



Heinz Bielka

Zelluläre Streßproteine: Biologische und medizinische Bedeutung

(Vortrag in der Sitzung der biowissenschaftlich-medizinischen Klasse am
28. Oktober 1994)

In: Berichte und Abhandlungen / Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften
(vormals Preußische Akademie der Wissenschaften) ; 1.1995, S. 87-102

Persistent Identifier: [urn:nbn:de:kobv:b4-opus-28495](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:b4-opus-28495)

Die vorliegende Datei wird Ihnen von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften unter einer
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Germany (cc by-nc-sa 3.0) Licence
zur Verfügung gestellt.



Heinz Bielka

Zelluläre Streßproteine: Biologische und medizinische Bedeutung

(Vortrag in der Sitzung der biowissenschaftlich-medizinischen Klasse
am 28. Oktober 1994)

1. Einführung und Überblick¹

1.1 Streßproteine: Produkte spezifischer Gene

Bakterien und Eukaryontenzellen, von Protozoen bis zu den Zellen tierischer Organismen einschließlich des Menschen, reagieren auf unphysiologische Bedingungen mit Streßreaktionen. Diese verlaufen in mehreren Phasen, deren wesentlichstes Charakteristikum eine Umprogrammierung der Genexpression ist. Während nahezu alle Transkriptions- und Translationsprozesse stark vermindert bzw. sogar eingestellt werden, wird andererseits die Transkription einiger Gene sehr schnell und stark aktiviert, und auch die Translation der synthetisierten mRNAs erfolgt sehr effizient. Die Produkte dieser Gene bzw. mRNAs werden allgemein als Streßproteine bezeichnet, häufig auch als Hitzeschockproteine (Hsp), da dieses Phänomen ursprünglich in Zellen nach Hitzeschock beobachtet wurde. Streßproteine, die innerhalb gewisser Grenzen unter unphysiologischen Bedingungen gebildet werden (z. B. bei Säugetierzellen bei 41 bis 43 °C), führen zu einer temporären Streßtoleranz von Zellen, d. h. der Befähigung, nachfolgend stärkere unphysiologische Belastungen (z. B. 44 bis 45 °C) besser zu überstehen als ohne vorausgehende Synthese von Streßproteinen.

Streßproteine werden auf Grund unterschiedlicher Molmassen in verschiedene Familien eingeteilt, die im Überblick in Tab. 1 zusammengefaßt sind.

¹ Reviews: (Schlesinger et al., 1982); (Schlesinger, 1986); (Nover, 1990 und 1991); (Burdon, 1986); (Lindquist & Craig, 1988); (Morimoto et al., 1990 und 1994); (Ciocca et al., 1993)

Tab. 1: Klassifizierung von Eukaryonten-Streßproteinen und Analoga in *E. coli*

Hsp90-Familie (ca. 90 kDa) Hsp100, Hsp90, Hsp86; htpG in <i>E. coli</i>
Hsp70-Familie (ca. 70 kDa) Hsp70, Hsp68; dnaK in <i>E. coli</i>
Hsp60-Familie (ca. 60 kDa) Hsp60; groEL in <i>E. coli</i> : kooperiert mit dem Helfer-(Cohort)-Protein GroES (Hsp10)
Hsp40 Hsp40; dnaJ in <i>E. coli</i> (Helfer-(Cohort)-Protein: kooperiert mit Hsp70 (dnaK))
Hsp25/27-Familie Hsp25 (Maus), Hsp27 (Drosophila, Mensch)
Hsp10 Hsp10; groES in <i>E. coli</i> (kooperiert mit Hsp60 (GroEL))
Hsp8 8 kDa-Ubiquitin*

* Wird durch Hitzeschock induziert und vermittelt Abbau denaturierter Proteine

1.2 Induktoren und Vorkommen von Streßproteinen

Streßreaktionen werden nicht nur durch erhöhte Temperaturen, sondern auch infolge von Sauerstoffmangel, durch eine Vielzahl chemischer Stoffe sowie auch bei infektiös bedingten Prozessen gebildet (Tab. 2). Durch derartige Einflüsse ausgelöste Streßtoleranzen sind „kreuzreaktiv“, beziehen sich also nicht nur auf die jeweilige „Noxe“, durch die primär die Synthese von Streßproteinen induziert wurde. Wie später noch beschrieben und dokumentiert werden wird, treten Streßproteine entwicklungspezifisch auch in verschiedenen Geweben unter normalen Bedingungen sowie unter pathophysiologischen Verhältnissen und im Verlauf pathologischer Prozesse auf (Tab. 3 und 4).

Tab. 2: Induktoren zellulärer Streßproteine (nach Zoeger et al., 1992)

*Unphysiologische Temperaturen**Sauerstoffmangel**Chemische Agenzien, z. B.*

Schwermetalle:	Cd, Cu, Hg, Zn
Alkohole:	Methanol, Äthanol, Propanol, Butanol
Aminosäureanaloge:	Äthionin, Hydroxynorvalin, β -Hydroxyleuzin
Chelatbildner:	EGTA, Hydrochinolin, Salizylsäure
Ionophore:	Valinomycin, A 23187
Inhibitoren des Energiestoffwechsels:	Arsenit, Azid, DNP, Amytal, Antimycin, Menadion
Hormone:	Dexamethason, Ecdysteron, Diäthylstilböstrol, Östradiol-
Aliphatische Karbonsäuren:	Arachidonsäurederivate
Teratogene:	Cumarine, Phenobarbital, Tolbutamid

Parasitäre Infektionen

Viren:	z. B. Herpesviren
Bakterien:	z. B. Mycobacterium (tuberculosis u. leprae), Chlamydia, Borrelia, Coxiella, Brucella, Bordetelle, Heliobacter
Tierische Parasiten:	
Protozoen:	z. B. Trypanosoma cruzi, Plasmodium falsiparum, Leishmania major
Würmer:	z. B. Schistosoma mansoni (Bilharzia)

Tab. 3: Medizinische Relevanz von Streßproteinen (Übersicht): Expression von Hsp's unter pathophysiologischen Bedingungen und bei pathologischen Prozessen

Lokale Temperaturerhöhungen, experimentell und klinisch angewandt (Hyperthermie) sowie z. B. bei Gelenkarthrose oder viralen Infekten (Herpesviren)
Applikation pyrogener Substanzen
Ischämien
Gewebehypertrophien
Verwundungen (Zell- und Gewebetraumen)
Infektionen (Viren, Bakterien, Protozoen, Würmer; s. Tab. 2)
Autoimmunprozesse (s. Tab. 4)
Unphysiologische und pathologische Prozesse im kardiovaskulären System (s. Tab. 4)
Pathologische Prozesse im Nervensystem (s. Tab. 4)
In Tumoren und nach Aktivierung von Protoonkogenen (z. B. c-fos, c-myc)

Tab. 4: Expression von Streßproteinen in spezifischen Gewebesystemen unter pathophysiologischen Bedingungen bzw. bei pathologischen Prozessen

