translokation von Mdg1 in den Zellkern verantwortlichen Sequenzen wurden in der vorliegenden Arbeit charakterisiert. Zur Überprüfung müssen weitere Deletionsmutanten konstruiert werden, welche lediglich die Aminosäuren 96 bis 125 und 180 bis 222 enthalten. Des Weiteren könnten Punktmutationen an Aminosäuren vorgenommen werden, um die Lokalisationsspezifität an einer bestimmten Aminosäure festzumachen.

Die Bedeutung des Mdg1-Proteins für die Individualentwicklung und im adulten Organismus kann durch die Generierung einer Mdg1-knockout- und einer Mdg1-transgenen Mauslinie untersucht werden. Durch den Vergleich der jeweiligen Lokalisationen mit dem Mdg1-Wildtyp ist eine genauere Aussage möglich. Das Plasmid zur Erstellung der Mdg1-transgenen Mauslinie ist bereits vorhanden.