

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Konzept der molekularen Chaperone	1
1.2. Das Hsp70/Hsp40-Chaperon-System	3
1.3. Das Chaperonin-System	5
1.4. Bearbeitete Organismen	9
1.5. Ziele der vorliegenden Arbeit	10
1.6. Nomenklatur	10
2. Methoden	11
2.1. Material	11
2.1.1. Chemikalien, Enzyme, Kits und Geräte	11
2.1.2. Biologisches Material	13
2.1.3. Oligonukleotide	13
2.2. Anzuchtverfahren	15
2.2.1. Bakterienkulturen	15
2.2.2. Kulturen von <i>Apotrichum curvatum</i>	15
2.2.3. Kulturen von <i>Phytophthora megasperma</i>	17
2.3. Präparation, Modifizierung und Analyse von Nukleinsäuren	18
2.3.1. Präparation und Gelelektrophorese von DNA	18
2.3.1.1. Präparation von Plasmid-DNA	18
2.3.1.2. Präparation von genomischer DNA	19
2.3.1.3. Gelelektrophorese von DNA	19
2.3.1.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
2.3.2. Präparation und Gelelektrophorese von RNA	20
2.3.2.1. Präparation von Gesamt-RNA aus <i>A. curvatum</i>	20
2.3.2.2. Präparation von Gesamt-RNA aus <i>P. megasperma</i>	21
2.3.2.3. Präparation von Poly(A) ⁺ -RNA	22
2.3.2.4. Denaturierende Gelelektrophorese von RNA	23
2.3.3. Prinzipielle Verfahren in der Analyse von Nukleinsäuren	24
2.3.3.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
2.3.3.2. Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol	24
2.3.3.3. Extraktion mit Phenol/Chloroform	24
2.3.3.4. Verdau mit Restriktionsendonukleasen	25
2.3.3.5. Dephosphorylierung von DNA	25

2.3.4. Amplifizierung von Nukleinsäuren durch PCR	25
2.3.4.1. PCR zur Amplifizierung von DNA	25
2.3.4.2. Reverse Transkription mit nachfolgender PCR	26
2.3.5. Verfahren zur Klonierung von DNA	27
2.3.5.1. Ligation von DNA	27
2.3.5.2. Klonierung von PCR-Produkten	27
2.3.5.3. Herstellung transformationskompetenter Zellen	28
2.3.5.4. Transformation in kompetente Zellen von <i>E. coli</i>	29
2.3.6. Herstellung einer cDNA-Bank	29
2.3.6.1. cDNA-Synthese	29
2.3.6.2. Ligation und Transformation	30
2.3.6.3. Herstellung von Master- und Replikafiltern	30
2.3.7. Transfer von Nukleinsäuren auf Trägermembranen	32
2.3.8. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten und Oligonukleotiden	32
2.3.9. Hybridisierungsverfahren	34
2.3.9.1. Hybridisierung von Southern- und Northern-Blots	34
2.3.9.2. Koloniehybridisierung	36
2.3.9.3. Autoradiographie	36
2.3.10. Sequenzierung von DNA	36
2.4. Analyse von Proteinen	37
2.4.1. Proteinbestimmung	37
2.4.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford	37
2.4.1.2. Proteinbestimmung nach Lowry	37
2.4.2. Säuredenaturierung von Proteinen	38
2.4.3. Gelelektrophoretische Verfahren zur Analyse von Proteinen	38
2.4.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
2.4.3.2. 2-dimensionale Gelelektrophorese	39
2.4.3.3. Proteinanfärbung	41
2.4.3.4. Fluorographie	42
2.5. Bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter Proteine	42
2.5.1. Herstellung des Expressionsvektors	42
2.5.2. Bakterielle Expression rekombinanter Proteine	42
2.5.2.1. Aufnahme von Zeitkurven	43
2.5.2.2. Untersuchung der Löslichkeit bakteriell exprimierter Proteine	43
2.5.2.3. Bakterielle Expression im präparativen Maßstab	43
2.5.3. Aufarbeitung von "inclusion bodies"	44
2.5.4. Reinigung rekombinanter Proteine über Affinitätschromatographie	44
2.6. Transkription und Translation <i>in vitro</i>	45
2.6.1. Transkription von cDNA <i>in vitro</i>	45

