

Institut für Organische Chemie und Biochemie

Lehrstuhl für Biotechnologie

**Der ATPase-Zyklus von Hsp90 und die
Struktur-Funktions-Beziehung seines Partnerproteins p23**

Martina Weikl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Dr. rer. nat. genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Th. Bach

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. J. Buchner

2. Univ.- Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 14.07.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26.09.2000 angenommen.

Inhaltsverzeichnis	I-IV
1. Einleitung	1
1.1. Proteinfaltung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>: Die Aufgabe von molekularen Chaperonen	1
1.2. Überblick über die Klassen der Hitzeschockproteine und ihre Funktionen	6
1.3. Chaperon-Mechanismen: Abhängigkeit von ATP	11
1.3.1. DnaJ-vermittelte Kopplung der ATPase-Aktivität an Substratbindung: ein Modell für den Chaperon-Zyklus von Hsp70 am Beispiel von DnaK	13
1.3.2. Die Chaperonine: ATP-gekoppelte Substratbindung und –faltung am Beispiel von GroEL	15
1.4. Charakterisierung der Hsp90-Familie	18
1.4.1. Struktur von Hsp90	19
1.4.2. Funktion von Hsp90	21
1.4.2.1. Hsp90 als spezialisiertes Chaperon für die Reifung von Substratproteinen	21
1.4.2.1.1. Der Early Protein Folding Complex	25
1.4.2.1.2. Der Steroidrezeptor-assoziierte Hsp90-enthaltende intermediäre Faltungskomplex	25
1.4.2.1.3. Der Steroidrezeptor-assoziierte Hsp90-enthaltende reife Faltungskomplex	26
1.4.2.1.4. Weitere Komponenten von Hsp90-enthaltenden Chaperon-Komplexen	27
1.4.2.2. Allgemeine Chaperon-Eigenschaften von Hsp90	28
1.4.3. Hsp90 und ATP	30
1.4.4. Hsp90 als Zielmolekül für Anti-Tumor-Medikamente	33
1.5. p23 – ein Hsp90-Partnerprotein im „Mature Folding Complex“	34
1.6. Problemstellung	37
2. Materialien und Methoden	39
2.1. Verwendete Materialien	39
2.1.1. Organismen	39
2.1.2. Plasmide	39
2.1.3. Proteine und Peptide	39
2.1.4. Chemikalien	40
2.1.5. Standards und Kits	42
2.1.6. Oligonukleotide	42

2.1.7. Sonstige Materialien	43
2.1.8. Medien und Puffer	44
2.1.9. Geräte	48
2.1.10. Computerprogramme	51
2.2. Mikrobiologische Methoden	51
2.2.1. Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	51
2.2.2. Kultivierung und Konservierung von Hefestämmen	51
2.3. Molekularbiologische Methoden	52
2.3.1. Agarosegelelektrophorese von DNA	52
2.3.2. Isolierung und Reinigung von DNA	52
2.3.2.1. Isolierung von Plasmid- DNA aus <i>E. coli</i> -Stämmen	52
2.3.2.2. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	52
2.3.3. Enzymatische Modifikation von DNA	52
2.3.3.1. Verdau mit Restriktionsendonukleasen	52
2.3.3.2. Behandlung mit alkalischer Phosphatase	53
2.3.3.3. Ligation	53
2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	53
2.3.5. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	54
2.3.6. Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten	54
2.4. Präparative Methoden	54
2.4.1. Reinigung von humanem p23 (hp23)	55
2.4.2. Reinigung von Δ p23	56
2.4.3. Reinigung von Hefe-p23 (yp23/Sba1)	56
2.4.4. Reinigung von humanem Hsp90 β	56
2.4.5. Reinigung von Hefe-Hsp90 (Hsp82)	57
2.5. Proteinchemische Methoden	59
2.5.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
2.5.2. Färbemethoden	59
2.5.2.1. Silberfärbung	59
2.5.2.2. Färbung nach Fairbanks	60
2.5.3. Immunoblotting	60
2.5.4. Proteinbestimmungsmethoden	61
2.5.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford	61
2.5.4.2. Proteinbestimmung durch UV-Absorption	61

2.6. Spektroskopische Methoden	62
2.6.1. Absorptionsspektroskopie	62
2.6.2. Circular dichroismus-(CD)-Messungen	62
2.6.3. Lichtstreuungsmessungen	64
2.7. Proteolytische Spaltung von Proteinen	64
2.8. Chemische Quervernetzung von Proteinen	64
2.9. Chaperon-Assays	65
2.9.1. Chaperon-Assays mit Citratsynthase (CS) als Substratprotein	65
2.9.1.1. Citratsynthase-Aktivitätstest	65
2.9.1.2. Citratsynthase-Aggregationstest	66
2.9.2. Malatdehydrogenase-Aggregationstest	67
2.9.3. α -Glucosidase-Aggregationstest	67
2.9.4. Insulin-Aggregationstest	68
2.10. ATPase-Aktivitätstests	68
2.10.1. Steady-State Hydrolyse-Messungen	69
2.10.2. Single-Turnover Messungen	69
3. Ergebnisse und Diskussion	70
3.1. Charakterisierung der ATPase-Aktivität von Hsp82	70
3.1.1. Festlegung geeigneter Messparameter für die ATPase-Aktivitätstests	70
3.1.1.1. Kaliumchloridabhängigkeit der Hsp82-ATPase-Aktivität	72
3.1.1.2. Allgemeine Salzabhängigkeit von Hsp82	73
3.1.1.3. K_M -Wert für die von Hsp82 katalysierte ATP-Hydrolyse	74
3.1.1.4. Temperaturabhängigkeit der ATPase-Aktivität von Hsp82	76
3.1.2. Analyse der Teilreaktionen des ATPase-Zyklus von Hsp82	79
3.1.2.1. Einfluss von Produktinhibition durch ADP auf den Reaktionszyklus von Hsp82	79
3.1.2.2. Bestimmung kinetischer Parameter für die ATP-Bindung an Hsp82	82
3.1.2.3. Identifizierung einer der ATP-Bindung nachgeschalteten Umlagerungsreaktion	88
3.1.2.4. Diskussion des von Hsp82 katalysierten ATP-Hydrolyse-Zyklus	89
3.1.3. ATPase-Aktivität von N-terminalen Hsp82-Fragmenten	91
3.1.3.1. Steady-State ATPase-Aktivität von N210	91
3.1.3.2. Determinierung des gebundenen Nukleotids in verschiedenen Hsp82-Fragmenten	93
3.1.3.3. Diskussion der ATPase-Aktivität N-terminaler Hsp82-Fragmente	95

Inhaltsverzeichnis	IV
<hr/>	
3.2. Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von p23	97
3.2.1. Chaperon-Eigenschaften von p23	97
3.2.1.1. Vergleich von hp23 und Sba1 in Citratsynthase-Chaperon-Assays	97
3.2.1.2. Einfluss von hp23 auf die thermisch induzierte Aggregation weiterer Substratproteine	99
3.2.1.3. Einfluss von hp23 auf die chemisch induzierte Aggregation von Insulin	101
3.2.1.4. Diskussion der Chaperon-Aktivität von p23	102
3.2.2. Wechselwirkung zwischen Hsp90 und p23	103
3.2.2.1. Chemische Quervernetzung von Hsp90 und p23	103
3.2.2.2. Diskussion der chemischen Quervernetzung von Hsp90 und p23	107
3.2.3. Struktur-Funktionsbeziehung von humanem p23	107
3.2.3.1. Strukturelle Charakterisierung von hp23	107
3.2.3.2. Klonierung und strukturelle Charakterisierung von Δ p23	109
3.2.3.3. Wechselwirkung von Δ p23 mit Hsp90	112
3.2.3.4. Chaperon-Eigenschaften von Δ p23	113
3.2.3.5. Diskussion der Struktur-Funktions-Beziehung von humanem p23	115
4. Zusammenfassung	118
5. Literaturverzeichnis	120
6. Abkürzungen	135
7. Publikationsliste	138

1. Einleitung

1.1. Proteinfaltung *in vitro* und *in vivo* –

Die Aufgabe von molekularen Chaperonen

Proteine sind essentielle Bausteine aller prokaryontischen und eukaryontischen Organismen und spielen in nahezu allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Ihre Funktionen reichen von enzymatischer Katalyse, Signaltransduktion, Transport und Speicherung über koordinierte Bewegung und Immunabwehr bis hin zu mechanischen Stützfunktionen. Dabei wird die biologische Aktivität eines Proteins durch seinen nativen Zustand festgelegt, der meistens einer einzigartigen dreidimensionalen Struktur entspricht (vgl. Dill *et al.*, 1995). Dahingegen muss der nicht-native oder entfaltete Zustand eines Proteins als Vielzahl unterschiedlicher, nicht genau definierter Konformationen beschrieben werden (Shortle, 1996).

Es ist allgemein anerkannt, dass die Information, die für die Ausbildung der nativen, dreidimensionalen Struktur aus dem ungefalteten Zustand benötigt wird, durch die Aminosäuresequenz eines Proteins codiert wird (Anfinsen, 1973). So konnte Anfinsen in seinen klassischen Experimenten zeigen, dass die Rückfaltung von denaturierten Proteinen ein spontaner Prozess ist (Anfinsen, 1973). Die treibende Kraft für diese Reaktion ist ein kleiner, jedoch signifikanter Unterschied der freien Enthalpie zwischen nativem und denaturiertem Zustand (Tanford, 1968, 1970; Kim & Baldwin, 1982; Jaenicke, 1987; Tsou, 1988). Das derzeitige Verständnis der komplexen Mechanismen und sequentiellen Reaktionsabfolgen, die bei der Proteinfaltung zum tragen kommen, beruht zum größten Teil auf *in-vitro*-Rückfaltungsstudien. Obwohl diese nicht genau die Bedingungen in der Zelle widerspiegeln, liefern sie doch ein ausreichend gutes Modell für die Faltung *in vivo*. Durch die Entwicklung geeigneter Techniken zur Auflösung schneller Prozesse in der Proteinfaltung (Stopped-Flow-Methoden, dynamisches NMR etc.) konnte in den letzten Jahren bedeutender Fortschritt bei der Entschlüsselung der „zweiten Hälfte des genetischen Codes“ gemacht werden (Clarke & Waltho, 1997; Clarke *et al.*, 1997; Dill *et al.*, 1995; Dill & Chan, 1997; Fersht, 1997; Fink, 1995; Privalov, 1996; Roder & Colon, 1997, Baldwin & Rose, 1999a,b; Brockwell *et al.*, 2000). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ist Proteinfaltung ein bemerkenswert schneller Prozess, was darauf hindeutet, dass der Faltungsweg vorgegeben ist (Levinthal, 1968). Bei

zahlreichen *in-vitro*-Faltungsexperimenten konnte dabei die Existenz von Faltungsintermediaten nachgewiesen werden (Clarke & Waltho, 1997). Obwohl diese Intermediate in einigen Fällen sogenannte „off-pathway“-Spezies zu sein scheinen (Silow & Olivenberg, 1997), sind die meisten tatsächlich Intermediate auf einem produktiven Faltungsweg. Dies kann durch das gegenwärtige Modell der Proteinfaltung als Energietrichter mit kinetisch und thermodynamisch stabilisierten Zwischenzuständen anschaulich beschrieben werden (Dill et al., 1995; Fersht, 1997) (Abbildung 1.1).

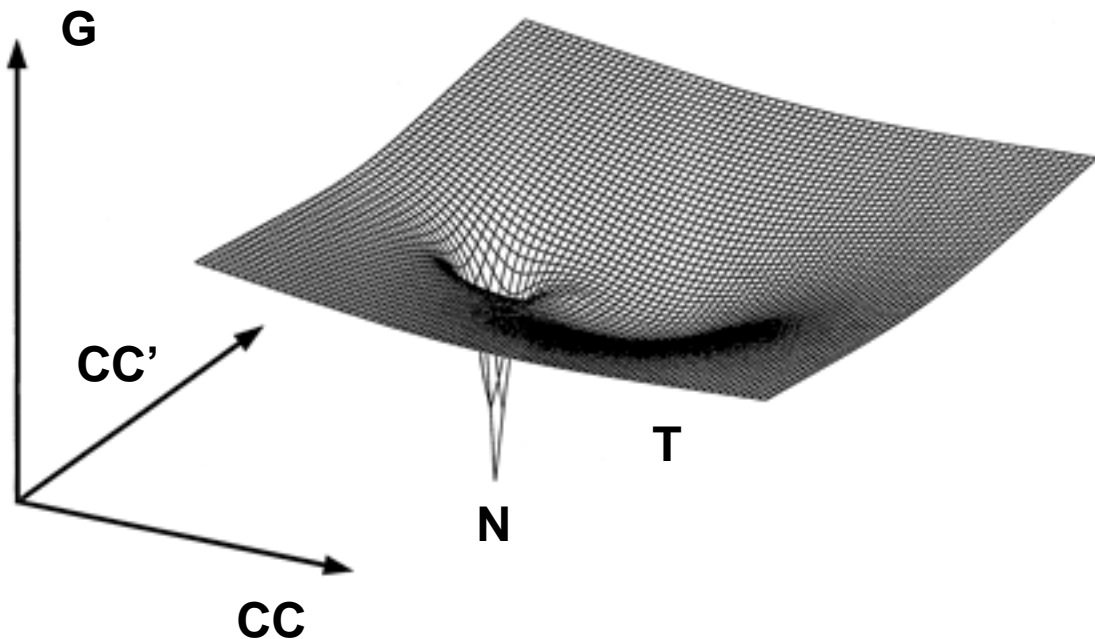


Abbildung 1.1: *Energie-Landschaft*

Schematische Darstellung der freien Enthalpie (G) für den Faltungsprozess eines Proteins als Funktion der Proteinkonfigurationskoordinaten CC und CC'. Ein Folding-Funnel, der den nativen Zustand (N) beschreibt, und ein lokales Energieminimum, das einen Intermediatzustand (T) repräsentiert, sind Teile der Energielandschaft (nach Goldbeck *et al.*, 1999).

Unter bestimmten Bedingungen können kleine Proteine (weniger als 100 Aminosäuren) den nativen Zustand ohne nachweisbare Intermediate innerhalb von zehntel Millisekunden erreichen (Privalov, 1996; Sosnick *et al.*, 1994), wobei erste Seitenkettenkontakte schon im Nanosekundenbereich auftraten (Bieri *et al.*, 1999). Entweder falten diese Proteine tatsächlich nach dem Zwei-Zustands-Modell oder die auftretenden Intermediate besitzen eine so kurze Lebensdauer, dass sie durch gängige Methoden nicht detektiert werden können (Dill & Chan, 1997). Die durchschnittliche Kettenlänge eines Proteins in *E. coli* beträgt 317 Aminosäuren, die in *S. cerevisiae* 496 Aminosäuren (Ellis & Hartl, 2000). Bei Proteinen dieser Größe kann oftmals die Existenz von Intermediaten während des Faltungsprozesses nachgewiesen werden. Obwohl ein Großteil an Sekundärstruktur bereits innerhalb weniger Millisekunden ausgebildet

ist, wird daher für die vollständige Faltung zum nativen Zustand wesentlich mehr Zeit benötigt (Sekunden).

Partiell gefaltete Intermediate, wie sie auch während der Neusynthese von Proteinen in der Zelle auftreten, besitzen eine hohe Tendenz zu unspezifischen Aggregationsreaktionen. Diese Aggregation beruht höchstwahrscheinlich auf intermolekularen Wechselwirkungen von hydrophoben Oberflächen, die vor Erreichen der nativen Struktur auf strukturellen Untereinheiten exponiert sind (Fink, 1998; Wetzel, 1996). Die Tendenz zur Aggregation ist bei Faltungsintermediaten deswegen stärker ausgeprägt als beim komplett ungefalteten Zustand, weil im letzteren die hydrophoben Reste statistisch als kleine Cluster über die Polypeptidkette verteilt sind, während sie in den Faltungsintermediaten bereits zu großen hydrophoben Oberflächen zusammengefunden haben (Fink, 1998). Daher müssen im *in-vitro*-Rückfaltungsexperiment physikalisch-chemische Parameter wie Proteinkonzentration, Temperatur und Ionenstärke optimiert werden, um eine maximale Rekonstitutionsausbeute zu gewährleisten (Jaenicke & Rudolph, 1989; Jaenicke, 1997). Wenn der Faltungsprozess unter den physiologischen Bedingungen abläuft, wie sie in der Zelle vorliegen, stellt Aggregation ein signifikantes Problem dar. Erhöhte zelluläre Temperaturen und die hohen Makromolekülkonzentrationen in der Zelle (300 g/l im Fall von *E. coli*, Zimmermann & Trach, 1991) schaffen Faltungsbedingungen, die Aggregation als Konkurrenzreaktion zum korrekten Faltungsablauf favorisieren (Kiefhaber *et al.*, 1991).

Die Faltung neu translatierter Polypeptide wird zusätzlich dadurch beeinflusst, dass sie kotranslational im Kontext des vektoriellen Proteinsyntheseprozesses ablaufen muss (Bergman & Kuehl, 1979; Braakman *et al.*, 1991). Die Kooperativität der Wechselwirkungen, die gefaltete Strukturen stabilisieren, erfordert das Vorhandensein einer kompletten Faltungsdomäne (50 – 200 Aminosäuren) als Voraussetzung für produktive Faltung (Feldman & Frydman, 2000). Darüber hinaus läuft der Translationsprozeß in einem Zeitrahmen von Sekunden (bei Bakterien) bis Minuten (bei Eukaryonten) ab. Dies übersteigt deutlich die Dauer des hydrophoben Kollapses, der am Anfang des Faltungsprozesses steht (Chan *et al.*, 1997). Ähnliche Probleme treten beim vektoriellen Import von Proteinen in separate Zellkompartimente wie Mitochondrien, Chloroplasten und Endoplasmatisches Retikulum (ER) auf, während dessen die Proteine in entfalteter Konformation vorliegen (Herrman & Neupert, 2000; Schatz & Dobberstein, 1996; Baker *et al.*, 1996). Daher müssen Proteine während der Translation oder des Imports vor unkorrekter Faltung und Aggregation

geschützt werden, bis ein für produktive Faltung ausreichender Teil des Proteins synthetisiert bzw. transportiert worden ist.

Die genannten Probleme werden in prokaryontischen wie eukaryontischen Zellen durch die Existenz einer Gruppe von spezialisierten Faltungshelferproteinen, den molekularen Chaperonen gelöst. Molekulare Chaperone haben die Funktion, partiell ungefaltete Proteine von nativen Proteinen zu diskriminieren und diese zu stabilisieren (Ellis, 1990). Sie binden primär an reaktive Oberflächen von Polypeptiden (wie die exponierten hydrophoben Reste der Faltungsintermediate) und machen damit diese Zonen unzugänglich für andere reaktive Oberflächen. Chaperone sind in dem Sinn Katalysatoren, dass sie transient mit ihren Substratproteinen interagieren, jedoch nicht Bestandteil des gefalteten Endprodukts sind (Ellis, 1987; Fink, 1999). Sie sind jedoch nicht in der Lage, die Geschwindigkeit der Faltungsreaktion zu erhöhen. Vielmehr beeinflussen sie die kinetisch kontrollierte Konkurrenz zwischen Proteinfaltung und deren Nebenreaktionen zugunsten des produktiven Faltungsprozesses (Jaenicke & Buchner, 1993).

Neben der Stabilisierung partiell entfalteter Polypeptidketten während Proteinbiosynthese, Import oder Komplexassemblierung kommt den Chaperonen noch eine wichtige Aufgabe beim Schutz der Zelle unter Stressbedingungen zu. Stressbedingungen, wie zum Beispiel eine unphysiologische Erhöhung der Wachstumstemperatur führt bei allen Organismen zu schädlichen Auswirkungen auf zelluläre Strukturen und metabolische Prozesse (Nover, 1991; Laszlo, 1992; Parsell & Lindquist, 1994). Diese Störung des zellulären Gleichgewichts destabilisiert vorhandene Proteinstrukturen, die sonst unter idealen Bedingungen in thermodynamischem Gleichgewicht vorliegen (Morimoto, 1998). So kommt es unter Stressbedingungen oft zu Entfaltung und Aggregation von Proteinen. Um die Proteinhomöostase aufrechtzuerhalten, reagiert die Zelle daher mit der verstärkten Synthese von molekularen Chaperonen (die aus diesem Grund auch Hitzeschockproteine genannt werden) und Proteasen. Die Hitzeschockantwort kann bei allen darauf untersuchten Organismen beobachtet werden und scheint universell zu sein (Lindquist & Craig, 1988). In *E. coli* zählen bei 46°C mehr als 20% aller zellulären Polypeptide zur Klasse der Hitzeschockproteine (Herendeen et al, 1979). Die Synthese von Hitzeschockproteinen wird nicht nur infolge abrupter Temperaturerhöhung induziert, sondern auch als Reaktion auf andere Stressfaktoren wie z.B. Alkohol, Schwermetallionen oder Sauerstoffmangel (Lindquist & Craig, 1988). Deshalb werden diese Proteine allgemeiner auch als Stressproteine bezeichnet.

Das primäre Signal, das zur Auslösung der Hitzeschockantwort führt, ist die intrazelluläre Akkumulation von nicht-nativ gefalteten Polypeptiden (Morimoto *et al.*, 1994). Als Folge dieses Signals werden in höheren Organismen sogenannte Hitzeschockfaktoren (HSF) aktiviert (Vollmeyer, 1994; Wu, 1995). HSFs sind unter physiologischen Bedingungen intramolekular negativ regulierte Transkriptionsfaktoren, die nach Aktivierung Homotrimerie mit DNA-Bindeaktivität ausbilden. Die Bindung dieser Homotrimerie an Hitzeschockpromotorelemente (HSE) führt letztendlich zur verstärkten Transkription der Hitzeschockgene (Fernandes *et al.*, 1994). Die Expression von Chaperonen, die im ER lokalisiert sind, wird über eine gesonderte Signaltransduktionskaskade reguliert (Unfolded Protein Response). Hier wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors Hac1p durch reguliertes Spleissen der Hac1p codierenden mRNA kontrolliert. Das Spleissen erfolgt dabei nicht über „Spliceosome“ sondern über spezialisierte Enzyme, von denen eines (Ire1p) als Signalüberträger vom ER-Lumen, wo die Stressantwort durch Akkumulation ungefalteter Proteine ausgelöst wird, ins Cytosol fungiert (Chapman *et al.*, 1998). In Prokaryonten wird die Hitzeschockantwort durch die verstärkte Synthese einer auf Hitzeschockpromotorelemente spezialisierten Untereinheit der RNA-Polymerase (σ^{32} -Faktor in *E. coli*) reguliert (Yura *et al.*, 1996).

Neben den molekularen Chaperonen existieren zwei Klassen von Enzymen, die durch Katalyse langsamer Faltungsschritte zum effektiven Faltungsprozess von Proteinen beitragen (Schiene & Fischer, 2000). Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPI) katalysieren die intrinsisch langsame *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen, auf die ein Prolinrest folgt (Schmid, 1997; Dolinski & Heitman, 1997). Proteindisulfidisomerasen (PDI) aus dem ER (im prokaryontischen Periplasma: DsbA-, DsbB- und DsbC-System) sind verantwortlich für Thiol/Disulfidaustauschreaktionen an Cysteinresten, die zur Ausbildung korrekter Disulfidbrücken führen (Freedman, 1989; Bardwell, 1994, 1997). Beide Isomerisierungsreaktionen stellen oft geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Proteinfaltung dar und führen dadurch zur Population von aggregationssensitiven Intermediaten (Schiene & Fischer, 2000). Durch kinetische Kontrolle dieser langsamen Faltungsschritte verhindern PPIs und PDIs die kritische Akkumulation von Intermediaten und komplementieren somit die Wirkung von molekularen Chaperonen.

Nicht alle Hitzeschockproteine sind als Faltungshelferproteine an der Hitzeschockantwort beteiligt. Auch verschiedene Proteasen und Ubiquitin, die zentrale Komponente des nicht-lysosomalen Proteinabbaus (Parag *et al.*, 1987) werden unter Stressbedingungen verstärkt

exprimiert. Dies hat zur Folge, dass Proteine, die nicht mehr auf einen produktiven Faltungsweg zurückgeführt werden können, effektiv degradiert werden können. Somit existiert im Rahmen der Hitzeschockantwort ein aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel von molekularen Chaperonen und Proteasen, um die Proteinqualitätskontrolle in der Zelle zu gewährleisten (Gottesman *et al.*, 1997; Wickner *et al.*, 1999).

Das Interesse an molekularen Chaperonen wächst, seitdem eine wachsende Anzahl von Krankheiten mit unkorrekt gefalteten Proteinen korreliert werden kann (Carrel & Lomas, 1997). Solche Proteinfaltungskrankheiten werden oft von der Aggregation zelleigener Proteine begleitet, wie dies bei den Prionen der Fall ist. Das Auftreten solcher amyloidalen Plaques führt im Fall der Alzheimer-Krankheit (Wetzel, 1997) oder des Kreuzfeld-Jakob-Syndroms (Prusiner, 1997) zur Zerstörung von Nervenzellen. Häufig werden Chaperone in Assoziation mit dem aggregierten Proteinmaterial bei Faltungskrankheiten gefunden. So wurde auch eine Änderung des Expressionslevels von molekularen Chaperonen in Prionerkrankten Zellen nachgewiesen (Tazelt *et al.*, 1995). Eine Veränderung der Expressionsrate konnte für kleine Hitzeschockproteine auch mit dem Auftreten unterschiedlicher Krebsarten korreliert werden (Thor *et al.*, 1991; Tetu *et al.*, 1992).

1.2. Überblick über die Klassen der Hitzeschockproteine und ihre Funktionen

Hitzeschockproteine können in unterschiedliche Proteinfamilien unterteilt werden. Angehörige dieser Familien werden sowohl in einer Vielzahl prokaryontischer und eukaryontischer Organismen als auch in unterschiedlichen eukaryontischen Zellkompartimenten angetroffen (siehe Tabelle 1.1). Die Klassifizierung in die unterschiedlichen Hitzeschockproteinfamilien erfolgte anhand von Sequenzhomologien und vergleichbaren Molekulargewichten. Als die wichtigsten Klassen werden meist die Hsp40-, Hsp60-, Hsp70-, Hsp90- und Hsp100-Familien, sowie die Familie der kleinen Hitzeschockproteine genannt (Fink, 1999). Unter diesen sind wiederum die Hsp60- und die Hsp70-Familie die am besten charakterisierten Klassen von molekularen Chaperonen (Bukau & Horwich, 1998).

Die Hsp70-Proteine sind molekulare Chaperone mit einer schwachen ATPase-Aktivität (siehe Abschnitt 1.3.1.). Sie besitzen zwei funktionelle Domänen, eine N-terminale, hoch konservierte ATPase-Domäne und die C-terminale Peptidbindedomäne, die kooperativ zusammenarbeiten (Buchberger *et al.*, 1995; Buchberger *et al.*, 1994). Die Hsp70-Familie

umfasst viele Mitglieder und die meisten Organismen besitzen zahlreiche Vertreter in unterschiedlichen Zellkompartimenten. Für Mitglieder der Hsp70-Familie (DnaK in *E. coli*) konnte gezeigt werden, dass sie an naszierende Polypeptidketten am Ribosom binden (Egers *et al.*, 1997; Frydman *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1992; Beckmann *et al.*, 1990; Beck & DeMaio, 1994; Hansen *et al.*, 1994), wodurch vorzeitige Faltung, fehlerhafte Faltung und Aggregation verhindert werden. Es konnte jedoch bisher noch nicht geklärt werden, ob naszierende Ketten generell oder nur teilweise Substrate für die Hsp70-Klasse darstellen (Frydman *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994; Lorimer, 1996). Eine ähnliche Funktion erfüllen die Hsp70s, die während des Translokationsprozesses neu synthetisierter Proteine vom Cytosol in Mitochondrien oder ins ER an die translozierenden Polypeptidketten binden (Johnson, 1997; Haucke & Schatz, 1997). Das Bindemotiv der Hsp70-Familie scheint ein kurzer, hydrophober Abschnitt im Substratprotein zu sein, mit einer besonderen Präferenz für die Aminosäure Leucin an zentraler Position (Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Gragerov & Gottesman, 1994). Zusätzlich zu ihrer Beteiligung an der Proteinfaltung besitzen die Hsp70-Proteine noch einige spezialisierte Aufgaben in der Zelle wie z. B. das Entpacken von „Clathrin-Coated Vesicles“ (Chappell *et al.*, 1986).

Die Aktivität der Hsp70-Proteine wird zumindest zum Teil durch Vertreter der Hsp40-Familie (in *E. coli* DnaJ) reguliert, die somit als Hsp70-Co-Chaperone bezeichnet werden können (Cyr & Douglas, 1994; Cyr *et al.*, 1994). Diese Regulation wird durch eine Beeinflussung der ATPase-Aktivität von Hsp70-Molekülen erreicht und wird genauer in Kapitel 1.3.1. diskutiert. Darüber hinaus gibt es Befunde, die darauf hinweisen, dass DnaJ und andere Mitglieder der Familie selbst als Chaperone angesehen werden können, da sie zum Teil ungefaltete Proteine erkennen und binden können (Laufen *et al.*, 1998). Ein gemeinsames strukturelles Merkmal der Hsp40-Familie ist die sogenannte J-Domäne, die unter anderem für die Interaktion mit Hsp70 verantwortlich ist (Karzai & McMacken, 1996).

Mitglieder der Hsp60-Familie sind große oligomere Proteine mit Ringstruktur, die auch als Chaperonine bekannt sind (Ellis, 1990; Horwich & Willison, 1993). Sie bestehen aus zwei übereinandergestapelten Ringen, die aus je sieben bis neun Untereinheiten aufgebaut sind (Bukau & Horwich, 1998; Hartl, 1996). Chaperonine der Gruppe I, wie GroEL aus *E. coli* oder die Hsp60s aus Mitochondrien und Chloroplasten werden wie Hsp70 in ihrem ATPase-Zyklus durch Co-Chaperone, in diesem Fall Proteine aus der Hsp10-Familie (GroES bei *E. coli*) reguliert. Die ringförmigen Co-Chaperone verschließen dabei den zentralen Hohlraum im Inneren der Hsp60-Proteinkomplexe, wodurch ein abgeschirmtes Mikrokompartiment für

die Faltung nicht-nativer Proteine („Anfinsen Cage“) bereitgestellt wird (Bukau & Horwich, 1998; Hartl, 1996). Im Gegensatz dazu konnten derartige Co-Chaperone für die entfernt verwandte Gruppe II der Chaperonine aus Archaeen und Eukaryonten nicht identifiziert werden. Das Chaperonin des eukaryontischen Cytosols, TCP-1 (CCT oder TriC) bildet auch eine Ringstruktur mit zentralem Hohlraum aus, die im Unterschied zum tetradecameren GroEL jedoch als Heterooligomer aus acht unterschiedlichen Untereinheiten pro Ring aufgebaut ist (Kubota *et al.*, 1995; Gutsche *et al.*, 1999). Im endoplasmatischen Reticulum konnten keine Vertreter dieser Familie identifiziert werden. Im Gegensatz zu den Hsp70-Molekülen, die ein klar definiertes, lineares Bindemotiv aufweisen, interagieren Chaperonine auch mit nichtlinearen hydrophoben Determinanten, wie sie von kompakten Faltungsintermediaten exponiert werden, und können so ein breites Proteinspektrum von entfalten bis nativ-ähnlichen Konformationen binden (Frydman *et al.*, 1994; Rommelaere *et al.*, 1999; Hayer-Hartl *et al.*, 1994; Lilie & Buchner, 1995; Buchner, 1996). Dadurch können sie effektiv nicht-native Proteine während der *de-novo*-Synthese oder unter Stressbedingungen vor Aggregation schützen. Zudem wurde postuliert, dass GroEL darüber hinaus die Fähigkeit besitzt, missgefaltete Strukturen zu entfalten und korrekt rückzufalten (Shtilerman *et al.*, 1999).

Hsp90-Proteine sind *in vivo* meist mit verschiedenen Substratproteinen assoziiert, deren Aktivität sie modulieren (Buchner, 1999). Da das Hsp90-Protein das Hauptthema der vorliegenden Arbeit darstellt, erfolgt eine detaillierte Beschreibung dieser Molekülklasse in Kapitel 1.4. der Einleitung.

Die kleinen Hitzeschockproteine sind 12- bis 43-kDa-Proteine, die zu grossen multimeren Strukturen assemblieren (Ehrnsperger *et al.*, 1998). Sie enthalten eine konservierte C-terminale Domäne, die α -Kristallin-Domäne, benannt nach dem prominentesten Vertreter der Familie, dem α -Kristallin aus der Augenlinse. Da in der Augenlinse kein Proteinturnover stattfindet, ist es die Aufgabe dieses Hitzeschockproteins, an denaturierte Proteine zu binden und deren Aggregation zu verhindern, um Katarakten vorzubeugen (Horwitz, 1992). Darüber hinaus ist die Rolle der kleinen Hitzeschockproteine bei der Proteinfaltung noch weitgehend ungeklärt, allerdings wurde postuliert, dass ihre Hauptaufgabe darin besteht, unter Stressbedingungen denaturierte Proteine zu binden, um deren Aggregation zu verhindern. Somit stellen sie ein Proteinreservoir zur Verfügung, das nach Verschwinden der Stresssituation von der Hsp70-Maschinerie zur produktiven Rückfaltung genutzt werden kann (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Buchner, 1996). Die kleinen Hitzeschockproteine besitzen eine hohe Affinität für partiell

gefaltete Intermediatzustände und sind nur in ihrer oligomeren Form aktiv. Es wird angenommen, dass Substrate dabei mit einer bemerkenswerten Stöchiometrie von einem Substrat pro Untereinheit an die Aussenseite der hocholigomeren Komplexe binden (Lee et al., 1997, Haslbeck *et al.*, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Hsp26, ein kleines Hitzeschockprotein aus *S. cerevisiae*, einem aussergewöhnlichen Regulationsmechanismus unterliegt. Hsp26 ist in seiner oligomeren Form inaktiv und erst nach temperaturinduzierter Dissoziation in kleinere Einheiten in der Lage, Substrate zu binden (Haslbeck *et al.*, 1999).

Ein gemeinsames Merkmal der hitzeinduzierbaren Mitglieder der Hsp100-(oder Clp) Familie ist, dass sie Organismen dabei helfen, extreme Stressbedingungen zu überleben (Glover *et al.*, 1998). Dabei ist der grundlegende Mechanismus, nach dem diese Chaperone arbeiten, noch nicht entschlüsselt. Es wurde spekuliert, dass Hsp104 (aus *S. cerevisiae*) in Zusammenarbeit mit Hsp70- und Hsp40-Homologen die Ausbeute an renaturiertem Protein nach Stressbedingungen verbessert (Glover *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu den meisten anderen Chaperonen konnte für Hsp104 gezeigt werden, dass es die Fähigkeit besitzt, durch Hitzestress entstandene Proteinaggregate sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu resolubilisieren (Parsell *et al.*, 1994). Bemerkenswerterweise beeinflusst der intrazelluläre Hsp104-Spiegel auch die Aggregation von prionenähnlichen Proteinen in *S. cerevisiae* (Debburman *et al.*, 1997).

Während die Charakterisierung der einzelnen Hitzeschockproteinfamilien zunehmend fortschreitet, steht die Untersuchung des funktionellen Zusammenspiels der verschiedenen Chaperone erst am Anfang. Es wird allgemein angenommen, dass in Eukaryonten und Prokaryonten bei einigen Substratmolekülen eine konsekutive Interaktion der naszierenden Kette mit Hsp70- und Hsp60-Molekülen in Analogie zur Translokation über die Mitochondrienmembran besteht (Langer *et al.*, 1992; Frydman *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994; Lorimer, 1996; Martin & Hartl, 1997; Welch *et al.*, 1997; Bukau *et al.*, 2000). Ein sequentielles Zusammenspiel der Hsp70- und Hsp90-Familie wird bei der Bindung von antigenen Tumorpeptiden postuliert. Diese Peptide werden von den Hitzeschockproteinen zu MHC-Klasse-I-Molekülen transportiert, wo sie zur Auslösung der Immunantwort präsentiert werden (Srivastava *et al.*, 1994; Blachere *et al.*, 1997). Die Kooperation der Hsp70-Familie mit kleinen Hitzeschockproteinen unter Stressbedingungen (s. o.) ist ein weiteres Beispiel in diesem Kontext.

Neben den großen Hitzeschockproteinfamilien existieren noch einige spezialisierte Chaperone, die besondere Aufgaben bei der Faltung oder Assemblierung von Proteinen

übernehmen. So sind die ER-Chaperone Calnexin und Calreticulin maßgeblich an der Reifung von Glycoproteinen und der Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Reticulum beteiligt (Hebert *et al.*, 1995). Auch im ER lokalisiert ist Hsp47, das als Chaperon an der Regulation von Prokollagenfaltung und -assemblierung mitwirkt (Nagata *et al.*, 1998). In *E. coli* wird der Export von Proteinen ins Periplasma durch SecB (Hardy & Randall, 1993) vermittelt. Dort wird die Assemblierung der Bakterienpili über das Periplasma-Chaperon PapD reguliert (Kuehn *et al.*, 1993).

Molekülklasse	Unterklasse	Zelluläre Lokalisation
Hsp100		Cytoplasma, Chloroplasten, Mitochondrien, Prokaryonten
Hsp90		Cytoplasma, Chloroplasten, Mitochondrien, ER, Zellkern, Prokaryonten
Hsp70		Cytoplasma, ER, Mitochondrien, Zellkern, Plastiden, Prokaryonten
Hsp40		Cytoplasma, ER, Mitochondrien, Zellkern, Prokaryonten
Hsp60	Cpn60/GroEL	Mitochondrien, Plastiden, Prokaryonten
	CCT	Cytoplasma
Hsp10	Cpn10/GroES	Mitochondrien, Bakteriophagen, Prokaryonten
sHsp		Cytoplasma, Augenlinsen, Chloroplasten, ER, Mitochondrien, Zellkern, Prokaryonten
PDI		Cytoplasma, Chloroplasten, ER, Periplasma, Prokaryonten
PPI	Cyclophilin	Cytoplasma, ER, Mitochondrien, Periplasma, Prokaryonten
	FKBP	Cytoplasma, ER, Periplasma, Prokaryonten
	Parvulin	Cytoplasma, Periplasma, Prokaryonten
spezifische Chaperone	PapD	Periplasma
	Hsp47	ER
andere	Calnexin/Calreticulin	ER
	SecB	Prokaryonten

Tabelle 1.1: *Übersicht über die wichtigsten Faltungshelferproteine und ihre jeweilige Lokalisierung in der Zelle (nach Gething, 1997)*

1.3. Chaperon-Mechanismen: Abhängigkeit von ATP

Alle molekularen Chaperone haben die kennzeichnende Eigenschaft, dass sie an nicht-native Proteine binden, um unproduktive Nebenreaktionen der Faltung zu unterdrücken (s. o.). Jedoch unterscheiden sich die einzelnen Hitzeschockproteinfamilien grundlegend in der Art und Weise, wie sie mit ihrem Substrat wechselwirken (Beissinger & Buchner, 1998). Während Mitglieder der Hsp70-Familie einen kurzen Proteinabschnitt in komplett entfalteter Konformation binden (Zhu *et al.*, 1996), besitzt GroEL zwei identische hydrophobe Bindestellen im Inneren des zentralen Hohlraums (Braig *et al.*, 1994) für Proteine von komplett ungefalteter bis hin zu fast-nativer Struktur (s. o.). In Hsp90 existieren zwei funktionell unterschiedliche Substratbindestellen (Scheibel *et al.*, 1998) (s. u.). Kleine Hitzeschockproteine scheinen eine Bindestelle pro Untereinheit auf der Oberfläche des oligomeren Komplexes zu präsentieren, was sie auf molarer Ebene zu den effizientesten Chaperonen macht (Jaenicke & Creighton, 1993). Darüberhinaus unterscheiden sich die Chaperone in ihren Bindungs- und Freisetzungsgleichgewichten zum nicht-nativen Substrat. Das Spektrum der Wechselwirkungen reicht von stabil-langlebig bis hin zu dynamisch-transienten Komplexen (Beissinger & Buchner, 1998). Eine der stabilsten Wechselwirkungen mit dem Substratprotein gehen kleine Hitzeschockproteine ein, so dass Komplexe aus beiden Komponenten noch Tage nach der Ausbildung detektiert werden können (Ehrnsperger *et al.*, 1998). Die Modulation der Bindeeigenschaften eines Chaperons durch den entsprechenden Satz an Co-Chaperonen erhöht zusätzlich die Diversität der Interaktionen.

Eine klare Trennung in zwei Chaperonklassen kann aufgrund des Kriteriums der ATP-Abhängigkeit von Substratbindezyklen getroffen werden. So werden die Affinitäten der Substratbindestellen von Hsp60- und Hsp70-Familien durch ATP-Bindung und -Hydrolyse im Molekül beeinflusst (Bukau & Horwich, 1998). Es konnte zwar für sowohl das DnaK- als auch das GroE-System gezeigt werden, dass Bindung und Freisetzung von Substrat auch in der Abwesenheit von ATP erfolgen (Schmid *et al.*, 1994; Sparrer *et al.*, 1996), jedoch scheint die Freisetzungsreaktion in Anwesenheit von ATP stark favorisiert zu sein. Dies wird im Fall von GroE durch einen negativen Effekt auf die „on-rate“ der Substratbindereaktion bewirkt (Sparrer *et al.*, 1996), während ATP im DnaK-System einen steigernden Einfluss auf die „off-rate“ ausübt (Schmid *et al.*, 1994; Theysen *et al.*, 1996). In beiden Fällen induziert die Bindung von ATP einen Zyklus von konformationellen Umlagerungen, welche signifikanten Einfluss auf die Interaktion mit dem nicht-nativen Substratprotein haben. Durch

anschließende ATP-Hydrolyse wird die hochaffine Konformation des Chaperons wieder hergestellt. Somit fungiert die ATP-Hydrolyse-Reaktion als Zeitgeber für die Interaktion zwischen Chaperon und nicht-nativem Protein (Beissinger & Buchner, 1998). Dies erklärt die komplexe Regulation der ATP-Hydrolyse-Reaktion durch verschiedene Faktoren. So stimulieren Substratbindung und Co-Chaperone des Systems die intrinsisch niedrige ATPase-Aktivität des DnaK-Moleküls. Dahingegen wird die höhere ATPase des GroEL-Moleküls durch GroES vermindert (Bukau & Horwich, 1998). Diese Regulation führt in beiden Fällen zu Substratzykluslängen von etwa 20 Sekunden bei 25°C, was ein ideales Verhältnis zwischen Energieverbrauch und spontanen zellulären Faltungsraten darzustellen scheint (Beissinger & Buchner, 1998).

Die ATP-Abhängigkeit der Hsp90-Familie war lange Zeit ein kontrovers diskutiertes Thema. Der endgültige Beweis der ATP-Bindung wurde erst durch die Kristallstruktur einer N-terminalen Hsp90-Domäne im Komplex mit ATP erbracht (Prodromou *et al.*, 1997b). Die Existenz einer N-terminalen, ATP-abhängigen Substratstelle war jedoch durch eine zweite, C-terminale und ATP-unabhängige Substratbindestelle lange maskiert worden (Scheibel *et al.*, 1998). Die ATP-Abhängigkeit von Hsp90 wird genauer in Kapitel 1.4.3. diskutiert.

Zu den Chaperonen, deren Funktionsweise ATP-unabhängig ist, gehören kleine Hitzeschockproteine (Jakob *et al.*, 1993), DnaJ (Langer *et al.*, 1992), SecB (Randall & Hardy, 1995), Calnexin (Helenius, 1994) und Hsp47 (Saga *et al.*, 1987; El-Thaher *et al.*, 1996). Die ATP-unabhängigen Chaperone werden im Gegensatz zu den ATP-abhängigen Chaperonen als passive Teilnehmer am Faltungsgeschehen angesehen, da Substrate von ihnen in der gleichen Konformation entlassen werden, in der sie zuvor gebunden wurden (Beissinger & Buchner, 1998). Vor allem für die kleinen Hitzeschockproteine wurde postuliert, dass sie hauptsächlich einen Puffer-Effekt für aggregationsanfällige Intermediate ausüben, bis diese unter permissiven Bedingungen an ATP-abhängige Chaperonsysteme wie Hsp70 weitergegeben werden (Ehrnsperger *et al.*, 1997). Eine ähnliche Funktion wurde bis zur Entdeckung der ATP-Abhängigkeit auch für Hsp90 vermutet (Freeman & Morimoto, 1996).

Die Charakterisierung des ATPase-Zyklus von Hsp90 ist eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit. Zum Vergleich werden deshalb im folgenden die an Substratbindung gekoppelten ATP-Hydrolyse-Zyklen von je einem Vertreter der Hsp60- und Hsp70-Klasse im Überblick geschildert, die bereits detailliert untersucht worden sind (Bukau & Horwich, 1998).

1.3.1. DnaJ-vermittelte Kopplung der ATPase-Aktivität an Substratbindung - ein Modell für den Chaperon-Zyklus von Hsp70 am Beispiel von DnaK

In den Hsp70-abhängigen Faltungsreaktionen sind die Substrate wiederholten Bindungs- und Freisetzungszyklen unterworfen (Szabo *et al.*, 1994; Buchberger *et al.*, 1996), bei denen normalerweise eine Stöchiometrie von einem Hsp70-Monomer pro Substratmolekül vorliegt. Durch die Bindung eines ATP-Moleküls an die N-terminale Domäne von Hsp70 wird eine konformationelle Umlagerung in der C-terminalen Peptidbindedomäne induziert, infolge derer die Affinität von Hsp70 für Substrat signifikant verändert wird. So erhöht ATP-Bindung die Dissoziationskonstante des Hsp70-Substratkomplexes um ein 5- bis 85-faches. Dieser Faktor resultiert aus der Erhöhung der „off-rate“ um zwei bis drei Größenordnungen mit gleichzeitiger Erhöhung der „on-rate“ um ein Fünzigfaches (Palleros *et al.*, 1993; Schmid *et al.*, 1994; McCarty *et al.*, 1995; Theyssen *et al.*, 1996). Somit besteht der ATPase-Zyklus von Hsp70 vereinfacht dargestellt aus zwei alternierenden Zuständen: dem ATP-gebundenen Zustand mit niedriger Affinität und schnellen Austauschraten für Substrate (offene Substratbindetasche) und dem ADP-gebundenen Zustand mit hoher Affinität und langsamen Austauschraten für Substrate (geschlossene Substratbindetasche). Aufgrund der kinetischen Parameter dieser zwei Zustände kann die schnelle Assoziation von Hsp70 mit Substrat nur im ATP-Zustand erfolgen, da Substratbindung an den ADP-Zustand nach den Zeitmassstäben effizienter Faltungsreaktionen zu langsam ist (Bukau & Horwich, 1998).

Die Hydrolyse des gebundenen ATP, die zur Konvertierung vom „low-affinity state“ zum „high-affinity state“ des Moleküls führt, ist im isolierten Hsp70 der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des ATPase-Zyklus (Gao *et al.*, 1993; McCarty *et al.*, 1995; Karzai & McMacken, 1996; Theyssen *et al.*, 1996). Sogar in der Anwesenheit von Substraten, die typischerweise die ATP-Hydrolyserate um ein zwei- bis zehnfaches steigern, ist die Steady-State Turnover-Rate der Hsp70-ATPase (im unstimulierten Zustand zwischen $0,02$ und $0,2 \text{ min}^{-1}$) zu langsam, um eine effiziente Chaperon-Aktivität zu gewährleisten (Flynn *et al.*, 1989; Gao *et al.*, 1994; Ha & McKay, 1994; Jordan & McMacken, 1995; McCarty *et al.*, 1995; Theyssen *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wird die ATPase-Aktivität und damit auch die Chaperon-Funktion von Hsp70 sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten durch Mitglieder der DnaJ-Familie (Hsp40 s. o.) reguliert bzw. stimuliert (Liberek *et al.*, 1991; McCarty *et al.*, 1995).