Kardiovaskuläres System

Hyperthermie
 Ischämie (koronare Okklusion)/Hypoxie
 Reperfusion
 Druck- und Volumenüberbelastung
 Mechanische Dehnung
 Atherosklerose
 Hypertonie
 Herzinfarkt

Nervensystem

Ischämie/Hypoxie
 Herpes simplex-Infektionen
 Alzheimer-Krankheit
 Parkinson-Syndrom
 Pick-Krankheit
 Status epilepticus
 Multiple Sklerose

Autoimmunkrankheiten

Adjuvans- und chemisch (Pristan)-induzierte Arthritis, rheumatoide Arthritis
 Systemischer Lupus erythematoses
 Behcet-Krankheit
 Psoriasis

1.3 Spezifische Mechanismen der Syntheseregulation

Die im Ergebnis von Streßeinwirkungen induzierte Synthese von Streßproteinen beruht darauf, daß im Promotorbereich der Streßproteingene regulative Strukturen, sogenannte Hitzeschockelemente (HSE) vorkommen, die spezifische Transkriptionsfaktoren, sogenannte Hitzeschockfaktoren (HSF) binden (Abb. 1). Diese HSF werden unter Streßbedingungen in Trimere überführt, vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert, an die HSE der Promotoren gebunden und phosphoryliert und führen so zur Aktivierung der Streßproteingene und damit zur Synthese von Streßproteinen (Abb. 2). Die Funktion der HSF ist abhängig von ihren Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen, insbesondere ihrem Zustand unter normalen (native Proteine) bzw. unphysiologischen (denaturierte Proteine) Bedingungen (Abb. 2).

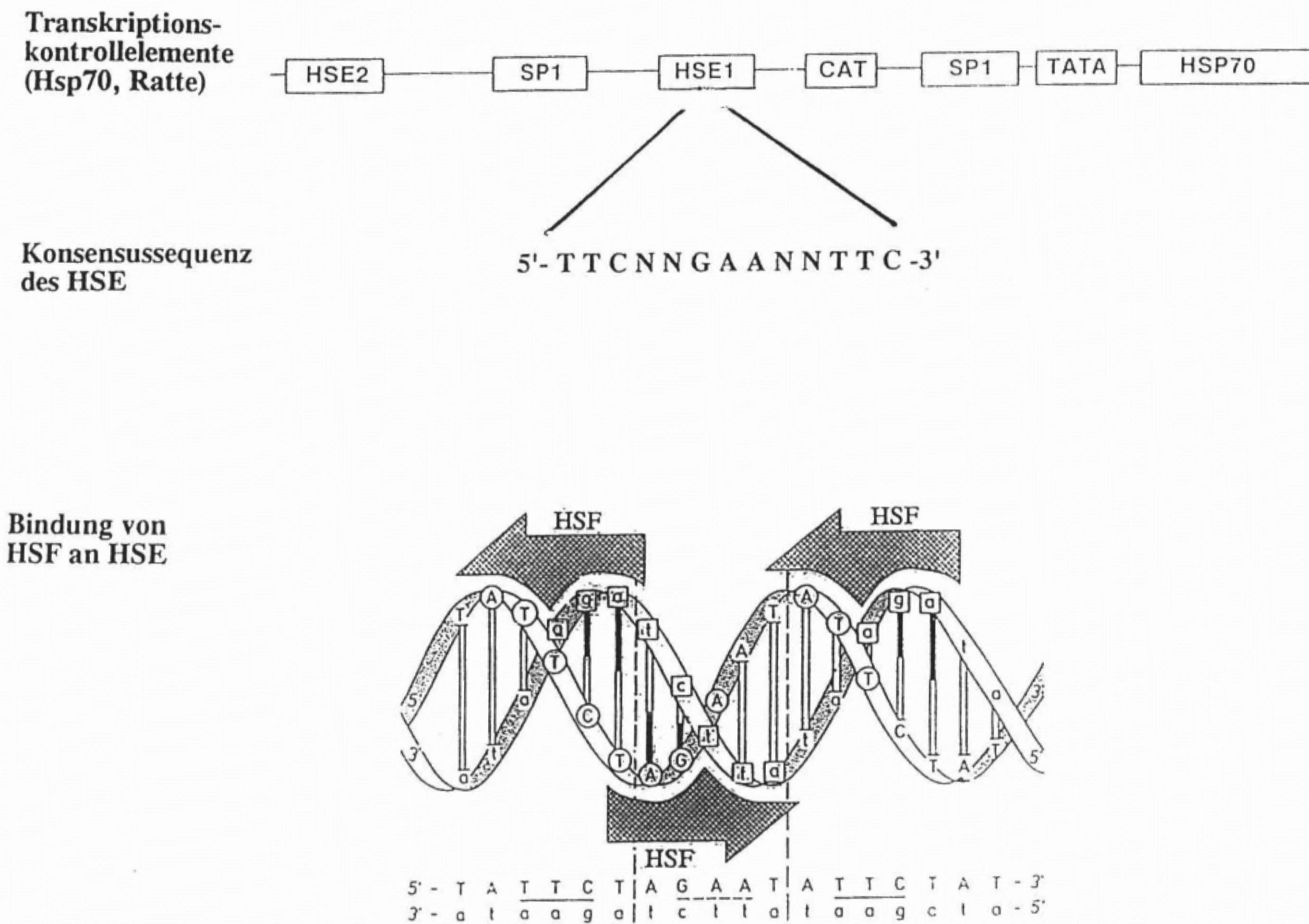


Abb. 1

Strukturen und Kontrollelemente (HSE) des hsp70-Gens und deren Wechselwirkung mit Hitzeschockfaktoren (HSF). Erläuterungen s. Text und Abb. 2

1.4 Streßproteine als molekulare Chaperone

Streßproteine stabilisieren die Struktur von Proteinen bzw. fördern die Wiederherstellung der nativen Struktur nach Denaturierungen, wie sie z. B. auch im Ergebnis von Streßeinwirkungen auf Zellen auftreten. Streßproteine gehören somit zu den molekularen Chaperonen. Die konstitutiv synthetisierten Chaperone sind funktionell dadurch ausgezeichnet, daß sie durch Reaktion mit hydrophoben Domänen an der Oberfläche von Peptidketten deren Faltung zu nativen Strukturen begünstigen, indem sie die Selbstassoziation (unspezifische Aggregation) und „unproduktive“ Faltungsprozesse, d. h. die Ausbildung nicht nativer Proteinkonformationen verhindern.

Chaperon-Eigenschaften der Streßproteine sind offensichtlich eine der wesentlichen molekularen Grundlagen ihrer Streßtoleranz-induzierenden Funktion: Stabilisierung zellulärer Strukturen unter unphysiologischen Bedingungen bzw. Wiederherstellung ihrer normalen Struktur.

