

**Untersuchungen zur Rolle der
Komponenten der Hsp70/Hsp40-Chaperonsysteme
im Cytosol und Endoplasmatischen Retikulum
der Pankreaszelle**

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III -
Chemie, Pharmazie und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Andreas Weitzmann

Saarbrücken

2006

Tag des Promotionsolloquiums:

30. November 2006

Dekan:

Prof. Dr. K. Hegetschweiler

Vorsitzender:

Prof. Dr. M. Montenarh

Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Zimmermann

Prof. Dr. M. Schmitt

Akad. Mitarbeiter:

Dr. G.-W. Kohring

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chaperon-vermittelte Proteinfaltung	1
1.1.1	Chaperon Familien und Faltungsnetzwerke	2
1.1.1.1	Hsp70-Chaperone	2
1.1.1.2	Chaperonine	3
1.1.1.3	Hsp90-Chaperone	4
1.1.1.4	Die Lektine	4
1.1.1.5	Sonstige Chaperone	5
1.1.1.6	Faltungsenzyme	6
1.2	Das Hsp70 Chaperon-System	7
1.2.1	Struktur von Hsp70-Chaperonen	7
1.2.2	Der molekulare Mechanismus der Hsp70-Funktion	10
1.2.3	Regulation des Hsp70-Reaktionszyklus durch Cochaperone	11
1.2.3.1	Die Familie der Hsp40-Cochaperone	11
1.2.3.2	Nukleotidaustauschfaktoren	13
1.2.3.3	Zusätzliche Cofaktoren des Säugerhomologs Hsp70/Hsc70	15
1.2.4	Hsp70/Hsp40-Systeme im Cytosol von <i>S. cerevisiae</i>	16
1.2.5	Hsp70/Hsp40-Systeme im Säuger-Cytosol	17
1.2.6	Hsp70/Hsp40-Systeme im Endoplasmatischen Retikulum	19
1.2.6.1	Protein-Import in das Endoplasmatische Retikulum	21
1.2.6.2	Hsp70/Hsp40-vermittelte Proteinfaltung im ER	24
1.2.6.3	Die Stressantwort („unfolded protein response“)	26
1.2.6.4	Der Abbau fehlgefalteter Proteine (ERAD)	28
1.2.7	Spezifität der Hsp40/Hsp70-Interaktion	29
1.3	Zielsetzung der Arbeit	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	31
2.2	Chemikalien und Enzyme	32
2.3	Verwendete Plasmide	33
2.4	Verwendete Bakterienstämme	33
2.5	Verwendete Antikörper	34
2.6	Analytische Methoden	34
2.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34

Inhaltsverzeichnis

2.6.2	Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant Blue	36
2.6.3	Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)	37
2.6.4	Immunologische Detektion der transferierten Proteine	38
2.6.5	TCA-Fällung von Proteinen.....	38
2.6.6	Quantifizierung von Proteinen.....	39
2.6.7	Sequenzierung von Proteinen mittels Edman-Abbau	39
2.7	Präparative Methoden.....	40
2.7.1	Präparation von rauen Mikrosomen aus Hundepankreas.....	40
2.7.2	Herstellung eines Detergenzextraktes aus Hundepankreasmikrosomen	43
2.7.3	Präparation von Ribosomen aus Hundepankreas	43
2.7.4	Carbonatextraktion.....	44
2.7.5	Entsalzung und Umpufferung	45
2.7.6	Kultivierung von Bakterien	46
2.7.7	Synthese und Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	46
2.7.7.1	Reinigung von GST-Fusionsproteinen	50
2.7.7.2	Reinigung von His ₆ -Fusionsproteinen	52
2.7.8	Spaltung von GST-MIDA1 mit Thrombin.....	54
2.7.9	Herstellung von Proteinantikörpern.....	54
2.8	Methoden zur Charakterisierung von Proteinen	57
2.8.1	Bindungsversuche (pull-down-assays)	57
2.8.2	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	58
2.8.3	ATPase-Versuch unter "steady state" Bedingungen.....	60
2.8.4	Nukleotidaustausch-Versuch	61
2.8.5	Untersuchung der Ribosomenbindung von Proteinen	62
2.8.6	<i>In vitro</i> -Synthese von Präprolactin	63
2.9	Chromatographische Methoden.....	64
2.9.1	Gelfiltration	64
2.9.2	Chromatographie an ATP-Agarose.....	66
2.9.3	Chromatographie an ConA-Sepharose.....	68
2.9.4	Chromatographie an Hydroxylapatit	69
2.9.5	Chromatographie an DE52-Cellulose	71
2.9.6	Ionenaustauschchromatographie mittels Source Q-Filter	72
2.10	Molekularbiologische Methoden	73
2.10.1	Agarose-Gelelektrophorese	73
2.10.2	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	74
2.10.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	74