In bakteriellem DnaK und mitochondrialen Hsp70-Vertretern wird auch die Freisetzung von ADP und Phosphat vom Molekül reguliert, in diesem Fall durch Mitglieder der GrpE-Familie (Liberek *et al.*, 1991; Dekker & Pfanner, 1997; Miao *et al.*, 1997). Durch die Assoziation von GrpE mit dem DnaK-ADP-Komplex wird die Affinität von DnaK für ADP 200-fach reduziert, wodurch der Nukleotidaustausch um das 5000-fache gesteigert wird (Packschies *et al.*, 1997). Interessanterweise konnten GrpE-Homologe in Eukaryonten weder im Cytosol noch in Zellkompartimenten identifiziert werden. Dahingegen existieren im eukaryontischen Cytosol andere Regulatoren des Hsp70-ATPase-Zyklus, wie Hip, das den ADP-gebundenen Zustand des Hsp70-Moleküls stabilisiert oder Hop und BAG-1, die als Nukleotidaustauschfaktoren diskutiert werden (Frydman & Höfeld, 1997; Höfeld & Jentsch, 1997).

Die Kopplung des regulierten ATPase-Zyklus von Hsp70 an produktive Substratbindung durch DnaJ-Proteine ist die Grundlage des Hsp70-Chaperon-Zyklus, da durch die Kopplung eine sinnlose ATP-Hydrolyse in Abwesenheit von Substrat vermieden wird. Durch Kombination der oben diskutierten Daten erhält man folgendes Modell für den Substratbinde/ATP-Hydrolyse-Zyklus von DnaK (nach Bukau & Horwich, 1998) (Abbildung 1.2a):

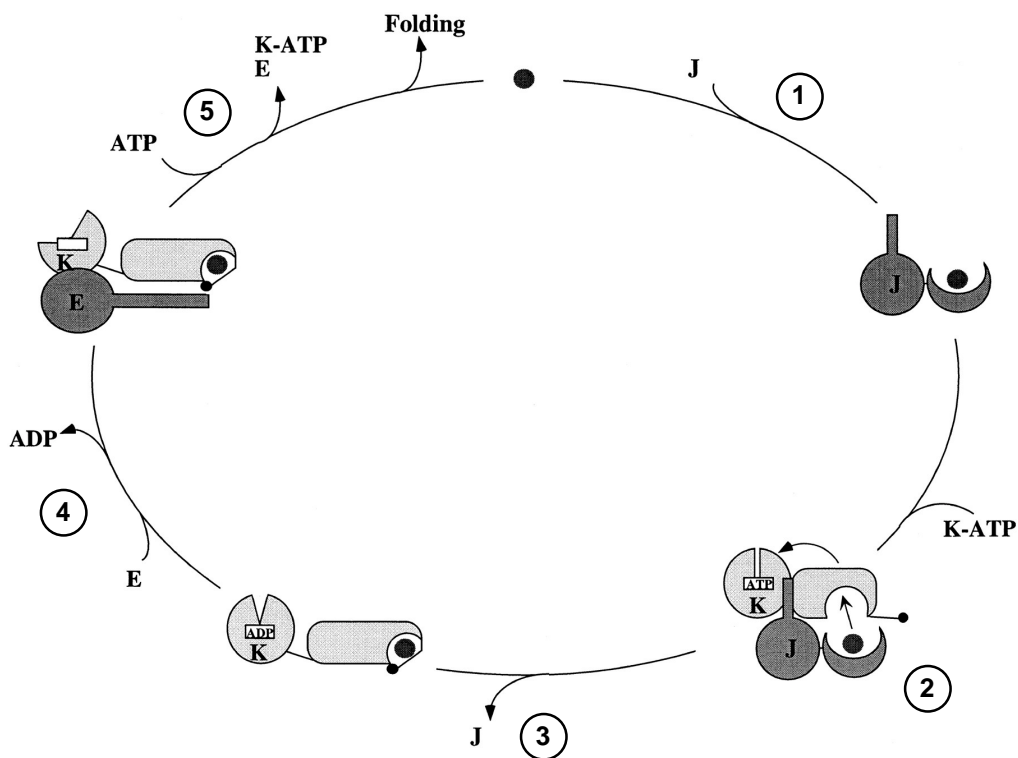


Abbildung 1.2a: Substratbindungs- und ATPase-Zyklus von DnaK

- (1) Der Zyklus beginnt mit der schnellen und transienten Assoziation von DnaJ mit Substrat
- (2) Der DnaK-ATP-Komplex übernimmt das Polypeptid vom DnaJ-Substrat-Komplex in einem Prozess, der in zwei Schritten abläuft: transiente Interaktion von DnaK-ATP mit der J-Domäne des DnaJ-Moleküls und Transfer des Substratproteins von DnaJ zur offenen Substratbindetasche von DnaK-ATP. Beide Teilschritte sind erforderlich zur Stimulation der ATP-Hydrolyse, welche zur Stabilisierung des DnaK-Substrat Komplexes führt.
- (3) Nach Substrattransfer auf DnaK und Konversion von DnaK in den ADP-gebundenen Zustand sinkt die Affinität des DnaK-Substrat Komplexes für DnaJ, welches vom Komplex abdissoziiert.
- (4) GrpE bindet an den DnaK-Substrat-Komplex und löst die Freisetzung von ADP aus
- (5) ATP bindet schnell an DnaK, was zur Freisetzung des gebundenen Substrats und zur Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands von DnaK führt.

1.3.2. Die Chaperonine: ATP-gekoppelte Substratbindung und –faltung am Beispiel von GroEL

Mitglieder der Chaperoninfamilie mit dem typischen Aufbau aus zwei back-to-back Ringsystemen (bestehend aus mehreren Untereinheiten s. o.) assistieren einer grossen Zahl neu synthetisierter oder translozierter Proteine, ihre native Konformation zu erlangen, indem sie die Substratproteine binden und ihre Faltung im zentralen Kanal des Ringsystems erleichtern (Ellis, 1996; Fenton & Horwich, 1997). Dieser zentrale Hohlraum jedes Ringes, der das aktive Zentrum der Faltungsmaschinerie darstellt, liegt in zwei verschiedenen funktionellen Zuständen vor.

Im bindungsaktiven Zustand ist der Kanal am Ende des Zylinders für den Eintritt von nicht-nativen Substratproteinen geöffnet (Langer *et al.*, 1992b; Braig *et al.*, 1993) und exponiert seine hydrophobe innere Oberfläche, an die nicht-native Spezies über deren hydrophobe Oberflächen (die im nativen Zustand im Inneren des Proteins verborgen sind) binden (Braig *et al.*, 1994; Fenton *et al.*, 1994). In manchen Fällen kann diese Bindung mit partieller Entfaltung des Proteins verbunden sein, um missgefaltete Zustände aus einer kinetischen Falle auf einen produktiven Faltungsweg zurückzuführen (Ranson *et al.*, 1995; Zahn *et al.*, 1996).

Der faltungsaktive Zustand wird induziert durch die Bindung von ATP, wobei im Falle der bakteriellen oder in Organellen lokalisierten Chaperonine die gleichzeitige Bindung eines Co-Chaperonins aus der Hsp10-Familie, das ebenfalls als Ringstruktur aus Untereinheiten organisiert ist, erfolgt (Hunt *et al.*, 1996; Mande *et al.*, 1996). Im GroEL-Molekül ist der Übergang vom bindungsaktiven zum faltungsaktiven Zustand nach Bindung des Co-Chaperonins GroES mit signifikanten konformationellen Umlagerungen verbunden. Das Volumen des zentralen Hohlraums im gebundenen Ring verdoppelt sich und wird durch GroES verschlossen. Die innere hydrophobe Oberfläche verschiebt sich weg vom gebundenen Polypeptid, das in den Hohlraum entlassen wird und die Hohlraumoberfläche nimmt statt dessen einen hydrophilen Charakter an. Diese hydrophile Umgebung favorisiert im faltenden Substratprotein die Minimierung der hydrophoben Oberfläche und fördert damit den nativen Zustand (Xu *et al.*, 1997).

Die Bindung von GroES und die Bindung und Hydrolyse von ATP beeinflussen den Affinitätszustand des GroEL-Moleküls im Bezug auf weitere Liganden. Dabei muss unterschieden werden, ob die Liganden in *cis*-Stellung (d. h. am Ringsystem, an dem auch Substrat gebunden ist) oder in *trans*-Stellung (d. h. am gegenüberliegenden Ringsystem) gebunden werden. So fördert Nukleotidbindung die gleichzeitige Assoziation von GroES und stabilisiert damit den faltungsaktiven Zustand im selben Ringsystem. In ähnlicher Weise stabilisiert GroES-Bindung die nukleotidgebundene Konformation (Xu *et al.*, 1997), was dazu führt, dass in dieser Weise gebundenes ATP zur Hydrolyse vorbestimmt („committed“) ist. Gleichzeitig wird die intrinsische ATPase-Aktivität des GroEL-Moleküls durch GroES partiell inhibiert. Die Bindung von ATP an einen Ring des Systems verläuft hochkooperativ im Hinblick auf die sieben Untereinheiten, die je ein ATP-Molekül binden können (Gray & Fersht, 1991; Bochkareva *et al.*, 1992), während sie eine anti-kooperative Wirkung auf die ATP-Bindung im gegenüberliegenden Ring ausüben (Bochkareva & Girshovich, 1994; Yifrach & Horovitz, 1995). Denselben anti-kooperativen Effekt hat die Bindung des GroES-Moleküls im Bezug auf GroES-Bindung an den zweiten Ring. Die Freisetzung von Substrat und GroES erfolgt interessanterweise durch Bindung von ATP in *trans*-Position zu den entlassenen Liganden (Todd *et al.*, 1994; Hayer-Hartl *et al.*, 1995).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hauptsächlich die Bindung von Nukleotid und nicht dessen Hydrolyse für die Prozessierung des Substratproteins in der GroEL-Maschinerie verantwortlich ist (Bukau & Horwich, 1998). Durch *cis*-gebundenes ATP/GroES wird die Dissoziation des Substrates in den Hohlraum induziert, der die produktive Faltung ermöglicht,

dagegen führt *trans*-gebundenes ATP zur Freisetzung von GroES und Substratprotein. Hydrolyse-Reaktionen haben andererseits die Aufgabe, das System in den nächsten Zustand zu befördern. So wird durch *cis*-Hydrolyse die hoch-affine Interaktion zwischen GroES und GroEL abgeschwächt, wodurch der *cis*-Ring auf die Freisetzung von Substrat und GroES vorbereitet wird. Die Regulation der ATPase-Rate durch GroES stellt somit eine angemessenen Zeitspanne für den Verbleib des Substratproteins im „Anfinsen Cage“ sicher.

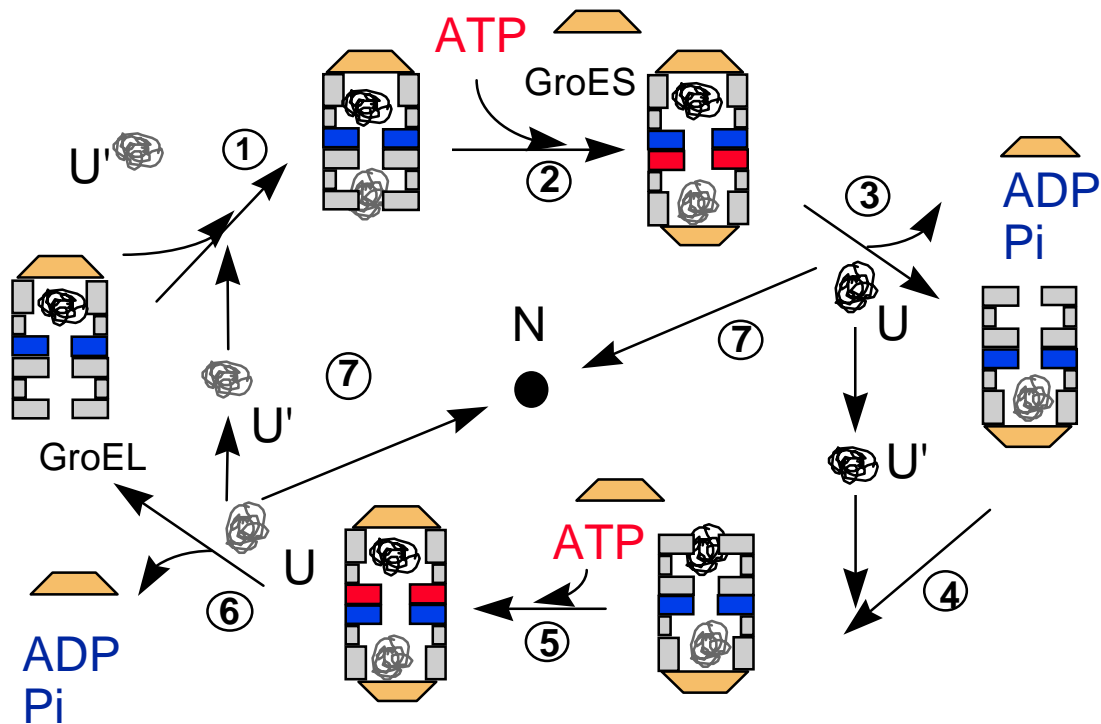


Abbildung 1.2b:

Modell für den Reaktionszyklus von GroE

Ein *cis*-Partikel mit gebundenem GroES, ADP (blau) und nicht-nativem Protein auf einer Seite ist der Akzeptorzustand für die Bindung eines zweiten nicht-nativen Proteins (U') an der hochaffinen *trans*-Seite (grau) (1). Assoziation von ATP (rot) und einem zweiten GroES-Molekül führt zur Ausbildung eines Football-förmigen Partikels, der zwei Faltungsintermediate einschließt (2). ATP-Hydrolyse im unteren Ring führt zur Freisetzung von GroES, Nukleotid und Substrat vom gegenüberliegenden Ringsystem und stellt die hoch-affine Bindungsstelle für Substrate wieder her (3). Das freigesetzte Substrat hat die Möglichkeit, zum nativen Zustand (N) zu falten (7) oder erneut an die hoch-affine Substratbindestelle des GroE-Systems zu binden (4). Schritte (4) bis (6) sind äquivalent zu Schritten (1) bis (3).

Basierend auf den genannten Daten können mehrere schlüssige Modelle für den ATPase/Substratbindezyklus von GroEL postuliert werden. Das im folgenden vorgestellte Modell (nach Beissinger & Buchner, 1998) geht davon aus, dass die *trans*-Seite des asymmetrischen Komplexes die bevorzugte Akzeptorstelle für Substratproteine ist (Sparrer & Buchner, 1997). Nach dem „Two-Stroke“-Modell verläuft ATP-Hydrolyse dann immer nur im Kontext des *cis*-Komplexes und alterniert konsekutiv zwischen beiden Ringen (Lorimer, 1997) (Abbildung 1.2b).

Der Zyklus startet mit einem ADP-gebundenen GroE-Komplex, der in *cis*-Stellung GroES und Substrat gebunden hat. In diesem Zustand kann ein nicht-natives Substratprotein an die hochaffine Bindungsstelle im *trans*-Ring binden (1). Im nächsten Schritt kommt es zur Assoziation von ATP und GroES, wodurch der *trans*-Ring in den faltungsaktiven Zustand überführt wird (2). Als Folge dieser Assoziation werden GroES, ADP und Substrat vom *cis*-Ring freigesetzt, mit dem Protein entweder in nativer oder nicht-nativer Konformation (3). In Schritten (3) bis (6) wiederholt sich der beschriebene Vorgang, wobei die beiden Ringe nun ihre Rollen vertauscht haben. Wenn das Protein nach der Freisetzung vom GroE-System (7) seine native Konformation noch nicht erreicht hat, wird es abermals als Substrat erkannt und tritt erneut in den Zyklus ein („iterative annealing“) (Todd *et al.*, 1996).

1.4. Charakterisierung der Hsp90-Familie

Auch in Abwesenheit von Stressbedingungen ist Hsp90 eines der am stärksten vertretenen Proteine im eukaryontischen Cytosol und stellt ca. 1-2 % des gesamten löslichen Proteins einer Zelle dar (Welch & Feramisco, 1982). Von Bakterien bis zum Mensch sind die Angehörigen der Hsp90-Familie mit mindestens 50 % Identität auf Aminosäureebene unter den eukaryontischen Vertretern stark konserviert (Lindquist & Craig, 1988). Während Deletion von HtpG, dem Hsp90-Homologen aus *E. coli*, keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum zeigt (Bardwell & Craig, 1988), ist Hsp90 in *S. cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* essentiell (Parsell & Lindquist, 1993; Cutforth & Rubin, 1994).

Im eukaryontischen Cytosol liegen öfters zwei Hsp90-Isoformen vor, die durch Genduplikation entstanden zu sein scheinen (Gupta & Golding, 1996) (menschliches Cytosol: Hsp90 α und Hsp90 β ; Hefecytosol: Hsc82 und Hsp82). Obwohl diese Isoformen austauschbare Funktionen haben (Borkovich *et al.*, 1989), werden die entsprechenden Gene unterschiedlich reguliert. In den meisten eukaryontischen Zellen wird einer der beiden cytosolischen Vertreter unter physiologischen Bedingungen stark konstitutiv exprimiert und bei Hitzeschock nur um den Faktor 2 bis 3 hochreguliert (in Hefe Hsc82). Das zweite Hsp90-Gen wird auf niedrigem Basalniveau exprimiert, seine Expression steigt unter restriktiven Wachstumsbedingungen jedoch um ein Vielfaches an (in Hefe: Hsp82) (Borkovich *et al.*, 1989; Krone & Sass, 1994). Darüber hinaus existiert in höheren Eukaryonten eine zusätzliche mitochondriale Spezies namens Hsp75 oder TRAP-1, die große strukturelle Ähnlichkeit zu den prokaryontischen Hsp90-Proteinen aufweist (Felts *et al.*, 2000). TRAP-1 wurde ursprünglich als Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Protein und als Retinoblastoma-

bindendes Protein identifiziert (Song *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996a). Weiterhin ist Hsp90 in Eukaryonten auch in Chloroplasten und im Endoplasmatischen Reticulum (als glucose regulated protein 94/grp94) lokalisiert (Little *et al.*, 1994; Wearsch & Nicchitta, 1996).

1.4.1. Struktur von Hsp90

Anhand von Sequenzvergleichen und limitierter Proteolyse konnte gezeigt werden, dass Hsp90 eine Domänenstruktur aufweist, in der zwei stark konservierte Regionen durch einen „Linker“ variabler Länge mit hoher Ladungsdichte verbunden sind (Abbildung 1.3a) (Buchner, 1999). Diese geladene Region ist in prokaryontischen Mitgliedern der Hsp90-Familie (wie HtpG in *E. coli*) und auch im TRAP-1-Molekül nicht vorhanden (Lindquist & Craig, 1998; Song *et al.*, 1995).

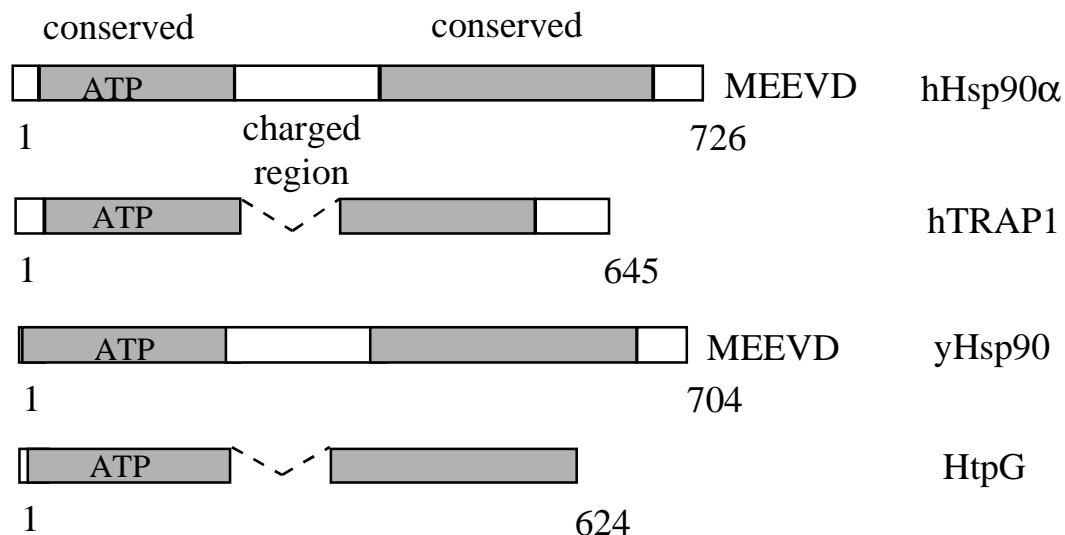


Abbildung 1.3a: Domänenstruktur von Hsp90
Hochkonservierte Regionen in verschiedenen Hsp90-Spezies sind in grau angezeigt. Die Länge der geladenen Region ist variabel. In prokaryontischen und einigen eukaryontischen Hsp90-Vertretern fehlt diese Region fast vollständig.

Das native Hsp90-Molekül liegt als langgestrecktes Dimer vor, und obwohl Homodimere die Regel zu sein scheinen (Minami *et al.*, 1991, 1994), wurden auch Heterodimere aus Hsp90α und Hsp90β beobachtet (Perdew *et al.*, 1993). Die Dimerisierungsstelle liegt in der C-terminalen Region des Proteins (Palmer *et al.*, 1995). Aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Antikörperbindungsstudien wird angenommen, dass die N-terminalen Domänen des Hsp90-Moleküls in entgegengesetzte Richtungen orientiert sind, während sich die C-terminalen Teile in der Mitte treffen und den Kontakt herstellen (Abbildung 1.3b) (Maruya *et al.*, 1999). Das Dimer scheint jedoch sehr flexibel zu sein, da verschiedene Konformationen des Moleküls beobachtet werden konnten. Darüber

hinaus löst Hitzestress eine weitere spezifische strukturelle Konformationsänderung des Hsp90-Moleküls aus, welche die beiden N-terminalen Domänen des Proteins in enge Nachbarschaft rückt (Maruya *et al.*, 1999).

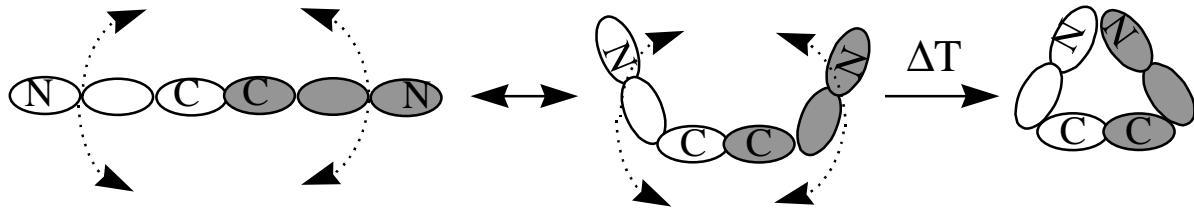


Abbildung 1.3b:

Flexibilität des Hsp90-Dimers

Ausbildung des Dimers erfolgt durch antiparallele Assoziation der C-terminalen Regionen. Die relative Orientierung der Domänen zueinander macht es dem Hsp90-Dimer möglich, verschiedene Konformationen anzunehmen. Temperaturanstieg führt zur Ausbildung einer geschlossenen Konformation.

Die dreidimensionale Struktur der N-terminalen Fragmente von menschlichem Hsp90 und Hsp90 aus *S. cerevisiae* konnte durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (Stebbins *et al.*, 1997; Prodromou *et al.*, 1997a; Prodromou *et al.*, 1997b) (Abbildung 1.4).



Abbildung 1.4: Struktur der N-terminalen Hsp90-Domäne (Aminosäuren 1-219) aus *S. cerevisiae* mit gebundenem Nukleotid

Demnach besteht die N-terminale Domäne aus einem achtsträngigen antiparallelen β -Faltblatt und neun α -Helices. Das N-terminale Fragment aus Hefe wurde im Komplex mit Nukleotid kristallisiert, was den eindeutigen Beweis für die lange Zeit kontrovers diskutierte Frage der Nukleotid-Bindung von Hsp90 lieferte (Prodromou *et al.*, 1997b) (siehe Kapitel 1.4.3.). Die ATP-Bindestelle ist in einer 15Å tiefen Tasche lokalisiert, deren Boden vom β -Faltblatt gebildet wird und der Ligand ist von Helices und Loops umgeben (Prodromou *et al.*, 1997b) (s. u.).

1.4.2. Funktion von Hsp90

Obwohl Hsp90 in eukaryontischen Organismen sehr stark exprimiert wird, sind diese hohen zellulären Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen für das Zellwachstum nicht notwendig. Sogar eine Reduktion auf 1/20 der normalen Menge wird in *S. cerevisiae* toleriert (Picard, *et al.*, 1990; Xu & Lindquist, 1993). Da hohe Hsp90-Konzentrationen jedoch für Zellwachstum bei erhöhten Temperaturen unentbehrlich sind, wurde postuliert, dass Hsp90 unter normalen Bedingungen eine Pufferfunktion ausübt, um die Zelle gegen die verheerenden Folgen einer plötzlich auftretenden Stresssituation und die damit verbundene Akkumulation nicht-nativer Proteine zu schützen (Buchner, 1999). Dies scheint jedoch nur für eukaryontische Organismen zu gelten, da sogar unter Stressbedingungen das Hsp90-Homologe in *E. coli* (HtpG) entbehrlich ist (Bardwell & Craig, 1988). Auch ist HtpG, im Gegensatz zu Hsp90 aus eukaryontischen Organismen, nicht in der Lage ist, einen Hsp90-defizienten Hefestamm am Leben zu erhalten (Palmer *et al.*, 1995). Da bakteriellem Hsp90 sowohl die geladene Mittelregion als auch ein hochkonserviertes Motiv am C-terminus fehlt, wurden diesen Bereichen zunächst wichtige funktionelle Eigenschaften zugesprochen. Die Deletion dieser Regionen zeigte jedoch in Hefen keine Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen oder die Aktivität des Proteins (Louvion *et al.*, 1996). Es scheinen daher noch weitere strukturelle Unterschiede zwischen pro- und eukaryontischem Hsp90 zu bestehen, die Auswirkungen auf die Funktionalität des Moleküls haben.

1.4.2.1. Hsp90 als spezialisiertes Chaperon für die Reifung von Substratproteinen

Hsp90 wird *in vivo* im Komplex mit einigen wenigen Substratproteinen gefunden (vgl. Buchner, 1999; Neckers *et al.*, 1999; Mayer & Bukau, 1999; Pearl & Prodromou, 2000). An den Komplexen sind neben Substratprotein und Hsp90 noch weitere Chaperone und Co-Chaperone beteiligt (s. u.). Durch die Interaktion im Multi-Chaperon-Komplex kann so die Reifung, der intrazelluläre Transport und die Aktivität der gebundenen Substratmoleküle konformationell reguliert werden (Mayer & Bukau, 1999).

Einen Großteil der ständig anwachsenden Liste von identifizierten Substraten stellen Proteine dar, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind (Tabelle 1.2 nach Buchner, 1999). Unter diesen sind die Steroidhormonrezeptoren (SHR) die am besten untersuchten *in-vivo*-Substrate von Hsp90 (Pratt & Toft, 1997). Im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptoren sind SHRs lösliche intrazelluläre Proteine, die als induzierbare Transkriptionsfaktoren

fungieren. Im hormonfreien, inaktiven Zustand liegen die SHRs im Komplex mit Hsp90 (und anderen Chaperonen und Co-Chaperonen s. u.) als sogenannte Aporezeptorkomplexe vor. Durch die Bindung des Hormonliganden kommt es nach Dissoziation des Komplexes zur Dimerisierung des Rezeptors, der daraufhin in der Lage ist, an spezifische DNA-Sequenzen zu binden, um die Transkriptionsaktivität benachbarter Promotoren zu regulieren (Yamamoto *et al.*, 1988; Louvion *et al.*, 1996). Die Wechselwirkung zwischen Hsp90 und Rezeptorprotein erfolgt über die hormonbindende Domäne des Rezeptors (Picard, 1994). Fusioniert man diese Domäne mit Reporterproteinen, wird auch deren Aktivierung hormon- und Hsp90-abhängig (Picard, 1994). Daher scheint es die Funktion von Hsp90 zu sein, den Rezeptor in der Abwesenheit von Hormon in einem inaktiven, jedoch durch Hormon aktivierbaren Zustand zu halten (Xu & Lindquist, 1993; Bohen & Yamamoto, 1994). Die Klärung der dreidimensionalen Struktur der hormonbindenden Domäne einiger SHRs führte zu der Hypothese vom Hormonligand als Teil des hydrophoben Rezeptorkerns (Renaud *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1995). In Abwesenheit des Liganden fehlt ein entscheidender Teil dieses hydrophoben Kerns und hinterlässt eine große Höhlung. Man nimmt daher an, dass das Hormon die Stabilität des Rezeptors erhöht, möglicherweise konformationelle Änderungen bewirkt und die Dimerisierung des Rezeptors induziert. Hsp90 könnte in diesem Zusammenhang die Hormonbindetasche vor einem hydrophoben Kollaps bewahren, um eine potentielle Hormonbindung zu gewährleisten (Buchner, 1999).

Zu den *in-vivo*-Substraten von Hsp90 zählen auch zahlreiche Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen (siehe Tabelle 1.2). Eines der ersten identifizierten Beispiele war virale pp60^{src}-Kinase (v-Src), deren Aktivität zu unkontrollierter, onkogener Proliferation der Wirtszelle führt. Im aktiven Zustand ist v-Src durch Myristoylierung in der Plasmamembran der Zelle verankert. Jedoch nur die lösliche, inaktive Form von v-Src bildet einen stabilen Komplex mit Hsp90 (und zusätzlich assoziierten Proteinen), was die Vermutung nahe legt, dass Hsp90 in einem bestimmten Stadium am Reifungsprozess der Kinase beteiligt ist (Brugge, 1986). Die Interaktion von Hsp90 mit v-Src folgt demnach einem ähnlichen Schema wie im Fall der SHRs: Hsp90 bindet an die inaktive Konformation des Proteins, bevor der letzte Prozessierungsschritt (Ligandbindung bei den SHRs und Membranverankerung bei v-Src) stattfindet.

Die Zahl der Proteine, deren Funktion und Stabilität *in vivo* durch Hsp90 moduliert wird, ist in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen. Während die meisten dieser Proteine Transkriptionsfaktoren oder Kinasen sind, gibt es auch einige Substrate, die nicht diesen

beiden Klassen angehören. So wurde Interaktion mit Hsp90 auch für die mutierte Form des Tumor-Suppressorproteins p53 (Blagosklonny *et al.*, 1996), die reverse Transkriptase des Hepatitis-B-Virus (Hu & Seeger, 1996; Hu *et al.*, 1997) und Telomerase (Holt *et al.*, 1999) nachgewiesen. Interessanterweise werden in HBV Hsp90 und assoziierte Partnerproteine sogar mit ins Viruscapsid verpackt (Hu *et al.*, 1997). Da die unterschiedlichen Klassen von Hsp90-Substraten keine offensichtlichen strukturellen Gemeinsamkeiten haben, müssen andere Kriterien – wie zum Beispiel der konformationelle Zustand der Proteine und deren Faltungscharakteristika – ausschlaggebend für die Interaktion mit Hsp90 sein (Jakob & Buchner, 1994; Buchner, 1996; Buchner, 1999).

Steroidhormonrezeptoren	Kinasen	Andere Substrate
Progesteronrezeptor	v-Src	Hitzeschockfaktor
Glucocorticoidrezeptor	Wee1	p53
Östrogenrezeptor	eIF-2 α -Kinase	Reverse Transkriptase
Androgenrezeptor	Casein-Kinase 2	Tumornekrosefaktor
Mineralcorticoidrezeptor	Raf-1	DHFRa
	Ste11	Telomerase
	Gcn2	
	Calcineurin	

Tabelle 1.2: *Hsp90-Substrate in vivo (nach Buchner, 1999)*

Die Schlüsselrolle, die Hsp90 bei der Faltung, Aktivierung und Assemblierung von Komponenten zahlreicher Zellzyklusregulationsmechanismen und Signaltransduktionswege spielt, hat tiefgreifende Auswirkungen auf die Evolution dieser Systeme. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Hsp90 eine Pufferfunktion ausübt, indem es Proteinen, die Mutationen enthalten, dabei assistiert, Struktur und Funktion des entsprechenden Wildtyps aufrechtzuerhalten (Rutherford & Lindquist, 1998). Wenn die Funktion von Hsp90 in diesem Kontext gestört wird, manifestieren sich die bis dahin versteckten Phänotypen der mutierten Substratproteine, so dass ein neuer variabler Pool für natürliche Selektion zugänglich wird. Selbst bei wiederhergestellter Hsp90-Funktion bleiben diese Phänotypen stabil. Man kann davon ausgehen, dass es sich hierbei um einen effizienten Evolutionsmechanismus handelt, der zum einen unter physiologischen Bedingungen anscheinende genetische Stabilität gewährleistet, während er zum anderen die Akkumulation von Mutationen erlaubt. Diese

Mutationen können sich unter Stressbedingungen, unter denen Hsp90 zur Aufrechterhaltung der Zellebensfähigkeit rekrutiert wird, plötzlich phänotypisch manifestieren.

An der Modulation der Aktivitäten obengenannter Substratproteine sind neben Hsp90 noch andere Chaperone und Co-Chaperone beteiligt. Das funktionelle Zusammenspiel der einzelnen Komponenten ist am besten untersucht für die SHRs, welche in Abwesenheit von Hormon einen Chaperonzyklus durchlaufen, an dem drei Komplexe beteiligt sind, von denen zwei Hsp90 als zentralen Bestandteil haben (Smith, 1995; Picard, 1997) (Abbildung 1.5 nach Smith, 1995). Identifiziert wurden die einzelnen Komponenten des Zyklus hauptsächlich durch Immunopräzipitationen der Komplexe aus Zellysaten (Smith *et al.*, 1995).

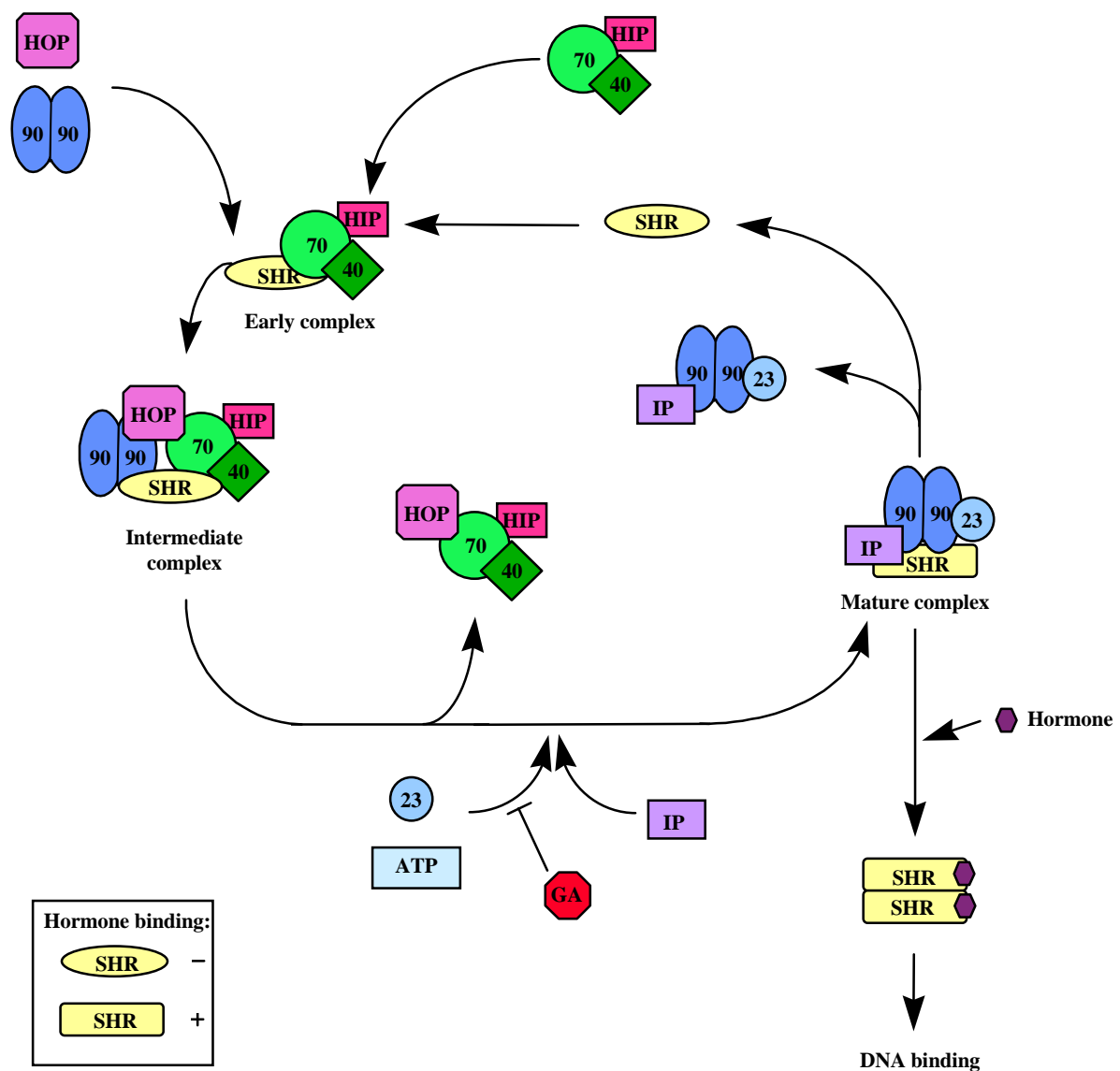


Abbildung 1.5:

Hsp90-Chaperon-Zyklus für die Progesteronrezeptor-Reifung

SHR: Steroidhormonrezeptor; IP: Immunophilin; GA: Geldanamycin

1.4.2.1.1. Der Early Protein Folding Complex

Während Proteine an Polyribosomen synthetisiert werden, gehen zumindest einige von ihnen eine Interaktion mit dem „Early Protein Folding Complex“ ein (siehe Kapitel 1.1. und 1.2.). Dieser enthält Hsp70/Hsc70 als die zentrale Chaperon-Komponente. Die stabile Bindung von Hsp70 an die Polypeptidkette erfordert die Hydrolyse des Hsp70-gebundenen ATPs, ein Prozess, der durch die transiente Wechselwirkung mit einem Protein der Hsp40-Familie (menschliches Homolog Hdj-1 für human DnaJ-like protein) stimuliert wird, und die Präsenz von p48/Hip (Johnson & Craig, 1997; Ziegelhoffer *et al.*, 1996). Dieses Co-Chaperon bindet an die Hsp70-ATPase-Domäne und stabilisiert den ADP-gebundenen Zustand des Hitzeschockproteins (Höhfeld *et al.*, 1995; Prapapanich, *et al.*, 1996). Die Interaktion mit Hsp70 wird durch drei im Hip-Molekül lokalisierte Tetratricopeptide Repeats (TPRs) vermittelt. TPRs sind degenerierte Sequenzmotive von 34 Aminosäuren, die oftmals in sequentieller Wiederholung auftreten und für Protein-Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Sikorski *et al.*, 1990).

Der „Early Protein Folding Complex“ führt zu partiell gefalteten Intermediaten, die oftmals weitere Interaktionen mit Chaperoninen benötigen, um die native Konformation zu erhalten (Kapitel 1.2.) (Hartl, 1996). Bei manchen Proteinen wie z. B. Steroidrezeptoren wird die endgültige Struktur jedoch durch sequentielle Interaktion mit Hsp90-enthaltenden Multi-Chaperon-Komplexen erreicht.

1.4.2.1.2. Der Steroidrezeptor-assoziierte Hsp90-enthaltende intermediäre Faltungskomplex

Zur weiteren Prozessierung des Rezeptormoleküls treten Hsp90 und Hop/p60 (STI1 in Hefe) in den Zyklus ein. Da Hop sowohl Hsp90 als auch Hsp70 bindet, scheint es als Adaptorprotein zu fungieren, welches den Hsp70/Hop/Hsp90-Rezeptor-Intermediärkomplex assembliert (Chen *et al.*, 1996b; Lässle *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1993). Auch Hop besitzt wie Hip TPR-Motive, die für die Interaktion mit sowohl Hsp70 als auch Hsp90 verantwortlich sind (Chen *et al.*, 1996b; Lässle *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1993). Dabei erkennt die TPR1-Domäne des Hop-Moleküls spezifisch das C-terminale Heptapeptid von Hsp70, während die Hop-TPR2A-Domäne an das C-terminale Pentapeptid von Hsp90 bindet (Scheufler *et al.*, 2000). Die Bindung wird zum Teil durch hydrophobe Interaktionen und zum Teil durch elektrostatische Wechselwirkungen der TPR-Domänen mit dem EEVD-Motiv, welches am C-terminus beider Hitzeschockproteine lokalisiert ist, vermittelt. Es ist nicht bekannt, ob bei

dieser Komplexbildung das schon gebundene Hsp70 rekrutiert oder ein vorgeformter Super-Chaperon-Komplex gebunden wird. Da man den Komplex aus Hsp70, Hop und Hsp90 jedoch auch in Abwesenheit von Substrat in der Zelle detektieren kann, scheint die substratunabhängige Bildung eines Komplexes wahrscheinlicher zu sein (Chen *et al.*, 1996b; Pratt & Toft, 1997).

Was mit dem SHR im intermediären Komplex geschieht, ist unklar. Obwohl Hormonbindung *in vivo* erst an den „mature complex“ erfolgt (s. u.), konnte in einem rekonstituierten *in-vitro*-System gezeigt werden, dass auch der Hsp70/Hop/Hsp90-Komplex in der Lage ist, SHRs zu einem hormonbindungskompetenten Zustand zu falten (Dittmar & Pratt, 1997). Ein stabiler Komplex mit dem Substrat wird jedoch erst in Anwesenheit von p23 (s. u.) gebildet (Morishima *et al.*, 2000). Der intermediäre Komplex wird durch Benzochinon-Ansamycine wie Geldanamycin (s. u.) stabilisiert, da durch diese Substanzen die Ausbildung des „mature folding complex“ inhibiert wird (Smith *et al.*, 1995; Johnson & Toft, 1995).

1.4.2.1.3. Der Steroidrezeptor-assoziierte Hsp90-enthaltende reife Faltungskomplex

Der intermediäre Komplex wird durch den sogenannten „mature complex“ ersetzt, welcher Hsp90, p23 und eines der großen Immunophilinen (FKBP51, FKBP52 oder Cyclophilin-40) enthält. Obwohl für SHRs auch im „intermediate complex“ schon Hormonbindung nachgewiesen werden konnte (Dittmar & Pratt, 1997), wird erst im „mature complex“ die stabile ligandbindungskompetente Konformation des Rezeptors erreicht (Dittmar *et al.*, 1997).

Immunophilinen sind ubiquitär exprimierte, hoch konservierte Proteine mit PPIase-Aktivität (siehe Kapitel 1.1.). Durch Bindung der Immunsuppressiva FK506, Cyclosporin A oder Rapamycin wird diese PPIase-Aktivität inhibiert (Peattie *et al.*, 1992; Schmid, 1993; Schreiber, 1991; Walsh *et al.*, 1992). Auf dieser Tatsache beruht die Einteilung der Immunophilinen in FK506-bindende Proteine (FKBPs) und Cyclosporin-A-bindende Proteine (Cylophilinen). Für FKBP52 und Cyclophilin-40 konnte *in vitro* eine Chaperon-Aktivität nachgewiesen werden, welche nicht von Immunsuppressiva beeinflusst wird (Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996). Immunophilinen binden an Hsp90 über ihre TPR-Motive und ersetzen dadurch Hop im Multi-Chaperon-Komplex (Owens-Grillo *et al.*, 1996). Dabei erfolgt die Rekrutierung eines der drei großen Immunophilinen an den Komplex in Abhängigkeit von der Art des gebundenen SHR. Diese Tatsache und die beobachtete Chaperon-Aktivität *in vitro*

macht eine direkte Interaktion der Immunophilinen mit dem Steroidrezeptorprotein im Komplex wahrscheinlich.

Für p23 konnte gezeigt werden, dass seine Präsenz im „mature complex“ eine entscheidende Voraussetzung für die stabile hormonbindende Konformation des Rezeptorproteins ist (Smith *et al.*, 1995; Dittmar *et al.*, 1997; Morishima *et al.*, 2000). Der Grund für diese stabilisierende Wirkung von p23 konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden. Da p23 ein Hauptthema der vorliegenden Arbeit ist, wird dieses Protein genauer in Kapitel 1.5. diskutiert.

Die Interaktionen zwischen SHR und Hsp90-Komplexen scheinen hochdynamisch zu sein, da der vollständige Chaperon-Zyklus innerhalb weniger Minuten durchlaufen wird. In Abwesenheit von Hormon tritt das Rezeptorprotein daraufhin erneut in den Zyklus ein und wird so weiter in einem hormonbindungskompetenten und damit aktivierbaren Zustand gehalten (Smith, 1993). Bei Hormonbindung an den im „mature complex“ gebundenen Rezeptor wird dahingegen die oben beschriebene Dimerisierung des Rezeptorproteins induziert, welche zur Aktivierung als Transkriptionsfaktor führt (s. o.). Interessanterweise konnten sowohl Hsp90/Hop/Hsp70 Komplexe (Chen *et al.*, 1996) als auch Hsp90/Immunophilin/p23 Komplexe (Johnson & Toft, 1994) in Abwesenheit von Substrat nachgewiesen werden. Daher könnten diese Komplexe eine allgemeinere Rolle bei Hsp90-abhängigen Faltungsreaktionen spielen (Buchner, 1999). Es ist vorstellbar, dass Hsp90 früher eine generelle Funktion bei der *de-novo*-Faltung von Proteinen besaß, welche im Lauf der Evolution verloren ging. Für die Funktionalität einiger Substratproteine war jedoch die Interaktion mit der Hsp90-Maschinerie vorteilhaft, so dass einige nicht-native strukturelle Merkmale auch im nativen Molekül beibehalten wurden, um die Wechselwirkung mit Hsp90 aufrechtzuerhalten (D. Smith, persönliche Mitteilung).

1.4.2.1.4. Weitere Komponenten von Hsp90-enthaltenden Chaperon-Komplexen

Die Zusammensetzung der Hsp90-Multichaperon-Komplexe variiert in Abhängigkeit des gebundenen Substrats. Nicht immer sind alle oben beschriebenen Komponenten an der Hsp90-abhängigen Faltungsreaktion des Substrats beteiligt. Darüber hinaus existieren noch weitere Partnerproteine, die in solchen Komplexen identifiziert wurden.

Ein kinase-spezifischer Kofaktor von Hsp90 ist p50, dessen Homologes in Hefe als Cdc37 charakterisiert wurde. p50 wurde erstmals als Phosphoprotein beschrieben, welches im Komplex mit Hsp90 und v-Src kopräzipitiert werden konnte (Brugge *et al.*, 1981; Opperman

et al., 1981). Cdc37 wurde in *S. cerevisiae* durch eine temperatursensitive Mutation, die zum G1-Arrest führt, identifiziert (Reed, 1980). In den Hsp90-Komplexen mit Kinasen wie Cdk4, v-Src und Raf-1 nimmt das p50-Protein, das *in vitro* Chaperon-Eigenschaften besitzt (Kimura *et al.*, 1997), die Stellung der Immunophiline ein (Brugge, 1986; Stancato *et al.*, 1994; Wartmann & Davis, 1994). p50 besitzt jedoch keine TPR-Motive sondern bindet an Hsp90 in unmittelbarer Nähe der TPR-Bindungsregion (Pratt & Toft, 1997). Abgesehen von der Chaperon-Aktivität ist die genaue Funktion von p50/Cdc37 in den Chaperon-Komplexen noch unklar.

Im Cytosol von L-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Subpopulation der Hsp90-Glucocorticoidrezeptor-(GR)-Komplexe anstelle von Immunophilinen ein Protein namens PP5 enthält (Silverstein *et al.*, 1997). PP5 ist eine Serin/Threonin-Phosphatase mit 4 TPR-Motiven in der N-terminalen Domäne, welche für die Interaktion mit Hsp90 verantwortlich sind (Becker *et al.*, 1994). Obwohl die Funktion von PP5 in GR-Komplexen nicht bekannt ist, wird aufgrund der enzymatischen Aktivität angenommen, dass durch PP5 der Phosphorylierungszustand einiger Komponenten des Komplexes reguliert wird.