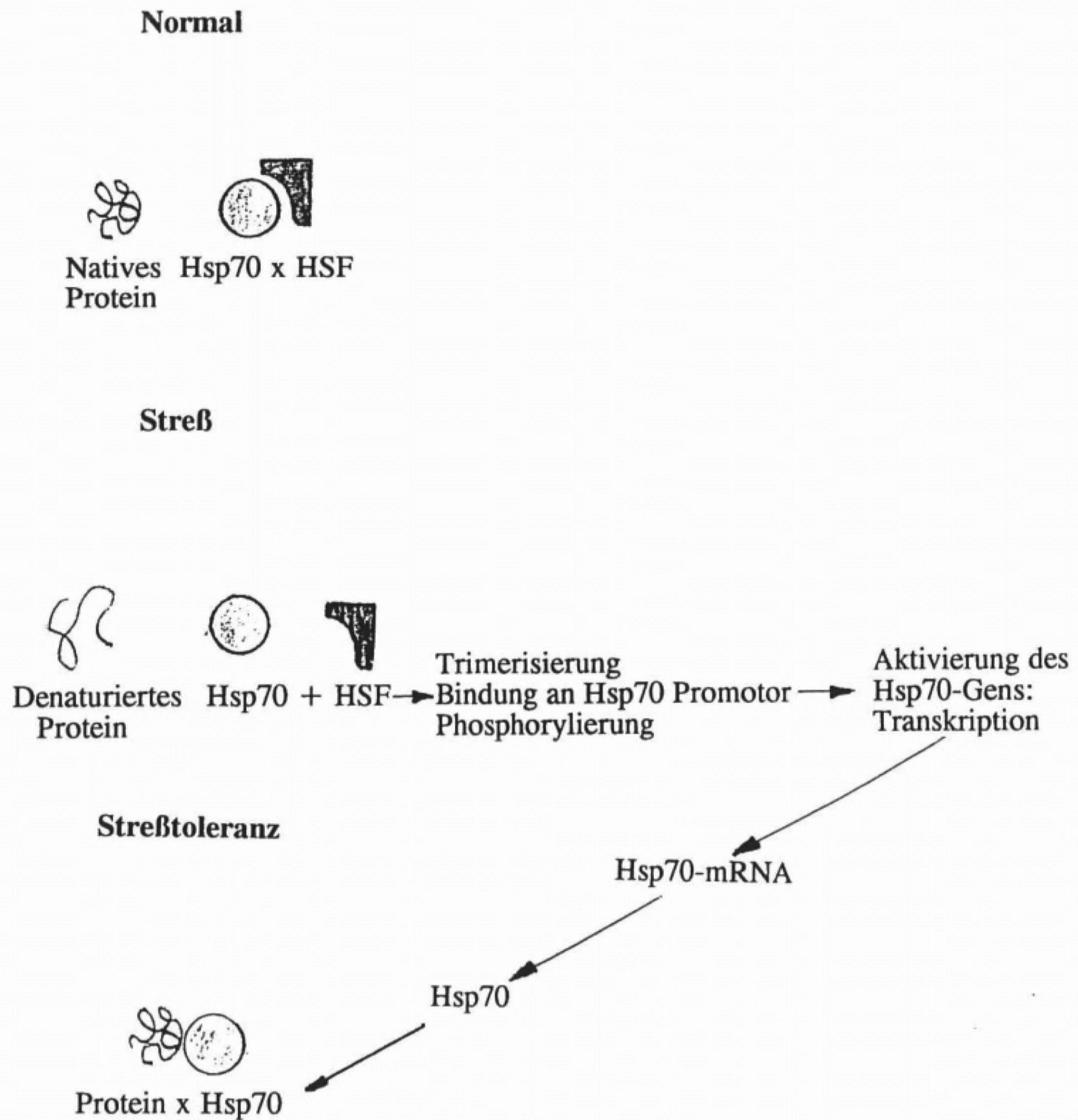


Abb. 2

Regulation der hsp-Genexpression unter physiologischen und Streß-Bedingungen über Wechselwirkungen zwischen Hsp und HSF. Erläuterungen s. Text und Abb. 1

2. Die „kleinen“ Streßproteine

Insbesondere im Zusammenhang mit entwicklungsbiologischen und medizinischen Problemen gewinnen zunehmend die sogenannten kleinen Streßproteine der Hsp25/Hsp27-Gruppe Interesse und Bedeutung. Die Einteilung in Hsp25 (Maus) und Hsp27 (Mensch) bedeutet nicht wirklich wesentliche Unterschiede beider Streßproteine in den realen Molmassen. Diese ergeben sich lediglich aus den mittels SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen ermittelten scheinbaren Molekulargewichten. Hsp25 und Hsp27 zeigen ein hohes Maß an Sequenzhomologien, verschiedene Gemeinsamkeiten z. B. auch hinsichtlich ihrer Phosphorylierungen sowie der Promotorstrukturen ihrer Gene.

Der nachfolgende Bericht enthält im wesentlichen die Ergebnisse über Hsp25 unserer Arbeitsgruppe Streßproteine im Max-Delbrück-Centrum (MDC), bis 1991

Abteilung Zellphysiologie im Institut für Molekularbiologie in Berlin-Buch, insbesondere die gemeinsam mit bzw. von Dr. Rainer Benndorf und Dr. Matthias Gaestel erzielten Resultate und Erkenntnisse, die z. T. mit anderen Arbeitsgruppen erreicht wurden und in den zitierten Publikationen aufgeführt sind.

2.1 Vom wachstumskorrelierten Protein p25 zum Streßprotein Hsp25

In gemeinsam mit R. Benndorf und P. Nürnberg 1986 begonnenen Experimenten über Veränderungen der Genexpression in verschiedenen Phasen des Wachstums