2.10.4	Plasmid-DNA Midipräparation.....	75
2.10.5	<i>In vitro</i> -Transkription mit SP6 RNA-Polymerase.....	76
2.10.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	77
3	Ergebnisse	78
3.1	Das cytosolische Hsp40-Homolog MIDA1	78
3.1.1	Verteilung von MIDA1 in unterschiedlichen Geweben der Maus.....	78
3.1.2	MIDA1 interagiert mit Hsc70	79
3.1.3	MIDA1 stimuliert die ATP-Hydrolyserate von Hsc70.....	82
3.1.4	MIDA1 interagiert mit Ribosomen	83
3.1.5	ERj1C- Δ C beeinflusst die Ribosomenbindung von MIDA1	86
3.1.6	MIDA1 hemmt die Translation von Präprolactin	88
3.2	ERj4p, ein Hsp40-Homolog im ER.....	90
3.2.1	Nachweis von ERj4p in der Membran von rauen Mikrosomen	91
3.2.2	Test auf Funktionalität von GST-ERj4p	92
3.2.2.1	GST-ERj4p interagiert ATP-abhängig mit BiP	92
3.2.2.2	GST-ERj4p stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP.....	94
3.2.3	Bestimmung der Affinität der BiP/ERj4p-Bindung.....	96
3.3	Der Nukleotidaustauschfaktor BAP	97
3.3.1	BAP stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP.....	98
3.3.2	BAP beschleunigt den Nukleotidaustausch bei BiP	99
3.4	Grp170, ein Hsp70-verwandtes Protein im ER.....	101
3.4.1	Aufreinigung von Grp170	101
3.4.2	Untersuchung des Bindungsverhaltens von BiP und Grp170 mittels Gelfiltration	102
3.4.3	Grp170 ist in der Lage ATP zu binden.....	104
3.4.4	Funktionelle Charakterisierung von Grp170 im ATPase-Versuch.....	105
3.4.5	Grp170 agiert als Nukleotidaustauschfaktor für BiP	107
3.4.6	Die ATPase von Grp170 ist stimulierbar	110
3.4.7	Grp170 zeigt keine Bindung an die J-Domäne von ERj1J.....	111
3.5	Charakterisierung der Hsp70/Hsp40-Interaktion.....	113
3.5.1	Bindungsstudien verschiedener BiP-Mutanten	113
3.5.2	Die ATPase von BiP(R197H) ist durch ein Peptidsubstrat stimulierbar	115
3.5.3	Isolierte Hsp70-ATPase-Domänen sind nicht durch J-Domänen stimulierbar ..	117
3.5.4	Bestimmung der Bindungsaffinität von GST-ERj5J und BiP.....	118
3.6	Spezifität der Hsp70/Hsp40-Interaktion	120
3.6.1	Hsp40-Homologe aus dem ER interagieren mit Hsc70	120

3.6.2	Hsp40-Homologe des ER stimulieren die ATPase von Hsc70	123
3.6.3	BiP interagiert mit dem cytosolischen MIDA1	124
3.6.4	Bestimmung der Affinität der BiP/MIDA1-Bindung.....	126
3.6.5	Kar2p, das Hefe-Ortholog von BiP, interagiert mit den Säuger-Hsp40s ERj1p und ERj2p	128
3.6.6	ERj1J und ERj2J stimulieren die ATPase-Aktivität von Kar2p.....	130
3.6.7	Kompetition von Kar2p und BiP um die Bindung an ERj1p und ERj2p.....	132
4	Diskussion.....	134
4.1	Charakterisierung von MIDA1	134
4.1.1	Interaktion von MIDA1 mit Hsc70	135
4.1.2	Assoziation von MIDA1 an Ribosomen.....	136
4.1.3	Nachweis von MIDA1 in verschiedenen Geweben der Maus	140
4.2	Charakterisierung von Grp170.....	141
4.2.1	Isolation von Grp170 aus Hundepankreas-Mikrosomen	141
4.2.2	Grp170 stimuliert den Nukleotidaustausch von BiP	142
4.2.3	Stimulation der Grp170-ATPase	144
4.2.4	Modell für eine mögliche Wirkungsweise von Grp170 bei der Proteinfaltung und Translokation	146
4.3	Der Nukleotidaustauschfaktor BAP.....	148
4.4	Die Hsp40-Homologen ERj4p und ERj5p.....	148
4.5	Zusammenfassung der Interaktionsdaten des Hsp70-Chaperon-Systems des Säuger-ER's.....	149
4.6	Charakterisierung der BiP/J-Interaktion	150
4.7	Spezifität der Hsp70/Hsp40-Interaktion	153
5	Zusammenfassung/Summary	157
6	Literaturverzeichnis.....	159