1.4.2.2. Allgemeine Chaperon-Eigenschaften von Hsp90

Die hohen cytosolischen Konzentrationen von Hsp90 unter physiologischen Bedingungen ebenso wie die gesteigerte Expression infolge von Stress sprechen gegen eine absolute Spezialisierung von Hsp90 auf eine kleine Subpopulation von Substratproteinen. Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass Hsp90 zumindest unter Stressbedingungen allgemeinere Funktionen erfüllt.

Die Art, in der Hsp90 zur Stressantwort beitragen könnte, wurde in Faltungsassays *in vitro* demonstriert. Wie andere molekulare Chaperone erkennt Hsp90 spezifisch nicht-native Proteine und verhindert deren irreversible Aggregation infolge von chemischer oder thermischer Denaturierung (Wiech *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 1995; Freeman & Morimoto, 1996). Während Hsp90 in der Lage ist, diese Substratproteine in einem faltungskompetenten Zustand zu halten, wird für die Rückfaltung zur nativen Konformation das Hsp70-System benötigt (Freeman & Morimoto, 1996). Interessanterweise ist Hsp90 über die Interaktion mit einem seiner Substratproteine auch an der Regulation der Stressantwort beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Hitzeschockfaktoren durch Hsp90 in einem inaktiven Komplex gehalten werden, bis dieser Komplex spezifisch durch Hitzeschock disruptiert wird (Zou *et al.*, 1998).

Die Analyse der *de-novo*-Faltung von neu synthetisierten Proteinen in *hsp82*-Hefemutanten lässt darauf schließen, dass Hsp90 nicht maßgeblich am Faltungsprozess der meisten Proteine aus *S. cerevisiae* beteiligt ist (Nathan *et al.*, 1997). Darüber hinaus gelang es bis jetzt nicht, Hsp90 in Assoziation mit naszierenden Polypeptidketten am Ribosom nachzuweisen (Bukau *et al.*, 1996). Somit scheint Hsp90 zwar eine allgemeine Funktion bei der Rückfaltung von Proteinen zu haben, die nach Stressbedingungen im Cytosol akkumulieren, für eine allgemeine Beteiligung am *de-novo*-Faltungsgeschehen gibt es jedoch keine Hinweise (Mayer & Bukau, 1999).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wird von Hsp90 ein Spektrum von Substraten erkannt, das von kleinen Peptiden bis zu großen Proteinen reicht. So bindet Grp94 *in vivo* spezifisch an Peptide, die eine Rolle bei der Antigen-Präsentation am MHC-Komplex spielen (Udono & Srivastava, 1997; Wearsch & Nicchitta, 1997). Dagegen sind die Steroidhormonrezeptoren große Proteine mit z. T. über 100 kD Molekulargewicht (Buchner, 1999). *In vitro* assoziiert Hsp90 mit vielen verschiedenen nicht-nativen Zuständen – von komplett ungefalteten Proteinen (Scheibel *et al.*, 1998; Miyata & Yahara, 1995) bis zu quartär strukturierten, nativ-ähnlichen, aber inaktiven Faltungsintermediaten (Jakob *et al.*, 1995). Dieses unspezifische Bindungsverhalten und die freie Zugänglichkeit von SHR-Hsp90-Komplexen für Antikörper sprechen dafür, dass nicht-native Proteine an der Oberfläche des Hsp90-Moleküls gebunden werden (Buchner, 1999).

Wichtige Erkenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehung des Hsp90-Moleküls konnten durch Analyse der isolierten N- und C-terminalen Domänen gewonnen werden, die beide rekombinant in *E. coli* exprimiert werden können (Scheibel *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1997). Diese Untersuchungen zeigten, dass Hsp90 zwei voneinander unabhängige chaperonaktive Zentren besitzt, die sich in ihrer Substratspezifität und ATP-Abhängigkeit unterscheiden. Während das C-terminale Chaperon-Zentrum keine Präferenzen im Bezug auf gebundene Substrate aufweist, müssen die Substrate der N-terminalen Chaperon-Stelle in entfalteter Konformation vorliegen. Dabei wird die Affinität der N-terminalen Bindestelle durch die Bindung von Nukleotiden an Hsp90 signifikant beeinflusst, so dass es in Anwesenheit von ATP zu einer Freisetzung von Substrat kommt. Die C-terminale Domäne weist dahingegen eine ATP-unabhängige Chaperon-Aktivität auf. Diese Kombination zwei unabhängiger, funktionell unterschiedlicher chaperon-aktiver Zentren in einem Molekül könnte die Grundlage für die ambivalente Funktionalität von Hsp90 (allgemeines und spezialisiertes Chaperon) in der Zelle sein (Buchner, 1999).

1.4.3. Hsp90 und ATP

Die ATP-Abhängigkeit von Hsp90 war lange Zeit ein kontrovers diskutiertes Thema. Von einigen Arbeitsgruppen wurde sowohl Bindung von Hsp90 an ATP als auch eine intrinsische ATPase-Aktivität für Hsp90 und Grp94 berichtet (Csermely *et al.*, 1993; 1995; Nadeau *et al.*, 1993; Li & Srivastava, 1993). Diese Befunde konnten jedoch in systematischen Studien nicht reproduziert werden (Jakob *et al.*, 1996). Auch die *in-vitro*-Chaperon-Aktivität von Hsp90 wurde als ATP-unabhängig charakterisiert (Shaknovich *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 1995; Freeman & Morimoto, 1996). Dennoch stellte sich heraus, dass die Bindung des Partnerproteins p23 an Hsp90 ATP-abhängig ist und durch ADP inhibiert werden kann (Johnson & Toft, 1995; Sullivan *et al.*, 1997). Auch die Affinität von Hsp90 zu hydrophoben Oberflächen scheint durch antagonistische Wirkung von ATP und ADP reguliert zu werden (Sullivan *et al.*, 1997). Diese Diskrepanz wurde im Rahmen einer Studie geklärt, die mit Hilfe von Elektronen-Spin-Resonanz-Experimenten eine schwache, jedoch spezifische Bindung von ATP an Hsp90 mit einem K_D um die 400 μM nachweisen konnte (Scheibel *et al.*, 1997). Dabei konnte gezeigt werden, dass nur solche spin-markierten ATP-Analoga an Hsp90 banden, bei denen die Markierung an der Ribose-Einheit des Moleküls lokalisiert war. ATP-Analoga, die am Adenin-Ring modifiziert waren, wie sie auch in den früheren Studien gebräuchlich waren, wurden vom Protein nicht akzeptiert.

Der eindeutige Beweis für die Bindung von ATP an Hsp90 wurde durch die Kristallstruktur eines N-terminalen Hsp90-Fragments im Komplex mit Nukleotid erbracht (Prodromou *et al.*, 1997b) (siehe Kapitel 1.4.1. und Abbildung 1.4). Das gebundene Nukleotid hat in diesem Komplex eine gebogene Konformation, wobei die hydrophobe Adenin-Einheit des Moleküls tiefer im Inneren der Nukleotidbindetasche lokalisiert ist, während die polaren Zucker- und Phosphateinheiten näher an der Öffnung der Tasche liegen (Prodromou *et al.*, 1997b; Grenert *et al.*, 1997). Dahingegen nehmen Nukleotide, die an Hsp70 oder GroE gebunden sind, eine eher langgestreckte Konformation ein (Prodromou *et al.*, 1997b; Buchner, 1999) (Abbildung 1.6 nach Beissinger & Buchner, 1998).

Basierend auf diesen Daten wurde für die ATP-Bindestelle eine molekulare Schalterfunktion postuliert, die durch konformationelle Umlagerungen die Assemblierung der Multi-Chaperon-Komplexe reguliert (Grenert *et al.*, 1997). So binden Hop und dessen Hefehomologes STI1 präferentiell in Anwesenheit von ADP an Hsp70 oder Hsp90 (Johnson *et al.*, 1998). Da p23 den ATP-gebundenen Zustand von Hsp90 bevorzugt (Johnson & Toft,

1995; Sullivan *et al.*, 1997), ist die gleichzeitige Assoziation von Hop und p23 mit Hsp90 ausgeschlossen, obwohl die Partnerproteine mit unterschiedlichen Bereichen des Hsp90-Moleküls in Wechselwirkung treten (Chen *et al.*, 1998). Auch die nukleotidregulierte Affinität des Hsp90-Moleküls für hydrophobe Oberflächen (Sullivan *et al.*, 1997) konnte durch die Identifizierung von zwei chaperon-aktiven Zentren (s. o.) im Hsp90-Molekül erklärt werden, von denen eines (das N-terminale) als ATP-abhängig charakterisiert wurde (Scheibel *et al.*, 1998). Bei dieser N-terminalen Chaperon-Domäne reguliert ATP-Bindung das Umschalten von einem hoch-affinen in einen niedrig-affinen Substratbindezustand. Dahingegen ist die schon früher postulierte und charakterisierte Chaperon-Aktivität von Hsp90 (Wiech *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 1995) in der C-terminalen Domäne lokalisiert (Scheibel *et al.*, 1998). Diese nimmt im Wildtypprotein zumindest in *in-vitro*-Testsystemen eine dominante Rolle ein, so dass die ATP-abhängige Chaperon-Aktivität des Hsp90-Moleküls lange nicht identifiziert werden konnte.

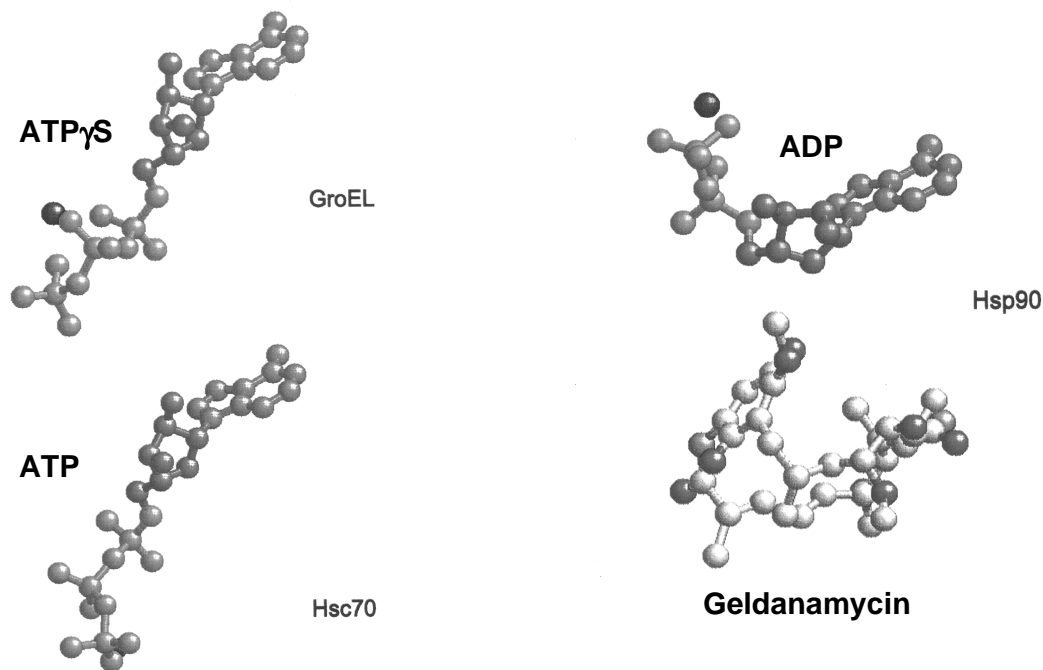


Abbildung 1.6: Konformationen von Nukleotiden und Geldanamycin im Hsp-gebundenen Zustand

Gezeigt ist die Konformation von ATP γ S im GroEL-gebundenen Zustand (oben links), von ATP im Hsc70-gebundenen Zustand (unten links), von ADP im Hsp90-gebundenen Zustand (oben rechts) und von Geldanamycin im Hsp90-gebundenen Zustand (unten rechts).

Hsp90 weist wie andere ATP-bindende Hitzeschockproteine ebenfalls eine ATPase-Aktivität auf, die im N-terminalen Fragment des Moleküls lokalisiert ist (Panaretou *et al.*, 1998; Scheibel *et al.*, 1998). Mit Turnover-Zahlen von 0.4 min^{-1} für das Hefeprotein ist die ATPase-Aktivität von Hsp90 dabei ähnlich niedrig wie die der Hsp70-Familie (Panaretou *et al.*, 1998). In der isolierten N-terminalen ATP-Bindedomäne kann nur eine um den Faktor 10

verringerte ATPase-Aktivität gemessen werden (Scheibel *et al.*, 1998), was darauf hindeutet, dass zusätzliche Regionen des Hsp90-Moleküls an der ATP-Hydrolyse-Reaktion beteiligt sein könnten. Durch Mutation der Aminosäuren, die als kritisch für ATP-Bindung und -Hydrolyse erachtet wurden, konnte gezeigt werden, dass die Funktion von Hsp90 *in vivo* ATP-abhängig ist (Panaretou *et al.*, 1998; Obermann *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist die Aktivierung des Progesteronrezeptormoleküls, eines authentischen Hsp90-abhängigen Substratproteins, zum hormonbindenden Zustand *in vitro* von einer funktionellen Hsp90-ATPase-Aktivität abhängig (Grenert *et al.*, 1999). Über die Regulation dieser ATPase-Aktivität durch Partnerproteine ist im Vergleich zu anderen molekularen Chaperonen wenig bekannt. Zumindest *in vitro* scheint STII einen inhibierenden Einfluss auf die ATPase-Aktivität von Hefe-Hsp90 auszuüben, der durch andere TPR-Cochaperone wie Cpr6 (ein Cyclophilin-Homologes aus Hefe) aufgehoben werden kann (Prodromou *et al.*, 1999).

Die Kristallstruktur von Hefe-Hsp90 im Komplex mit gebundenem Nukleotid zeigte eine strukturelle Homologie zwischen Hsp90 und der Typ-II-Topoisomerase DNA-Gyrase B auf, mit einer starken Konservierung der Aminosäuren, welche an ATP-Bindung und Hydrolyse beteiligt sind (Prodromou *et al.*, 1997b). In der Zwischenzeit wurden weitere Mitglieder dieser ungewöhnlichen Familie (GHKL-Superfamilie) identifiziert, die sich durch ein spezifisches ATPase-Motiv auszeichnet (Dutta & Inouye, 2000). Zu diesen gehören das MutL DNA-Mismatch-Repair Protein (Ban & Yang, 1998; Ban *et al.*, 1999) und ein C-terminales Fragment der bakteriellen Histidin-Kinase CheA (Bilwes *et al.*, 1999). Während in Hsp90, DNA-Gyrase und MutL die ATP-bindende Domäne N-terminal lokalisiert ist, liegt sie in CheA (und anderen Histidin-Kinasen) zentral in der Polypeptidkette. Für das 40-kDa N-terminale Fragment von MutL (LN40) konnte gezeigt werden, dass infolge von Nukleotid-Bindung signifikante konformationelle Umlagerungen stattfinden, welche zur Dimerisierung dieser Domäne führen (Ban *et al.*, 1999). Fünf Loop-Strukturen L1, L2, L3, L45 und ein Loop, der die Tasche nach Nukleotidbindung verschliesst („Lid“), nehmen im Gegensatz zum nukleotidfreien Zustand eine geordnete Konformation an (Abbildung 1.7). Die Kristallstruktur dieses Fragments enthüllte auch Kontakte zwischen Protein und gebundenem Nukleotid, die außerhalb des ursprünglich als ATP-Bindestelle identifizierten Bereichs liegen und welche für die ATPase-Aktivität des Proteins wichtig zu sein scheinen (Ban *et al.*, 1999). So inseriert bei Nukleotid-Bindung ein konservierter Lysinrest (Lysin 307), der auf dem L3-Loop lokalisiert ist, spezifisch in die ATP-Bindestelle und bildet einen direkten Kontakt zum aus der Bindestelle herausragenden γ -Phosphatrest des Nukleotids aus. Es ist vorstellbar, dass

im Hsp90-Molekül ähnliche Kontakte existieren, die eine wichtige Rolle bei ATP-Bindung und –Hydrolyse spielen.

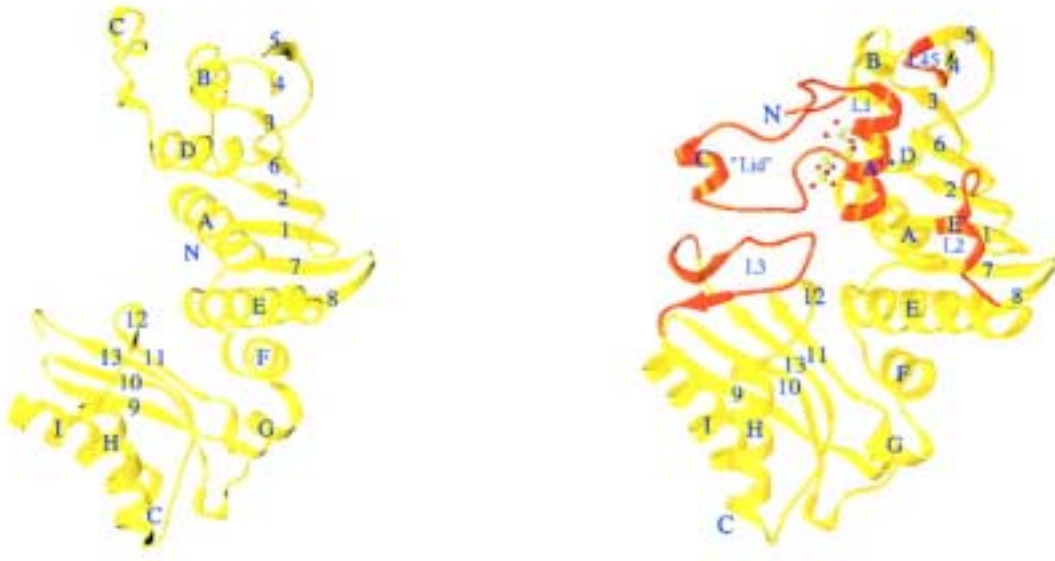


Abbildung 1.7: *Kristallstruktur des N-terminalen Fragments von MutL (LN40)*
LN40 ist ohne Nukleotid (links) und im Komplex mit AMP-PNP (rechts) gezeigt. Die Loops, die nach Nukleotid-Bindung eine geordnete Konformation annehmen, sind in rot markiert.

1.4.4. Hsp90 als Zielmolekül für Anti-Tumor-Medikamente

Antibiotika aus der Familie der Ansamycine wie Geldanamycin und Herbimycin A werden schon seit längerem als Antitumor-Medikamente diskutiert (Supko *et al.*, 1995), da sie die Aktivität onkogener Tyrosinkinase wie v-Src oder ErbB-2 signifikant verringern (Uehara *et al.*, 1988). Ähnliche Antitumor-Eigenschaften wurden auch für die chemisch nicht verwandte Substanz Radicicol beschrieben, durch welche der Tumor-Phänotyp von src- oder ras-transformierten Zelllinien umgekehrt werden kann. In beiden Fällen wurde zunächst angenommen, dass die Antitumor-Wirkung auf eine direkte Inhibition der Proteinkinase-Aktivität zurückzuführen ist. Es zeigte sich jedoch, dass das tatsächliche Zielmolekül beider Substanzklassen Hsp90 ist (Whitesell *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 1998). Die Antitumorwirkung beruht daher auf der Interferenz von Ansamycinen oder Radicicol mit der Hsp90-abhängigen Aktivierung der Substratproteine (Soga *et al.*, 1998; Whitesell *et al.*, 1998).

Die Bindestelle für Geldanamycin und Radicicol ist identisch mit der Nukleotidbindetasche (Grenert *et al.*, 1997; Roe *et al.*, 1999; Stebbins *et al.*, 1997; Schulte *et al.*, 1998; Prodromou *et al.*, 1997b). Beide Substanzen erwiesen sich demzufolge als hocheffektive, kompetitive Inhibitoren der intrinsischen ATPase-Aktivität von Hsp90 (Panaretou *et al.*, 1998; Roe *et al.*, 1999; Schulte *et al.*, 1998; Scheibel *et al.*, 1998), da sie

höhere Affinitäten für das Hsp90-Molekül aufweisen als Nukleotide (Buchner, 1999). Im Hsp90-gebundenen Zustand imitieren Geldanamycin und Radicol die Struktur der an Hsp90 gebundenen Nukleotide und bilden ähnliche Wechselwirkungen zur Nukleotidbindestelle aus (Roe *et al.*, 1999) (Abbildung 1.6). So haben fast alle hydrophoben Interaktionen zwischen Geldanamycin und Hsp90 ein exaktes Äquivalent im Hsp90-Nukleotid-Komplex (Prodromou *et al.*, 1997b; Stebbins *et al.*, 1997). Während die Bindung von Geldanamycin an Hsp90 sehr spezifisch ist, konnte keine Wechselwirkung zwischen Ansamycinen und Hsp70 beobachtet werden, da in diesem Fall gebundene Nukleotide eine andere Konformation einnehmen (Whitesell *et al.*, 1994).

Da Ansamycine als kompetitive Inhibitoren für ATP-abhängige Funktionen von Hsp90 fungieren, wird auch die Assoziation von p23 mit Hsp90 durch Geldanamycin beeinflusst. So kommt es in Anwesenheit von Geldanamycin zu einer Disruption der Hsp90/p23-Interaktion (Johnson & Toft, 1995), was zu einem Arrest des Steroidrezeptorzyklus auf der Stufe des „intermediate complex“ führt (Smith *et al.*, 1995). Ob die Antitumorwirkung von Geldanamycin *in vivo* allein auf der Disruption des Hsp90/p23-Komplexes beruht, oder ob Geldanamycin zusätzliche Effekte ausübt, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht geklärt. *In vitro* konnte anhand der isolierten Hsp90-Domänen gezeigt werden, dass Geldanamycin in ähnlicher Weise wie ATP die Affinität des N-terminalen chaperon-aktiven Zentrums für nicht-native Proteine verändert, während die C-terminale Chaperon-Aktivität davon unbeeinflusst ist (Scheibel *et al.*, 1998).

Die essentielle Rolle von Hsp90 bei der Aktivierung wichtiger Antitumorzielmoleküle wie Raf-1, Kinasen der Src-Familie und Cdk4 macht das Hsp90-Molekül in jedem Fall auch zu einem vielversprechenden Angriffspunkt, so dass wachsendes Interesse am klinischen Einsatz von Geldanamycin, Radicol und deren Derivaten besteht. Unabhängig von dieser Entwicklung erweisen sich diese spezifischen Hsp90-Inhibitoren als wichtige Hilfsmittel bei der Aufklärung der *in-vivo*-Funktion von Hsp90-enthaltenden Chaperon-Systemen.

1.5. p23 – ein Hsp90-Partnerprotein im „mature folding complex“

p23 ist ein stark saures Phosphoprotein, das erstmals im Jahr 1990 als Komponente des reifen, nicht-aktivierten Progesteronrezeptorkomplexes in der Literatur beschrieben wurde (Smith *et al.*, 1990). Expressions- und Sequenzanalysen zeigten, dass es sich bei p23 um ein in allen Geweben ubiquitär exprimiertes und in höheren Eukaryonten hoch konserviertes Molekül handelt (Johnson *et al.*, 1994). Dahingegen weist Sba1, das p23-Homologe aus

Konformation mit hoher Affinität umzuschalten (Grenert *et al.*, 1997). Dies erklärt auch den positiven Einfluss des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons ATP γ S auf die Assoziation von Hsp90 und p23 (Sullivan *et al.*, 1997). Der Hsp90-p23-Komplex wird *in vitro* zusätzlich durch das Detergens Nonidet P-40 und das Metalloxianion Molybdat stabilisiert (Sullivan *et al.*, 1997), welches schon seit längerem als stabilisierender Faktor für nicht-aktivierte Rezeptorkomplexe bekannt war (Redeuilh *et al.* 1987). Es wurde postuliert, dass Molybdat nach ATP-Hydrolyse in der Hsp90-Nukleotidtasche bindet und dadurch Hsp90 in seiner ATP-gebundenen Konformation festhält (Grenert *et al.* 1999).

Während für viele Hsp90-Partnerproteine bekannt ist, an welcher Region von Hsp90 ihre Bindung erfolgt, ist diese Frage für p23 noch nicht endgültig geklärt. Da die Wechselwirkung von p23 mit Hsp90 durch N-terminal gebundene Nukleotide reguliert wird (Grenert *et al.*, 1997), wurde die Bindestelle zunächst in der N-terminalen Domäne vermutet. *In-vitro*-Experimente mit Hsp90-Punktmutanten weisen jedoch darauf hin, dass auch C-terminale Bereiche des Hsp90-Moleküls an dieser Interaktion beteiligt sind (Chen *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1998). In Übereinstimmung mit diesem Befund gelang es nicht, eine Wechselwirkung zwischen p23 und der isolierten N-terminalen Domäne von Hsp90 nachzuweisen (Scheibel *et al.*, 1999).

Neben Steroidhormonrezeptoren wurden verschiedene andere Hsp90-Substratproteine identifiziert, welche die Anwesenheit von p23 im Heterokomplex für eine korrekten Faltungsprozess zu benötigen scheinen. Zu diesen Substratproteinen zählen unter anderem die reverse Transkriptase des Hepatitis-B-Virus (Hu *et al.*, 1997) und Telomerase (Holt *et al.*, 1999). Da für p23 *in vitro* eine Chaperon-Aktivität festgestellt werden konnte (Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996), ist es wahrscheinlich, dass Substratmoleküle im Heterokomplex von p23 direkt kontaktiert werden. Die genaue Funktion des p23-Moleküls in diesem Kontext ist noch nicht geklärt, obwohl Assemblierungsstudien des Glucocorticoid-Aporezeptorkomplexes *in vitro* vermuten lassen, dass die Anwesenheit von p23 zu einer Stabilisierung der hormonbindenden Form des Steroidhormonrezeptors führt (Dittmar *et al.*, 1997). Diese Vermutung wird auch durch *in-vivo*-Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* bekräftigt. So führt die Deletion von *sba1* zu einer erhöhten Sensitivität von Hsp90-abhängigen Faltungsprozessen gegenüber Ansamycin-Antibiotika (Bohen, 1998). Auch dies lässt auf eine Destabilisierung des Hsp90-Substrat-Komplexes in Abwesenheit von p23 schließen. Im Widerspruch dazu wurde kürzlich postuliert, dass p23-Homologe keinen Einfluss auf die Hormonbindeaktivität sondern auf die Aktivierung der Transkriptionsaktivität

des Rezeptors ausüben (Freeman *et al.*, 2000). Nach dieser Hypothese moduliert p23 nicht die Aktivität des Aporezeptormoleküls, sondern des Holorezeptors (d. h. die Ligandeneffizienz). Um jedoch die präzise Funktion von p23 im Zusammenspiel mit Hsp90 definieren zu können, ist es unerlässlich, weitere Substratmoleküle neben Steroidrezeptoren in diesem Kontext zu untersuchen.

1.6. Problemstellung

Molekulare Chaperone der Hsp90-Familie binden Nukleotide mit vergleichsweise schwachen Affinitäten. Als Konsequenz der Nukleotidbindung kann eine Modulation der Affinitäten des Hsp90-Moleküls für Substrat- und Partnerproteine beobachtet werden. Im Vergleich zu den detailliert analysierten Substratbinde- und ATP-Hydrolysezyklen anderer molekularer Chaperone sind diese Zusammenhänge jedoch für Hsp90 kaum verstanden. Daher können auch *in vitro* beobachtete Einflüsse auf die von Hsp90 katalysierte ATP-Hydrolyse nur schwer erklärt werden.

Aus diesem Grund sollte die ATPase-Aktivität des Hitzeschockproteins grundlegend beschrieben werden. Ein Hauptziel war dabei, den kompletten ATPase-Zyklus des isolierten Hsp90-Moleküls in seine Teilreaktionen zu zerlegen und diese genauer zu charakterisieren. Die Zuordnung kinetischer Parameter zu diesen Teilreaktionen und vor allem die Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes waren wichtige Fragestellungen, da die Etablierung eines schlüssigen Modells eine wichtige Voraussetzung für die Beschreibung des durch ATP modulierten Chaperon-Zyklus von Hsp90 ist. Darüber hinaus könnten die erhaltenen Informationen auch erklären, warum die ATPase-Aktivität des die Nukleotidbindestelle enthaltenden N-terminalen Hsp90-Fragmentes im Vergleich zum Wildtypprotein 10-fach verringert ist. Es wurde spekuliert, dass ähnlich wie im MutL-Protein zusätzliche, außerhalb der ATP-Bindedomäne liegende Aminosäuren benötigt werden, um Kontakte zum Nukleotid auszubilden und dadurch die ATPase-Rate zu steigern. Diese Theorie sollte mit Hilfe verschiedener C-terminal verkürzter Hsp90-Konstrukte überprüft werden.

Ein weiteres Thema der vorliegenden Arbeit war das Hsp90-Partnerprotein p23. Dieses Protein scheint im Zusammenspiel mit Hsp90 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des aktiven Zustandes von Substratmolekülen im Heterokomplex zu spielen. In der Literatur beschrieben sind jedoch hauptsächlich die Funktionalitäten des isolierten Proteins *in vitro* (Hsp90-Bindung und Chaperon-Eigenschaften). Die identifizierte Chaperon-Eigenschaft von

p23 sollte im folgenden genauer analysiert werden. Es sollten weitere Substratproteine getestet werden, um möglicherweise anhand eines umfassenden Substratspektrums Aussagen über Bindeeigenschaften von p23 treffen zu können. Darüber hinaus war es wichtig, die Chaperon-Aktivität einem bestimmten strukturellen Bereich von p23 zuzuordnen. Ähnlich wie schon beim Hsp90-Molekül geschehen, sollte daher eine Struktur-Funktions-Analyse des p23-Moleküls erstellt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

2.1.1. Organismen

Bakterienstämme:

Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS $F' lon ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-)$, gal (λ clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1) (Phillips *et al.*, 1984)

Escherichia coli XL1-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 suppE44 relA1 lac[F' proAB lac^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]*

Hefestämme:

Saccharomyces cerevisiae JC6a can1, ade2, leu2, his3, trp1, ura3, (hsc82::Leu2), (hsp82::Leu2), (pep4::His3) p2μGPD-Hsp82; wurde von Susan Lindquist zur Verfügung gestellt.

Infizierte *Spodoptera frugiperda* (SF9) Zellpellets wurden kommerziell vom University of Colorado Cancer Center Tissue Culture Core (Denver, Colorado, USA) erworben. Die Sf9 Zellen waren 48 Stunden mit rekombinantem *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) infiziert worden, dessen Polyhedrin Gen durch das Gen für die β-Isoform von humanem Hsp90 ersetzt wurde.

2.1.2. Plasmide

Plasmid pET17b

Plasmid pET23a-hp23 wurde von David O. Toft zur Verfügung gestellt (Johnson & Toft, 1994).

Plasmid pET23a-yp23 wurde von Brian C. Freeman zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Proteine und Peptide

α-Glucosidase aus Hefe

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Albumin aus Rinderserum (BSA)

Serva, Heidelberg

Alkalische Phosphatase aus Shrimp	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Citratsynthase aus Schweineherz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Insulin aus Rinderpankreas	Sigma, St. Louis, USA
Laktatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MAK33-IgG aus Maus	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Malat Dehydrogenase aus Schweineherz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pwo-Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel	Sigma, St. Louis, USA
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4-DNA Ligase	Promega, Mannheim
Trypsin aus Rinderpankreas	Sigma, St. Louis, USA
N-terminale Fragmente von Hefe Hsp82	Paul Muschler (Technische Universität, München) und Klaus Richter (Technische Universität, München)
Monoklonaler Antikörper JJ3 aus Maus (anti-hp23; IgG)	David O. Toft (Mayo Graduate School, Minnesota), (Johnson <i>et al.</i> , 1994)
anti-Maus-Ig-POD-Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PEP1	Dr. Susanne Modrow, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg

2.1.4. Chemikalien

Acetyl-Coenzym A, Trilithiumsalz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (40%)	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'-diphosphat, Dinatriumsalz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Adenosin-5'-(γ -thiotriphosphat), Lithiumsalz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
α - ³² P-Adenosin-5'-triphosphat (110TBq/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Adenylyl-imidodiphosphat, Tetralithiumsalz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Agarose NEEO, ultra pure	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat, p.a.	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Serva, Heidelberg

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco Biotec., Detroit, USA
Bacto Pepton	Difco Biotec., Detroit, USA
Bacto Trypton	Difco Biotec., Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Biotec., Detroit, USA
Bromphenolblau	Biorad, München
Complete™ Protease Inhibitoren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma, St. Louis, USA
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, USA
5,5'-Dithio-bis-Nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma, St. Louis, USA
1,4-Dithioerythrit (DTE)	Roth, Karlsruhe
Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP)	Pierce, Rockford, USA
ECL-Westernblot-Detektionssystem	Amersham Pharmacia Biotech
Ethanol	Riedel de Haen AG, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure, Titriplex III	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Riedel de Haen AG, Seelze
Glutaraldehyd, 25% in H ₂ O	Serva, Heidelberg
Glycerin	ICN, Meckenheim
Guanidin Hydrochlorid, p.a.	ICN, Meckenheim
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-	ICN, Meckenheim
N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	
Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA
Milchpulver	Glücksklee
NADH	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NAD ⁺	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Natriumdodecylsulfat (SDS), reinst	Serva, Heidelberg
p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranosid	Sigma, St. Louis, USA
Nonidet P-40 (10%)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Oxalacetat	Sigma, St. Louis, USA
Pefabloc™	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phosphoenolpyruvat	Sigma, St. Louis, USA

Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma, St. Louis, USA
Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg
Silbernitrat, p.a.	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a.. Puffer und Lösungen wurden mit quarzbidestilliertem Wasser hergestellt; für *E. coli*-Medien wurde Reinwasser benutzt. Alle Puffer wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert und für Gelfiltrationssäulen und FPLC-Chromatographien zusätzlich entgast.

2.1.5. Standards und Kits

BioRad Miniprep Kit	BioRad, München
DNA Längenstandard λ /BstE II	New England Biolabs, Schalbach
EnzChek ATPase-Assay Kit	Molecular Probes Inc., Leiden, Niederlande
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
High Range Molekularmassenmarker	BioRad, München
Low Range Molekularmassenmarker	BioRad, München
Promega Wizard Plasmid Miniprep Kit	Promega, Mannheim
Rainbow Molekularmassenmarker	Amersham Pharmacia Biotech
Qiex II Kit	Qiagen, Hilden

2.1.6. Oligonukleotide

PCR-Primer für $\Delta p23$:

Start: 5' G ATC CAT ATG CAG CCT GCT TCT GCA 3'

Stop: 5' G ATC GAA TTC TTA TTA CAT GTT GTT CAT CAT CTC AGA GAA 3'

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

2.1.7. Sonstige Materialien

Cellulosenitrat Membranfilter	Sartorius, Göttingen
Centricon Mikrokonzentratoren 10 und 30	Amicon, Witten
Centriplus Konzentratoren 10 und 30	Amicon, Witten
Centriprep Konzentratoren 10 und 30	Amicon, Witten
DC-Fertigfolien, PEI Cellulose	Merck, Darmstadt
Dialyseschläuche Spectra/Por, 6000-8000 Da	Spectrum, Houston, USA
Filterpapier	Whatman, Maidstone, USA
Immobilon P Membran	Millipore, Bedford, USA
Kulturröhrchen (17 x 100 mm)	Elkay Laboratory Products, UK
Microcon-Mikrokonzentratoren	Amicon, Witten
Nitrocellulose Membran	Millipore, Bedford, USA
PE Röhrchen (15ml/50ml)	Greiner & Söhne, Nürtingen
Petrischalen aus Polystyrol	Greiner & Söhne, Nürtingen
pH-Indikatorstäbchen	Merck, Darmstadt
Pottergefäß und -kolben (handbetrieben)	Braun, Melsungen
Quarzküvetten	Hellma, Müllheim
Röntgenfilme X-OMAT AR	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Sterilfilter	Renner, Darmstadt
Tris-Glycin Gradientengele	Novex, San Diego, USA
Ultrafiltrationsmembranen YM10, YM30	Amicon, Witten
Chromatographiematerialien:	
DEAE Sephacel	Amersham Pharmacia Biotech
Q-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech
SP-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech
Resource-Q (FPLC)	Amersham Pharmacia Biotech
Hydroxylapatit CHT	Biorad, München
Superdex 200 prep. grade	Amersham Pharmacia Biotech
Superdex 75 prep. Grade	Amersham Pharmacia Biotech

2.1.8. Medien und Puffer

Puffer, Medien und Medienzusätze für Arbeiten mit Bakterien oder Hefen wurden direkt nach ihrer Herstellung autoklaviert (Medien) bzw. sterilfiltriert (Puffer, Antibiotika) (Sambrook, 1989). Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Antibiotika und Medien:

LB-Medium 10 g/l Bacto Trypton
 5 g/l Yeast Extract
 5 g/l NaCl
Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

YPD-Medium 10 g/l Bacto Yeast Extract
 20 g/l Bacto Pepton
 20 g/l D(+)-Glucose
Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

Ampicillin-Stammlösung 100 mg/ml in H₂O, stabil bei -20°C
Die Stammlösung wird dem LB-Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem jeweiligen Medium 15 g/l Agar hinzugefügt.

Puffer für molekularbiologische Methoden:

DNA-Auftragspuffer 50% v/v Glycerin
 0,25% w/v Xylencyanol
 0,25% w/v Bromphenolblau

TAE-Puffer 40 mM Tris/Acetat pH 8,0
 1 mM EDTA

TE-Puffer (steril)	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
--------------------	------------------------------------

Bei der Verwendung von Kits und Enzymen wurden die jeweils von der Herstellerfirma mitgelieferten Puffer benutzt.

Puffer für proteinchemische Methoden

Puffer für die Reinigung von humanem Hsp90 β

TEN ₀ -Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 6,9 0,1 mM EDTA
TEN ₁₀₀ -Puffer	TEN ₀ -Puffer mit 100 mM NaCl
TEN ₁ -Puffer	TEN ₀ -Puffer mit 1 M NaCl
KP-1-Puffer	20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8
KP-3-Puffer	400 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8
Gelfiltrationspuffer	40 mM Hepes/KOH, pH 7,5 400 mM KCl 5 % Glyzerin
Aufbewahrungspuffer	40 mM Hepes/KOH, pH 7,5 5 % Glyzerin

Puffer für die Reinigung von Hefe Hsp90 (Hsp82)

Lyse-Puffer	40 mM Hepes/KOH, pH 7,5 50 mM NaCl 5 mM EDTA 1 mM DTE 5 % Glyzerin
NaP-Puffer	20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,5 5 % Glyzerin
KP-1-Puffer	100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 5 % Glyzerin
KP-3-Puffer	300 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 5 % Glyzerin
Gelfiltrationspuffer	40 mM Hepes/KOH, pH 7,5 400 mM KCl 20 mM MgCl ₂ 5 % Glyzerin
Aufbewahrungspuffer	40 mM Hepes/KOH, pH 7,5 20 mM KCl 5 % Glyzerin

Puffer für die Reinigung von humanem p23 (hp23)

Reinigungspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7.5 10 mM Glyzerin 5 mM DTE 2 mM EDTA
------------------	---

Gelfiltrationspuffer 40 mM Hepes/KOH, pH 7,5
500 mM NaCl
5 mM DTE

Aufbewahrungspuffer 40 mM Hepes/KOH, pH 7,5
5 mM DTE

Puffer für die Reinigung von Hefe p23 (yp23/Sba1)

TE-Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
2 mM EDTA

TE₅₀-Puffer TE-Puffer
+ 50 mM KCl
+ 5 mM DTE

TE₅₀₀-Puffer TE-Puffer
+ 500 mM KCl
+ 5 mM DTE

Gelfiltrationspuffer TE-Puffer
+ 100 mM NaCl
+ 5 mM DTE

Aufbewahrungspuffer 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
2 mM DTE

Puffer für die Reinigung von Δ p23

Für die Reinigung von Δ p23 wurden identische Pufferbedingungen wie für die Reinigung von humanem p23 gewählt.

Weitere Puffer

TE-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 (25°C) 2 mM EDTA
PBS-Puffer	4 mM KH ₂ PO ₄ 16 mM Na ₂ HPO ₄ 115 mM NaCl

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle pH-Werte der Puffer bei 4°C eingestellt.

2.1.9. GeräteAbsorptionsspektrophotometer:

Perkin Elmer 551 S, UV/VIS-Spektrophotometer
Pharmacia Biochrom 4060, UV/VIS-Spektrophotometer
Pharmacia Ultrospec 3000, UV/VIS-Spektrophotometer
Jasco V-550, UV/VIS-Spektrophotometer

Spektrofluorimeter:

Perkin Elmer MPF 44 A, Fluoreszenz-Spektrophotometer

Circulardichroismus-Spektropolarimeter

Jasco J715, Spektropolarimeter mit PTC 343 Peltier-Temperiereinheit

Chromatographieeinheiten:

LKB 2211, Superrac-Fraktionskollektor
LKB 2238 Uvicord-S-II, UV-Durchflußphotometer
LKB 2210, Zweikanal-Flachbettschreiber
LKB Peristaltische Pumpe P-1

Pharmacia HiLoad-System:

Gradientenprogrammierer GP-10

Pumpe P-50

Einstrahlmonitor Uvicord-S-II

Fraktionskollektor Redifrac

Einkanalschreiber REC-101

Pharmacia GradiFrac-System:

Pumpe P-50

Kontrolleinheit UV-1

Optische Einheit UV-1

Zweikanalschreiber REC-112

Pharmacia FPLC-Anlage:

Kontrolleinheit LCC-500-Plus

FPLC-Pumpen P-500

Einstrahlmonitor UV-1 mit HR-10-Meßzelle

Fraktionskollektor FRAC-100

Zweikanalschreiber REC-482

Gelelektrophorese- und Blotapparaturen:

LKB 2050 Midget, Elektrophorese-Einheit

Agarosegel-Apparatur Pharmacia LKB GNA 100

Biometra Fast-Blot-Apparatur

Spannungsgeräte:

LKB 2197, Power Supply

Pharmacia EPS 600, 3500 und 3501 XL, Power Supply

Waagen:

Mettler Analysenwaage H-20-T
Sartorius Analysenwaage
Sartorius Halbmikrowaage L-160-D
Sartorius Halbmikrowaage BL -500-S

Zentrifugen:

Eppendorf Kühlzentrifuge 5402
Eppendorf Tischzentrifugen 5415-C und 5417-C
Kontron Centrikon T-42K Kühlzentrifuge
Hettich Mikroliter Zentrifuge 2041
Hettich Rotina 46-R Kühlzentrifuge
Sorvall Superspeed RC-2 und RC-5-B
Beckmann Avanti J-25 und J2-HS

Sonstige Geräte:

Amicon Ultrafiltrationszelle mit Filtermembran YM-10 und YM-30
Autoklav MM München 25 mit Dampfkessel (TRD) 601
Beckmann Szintillationsmessgerät LS-8000
Beckmann 89-60 pH-Meter
Brutschrank, Memmert
French Pressure Cell Press, Aminco SLM Instrument
Keithley Digitalthermometer mit Thermofühler
Kryostaten Haake F3/K und Haake D-87-GH
Kühlschrank Labcool, Sanyo
Magnetrührer Heidolph MR-2000
Metallblockthermostat Reacti-Therm
Mytron Umluftinkubatoren
Molecular Dynamics Storm-860 Phospho Imager
Thermomixer 5436, Eppendorf
Zellaufschlussmaschine, Amherst
Ziegra Eismaschine

2.1.10. Computerprogramme:

Corel Draw 8.0	Corel Corporation Ltd
Corel Photo Paint 8.0	Corel Corporation Ltd
Microsoft Office 7.0	Microsoft
ProtParam Tools	ExpPASy (http://expasy.hcuge.ch)
Sigma Plot 4.01 für Windows 95/NT	Jandel Scientific

2.2. Mikrobiologische Methoden

Zur Anzucht von Bakterien und Hefen wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet.

2.2.1. Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium in einem Umluftinkubator mit Schüttelfunktion (200 Upm). Bei plasmidtragenden Stämmen wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten oder aus Glycerinkulturen angeimpft. Das Wachstum der Bakterien in Flüssigmedium wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Für kürzere Zeiträume wurden *E. coli*-Stämme auf LB-Agar-Platten bei 4°C aufbewahrt. Bei einer längerfristigen Lagerung wurden Glycerinkulturen aus 0,85 ml einer Übernachtskultur mit 0,15 ml 87% (w/v) Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.2. Kultivierung und Konservierung von Hefestämmen

Die Anzucht von *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 30°C in YPD-Medium in einem Umluftinkubator mit Schüttelfunktion (200 Upm). Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von YPD-Agar-Platten oder aus Glycerinkulturen angeimpft. Das Wachstum der Hefen in Flüssigmedium wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Für kürzere Zeiträume wurden *S. cerevisiae* Stämme auf YPD-Agar-Platten oder als Flüssigkulturen in YPD-Medium bei 4°C aufbewahrt. Bei einer längerfristigen Lagerung wurden Glycerinkulturen aus 0,85 ml einer Übernachtskultur mit 0,15 ml 87% (w/v) Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3. Molekularbiologische Methoden

Zu molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Agarosegele wurden nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) unter Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Hierfür wurde 1% (w/v) Agarose durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst. Die Proben wurden mit 1/10 ihres Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und anschließend mit einer konstanten Spannung von 100V elektrophoretisch getrennt. Die DNA wurde nach dem Lauf mittels Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und das Ergebnis fotografiert. Anhand des mitgelaufenen λ /BstEII-Standards wurden die Größen der getrennten Fragmente abgeschätzt.

2.3.2. Isolierung und Reinigung von DNA

2.3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Stämmen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Vorschrift der Firma Promega mit dem *Promega Wizard Plasmid Miniprep Kit* durchgeführt.

2.3.2.2. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde die DNA in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die zu isolierenden Fragmente wurden unter langwelliger UV-Belichtung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *Qiex II Kit* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben gereinigt.

2.3.3. Enzymatische Modifikation von DNA

2.3.3.1. Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Analytische Restriktionshydrolysen wurden gewöhnlich mit 0,1-0,5 µg DNA und je 5 Units der entsprechenden Restriktionsenzyme in einem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Dabei wurde auf kompatible Pufferbedingungen für beide Restriktionsendonukleasen geachtet. Die Ansätze wurden 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

Präparative Ansätze wurden in einem entsprechend vergrößerten Volumen mit je 20 Units Enzym durchgeführt und für 2 Stunden inkubiert. Die verdaute DNA wurde im Anschluss mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3.3.2. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Plasmid-DNA wurde nach dem Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase behandelt. Diese Reaktion erfolgte im selben Ansatz wie die präparative Restriktionshydrolyse. Dazu wurden nach zehnmütiger Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme bei 75°C und anschließendem Abkühlen dem Ansatz 1/10 Volumen an Phosphatasepuffer und 6 Units alkalische Phosphatase zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde erneut Phosphatase zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA wurde der Verdau anschließend mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* behandelt und konnte so direkt in die Ligation eingesetzt werden.

2.3.3.3. Ligation

Ligationen wurden mit etwa 200 ng geschnittener Plasmid-DNA nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase, geschnittenem Insert in drei- bis fünffach molarem Überschuss und 3 Units T4-DNA-Ligase bei 4°C über Nacht durchgeführt.