2.6.2. Translation von mRNA <i>in vitro</i> in Retikulozytenlysat	46
2.6.3. Gekoppelte Transkription und Translation <i>in vitro</i>	46
2.7. Zellfraktionierung von <i>A. curvatum</i>	47
2.7.1. Präparation von Rohextrakten	47
2.7.2. Aufarbeitung zur zellulären Lokalisierung von CCT	47
2.7.3. Aufarbeitung zur Anreicherung von CCT	49
2.8. Zellfraktionierung von <i>P. megasperma</i>	50
2.9. Autophosphorylierung	50
2.10. Immunologische Verfahren	51
2.10.1. Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose	51
2.10.2. Immunfärbung	51
2.10.2.1. Immunfärbung mit dem Enzymkonjugat der Alkalischen Phosphatase	51
2.10.2.2. Immunfärbung mit den "ECL-Western blotting detection reagents"	51
2.10.3. Immunpräzipitation	53
2.10.4. Antikörper-Affinitätschromatographie	55
2.10.5. Herstellung polyklonaler Antikörper	55
3. Ergebnisse	56
3.1. Klonierung von CCT-Untereinheiten aus <i>A. curvatum</i>	57
3.1.1. Klonierung einer für Cct5p kodierenden cDNA	57
3.1.2. Klonierung einer für Cct1p kodierenden cDNA	60
3.1.3. Klonierung einer für Aktin kodierenden cDNA	62
3.2. Bakterielle Expression und Reinigung von <i>AcCct1p</i> , <i>AcCct5p</i> und <i>AcAktinp</i> zur Gewinnung von Antiseren	64
3.2.1. Umklonierung der cDNA-Inserts der Klone pT7T3-18U/ <i>AcCCT5</i> , pSPORT/ <i>AcCCT1</i> und pSPORT/ <i>AcAktin</i> in Expressionsvektoren	64
3.2.2. Bakterielle Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine	66
3.2.3. Herstellung, Charakterisierung und Untersuchung der Spezifität von Antiseren	73
3.2.4. Untersuchung des unerwarteten Laufverhaltens der exprimierten Proteine	76
3.3. Analyse der Expression von Untereinheiten des CCT unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	77
3.3.1. Expression der CCT-Untereinheiten bei Wachstum der Zellen unter Normalbedingungen	78
3.3.2. Expression der CCT-Untereinheiten bei Wachstum der Zellen unter Bedingungen mit limitiertem Stickstoffangebot	81
3.3.3. Expression der CCT-Untereinheiten bei Wachstum der Zellen unter Kohlenstoffmangelbedingungen	84

3.3.4. Expression der CCT-Untereinheiten bei Wachstum der Zellen auf Oleat als einziger Kohlenstoffquelle	87
3.3.5. Analyse der Expression der CCT-Untereinheiten bei Shift der Zellen von Kohlenstoffmangelbedingungen auf Normalbedingungen	90
3.4. Charakterisierung der <i>in vivo</i> vorliegenden Struktur des AcCCT	92
3.4.1. Untersuchung der zellulären Lokalisation von AcCct5p	92
3.4.2. Anreicherung von CCT in der Zellfraktion P230 und Subfraktionierung der Zellfraktion über einen linearen Saccharosegradienten	94
3.5. Immunpräzipitation und Antikörper-Affinitätschromatographie	99
3.5.1. Immunpräzipitation	99
3.5.2. Antikörper-Affinitätschromatographie	103
3.6. Autophosphorylierung von Proteinen der Zellfraktion P230	104
3.7. <i>Phytophthora megasperma</i> : Klonierung einer zu Cct5p homologen Untereinheit	107
3.7.1. Erstellen einer cDNA-Bank und Screening mit CCT-spezifischen Sonden	108
3.7.2. Versuch der Amplifikation einer für CCT-Untereinheiten kodierenden cDNA mittels RT-PCR	109
3.7.3. Klonierung eines für Cct5p kodierenden DNA-Fragmentes mittels PCR ausgehend von genomischer DNA aus <i>P. megasperma</i>	111
3.7.4. Klonierung einer für Cct5p kodierenden cDNA	112
3.8. Untersuchung zur Charakterisierung von cytosolischen Hsp70 in <i>P. megasperma</i>	116
3.8.1. Nachweis cytosolischer Hsp70 in Zellfraktionen von <i>P. megasperma</i>	118
3.8.2. Nachweis cytosolischer Hsp70 auf Transkriptebene	123
4. Diskussion	125
4.1. CCT-Homologe in <i>A. curvatum</i> und <i>P. megasperma</i>	125
4.2. Charakterisierung der <i>in vivo</i> Struktur des CCT aus <i>A. curvatum</i>	131
4.3. Untersuchungen zur Phosphorylierung	135
4.4. Cytosolische Hsp70 in <i>P. megasperma</i>	136
5. Zusammenfassung	139
6. Literatur	141