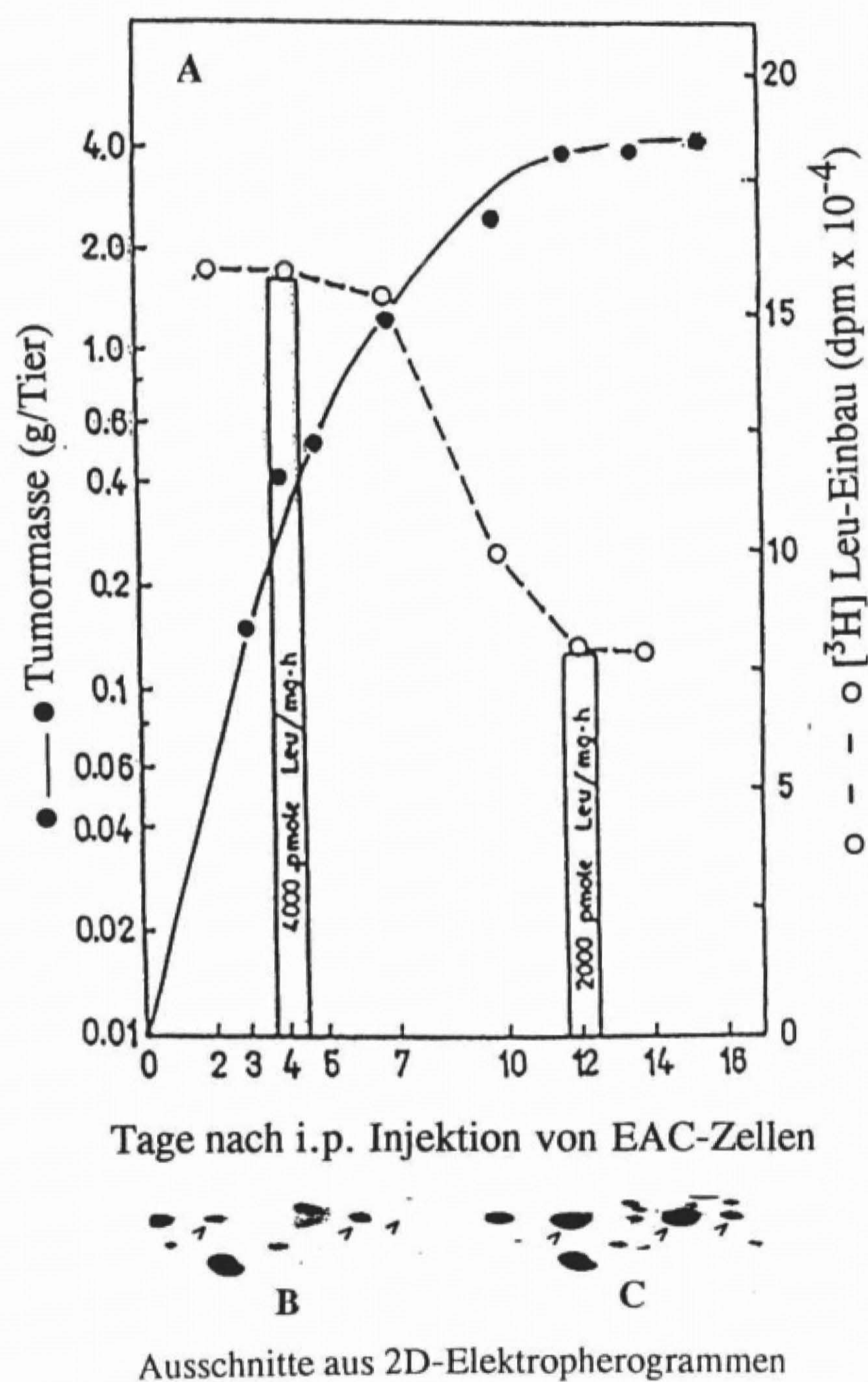


Abb. 3

oben: Wachstumskurve des Ehrlich-Ascites-Mammarycarcinoms in der Maus (\bullet — \bullet), Proteinsyntheseparameter (Säulen: zelluläre Proteinsynthese; \circ — — \circ : Proteinsynthese im zellfreien System) sowie (unten) wachstumsabhängige Expression von Hsp25 und dessen Phosphorylierung (a) am 3. Tag nach der Inokulation der Tumorzellen (exponentielle Wachstumsphase) und (b) am 12. Tag (stationäre Phase). Die Pfeilspitzen markieren (jeweilig von links nach rechts): unphosphorylierte Form p25/1 sowie phosphorylierte Formen p25/2 und p25/3. Weitere Erläuterungen hierzu s. Text. (nach Benndorf et al., 1988a und Bielka et al., 1988)

von Tumoren konnten zahlreiche Unterschiede im Auftreten von Proteinen in Zellen der frühen und späteren Stadien des proliferierenden Ehrlich-Ascites-Mammacarcinoms sowie Zellen des Tumors der stationären Phase nachgewiesen werden (Benndorf et al., 1988a; Bielka et al., 1988) (Abb. 3).

P25 tritt in drei Isoformen auf: als unphosphoryliertes (p25/1) sowie an Serinresten phosphoryliertes Protein (p25/2, p25/3) (Benndorf et al., 1988b; Bielka et al., 1988). Als Phosphorylierungsorte wurden Ser₁₅ und Ser₈₆ im Sequenzmotiv LXRXXS bestimmt (Gaestel et al., 1991). Die Phosphorylierung erfolgt durch MAPKAP-Kinase 2, die Dephosphorylierung durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Typ2B-Proteinphosphatase (Gaestel et al., 1992).

Während in der frühen Phase des exponentiell wachsenden Ehrlich-Ascites-Carcinoms p25 nur in geringen Mengen vorkommt, nehmen beim Übergang in die stationäre Phase insbesondere die phosphorylierten Formen sehr stark zu (Benndorf et al., 1988; Bielka et al., 1988) (Abb. 3).

Im Ergebnis der p25-cDNA-Klonierung und Sequenzanalyse konnte auf der Aminosäureebene eine etwa 80%ige Sequenzhomologie von p25 zum menschlichen Streßprotein Hsp27 nachgewiesen und p25 damit in die Familie der niedrigmolekularen Streßproteine (HSP) eingeordnet werden (Gaestel et al., 1989). Diese Zuordnung wurde sodann durch die Induzierbarkeit von p25 durch Hitzeschock in in vitro kultivierten Tumorzellen der exponentiellen Proliferationsphase, in denen p25 nicht nachweisbar ist, bestätigt (Oesterreich et al., 1990).

2.2 *Das Gen und das Protein*

Nachdem 1989 die Sequenzanalyse der hsp25-cDNA gelang (Gaestel et al., 1989), wurde nachfolgend die Struktur und Organisation des transkribierten Teils des *hsp25*-Gens und dessen Promotorregion aufgeklärt (Gaestel et al., 1993).

Das Gen besteht aus drei Exonen, die für 125, 22 und 62, also insgesamt 209 Aminosäuren kodieren [Molekulargewicht 23014; errechneter IEP 6,10; die phosphorylierten Isoformen haben IEP 5,8 bzw. 5,6, bestimmt mittels isoelektrischer Fokussierung (Benndorf et al., 1988a u. b; Bielka et al., 1988)] und zwei unterschiedlich großen Intronen (Abb.4). Das Produkt des zweiten Exons ist durch ein hohes Ausmaß an Hydrophobizität im entsprechenden Proteinsegment ausgezeichnet, das möglicherweise für das Aggregationsverhalten von Hsp25 unter Ausbildung supramolekularer Strukturen verantwortlich ist (Behlke et al., 1991).