2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die von Mullis & Faloona (1987) entwickelte Polymerasekettenreaktion wurde anstelle der standardmäßig verwendeten Taq-Polymerase die Pwo-Polymerase eingesetzt. Diese zeichnet sich gegenüber der Taq-Polymerase durch erhöhte Zuverlässigkeit aus, da sie eine *proof-reading* Eigenschaft besitzt. Ein Standardreaktionsansatz von 100 µl enthält:

- je 100 pmol Primer (Start und Stop Primer)
- 20-100 ng Template-DNA
- je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- 2,0 mM MgCl₂
- 2,5 U Polymerase
- 10 µl vom Hersteller mitgelieferter 10x Reaktionspuffer
- steriles bidestilliertes Wasser ad 100 µl

Die Amplifizierung erfolgte zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen und Aktivitätsverluste der Polymerase als *hot start* unter folgenden Bedingungen:

Hot Start:	95°C	5 min, dann Zugabe der Pwo-Polymerase
Denaturierung:	95°C	30 sec
Annealing:	60°C	45 sec
Synthese:	72°C	1 min
Zahl der Zyklen:	36	

Der Syntheseschritt im letzten Amplifikationszyklus wurde auf 4 min ausgedehnt, um die Reaktion zu vervollständigen.

Der Erfolg der PCR wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft, das gewünschte Produkt aus dem Gel isoliert und mit dem *Gene Clean Kit* gereinigt.

2.3.5. Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation von *E. coli*-Stämmen mit Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Chung *et al.* (1989) durchgeführt. Diese Methode liefert eine Ausbeute von etwa 100 Transformanden pro μg Plasmid-DNA. Die transformationsfähigen Zellen können bei -70°C aufbewahrt werden und stehen somit schnell für eine Transformation zur Verfügung.

2.3.6. Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten

Zur Sequenzierung wurden ca. 7 μg PEG-gefällter Plasmid-DNA eingesetzt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

2.4. Präparative Methoden

Alle Proteinreinigungen wurden bei 4°C durchgeführt. Besonders zu Beginn jeder Reinigung wurden den Proteinlösungen ausreichend Proteaseinhibitoren zugesetzt. Nach jedem Reinigungsschritt wurde der Erfolg der Reinigung auf einem coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert und die gewünschten Proteinfractionen zur Weiterverarbeitung vereinigt. Der Reinheitsgrad der endgültigen Proteinpräparation wurde mit Hilfe eines silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgels abgeschätzt.

2.4.1. Reinigung von humanem p23 (hp23)

Die Reinigung von humanem p23 erfolgte nach der leicht modifizierten Reinigungsvorschrift von Buchner *et al.* (1998a).

Dazu wurde LB_{amp}-Medium mit 1/50 Volumen einer Übernachtskultur des expressionsplasmidtragenden *E. coli*-Stammes BL21(DE3)pLysS/pET23a-hp23 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (200 Upm) inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 wurde in den Kulturen die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Induktion erfolgte für drei Stunden bei einer reduzierten Inkubationstemperatur von 25°C. Im Anschluß wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, 5000 Upm, 5 min, 4°C, GS3) geerntet, durch Resuspension in PBS-Puffer gewaschen und nochmals abzentrifugiert (Sorvall, 5000 Upm, 5 min, 4°C, GS3). Die so erhaltenen Zellpellets wurden dann in Reinigungspuffer (1/20 des ursprünglichen Kulturvolumens) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Lyse der Zellen erfolgte beim anschließenden Auftauen bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation des Zellhomogenisats (Sorvall, 20000Upm, 60 min, 4°C, SS34) wurde humanes p23 aus der löslichen Proteinfraction nach folgendem Protokoll isoliert:

1. Anionenaustauscherchromatographie:

Die lösliche Fraction des Zellhomogenisats wurde auf eine DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen. Humanes p23 eluierte im Salzgradienten (0-0,5 M KCl in Reinigungspuffer) bei ca. 0,3 M KCl von der Säule.

2. Ammoniumsulfatpräzipitation:

Die vereinigten hp23-haltigen Fractionen aus der DEAE-Chromatographie wurden in 2,5 M Ammoniumsulfat präzipitiert. Humanes p23 verblieb dabei im löslichen Überstand und wurde durch Zentrifugation (Sorvall, 20000 Upm, 60 min, 4°C, SS34) von den präzipitierten Proteinen abgetrennt.

3. Anionenaustauscherchromatographie:

Der lösliche Überstand aus der Ammoniumsulfatpräzipitation wurde nach Dialyse gegen Reinigungspuffer auf eine Resource-Q-Säule aufgetragen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit einem KCl-Gradienten von 0-0,5 M in Reinigungspuffer, wobei humanes p23 bei 0,35-0,4 M KCl von der Säule gelöst wurde.

4. Gelfiltration:

Die vereinigten hp23-haltigen Fraktionen aus der Resource-Q-Chromatographie wurden aufkonzentriert und auf eine Superdex-75-pg-Säule aufgetragen. Nach der Gelfiltration wurden die Fraktionen, die zur Homogenität gereinigtes hp23 enthielten, gegen Aufbewahrungspuffer dialysiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Die beschriebene Reinigungsvorschrift lieferte eine Ausbeute von 5 mg/l Bakterienkultur.

2.4.2. Reinigung von Δ p23

Die Reinigung von Δ p23 aus dem expressionsplasmidtragenden *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS/pET17b- Δ p23 erfolgte nach der Vorschrift für die Reinigung von humanem p23 (2.4.1.). Es wurden identische Pufferbedingungen gewählt, mit der Ausnahme, dass die Ammoniumsulfatpräzipitation in 2,25 M Ammoniumsulfat erfolgte. Die Reinigung lieferte eine ähnliche Ausbeute wie die Reinigung von humanem p23.

2.4.3. Reinigung von Hefe-p23 (yp23/Sba1)

Die Reinigung von Sba1 aus dem expressionsplasmidtragenden *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS/pET23a-yp23 erfolgte nach der Vorschrift für die Reinigung von humanem p23 (2.4.1.). Dabei wurden die Pufferzusammensetzungen für die Säulenchromatographien leicht modifiziert (siehe Abschnitt 2.1.8.), wobei jedoch die Salzgradienten zur Elution nicht verändert wurden. Die Ammoniumsulfatpräzipitation wurde in 2 M Ammoniumsulfat durchgeführt. Die Reinigung lieferte eine ähnliche Ausbeute wie die Reinigung von humanem p23.

2.4.4. Reinigung von humanem Hsp90 β

Humanes Hsp90 β wurde aus baculovirus-infizierten Sf9-Zellen gereinigt. Das Protein wurde aus den infizierten Zellen nach dem leicht modifizierten Protokoll von Buchner *et al.* (1998b) isoliert. Dazu wurden die Sf9-Zellpellets gewogen und in 7,5 ml TEN₁₀₀-Puffer pro Gramm Zellpellet resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Inkubationsphase auf Eis, um ein ausreichendes Quellen der Sf9-Zellen zu gewährleisten, wurde die Zellsuspension unter Kühlung durch sanftes, gleichmäßiges Pottern (50 Wiederholungen) aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden von den löslichen Proteinen durch Zentrifugation

(Sorvall, 12000 Upm, 30 min, 4°C, SS34) abgetrennt. Die Aufreinigung der Proteinlösung erfolgte in folgenden Schritten:

1. Anionenaustauscherchromatographie:

Die lösliche Fraktion des Sf9-Zellaufschlusses wurde auf eine Q-Sepharose-Fast-Flow-Säule aufgetragen. Humanes Hsp90 β eluierte im Salzgradienten von TEN₁₀₀ – TEN₁ bei ca. 0,5 M NaCl.

2. Hydroxylapatitchromatographie:

Nach Dialyse gegen KP-1-Puffer wurden die Hsp90-haltigen Fraktionen aus der Anionenaustauscherchromatographie auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen. Unter ansteigenden Kaliumphosphatkonzentrationen (KP-1 bis KP-3) eluierte Hsp90 bei ca. 0,2 M Kaliumphosphat von der Säule.

3. Gelfiltration:

Die Hsp90-enhaltenden Fraktionen aus der Hydroxylapatitchromatographie wurden aufkonzentriert und auf eine Superdex-200-pg-Säule aufgetragen. Nach der Gelfiltration wurden die Fraktionen, die zur Homogenität gereinigtes humanes Hsp90 β enthielten, gegen Aufbewahrungspuffer dialysiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei –70°C gelagert. Die beschriebene Reinigungsvorschrift lieferte eine Ausbeute von 10 mg/g Sf9-Zellpellet.

2.4.5. Reinigung von Hefe-Hsp90 (Hsp82)

Hsp82 wurde nach der leicht modifizierten Vorschrift von Buchner *et al.* (1998b) gereinigt. Dazu wurde YPD-Medium mit einer Vorkultur des Hsp82 überexprimierenden *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes JC6a angeimpft. Die Inokulation erfolgte mit 25 ml Vorkultur pro Liter Endvolumen. Nach Inkubation der Hefekultur unter Schütteln (200 Upm) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 2 wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckmann, 5000 Upm, 10 min, 4°C, JA-10) abgeerntet. Die Hefezellen wurden dann durch Resuspension in Lysepuffer gewaschen, abzentrifugiert (Beckmann, 5000 Upm, 10 min, 4°C, JA-10) und die so erhaltenen Zellpellets nochmals in Lysepuffer (2,5 ml/g Hefezellen) aufgenommen. Der Aufschluß der Hefezellen erfolgte durch zwei Zyklen in der Zellaufschlussmaschine (2,5 kbar), wobei die Zellsuspension zwischen den Passagen dreimal für je 20 s mit Ultraschall behandelt wurde. Nach Zentrifugation des Zellhomogenisats (Beckmann, 18000 Upm, 50 min,

4°C, JA-25.10) wurde Hsp82 aus der löslichen Proteinfraction nach folgendem Protokoll isoliert:

1. Anionenaustauscherchromatographie:

Die Proteinlösung wurde auf eine DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde ein Salzgradient von 0,05 M bis 0,4 M NaCl angelegt. Hsp82 eluierte im Bereich von 0,2 M NaCl von der DEAE-Sephacel-Säule.

2. Kationenaustauscherchromatographie:

Nach Dialyse gegen NaP-Puffer wurden die vereinigten Fraktionen aus der DEAE-Chromatographie auf eine S-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte bei einem pH Wert von 5,5, um den Anteil der an die Säule bindenden Proteine zu erhöhen. Hsp82 wurde aufgrund seines niedrigen isoelektrischen Punktes nicht an die Säule gebunden und befand sich im Durchlauf und in den Waschfraktionen der Säulenchromatographie. Mit 1 M HEPES/KOH-Puffer, pH 8,0 wurden die eluierten Fraktionen unmittelbar nach der Chromatographie auf einen physiologischen pH-Wert zurücktitriert.

3. Hydroxylapatitchromatographie:

Die vereinigten Durchlauf- und Waschfraktionen aus dem letzten Chromatographieschritt wurden nach Dialyse gegen KP-1-Puffer auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen. Unter ansteigenden Kaliumphosphatkonzentrationen (KP-1 bis KP-3) eluierte Hsp82 bei ca. 0,2 M Kaliumphosphat von der Säule.

4. Gelfiltrationschromatographie:

Die Hsp82 enthaltenden Fraktionen aus der Hydroxylapatitchromatographie wurden aufkonzentriert und auf eine Superdex-200-pg-Säule aufgetragen. Nach der Gelfiltration wurden die Fraktionen, die zur Homogenität gereinigtes Hsp82 enthielten, gegen Aufbewahrungspuffer dialysiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Die beschriebene Reinigungsvorschrift lieferte eine Ausbeute von 0,5 mg/g Zellpellet.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die vorliegende Arbeit wurden 10 und 15%ige SDS-Polyacrylamidgele mit Trenn- und Sammelgel hergestellt (modifizierte Methode nach Fling & Gregerson, 1986). Außerdem wurden zur Analyse der Quervernetzungsexperimente kommerziell erhältliche, gebrauchsfertige Tris-Glycin Gradientengele (Novex, San Diego) benutzt. Bei der Probenvorbereitung wurden die Ansätze mit 1/5 ihres Volumens 5x Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde β -Mercaptoethanol verwendet (Laemmli, 1970; Hannes & Rickwood, 1982). Vor dem Auftragen wurden die Proteine durch Erhitzen (1 min, 95°C) denaturiert.

Falls erforderlich wurden zur Aufkonzentrierung oder Entsalzung der Proteinproben vor SDS-PAGE diese einer TCA-Präzipitation unterzogen. Dazu wurde der auszufällenden Probe eiskalte TCA zu einer Endkonzentration von 10% zugesetzt. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 Upm, 5 min, 4°C). Die Proteinpellets wurden mit eiskaltem 80%igem Aceton gewaschen und zur Beladung des Gels im gewünschten Volumen einfachen Laemmlipuffers (+ β -Mercaptoethanol) aufgenommen.

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel. Um das Molekulargewicht der einzelnen Proteine abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsstandard auf die Gele aufgetragen.

2.5.2. Färbemethoden

Zur Färbung der Proteingele wurden zwei verschiedene Färbeverfahren eingesetzt. Zum einen die hoch empfindliche Silberfärbung (Nachweisgrenze: 10 ng) und die Färbung nach Fairbanks, deren Nachweisgrenze bei 100 ng liegt.

2.5.2.1. Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach der Vorschrift von Heukeshoven & Dernick (1988) durchgeführt. Es wurde folgendes Färbeprotokoll verwendet:

Fixierer 1:	10-30 min	30 % (v/v) Ethanol, 10% Essigsäure
Fixierer 2:	30-60 min	2 ml 25% Glutaraldehyd, 0,1 g Natriumdithiosulfat ad 100 ml mit 0,4 M Natriumacetat, 0,5 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol
Waschen:	3 x 10 min	H ₂ O
Färbelösung:	45 min	0,5 ml 1,2 M Silbernitratlösung, 25 µl Formaldehyd (37 % (w/v)) ad 100 ml mit H ₂ O bidest.
Entwickler:	1-5 min	5 g Natriumcarbonat (wasserfrei), 75 µl Formaldehyd (37 % (w/v)) ad 200 ml mit H ₂ O bidest.
Stopplösung:	≥10 min	50 mM EDTA, pH 7,5

2.5.2.2. Färbung nach Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971)

Nach dieser Färbemethode werden die SDS-Polyacrylamidgele in Lösung A gefärbt und dann schrittweise in den Lösungen B, C und D entfärbt. Durch kurzes Aufkochen der Proteingele können die Inkubationszeiten in den verschiedenen Lösungen, abweichend von der Originalvorschrift (2 h färben und jeweils 1 h entfärben) auf etwa 10 min verkürzt werden.

Färbe- und Entfärbelösungen:

Lösung A: 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) techn. Eisessig, 0,05% (w/v) Coomassie Blau R

Lösung B: 10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) techn. Eisessig, 0,005% (w/v) Coomassie Blau R

Lösung C: 10% (v/v) techn. Eisessig, 0,002% (w/v) Coomassie Blau R

Lösung D: 10% (v/v) techn. Eisessig

2.5.3. Immunoblotting

Western Blots wurden in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur durchgeführt (Khyse-Anderson, 1984). Die Dauer des Blotvorganges betrug 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm². Mit Hilfe der reversiblen Ponceau-S-Färbung wurde der Transfererfolg überprüft (Salinovich & Montelaro, 1986). Anschließend erfolgte der Nachweis der Proteine mittels immunspezifischer Färbung nach folgendem Protokoll (modifiziert nach Blake *et al.*, 1984):

Absättigung der Membran mit 5% Milchpulver in PBS-0,05% Tween

Inkubation mit primärem Antikörper (1:500 – 1: 5000 verdünnt in PBS-0,05% Tween mit 1% Milchpulver) für 90 min

Waschen mit PBS-0,1% Tween für 5 x 5 min

Inkubation mit sekundärem Antikörper (1:1000 – 1: 4000 verdünnt in PBS-0,05% Tween mit 1% Milchpulver) für 45 min

Waschen mit PBS-0,1% Tween für 5 x 5 min

Nachweis der immunspezifisch gefärbten Banden mit dem ECL System nach Vorschrift des Herstellers

2.5.4. Proteinbestimmungsmethoden

2.5.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde die Färbelösung (Coomassie Protein Assay Reagent) 1:2 mit H₂O bidest verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 1 ml mit 100 µl Probe versetzt. Die Ansätze wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend deren Absorption bei 595 nm bestimmt. Es wurde eine Eichkurve mit BSA erstellt, wobei die exakte BSA-Konzentration photometrisch bei 280 nm ermittelt wurde (BSA: $A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%} = 0,667$).

2.5.4.2. Proteinbestimmung durch UV-Absorption (modifiziert nach Wetlaufer, 1962)

Die Konzentration zur Homogenität gereinigter Proteine wurde präferentiell durch UV-Absorption ermittelt. Dazu wurde die Proteinprobe zunächst zentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 Upm, 15 min, 4°C). Die Absorption des löslichen Überstandes wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen. Aus der Aminosäurezusammensetzung des zu analysierenden Proteins wurde mit Hilfe des Programms ProtParam die UV-Absorption bei 280 nm einer 0,1% Lösung (bei 1 cm Schichtdicke der Küvette) dieses Proteins bestimmt (nach Wetlaufer, 1962). Mit diesen Parametern wurde dann die Konzentration der vermessenen Proteinprobe errechnet. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten, selbstgereinigten Proteine wurden folgende Absorptionswerte von ProtParam errechnet:

Protein	$A_{280 \text{ nm}, 0,1\%}$	Protein	$A_{280 \text{ nm}, 0,1\%}$
Humanes Hsp90β	0,65	N210	0,56
Hsp82	0,66	N272	0,43
Humanes p23	1,67	N386	0,78
sba1	1,19	N451	0,72
Δp23	2,02	N527	0,70

2.6. Spektroskopische Methoden

Bei allen spektroskopischen Untersuchungen wurden die aufgenommenen Spektren gegen eine Pufferreferenz korrigiert, deren Zusammensetzung der zu vermessenden Probe entsprach, wobei jedoch das Protein gegen ein äquivalentes Volumen an Puffer ersetzt wurde.

2.6.1. Absorptionsspektroskopie

Proteine absorbieren Licht im UV-Bereich des Spektrums. Im Wellenlängenbereich von 180 bis 240 nm wird die Absorption der Proteine durch die Carbonylgruppen der Peptidbindungen bestimmt, während im Bereich von 250 bis 300 nm insbesondere die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie in geringem Maße Disulfidbrücken absorbieren. Der Absorptionsanteil der drei aromatischen Aminosäuren ist dabei unterschiedlich groß, da sie sich sowohl in ihrem molaren Extinktionskoeffizienten als auch in der maximalen Absorptionswellenlänge unterscheiden.

Zur Vorbereitung auf die Spektrenaufnahme wurden die Proteinlösungen über Nacht gegen den entsprechenden Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 Upm, 15 min, 4°C) und der lösliche Überstand wurde in Quarz-UV-Küvetten vermessen. UV-Absorptionsspektren wurden in der Regel im Wellenlängenbereich von 400 bis 240 nm bei 25°C aufgenommen. Aus dem Wert der UV-Absorption bei 280 nm konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden (siehe 2.5.4.2.). Aus dem Verhältnis der Absorption bei 280 nm und 260 nm ($A_{280/260}$) ließ sich der Grad der Verunreinigung der Proteinlösung durch Nukleotide abschätzen. Das Vorhandensein von Aggregaten wurde, falls vorhanden, durch eine Grundliniendrift oberhalb von 300 nm angezeigt.

2.6.2. Circular dichroismus-(CD)-Messungen

Unter Circular dichroismus versteht man die unterschiedliche Absorption von links und rechts polarisiertem Licht durch optisch aktive Moleküle. Je nach Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes unterscheidet man beim Circular dichroismus zwei Bereiche:

- Die Fern-UV- oder Amidregion erstreckt sich von 170 bis 250 nm. CD-Spektren in diesem Bereich enthalten Informationen über die Anordnung der Peptidbindungen und somit die Sekundärstruktur eines Proteins. Charakteristische Signale sind ein Doppelminimum bei 208 und 222 nm, welches auf α -Helices zurückzuführen ist, und

ein weniger ausgeprägtes Minimum bei 218 nm, welches auf β -Faltblattstrukturen hinweist (Schmid, 1989).

- CD-Banden im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm) werden beobachtet, wenn aromatische Seitenketten Teil einer asymmetrischen Struktur darstellen, wie es im gefalteten Protein der Fall ist. Anders als im Fern-UV-Bereich können diese Banden jedoch nicht definierten Strukturelementen zugeordnet werden. Ebenso wie ein Infrarotspektrum liefern sie jedoch einen „Fingerabdruck“ für ein spezielles Protein (Schmid, 1989).

CD-Signale werden als Elliptizität Θ in Grad angegeben. Standardisierung in molare Elliptizität erfolgt durch folgende Formel:

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MRW}{c \cdot d} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A}$$

mit:	Θ_{MRW} :	Elliptizität der Aminosäure (Grad x cm ² x d mol ⁻¹)
	Θ :	gemessene Elliptizität
	MRW :	mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren
	c :	Konzentration der Proteinlösung (mg/ml)
	d :	Schichtdicke der Küvette (cm)
	M_r :	Molekulargewicht (g/mol)
	N_A :	Anzahl der Aminosäuren je Proteinkette

In der vorliegenden Arbeit wurden Fern-UV-CD Spektren von hp23 und durch proteolytischen Verdau identifizierten Fragmenten von hp23 erstellt. Zur Vorbereitung auf die Spektrenaufnahme wurden die Proteine über Nacht gegen 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 dialysiert und die dialysierte Proteinlösung im Anschluss abzentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 Upm, 15 min, 4°C). Fern-UV-CD Spektren wurden in thermostatisierten Quarz-Küvetten (20°C) mit einer Schichtdicke von 0,1 cm im Wellenlängenbereich von 250 bis 200 nm aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug dabei 0,2 mg/ml.

Um den Einfluß erhöhter Temperaturen auf die strukturelle Integrität der Proteine zu untersuchen, wurde deren CD-Signal bei einer ausgesuchten Wellenlänge vermessen, während die Proteinlösung mit einer konstanten Heizrate von 0,5°C/min im Bereich von 20°C bis 80°C

erwärmt wurde. Im Anschluß wurde die Proteinlösung mit derselben Geschwindigkeit abgekühlt, um die Reversibilität des Prozesses zu überprüfen.

2.6.3. Lichtstreuungsmessungen

Aggregation von Proteinen infolge thermischer oder chemischer Denaturierung wurde mit Hilfe von Lichtstreuungsmessungen verfolgt. Die Messungen erfolgten entweder im Absorptionsspektrophotometer oder im Fluoreszenzspektrophotometer, wobei im letzteren Fall die Anregungs- und Emissionswellenlängen gleich gewählt wurden. Um ein Absinken der Aggregate zu vermeiden, erfolgten die Messungen, wenn möglich, unter konstantem Rühren. Die Versuche wurden in thermostatisierbaren Küvettenhaltern durchgeführt und die Temperatur wurde in einer Referenzküvette überprüft. Die genauen Parameter der jeweiligen Experimente sind im entsprechenden Teil dieser Arbeit beschrieben (siehe 2.9.1.2., 2.9.2., 2.9.3., 2.9.4.).

2.7. Proteolytische Spaltung von Proteinen

Die proteolytische Spaltung zur Erzeugung stabiler Fragmente von humanem p23 wurde entweder mit Proteinase K oder mit Trypsin durchgeführt. Das zu spaltende Protein wurde dazu in 40 mM Hepes/KOH-Puffer, pH 7,5, 5 mM EDTA inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug 0,1 mg/ml in einem Endvolumen von 100 µl. Die Spaltreaktion wurde durch Zugabe eines molaren Unterschusses an Protease gestartet (bei Proteinase K 4000-facher Unterschuss, bei Trypsin 50-facher Unterschuss). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots von 19 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen, in denen durch Zugabe von 1 µl Complete™ Protease Inhibitorlösung die Proteolyse gestoppt wurde. Die Aliquots wurden im Anschluss auf einem 12,5 – 20%igen SDS-PAGE Gradientengel analysiert.

2.8. Chemische Quervernetzung von Proteinen

Zur Analyse der Wechselwirkung von Proteinen untereinander wurden die zu untersuchenden Proteine chemisch quervernetzt. Als quervernetzendes Reagenz wurde der thiolspaltbare Crosslinker Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP) verwendet, welcher Proteine in einer zu Glutaraldehyd vergleichbaren Reaktion über deren Lysinseitenketten kovalent miteinander verknüpft. Die Reaktion wurde in 40 mM Hepes/KOH, pH 7,5, 10 mM MgCl₂ in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Konzentrationen der zu vernetzenden Proteinkomponenten lagen dabei zwischen 0,2 und 0,4 mg/ml. Je nach Testreihe

wurden den Reaktionsansätzen weitere Komponenten beigefügt, um optimale Vernetzungsbedingungen zu erhalten (siehe Bildunterschriften). Die Proteine wurden bei 30°C für 30 min inkubiert um eine ausreichende Komplexbildung zu gewährleisten. Anschließend wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von DSP zu einer Endkonzentration von 250 µM gestartet und die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur fortgesetzt. Der Stopp der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines Überschusses an Tris/HCl (pH 8.0), wodurch freie, noch nicht reagierte DSP-Moleküle abgefangen und inaktiviert wurden. Die quervernetzten Ansätze wurden im Anschluss durch SDS-PAGE auf 4 – 12%igen Gradientengelen analysiert.

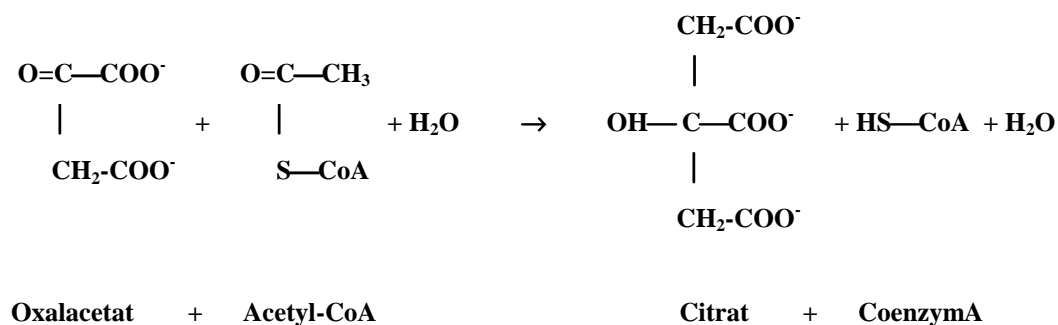
2.9. Chaperon-Assays

In der vorliegenden Arbeit wurden Aktivitätstests und Aggregationsmessungen an Substratproteinen durchgeführt, die denaturierenden Bedingungen ausgesetzt waren. Ziel dieser Experimente war es, den Einfluß von p23 auf den Aktivitätsverlust und das Aggregationsverhalten dieser nicht-nativen Substratproteine zu untersuchen. Als Modellsubstrate wurden dabei folgende Proteine gewählt:

2.9.1. Chaperon-Assays mit Citratsynthase (CS) als Substratprotein

2.9.1.1. Citratsynthase-Aktivitätstest

Citratsynthase aus Schweineherz ist ein Enzym der mitochondrialen Matrix und liegt nativ als Homodimer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 48900 Da vor. Das Enzym katalysiert im Citratzyklus die Umwandlung von Oxalacetat, Acetyl-CoA und Wasser zu Citrat und Coenzym A. Diese Reaktion stellt eine Aldolkondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citryl-CoA dar, der sich die Hydrolyse von Citryl-CoA zu Citrat und CoA-SH anschließt.



Die freien SH-Gruppen am Coenzym A, die bei dieser Reaktion entstehen, werden im Aktivitätstest mit DTNB, einem Thiolnachweisreagenz, nachgewiesen. Die durch die Thiobenzole entstehende Gelbfärbung wird im Photometer bei 412 nm gemessen.

Im Aktivitätstest wurde die thermische Inaktivierung der Citratsynthase sowie der Einfluß von p23 auf diese untersucht (Buchner *et al.*, 1998c). Die Citratsynthase (15 µM Stammlösung bezogen auf das Monomer) wurde 1:100 im Testansatz verdünnt und bei 43°C inkubiert. Zur Inaktivierung wurde das zu untersuchende Protein in unterschiedlichen Konzentrationen beigegeben. Je 20 µl wurden zu definierten Zeitpunkten entnommen und sofort in den Aktivitätstest eingesetzt. Die Inaktivierungskinetiken wurden in 40 mM Hepes/KOH, pH 7,5 durchgeführt.

Folgende Reagenzien wurden für den Test in Halbmikroplastikküvetten vorgelegt und auf 25°C temperiert:

- 0,93 ml 50 mM TE-Puffer pH 8,0
- 0,01 ml 10 mM DTNB (in TE-Puffer pH 8,0)
- 0,01 ml 10 mM Oxalacetat (in 50 mM Tris)
- 0,03 ml 5 mM Acetyl-CoA (in TE-Puffer, pH 8,0)

Die spezifische Aktivität der Citratsynthase konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{spez. Akt.} = \Delta E / \text{min} \times V / (\epsilon \times d \times v \times c)$$

V = Testvolumen [ml]

ε = molarer Extinktionskoeffizient [= 13600 l/M x cm]

d = Schichtdicke [cm]

v = Probenvolumen [ml]

c = Konzentration des Enzyms [mg/ml]

Zur Interpretation der Werte wurde die Aktivität der nativen Citratsynthase zum Zeitpunkt Null gleich 100 % gesetzt.

2.9.1.2. Citratsynthase-Aggregationstest

Mitochondriale Citratsynthase eignet sich auch als Modellsubstrat für Aggregationsmessungen, da dieses Protein bereits bei 43°C unter Aggregatausbildung irreversibel denaturiert. Diese Aggregatbildung kann photometrisch oder

spektrofluorometrisch bestimmt werden, da sie zu vermehrter Lichtstreuung der Proteinlösung führt (Jakob *et al.*, 1995; Buchner *et al.*, 1998c)

Zur Messung im Spektrofluorometer wurde eine Stammlösung mitochondrialer Citratsynthase (30 μM in TE-Puffer bezogen auf das Monomer) 1:200 in den 1,5 ml Inkubationsansatz (40 mM Hepes/KOH, pH 7,5) verdünnt. Die Aggregation der Citratsynthase bei 43°C wurde in thermostatisierbaren Küvettenhaltern bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 500 nm (Spaltbreite 2 nm) kontinuierlich über einen Zeitraum von 30 min verfolgt. p23 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen im Inkubationsansatz vorgelegt.

Die Messung von Citratsynthaseaggregation im Absorptionsspektrophotometer wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll durchgeführt. Demnach wurde der Reaktionsansatz auf ein Volumen von 120 μl reduziert und die CS-Konzentration in der Küvette auf 4 μM abgeändert. Die von der aggregierenden CS ausgelöste Lichtstreuung wurde bei 360 nm im Photometer verfolgt.

2.9.2. Malatdehydrogenase-Aggregationstest

Malatdehydrogenase (MDH), ein mitochondriales Enzym des Citratzyclus, ist ein Homodimer aus 35000-Da-Untereinheiten. MDH wird wie CS häufig in Chaperon-Assays eingesetzt, da Inkubation bei 37°C zu Aktivitätsverlust und Aggregation des Proteins führt (Hartman *et al.*, 1993).

Der Einfluß von p23 auf die temperaturinduzierte MDH-Aggregation wurde bei 46°C vermessen, da sich diese Temperatur in Vorversuchen als günstig erwiesen hatte, um geeignete Aggregationskinetiken zu erhalten. Die Messung erfolgte im Spektrofluorometer analog zum Citratsynthase-Aggregationstest (2.9.1.2.), wobei die Anregungs- und Emissionswellenlängen auf 360 nm (Spaltenbreite 2 nm) verschoben wurden. Die MDH-Konzentration in der Küvette betrug 200 nM (bezogen auf das Monomer).

2.9.3. α -Glucosidase-Aggregationstest

α -Glucosidase aus *S. cerevisiae* ist ein monomeres Protein mit einer molekularen Masse von 68000 Da. Wie CS oder MDH wird α -Glucosidase bei erhöhten Temperaturen rasch inaktiviert, und die inaktiven Moleküle zeigen eine starke Tendenz zur Aggregation (Höll-Neugebauer & Rudolph, 1991).

Der Einfluß von p23 auf die Aggregation von α -Glucosidase wurde bei 49°C vermessen. Die anderen Parameter des Experiments sind dieselben wie beim Malatdehydrogenase-Aggregationsassay mit der Ausnahme, dass die Aggregationsreaktion in 0,1 M Tris/Cl, pH 7,6 durchgeführt wurde. Die Proteinkonzentration in der Küvette betrug wie beim CS-Aggregationsassay 150 nM.

2.9.4. Insulin-Aggregationstest

Insulin liegt in seiner aktiven Form als Heterodimer aus zwei Polypeptidketten vor, die miteinander durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Ein Aufbrechen dieser Disulfidbrücken durch Reduktionsmittel wie DTE führt zur Aggregation der 30 Aminosäure langen B-Kette des Moleküls, während die A-Kette in Lösung bleibt (Sanger, 1949). Folglich kann ähnlich wie bei Citratsynthase, Malatdehydrogenase oder α -Glucosidase der Einfluß von Chaperonen auf das Aggregationsverhalten der reduzierten Insulinkette getestet werden. Dabei bietet der Insulinassay jedoch den Vorteil, dass er bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Insulin-Aggregationstests in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 und 100 mM KCl durchgeführt. Die durch Aggregation hervorgerufene Trübung der Lösung wurde bei 650 nm in einem Spektrophotometer verfolgt, das mit einer Temperaturkontrolleinheit ausgestattet war. 45 μ M Insulin in einem Endvolumen von 120 μ l wurden bei 30°C mit verschiedenen Konzentrationen an p23 vorinkubiert. Die Aggregationsreaktion wurde durch die Zugabe von DTE zu einer Endkonzentration von 20 mM gestartet und über einen Zeitraum von 30 min vermessen.

2.10. ATPase-Aktivitätstests

ATPase-Aktivitätsbestimmungen von humanem Hsp90, Hsp82 und Hsp82-Fragmenten wurden nach der Methode von Kornberg *et al.* (1978) durchgeführt. Dabei wird die Hydrolyse von an der α -Phosphatgruppe radioaktiv markiertem ATP zu ADP und Phosphat vermessen. Die Methode von Kornberg zeichnet sich gegenüber anderen üblichen ATPase-Aktivitätstests durch hohe Sensitivität aus. Zudem bietet sie den Vorteil, dass der ATP-Hydrolyse keine weiteren Reaktionen nachgeschaltet werden müssen, um ein messbares Signal zu erhalten, wie es bei gekoppelten enzymatischen Tests der Fall ist.

2.10.1. Steady-State Hydrolyse-Messungen

Zur Bestimmung der Steady-State Hydrolyserate von Hsp90 wurde das Protein, wenn nicht anders angegeben, in 40 mM Hepes/KOH, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂ verdünnt. Die Hsp90-Konzentration in den Messansätzen betrug dabei zwischen 5 und 20 μM in Endvolumina von 20 bis 60 μl. Die ATPase-Reaktion wurde durch die Zugabe eines Gemisches aus unmarkiertem und radioaktiv markiertem ATP (α-³²P-ATP) gestartet, so dass die ATP-Endkonzentration im Ansatz 2 mM betrug. Üblicherweise enthielt ein Reaktionsansatz zwischen 0,1 und 1 μCi radioaktiv markiertes ATP. Während der Inkubationsphase bei 37°C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots von 3 μl aus dem Reaktionsansatz entnommen, in denen die ATP-Hydrolyse durch Zugabe von 2 μl einer 60 mM EDTA-Lösung gestoppt wurde. 4 μl dieses gestoppten Ansatzes wurden 2,5 cm vom unteren Rand entfernt auf eine PEI-Cellulose Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Chromatographie wurde in 0,5 M LiCl und 2 N Ameisensäure für ca. 25 min durchgeführt. Dabei wurde radioaktiv markiertes ADP vom nicht hydrolysierten radioaktiven ATP aufgrund der unterschiedlichen Ladungsdichte beider Nukleotide abgetrennt. Die Chromatographieplatten wurden unter Rotlicht getrocknet und die ATP- bzw. ADP-Spots wurden mit Hilfe eines Molecular Dynamics Storm 860 Phosphoimagers quantifiziert. Nach Abzug der entsprechenden Nullprobenwerte konnte so die tatsächliche Menge an produziertem ADP nach folgender Formel berechnet werden:

$$\mu M ADP = \frac{counts(ADP) \cdot 2000\mu M}{counts(ATP) + counts(ADP)}$$

2.10.2. Single-Turnover Messungen

Zur Bestimmung der Single-Turnover Hydrolyse-Rate eines Proteins wird üblicherweise ATP im molaren Unterschuss zum Protein zugegeben, um zu gewährleisten, dass die Reaktion nach einem komplett durchlaufenen Zyklus zum Erliegen kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhältnis von Hsp90 zu ATP daher auf 1 : 0,8 eingestellt, wobei die Proteinkonzentrationen im Vergleich zu den Steady-State Messungen signifikant erhöht wurden. Die Durchführung des Experiments verlief nach dem oben beschriebenen Protokoll (2.10.1.1.). Nach der Messung wurde die erhaltene Kinetik nach folgender Gleichung erster Ordnung gefittet, um die Ratenkonstante der Hydrolysereaktion zu erhalten: $y = a(1 - e^{-bx})$

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Charakterisierung der ATPase-Aktivität von Hsp82

3.1.1. Festlegung geeigneter Messparameter für die ATPase-Aktivitätstests

Die für die Messung der durch Hsp90 katalysierten ATP-Hydrolyse-Reaktion beschriebenen Aktivitätstests beruhen üblicherweise auf dem Prinzip des gekoppelten enzymatischen Tests nach Kreuzer und Jongeneel (1983) (Panaretou *et al.*, 1998; Prodromou *et al.*, 1999). Da bei diesem Testverfahren die Beteiligung mehrerer Enzymkomponenten an der Signalentwicklung jedoch eine präzise Charakterisierung der intrinsischen Hsp90-ATPase erschwert, wurden die im Rahmen dieser Doktorarbeit beschriebenen ATPase-Messungen nach der Methode von Kornberg *et al.* (1978) durchgeführt. Dabei wird die Hydrolyse von an der α -Phosphatgruppe radioaktiv markiertem ATP zu ADP und Phosphat vermessen. Nach erfolgter Reaktion können radioaktiv markierte Nucleosiddi- und triphosphate aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität chromatographisch aufgetrennt und quantitativ erfasst werden (siehe Materialien & Methoden 2.10.). An der Signalentwicklung ist somit nur Hsp90 beteiligt, womit diese Methode am geeignetsten schien, um die Einflüsse verschiedener Parameter auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 zu testen.

Zu Beginn wurde die Steady-State-Hydrolyserate von Hefe-Hsp82 ermittelt. Unter diesen Bedingungen liegt das Substrat ATP im hohen molaren Überschuss zu Hsp82 vor, so dass von einer Substratsättigung des Proteins und daraus resultierenden Fließgleichgewichtsbedingungen ausgegangen werden kann. Aufgrund des hohen K_D -Wertes im 100 μ M-Bereich (Panaretou *et al.*, 1998; Scheibel *et al.*, 1997) wurde bei Proteinkonzentrationen von 5 μ M daher eine ATP-Konzentration von 2 mM gewählt. Darüber hinaus waren neben dem für die Katalyse benötigten Magnesium (5 mM) zunächst keine weiteren Salze im Reaktionsansatz vorhanden. Die ATP-Hydrolyse wurde über einen Zeitraum von 150 min bei 37°C verfolgt (Abbildung 3.1). Um auszuschließen, dass die erhaltene Hydrolyserate auf ATPase-aktive Kontaminationen der verwendeten Hsp82-Präparation zurückzuführen ist, wie schon öfter spekuliert worden war (Montel *et al.*, 1999), wurde in einem Kontrollansatz die gleiche Reaktion in Anwesenheit von Geldanamycin durchgeführt (Abbildung 3.1). Da Ansamycine bedeutend höhere Affinitäten zum Hsp90-Molekül aufweisen als Nucleotide (Roe *et al.*, 1999) und die Löslichkeitsgrenze von

Geldanamycin in wässrigen Lösungen 100 μM beträgt (T. Scheibel, persönliche Mitteilung), wurde das molare Verhältnis von Geldanamycin zu Hsp82 auf 5:1 eingestellt. Unter den genannten Bedingungen konnte im Ansatz ohne Geldanamycin ein Turnover von $0,25 \text{ min}^{-1}$ ermittelt werden, was einem massenbezogenen Umsatz von $3,0 \text{ pmol ATP min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ entspricht. Obwohl dieser Wert für k_{cat} relativ niedrig im Vergleich zu anderen ATP-hydrolysierenden Enzymen ist, befindet er sich in derselben Größenordnung wie die ATP-Hydrolyseraten der Hsp70-Familie (Theyssen *et al.*, 1996; McKay, 1993). Dahingegen ist die intrinsische ATPase-Aktivität von Mitgliedern der Chaperonin-Familie wie GroEL mit einem Turnover von ca 6 min^{-1} um den Faktor 20 höher (Viitanen *et al.*, 1990).

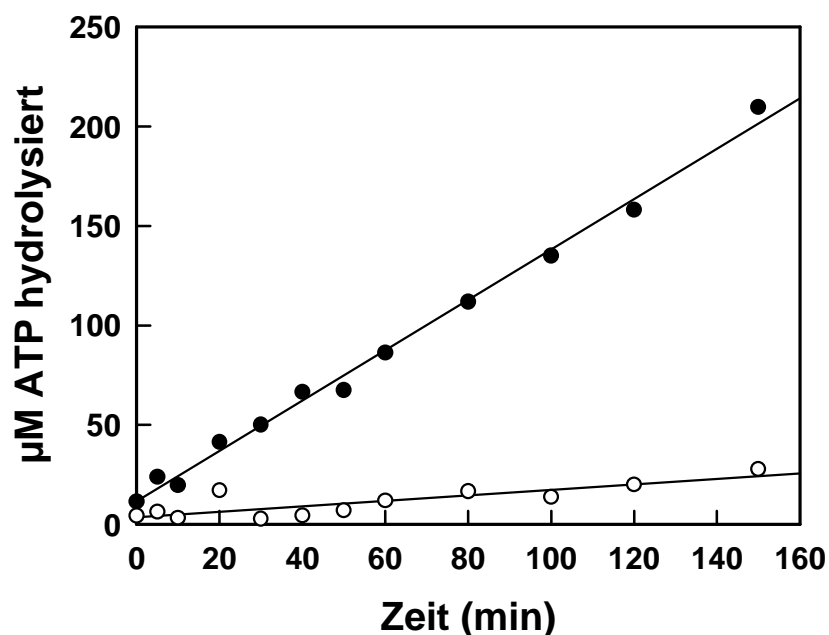


Abbildung 3.1: *Steady-State Hydrolyse von Hsp82*

Steady-State ATP-Hydrolyse von 5 μM Hsp82 in Abwesenheit (●) oder in Anwesenheit (○) von 25 μM Geldanamycin bei 37°C.

Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 5 mM MgCl_2

ATP-Konzentration: 2 mM

Durch die Anwesenheit von Geldanamycin in fünffachem Überschuss wurde die ATPase-Aktivität von Hsp82 fast komplett unterdrückt, wodurch signifikante Kontaminationen mit ATPase-aktiven Enzymen in der verwendeten Hsp82-Präparation ausgeschlossen werden konnten. Eine vollständige Inhibition konnte auch durch Steigerung der Geldanamycin-Konzentration nicht erzielt werden (Daten nicht gezeigt), so dass man von einer quantitativen Komplexierung von Hsp82 mit Geldanamycin unter den gewählten Bedingungen ausgehen kann. Ein Anteil von 1% DMSO im Reaktionsansatz hatte keinen Einfluss auf die intrinsische ATPase-Aktivität von Hsp82 (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die über die Geldanamycin-

Stammlösung eingebrachte DMSO-Konzentration in den ATPase-Ansätzen im folgenden zu 1% oder darunter eingestellt.

3.1.1.1. Kaliumchloridabhängigkeit der Hsp82-ATPase-Aktivität

Für Mitglieder der Hsp60- und Hsp70-Familie konnte eine signifikante Stimulation ihrer intrinsischen ATPase-Aktivität durch die Anwesenheit von monovalenten Kationen wie K^+ , Rb^+ und NH_4^+ nachgewiesen werden (Viitanen *et al.*, 1990; O'Brien & McKay, 1995). Als Folge dieser kationenabhängigen ATPase-Aktivität erwiesen sich auch charakteristische Funktionalitäten beider Chaperonklassen wie die Rückfaltung chemisch denaturierter Ribulosebisphosphatcarboxylase (Rubisco) durch das GroEL-System oder das „Uncoating“ von „Clathrin-Coated Vesicles“ durch Hsc70 als salzabhängig (Viitanen *et al.*, 1990; Schlossmann *et al.*, 1984). Im Ko-Kristall mit dem Hsc70-ATPase-Fragment nehmen Kaliumionen zwei Positionen im aktiven Zentrum ein, die es ihnen erlauben, als spezifische Kofaktoren der ATPase zu fungieren (Wilbanks & McKay, 1995). Es wurde postuliert, dass sowohl der MgATP-Hsc70-Komplex selbst als auch der Übergangszustand der ATPase-Reaktion von diesen beiden Kaliumionen stabilisiert werden kann (Wilbanks & McKay, 1995).

Aus diesen Überlegungen heraus sollte eine mögliche Ionen- bzw. Salzabhängigkeit von Hsp90 überprüft werden. Dazu wurde die ATP-Umsatzrate von Hsp82 unter Steady-State-Bedingungen in Anwesenheit steigender KCl-Konzentrationen bis zu 500 mM ermittelt (Abbildung 3.2). Höhere KCl-Konzentrationen erschweren die dünnschicht-chromatographische Auftrennung der Nukleotide und verfälschen so das Ergebnis des Experiments. Im vermessenen Konzentrationsbereich zeigte die intrinsische ATPase von Hsp82 eine signifikante Abhängigkeit von der Salzkonzentration, so dass bei 500 mM KCl ein Turnover von $0,8 \text{ min}^{-1}$ ermittelt werden konnte. Die Aktivität des Hitzeschockproteins stieg dabei linear an und zeigte kein Sättigungsverhalten. Im Gegensatz dazu sind im isolierten Hsc70-Molekül bei 50 – 75 mM KCl (O'Brien & McKay) und im isolierten GroEL-Molekül bereits bei 1 mM KCl (Viitanen *et al.*, 1990) maximale ATP-Hydrolyseraten erreicht. Die mechanistische Grundlage für diese Salzeffekte im Hsp82-Molekül ist unklar. Der Klärung dieser Frage sollte in jedem Fall die Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes im ATPase-Zyklus vorangehen. Im Anschluss kann die Ursache für den stimulierenden Effekt, den Salze auf diesen Schritt ausüben, untersucht werden. Da für Hsp82 keine optimale KCl-Konzentration ermittelt werden konnte, wurden die nachfolgenden

Messungen in 150 mM KCl durchgeführt, was den physiologischen Bedingungen im Cytosol eukaryontischer Zellen entspricht (Alberts *et al.*, 1994).

