

1. Einleitung

Eine lebende Zelle ist häufig wechselnden äußeren Einflüssen ausgesetzt. Solche Stresssituationen können beispielsweise sein: Nahrungsmangel, Hitze- oder Kälteeinwirkung, Wasserstress, Änderung des osmotischen Milieus oder des pH-Wertes, UV-Strahlung, oxidativer Stress oder Einwirkung von mutagenen und/oder toxischen Agenzien, um nur einige zu nennen (WELCH, 1993; COSTA und MORADAS-FERREIRA, 2001; ROWBURY, 2001). Die Natur hat verschiedenste Strategien entwickelt, um auf solche wechselnden Bedingungen zu reagieren. Die Verteidigungsstrategien greifen dabei sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene. Schwermetalle werden beispielsweise einerseits durch aktiven Transport wieder aus der Zelle gebracht und andererseits wird durch ihre Anwesenheit die Transkription bestimmter Gene reguliert und so eine Anpassung erreicht (TAMAS und WYSOCKI, 2001). Auch greifen die Verteidigungsstrategien häufig ineinander über (COSTAS und MORADAS-FERREIRA, 2001; KREGEL, 2002). Einige Mechanismen, die dem direkten Schutz von Makromolekülen, wie DNA oder Proteinen dienen, sollen im Folgenden näher erläutert werden.

1.1 Stabilisierung von Makromolekülen

Bei Schädigung der DNA, z. B. durch UV-Strahlung oder durch freie Radikale, wird durch eine vermehrte Anzahl an ssDNA-Fragmenten die umfassende SOS-Antwort induziert, so dass Schäden an der DNA repariert und auf diese Weise Mutationen verhindert werden (PHAM et al., 2001).

Die Stabilität von Proteinen, ebenso wie die Funktionalität von Membranen werden insbesondere durch thermische Einwirkungen beeinflusst. Eine Temperaturerhöhung verursacht das Anschalten eines elementaren Verteidigungsmechanismus der Zelle, der Hitzeschockantwort (zur Übersicht siehe MOGK et al., 2001). Diese umfasst die umfangreiche Transkription und Translation von Hitzeschockproteinen (FEDER und HOFMANN, 1999;

FEHRENBACH und NIESS, 1999; JOLLY und MORIMOTO, 2000; GOUESBET et al., 2002; YOSHIMUNE et al., 2002). Einen großen Anteil an den Hitzeschockproteinen (HSP) haben Chaperone, welche vom Bakterium bis hin zum Menschen hoch konserviert sind. Sie sorgen für eine Stabilisierung von gefalteten Proteinen oder für deren ständige Rückfaltung. So wird Denaturierung oder Aggregation bis zu einem gewissen Punkt verhindert (AGASHE und HARTL, 2000; HARTL und HAYER-HARTL, 2002). Nicht nur bei Temperaturerhöhung, auch bei der Temperaturerniedrigung werden Mechanismen zum Schutze der Zelle aktiv. Die Kälteschockantwort wurde bereits in Bakterien (z. B. GRAUMANN und MARAHIEL, 1996), Archaea (CAVICCHIOLI et al., 2000), Hefen (KOWALSKY, et al., 1995), Pflanzen (HUGUES und DUNN, 1996), Tieren (COSTENZO et al., 1995) bis hin zum Menschen (HOLLAND et al., 1993) nachgewiesen. In welcher Art und Intensität sie ausfällt, hängt zum einen vom Organismus ab, denn beispielsweise unter den Bacteria und Archaea gibt es thermo-, meso- oder psychrophile Arten, die von der genetischen Grundausstattung unterschiedlich angepasst sind (WIEGEL, 1990), zum anderen spielt die Tiefe der Temperatur, bzw. die Temperaturspanne eine Rolle. Temperaturen unter 0 °C führen normalerweise zum Tod der Zelle, nicht zuletzt verursacht durch das Gefrieren des Wassers (HAINES, 1938). In mesophilen Bakterien besteht die Kälteschockantwort bei mäßiger Temperaturerniedrigung aus zwei Phasen (PANOFF et al., 1998), einer sofortigen Expression von Kälteschockproteinen (cold-shock-proteins, CSP) und einer kontinuierlichen Adaptationsphase, nämlich der Expression der Kälteakklimatisierungsproteine (cold-acclimation-proteins, CAP). Die CSPs besitzen unterschiedlichste Funktionen. Einige regulieren Replikation, Reparatur, Transkription sowie die Packungsdichte der DNA (GOLDSTEIN et al., 1990; PHADTARE et al., 2002), andere sorgen für eine Entsättigung der Fettsäureketten von Membranlipiden, um die Membran fluid zu halten. Dies ist von äußerster Wichtigkeit für die Erhaltung der Funktionalität von Membranproteinen (MURATA und WADA, 1995). Eine Änderung der Zusammensetzung der Membran kann ebenfalls als Kälteschutz wirken (FUJITA, 1999). Zur Stabilisierung von Proteinen wird die Einlagerung oder