Im Promotor (Abb. 5) sind verschiedene potentielle Transkriptionsfaktor-bindende Sequenzen vorhanden, nämlich zwei Sp1-bindende GC-reiche Sequenzen, zwei TATA-Boxen sowie ein Hitzeschockelement (HSE; s. 1.3) und ein halbpalindromisches Motiv eines östrogenreaktiven Elements (ERE). Letztere sind für die Ak-

```

10      20      30      40      50      60
|       |       |       |       |       |
TTGTCTTCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAAGCAAAGAAAAACAAAAAAAAAGC 60
ATTCAAATAAAAAAAAAAGAAAAATCCTACTTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA 120
GAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 180
ATACTCAGTGAACACTAAGCCCTGCCACGAAGCCTTTGCTCCCCAGGAGATACACTATA 240
GAAGACAGCTATCTTGCCGGTGTCTATGAGACCTCCACAGGTGTCCATGACATGTGTGTT 300
CCCACGGCCCTCCTTCTGGTTCAGACCAGGTTCAAGTTGATTCCAGTTGCGACACAAAAG 360
ACCTAACCTCTCCTGTTATTCTCAATAAAAAATGGGGCTGCCCCAGGCCACCGCCCTTCA 420
GCCAGCAGTGTCTAAACCCACAGTGGGAATCGCTCCAGCTACCGGTATTACGCCGTCA 480
TTTGTCTTCTCAACAAGAGAAAGTTTCCAGATGGGGGAGAACCTTCTGCCCGCCCTGC 540
CCGCCCCCTTTGCAAGCTTAGGGGAGGAAATGCAGAGGGGAGGGGCGGGAGGGGCGGCC 600
CCTGAGACGGTCATTGGCATTAAATAGAGACCTGAAGCACCCCTGCTAAAAATACCCGGC 660
TGGGCACACATAAAGCACCGCTGGGGCTCCAGTCCGGCACTTCTCGATCCTCAGCCAG 720
TGCTTCTAGATCCTCAGCCTTGACCAGCCAAAGAACATGACCGAGCGCCCGCTGCCCTTCT 780
          M T E R R V P F 8

CGCTGCTGCGGAGCCCGAGCTGGGAACCATTCCGGGACTGGTACCCTGCACACAGCCGCC 840
S L L R S P S W E P F R D W Y P A H S R 28

TCTTCGATCAAGCTTTCCGGGTGCCCGGTTGCCCGATGAGTGGTCCAGTGGTTCCAGCG 900
L F D Q A F G V P R L P D E W S Q W F S 48

CCGCTGGGTGCCCGGATACGTGCGCCCGCTGCCCGCCGCGACCCGAGGGCCCCCGCG 960
A A G W P G Y V R P L P A A T A E G P A 68

CGGTGACCTGGCCGCACCAGCCTTCAGCCGAGCGCTCAACCGACAGCTCAGCAGCGGG 1020
A V T L A A P A F S R A L N R Q L S S G 88

TCTCGAGATCCGACAGACGGCTGATCGCTGGCGCTGTCCCTGGACGTCAACCACTTCG 1080
V S E I R Q T A D R W R V S L D V N H F 108

CTCCGGAGGAGCTCACAGTGAAGACCAAGGAAGGCGTGGTGGAGATCACTGGTGAATTC 1140
A P E E L T V K T K E G V V E I T 125

CCTTGTGCCAGAGGGACGAAGCTGCCGAGGCAGAGTGGTGGCTGGGGGCTGAGGGTGG 1200
GGGCTGAAACCCTGAGGAATAGAACCCTGAGAAGTTAGAAAATAACCTAGGGACCCGGAGC 1260
CCGCATCATTCTCCTTTGCTGCTTCTTCCCGGAAACCGGGTGCAGGTTGCTCTTA 1320
AAAGCTGTCTCATCTTCGATGATATGGACCAACAGCTGGGGATGTAGCTCAGGGTAGAGC 1380
TTCGCTGGCCTGCCCGGACGTTGAGGCTTTGCGTTCCACCCGACGACAGAAAACAAAAT 1440
GAAGGAAGACCAACACACCTCTGGAAGACCTCATTCCAATAGCAGCGCAGGATCAGGTCC 1500
TAGACAGCCGAGAGCGTTTGGATATACCTACCCTGGTATCCAAGTCTGGGTGAGAGCCA 1560
AGCCCTTCGCATCCCAAATCTCAGAAAGGAAAGTTTCTGAAAGTTTAAAGATTCCAGACA 1620
GTCAGGCACCCCGCCGCACTCGGGTTTGTTCCTCCCTGGGGTCCCAGCCACTCCTTG 1680
CTAGGACAGCAGAGGGCTGACTTCTGACCTTCTGTCCCCACCCACAGGCAAGCAGGAAGA 1740
          G K H E E 130

AAGGCAGGACGAACATGGCTACATCTCTCGTGCTTACCCGAAATACAGTGAATTC 1800
R Q D E H G Y I S R C F T R K Y T 147

GATTCCTTCATGGAGGGCGGGGAGGTGGGGGGGGGGGAGCGGACCCAGGGCGGAGGGC 1860
GAAGAGCCCCGGTACAGGAGGATGTGTAACCCTTGCCCTGATTTTCTGTGTCCAGGC 1920
TCCCTCCAGGTGTGGACCCACCTAGTGTCTCCTTCCCTATCCCCTGAGGGCACACTTA 1980
L P P G V D P T L V S S L S P E G T L 167

CCGTGGAGGCTCCGTTGCCCAAAGCAAGTCAAGCAAGTCAAGCGGAGATCACCATTCCGGTTA 2040
T V E A P L P K A V T Q S A E I T I P V 187

CTTTCGAGGCCCCGCGCCAAATGGGGGCCAGAAAGCTGGGAAGTCTGAACAGTCTGGAG 2100
T F E A R A Q I G G P E A G K S E Q S G 207

CCAAGTAGAAGCCATCAGCCTGCTGCCTATCTCCATAGCCATTGCTGCCACCCCTCTC 2160
A K * 209

TGTCAATCTGTGCGCTCTTTTGATACATACATTTACCTGCTGTTTTTCTCAAATAAAAGT 2220
TGCAAGCTACTGCTCACCACCGTCTGACTCCAGAATTATTATGGTGGGCTAGGGATGGGT 2280
GTGCTAAATTGGAACACCCTTTGGGTCTTTGCTAAGTGTCTACTATGGGCTCAGGCTTCC 2340
TGTGGGAAAAGAGATAACCTGGAGATTAAGGTTTACCAGGGGGGCTGGAAAGGTGGCTC 2400
AGCGGGTAAGAGCACTGACTGCTCTCCGAAAGTCTGAGTTCAAATCCCAGCAACCACAT 2460
GGTGTCAACAACCACCGTGTATGAGGTCTGACACCCTCTTCTGGTGCATCTGAAGGCAGC 2520
TACGGTATACGTACATATATAATAATAATAAATCTTAAAAAAAAAAAAAGTTTACCAG 2580
GCTGGGTAGAATGATGGTATAATTACATCTCCTGTAATCCAATATCCAAAAACGGATGC 2640
AAAAGCAGTGTGAATTTGAAGCCAGCCTGGGCTACAGGGTGAAGTTCTATGAGTGCCTGGG 2700
CCACACATGTACTTGTCTCAAAAAACAACAGAAAGGCAAAAACAAAACAGAAAGCTCAG 2760
TAGAGGGTTTGCATGGCATCCGTGAAGTAATGTTTGTATCCCCCGCATTGGATAAACTGGG 2820
TATGGTGGCACCCTCCAGAAAGTGGAGAAAGGATCAGAAAGGAGTTCAAGGTTATCCTGGG 2880
CTACATGGCTAGTTTGGAGCCAGCCTGGGACACATGAAAACATCTTTTTTTTTTTTTTT 2940
CACATGAAAATATCTTAAAGAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAGGATCAGAGCCAGTCAAGT 3000
CCAAAGCAACCCCTCTCTCCAGCCTCTGGTCTGTTCTCTATGAACAGAGAAATTT 3058