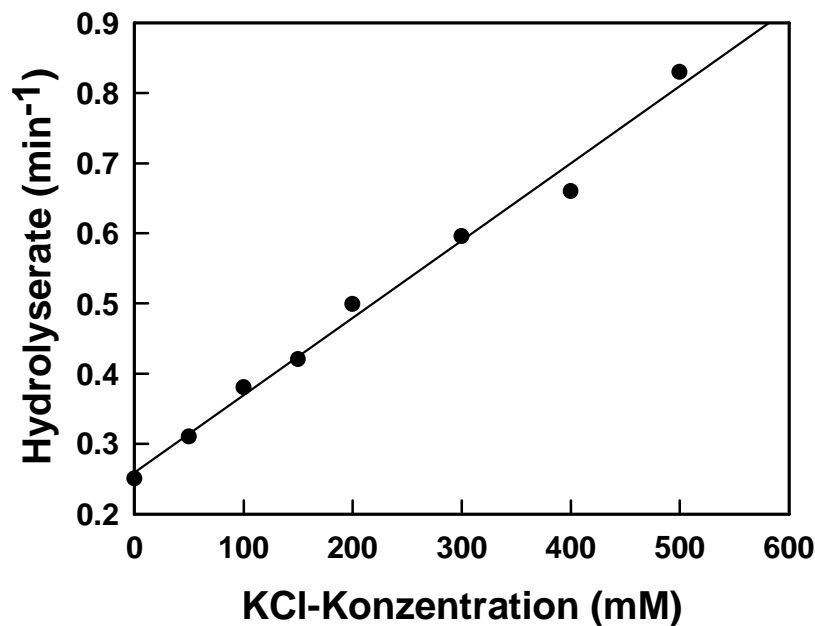


Abbildung 3.2: *KCl-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von Hsp82*
Steady-State Hydrolyseraten von Hsp82 bei ansteigenden KCl-Konzentrationen (37°C)
Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 5 mM MgCl₂
ATP-Konzentration: 2mM

3.1.1.2. Allgemeine Salzabhängigkeit von Hsp82

Wie im Fall anderer K⁺-benötigender Enzyme (Evans & Sorger, 1966; Suelter, 1974), kann das Kalium-Ion in Hsp60- oder Hsp70-abhängigen Reaktion durch Rb⁺ und NH₄⁺, nicht jedoch durch Na⁺, Li⁺ oder Cs⁺ substituiert werden (Viitanen *et al.*, 1990; O'Brien & McKay, 1995). Ein vergleichbarer Zusammenhang konnte jedoch für die ATPase-Aktivität von Hsp82 im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht festgestellt werden (Abbildung 3.3). Vielmehr scheinen sich alle getesteten monovalenten Alkalikationen in ihrem stimulierenden Einfluss auf Hsp82 nur wenig zu unterscheiden. Trotzdem kann die Steigerung der ATPase-Aktivität in Anwesenheit von Salzen nicht ausschließlich auf der erhöhten Ionenstärke des Reaktionsmilieus beruhen, da kein Einfluss von Et₄NCl, welches im Vergleich zu den anderen getesteten Salzen einen signifikant größeren Kationenradius aufweist, auf Hsp82 detektiert werden konnte.

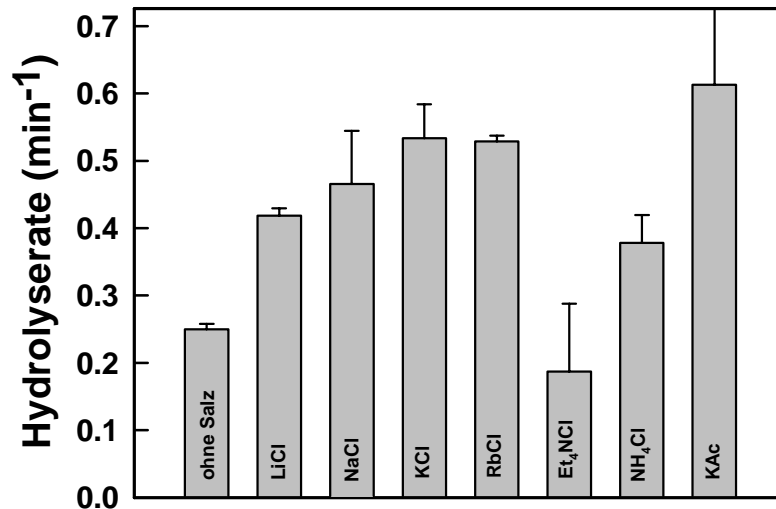
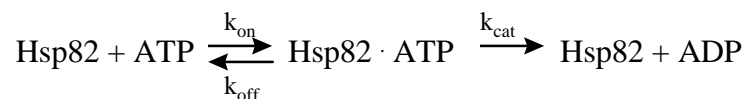


Abbildung 3.3: Allgemeine Salzabhängigkeit der ATPase-Aktivität von Hsp82

Steady-State Hydrolyseraten von Hsp82 in Anwesenheit verschiedener Salze (37°C)
 jeweilige Salzkonzentrationen: 200 mM
 Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 5 mM MgCl₂
 ATP-Konzentration: 2 mM

3.1.1.3. K_M -Wert für die von Hsp82 katalysierte ATP-Hydrolyse

Um zu gewährleisten, dass die gewählte ATP-Konzentration von 2 mM ausreichend ist, um unter Steady-State-Bedingungen eine maximale Umsatzrate zu erhalten, wurde der K_M -Wert für die Hydrolysereaktion nach der Methode von Michaelis-Menten (Michaelis & Menten, 1913) ermittelt. Ausgehend von dem vereinfachten Reaktionsschema



mit:

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad \text{und} \quad K_M = K_D + \frac{k_{\text{cat}}}{k_{\text{on}}}$$

wurde unter Kenntnis des hohen K_D -Wertes für Hsp90 und ATP (Scheibel *et al.*, 1997; Prodromou *et al.*, 1997; Panaretou *et al.*, 1998) ein K_M -Wert ebenfalls im 100 μM -Bereich erwartet.

Zur Ermittlung des K_M -Wertes wurde die ATP-Konzentration in den verschiedenen Ansätzen von 5 μM bis 2000 μM variiert. Die Umsatzraten wurden aus den linearen Anfangsphasen der einzelnen Kinetiken errechnet und graphisch gegen die ATP-Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 3.4a). Aus dem Fit nach folgender Gleichung

$$y = \frac{ax}{b+x}$$

analog zu

$$v = v_{max} \frac{[ATP]}{[ATP] + K_M}$$

ergaben sich für den K_M in Übereinstimmung mit den Erwartungen ein Wert von 300 μM und für v_{max} ein Wert von 0.55 min^{-1} . Ähnliche Parameter wurden bei der Auftragung derselben Messdaten nach Eadie-Hofstee ermittelt (Abbildung 3.4b). Hier kann v_{max} aus dem Y-Achsenabschnitt und K_M aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt werden.

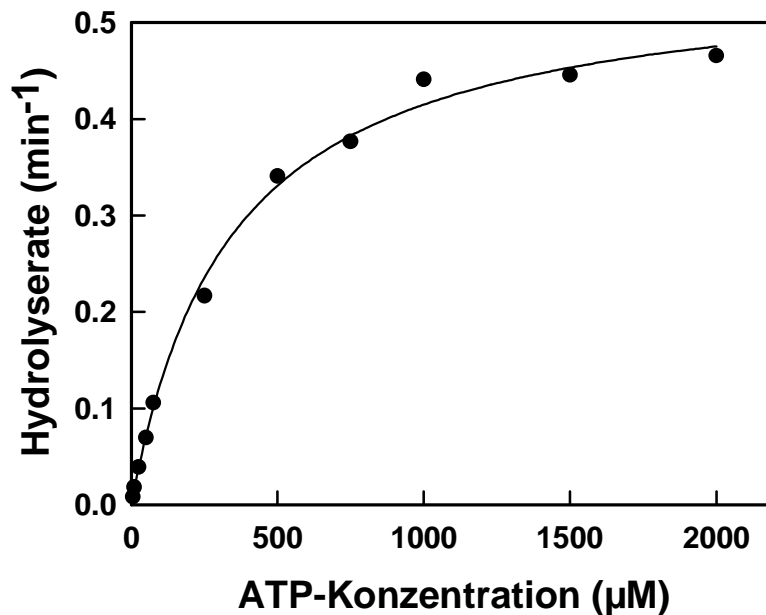


Abbildung 3.4a: Bestimmung des K_M -Wertes nach Michaelis-Menten

Hsp82 wurde bei verschiedenen ATP-Konzentrationen bei 37°C inkubiert.

Die Umsatzraten wurden aus den linearen Anfangsphasen der jeweiligen Hydrolysekinetik ermittelt.

Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 150 mM KCl; 5 mM MgCl_2

Der hier gemessene K_M -Wert muss als Näherung betrachtet werden, da die Messparameter nicht exakt den Michaelis-Menten-Anforderungen genügen. Besonders bei niedrigen ATP-Konzentrationen waren die Quasi-Stationaritäts-Bedingungen für den Enzym-Substrat-Komplex nicht gewährleistet, da hier Enzym und Substrat fast in äquimolaren Verhältnissen vorlagen, während im Michaelis-Menten-Modell ein hoher Substratüberschuss erwünscht ist. Aus diesem Grund steigt die Fitkurve im Bereich zwischen 1 mM und 2 mM weiter an, während bei diesen Konzentrationen die ermittelten Messwerte bereits ein Maximum erreicht haben. Die in den folgenden Messungen eingesetzte ATP-Konzentration kann jedoch aufgrund dieser Messungen in jedem Fall als ausreichend für die Gewährleistung von Steady-State-Bedingungen angesehen werden.

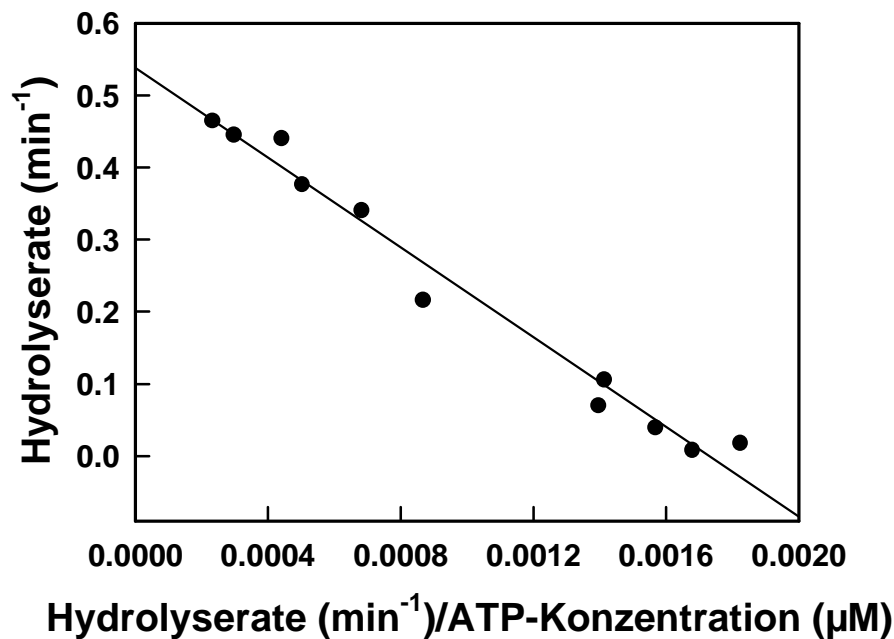


Abbildung 3.4b: Bestimmung des K_M -Wertes nach Eadie-Hofstee
 Auftragung der Daten aus Abbildung 3.4a in einem Eadie-Hofstee-Diagramm

3.1.1.4. Temperaturabhängigkeit der ATPase-Aktivität von Hsp82

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden viele ATPase-Tests bei 37°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur eine gut messbare Hydrolyseaktivität von Hsp82 vorliegt. Für das aus *Saccharomyces cerevisiae* stammende Hitzeschockprotein stellen diese Parameter jedoch Hitzestressbedingungen dar, während die optimale Wachstumstemperatur für Hefezellen im Bereich von 30°C liegt (Walker, 1998). Daher wäre es vorstellbar, dass sich die ATPase-Aktivität des Hsp82-Moleküls in diesem Temperaturbereich in signifikanter Weise verändert, um die Funktionalität von Hsp82 den jeweiligen Erfordernissen anzupassen. Eine grundlegende konformationelle Umlagerung von Hsp90 mit Neuorientierung der die ATP-Bindestelle enthaltenden N-terminalen Domänen zueinander konnte bereits nachgewiesen werden (Maruya *et al.*, 1999). Eine derartige Verschiebung könnte zu einer Modulation der ATP-hydrolysierenden Aktivität mit inhibierendem oder stimulierendem Effekt führen.

Um diese Möglichkeit von einer einfachen, der Arrhenius-Gleichung ($k = A \cdot e^{-E_a / RT}$) gehorchenden Temperaturabhängigkeit abzugrenzen, wurde die ATPase-Aktivität von Hsp82 bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 25 bis 51°C vermessen. In der linearen Darstellung dieser Messwerte scheint die ATPase-Aktivität dem Arrhenius-Gesetz gemäß in exponentiellem Zusammenhang mit der Temperatur anzusteigen (Abbildung 3.5a). Die logarithmische Auftragung der Umsatzraten gegen den reziproken Wert der Temperatur als

Arrhenius-Plot zeigt jedoch, dass die temperaturabhängige Aktivitätszunahme im Bereich von 25°C bis 40°C stärker ist als im Bereich zwischen 40°C und 51°C (Abbildung 3.5b).

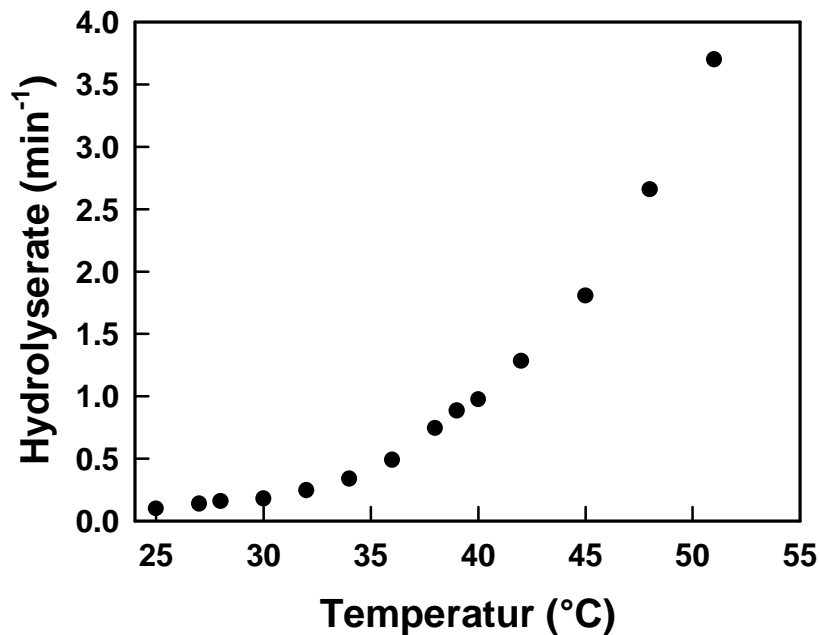


Abbildung 3.5a: Temperaturabhängigkeit der ATPase-Aktivität von Hsp82
Steady-State Hydrolyseraten von Hsp82 bei verschiedenen Temperaturen
Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 150 mM KCl; 5 mM MgCl₂

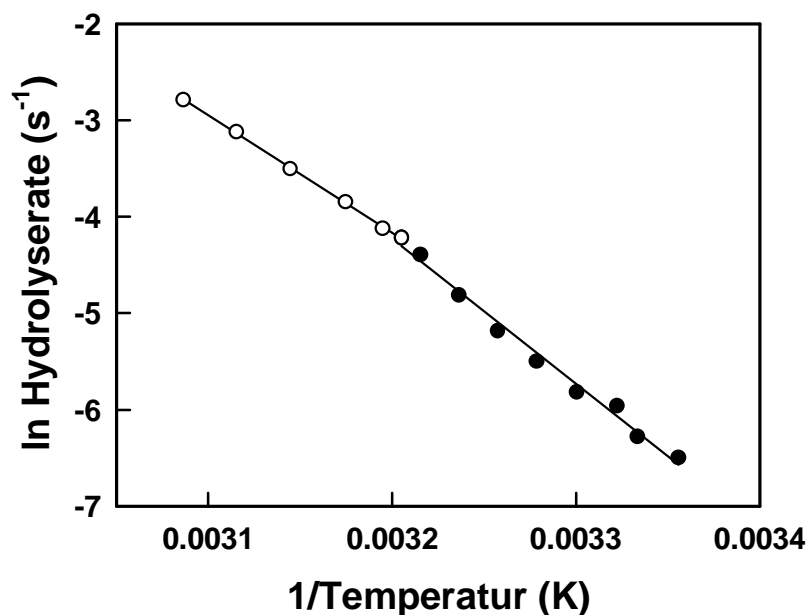


Abbildung 3.5b: Arrhenius-Diagramm
Auftragung der Daten aus Abbildung 3.5a in einem Arrhenius-Diagramm
Temperaturbereich 25°C bis 38°C: ●
Temperaturbereich 39°C bis 51°C: ○

Dabei kann mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass diese Verlangsamung der Aktivitätszunahme auf einer beginnenden partiellen Hitzedenaturierung

des Hsp82-Moleküls beruht, da durch Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Hitzeschockproteins bei steigenden Temperaturen gezeigt werden konnte, dass temperaturinduzierte Entfaltung erst ab 55°C einsetzt (Jakob *et al.*, 1995c). Insofern könnte die Zweiphasigkeit des Arrhenius-Plots eher dadurch begründet sein, dass oberhalb der ermittelten Temperaturgrenze von 39°C eine andere Teilreaktion des Hsp82-ATPase-Zyklus geschwindigkeitsbestimmend ist als bei niedrigeren Temperaturen. Aus den Steigungen der beiden Geradenabschnitte können die jeweiligen Aktivierungsenergien für die ATP-Hydrolysereaktion berechnet werden, da folgender Zusammenhang gilt:

$$k = A \cdot e^{-E_a / RT}$$

mit A: Häufigkeitsfaktor

E_a : Aktivierungsenergie

R: allgemeine Gaskonstante (8,31 J mol⁻¹ K⁻¹)

T: Temperatur (in Kelvin)

Demnach ergibt sich für die Aktivierungsenergie des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes im Temperaturbereich bis 39°C ein Wert von 118,4 kJ mol⁻¹ und bei höheren Temperaturen eine Aktivierungsenergie von 101,4 kJ mol⁻¹. Eine niedrigere Aktivierungsenergie von 25,7 kJ mol⁻¹ wurde für die durch DnaK aus *Thermus thermophilus* katalysierte ATP-Hydrolysereaktion bereits beschrieben (Klostermeier *et al.*, 1998). Von Bedeutung für die nachfolgenden Experimente ist die Tatsache, dass die Durchführung der ATPase-Aktivitätstests bei 37°C anstelle von 30°C keinen Einfluss auf die Interpretation der gewonnenen Daten haben sollte, da beide Temperaturen derselben Phase des Arrhenius-Diagramms zuzuordnen sind. Somit sind die definierten Standardparameter für nachfolgende Steady-State-ATPase-Aktivitätstests:

150 mM KCl

5 mM MgCl₂

2 mM ATP

37°C

Unter diesen Bedingungen beträgt die Umsatzrate von Hsp82 $0,4 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ (siehe Abbildungen 3.2, 3.4a und 3.5a)

3.1.2. Analyse der Teilreaktionen des ATPase-Zyklus von Hsp82

3.1.2.1. Einfluss von Produktinhibition durch ADP auf den Reaktionszyklus von Hsp82

Aufgrund von isothermalen Titrationskalorimetrie-Messungen (ITC) wurde postuliert, dass die Nukleotidbindetasche des Hsp90-Moleküls eine im Vergleich zu ATP 3- bis 4-fach höhere Affinität für ADP aufweist (Prodromou *et al.*, 1997). Die erneute Assoziation eines ATP-Moleküls an Hsp90 nach einem durchlaufenen Hydrolysezyklus könnte somit erschwert werden, wenn freies ATP, obwohl im Überschuss vorhanden, mit dem höher-affinen Reaktionsprodukt ADP um die Bindung konkurrieren muss. ADP sollte demnach eine inhibierende Wirkung auf die von Hsp90 katalysierte ATP-Hydrolyse ausüben.

Um diesen Einfluss von ADP genauer zu untersuchen, wurde die ATP-Hydrolyse durch Hsp82 unter Steady-State-Bedingungen verfolgt. Nach 30 min wurde der Reaktionsansatz halbiert und einem der beiden resultierenden Ansätze wurde nicht radioaktiv markiertes ADP in 10-fach molarem Überschuss (= 20 mM) zu ATP zugegeben (Abbildung 3.6).

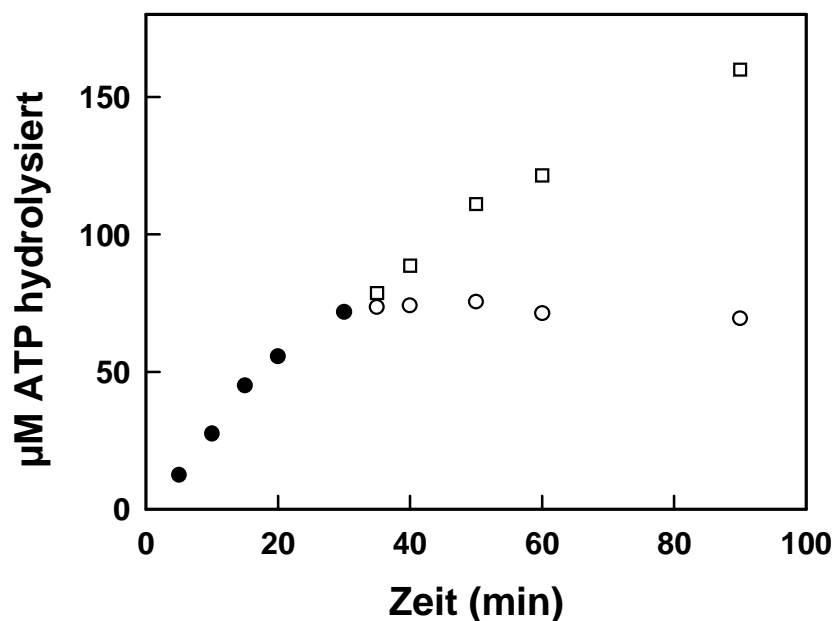


Abbildung 3.6: *Inhibition der ATPase-Aktivität von Hsp82 durch ADP*
Steady-State ATPase-Aktivität von 5 µM Hsp82 unter Standardbedingungen (●);
nach 30 min wurde der Ansatz halbiert und entweder ein 10-facher molarer Überschuss an
ADP (○) oder ein äquivalentes Volumen an Puffer (□) zugegeben

Die Anwesenheit des Reaktionsprodukts ADP führte zu einer deutlichen Reduktion der ATP-Hydrolyse-Rate. Während vor ADP-Zugabe und im Kontrollansatz ein Turnover von $0,37 \text{ min}^{-1}$ errechnet wurde, war nach Addition von ADP kein ATP-Umsatz mehr feststellbar. Dies überschreitet das Maß an Inhibition, dass zu erwarten wäre, wenn beide Nukleotide

vergleichbare Affinitäten zum Hsp90 Molekül aufweisen würden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Hsp90 tatsächlich stärker an ADP als an ATP bindet.

Als Konsequenz dieser Beobachtung kann postuliert werden, dass ADP-Freisetzung am Ende eines durchlaufenen Hydrolysezyklus den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt und somit verantwortlich für die makroskopische Umsatzrate von $0,4 \text{ min}^{-1}$ ist. Im Einklang mit dieser Hypothese konnte in der Anfangsphase der Steady-State-Messungen ein „Burst“-Effekt beobachtet werden (Abbildung 3.7), wie er auch schon für andere ATP-hydrolysierende Hitzeschockproteine beobachtet worden war (Gerhard Knarr, persönliche Mitteilung). Jedoch konnte keine lineare Abhängigkeit des „Burst“-Effektes von der eingesetzten Hsp82-Konzentration beobachtet werden, wie sie in Übereinstimmung mit der genannten Hypothese erwartet werden könnte (Daten nicht gezeigt).

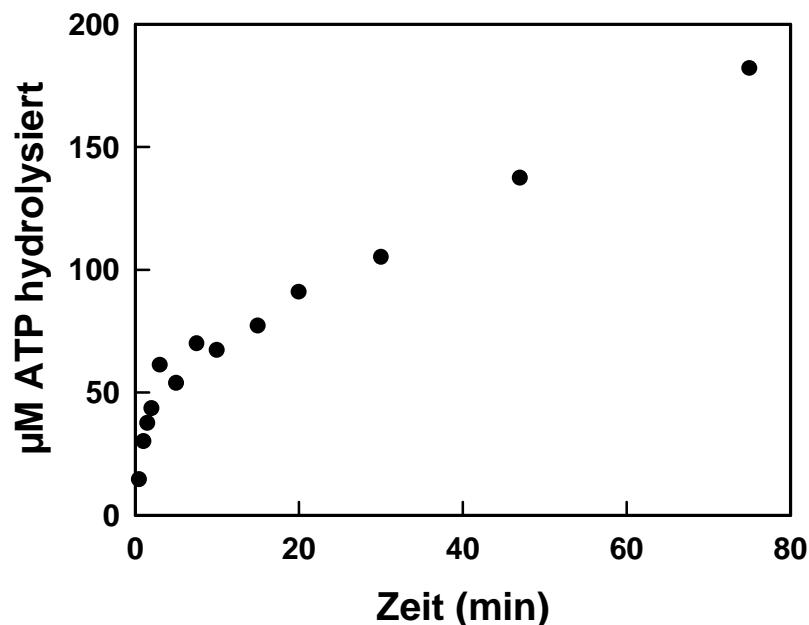


Abbildung 3.7: Burst-Effekt

Steady-State ATPase-Aktivität von $5 \mu\text{M}$ Hsp82 unter Standardbedingungen; in der Anfangsphase der Reaktion wurden vermehrt Messwerte genommen, um diese Phase gut aufzulösen

Zur Klärung dieser Frage wurden Single-Turnover-Experimente durchgeführt. Bei diesen Messungen lag das Substrat ATP im Gegensatz zum Steady-State im 0,8-fach molaren Überschuss zum Hsp90-Molekül vor, so dass nur ein einziger Reaktionszyklus durchlaufen werden kann. Infolgedessen trägt ADP-Freisetzung nicht zur beobachteten Umsatzrate der Reaktion bei.

Es muss betont werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen aufgrund des hohen K_D für Hsp90 und ATP nur annähernd den Single-Turnover-Bedingungen

entsprechen, da eine quantitative Komplexbildung beider Reaktionspartner auch bei hohen Konzentrationen nicht erreicht werden kann. Geht man von einem K_D von 100 μM aus, so liegen selbst bei einer Hsp90-Konzentration von 200 μM nur ca. 85 μM Hsp90 und ATP im Komplex vor. Daher wurden Single-Turnover-Experimente mit steigenden Mengen an Hsp82 durchgeführt, um die Proteinkonzentration zu identifizieren, die zumindest annähernde Single-Turnover-Bedingungen garantiert (Abbildung 3.8a).

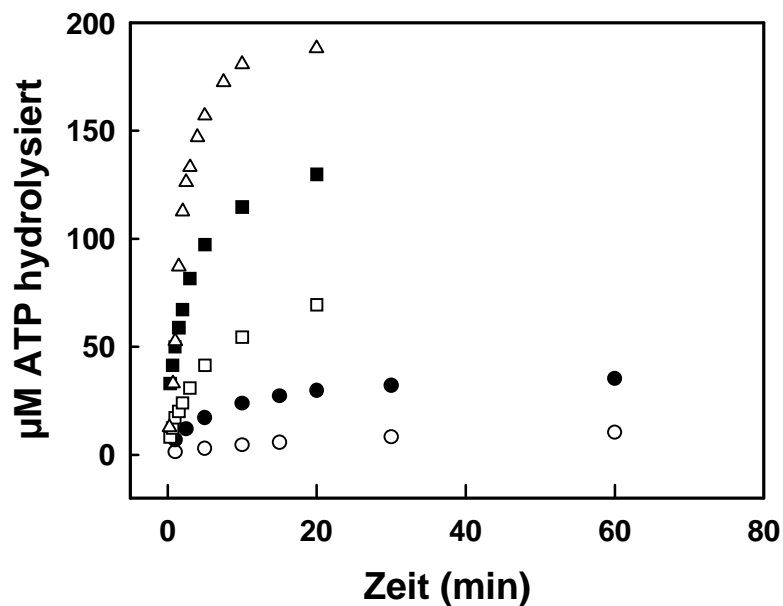


Abbildung 3.8a: Single-Turnover Hydrolyse

Single-Turnover Hydrolysekinetiken von 20 μM (○), 60 μM (●), 120 μM (□), 200 μM (■) und 272 μM (Δ) Hsp82 bei 37°C;
Puffer: 40 mM Hepes/KOH, pH 7,5; 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂

Die Single-Turnover-Kinetiken wurden nach einer Exponentialgleichung erster Ordnung gefittet (siehe Material und Methoden). Erst ab einer Hsp82-Konzentration von 200 μM erreichen die aus dem Fit erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten ein Maximum (Abbildung 3.8b). Somit kann angenommen werden, dass unter diesen Bedingungen signifikante Komplexbildung gewährleistet ist, die eine Auswertung nach dem Single-Turnover-Modell erlaubt. Die bei diesen Konzentrationen beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von $0,4 \text{ min}^{-1}$ sind dabei in sehr guter Übereinstimmung mit den aus den Steady-State-Messungen erhaltenen Umsatzraten. Dies führt zu dem Schluss, dass ADP-Freisetzung nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ATP-Hydrolyse durch Hsp82 sein kann.

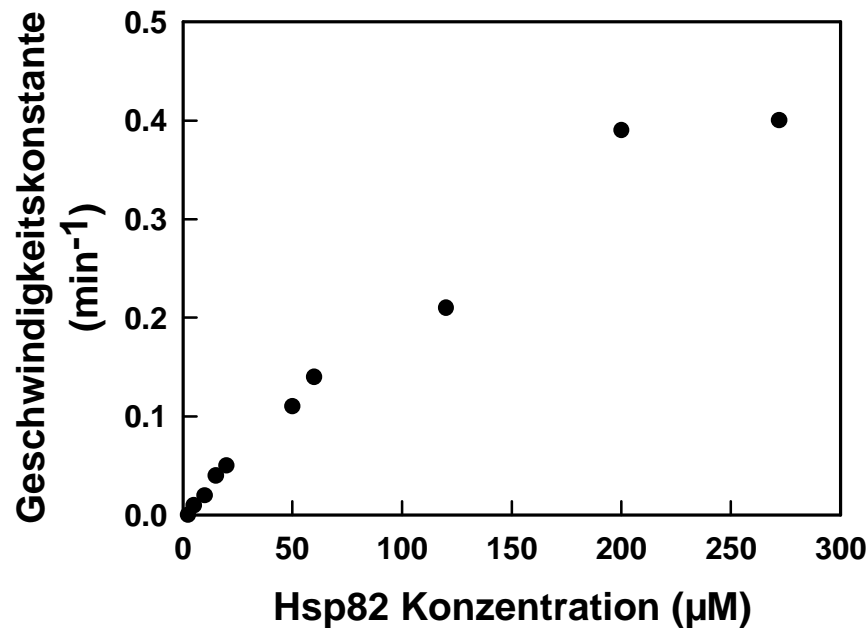


Abbildung 3.8b: Konzentrationsabhängigkeit der Single-Turnover Hydrolyseraten

Die Hydrolysekinetiken aus 3.8a wurden nach einer Exponentialgleichung erster Ordnung gefittet. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die jeweilige Hsp82-Konzentration aufgetragen.

Eine ähnliche Beobachtung wurde für das isolierte DnaK-Molekül aus *E. coli* gemacht (Theyssen *et al.*, 1996). Auch hier wurde im Single-Turnover eine Geschwindigkeitskonstante ermittelt, die vergleichbar zum Steady-State-Umsatz ist, was die Schlussfolgerung nahelegte, dass ATP-Hydrolyse den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des gesamten ATPase-Zyklus darstellt. Eine Ursache für den beschriebenen „Burst“-Effekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden.

3.1.2.2. Bestimmung kinetischer Parameter für die ATP-Bindung an Hsp82

Zur genaueren Beschreibung des ATPase-Zyklus von Hsp90 wurden die kinetischen Parameter k_{on} und k_{off} für die Bindung von Hsp82 an ATP ermittelt. Die Messungen wurden mit dem fluoreszenzmarkierten ATP-Analogon (P γ)-MABA-ATP (Abbildung 3.9) im Stopped-Flow-Fluoreszenz-Spektrophotometer durchgeführt, um die Anfangsphasen der Assoziations- und Dissoziationsreaktionen gut aufzulösen. Im (P γ)-MABA-ATP-Molekül ist die fluoreszierende Gruppe im Gegensatz zu bis dato in der Literatur beschriebenen fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (vgl. Scheibel *et al.*, 1997; Klostermeier *et al.*, 1998) über die γ -Phosphatgruppe mit dem ATP-Molekül gekoppelt, so dass keine sterische Hinderung bei Assoziation mit Hsp82 auftritt (vgl. Kapitel 1.4.3. der Einleitung). (P γ)-MABA-ATP emittiert

nach Anregung bei 334 nm Licht der Wellenlänge 418 nm und das Ausmaß dieser Fluoreszenz steigt an, wenn das Nukleotid im Hsp90-gebundenen Zustand vorliegt.

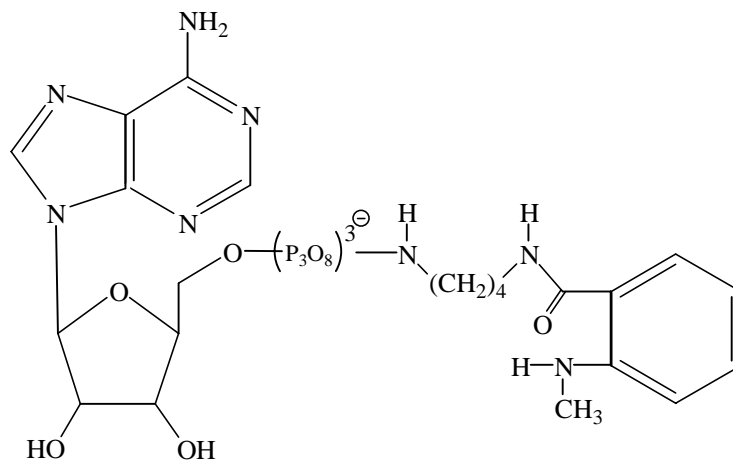


Abbildung 3.9: Struktur von (P γ)-MABA-ATP

Die Stopped-Flow-Messungen mussten bei 25°C durchgeführt werden, da bei 37°C das Signal/Rauschverhältnis für sinnvolle Auswertungen nicht optimal ist (Jochen Reinstein, persönliche Mitteilung). Bei dieser Temperatur beträgt die beobachtete Umsatzrate für die ATP-Hydrolyse ungefähr 0,1 min⁻¹ (siehe Abschnitt 3.1.1.4.) bzw. 1,5 x 10⁻³ s⁻¹. Gleichzeitig sinkt der K_M für die ATP-Hydrolyse von 300 μM auf 100 μM (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen Daten können mit den bei 37°C ermittelten Messwerten korreliert werden, da beide Temperaturen derselben Phase des Arrhenius-Diagramms zuzuordnen sind.

Zu Beginn wurde die „Off-Rate“ für das gebundene Nukleotid durch direkte Verdrängung von (P γ)-MABA-ATP aus einem vorgeformten Komplex bestimmt. Zu diesem Zweck wurde durch 30 minütige gemeinsame Inkubation ein Komplex aus Hsp82 und (P γ)-MABA-ATP gebildet. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mit einem hohen molaren Überschuss an nicht-markiertem ATP versetzt. Die aus der Verdrängung des markierten Nukleotids resultierende Fluoreszenzabnahme wurde spektroskopisch verfolgt (Abbildung 3.10). Die Verdrängungsreaktion lässt sich durch eine Exponentialfunktion erster Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{off} = 3,2 s⁻¹ beschreiben. Somit ist die Dissoziation des (P γ)-MABA-ATP Moleküls von Hsp82 um 3 Größenordnungen schneller als die im Steady-State oder Single-Turnover beobachteten Umsatzraten für ATP-Hydrolyse (1,5 x 10⁻³ s⁻¹ bei 25°C).

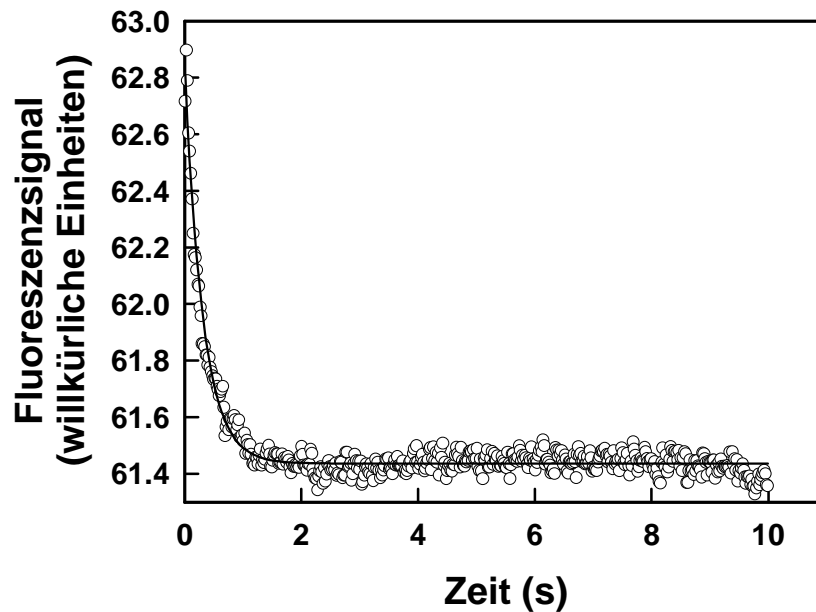


Abbildung 3.10: Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für Hsp82 und (P γ)-MABA-ATP

Ein Komplex aus (P γ)-MABA-ATP und Hsp82 wurde durch 30minütige Inkubation in Spritze A eines Stopped-Flow-Spektrofluorimeters vorgeformt. k_{off} wurde durch direkte Verdrängung von (P γ)-MABA-ATP aus dem Komplex mit einem Überschuss an nicht-markiertem ATP bestimmt. Spritze A enthielt 5 μM (P γ)-MABA-ATP und 10 μM Hsp82, Spritze B enthielt 1014 μM ATP. Nach der Durchmischung betrug die Konzentrationen in der Messzelle 3,4 μM (P γ)-MABA-ATP, 6,8 μM Hsp82 und 334 μM ATP.

Stopped-Flow-Gerät: HiTech SF-61 DX2

Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂

Temperatur: 25°C

Anregungswellenlänge: 334 nm / Emissionswellenlänge: 418 nm

Als nächster Schritt wurde die Kinetik der Assoziation von (P γ)-MABA-ATP und Hsp82 verfolgt (Abbildung 3.11a). Auch hier kann die Fluoreszenzänderung, die auf Bindung des Nukleotids an Hsp82 beruht, mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung beschrieben werden. Daraus lässt sich für die im Reaktionsansatz vorhandenen Konzentrationen von 14 μM für Hsp82 und 0,7 μM für (P γ)-MABA-ATP eine Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von $4,8 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ errechnen.

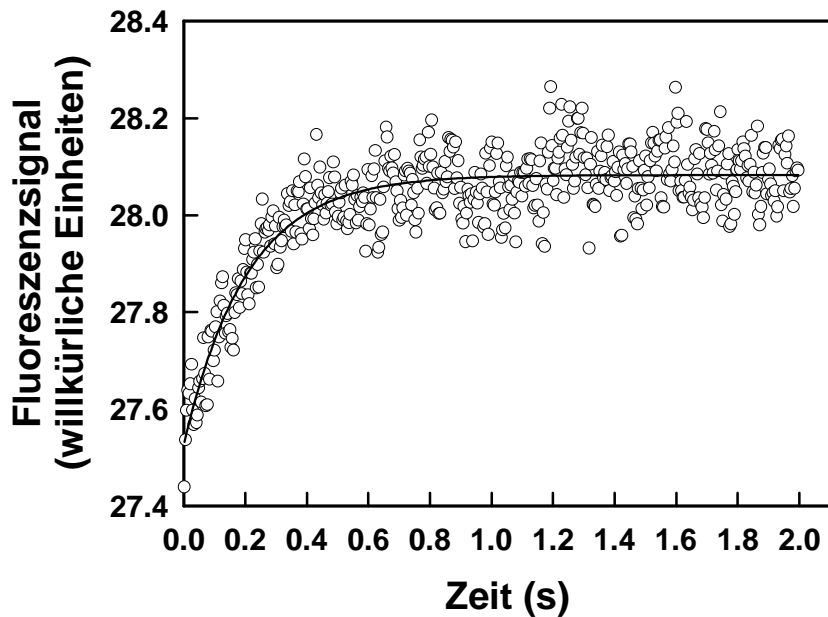


Abbildung 3.11a:

Assoziationskinetik von Hsp82 und (Pγ)-MABA-ATP

20 μM Hsp82 aus Spritze A und 2,1 μM (Pγ)-MABA-ATP aus Spritze B wurden gemischt. Die Konzentrationen in der Messzelle betragen 14 μM Hsp82 und 0,7 μM (Pγ)-MABA-ATP.

Stopped-Flow-Gerät: HiTech SF-61 DX2

Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 150 mM KCl, 5 mM MgCl_2

Temperatur: 25°C

Anregungswellenlänge: 334 nm / Emissionswellenlänge: 418 nm

Das Experiment wurde analog bei verschiedenen Hsp82-Konzentrationen durchgeführt und die jeweils ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden graphisch gegen die Proteinkonzentration aufgetragen (Abbildung 3.11b). Extrapolation der Messwerte führte zu einer aus dem Y-Achsenabschnitt ermittelten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{off} von $3,2 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ und bekräftigte somit den im Verdrängungsexperiment erhaltenen Wert von $3,2 \text{ s}^{-1}$. Des weiteren konnte aus der Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{on}) für (Pγ)-MABA-ATP und Hsp82 zu $0,16 \pm 0,03 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Daraus ergibt sich ein berechneter K_D ($= \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$) von 18 μM für Hsp82 und (Pγ)-MABA-ATP. Ausgehend von diesen kinetischen Parametern kann postuliert werden, dass die Bindung von (Pγ)-MABA-ATP an Hsp82 mit einem einfachen, einstufigen Bindungsmodell beschrieben werden kann. Die ermittelten Werte für k_{on} , k_{off} und K_D weisen dabei auf eine schnelle und schwache Bindungsreaktion hin.

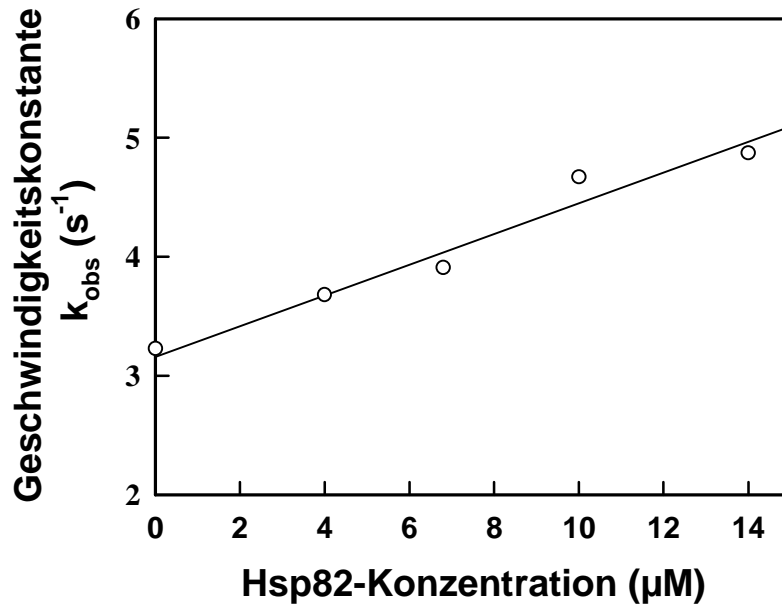


Abbildung 3.11b:

Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten für Hsp82 und (Pγ)-MABA-ATP

Analoge Experimente zu Abbildung 3.11a wurden mit verschiedenen Hsp82-Konzentrationen bei konstanter (Pγ)-MABA-ATP-Konzentration (0,7 μM) durchgeführt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen wurden gegen die verwendete Proteinkonzentration aufgetragen. Der Wert bei 0 μM entstammt dem Verdrängungsexperiment

Um abschätzen zu können, in welchem Maß die kinetischen Parameter für unmarkiertes ATP im Vergleich zu den Werten für (Pγ)-MABA-ATP abweichen, wurden kinetische Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dabei wurde die Bindungskinetik von (Pγ)-MABA-ATP an Hsp82 in Anwesenheit ansteigender Mengen ATP verfolgt. Die Bindung von ATP in diesem Konkurrenzexperiment scheint eine schnelle Reaktion zu sein, da sich nach 5 s ein stabiles Fluoreszenzsignal einstellt. Eine leichte Abnahme dieses Signals mit der Zeit kann durch Hydrolyse von ATP zum stärker bindenden ADP erklärt werden, welche zur weiteren Verdrängung von gebundenem MABA-ATP führt. Aus der graphischen Auftragung der Signalamplituden der schnellen Reaktionsphase gegen die im Reaktionsansatz vorhandene ATP-Konzentration (Abbildung 3.12) wird deutlich, dass ca. 150 μM ATP benötigt werden, um 5 μM (Pγ)-MABA-ATP zur Hälfte vom Hsp82-Molekül zu verdrängen (Abbildung 3.12). Nach folgendem Zusammenhang

$$K_D(ATP) = K_D(MABA-ATP) \frac{[ATP]_{1/2}}{[MABA-ATP]} = 18 \frac{150}{5} \mu\text{M}$$

kann damit der K_D für ATP auf einen Wert um 500 μM abgeschätzt werden. Affinitäten dieser Größenordnung waren auch in früheren Messungen mit spin-markierten Nukleotiden ermittelt worden (Scheibel *et al.*, 1997).

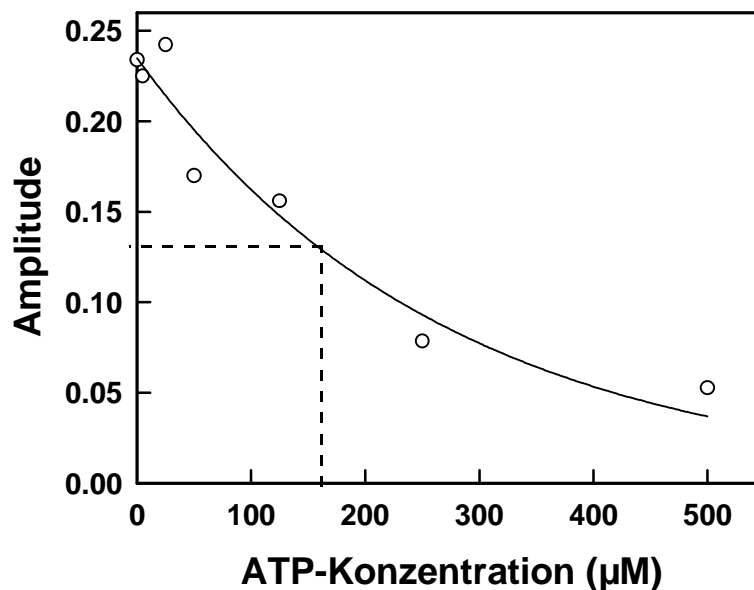


Abbildung 3.12 :

Kinetische Konkurrenz zwischen ATP und (P γ)-MABA-ATP

In einem Stopped-Flow-Spektrofluorimeter wurden 5 μM Hsp82 und 5 μM (P γ)-MABA-ATP in Anwesenheit verschiedener ATP-Konzentrationen gemischt. Die Amplituden der jeweiligen Bindungskinetiken wurden als Funktion der ATP-Konzentration aufgetragen.

Stopped-Flow-Gerät: HiTech SF-61 DX2

Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂

Temperatur: 25°C

Anregungswellenlänge: 334 nm / Emissionswellenlänge: 418 nm

Ein ähnliches Konkurrenzexperiment wurde mit unmarkiertem ADP anstelle von ATP durchgeführt. Dabei wurde ein ungefähres K_D von 150 μM ermittelt (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund steht im Einklang mit der früheren Beobachtung, dass ADP fester an Hsp82 bindet als ATP.

Als Konsequenz der Single-Turnover-Experimente und Stopped-Flow-Messungen lässt sich ausschließen, dass die Teilreaktionen von ATP-Bindung oder ADP-Freisetzung für die im Steady-State erhaltenen Hydrolyseumsatzraten verantwortlich sind. Somit muss entweder die Hydrolysereaktion selbst oder eine im Zyklus enthaltene intramolekulare Umlagerungsreaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der durch Hsp82 katalysierten ATP-Hydrolyse darstellen.