Synthese von Osmolyten (s. u.) induziert (WOUTERS et al., 2000; MENDUM und SMITH, 2002).

Bei Wassermangel oder bei Erhöhung der Ionenkonzentration im Medium (osmotischer Stress) beginnen Zellen aller Organismen ebenfalls mit der Akkumulation nicht-toxischer, organischer Komponenten (LE RUDULIER et al., 1984; BROWN, 1990; GALINSKI und TRÜPER, 1994). Die Einlagerung dieser sogenannten Osmolyte, auch osmotische Schutzsubstanzen oder kompatible Solute genannt (YANCEY et al., 1982) kann mit einer erhöhten Thermotoleranz von Bakterien einhergehen, so beobachtet bei *Escherichia coli* oder *Salmonella typhimurium* (JENKINS et al., 1988; FLETCHER et al. 2001). Nach der Definition von BROWN (1976) sind kompatible Solute Substanzen, die bei niedriger externer Wasseraktivität intrazellulär in hohen Konzentrationen akkumuliert werden, ohne dabei den Stoffwechsel zu beeinträchtigen. Sie stabilisieren Proteine und andere Makromoleküle bei Bedingungen hoher Ionenstärke *in vivo* und *in vitro* und erhalten so deren native Konformation (LIPPERT und GALINSKI, 1992; COURTENAY et al., 2000).

Die oben aufgeführten Schutzmechanismen haben eine Gemeinsamkeit: Makromoleküle werden durch die Veränderung ihrer direkten Umgebung angepasst und stabilisiert. Eine Thermostabilisierung beispielsweise kann auch von den Proteinen selbst ausgehen. Vergleichende strukturelle Untersuchungen zwischen mesophilen und thermophilen Enzymen haben gezeigt, dass diese von innen her, basierend auf deren Struktur, thermophilen Bedingungen angepasst werden. Eine vermehrte Anzahl an Wasserstoff- oder Schwefelbrücken, hydrophoben Interaktionen etc. führt zu einer kompakteren Struktur von thermophilen Proteinen (ZEIKUS, 1998). Die Stabilisierung von außen durch die Einlagerung kompatibler Solute allerdings ist genetisch wesentlich sparsamer und ermöglicht eine kurzfristige und sofortige Adaptation an neue Verhältnisse. Dies ist wohl auch ein Grund für die universelle Verbreitung und vielfach analoge Entwicklung dieses Mechanismus (YANCEY et al., 1982).