```

Abb. 4
Nukleotidsequenz
des *hsp25*-Gens.
(nach Gaestel et al., 1993)

Durch Untersuchungen von Miron et al. (1991) ist bekannt, daß ein aus der glatten Muskulatur vom Truthahn isoliertes Protein, das der Familie der Hsp25-Streßproteine angehört, die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin hemmt. Dies konnte durch Benndorf et al. (1994) für Hsp25 aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen in *in vitro*-Versuchen mit Aktin aus Kaninchenmuskel bestätigt werden. Darüber hinaus gelang Benndorf et al. der bedeutsame Nachweis, daß diese Eigenschaft vom Phosphorylierungszustand des Streßproteins abhängig ist. Im Gegensatz zum unphosphorylierten Hsp25 hemmt pHsp25, d.h. phosphoryliertes Hsp25, die Aktinpolymerisation nicht, was vor allem für das kardiovaskuläre System von Bedeutung sein könnte.

2.4 Zellphysiologische Phänomene

Wie vorausgehend beschrieben, führt die durch unphysiologische Bedingungen induzierte Expression von Streßproteinen zur Streßtoleranz. Weiterhin ist bekannt, wie ebenfalls schon erwähnt, daß Streßproteine auch unter normalen Bedingungen in verschiedenen Geweben und Organen wachstums- und differenzierungsabhängig auftreten.

2.4.1 Streßtoleranz-induzierende Wirkung

In Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen konnte nach Überexpression von Hsp25 infolge vektorvermittelter hsp25-cDNA-Transfektion erhöhte Thermoresistenz der Tumorzellen festgestellt werden (Knauf et al., 1992), in weiteren entsprechenden Experimenten auch in NIH 3T3-Zellen (Knauf et al., 1994). In den Versuchen mit 3T3-Zellen wurde gleichzeitig gefunden, daß die Thermoresistenz-erzeugende Wirkung unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von Hsp25 ist.

2.4.2 Wachstums- und differenzierungsabhängige Expression

Wie unter 2.1 beschrieben und in Abb. 3 für das Ehrlich-Ascites-Carcinom gezeigt, tritt Hsp25 stark in Zellen des Tumors der stationären Phase auf, in Zellen der exponentiellen Proliferationsphase hingegen nicht oder nur in geringem Ausmaß. Damit könnten Hsp25 und insbesondere die phosphorylierten Isoformen als molekulare Marker des Proliferationsverhaltens von Tumorzellen dienen.

Das wachstumsabhängige Auftreten von Hsp25 legte die Frage nach direkten Beziehungen zwischen der Synthese dieses Streßproteins und dem Wachstum von Tumoren nahe. Zu diesem Zweck wurde Hsp25-cDNA in Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen transfiziert (s. auch 2.4.1), wodurch es zu einer Überexpression von Hsp25 kam. Derartig gentechnisch veränderte Tumorzellen zeigten sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* ein um mehrere Größenordnungen vermindertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen, in die lediglich der Vektor ohne Hsp25-cDNA-Insert übertragen wurde (Knauf et al., 1992) (Abb. 6).