3.1.2.3. Identifizierung einer der ATP-Bindung nachgeschalteten Umlagerungsreaktion

Ein wichtiger Aspekt des ATP-Hydrolyse-Zyklus ist die Frage, ob Nukleotide nach ihrer Bindung an Hsp82 zur Hydrolyse determiniert sind. Eine derartige Festlegung („Commitment“) des gebundenen Nukleotids resultiert gewöhnlich aus konformationellen Umlagerungen des Proteins, die das Nukleotid in der Bindetasche immobilisieren, so dass es hydrolysiert werden muss, bevor es aus der Bindetasche entlassen werden kann. Im Chaperonin GroEL kann Commitment des gebundenen ATP-Moleküls im asymmetrischen Komplex mit einem GroES-Ring, nicht jedoch im GroES-freien tetradecameren Zustand beobachtet werden (Todd *et al.*, 1994).

Um festzustellen, ob der Hsp82-ATPase-Zyklus ebenfalls einen Schritt beinhaltet, welcher das gebundene ATP zur Hydrolyse determiniert, wurde ein Pulse-Chase-Experiment durchgeführt. Dazu wurde unter Single-Turnover-Bedingungen kurz nach Komplexbildung zwischen radioaktiv markiertem ATP und Hsp82 ein 50-fach molarer Überschuss an unmarkiertem ATP zum Reaktionsansatz zugegeben (Abbildung 3.13). Als Konsequenz sollte nicht-determiniertes ATP vom Hsp82-Molekül verdrängt werden, während determiniertes, konformationell immobilisiertes Nukleotid nicht beeinflusst wird. Tatsächlich wird auch nach dem Chase mit unmarkiertem ATP die Hydrolyse radioaktiv markierten ATPs fortgesetzt. Das Ausbleiben einer Plateau-Phase im Chase-Experiment kann durch Steady-State-Background-Hydrolyse nach Zugabe des ATP-Überschusses erklärt werden. Nach Subtraktion des unter diesen Bedingungen erwarteten Steady-State-Umsatzes kann die Umsetzung des konformationell determinierten, markierten Nukleotids durch eine Exponentialfunktion erster Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $0,24 \text{ min}^{-1}$ bzw. $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bei 37°C beschrieben werden. Die Umlagerung, die zu einer derartigen Determinierung des gebundenen Nukleotids im hydrolyseaktiven Zentrum führt, muss wenigstens mehrfach schneller als die nachfolgende Hydrolyse ablaufen, da im Single-Turnover-Experiment keine „Lag-Phase“ zu beobachten ist. Die entsprechende Rückreaktion, d. h. Wiederöffnung der verschlossenen Nukleotidbindetasche scheint mit ähnlichen Geschwindigkeiten wie die ATP-Hydrolyse abzulaufen, da nach dem Chase ungefähr gleiche Mengen an verbliebenem radioaktiv markiertem ATP und ADP detektiert werden können.

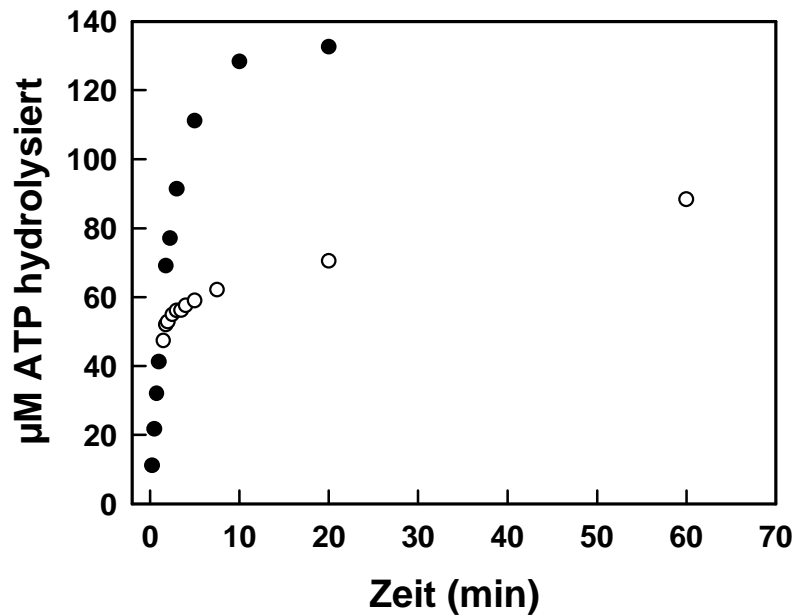


Abbildung 3.13: Pulse/Chase-Single-Turnover von Hsp82

200µM Hsp82 wurden unter Single-Turnover-Bedingungen bei 37°C inkubiert (●). Nach 75 s wurde der Ansatz geteilt und einer Hälfte (○) wurde ein 50-facher Überschuss an nicht-markiertem ATP zugesetzt, während die andere Hälfte (●) mit einem äquivalenten Volumen an Puffer versehen wurde.

3.1.2.4. Diskussion des von Hsp82 katalysierten ATP-Hydrolyse-Zyklus

Mit den erhaltenen Daten kann nun ein Reaktionsschema für die ATP-Hydrolysereaktion von Hsp82, dem Hsp90-Homologen aus *Saccharomyces cerevisiae* postuliert werden (Abbildung 3.14). Es muss jedoch betont werden, dass einige der kinetischen Parameter des Modells nur als qualitative Annäherungen zu verstehen sind, da sie aufgrund der besonderen Nukleotidbindeeigenschaften von Hsp90 nicht auf direktem Wege ermittelt werden konnten.

Der Hydrolysezyklus (bei 25°C) wird eingeleitet durch schnelle, jedoch schwache Bindung von ATP an Hsp82. Für (Pγ)-MABA-ATP und Hsp82 wurden eine Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von ca. $0,16 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und eine Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von ca. 3s^{-1} ermittelt. Somit laufen diese Teilreaktionen im Vergleich zur im Single-Turnover oder Steady-State ermittelten Hydrolyseumsatzrate sehr schnell ab. Aus den kinetischen Parametern k_{on} (= k_{+1} im Reaktionsschema) und k_{off} (= k_{-1} im Reaktionsschema) konnte der K_D für die Bindung von (Pγ)-MABA-ATP an Hsp82 zu ca. $20 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Obwohl der K_D für das unmarkierte ATP von diesem Wert abweicht ($500 \mu\text{M} = K_D$ im Reaktionsschema), kann dennoch davon ausgegangen werden, dass ATP-Bindung nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt.

Im Anschluss an die Nukleotidbindung ist das Hsp82-Molekül wahrscheinlich einer strukturellen Umlagerung unterworfen, welche zur Determinierung des in der Nukleotidtasche

gebunden ATP für die anschließende Hydrolyse führt. Eine derartige konformationelle Veränderung könnte den Umorientierungen ähnlich sein, die für die Kristallstruktur von MutL infolge Nukleotidbindung beobachtet wurden (Ban *et al.*, 1999) (siehe Abbildung 1.7), wo ATP-Bindung signifikante Domänenbewegungen auslöst. In diesem Zusammenhang könnte der Lysinrest 342 aus Hsp82, welcher homolog zum Lysin 307 des MutL-Moleküls ist, eine wichtige Rolle bei der Bildung zusätzlicher Protein/Nukleotid-Kontakte spielen. Konformationelle Veränderungen von Hsp90 als Konsequenz von ATP-Bindung, welche zur Modulation der Affinität des Moleküls für hydrophobe Oberflächen führen, wurden bereits früher postuliert (Sullivan *et al.*, 1997).

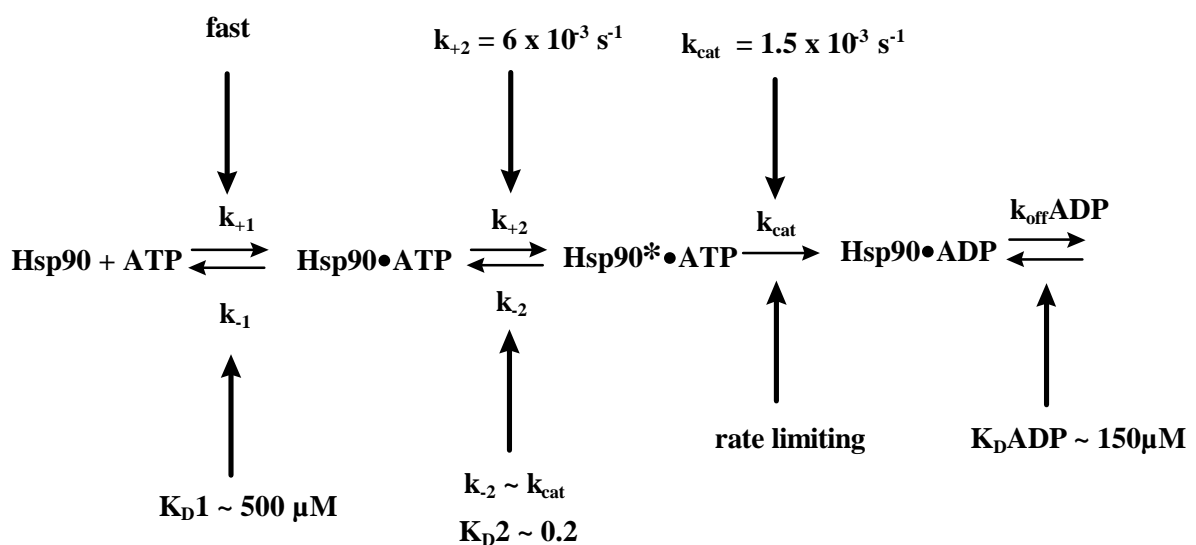


Abbildung 3.14:

Modell für den ATPase-Reaktionszyklus von Hsp82

Hsp82 bindet ATP in einer schnellen, einstufigen Reaktion. Diese Bindung induziert signifikante intramolekulare Umlagerungen, die zur Schliessung der Nukleotidbindetasche führen. ATP-Hydrolyse stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar. Der Zyklus wird durch Freisetzung des Reaktionsprodukts ADP abgeschlossen.

Die molekularen Umlagerungen, die zur Determinierung des gebundenen Nukleotids führen, müssen wenigstens mehrfach schneller sein als die anschließende Hydrolysereaktion, wie aus dem Fehlen einer „Lag-Phase“ im Single-Turnover-Experiment gefolgert werden kann. Somit stellt die ATP-Hydrolyse mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{cat} von $0,1 \text{ min}^{-1}$ bzw. $1,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (bei 25°C) den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der gesamten ATPase-Reaktion dar. Aus der Verteilung von determiniertem und nicht-determiniertem Nukleotid wird deutlich, dass die Wiederöffnung der verschlossenen Nukleotidtasche mit gebundenem ATP mit einer ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten wie die ATP-Hydrolyse ablaufen muss und somit auch bei ca. $1,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($= k_{-2}$) liegt.

Unter Berücksichtigung des K_M -Wertes von 100 μM und der Dissoziationskonstanten von 500 μM ist es nach Formel (1) möglich, den k_{+2} Wert für die molekulare Umlagerung zu ca. $6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ zu errechnen.

$$\text{Formel (1):} \quad K_M = K_{D1} \frac{k_{cat}}{k_{cat} + k_{+2}} \quad (\text{Fersht, 1985})$$

Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass die Schliessung der Nukleotidtasche schneller verlaufen muss als die nachfolgende Hydrolyse (s. o.). Aus k_{+2} und k_2 lässt sich der K_{D2} Wert für die molekulare Umlagerung zu 0,2 berechnen. Somit ist die geschlossene Form der Nukleotidbindetasche in Anwesenheit von ATP 5-fach gegenüber der offenen Form favorisiert. Der ATPase-Zyklus wird durch Freisetzung des Reaktionsprodukts ADP abgeschlossen. Diese Freisetzungsreaktion muss schneller sein als die vorausgegangene Hydrolyse und trägt nicht zur ermittelten Umsatzrate der Steady-State-Reaktion bei.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ATP-Bindung zu signifikanten konformationellen Umlagerungen im Hsp82-Molekül führt. Als Konsequenz dieser Umorientierung wird das gebundene Nukleotid zur Hydrolyse determiniert. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktionen von Hsp82 mit Co-Chaperonen und Partnerproteinen von diesen Reaktionen ebenfalls moduliert werden.

3.1.3. ATPase-Aktivität von N-terminalen Hsp82-Fragmenten

3.1.3.1. Steady-State ATPase-Aktivität von N210

Um die Bereiche des Hsp82-Moleküls zu identifizieren, die zur ATPase-Aktivität beitragen, wurden verschiedene C-terminal verkürzte Fragmente des Hefeproteins analysiert. Zu Beginn wurde die Steady-State-ATP-Hydrolyse der N-terminalen Region von Aminosäure 1 bis 210 (N210) vermessen (Abbildung 3.15a). Dieses Proteinfragment beinhaltet die komplette Nukleotidbindestelle, wie sie in der Literatur beschrieben wurde (Prodromou *et al.*, 1997b). Unter Standardbedingungen weist N210 eine Umsatzrate von $0,04 \text{ min}^{-1}$ auf, was genau einem Zehntel der Aktivität des Wildtypproteins entspricht. Die Hsp90-Spezifität der ermittelten ATP-Hydrolyse wurde durch komplette Inhibition mit einem 5-fach molaren Überschuss an Geldanamycin bewiesen. Darüberhinaus konnte für N210 eine zum Wildtyp analoge Kaliumchloridabhängigkeit der ATPase-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 3.15b), wobei jeweils um den Faktor 10 reduzierte Turnover-Zahlen ermittelt wurden. Eine derartig verminderte ATPase-Aktivität für die isolierte ATP-Bindedomäne war auch bereits beschrieben worden (Panaretou *et al.*, 1998). Somit scheinen Regionen des Hsp90-Moleküls,

welche außerhalb der Nukleotidbindetasche lokalisiert sind, für die ATPase-Aktivität des Wildtypproteins von Bedeutung zu sein.

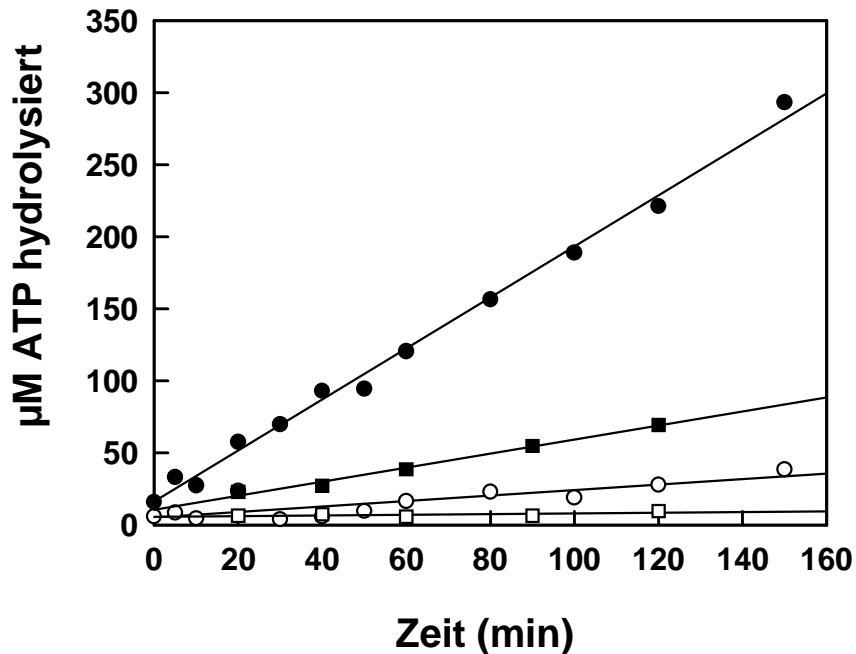


Abbildung 3.15a:

Steady-State Hydrolyse von N210

Steady-State ATP-Hydrolyse von 10 µM N210 in Abwesenheit (■) oder in Anwesenheit (□) von 50 µM Geldanamycin bei 37°C. Zum Vergleich: 5 µM Hsp82 in Abwesenheit (●) oder in Anwesenheit (○) von 25 µM Geldanamycin
 Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 5 mM MgCl₂
 ATP-Konzentration: 2 mM

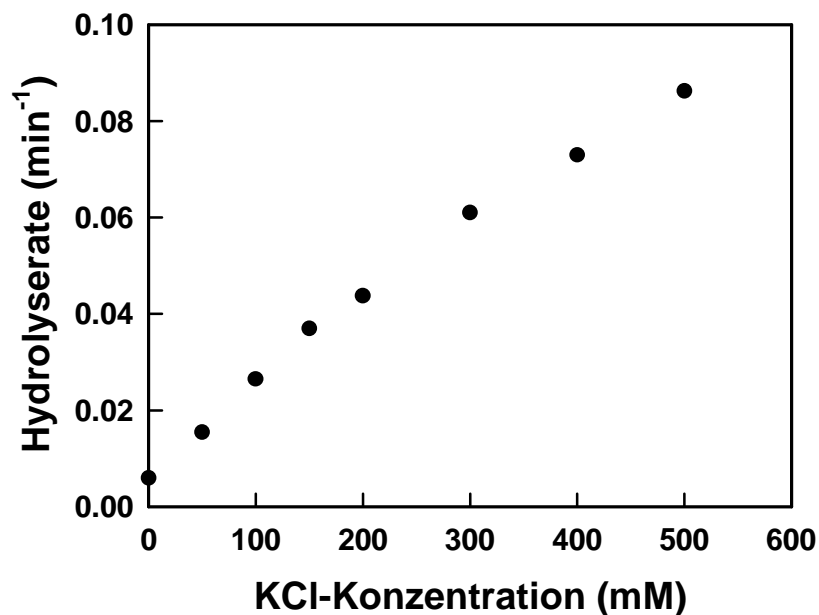


Abbildung 3.15b:

KCl-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von N210

Steady-State Hydrolyseraten von N210 bei ansteigenden KCl-Konzentrationen (37°C)
 Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 5 mM MgCl₂
 ATP-Konzentration: 2 mM

3.1.3.2. Determinierung des gebundenen Nukleotids in verschiedenen Hsp82-Fragmenten

Eine mögliche Erklärung für die 10-fach reduzierte ATPase-Aktivität isolierter ATP-Bindedomänen könnte sein, dass Wildtyp-Umsatzraten nur dann erzielt werden können, wenn ATP in der Bindetasche „eingefangen“ und somit zur Hydrolyse determiniert wird. Im N210-Molekül ist der Lysinrest 342 nicht vorhanden, welcher als potentieller zusätzlicher Kontaktpunkt zwischen Nukleotid und Protein bei geschlossener Proteinkonformation diskutiert wird. Wenn diese Annahme stimmt, kann im N210 das gebundene Nukleotid nicht konformationell eingefangen werden und es sollte sich keine Determinierung nachweisen lassen.

Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Pulse/Chase-Experiment unter Single-Turnover-Bedingungen mit N210 durchgeführt (Abbildung 3.16a). Im Gegensatz zum Wildtypprotein führte der Chase mit einem molaren Überschuss an unmarkiertem ATP hier zum kompletten Stillstand der Hydrolyse von radioaktivem ATP. Gebundenes Nukleotid konnte demnach quantitativ durch freies, unmarkiertes ATP vom Protein verdrängt werden. Somit scheinen in der Tat zusätzliche Regionen des Hsp82-Moleküls an der Verschließung der ATP-Bindetasche beteiligt zu sein, welche zur Determinierung des gebundenen Nukleotids führt.

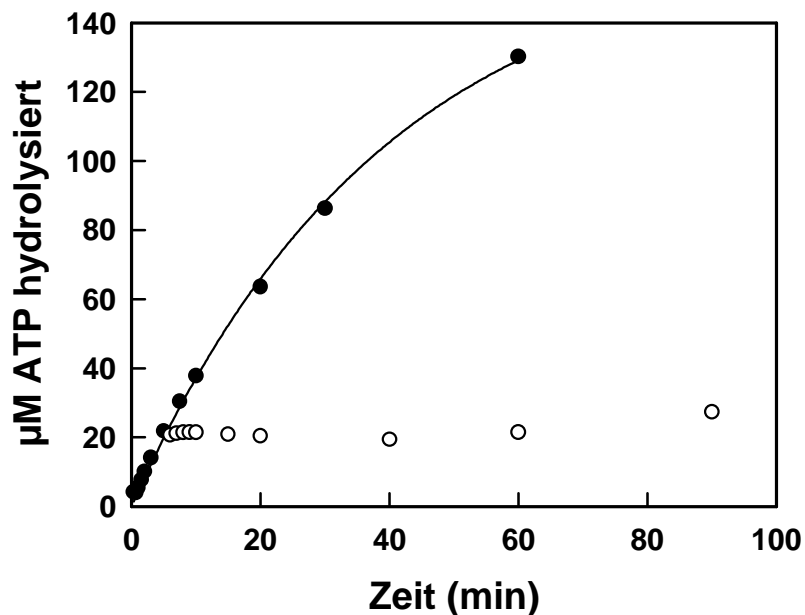


Abbildung 3.16a:

Pulse/Chase-Single-Turnover von N210

300µM N210 wurden unter Single-Turnover-Bedingungen bei 37°C inkubiert (●). Nach 5 min wurde der Ansatz geteilt und einer Hälfte (○) wurde ein 50 facher Überschuss an nicht-markiertem ATP zugesetzt, während die andere Hälfte (●) mit einem äquivalenten Volumen an Puffer versehen wurde.

Diese Annahme wurde bestätigt, als gezeigt werden konnte, dass in einem weiteren N-terminalen Konstrukt, welches die Aminosäuren 1 bis 451 des Wildtypproteins umfasst (N451), eine ähnliche Determinierung des Nukleotids beobachtet werden konnte wie im kompletten Hsp82 (Abbildung 3.16b).

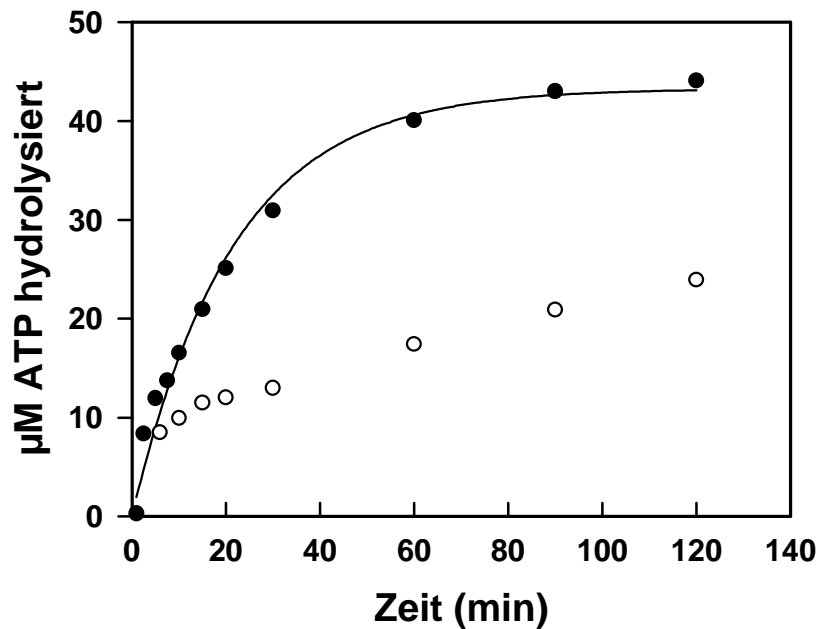


Abbildung 3.16b:

Pulse/Chase-Single-Turnover von N451

60 µM N451 wurden unter Single-Turnover-Bedingungen bei 37°C inkubiert (●). Nach 5 min wurde der Ansatz geteilt und einer Hälfte (○) wurde ein 50 facher Überschuss an nicht-markiertem ATP zugesetzt, während die andere Hälfte (●) mit einem äquivalenten Volumen an Puffer versehen wurde.

Im Einklang mit früheren Spekulationen enthält dieses determinierungskompetente Fragment die im verschlossenen Zustand postulierte Kontaktposition Lysin 342. Erstaunlicherweise wies jedoch auch N451 niedrigere Aktivitäten als der Wildtyp auf (siehe Tabelle 3.1). Im Steady-State konnten nur Umsatzraten in der Größenordnung von N210 beobachtet werden.

Protein	Hydrolyserate (min ⁻¹)
Hsp82 (Wildtyp)	0,4
N210	0,041
N272	0,038
N386	0,043
N451	0,041
N527	0,1

Tabelle 3.1:

Vergleich der Steady-State Hydrolyseraten verschiedener N-terminaler Konstrukte von Hsp82 (37°C)

Ähnlich verhielten sich weitere getestete C-terminal verkürzte Hsp82-Fragmente (siehe Tabelle 3.1). Nur im Konstrukt N527 wurde eine im Vergleich zu N210 2,5-fache Steigerung der ATPase-Aktivität ermittelt. Somit scheint der vermutete zusätzliche Kontakt zwischen Protein und Nukleotid, der durch den Lysinrest 342 vermittelt wird, nicht der entscheidende Faktor für gesteigerte ATP-Hydrolyse zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Einklang mit den Erwartungen C-terminale Bereiche des Hsp82-Moleküls für das Einfangen und das daraus resultierende „Commitment“ von Nukleotiden verantwortlich sind. Für maximale Hydrolyseumsatzraten sind jedoch noch zusätzliche Abschnitte des Proteins, welche zwischen Aminosäuren 451 und 709 lokalisiert sind, erforderlich.

3.1.3.3. Diskussion der ATPase-Aktivität N-terminaler Hsp82-Fragmente

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass C-terminale Regionen des Hsp82-Moleküls, die außerhalb der ATP-Bindestelle lokalisiert sind, für den durch konformationelle Umlagerungen ausgelösten Verschluss der Nukleotidbindetasche erforderlich sind (Abbildung 3.17). In der Kristallstruktur der isolierten ATP-Bindungsdomäne im Komplex mit ATP konnte dahingegen keine strukturelle Reorientierung im Vergleich zur unkomplexierten Domäne beobachtet werden (Prodromou *et al.*, 1997b). Überraschenderweise führt die Determinierung des Nukleotids zur Hydrolyse jedoch nicht zu ATP-Hydrolyse-Umsatzraten in der Größenordnung des Wildtypproteins.

Da den getesteten Hsp82-Fragmenten die C-terminale Dimerisierungsstelle fehlt (Palmer *et al.*, 1995), könnte spekuliert werden, dass Wildtyp-ATPase-Aktivität eine Dimerisierung des Proteins voraussetzt. Auch im MutL-Protein wird die ATPase-Aktivität durch Kontakte gesteigert, die von den beiden N-terminalen Domänen untereinander ausgebildet werden (Ban *et al.*, 1999). Und obwohl die N-terminale Domäne von Hefe-Hsp82 in Lösung keine detektierbaren stabilen Dimere ausbildet (Scheibel *et al.*, 1999b), zeigte die Kristallstruktur dieses Fragments eine dimere Struktur mit Kontaktstellen im äußersten C-terminalen Bereich des Proteins (Prodromou *et al.*, 1997a). Im dimeren Wildtyp wäre die Knüpfung derartiger Kontakte im Vergleich zu den monomeren Fragmenten signifikant erleichtert.

Wenn N-terminale Dimerisierung entscheidend für Wildtyp-ATPase-Aktivität ist, dann sollte diese Aktivität mit den im Test eingesetzten Fragmentkonzentrationen ansteigen. Jedoch selbst bei den für die Single-Turnover-Experimente eingesetzten hohen Proteinmengen (300 μ M N210) konnte keine Steigerung von k_{cat} beobachtet werden. Darüber hinaus wurde

durch Elektronenmikroskopie gezeigt, dass Hsp90 unter physiologischen Bedingungen als langgestrecktes, antiparalleles Dimer vorliegt, bei dem die N-terminalen Domänen in entgegengesetzte Richtungen weisen (Maruya *et al.*, 1999). Somit scheinen permanente Kontakte zwischen diesen Domänen unwahrscheinlich. Während es möglich ist, dass im Laufe des Hsp90-Chaperon-Zyklus strukturelle Umlagerungen ablaufen, welche die beiden N-Termini des Proteins in Nachbarschaft bringen, muss noch geklärt werden, ob diese Interaktionen oder zusätzliche C-terminale Regionen an der Stimulation der ATPase-Aktivität beteiligt sind.

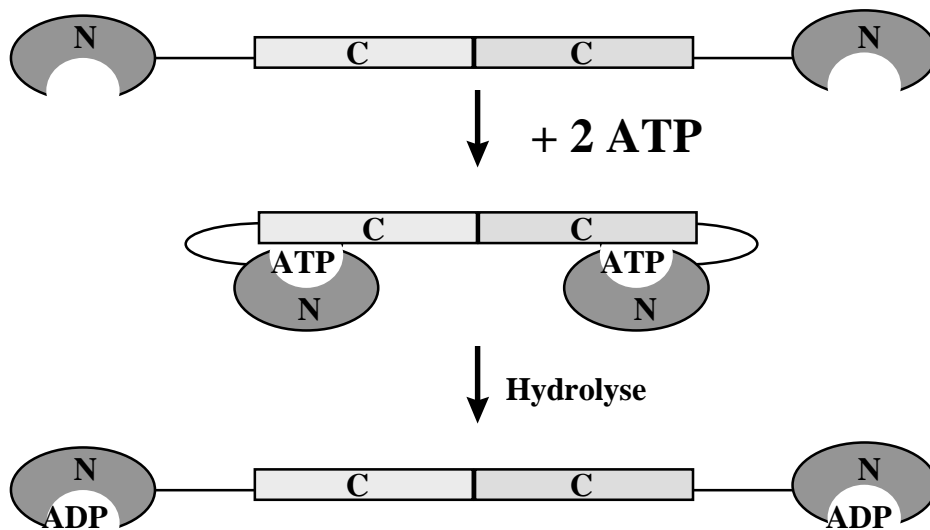


Abbildung 3.17:

Modell für die postulierte molekulare Umlagerung des Hsp90-Moleküls

Durch ATP-Bindung in der N-terminalen Nukleotidbindestelle wird eine Konformationsänderung im Hsp90-Molekül ausgelöst, die zum Verschluss der Bindetasche führt. C-terminale Regionen des Moleküls sind an dieser Verschlussreaktion beteiligt. Durch ATP-Hydrolyse wird die ursprüngliche Konformation des Proteins wiederhergestellt.

3.2. Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von p23

3.2.1. Chaperon-Eigenschaften von p23

Für das isolierte p23-Molekül konnte in etablierten Chaperon-Assays eine Aktivität festgestellt werden, die vergleichbar mit den Chaperon-Eigenschaften einiger Hitzeschockproteine ist. So ist humanes p23 in der Lage, chemisch denaturierte β -Galaktosidase-Moleküle in einem durch das Hsp70-System rückfaltungskompetenten Zustand zu halten (Freeman *et al.*, 1996). Des Weiteren hat die Interaktion mit humanem p23 einen stabilisierenden Effekt auf thermisch denaturierte Citratsynthase, was zur Verlangsamung der Inaktivierungskinetik und Unterdrückung der Aggregationsreaktion führt (Weigl, 1996; Bose *et al.*, 1996).

3.2.1.1. Vergleich von hp23 und Sba1 in Citratsynthase-Chaperon-Assays

Um nachzuprüfen, ob die in der Literatur beschriebenen Chaperon-Aktivitäten von hp23 eine allgemeine Eigenschaft der Mitglieder aus der p23-Familie darstellen, wurden analoge Chaperon-Assays mit Sba1, dem p23-Homologen aus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Zunächst wurde der Einfluss von Sba1 auf die thermisch induzierte Aggregation von Citratsynthase (CS) im Fluoreszenzspektrophotometer beobachtet (Abbildung 3.18a).

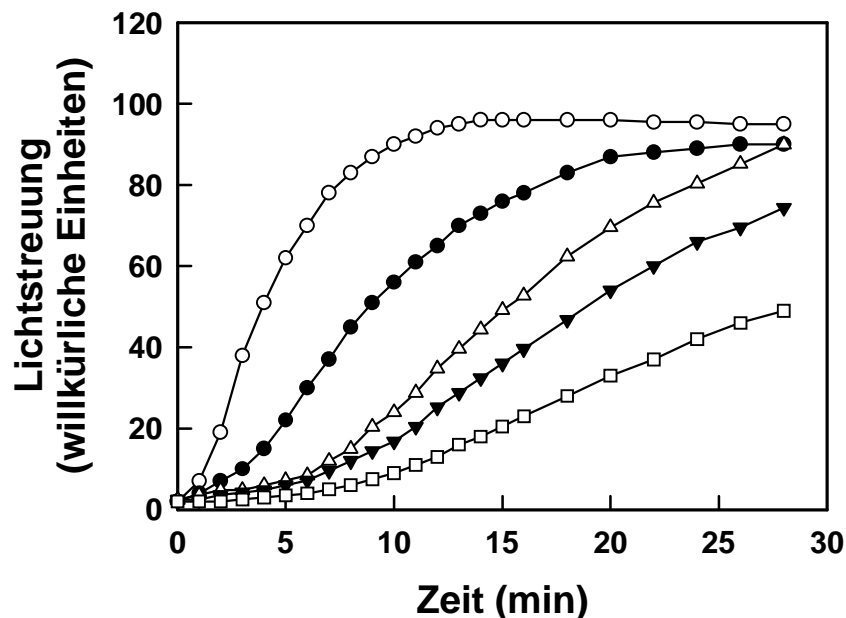


Abbildung 3.18a:

Interaktion von Sba1/yp23 und hp23 mit thermisch denaturierter CS (Aggregation)
 150 nM CS (Monomer) wurden bei 43°C inkubiert. Die durch CS-Aggregation bewirkte Lichtstreuung des Reaktionsansatzes wurde in Abwesenheit zusätzlicher Komponenten (○) oder in Anwesenheit eines 5-fachen (●), 10-fachen (Δ) oder 15-fachen (▼) molaren Überschusses an Sba1 beobachtet. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit 5-fach molarem Überschuss an hp23 vermessen (◻).

Das molare Verhältnis von Sba1 zu CS betrug dabei zwischen 5:1 und 15:1. Während der 30 minütigen Inkubation bei 43°C nahm die Lichtstreuung im Kontrollansatz ohne p23 signifikant zu und erreichte nach ca. 15 min ein Maximum. Durch Anwesenheit von Sba1 in der temperierten Küvette konnte der Verlauf dieser Aggregationskinetik deutlich beeinflusst werden. Die temperaturinduzierte CS-Aggregation wurde in konzentrationsabhängiger Weise durch Sba1 verlangsamt. Dabei stellte diese Aggregationsunterdrückung nicht einen unspezifischen „Proteineffekt“ dar, wie in einer Kontrollreaktion mit gleichen Mengen an MAK33-IgG deutlich wurde (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich mit hp23 zeigte sich jedoch, dass Sba1 als Chaperon weniger effektiv ist als sein humanes Homolog. Selbst mit einem 15-fachen molaren Überschuss an Sba1 zu CS wurde nicht das Ausmaß an Unterdrückung erreicht, das sich bei einem 5-fachen Überschuss von hp23 zeigt. Geringe Unterschiede wurden auch beim Einfluss beider Proteine auf die thermische Inaktivierung von CS deutlich (Abbildung 3.18b).

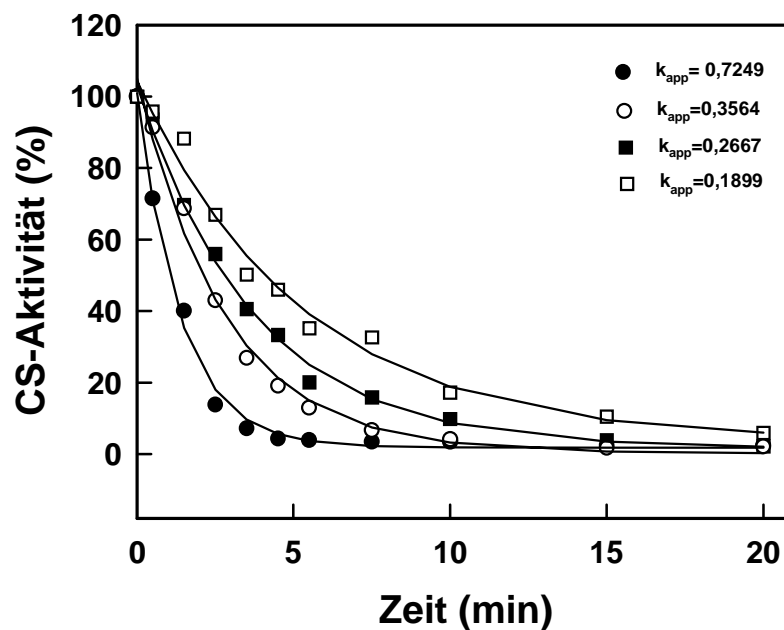


Abbildung 3.18b: *Interaktion von Sba1/yp23 und hp23 mit thermisch denaturierter CS (Inaktivierung)*

150 nM CS (Monomer) wurden bei 43°C inkubiert. Die Inaktivierungskinetik des Enzyms wurde in Abwesenheit sonstiger Komponenten (●), oder in Anwesenheit eines 2-fachen molaren Unterschusses an Sba1 (○) bzw. in Anwesenheit äquimolarer Mengen an Sba1 (■) verfolgt. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit äquimolaren Mengen an hp23 vermessen (□). Die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierungsreaktion sind angegeben.

Während die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierungsreaktion durch die Anwesenheit äquimolarer Mengen an hp23 ca. um den Faktor 4 verringert wird, ist Sba1 in diesem Kontext weniger effektiv (ca. Faktor 3 bei äquimolaren Mengen). Wie im Fall der

Aggregationsreaktion konnte auch hier ein unspezifischer Proteineffekt ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der Literatur beschriebenen Chaperon-Eigenschaften ein charakteristisches Merkmal der p23-Familie zu sein scheinen. Unter den einzelnen Mitgliedern der Familie zeigen sich jedoch Unterschiede im Bezug auf die Effektivität.

3.2.1.2. Einfluss von hp23 auf die thermisch induzierte Aggregation weiterer Substratproteine

Humanes p23 geht eine produktive Wechselwirkung mit Entfaltungsintermediaten von β -Galactosidase und Citratsynthase ein (Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996). Basierend auf diesem kleinen Substratrepertoire lassen sich jedoch keine Schlüsse hinsichtlich Substrat-Chaperon-Interaktionen und insbesondere bezüglich Substratpräferenzen von p23 ziehen. Daher wurde der Einfluss von p23 in weiteren Chaperon-Assays mit Modellsubstraten getestet, um zusätzliche Proteine zu identifizieren, die durch Interaktion mit p23 stabilisiert werden. Als erstes Modellsubstrat wurde α -Glucosidase (α -Glc) gewählt. Dieses Hefeprotein zeigt nach Inkubation bei erhöhten Temperaturen ein ähnliches Aggregationsverhalten wie Citratsynthase, welches im Fluoreszenzspektrophotometer verfolgt wurde (Abbildung 3.19a).

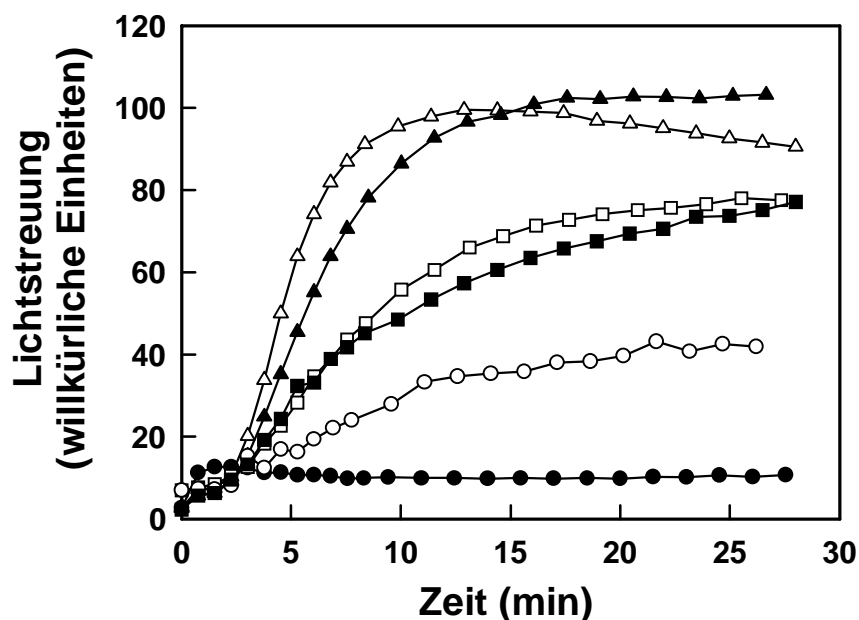


Abbildung 3.19a:

Interaktion von hp23 mit thermisch denaturierter α -Glucosidase

150 nM α -Glucosidase wurden bei 49°C inkubiert. Die durch Aggregation des Proteins bewirkte Lichtstreuung wurde in Abwesenheit sonstiger Komponenten (Δ) oder in Anwesenheit eines 10-fachen (\blacktriangle), 20-fachen (\square) oder 40-fachen (\circ) molaren Überschusses an hp23 beobachtet. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit äquimolaren Mengen an tetradecamerem GroEL (\bullet) oder einem 40-fachen Überschuss an MAK33-IgG (\blacksquare) vermessen.

Die Aggregation konnte durch einen hohen molaren Überschuss an hp23 zu einem Teil unterdrückt werden. Im Vergleich zum Citratsynthase-Assay erwies sich p23 jedoch hier auf molarer Ebene als weitaus weniger effektiv (s.o.). Darüber hinaus war für die beobachtete Unterdrückung zu einem Grossteil ein unspezifischer Proteineffekt verantwortlich, da auch große Mengen an MAK33 zu einer ähnlichen Veränderung der Aggregationskinetik führten. Dahingegen konnte durch äquimolaren Mengen an GroEL die beobachtete Lichtstreuung fast komplett inhibiert werden.

Im Bezug auf das Modellsubstrat Malatdehydrogenase (MDH) konnten für p23 ebenfalls keine Chaperon-Aktivitäten festgestellt werden (Abbildung 3.19b). Die durch Inkubation bei erhöhten Temperaturen ausgelöste Aggregation des Proteins scheint in Anwesenheit von hp23 sogar schneller zu verlaufen. Das Erreichen eines Maximalwertes ist in diesem Fall auf ein Überschreiten des auf die Standardreaktion (MDH ohne Chaperone) geeichten Messbereiches zurückzuführen. Auch die Aggregation von MDH kann durch die Zugabe von GroEL im Verhältnis 1:1 zum Substratprotein fast komplett unterdrückt werden.

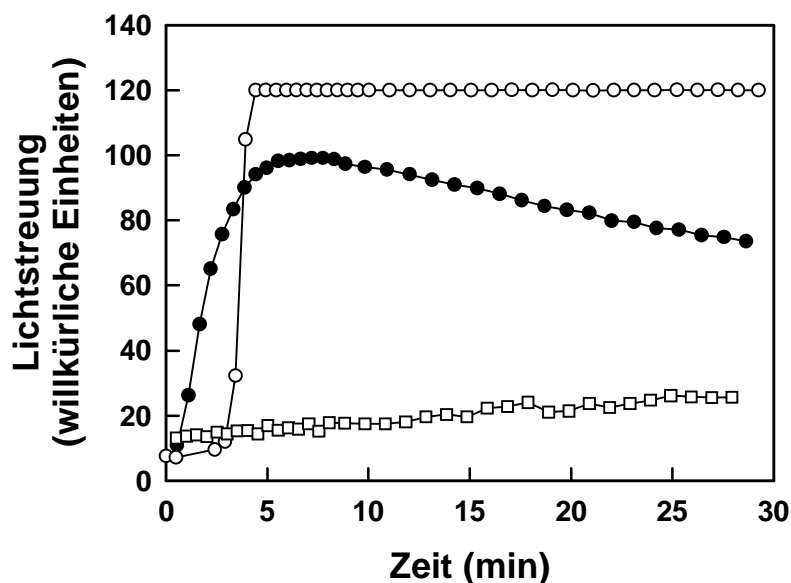


Abbildung 3.19b:

Interaktion von hp23 mit thermisch denaturierter Malatdehydrogenase

200 nM MDH (Monomer) wurden bei 46°C inkubiert. Die durch Aggregation des Proteins bewirkte Lichtstreuung wurde in Abwesenheit sonstiger Komponenten (●) oder in Anwesenheit einer äquimolaren Menge an hp23 (○) beobachtet. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit äquimolaren Mengen an tetradecamerem GroEL (□) vermessen.

Zur genaueren Analyse der beschriebenen Chaperon-Aktivitätstests wurde hp23 mit den Substratproteinen unter den Bedingungen jeweiligen Tests quervernetzt (Abbildung 3.19c). Wie erwartet, bildete sich ein Komplex zwischen dem Entfaltungsintermediat von CS und p23 aus, der mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen p23 sichtbar gemacht werden

konnte. p23 interagiert dabei sowohl mit der monomeren als auch der dimeren Form des Citratsynthasemoleküls. Ein ähnliches Muster konnte für die Wechselwirkung mit Malatdehydrogenase beobachtet werden. Dahingegen trat weder bei 44°C, 49°C noch bei 52°C ein Komplex zwischen p23 und α -Glucosidase auf. Dies erklärt die mangelnde Stabilisierung von α -Glucosidase im Aggregationsassay.

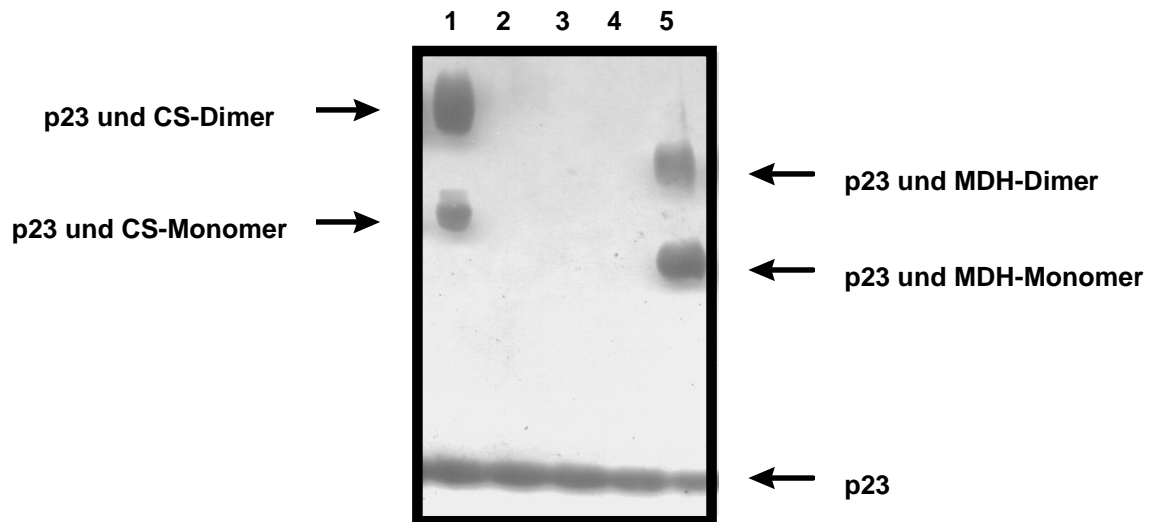


Abbildung 3.19c:

Interaktion von hp23 mit verschiedenen Substratproteinen

0,075 mg/ml hp23 wurde mit 0,075 mg/ml des jeweiligen Substratproteins für 5 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert und im Anschluss chemisch quervernetzt. p23-enhaltende Komplexe wurden nach der SDS-PAGE durch Immunoblot und Detektion mit monoklonalem Antikörper JJ3 sichtbar gemacht (primärer Antikörper: 1:2000; sekundärer Antikörper: 1:2000)

Spur 1: p23 und CS bei 43°C

Spur 2: p23 und α -Glc bei 44°C

Spur 3: p23 und α -Glc bei 49°C

Spur 4: p23 und α -Glc bei 52°C

Spur 5: p23 und MDH bei 46°C

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zu anderen Chaperonen (wie z. B. GroEL) p23 nur mit einigen Substratproteinen Interaktionen eingeht. Darüber hinaus führen nicht alle Wechselwirkungen zu einer apparenten Stabilisierung des Substratproteins wie am Beispiel von MDH gezeigt werden konnte.