1.2 Natürliche Umgebungen von Proteinen

Die Umgebung von Proteinen *in vivo* wurde viele Jahrzehnte bei *in vitro* Untersuchungen von Enzymen vernachlässigt. Das Cytoplasma einer Zelle ist angefüllt mit Ionen, Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Makromolekülen, ihre Konzentration im Cytoplasma wurde auf 80-200 g/l geschätzt (SWAMINATHAN et al., 1997; LI et al., 2001). Durch dieses „macromolecular crowding“ unterscheiden sich die natürlichen Bedingungen vom wässrigen Milieu, Moleküle interagieren zwangsläufig unspezifisch miteinander durch sterische oder elektrostatische Abstoßung, Volumenausschluss, elektrostatische Anziehung oder hydrophobe Wechselwirkungen (MINTON, 2001). Dies setzt die Diffusionsgeschwindigkeiten, insbesondere von großen Molekülen herab, was wiederum Einfluss nimmt auf Reaktionsgleichgewichte und Reaktionsraten. Allerdings sind diese Einflüsse sehr komplex, da durch das „macromolecular crowding“ die thermodynamische Aktivität wiederum gesteigert wird (ZIMMERMANN und MINTON, 1993; ELLIS, 2001). Desweiteren ist eine solche Umgebung charakterisiert durch die Exposition großer Oberflächen, welche in Kontakt zum Lösungsmittel stehen (EGGERS und VALENTINE, 2001). Der Grad der Hydratation hat häufig entscheidenden Einfluss auf die Aktivität von Enzymen. Wassermoleküle unterstützen in Form von „strukturiertem“ Wasser die Stabilität und Spezifität von Makromolekülen (MAYER und HOPPERT, 1996; BROWN et al., 1999). An kristallisierten Protein-DNA-Komplexen beispielsweise wurden an der Protein-DNA-Grenzfläche Wassermoleküle in geordneter Form gefunden. Diese fungieren als verlängerte Wasserstoffbrücken und können so elektrostatische Abstoßungen elektronegativer Atome von Protein und DNA überwinden (REDDY et al., 2001). Auch bei Dissoziationsprozessen können Wassermoleküle eine aktive Rolle einnehmen. Bei der Untersuchung des Streptavidin-Biotin-Komplexes konnten HYRE et al. (2002) feststellen, dass ein bestimmtes Wassermolekül die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Biotin und Asp 128 (vermittelt die Bindung zum Biotin) interkaliert, so das frühe Stadium der Dissoziation einleitet und den daraus resultierenden

Zwischenzustand stabilisiert. Proteine und Makromoleküle im allgemeinen sind demnach *in vivo* einer völlig anderen Umgebung ausgesetzt als in dem meistens verwendeten wässrigen Milieu *in vitro*.

1.3 Künstliche Umgebungen von Proteinen

Das „crowding“ wurde durch die Zugabe von synthetischen Polysacchariden wie Ficoll 70 und Dextran 70 oder durch PEG 6000, PEG 35000, aber auch Proteinen (BSA) simuliert (ROHWER et al., 1998; VAN DEN BERG et al., 1999; LI et al., 2001). Lysozym wurde beispielsweise mit unterschiedlichen Agenzien versetzt und auf Rückfaltung und Aggregation getestet. Es konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen die Aggregation von Proteinmolekülen während der Rückfaltung stark zugenommen hatte, welche durch das Chaperon Protein Disulfid Isomerase wiederum reduziert werden konnte (VAN DEN BERG et al., 1999). LAVERY und KOWALCZYKOWSKI (1992) stellten fest, dass die Assoziation und Affinität von RecA zu ssDNA in Anwesenheit von „crowding“-Agenzien wesentlich verbessert werden konnte. Auch in anderen künstlichen Umgebungen wurden veränderte Verhaltensweisen von Proteinen beobachtet. HOPPERT et al. (1994) zeigten, dass in Umkehrmicellen die Aktivität von Hydrogenasen um ein Vielfaches gesteigert wurde. SOARES et al. (2001) immobilisierten die Lipase von *Candida rugosa* an einer Silika-Matrix, aktiviert durch Glutaraldehyd, und beeinflussten die Umgebung weiterhin durch die Zugabe von Proteinen (z. B. Albumin) oder organischen Molekülen (z. B. PEG 1500). Nach Hinzufügen von PEG 1500 konnte die Halbwertszeit für die Immobilisierung verfünffacht, das Enzym also erheblich stabilisiert werden. EGGERS und VALENTINE (2001) untersuchten die Stabilität und Konformation von Apomyoglobin eingeschlossen in einer Silika-Matrix. Nach Zugabe von neutralen Salzen, Osmolyten oder Alkoholen zeigte sich die Konformation des Proteins innerhalb der Silika-Matrix im Gegensatz zu vergleichbaren wässrigen Umgebungen äußerst leicht zu beeinflussen. Veränderungen der Wasserstruktur wurden auch hier als Grund vermutet.