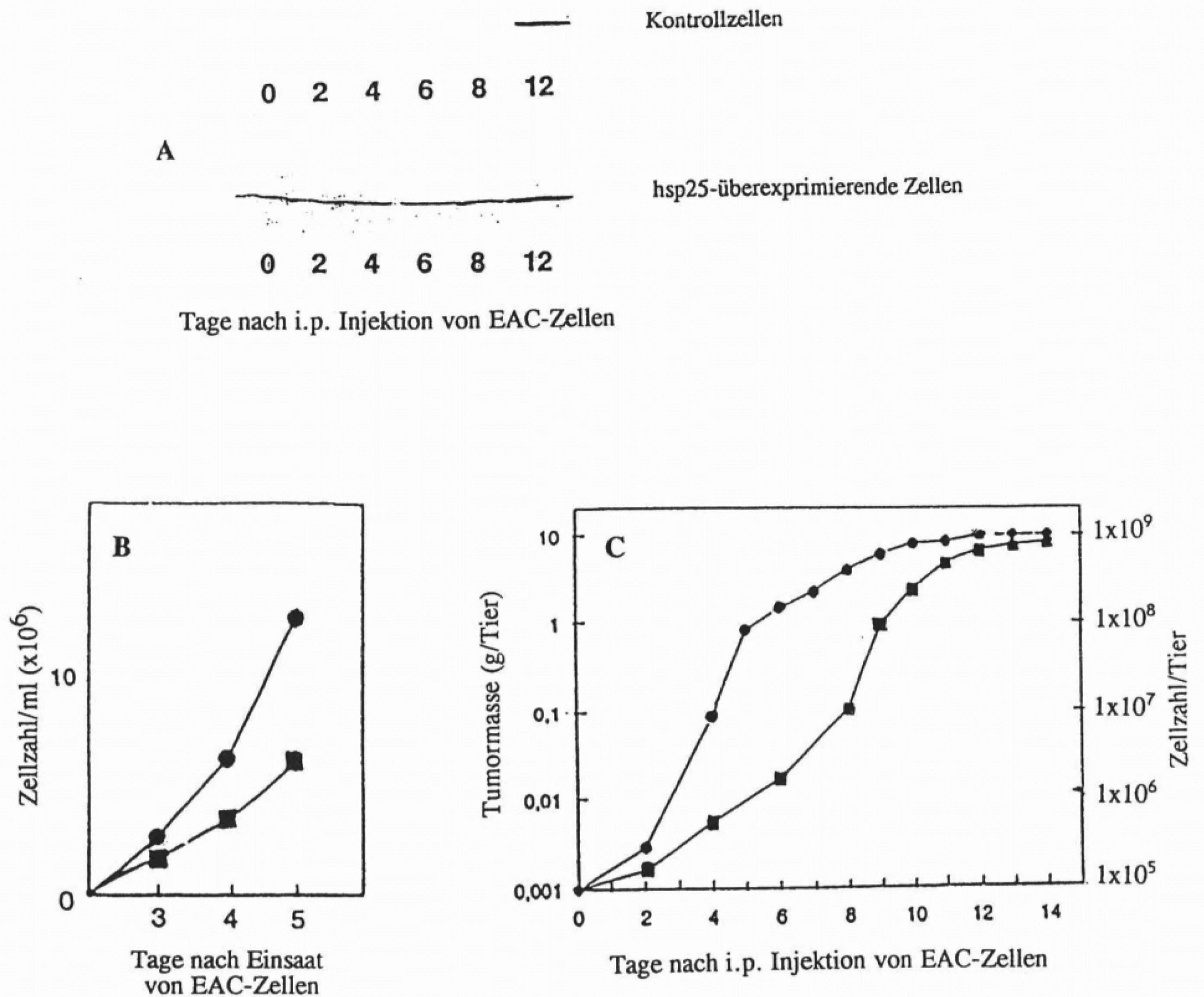


Abb. 6

Wachstumscharakteristika (Zellproliferation) des Ehrlich-Ascites-Carcinoms (B) *in vitro* und (C) *in vivo* von Wildtypzellen (●) sowie Hsp25-überexprimierenden Zellen (■) nach Hsp25-cDNA-Transfektion. Bildteil (A) zeigt, daß nach vektorvermittelter Transfektion von Hsp25-cDNA Hsp25 (Western-Blot-Analyse) bereits in Zellen der normalerweise frühen exponentiellen Vermehrungsphase synthetisiert wird und, wie in (B) und (C) gezeigt, zu einer Proliferationshemmung der Tumorzellen und damit zur Wachstumshemmung des Tumors führt (nach Knauf et al., 1992)

Da Proliferation und Differenzierung von Zellen im wesentlichen alternativ erfolgende Vorgänge sind, war es nach den vorausgehend beschriebenen Befunden über die negative Korrelation zwischen Hsp25-Synthese und Wachstum von besonderem Interesse zu prüfen, inwieweit Hsp25 auch differenzierungsabhängig auftritt. Daher führten wir zunächst Untersuchungen über das Vorkommen von Hsp25 in embryonalen Carcinomzellen (P19, PCC4) und embryonalen Stammzellen (BLC6) durch (Stahl et al., 1992). Sowohl in den differenzierungsfähigen pluripotenten embryonalen Carcinomzellen der Linie P19 als auch in den pluri-

potenten embryonalen Stammzellen der Linie BLC6 läßt sich unter Kultivierungsbedingungen, unter denen der undifferenziert proliferierende Zustand erhalten bleibt, Hsp25 nicht nachweisen. Werden P19- und BLC6-Zellen jedoch zur Differenzierung gebracht, so kommt es zu einer schnellen und starken Zunahme von Hsp25. Die sogenannten nullipotenten Zellen des embryonalen Carcinoms PCC4, die nicht differenzierungsfähig sind, bilden hingegen kein Hsp25. Daß diese Zellen jedoch prinzipiell zur Hsp25-Synthese befähigt sind, ergab sich aus Hitzschock-Kontrollversuchen.

Die Arbeiten über das wachstums- bzw. differenzierungsabhängige Auftreten von Hsp25 *in vitro* wurden durch weitere Untersuchungen an Gesamtembryonen der Maus während verschiedener Phasen der Entwicklung ergänzt (Gernold et al., 1993). In diesen Experimenten mit Gesamtembryonalextrakten konnte mittels Western-Blot-Analysen sowie in Schnittpräparaten des Gesamtembryos mittels immunhistochemischer Technik eine entwicklungsphasen- und organ- bzw. gewebespezifische Expression von Hsp25 nachgewiesen werden. Hsp25 tritt mit unterschiedlichen Veränderungen zwischen dem 13. und 16. Tag insbesondere im Mesencephalon, Telencephalon und im Notochord, in der Zungen-, Blasen- und Intestinalmuskulatur sowie in verschiedenen Bereichen der Skelettmuskulatur, im Sternum sowie hauptsächlich im Herzen auf. Der Hsp25-Gehalt erreicht kurz vor der Geburt maximale Werte und geht mit der Geburt drastisch zurück.

2.4.3 Vorkommen von Hsp25 nach Zytostatikabehandlung

Unter 2.1 wurde dargestellt, daß Hsp25 insbesondere in Zellen der stationären Phase des Ehrlich-Ascites-Mammacarcinoms auftritt. Über die molekularen Ursachen, die zur Wachstumshemmung führen, ist gesichert bisher nichts bekannt. Unter anderem wird eine Anhäufung von Wachstumsinhibitoren diskutiert. Wir prüften daher, ob die Hemmung der Proliferation von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen während der exponentiellen *in vitro*-Vermehrungsphase durch klinisch angewandte Kanzerostatika mit einer Induktion bzw. einem vermehrten Auftreten von Hsp25 einhergeht (Oesterreich et al., 1991; Bielka et al., 1994). Dies konnte in der Tat nachgewiesen werden, und zwar für solche Zytostatika, die Replikationssysteme in der S-Phase (DNA-Synthese) und in der M-Phase (Zytokinese) hemmen. Zu ersteren gehören Cisplatin, Doxorubicin, Daunomycin, Cytosin-arabinosid, 3'-Fluordesoxythymidin, zur zweiten Gruppe Colchicin und Vincristin. Keine entsprechenden Effekte konnten hingegen für Substanzen nachgewiesen werden, die zytostatisch durch Beeinflussung von Prozessen in der G1-Phase des Zellzyklus wirken, nämlich 5-Fluoruracil sowie die Folsäureantagonisten Amethopterin (Methotrexat) und Aminopterin. Auch ⁶⁰Co-generierte Gammastrahlen, wie sie in der Strahlentherapie von Tumoren angewandt werden, führten nicht zur Induktion von Hsp25. Da Streßproteine zur Streßtoleranz von Zellen führen, sind

diese Befunde möglicherweise auch für die klinische Praxis von Bedeutung. Entsprechende Untersuchungen befinden sich in Vorbereitung.

3. Zusammenfassung und Ausblick

Das Streßprotein Hsp25 ist ein phosphorylierbares Protein. Die von verschiedenen Bedingungen abhängige Phosphorylierung der Ser-Reste 15 und 86 im Sequenzmotiv LXRXXS erfolgt durch die sogenannte MAPKAP-Kinase 2, eine Kinase eines streß- und mitogenaktivierbaren zellulären Systems. Das Gen besteht aus drei Exonen und zwei Intronen. Der Promotor enthält neben allgemeinen (Sp1, TATA-Boxen) spezifische Transkriptionsfaktor-bindende Sequenzmotive. Hsp25 wird wachstums- und differenzierungsabhängig exprimiert sowie u. a. auch durch zytostatisch wirksame Pharmaka induziert. Es erzeugt Streßresistenz, Wachstumshemmung, besitzt Proteinstrukturen stabilisierende und renaturierende Chaperoneigenschaften und interagiert phosphorylierungsabhängig mit Aktinstrukturen. Insbesondere das wachstums- und differenzierungsabhängige Auftreten, das Vorkommen in Tumoren, im kardiovaskulären System, in verschiedenen Geweben unter pathophysiologischen Bedingungen und bei pathologischen Prozessen sowie die von Streß- und Mitogen-wirksamen Faktoren abhängige Phosphorylierung machen Hsp25 für die biologische und medizinische Forschung zu einem wichtigen Untersuchungsprojekt. Als weitere Aufgaben von besonderer Bedeutung seien genannt:

- Aufklärung der Bedeutung des Streßproteins für normale Wachstums- und Entwicklungsvorgänge sowie für verschiedene pathologische Prozesse.
- Analyse der Signalsysteme, über die die Synthese und die Phosphorylierung reguliert werden.
- Nutzung als Marker für pathologische Prozesse, möglicherweise auch für protektive Zwecke, z. B. Streßsituationen im kardiovaskulären System.
- Aufklärung der Rolle und Nutzung von Streßproteinen für die Ausbildung protektiver Immunität und Entwicklung von Impfstoffen, z. B. durch Kopplung mit viralen Proteinen.
- Nutzung der Induktion von Streßproteinen für den Nachweis schädigender Chemikalien in der chemisch-toxikologischen Forschung.

Literatur

- Behlke, J., Lutsch, G., Gaestel, M. and H. Bielka, 1991: Supramolecular structure of the recombinant murine small heat shock protein hsp25. In: FEBS-Lett. 288, 119–122
- Benndorf, R., Nürnberg, P. and H. Bielka, 1988a: Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich ascites tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis. In: Exper. Cell Res. 174, 130–138
- Benndorf, R., Kraft, R., Otto, A., Stahl, J., Böhm, H. and H. Bielka, 1988b: Purification of the growth-related protein p25 of the Ehrlich ascites tumor and analysis of its isoforms. In: Biochem. Internat. 17, 225–234
- Benndorf, R., Hayeß, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J. and G. Lutsch, 1994: Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein Hsp25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. In: J. Biol. Chem. 269, 20780–20784
- Benndorf, R., Hayeß, K., Stahl, J. and H. Bielka, 1992: Cell-free phosphorylation of the murine small heat-shock protein hsp25 by an endogenous kinase from Ehrlich ascites tumor cells. In: Biochem. Biophys. Acta 1136, 203–207
- Bielka, H., Benndorf, R. and I. Junghahn, 1988: Growth related changes in protein synthesis and in a 25 kDa protein of Ehrlich ascites tumor cells. In: Biomed. Biochim. Acta 47, 557–563
- Bielka, H., Hoinkis, G., Oesterreich, St., Stahl, J. and R. Benndorf, 1994: Induction of the small stress protein, hsp25, in Ehrlich ascites carcinoma cells by anticancer drugs. In: FEBS-Lett. 343, 165–167
- Burdon, R. H., 1986: Heat shock and the heat shock proteins. In: Biochem. J. 240, 313–324
- Ciocca, D.R., Oesterreich, St., Chamness, G.C., McGuire, W.L. and S.A. W Fuqua, 1993: Biological and clinical implications of heat shock protein 27 000 (Hsp27): a review. In: J. Natl. Cancer Inst. 85, 1558–1570
- Gaestel, M., Gross, B., Benndorf, R., Strauss, M., Schunk, W.-H., Kraft, R., Otto, A., Böhm, H., Stahl, J., Drabsch, H. and H. Bielka, 1989: Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the 25-kDa growth related protein of Ehrlich ascites tumor and its homology to mammalian stress proteins. In: Eur. J. Biochem. 179, 209–213
- Gaestel, M., Schröder, W., Benndorf, R., Lippmann, C., Buchner, K., Hucho, F., Erdmann, V.A. and H. Bielka, 1991: Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25. In: J. Biol. Chem. 266, 14721–14724
- Gaestel, M., Benndorf, R., Hayes, K., Priemer, E. and K. Engel, 1992: Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by Calcium/Calmodulin-dependent (Type 2B) protein phosphatase. In: J. Biol. Chem. 267, 21607–21611
- Gaestel, M., Gotthardt, R. and T. Müller, 1993: Structure and organisation of a murine gene encoding small heat-shock protein Hsp25. In: Gene 128, 279–283
- Gernold, M., Knauf, U., Gaestel, M., Stahl, J. and P.-M. Kloetzel, 1993: Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25. In: Dev. Genet. 14, 103–111
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. and J. Buchner, 1993: Small heat shock proteins are molecular chaperones. In: J. Biol. Chem. 268, 1517–1520

- Knauf, U., Bielka, H. and M. Gaestel, 1992: Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells. In: FEBS-Lett. 309, 297–302
- Knauf, U., Jakob, U., Engel, K., Buchner, J. and M. Gaestel, 1994: Stress and mitogen-induced phosphorylation of the small heat shock protein Hsp25 by MAPKAP kinase 2 is not essential for chaperone properties and cellular thermoresistance. In: EMBO-J. 13, 54–60
- Lindquist, S. and E. A. Craig, 1988: The heat shock proteins. In: Ann. Rev. Genet. 22, 631–677
- Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M. and B. Geiger, 1991: A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. In: J. Cell Biol. 114, 255–261
- Morimoto, R. I., Tissières, A. and C. Georgopoulos (Eds.), 1990: Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Morimoto, R. I., Tissières, A. and C. Georgopoulos (Eds.), 1994: The biology heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Nover, L., 1990: Molekulare Zellbiologie der Hitzestressantwort. In: Naturwiss. 77, 310–316 (Teil I) und 359–365 (Teil II)
- Nover, L. (Ed.), 1991: Heat shock response. CRC Press, Boca Raton
- Oesterreich, St., Benndorf, R. and H. Bielka, 1990: The expression of the growth-related 25kDa protein (p25) of Ehrlich ascites carcinoma cells is increased by hyperthermic treatment (heat shock). In: Biomed. Biochim. Acta 49, 219–226
- Oesterreich, St., Schunck, H., Benndorf, R. and H. Bielka, 1991: Cisplatin induces the small heat shock protein hsp25 and thermotolerance in Ehrlich ascites tumor cells. In: Biochem. Biophys. Res. Comm. 180, 243–248
- Ritossa, F., 1962: A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. In: Experientia 18, 571–573
- Schlesinger, M. J., Ashburner, M. and A. Tissières (Hg.), 1982: Heat shock: from bacteria to man. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Schlesinger, M. J., 1986: Heat shock proteins: The search for functions. In: J. Cell Biol. 103, 321–325
- Stahl, J., Wobus, A. M., Ihrig, S., Lutsch, G. and H. Bielka, 1992: The small heat shock protein hsp25 is accumulated in P19 embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells of line BLC6 during differentiation. In: Differentiation 51, 33–37
- Tissières, A., Mitchell, H. K. and U. M. Tracy, 1974: Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. In: J. Mol. Biol. 84, 389–398
- Zoeger, D., Beyersmann, D., Rensing, L. and M. Hagemann, 1992: Stressverarbeitung in der Zelle. In: Naturwiss. Rdsch. 45, 9–19