3.2.1.3. Einfluss von hp23 auf die chemisch induzierte Aggregation von Insulin

Neben Citratsynthase und β -Galaktosidase konnte im Rahmen dieser Arbeit Insulin als weiteres Substrat für p23 identifiziert werden (Abbildung 3.20). Es zeigte sich, dass die durch chemische Reduktion ausgelöste Aggregation der Insulin-B-Kette durch Anwesenheit von hp23 signifikant unterdrückt werden kann. Da das Ausmaß der Unterdrückung wie im Citratsynthase-Assay in direkter Relation zur eingesetzten p23-Menge steht und IgG keinen Einfluss auf die Insulinaggregation zeigt (nicht gezeigt), kann davon ausgegangen werden,

dass es sich um einen p23-spezifischen Effekt handelt. Dabei erweist sich hp23 auf molarer Ebene im Insulinassay als effektiveres Chaperon als im CS-Assay, da bereits ein äquimolares Verhältnis von hp23 zu Insulin ausreicht, um signifikante Unterdrückung zu erzielen. Diese Unterschiede, die auch für Hsp82 beschrieben wurden (Scheibel *et al.*, 1998), reflektieren die unterschiedlichen Aggregationskinetiken beider Substratproteine, welche schnell im Fall von CS und deutlich langsamer im Fall von Insulin sind (siehe Lag-Phase am Anfang der Aggregationskinetik).

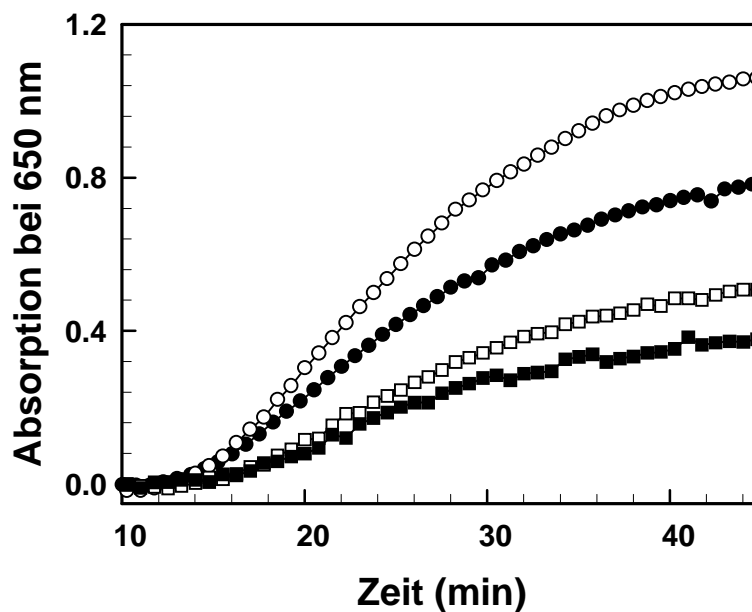


Abbildung 3.20:

Interaktion von hp23 mit reduziertem Insulin

Die Aggregation von 45 μ M Insulin wurde durch Reduktion mit 20 mM DTE induziert. Die durch Aggregation der Insulin-B-Kette bewirkte Absorptionszunahme bei 650 nm wurde in Abwesenheit zusätzlicher Komponenten (○) oder in Anwesenheit eines 2-fachen molaren Unterschusses (●), äquimolarer Mengen (□) oder eines 2-fachen molaren Überschusses (■) an hp23 beobachtet. Die Aggregation setzt erst 10 min nach DTE-Zugabe ein.

3.2.1.4. Diskussion der Chaperon-Aktivität von p23

p23 wurde als Komponente zahlreicher Hsp90-Substratkomplexe identifiziert (Johnson *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1997; Holt *et al.*, 1999). Somit scheint dieses Molekül eine essentielle Rolle bei der Hsp90-abhängigen Reifung von Substratproteinen zu spielen. Dennoch ist über die genaue Funktion von p23 in diesem Kontext wenig bekannt. Für das isolierte p23-Molekül konnten *in vitro* Chaperon-Eigenschaften festgestellt werden (Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996). Die Wechselwirkung, die p23 mit den Substratproteinen eingeht, scheint eher transientser Natur zu sein (Weickl, 1996). Zum einen würde bei stabiler Interaktion zwischen Chaperon und Substrat kein Einfluss auf die Inaktivierungskinetik von CS zu erkennen sein,

wie dies auch bei den kleinen Hitzeschockproteinen der Fall ist (Ehrnsperger *et al.*, 1997). Darüber hinaus deutet der ansteigende Verlauf der CS-Aggregationskinetik in Anwesenheit von p23 darauf hin, dass CS-Moleküle kontinuierlich von p23 abdissoziieren und in Folge dessen wieder aggregationsanfällig sind.

Nach Kenntnis der Chaperon-Eigenschaften von p23 wurde spekuliert, dass p23 im Hsp90-Heterokomplex nicht nur Wechselwirkungen zum Hsp90-Molekül ausbildet, sondern auch direkt mit dem Substratprotein in Kontakt tritt (Bose *et al.*, 1996; Weikl, 1996; Freeman *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Chaperon-Eigenschaften eingehender analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Proteine von p23 als Substrate erkannt und gebunden werden. Im Fall von Malatdehydrogenase führte die ausgebildete Interaktion nicht zu einer apparenten Stabilisierung der Entfaltungsintermediate, sondern sogar zu einer Beschleunigung der Aggregationskinetik. Es ist vorstellbar, dass in diesem speziellen Beispiel die Chaperon-Substrat-Wechselwirkung destabilisierende Wirkung auf p23 ausübt, so dass auch p23 in die Aggregationsreaktion involviert ist.

Ein allgemeines Substraterkennungsmuster für p23 kann basierend auf den gezeigten Daten nicht erstellt werden. Vor kurzem wurde postuliert, dass die Funktionalität von Steroidhormonrezeptoren durch verschiedene p23-Homologe unterschiedlich moduliert wird (Freeman *et al.*, 2000). Demnach scheinen innerhalb der p23-Familie Unterschiede bezüglich Substraterkennung bzw. Interaktion mit dem jeweiligen Substratprotein zu existieren.

3.2.2. Wechselwirkung zwischen Hsp90 und p23

3.2.2.1. Chemische Quervernetzung von Hsp90 und p23

Die Ausbildung eines detektierbaren Komplexes aus Hsp90 und p23 kann durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden. Eine absolute Voraussetzung für das Zustandekommen der wechselseitigen Interaktion ist dabei das Vorhandensein von ATP, damit das Hsp90-Molekül im ATP-gebundenen und damit für p23 affinen Zustand vorliegt (Sullivan *et al.*, 1997; Grenert *et al.*, 1997). Da ATP-Hydrolyse in diesem Kontext einen negativen Effekt ausübt, wie anhand von ATP-Hydrolyse-defizienten Hsp90-Mutanten gezeigt wurde (Grenert *et al.*, 1999), wird der Hsp90-p23-Komplex zusätzlich durch die Substitution von ATP durch das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon ATP γ S stabilisiert (Sullivan *et al.*, 1997).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen p23 und Hsp90 durch geringe Konzentrationen (0,01%) des nicht-ionischen Detergens Nonidet P-40 gefördert

wird (Sullivan *et al.*, 1997). Diese Substanz wurde ursprünglich zum Aufschluss von Zellen verwendet, aus denen nicht-aktivierte Steroidhormonrezeptoren isoliert wurden. Die chemische Grundlage für die Stabilisierung einer Protein-Protein-Interaktion durch ein Detergens ist noch unklar.

Als weitere unphysiologische Substanz mit stabilisierendem Einfluss wurde Molybdat in Konzentrationen zu ca. 10 mM identifiziert (Sullivan *et al.*, 1997). Für Molybdat wird ein Einfluss auf die Konformationserhaltung des Hsp90-Moleküls nach ATP-Hydrolyse diskutiert (Grenert *et al.*, 1999) (Einleitung Kapitel 1.5.).

Die in der Literatur beschriebenen Effekte auf Wechselwirkungen zwischen Hsp90 und p23 wurden vorwiegend durch Immunpräzipitationen der gebildeten Komplexe untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob auch chemische Quervernetzung beider Proteine geeignet ist, um diese Komplexbildung zu dokumentieren. Zunächst wurden beide Komponenten des Hefesystems (Hsp82 und Sba1) in Anwesenheit von ATP bzw. der nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga ATP γ S und AMP-PNP nach 30 minütiger Inkubation quervernetzt (Abbildung 3.21a).

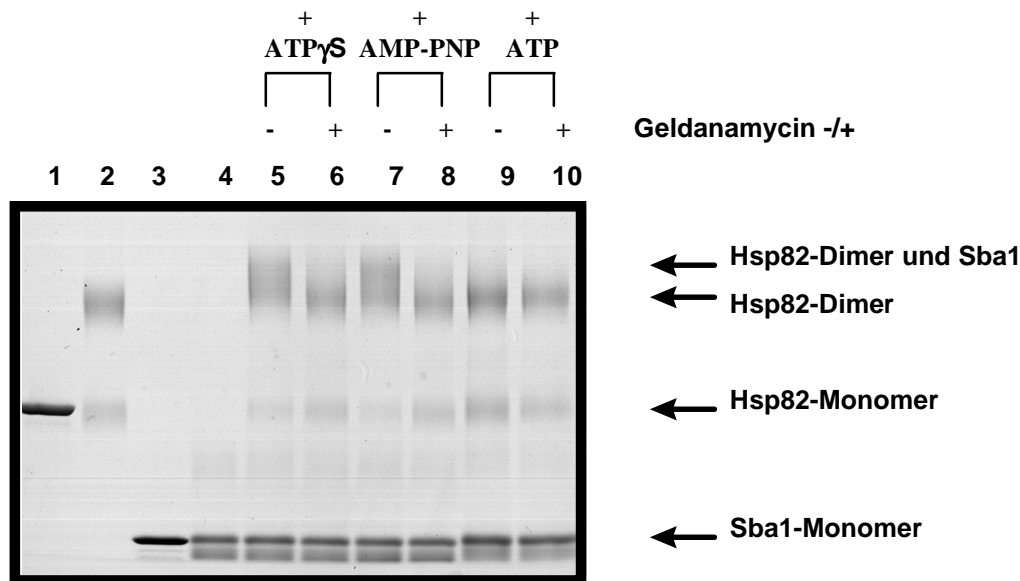


Abbildung 3.21a:

Interaktion von Hsp82 und Sba1 in Abhängigkeit verschiedener Nukleotide

0,2 mg/ml Hsp82 und 0,2 mg/ml Sba1 wurden unter Zusatz verschiedener Nukleotide (bzw. Nukleotidanaloga) für 30 min inkubiert und anschließend chemisch quervernetzt. Die Konzentrationen der Nukleotide betragen jeweils 2 mM. Zur Kontrolle wurden entsprechende Ansätze mit Geldanamycin (GA) in 2-fachem Überschuss zu Hsp82 angesetzt.

Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 15 mM MgCl₂

Spur 1: Hsp82 nicht quervernetzt

Spur 2: Hsp82

Spur 3: Sba1 nicht quervernetzt

Spur 4: Sba1

Spur 5: Hsp82 und Sba1 mit ATP γ S

Spur 6: analog Spur 5 mit GA

Spur 7: Hsp82 und Sba1 mit AMP-PNP

Spur 8: analog Spur 7 mit GA

Spur 9: Hsp82 und Sba1 mit ATP

Spur 10: analog Spur 9 mit GA

Es zeigte sich, dass die alleinige Anwesenheit von ATP im Ansatz nicht ausreichend ist, um eine durch Quervernetzung nachweisbare Komplexbildung beider Proteine zu bewirken. Die fehlende Interaktion könnte ihren Grund darin haben, dass Hsp82 unter den vorliegenden Steady-State-Bedingungen einer kontinuierlichen Abfolge von ATP-Hydrolyse-Zyklen unterworfen ist. Somit könnte die Zeitspanne, in der das Hitzeschockprotein im ATP-gebundenen Zustand vorliegt, zu kurz sein, um eine effektive Komplexbildung mit Sba1 zu gewährleisten. Dahingegen konnte in den Ansätzen mit ATP γ S und AMP-PNP eine erkennbare Verschiebung der Hsp82-Dimerenbande zu höheren Molekulargewichten beobachtet werden. Diese Verschiebung beruht auf einer spezifischen Wechselwirkung mit Sba1, da in den entsprechenden Kontrollansätzen mit Geldanamycin keine Verschiebung der Dimerenbande auftrat.

Im Gegensatz zum Hefesystem ist die Anwesenheit von ATP γ S nicht ausreichend, um signifikante Komplexbildung zwischen den humanen Hsp90- und p23-Homologen zu bewirken (Abbildung 3.21b).

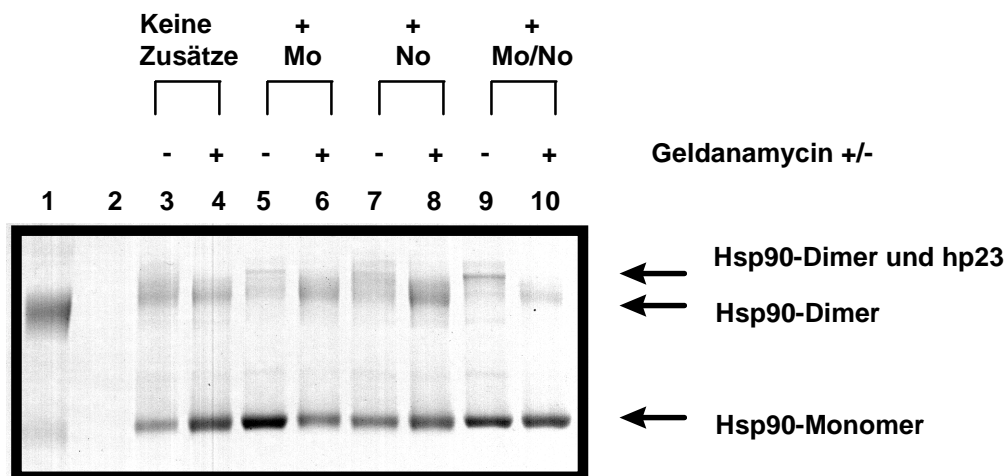


Abbildung 3.21b:

Interaktion von humanem Hsp90 β und hp23 unter verschiedenen Bedingungen

0,2 mg/ml Hsp90 und 0,2 mg/ml hp23 wurden vor Quervernetzung mit 2 mM ATP γ S und verschiedenen Zusätzen 30 min inkubiert. Zur Kontrolle wurden entsprechende Ansätze mit Geldanamycin (GA) in 2-fachem Überschuss zu Hsp90 angesetzt. Die Konzentration von Molybdat (Mo) in den Ansätzen betrug 10 mM, die Konzentration von Nonidet P-40 (No) betrug 0,01%. Die monomere p23-Bande ist nicht zu erkennen. Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 15 mM MgCl₂

Spur 1: Hsp90

Spur 2: hp23

Spur 3: Hsp90 und hp23 ohne Zusätze

Spur 4: analog Spur 3 mit GA

Spur 5: Hsp90 und hp23 + Mo

Spur 6: analog Spur 5 mit GA

Spur 7: Hsp90 und hp23 +No

Spur 8: analog Spur 7 mit GA

Spur 9: Hsp90 und hp23 +Mo/No

Spur 10: analog Spur 9 mit GA

Eine deutliche Verschiebung der Hsp90-Dimerenbande zeigte sich erst nach Zugabe von Molybdat oder Nonidet P-40. Am effektivsten erwies sich die Kombination beider Substanzen. Auch in diesem Fall wurde die Spezifität der Interaktion durch Disruption des Komplexes mit Geldanamycin erwiesen. Auf die Wechselwirkung zwischen Hsp82 und Sba1 haben Molybdat und Nonidet P-40 keinen steigernden Einfluss, wenn die Quervernetzungsreaktion in Anwesenheit von ATP γ S durchgeführt wird (Daten nicht gezeigt). Bei Substitution des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons gegen ATP führt die gleichzeitige Zugabe dieser Substanzen jedoch zu einem für Komplexbildung typischen Bandenshift (Daten nicht gezeigt), welcher üblicherweise in Anwesenheit von ATP nicht auftritt (s.o.). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass durch die Anwesenheit von Molybdat die Konformation von Hsp90 auch nach ATP-Hydrolyse im ATP-gebundenen und damit für p23 affinen Zustand gehalten wird (Grenert *et al.*, 1999). Auch heterologe Wechselwirkungen zwischen Hsp90 und p23 wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Hsp82 und hp23 unter keinen Bedingungen miteinander assoziieren (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte für humanes Hsp90 und Sba1 die Ausbildung eines Komplexes unter den für das humane System etablierten Bedingungen (Molybdat und Nonidet P-40) beobachtet werden (Abbildung 3.21c).

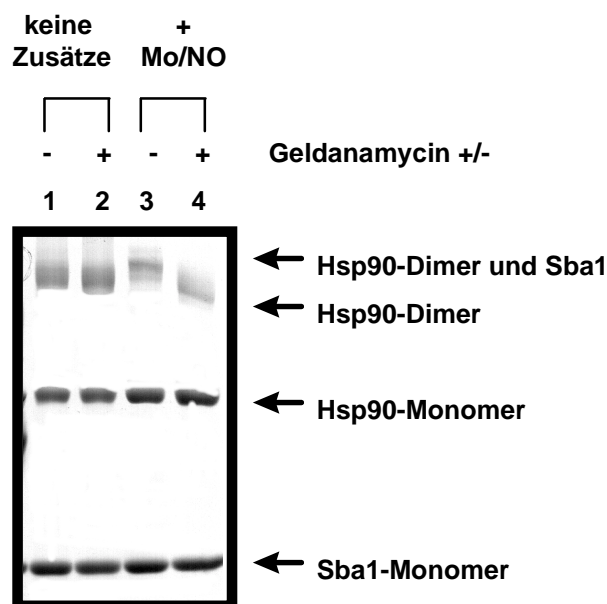


Abbildung 3.21c:

Interaktion von humanem Hsp90 β mit Sba1

0,2 mg/ml Hsp90 und 0,2 mg/ml Sba1 wurden vor Quervernetzung mit 2 mM ATP γ S und falls angegeben mit entsprechenden Zusätzen inkubiert. Zur Kontrolle wurden entsprechende Ansätze mit Geldanamycin (GA) in 2-fachem Überschuss zu Hsp90 angesetzt. Die Konzentration von Molybdat (Mo) in den Ansätzen betrug 10 mM, die Konzentration von Nonidet P-40 (No) betrug 0,01%.

Puffer: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 15 mM MgCl₂

Spur 1: Hsp90 und Sba1 ohne Zusätze

Spur 2: analog Spur 1 mit GA

Spur 3: Hsp90 und Sba1 +Mo/No

Spur 4: analog Spur 3 mit GA

3.2.2.2. Diskussion der chemischen Quervernetzung von Hsp90 und p23

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Komplexbildung zwischen Hsp90 und p23 auch durch chemische Quervernetzung anstelle der bisher üblichen Immunpräzipitation nachgewiesen werden kann. Zwar wurde im Quervernetzungsexperiment nur ein gewisser Anteil des Gesamtproteins im Komplex detektiert, wie aus der Fraktion ungebundenen Proteins geschlossen werden kann. Die Ausbeute an quervernetztem Protein konnte auch durch Titration der p23-Menge nicht weiter optimiert werden. Jedoch kann die beobachtete Bandenverschiebung als signifikantes und ausreichendes Signal zum Nachweis einer ausgebildeten Wechselwirkung angesehen werden. Bei beiden Methoden wurden dieselben Komponenten als Stabilisatoren des Komplexes identifiziert. *In vivo* müssen andere Faktoren existieren, die einen stabilisierenden Effekt auf Hsp90/p23-Komplexe ausüben. Zum einen könnte die Rekrutierung von p23 in den Komplex mit Hsp90 durch solche Faktoren beschleunigt werden. Damit wäre die Zeitspanne, die sich Hsp90 vor der Hydrolyse im ATP-gebundenen Zustand befindet, möglicherweise ausreichend für effektive Wechselwirkung beider Proteine. Zum anderen ist vorstellbar, dass die Interaktion zwischen Hsp90 und p23 dadurch erleichtert wird, dass das Hsp90-Molekül im ATP-gebundenen Zustand stabilisiert wird. Dies könnte durch STI1-Homologe bewirkt werden, von denen gezeigt wurde, dass sie *in vitro* einen inhibierenden Effekt auf die intrinsische ATPase-Aktivität von Hsp90 ausüben (Prodromou *et al.*, 1999).

3.2.3. Struktur-Funktions-Beziehung von humanem p23

3.2.3.1. Strukturelle Charakterisierung von hp23

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beiden für p23 *in vitro* beschriebenen Funktionen (Bindung an Hsp90 und *in-vitro*-Chaperon-Aktivität) definierten Strukturbereichen des Moleküls zuzuordnen. Im Rahmen einer grundlegenden strukturellen Charakterisierung wurde daher ein Fern-UV-CD-Spektrum von hp23 aufgenommen (Abbildung 3.22). Das von 250 nm bis 200 nm gemessene Spektrum, anhand dessen Rückschlüsse auf Sekundärstrukturelemente des p23-Moleküls gezogen werden können, wies einen für Fern-UV-CD-Spektren ungewöhnlichen Peak bei 230 nm auf. Dieser Peak, der charakteristisch für die p23-Familie zu sein scheint, da er auch im Fern-UV-CD-Spektrum von Sba1 zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt), beruht wahrscheinlich auf dem hohen Anteil (10 %) aromatischer Aminosäuren im Protein. Aufgrund des lokalen Minimums im

Bereich von 218 nm zusammen mit dem geringen negativen Elliptizitätssignal können für hp23 überwiegend β -Strukturanteile postuliert werden. Jedoch ist die negative Elliptizität im Bereich von 200 nm uncharakteristisch für nativ gefaltete Proteine (Schmid, 1989). Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass das p23-Molekül ungefaltete Strukturbereiche enthält.

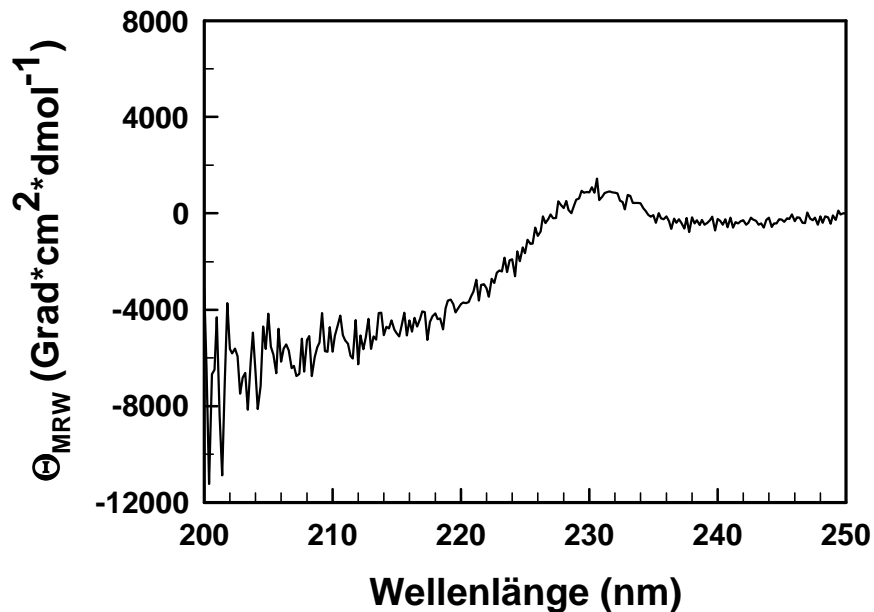


Abbildung 3.22: *Sekundärstruktur von humanem p23*
Fern-UV-CD-Spektrum von 0,2 mg/ml hp23 bei 20°C.
Puffer: 40 mM Kaliumphosphat, pH 6,8

Um diese Theorie zu testen, wurde humanes p23 einer limitierten Proteolyse durch Proteinase K ausgesetzt (Abbildung 3.23).

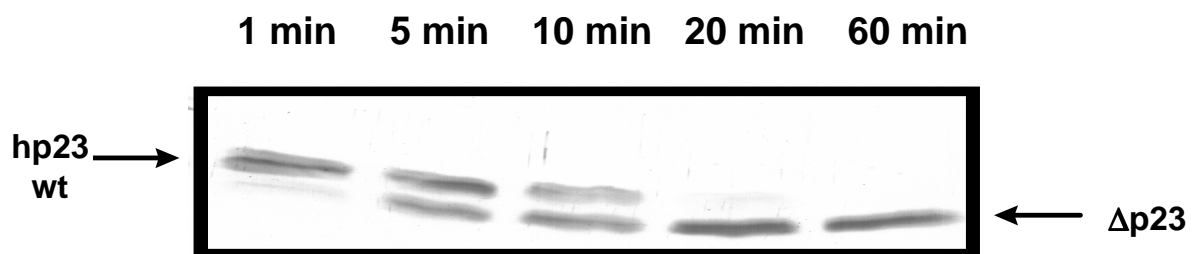


Abbildung 3.23: *Proteolytischer Verdau von hp23*
hp23 wurde mit 4000-fachem Unterschuss an Proteinase K bei 25°C verdaut.
SDS-PAGE: 12.5%-20% Gradientengel

Die 60 minütige Inkubation des Wildtypproteins mit einem 4000-fachen Unterschuss an Protease führte zur Entstehung eines neuen stabilen Fragments, welches nach Grössenabschätzung auf der SDS-PAGE ungefähr 3 kDa kleiner ist als das unprozessierte Protein. Dieses Fragment erwies sich auch bei Verlängerung der Inkubationszeiten oder Erhöhung der Proteasekonzentration als stabil. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Verwendung von Trypsin anstelle von Proteinase K erzielt. Die Grösse des proteolytischen Produkts wurde anhand von Massenspektrometrie zu ca. 15400 Da bestimmt. Durch Edman-Abbau wurden die N-terminalen Aminosäuren des entstandenen Fragments als MQPASAK identifiziert. Diese Sequenz entspricht der N-terminalen Region des Wildtypproteins. Als Konsequenz dieser Ergebnisse und nach Lokalisierung möglicher Proteinase-K-Schnittstellen in der hp23-Sequenz konnte gefolgert werden, dass das durch proteolytischen Verdau aus hp23 entstandene Fragment die Aminosäuren 1 bis 130 des 160 Aminosäuren langen Wildtypproteins umfasst. Dahingegen fehlen die 30 C-terminalen Aminosäuren, die möglicherweise einen ungefalteten, proteaseanfälligen Schwanz des p23-Moleküls darstellen.

3.2.3.2. Klonierung und strukturelle Charakterisierung von $\Delta p23$

Um die strukturellen Eigenschaften des Wildtypproteins mit denen des proteolytischen Abbauproduktes vergleichen zu können, wurde die DNA-Sequenz des entsprechenden Fragments vom Originalplasmid pET23a-hp23 durch PCR amplifiziert (zur Klonierung siehe Material und Methoden). Das PCR-Produkt wurde in den pET17b-Vektor über die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen inseriert. Nach Transformation des entstandenen Klons pET17b- $\Delta p23$ in ein bakterielles Expressionssystem wurde $\Delta p23$ nach der in Material und Methoden beschriebenen Vorschrift gereinigt.

Das Fern-UV-CD-Spektrum von $\Delta p23$ ist typisch für ein β -Faltblatt-Protein mit einem lokalen Minimum von $-5000 \text{ Grad cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ (Abbildung 3.24a).

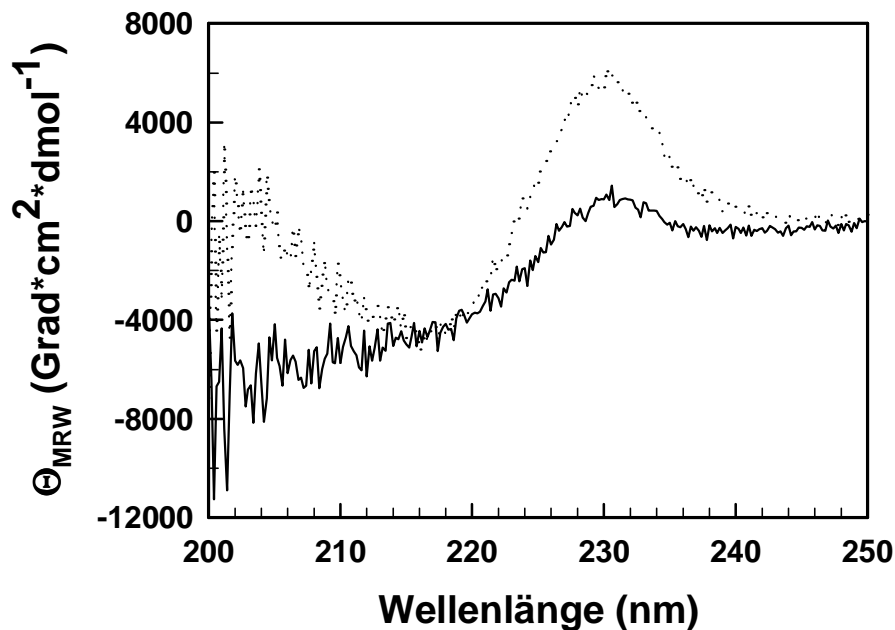


Abbildung 3.24a: *Sekundärstruktur von humanem p23 und $\Delta p23$*
 Fern-UV-CD-Spektren von 0,2 mg/ml hp23 (—) und 0,2 mg/ml $\Delta p23$ (····) bei 20°C.
 Puffer: 40 mM Kaliumphosphat, pH 6,8

Das Signal bei 230 nm ist hier sogar noch stärker ausgeprägt als im Wildtypprotein, da alle aromatischen Aminosäuren der hp23-Sequenz auch im $\Delta p23$ -Molekül vorhanden sind. Wie erwartet, steigt das CD-Signal von $\Delta p23$ im Bereich zwischen 210 nm und 200 nm auf Werte um 0 Grad cm² dmol⁻¹ an, was auf eine nativ gefaltete Struktur des Proteins hinweist. Zum Vergleich wurde ein Fern-CD-Signal von PEP1 aufgenommen (Abbildung 3.24b). PEP1 ist ein chemisch synthetisiertes Peptid, welches den 37 C-terminalen Aminosäuren des hp23-Moleküls entspricht. In Übereinstimmung mit der Annahme, dass dieser Teil von p23 größtenteils in ungefaltetem Zustand vorliegt, konnten im Fern-UV-CD-Spektrum von PEP1 keine Sekundärstrukturelemente erkannt werden.

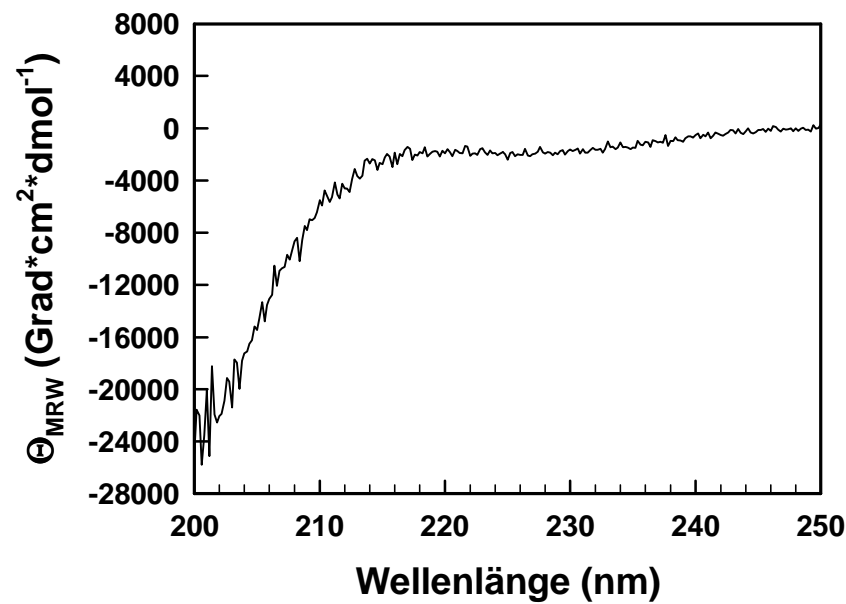


Abbildung 3.24b: *Sekundärstruktur von PEP1*
Fern-UV-CD-Spektrum von 0,2 mg/ml PEP1 bei 20°C.

Als Grundlage für die nachfolgenden Chaperon-Assays wurde die Stabilität von $\Delta p23$ mit der des Wildtypproteins verglichen. Dies erfolgte durch Messung des CD-Signals beider Proteine bei der charakteristischen Wellenlänge von 230 nm während kontinuierlicher Temperaturerhöhung (Abbildung 3.25). Während das CD-Signal von hp23 ab ca. 45°C an Intensität verlor, blieb das entsprechende $\Delta p23$ -Signal konstant bis ca. 60°C. Oberhalb 60°C wurde ein scharfes Abfallen der Elliptizität beobachtet, was auf einen kooperativen Verlust von Sekundärstrukturelementen als Folge thermischer Entfaltung hinweist. Bei beiden Proteinen war der Entfaltungsprozess bei ca. 70°C abgeschlossen. Die thermische Entfaltung stellte eine irreversible Reaktion dar, da ein anschließendes Abkühlen nicht zur Wiederausbildung von nativen Sekundärstrukturen führte. Von Bedeutung ist, dass die Entfernung der C-terminalen Region von hp23 dessen thermische Stabilität nicht verringert, sondern vielmehr zu einem kooperativeren Entfaltungsübergang führt.

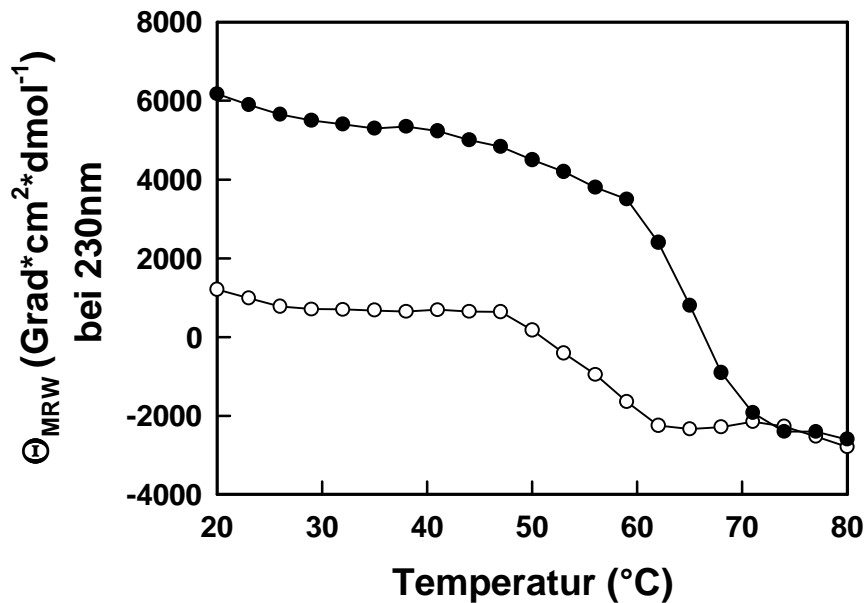


Abbildung 3.25:

Temperaturübergang von hp23 und Δp23

Das CD-Signal von 0,2 mg/ml hp23 (○) und 0,2 mg/ml Δp23 (●) wurde bei 230 nm während konstanter Temperaturerhöhung mit einer Heizrate von 0,5°C/min beobachtet.

Puffer: 40 mM Kaliumphosphat, pH 6,8

3.2.3.3. Wechselwirkung von Δp23 mit Hsp90

Um zu analysieren, welche Auswirkungen die Entfernung der C-terminalen Region auf die Funktionalität des p23-Moleküls hat, wurde zunächst die Interaktion von Δp23 mit humanem Hsp90 untersucht (Abbildung 3.26). Als Bedingungen wurden diejenigen gewählt, welche sich als optimal für die Stabilisierung des Hsp90-p23-Komplexes aus den humanen Komponenten erwiesen hatten (Sullivan *et al.*, 1997; Grenert *et al.*, 1999; Kapitel 3.2.2.). hp23 oder Δp23 wurden in der Anwesenheit von ATPγS mit humanem Hsp90 nach 30 minütiger Inkubation chemisch vernetzt. Als Kontrolle dienten analoge Reaktionen mit Geldanamycin. Es zeigte sich, dass sowohl hp23 als auch Δp23 gleichermaßen in der Lage sind, an Hsp90 zu binden. In beiden Fällen kann die Komplexbildung spezifisch durch Geldanamycin-Zugabe inhibiert werden. Somit konnten im Bezug auf Interaktion mit Hsp90 keine Unterschiede zwischen hp23 und Δp23 festgestellt werden. Es ist daher anzunehmen, dass die ungefaltete C-terminale Region des p23-Moleküls für die Wechselwirkung mit Hsp90 nicht notwendig ist.

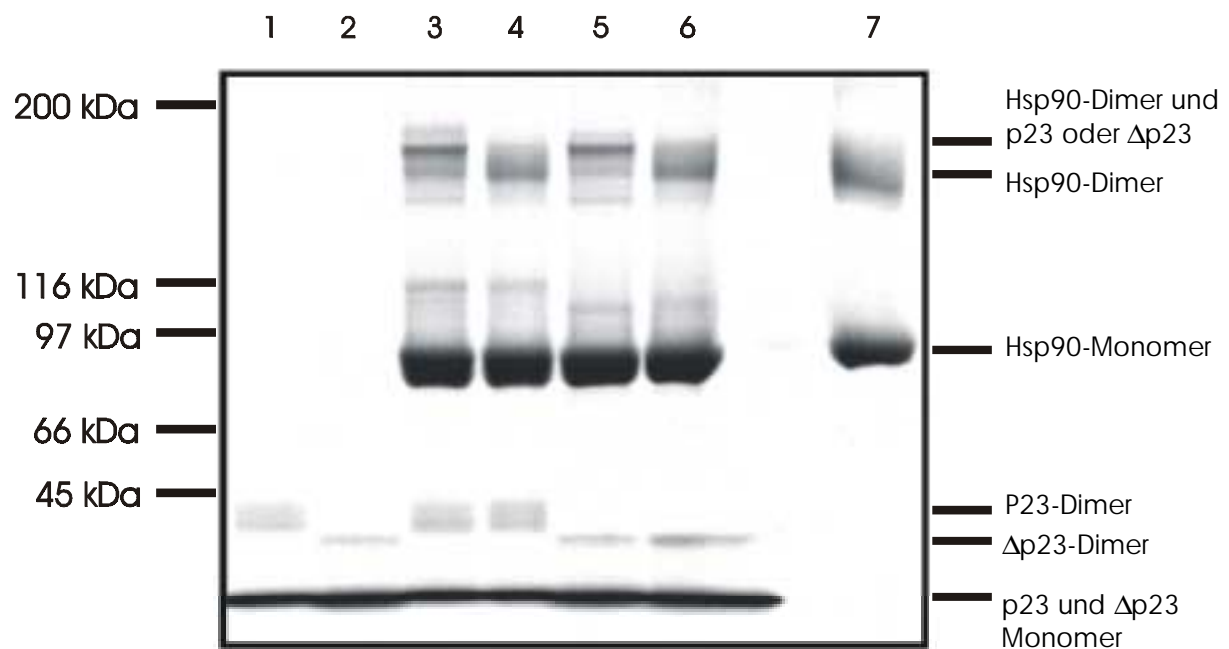


Abbildung 3.26:

Interaktion von Hsp82 mit hp23/Δp23

Die Proteine (Konzentration 0,4 mg/ml) wurden vor Quervernetzung in folgendem Puffer inkubiert:

40 mM HEPES/KOH, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 2 mM ATPγS; 10 mM Na₂Mo₄; 0,01 % Nonidet

Spur 1: hp23

Spur 2: Δp23

Spur 3: Hsp90 und hp23

Spur 4: Hsp90, hp23 und Geldanamycin

Spur 5: Hsp90 und Δp23

Spur 6: Hsp90, Δp23 und Geldanamycin

Spur 7: Hsp90

Geldanamycin wurde in 2-fachem Überschuss zu Hsp90 eingesetzt.

3.2.3.4. Chaperon-Eigenschaften von Δp23

Um die Chaperon-Eigenschaften von Δp23 mit denen des Wildtypproteins zu vergleichen, wurden Chaperon-Assays mit Citratsynthase als Substratprotein im Absorptionsspektrophotometer durchgeführt. Im CS-Aggregationsassay führte die Anwesenheit eines molaren Überschusses an hp23 wie bereits in der Literatur beschrieben (Bose *et al.*, 1996) zu einer effektiven Unterdrückung der thermisch induzierten CS-Aggregation (Abbildung 3.27a). Im Gegensatz dazu hatte dieselbe Menge an Δp23 keinen signifikanten Einfluss auf das Aggregationsverhalten von CS. Somit scheint das Vorhandensein der C-terminalen Region im p23-Molekül eine Voraussetzung für die effiziente Wechselwirkung von p23 mit nicht-nativen Substratproteinen zu sein. Isoliertes PEP1, welches dieser ungefalteten Region entspricht, hatte alleine keinen Einfluss auf CS-Aggregation (Daten nicht gezeigt). Ebenso wenig konnte die Funktion von Δp23 durch die Anwesenheit eines Überschusses an PEP1 im CS-Aggregationsassay trans-komplementiert werden (Daten nicht gezeigt).

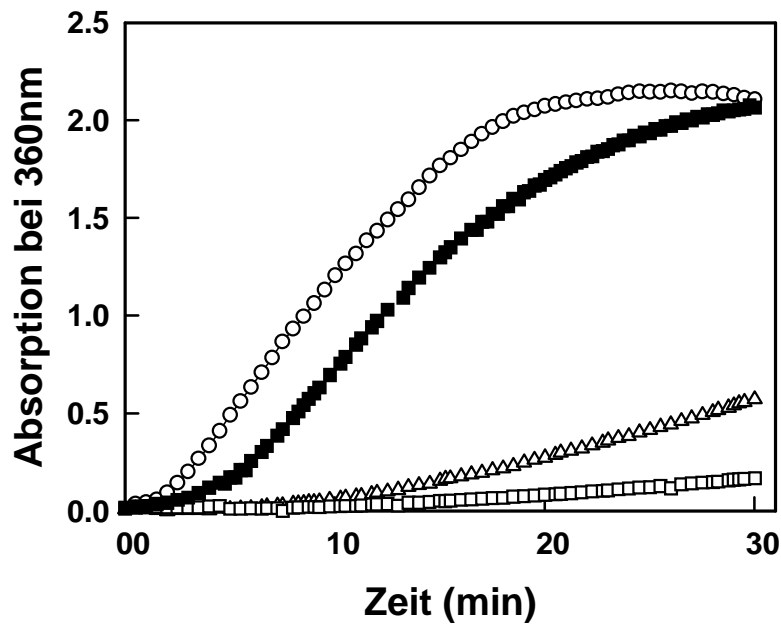


Abbildung 3.27a:

Interaktion von hp23 und Δp23 mit nicht-nativer CS (Aggregation)

4 μM CS (Monomer) wurden bei 43°C inkubiert. Die durch CS-Aggregation bewirkte Absorptionzunahme bei 360 nm wurde in Abwesenheit zusätzlicher Komponenten (○) oder in Anwesenheit eines 5-fachen (Δ) oder 10-fachen (□) molaren Überschusses an hp23 beobachtet. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 10-fach molarem Überschuss an Δp23 (■) vermessen.

Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, als der Einfluss von hp23 und Δp23 auf die Inaktivierungskinetik von CS untersucht wurde (Abbildung 3.27b). Äquimolare Mengen an hp23 verlangsamten den Inaktivierungsprozess des CS-Moleküls um den Faktor 5. Dahingegen blieben die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierungsreaktion in der Anwesenheit von Δp23 unverändert. Auch in diesem Fall konnte durch gleichzeitige Zugabe von PEP1 die Chaperon-Eigenschaft von Δp23 nicht wiederhergestellt werden. Aufgrund dieser Beobachtungen kann postuliert werden, dass der ungefaltete C-terminus von p23 als integraler Bestandteil des Moleküls einen entscheidenden Beitrag zur Chaperon-Eigenschaft des Gesamtmoleküls leistet.

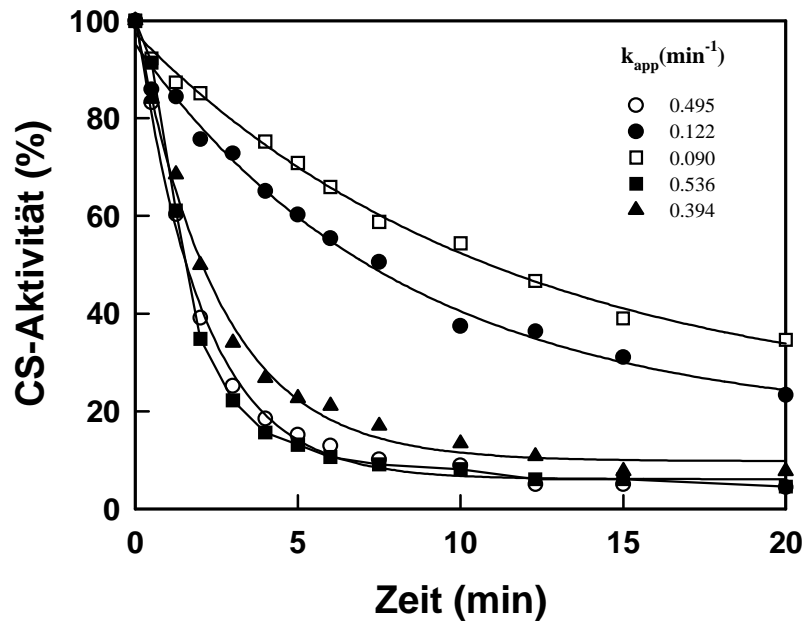


Abbildung 3.27b:

Interaktion von hp23 und Δp23 mit nicht-nativer CS (Inaktivierung)

150 nM CS (Monomer) wurden bei 43°C inkubiert. Die Inaktivierungskinetik des Enzyms wurde in Abwesenheit sonstiger Komponenten (○) oder in Anwesenheit eines 2-fachen molaren Überschusses an hp23 (●) bzw. in Anwesenheit äquimolarer Mengen an hp23 (□) verfolgt. Zusätzlich wurden Ansätze mit äquimolaren Mengen (■) oder einem einem 5-fach molaren Überschuss (▲) an Δp23 vermessen. Die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierungsreaktion sind angegeben.

3.2.3.5. Diskussion der Struktur-Funktions-Beziehung von humanem p23

In der vorliegenden Arbeit konnte eine C-terminale Region des hp23-Moleküls identifiziert werden, die offenbar überwiegend unstrukturiert ist und leicht proteolytisch vom Gesamtmolekül abgespalten werden kann. Den ersten Hinweis auf das Vorhandensein einer solch ungefalteten Domäne lieferte der ungewöhnliche Verlauf des Fern-UV-CD-Spektrums von hp23 im Bereich zwischen 210 und 200 nm. Da das CD-Signal von Sba1 ebenfalls in diesem Bereich nicht anstieg (Daten nicht gezeigt), wie es für nativ gefaltete Proteine charakteristisch ist, kann spekuliert werden, dass ein unstrukturierter C-terminer Bereich für die Mitglieder der p23-Familie kennzeichnend ist. Tatsächlich lieferten analoge Proteolyseexperimente mit Sba1 ein vergleichbares Ergebnis zu hp23. In diesem Fall wurde das 216 Aminosäuren lange Molekül an Position 145 geschnitten (Daten nicht gezeigt). Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde gefolgert, dass das p23-Molekül aus zwei strukturellen Bereichen besteht: (i) einer stabil gefalteten und hoch-kooperativen β -Faltblattdomäne und (ii) einem überwiegend unstrukturierten C-terminalen Schwanz.

Funktionelle Charakterisierungen von p23 konzentrierten sich bis jetzt hauptsächlich auf die Bindung von p23 an Hsp90 oder die *in-vitro*-Chaperon-Eigenschaften von isoliertem p23.

Die Ausbildung eines Komplexes zwischen p23 und Hsp90 wurde als streng ATP-abhängig charakterisiert. Diese straffe Regulation der Assoziationsreaktion, die über den Nukleotidbindungszustand des Hsp90-Moleküls kontrolliert wird, ist insbesondere interessant, da gleichzeitig die Affinität der N-terminalen Chaperon-Aktivität für Substrate durch Nukleotide beeinflusst. Für die Interaktion mit p23 ist die N-terminale Region, welche die ATP-Bindestelle enthält, zumindest zum Teil mit verantwortlich (Chen *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1998). Da es jedoch nicht möglich ist, p23 mit der isolierten N-terminalen Domäne von Hsp90 chemisch quervernetzen (Scheibel *et al.*, 1999), scheinen auch andere Bereiche des Hitzeschockproteins an der Interaktion mit p23 beteiligt zu sein.

Während die Wechselwirkung zwischen p23 und Hsp90 üblicherweise durch Immunopräzipitation nachgewiesen wurde (Sullivan *et al.*, 1997), wurde in der vorliegenden Arbeit der gebildete Komplex durch chemische Quervernetzung sichtbar gemacht. So konnte gezeigt werden, dass Δ p23 dieselbe Affinität zu Hsp90 aufweist wie das Wildtypprotein hp23. Daher scheint die Hsp90-Bindestelle innerhalb der strukturierten β -Faltblattdomäne von p23 lokalisiert zu sein.

Ein wichtiger Befund der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass die Fähigkeit von hp23, mit nicht-nativen Proteinen zu interagieren, von der C-terminalen Region des Moleküls abhängig ist. Das C-terminal verkürzte Fragment Δ p23 war nicht in der Lage, CS-Aggregation zu unterdrücken oder die Inaktivierung dieses Substratproteins zu verlangsamen. Das isolierte C-terminale Peptid wies jedoch auch keine Chaperon-Aktivität auf, noch konnte es das inaktive Fragment Δ p23 komplementieren. Ob der C-terminale Schwanz direkt oder indirekt für die beobachtete Chaperon-Aktivität von p23 notwendig ist, ist noch unklar. Da diese Region des p23-Moleküls wenig konserviert ist, scheint eine indirekte Beteiligung wahrscheinlicher. So könnte der sehr hydrophile Schwanz notwendig sein, um die Löslichkeit des p23-Substrat-Komplexes zu gewährleisten. Alternativ dazu könnte durch C-terminale Region ein hydrophober Bereich des p23-Moleküls maskiert werden, wenn dieses frei in Lösung vorliegt.

Als Konsequenz der beschriebenen Experimente war es möglich, die beiden für p23 beschriebenen Funktionalitäten (Bindung an Hsp90 und produktive Interaktion mit nicht-nativen Proteinen) bestimmten Regionen des Moleküls zuzuordnen. Wie diese zweigeteilte Struktur von p23 in Zusammenarbeit mit Hsp90 zur Erhaltung der aktiven Konformation vieler Substratmoleküle beiträgt, muss noch entschlüsselt werden.

Viele der in der vorliegenden Arbeit für p23 beschriebenen Ergebnisse wurden kürzlich durch die Bestimmung der Kristallstruktur des hp23-Moleküls bekräftigt (Weaver *et al.*, 2000) (Abbildung 3.28).

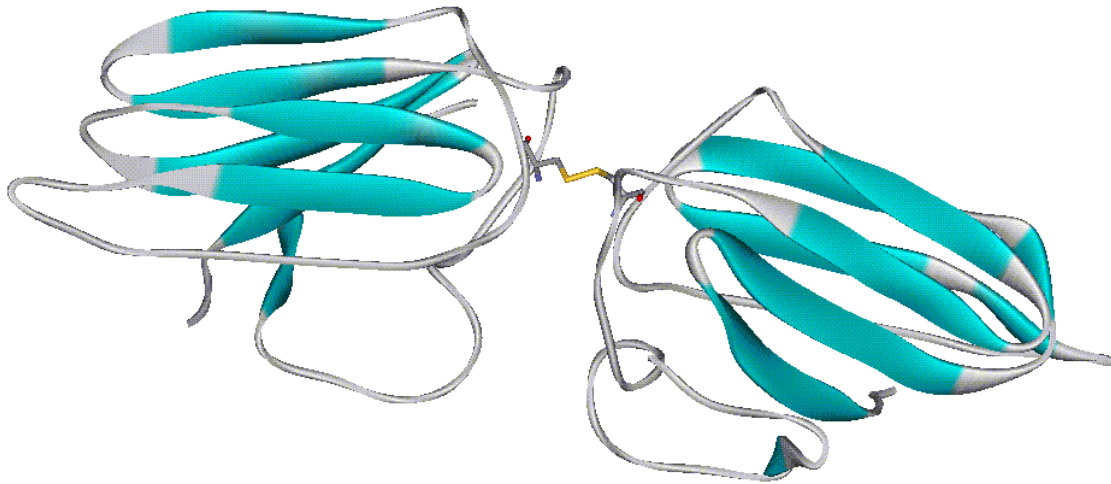


Abbildung 3.28: *Kristallstruktur eines C-terminal verkürzten hp23-Fragments (p23-C35) (nach Weaver et al., 2000)*
Die zwei Domänen sind durch die in gelb gezeigte Disulfidbrücke verbunden.

Die Kristallstruktur zeigt ein C-terminal um 35 Aminosäuren verkürztes Fragment von hp23, da das Wildtypprotein mit der unstrukturierten Region nicht kristallisiert werden konnte. hp23 liegt im Kristall als Homodimer vor, wobei die einzelnen Untereinheiten aus acht antiparallelen β -Strängen bestehen und so eine kompakte β -Sandwich-Struktur ausbilden. Das Dimer wird durch eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Untereinheiten stabilisiert, welche jedoch aufgrund der unphysiologischen Kristallisationsbedingungen entstanden sein könnte. Konservierte Reste, die möglicherweise an der Ausbildung des Kontakts zu Hsp90 beteiligt sind, befinden sich als Cluster auf einer Seite des Homodimers. Das kristallisierte Fragment verhielt sich *in vitro* wie Δ p23 (Weaver *et al.*, 2000). Es war in der Lage, an Hsp90 zu binden, wies jedoch keine Chaperon-Aktivität auf.

Die genaue Funktion von p23 bleibt weiterhin unklar. Einen Hinweis darauf könnte die kürzlich entdeckte Gewebespezifität mancher Mitglieder der p23-Familie (Freeman *et al.*, 2000) geben. Da die einzelnen p23-Homologe unterschiedliche Effekte auf die Transkriptionsaktivierungsaktivität von Steroidrezeptoren ausüben, könnte mittels p23 die zelluläre Antwort auf Hormonsignale unterschiedlich reguliert werden. So können verschiedene, durch Steroidrezeptoren aktivierbare Gene durch die Existenz verschiedener p23-Homologe mit einem einzigen Hormonsignal differentiell aktiviert werden.

4. Zusammenfassung

Hsp90 ist ein molekulares Chaperon, dessen Funktionsweise *in vivo* ATP-abhängig zu sein scheint. Die ATP-Bindestelle wurde in der N-terminalen Domäne des Moleküls lokalisiert. In dieser N-terminalen Region konnte auch ein chaperon-aktives Zentrum identifiziert werden, welches in seiner Affinität für Substrate durch Nukleotide reguliert wird. Dahingegen ist die C-terminal lokalisierte Chaperon-Aktivität ATP-unabhängig.

Um die intrinsische ATPase-Aktivität des Hsp90-Homologen aus *S. cerevisiae* (Hsp82) genauer zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst geeignete Parameter für die ATPase-Aktivitätstests ermittelt. Dabei zeigte sich, dass Hsp82 in ähnlicher Weise wie andere ATP-abhängige Chaperone in seiner ATPase-Aktivität durch monovalente Kationen stimuliert werden kann. Jedoch konnten im Gegensatz zu molekularen Chaperonen der Hsp60- und Hsp70-Familie keine signifikanten Präferenzen für bestimmte Kationen festgestellt werden.

Im Anschluss wurden die Teilreaktionen des von Hsp82 katalysierten ATP-Hydrolyse-Zyklus kinetisch analysiert. Es zeigte sich, dass ATP-Bindung an Hsp82 in zwei Schritten erfolgt. Der zweite Teilschritt scheint eine molekulare Umlagerung innerhalb des Hsp82-Moleküls zu sein, welche dazu führt, dass das gebundene Nukleotid zur Hydrolyse determiniert ist. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Zyklus ist die ATP-Hydrolyse-Reaktion selbst.

In der isolierten ATP-Bindedomäne konnte keine Determinierung des gebundenen Nukleotids festgestellt werden. Außerdem waren die Umsatzraten dieses Fragmentes im Vergleich zum Wildtypprotein deutlich herabgesetzt. Durch Untersuchung einer Reihe C-terminal verkürzter Hsp82-Fragmente stellte sich heraus, dass Regionen des Hsp82-Moleküls, die außerhalb der Nukleotidbindedomäne liegen, für das zur Determinierung führende Einfangen des ATP-Moleküls von Bedeutung sind. Jedoch konnten auch in determinierungskompetenten Fragmenten keine Umsatzraten in der Größenordnung des Wildtypproteins gemessen werden. Es scheinen somit noch weiter C-terminal gelegene Teile des Hsp82-Moleküls für die komplette ATPase-Aktivität verantwortlich zu sein. Die erhaltenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ATP-Bindung konformationelle Umlagerungen in Hsp82 auslöst, welche das gesamte Molekül miteinbeziehen und zu Repositionierung der N- und C-terminalen Domänen zueinander führt.

Ein weiteres Thema der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von p23, einem Co-Chaperon von Hsp90. p23 bindet an Hsp90 im ATP-gebundenen Zustand des Hitzeschockproteins. Für isoliertes p23 konnte *in vitro* eine spezifische, produktive Interaktion mit nicht-nativen Proteinen festgestellt werden. Diese beiden Funktionen wurden hier mit entsprechenden Bereichen des p23-Moleküls korreliert. Dabei wurde eine unstrukturierte Region innerhalb des Moleküls identifiziert, welche im C-terminalen Bereich der Proteinsequenz lokalisiert ist. Dieser ungefaltete Anteil ist nicht notwendig für die Interaktion zwischen p23 und Hsp90, da C-terminal verkürztes p23 (Δ p23) weiterhin in der Lage ist, spezifische Komplexe mit Hsp90 auszubilden. Dahingegen verhindert das Entfernen der C-terminalen Region die effiziente Interaktion des p23-Moleküls mit nicht-nativen Substraten. Die isolierte C-terminale Region selbst ist nicht in der Lage, als Chaperon zu fungieren. Auch die Komplementation der Chaperon-Eigenschaft von Δ p23 durch gleichzeitige Anwesenheit dieser isolierten Domäne war nicht möglich.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die Bindungsstelle für Hsp90 in der gefalteten Domäne des p23-Moleküls vermutet werden kann. Für die produktive Interaktion von p23 mit nicht-nativen Proteinen sind sowohl die strukturierte als auch die unstrukturierte C-terminale Region des Moleküls benötigt.

5. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994) In: *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc., New York & London
- Anfinsen, C. B. (1973) *Science* **181**, 223-230
- Baker, A., Kaplan, C. P. & Pool, M. R. (1996) *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **71**, 637-702
- Baldwin, R. L. & Rose, G. D. (1999a) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 26-33
- Baldwin, R. L. & Rose, G. D. (1999b) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 77-83
- Ban, C., Yang, W. (1998) *Cell* **95**, 541-552
- Ban, C., Junop, M. & Yang, W. (1999) *Cell* **97**, 85-97
- Bardwell, J. C. & Craig, E. A. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 2977-2983
- Bardwell, J. C. A. (1994) *Mol. Microbiol.* **14**, 199-205
- Bardwell, J. C. A. (1997) In: *Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts*, Gething, M. J. (Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, 311-314
- Beck, S. C. & DeMaio A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21803-21811
- Becker, W., Kentrup, H., Klumpp, S., Schultz, J. E. & Joost, H. G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22586-22592
- Beckmann, R. P., Mizzen, L. A. & Welch, W. J. (1990) *Science* **248**, 850-854
- Beissinger, M. & Buchner, J. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 245-259
- Bergman, L. W. & Kuehl, W. M. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 8869-8876
- Bieri, O., Wirz, J., Hellrung, B., Schutkowski, M., Drewello, M. & Kiefhaber, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9597-9601
- Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. & Simon, M. I. (1999) *Cell* **96**, 131-141
- Blachere, N. E., Li, Z., Chandawarkar, R. Y., Suto, R., Jaikaria, N. S., Basu, S., Udono, H. & Srivastava, P. K. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 1315-1322
- Blagosklonny, M. V., Toretsky, J., Bohen, S. & Neckers, L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 8379-8383
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russel-Jones, G. H. & Gotschlich, E. C. (1984) *Anal. Biochem.* **136**, 175-179
- Blond-Elguindi, S., Cwirala, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F. & Gething, M. J. (1993) *Cell* **75**, 717-728

- Bochkareva, E. S., Lissin, N. M., Flynn, G. C., Rothman, J. E. & Girshovich, A. S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6796-6800
- Bochkareva, E. S. & Girshovich, A. S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23869-23871
- Bohen, S. P. & Yamamoto, K. R. (1994) In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Morimoto, R. I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (Hrsg), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 313-334
- Bohen, S. P. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3330-3339
- Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J. & Lindquist, S. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3919-3930
- Bose, S., Weikl, T., Bügl, H. & Buchner, J. (1996) *Science* **274**, 1715-1717
- Braakman, I., Hoover-Litty, H., Wagner, K. R. & Helenius, A. (1991) *J. Cell. Biol.* **114**, 401-411
- Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Braig, K., Simon, M., Furuya, F., Hainfeld, J. F. & Horwich, A. L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3978-3982
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1994) *Nature* **371**, 578-586
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1994) *Nature* **371**, 578-586
- Brockwell, D. J., Smith, D. A. & Radford, S. E. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 16-25
- Brugge, J. S., Erikson, E. & Eriksen, R. L. (1981) *Cell* **25**, 363-372
- Brugge, J. S. (1986) *Curr. Opin. Microbiol. Immunol.* **123**, 1-22
- Brugge, J. S. (1986) In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* **123**, Compans, R. W., Cooper, M., Koprowski et al. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1-22
- Buchberger, A., Valencia, A., McMacken, R., Sander, C. & Bukau, B. (1994) *EMBO J.* **13**, 1687-1695
- Buchberger, A., Theyssen, H., Schroder, H., McCarty, J. S., Virgallita, G., Milkereit, P., Reinstein, J. & Bukau, B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16903-16910
- Buchberger, A., Schröder, H., Hesterkamp, T., Schönfeld, H.-J. & Bukau, B. (1996) *J. Mol. Biol.* **261**, 328-333
- Buchner, J. (1996) *FASEB J.* **10**, 10-19

- Buchner, J., Weikl, T., Bügl, H., Pirkl, F. & Bose, S. (1998a) *Methods Enzymol.* **290**, 418-429
- Buchner, J., Bose, S., Mayr, C. & Jakob, U. (1998b) *Methods Enzymol.* **290**, 409-417
- Buchner, J., Grallert, H. & Jakob, U. (1998c) *Methods Enzymol.* **290**, 323-330
- Buchner, J. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 136-141
- Bukau, B., Hesterkamp, H & Luirink, J. (1996) *Trends Cell Biol.* **6**, 480-486
- Bukau, B. & Horwich, A. L. (1998) *Cell* **92**, 351-366
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. & Craig, E. A. (2000) *Cell* **101**, 119-122
- Carrel, R. W. & Lomas, D. A. (1997) *Lancet* **350**, 134-138
- Castilla, L. H. (1995) Ph. D. thesis, University of Michigan, Ann Arbor
- Chan, C. K., Hu, Y., Takahashi, S., Rousseau, D. L., Eaton, W. A. & Hofrichter, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1779-1784
- Chapman, R., Sidrauski, C. & Walter, P. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 459-485
- Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J. & Rothman, J. E. (1986) *Cell* **45**, 3-13
- Chen, C. F., Chen, Y., Dai, K., Chen, P. L., Riley, D. J. & Lee, W. H. (1996a) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4691-4699
- Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R. A., Honore, B. & Smith, D. F. (1996b) *Mol. Endocrinol.* **10**, 682-693
- Chen, S. Y., Sullivan, W. P., Toft, D. O. & Smith, D. F. (1998) *Cell Stress Chaperones* **3**, 118-129
- Chung, C. T., Niemala, S. H. & Miller, R. H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175
- Clarke, A. R. & Waltho, J P. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 400-410
- Clarke, A. R., Itzhaki, L.S. & Fersht, A. R. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 284-287
- Csermely, P., Kajtar, J., Hollosi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C. R., Gergely, P. J., Soti, C., Mihaly, K. & Somogyi, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1901-1907
- Csermely, P., Miyata, Y., Schnaider, T. & Yahara, I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6381-6388
- Cutforth, T. & Rubin, G. M. (1994) *Cell* **77**, 1027-1036
- Cyr, D. M. & Douglas, M. G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9798-9804
- Cyr, D. M., Langer, T. & Douglas, M. G. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 176-181
- Debburman, S. K., Raymond, G. J., Caughey, B. & Lindquist, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13938-13943

- Dekker, P. J. T. & Pfanner, N. (1997) *J. Mol. Biol.* **270**, 321-327
- Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D. & Chan, H. S. (1995) *Protein Science* **4**, 561-602
- Dill, K. A. & Chan, H. S. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 10-19
- Dittmar, K. D. & Pratt, W. B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13047-13054
- Dittmar, K. D., Demady, D. R., Stancato, L. F., Krishna, P. & Pratt, W. B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21213-21220
- Dolinski, K. & Heitman, J. (1997) In: *Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts*, Gething, M. J. (Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, 359-369
- Dutta, R. & Inouye, M. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 24-28
- Egers, D. K., Welch, W. J. & Hansen, W. J. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1559-1573
- Ehrnsperger, M., Gräber, S. Gaestel, M. & Buchner, J. (1997) *EMBO J.* **16**, 221-229
- Ehrnsperger, M., Gaestel, M. & Buchner, J. (1998) In: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A. L. & Goto, Y. (Hrsg) Marcel Dekker, New York, 533-575
- Ehrnsperger, M., Hergersberg, C., Wienhues, U., Nichtl, A. & Buchner, J. (1998b) *Anal. Biochem.* **259**, 218-225
- Ellis, R. J. (1990) *Semin. Cell Biol.* **1**, 1-9
- Ellis, R. J. (1987) *Nature* **328**, 378-379
- Ellis, R. J. (1996) *The Chaperonins*, Academic Press, San Diego, CA
- Ellis, R. J. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 531-533
- Ellis, R. J. & Hartl, F. U. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 13-15
- El-Thaher, T. S. H., Drake, A. F., Yokota, S., Nakai, A., Nagata, K. & Miller, A. D. (1996) *Protein Peptide Letters* **3**, 1-8
- Evans, H. J. & Sorger, G. J. (1966) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **17**, 47-76
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. H. (1971) *Biochemistry* **10**, 2606-2617
- Fang, Y., Fliss, A. E., Rao, J. & Caplan, A. J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3727-3734
- Feldman, D. E. & Frydman, J. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 26-33
- Felts, S. J., Owen, A. A. A., Nguyen, P. M., Trepel, J., Donner, D. B. & Toft, D. O. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 3305-3312
- Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K. & Horwich, A. L. (1994) *Nature* **371**, 614-619
- Fenton, W. A. & Horwich, A. L. (1997) *Protein Sci.* **6**, 743-760

- Fernandes, M., O'Brien, T. & Lis, J. T. (1994) In: *The Biology of Heat Shock and Molecular Chaperones*, Morimoto, R. I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (Hrsg), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 375-393
- Fersht, A. R. (1985) In: *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman & Company, New York, 98-120
- Fersht, A. R. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 3-9
- Fink, A. L. (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 495-522
- Fink, A. L. (1998) *Folding Design* **3**, R9-R15
- Fink, A. L. (1999) *Physiol. Reviews* **79**, 425-449
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986) *Anal. Biochem.* **155**, 83-88
- Flynn, G. C., Chappell, T. G. & Rothman, J. E. (1989) *Science* **245**, 385-390
- Freedman, R. B. (1989) *Cell* **57**, 1069-1072
- Freeman, B. C., Toft, D. O. & Morimoto, R. I. (1996) *Science* **274**, 1718-1720
- Freeman, B. C. & Morimoto, R. I. (1996) *EMBO J.* **15**, 2969-2979
- Freeman, B. C., Felts, S. J., Toft, D. O. & Yamamoto, K. R. (2000) *Genes Dev.* **14**, 422-434
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K. & Hartl, F. U. (1994) *Nature* **370**, 111-117
- Frydman, J. & Höhfeld, J. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 87-92
- Gao, B., Greene, L. & Eisenberg, E. (1994) *Biochemistry* **33**, Gao, B., Yumiko, E., Greene, L. & Eisenberg, E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 8507-8513
- Gething, M.-J. (1997) In: *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts*
- Glover, J. R., Schirmer, E. C., Singer, M. A. & Lindquist, S. (1998) In: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A. L. & Goto, Y. (Hrsg), Marcel Dekker, New York, 193-224
- Goldbeck, R., Thomas, Y., Chen, E., Esquerra, R. & Kliger, D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2782-2787
- Gottesman, S., Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1997) *Genes Dev.* **11**, 815-823
- Gragerov, A. & Gottesman, M. E. (1994) *J. Mol. Biol.* **241**, 133-135
- Gray, T. E. & Fersht, A. R. (1991) *FEBS Lett.* **292**, 254-258
- Grenert, J. P., Sullivan, W. P., Fadden, P., Haystead, Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H. J., Schulte, T. W., Sausville, E., Neckers, L. M. & Toft, D. O. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23843-23850
- Grenert, J. P., Johnson, B. D. & Toft, D. O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17525-17533

- Gupta, R. S. & Golding, G. B. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 166-171
- Gutsche, I., Essen, L. O. & Baumeister, W. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 295-312
- Ha, J.-H. & McKay, D. B. (1994) *Biochemistry* **33**, 14625-14635
- Hannes, B. D. & Rickwood, D. (1982) In: *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, JRLR, Press LTD, Oxford
- Hansen, W. J., Lingappa, V. R. & Welch, W. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26610-26613
- Hardy, S. J. & Randall, L. L. (1993) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **348**, 107-112
- Hartl, F. U. (1996) *Nature* **381**, 571-579
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. & Buchner, J. (1999) *EMBO J.* **18**, 6744-6751
- Hauke, V. & Schatz, G. (1997) *Trends Cell. Biol.* **7**, 103-106
- Hayer-Hartl, M. K., Ewbank, J. J., Creighton, T. E. & Hartl, F. U. (1994) *EMBO J.* **13**, 3192-3202
- Hayer-Hartl, M., Martin, J. & Hartl, F. U. (1995) *Science* **269**, 836-841
- Hebert, D. N., Simons, J. F., Peterson, J. R. & Helenius, A. (1995) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **60**, 405-415
- Helenius, A. (1994) *Mol. Biol. Cell.* **5**, 253-265
- Herendeen, S. L., VanBongelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1979) *J. Bacteriol.* **139**, 185-194
- Herrman, J. M. & Neupert, W. (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 210-214
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988) *Electrophoresis* **9**, 335-362
- Höhfeld, J. & Jentsch, S. (1997) *EMBO J.* **16**, 6209-6216
- Höhfeld, J., Minami, Y. & Hartl, F. U. (1995) *Cell* **83**, 589-598
- Holt, S. E., Aisner, D. L., Baur, J., Tesmer, V. M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J. B., Morin, G. B., Toft, D. O., Shay, J. W., Wright, W. E. & White, M. A. (1999) *Genes Dev.* **13**, 817-826
- Horwich, A. L. & Willison, K. R. (1993) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **339**, 313-325
- Horwitz, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10449-10453
- Hu, J. & Seeger, C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1060-1064
- Hu, J., Toft, D. O. & Seeger, C. (1997) *EMBO J.* **16**, 59-68
- Hunt, J. F., Weaver, A. J., Landry, S. J., Gierasch, L. & Deisenhofer, J. (1996) *Nature* **379**, 37-45

- Jaenicke, R. (1987) *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1989) In: *Protein Structure: A Practical Approach*, Creighton, T. E. (Hrsg), IRL press, Oxford, 191-223
- Jaenicke, R. & Buchner, J. (1993) *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.* **4**, 1-30
- Jaenicke, R. & Creighton, T. E. (1993) *Curr. Biol.* **3**, 234-235
- Jaenicke, R. (1997) In: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A. L. & Goto, Y. (Hrsg), Marcel Dekker, New York, 35-70
- Jakob, U. & Buchner, J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 205-211
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. & Buchner, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **268**, 1517-1520
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. & Buchner, J. (1995b) *J. Biol. Chem.* **270**, 7288-7294
- Jakob, U., Meyer, I., Bügl, H., André, S., Bardwell, J. C. & Buchner, J. (1995c) *J. Biol. Chem.* **270**, 14412-14419
- Jakob, U., Scheibel, T., Bose, S., Reinstein, J. & Buchner, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10035-10041
- Johnson, J. L. & Toft, D. O. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24989-24993
- Johnson, J. L., Beito, T. G., Krco, C. J. & Toft, D. O. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1956-1963
- Johnson, J. L. & Toft, D. O. (1995) *Mol. Endocrinol.* **9**, 670-678
- Johnson, J. L. & Craig, E. A. (1997) *Cell* **90**, 201-204
- Johnson, A. E. (1997) *Trends Cell. Biol.* **7**, 90-95
- Johnson, B. D., Schumacher, R. J., Ross, E. D. & Toft, D. O. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3679-3686
- Jordan, R. & McMacken, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 4563-4569
- Karzai, A. W. & McMacken, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 11236-11246
- Khyse-Anderson, J. (1984) *Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.-H. & Buchner, J. (1991) *Bio/Technology* **9**, 825-829
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 247-265
- Kim, S., Willison, K. R. & Horwich, A. L. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 543-548
- Kimura, Y., Rutherford, S. L., Miyata, Y., Yahara, I., Freeman, B. C., Yue, L., Morimoto, R. I. & Lindquist, S. (1997) *Genes Dev.* **11**, 1775-1785
- Klostermeier, D., Seidel, R. & Reinstein, J. (1998) *J. Mol. Biol.* **279**, 841-853
- Kornberg, A., Scott, J. F. & Bertsch, L. L. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 3298-3304
- Kreuzer, K. N. & Jongeneel, C. V. (1983) *Methods Enzymol.* **100**, 144-160

- Krone, P. H. & Sass, J. B. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 746-752
- Kubota, H., Hynes, G. & Willison, K. (1995) *Eur. J. Biochem.* **230**, 3-16
- Kuehn, M. J., Ogg, D. J., Kihlberg, J., Slonim, L. N., Flemmer, K., Bergfors, T. & Hultgren, S. J. (1993) *Science* **262**, 1234-1241
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. & Hartl, F. U. (1992) *Nature* **356**, 683-689
- Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W. & Hartl, F. U. (1992b) *EMBO J.* **11**, 4757-4765
- Lässle, M., Blatch, G. L., Kundra, V., Takatori, T. & Zetter, B. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1876-1884
- Laszlo, A. (1992) *Cell Prolif.* **25**, 59-87
- Laufen, T., Zuber, U., Buchberger, A. & Bukau, B. (1998) In: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A. L. & Goto, Y. (Hrsg), Marcel Dekker, New York, 241-274
- Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. R. & Vierling, E. A. (1997) *EMBO J.* **16**, 659-671
- Levinthal, C. (1968) *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45
- Li, Z. & Srivastava, P. K. (1993) *EMBO J.* **12**, 3143-3151
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. & Zylicz, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2874-2878
- Lilie, H. & Buchner, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8100-8104
- Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988) *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677
- Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 495-498
- Little, E., Ramakrishnan, M., Roy, B., Gazit, G. & Lee, A. S. (1994) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **4**, 1-18
- Lorimer, G. H. (1996) *FASEB J.* **10**, 5-9
- Lorimer, G. H. (1997) *Nature* **388**, 720-723
- Louvion, J. F., Warth, R. & Picard, D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13937-13942
- Mande, S. C., Mehra, V., Bloom, B. R. & Hol, W. G. J. (1996) *Science* **271**, 203-207
- Martin, J. & Hartl, F. U. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 41-52
- Maruya, M., Sameshima, M., Nemoto, T. & Yahara, I. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 903-907

- Mayer, M. P. & Bukau, B. (1999) *Curr. Biol.* **9**, R322-R325
- McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J. & Bukau, B. (1995) *J. Mol. Biol.* **249**, 126-137
- Miao, B., Davis, J. E. & Craig, E. A. (1997) *J. Mol. Biol.* **265**, 541-552
- Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913) *Biochem. Z.* **49**, 333
- Minami, Y., Kawasaki, H., Miyata, Y., Suzuki, K. & Yahara, I. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10099-10103
- Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K. & Yahara, I. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1459-1464
- Miyata, Y. & Yahara, I. (1995) *Biochemistry* **34**, 8123-8129
- Montel, V., Gardrat, F., Azanza, J.-L. & Raymond, J. (1999) *Biochem. Mol. Biol. Internat.* **47**, 465-472
- Morimoto, R. I., Jurivich, D. A., Kroeger, P. E., Mathur, S. K., Murphy, S. P., Nakai, A., Sarge, A. K., Abravaya, K. & Sistonen, L. T. (1994) In: *The Biology of Heat Shock and Molecular Chaperones*, Morimoto, R. I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (Hrsg), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 417-455
- Morimoto, R. I. (1998) *Genes & Dev.* **12**, 3788-3796
- Morishima, Y., Kanelakis, K. C., Silverstein, A. M., Dittmar, K. D., Estrada, L. & Pratt, W. B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6894-6900
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987) *Methods Enzymol.* **155**, 335-350
- Nadeau, K., Das, A. & Walsh, C. T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1479-1487
- Nagata, K., Satoh, M., Miller, A. D. & Hosokawa, N. (1998) In: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A. L. & Goto, Y. (Hrsg), Marcel Dekker, New York, 225-240
- Nathan, D. F., Vos, M. H. & Lindquist, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12949-12956
- Neckers, L., Mimnaugh, E. & Schulte, T. W. (1999) In: *Handbook of Experimental Pharmacology* **136**, Latchman, D. S. (Hrsg.) Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 9-42
- Nelson, R. J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. & Craig, E. A. (1992) *Cell* **71**, 97-105
- Nover, L. (1991) *Heat Shock Response*. CRC press, Boca Raton, Florida
- O'Brien, M. C. & McKay, D. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2247-2250

- Obermann, W. M. J., Sondermann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P. & Hartl, F. U. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 901-910
- Opperman, H., Levinson, W. & Bishop, J. M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1067-1071
- Owens-Grillo, J. K., Czar, M. J., Hutchinson, K. A., Hoffmann, K., Perdew, G. H. & Pratt, W. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13468-13475
- Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R. S. & Reinstein, J. (1997) *Biochemistry* **36**, 3417-3422
- Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., Welch, W. J. & Fink, A. L. (1993) *Nature* **365**, 664-666
- Palmer, G., Louvion, J. F., Tibbetts, R. S., Engman, D. M. & Picard, D. (1995) *Mol. Biochem. Parasitol.* **70**, 199-202
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1998) *EMBO J.* **17**, 4829-4836
- Parag, H. A., Raboy, B. & Kulka, R. G. (1987) *EMBO J.* **6**, 55-61
- Parsell, D. A. & Lindquist, S. (1993) *Annu. Rev. Genet.* **27**, 437-496
- Parsell, D. A. & Lindquist, S. (1994) In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Morimoto, R. I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (Hrsg), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 53-84
- Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. & Lindquist, S. (1994) *Nature* **372**, 475-478
- Pearl, L. H. & Prodromou, C. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 46-51
- Peattie, D. A., Harding, M. W., Fleming, M. A., DeCenzo, M. T., Lippke, J. A., Livingston, D. J. & Benasutti, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10974-10987
- Perdew, G. H., Hord, N., Hollenback, C. E. & Welsh, M. J. (1993) *Exp. Cell. Res.* **209**, 350-356
- Phillips, T. A., VanBongelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1984) *J. Bacteriol.* **159**, 283-287
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M. J., Fortin, M. G., Lindquist, S. & Yamamoto, K. R. (1990) *Nature* **348**, 166-168
- Picard, D. (1994) *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 511-515
- Picard, D. (1997) In: *The Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors*. Freedman, L. P. (Hrsg.) Birkhäuser, Boston
- Prapapanich, V., Chen, S., Nair, S. C., Rimerman, R. A. & Smith, D. F. (1996) *Mol. Endocrinol.* **10**, 420-431

- Pratt, W. B. & Toft, D. O. (1997) *Endocr. Rev.* **18**, 306-360
- Pratt, W. B. & Dittmar, K. D. (1998) *Trends Endocrinol. Metabol.* **9**, 244-252
- Privalov, P. L. (1996) *J. Mol. Biol.* **258**, 707-725
- Prodromou, C., Roe, S. M., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1997a) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 477-482
- Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1997b) *Cell* **90**, 65-75
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D. N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1999) *EMBO J.* **18**, 754-762
- Prusiner, S. B. (1997) *Science* **278**, 245-251
- Randall, L. L. & Hardy, S. J. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 65-69
- Ranson, N. A., Dunster, N. J., Burston, S. G. & Clarke, A. R. (1995) *J. Mol. Biol.* **250**, 581-586
- Redeuilh, G., Moncharmont, B., Secco, C. & Baulieu, E.-E. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6969-6975
- Reed, S. I. (1980) *Genetics* **95**, 561-577
- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. (1995) *Nature* **378**, 681-689
- Roder, H. & Colon, W. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 15-28
- Roe, S. M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1999) *J. Med. Chem.* **42**, 260-266
- Rommelaere, H., DeNeve, M., Melki, R., Vandekerckhove, J. & Ampe, C. (1999) , *Biochemistry* **38**, 3246-3257
- Rutherford, S. L. & Lindquist, S. (1998) *Nature* **396**, 336-342
- Saga, S., Nagata, K., Chen, W.-T. & Yamada, K. M. (1987) *J. Cell. Biol.* **105**, 517-527
- Salinovich, O. & Montelaro, R. C. (1986) *J. Biochem.* **98**, 1433-1440
- Sambrook, J. F., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanger, F. (1949) *J. Biol. Chem.* **45**, 563-574
- Schatz, G. & Dobberstein, B. (1996) *Science* **271**, 1519-1526
- Scheibel, T., Neuhofen, S., Weikl, T., Mayr, C., Reinstein, J., Vogel, P. D. & Buchner, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 18608-18613
- Scheibel, T., Weikl, T. & Buchner, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1495-1499

- Scheibel, T., Weikl, T., Rimerman, R., Smith, D. F., Lindquist, S. & Buchner, J. (1999) *Mol. Microbiol.* **34**, 701-713
- Scheibel, T., Siegmund, H. I., Jaenicke, R., Ganz, P., Lilie, H. & Buchner, J. (1999b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1297-1302
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. & Moarefi, I. (2000) *Cell* **101**, 199-210
- Schiene, C. & Fischer, G. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 40-45
- Schlossmann, D. M., Schmid, S. L., Braell, W. A. & Rothman, J. E. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 723-733
- Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. & Christen, P. (1994) *Science* **263**, 971-973
- Schmid, F. X. (1989) In: *Protein Structure: A Practical Approach*, Creighton, T. E. (Hrsg), IRL press, Oxford, New York, Tokyo, 251-285
- Schmid, F. X. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 123-143
- Schmid, F. X. (1997) In: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A. L. & Goto, Y. (Hrsg), Marcel Dekker, New York, 361-390
- Schreiber, S. L. (1991) *Science* **251**, 283-287
- Schulte, T. W., Akinaga, S., Soga, S., Sullivan, W., Stensgard, B., Toft, D. O. & Neckers, L. M. (1998) *Cell Stress Chaperones* **3**, 100-108
- Sharma, S. V., Agatsuma, T. & Nakano, H. (1998) *Oncogene* **16**, 2639-2645
- Shaknovich, R., Shue, G. & Kotz, D. S. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5059-5068
- Shortle, D. (1996) *FASEB J.* **10**, 27-34
- Shtilerman, M., Lorimer, G. H. & Englander, S. W. (1999) *Science* **284**, 822-825
- Sikorski, R. S., Boguski, M. S., Goebel, M. & Hieter, P. (1990) *Cell* **60**, 307-317
- Silow, M. & Olivenberg, M. (1997) *Biochemistry* **36**, 7633-7637
- Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Chen, M. S., Owens-Grillo, J. K., Chinkers, M. & Pratt, W. B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16224-16230
- Smith, D. F., Faber, L. E. & Toft, D. O. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3996-4003
- Smith, D. F. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**, 1418-1429
- Smith, D. F., Sullivan, W. P., Marion, T. N., Zaitsev, K., Madden, B., McCormick, D. J. & Toft, D. O. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 869-876
- Smith, D. F. (1995) *Sci. Medicine* **2**, 38-47

- Smith, D. F., Whitesell, L., Nair, S. C., Chen, S., Prapapanich, V. & Rimerman, R. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6804-6812
- Soga, S., Kozawa, T., Narumi, H., Akinaga, S., Irie, K., Matsumoto, K., Sharma, S. V., Nakano, H., Mizukami, T. & Hara, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 822-828
- Song, H. Y., Dunbar, J. D., Zhang, Y. X., Guo, D. & Donner, D. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 3574-3581
- Sosnick, T. R., Mayne, L., Hiller, R. & Englander, S. W. (1994) *Nature Struct. Biol.* **1**, 149-56
- Sparrer, H., Lilie, H. & Buchner, J. (1996) *J. Mol. Biol.* **258**, 74-87
- Sparrer, H. & Buchner, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14080-14086
- Srivastava, P. K., Udono, H., Blachere, N. E. & Li, Z. (1994) *Immunogenetics* **39**, 93-98
- Stancato, L. F., Chow, Y. H., Owens-Grillo, J. K., Yem, A. W., Deibel, M. J., Jove, R. & Pratt, W. B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22157-22161
- Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U. & Pavletich, N. P. (1997) *Cell* **89**, 239-250
- Suelter, C. H. (1974) *Met. Ions. Biol. Syst.* **3**, 201-251
- Sullivan, W., Stensgard, B., Caucutt, G., Bartha, B., McMahon, N., Alnemri, E. A., Litwack, G. & Toft, D. O. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8007-8012
- Supko, J. G., Hickman, R. L., Grever, M. R. & Malspeis, L. (1995) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **36**, 305-315
- Szabo, A., Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B. & Hartl, F. U. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10345-10349
- Tanford, C. (1968) *Adv. Protein Chem.* **23**, 121-282
- Tanford, C. (1970) *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95
- Tazelt, J., Zuo, J., Voellmy, R., Scott, M., Hartl, U., Prusiner, S. B. & Welch, W. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2944-2948
- Tetu, B., Brisson, J., Landry, J. & Huot, J. (1992) *Breast Cancer Res. Treat.* **36**, 93-97
- Theysen, H., Schuster, H.-P., Packschies, L., Bukau, B. & Reinstein, J. (1996) *J. Mol. Biol.* **263**, 657-670
- Thor, A., Benz, C., Moore, D., Goldman, E., Edgerton, S., Landry, J., Schwartz, L., Mayall, B., Hickey, E. & Weber, L. A. (1991) *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 170-178
- Todd, M. J., Viitanen, P. V. & Lorimer, G. H. (1994) *Science* **265**, 659-666

- Todd, M. J., Lorimer, G. H. & Thirumalai, D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4030-4035
- Tsou, C. L. (1988) *Biochemistry* **27**, 1809-1812
- Udono, H. & Srivastava, P. K. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 1315-1322
- Uehara, Y., Murakami, Y., Suzukake-Tsuchiya, K., Moriya, Y., Sano, H., Shibata, K. & Omura, S. (1988) *J. Antibiot. (Tokyo)* **41**, 831-834
- van den Berg, B., Ellis, R. J. & Dobson, C. M. (1999) *EMBO J.* **18**, 6927-6933
- Viitanen, P. V., Lubben, T. H., Reed, J., Goloubinoff, P., O'Keefe, D. P. & Lorimer, G. H. (1990) *Science* **29**, 5665-5671
- Vollmeyer, R. (1994) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **4**, 357-401
- Wagner, R. L., Apriletti, J. W., McGrath, M. E., West, B. L., Baxter, J. D. & Fletterick, R. J. (1995) *Nature* **378**, 690-697
- Walker, G. M. (1998) In: *Yeast - Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester
- Walsh, C. T., Zydowsky, L. D. & McKeon, F. D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13115-13118
- Wartmann, M. & Davis, R. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6695-6701
- Wearsch, P. A. & Nicchitta, C. V. (1996) *Protein Expr. Purif.* **7**, 114-121
- Wearsch, P. A. & Nicchitta, C. V. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5152-5156
- Weaver, A. J., Sullivan, W. P., Felts, S. J., Owen, B. A. & Toft, D. O. (2000) *J. Biol. Chem.*
- Weickl, T. (1996) Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Welch, W. J. & Feramisco, J. R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 14949-14959
- Welch, W. J., Eggers, D. K., Hansen, W. J., Nagata, H. (1997) In: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A. L. & Goto, Y. (Hrsg), Marcel Dekker, New York, 71-93
- Wetlaufer, D. B. (1962) *Adv. Protein Chem.* **17**, 303-390
- Wetzel, R. (1996) *Cell* **86**, 699-702
- Wetzel, R. (1997) in: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A. L. & Goto, Y. (Hrsg), Marcel Dekker, New York, 71-93
- Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., DeCosta, B., Myers, C. E. & Neckers, L. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8324-8328
- Whitesell, L., Sutphin, P. D., Pulcini, E. J., Martinez, J. D. & Cook, P. H. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1517-1524

- Wickner, S. Maurizi, M. R. & Gottesman, S. (1999) *Science* **286**, 1888-1893
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. & Jakob, U. (1992) *Nature* **358**, 169-170
- Wilbanks, S. M. & McKay, D. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2251-2257
- Wu, C. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 441-469
- Xu, Y. & Lindquist, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7074-7078
- Xu, Z., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1997) *Nature* **388**, 741-750
- Yamamoto, K. R., Godowski, P. J. & Picard, D. (1988) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **53**, 803-811
- Yifrach, O. & Horowitz, A. (1995) *Biochemistry* **34**, 5303-5308
- Young, J. C., Schneider, C. & Hartl, F. U. (1997) *FEBS Lett.* **418**, 139-143
- Yura, T., Nakahigashi, K. & Kanemori, M. (1996) *EXS* **77**, 165-181
- Zahn, R., Perret, S., Stenberg, G. & Fersht, A. R. (1996) *Science* **271**, 642-645
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E. & Hendrickson, W. A. (1996) *Science* **272**, 1606-1614
- Ziegelhoffer, T., Johnson, J. L. & Craig, E. A. (1996) *Current Biol.* **6**, 272-275
- Zimmermann, S. B., Trach, S. O. (1991) *J. Mol. Biol.* **222**, 599-620
- Zou, J. Y., Guo, Y. L., Guettouche, T., Smith, D. F. & Vollmy, R. (1998) *Cell* **94**, 471-480

6. Abkürzungen

Å	Angström
A ₂₈₀	UV-Absorption bei 280 nm
α-Glc	α-Glucosidase
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
amp	Ampicillin
AMP-PNP	Adenylyl-imido-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPγS	Adenosin-5'-γ-thio-triphosphat
BiP	Heavy Chain Binding Protein
BSA	Rinderserumalbumin
CCT	Gruppe-II-Chaperonin
CD	Circulardichroismus
Cpn	Gruppe-I-Chaperonin
cdc37	Cell Division Cycle Protein
Cpr6	Cyclophilin aus <i>S. cerevisiae</i>
CS	Citratsynthase
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTNB	5,5'-Ditio-bis-2-Nitrobenzoesäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ε	molarer Extinktionskoeffizient
FKBP	FK506-bindendes Protein
g	Gramm

GA	Geldanamycin
GR	Glucocorticoidrezeptor
GroE	GroEL und GroES
GroEL	Chaperonin der Hsp60-Familie aus <i>E. coli</i>
GroES	Co-Chaperonin von GroEL aus <i>E. coli</i>
Grp94	Glucose-reguliertes Protein mit der apparenten molekularen Masse von 94.000 Da
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
H ₂ O bidest	Quarzdestilliertes Wasser
Hip	mit Hsp70 interagierendes Protein
Hop	Hsp70/Hsp90-organizing protein
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunophilin
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KP	Kaliumphosphat
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
λ	Wellenlänge
M	molar
MDH	Malatdehydrogenase
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
mM	millimolar
μM	micromolar
MW	Molekulare Masse
nm	Nanometer
OAA	Oxalacetat
OD	optische Dichte

p. A.	per analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDI	Proteindisulfidisomerase
POD	Peroxidase
PPI	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase
PR	Progesteronrezeptor
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHR	Steroidhormonrezeptor
sHsp	kleines Hitzeschockprotein
T	Temperatur
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TPR	Tetratricopeptid-Repeat
TRAP-1	Mitglied der Hsp90-Chaperonklasse mit apparenter molekularer Masse von 75.000 Da
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/Hydrochlorid
Tween	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
v-src	pp60 virale Src-Kinase
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

7. Publikationsliste

1. Bose, S., Weikl, T., Bügl, H. & Buchner, J. (1996) Chaperone Function of Hsp90-Associated Proteins. *Science* **274**, 1715-1717
2. Scheibel, T., Neuhofen, S., Weikl, T., Mayr, C., Reinstein, J., Vogel, P. D. & Buchner, J. (1997) ATP-binding Properties of Human Hsp90. *J. Biol. Chem.* **272**, 18608-18613
3. Scheibel, T., Weikl, T. & Buchner, J. (1998) Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1495-1499
4. Weikl, T., Abelmann, K. & Buchner, J. (1999) An Unstructured C-Terminal Region of the Hsp90 Co-Chaperone p23 is Important for its Chaperone Function. *J. Mol. Biol.* **293**, 685-691
5. Scheibel, T., Weikl, T., Rimerman, R., Smith, D., Lindquist, S. & Buchner, J. (1999) Contribution of N- and C-terminal domains to the function of Hsp90 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **34**, 701-713
6. Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J. & Buchner, J. (2000) C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle, eingereicht

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1996 bis Juli 2000 am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg und am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München angefertigt.

Ich danke Prof. Dr. Johannes Buchner für die herausfordernde Themenstellung sowie sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Darüber hinaus möchte ich ihm für die Gewährung größtmöglicher Freiheit zur Bearbeitung dieses Themas danken.

Prof. Dr. David Toft, Prof. Dr. Susan Lindquist und Dr. Brian Freeman sei gedankt für die Überlassung der Vektoren zur Expression rekombinanter Proteine.

Dr. Dean Edwards und Dr. Kurt Christensen möchte ich für die Anzucht der Sf9-Zellen danken.

Dr. Peter Rücknagel danke ich für die massenspektrometrischen Analysen und Dr. Rainer Deutzmann für N-terminale Sequenzierungen.

Großer Dank gebührt Dr. Jochen Reinstein, Thomas Veit und Petra Herde für die Stopped-Flow-Messungen. Im besonderen möchte ich Jochen für seine stete Bereitschaft, die erhaltenen Daten zu jeder Tag- und Nachtzeit zu diskutieren, danken.

Thomas Scheibel, Franziska Pirkl, Christian Mayr, Klaus Richter und Paul Muschler sei dafür gedankt, dass es Spaß gemacht hat, ein Mitglied des "Hsp90-Teams" zu sein. Außerdem möchte ich Paul und Klaus für das fleißige Klonieren und Reinigen der N-terminalen Fragmente danken.

Unseren schlauen Post-Docs Martina Beissinger und Stefan Walter gebührt großer Dank für die vielen Anregungen und hilfreichen Diskussionen.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für das gute Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre danken. Im besonderen möchte ich erwähnen: Dr. Suchira Bose, die mich in die Welt der Chaperone einführte, Martin Haslbeck für seine unermüdliche Hilfe beim Klonieren und unsere beiden SysAdmins Stefan Bell und Michael Thies für Hilfe beim Kampf mit dem unberechenbaren Element.

Ursula Kies, Markus Fischer und Stefan Bell sei für das kritische Korrekturlesen des vorliegenden Manuskripts gedankt.

Am allermeisten möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, deren Großzügigkeit mir die Jahre meiner Doktorarbeit immer wieder erleichtert hat. Ohne ihre Aufmunterungen, ihren Optimismus und ihren Humor wäre ich an vielen Hindernissen gescheitert.