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
AA	Acrylamid
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
accel	acceleration (Beschleunigung des Rotors)
ADP	Adenosindiphosphat
AMPS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BAP	BiP associated protein
BiP	Immunoglobulin-schwere Kette-bindendes Protein
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
ConA	Concanavalin A
C-Terminus	Carboxy-Terminus
decel	deceleration (Geschwindigkeitsabnahme des Rotors)
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	3,6-Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum-assoziiierter Proteinabbau
<i>et al.</i>	et alii = und andere
Fc	Flusszelle
g	Gramm
Grp	Glucose-reguliertes Protein
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hsc	konstitutiv exprimiertes Hitzeschockprotein
Hsp	Hitzeschockprotein
Ig	Immunoglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kar2	„Karyogamie-Mutante“ 2
kb	Kilobasen
K _D	Dissoziationskonstante

Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
M	molar
mA	Milliampère
µg	Mikrogramm
min	Minute
µl	Mikroliter
MIDA1	mouse Id associated 1
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µM	mikromolar
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Mtj1p	murine tumor cell DnaJ-like protein 1
MVP	Mikrosomenverdünnungspuffer
MW	molekulare Masse
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA-Agarose	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PDI	Proteindisulfidisomerase
P _i	nicht-organisches Phosphat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
ppL	Präprolactin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RM	raue Mikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RU	response unit
S	Svedberg
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	„Sekretionsmutante“
SPR	surface plasmon resonance
SRP	Signalerkennungspartikel
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	unfolded protein response
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche

Abkürzungsverzeichnis

Ein- beziehungsweise Dreibuchstaben Code für Aminosäuren:

A	(Ala)	Alanin	M	(Met)	Methionin
C	(Cys)	Cystein	N	(Asn)	Asparagin
D	(Asp)	Aspartat	P	(Pro)	Prolin
E	(Glu)	Glutamat	Q	(Gln)	Glutamin
F	(Phe)	Phenylalanin	R	(Arg)	Arginin
G	(Gly)	Glycin	S	(Ser)	Serin
H	(His)	Histidin	T	(Thr)	Threonin
I	(Ile)	Isoleucin	V	(Val)	Valin
K	(Lys)	Lysin	W	(Trp)	Tryptophan
L	(Leu)	Leucin	Y	(Tyr)	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Chaperon-vermittelte Proteinfaltung

Proteine werden als lineare Aminosäureketten synthetisiert, die theoretisch eine immense Anzahl unterschiedlicher Konformationen einnehmen können. Damit Proteine aber ihre Aufgabe in der Zelle wahrnehmen können, müssen sie eine exakt definierte dreidimensionale Struktur besitzen, was durch eine Faltung und Assemblierung der Aminosäureketten erreicht wird. Die Experimente von Anfinsen (1973) demonstrierten, dass die notwendige Information, um die native, gefaltete Struktur zu erreichen, in der Aminosäuresequenz des zu faltenden Proteins selber liegt. In den *in vitro* Experimenten von Anfinsen fand die Rückfaltung von Ribonuclease A spontan, ohne die Hilfe von zusätzlichen Faktoren statt.

Proteinfaltung *in vitro* unterscheidet sich jedoch grundlegend von einer Proteinfaltung in der lebenden Zelle. Die hohe Komplexität des letzteren Prozesses wird durch die sehr hohe Konzentration an Makromolekülen in der Zelle (etwa 300 g/l) verursacht, die eine überfüllte Umgebung für die Proteinfaltung bereitstellt. Dadurch werden ungefaltete oder teilweise gefaltete Proteine, die exponierte, hydrophobe Segmente besitzen, leichter aggregieren als in *in vitro* Experimenten mit niedrigen Proteinkonzentrationen (Hartl, 1996; Ellis, 1997). Außerdem dauert es bei der Proteinsynthese relativ lange, bis eine komplette Proteindomäne, die sich spontan in ihre native Struktur falten kann, synthetisiert ist. Eine noch ungefaltete aus dem Ribosom herausragende Kette muss daher durch cotranslationale Bindung von Proteinen, den molekularen Chaperonen, vor einer Aggregation oder Misfaltung geschützt werden, bis die Translation der Polypeptidkette beendet ist (Netzer und Hartl, 1998).

Molekulare Chaperone sind nach der heutigen Definition Proteine, die an ansonsten instabilen Konformären anderer Proteine binden und diese stabilisieren, ohne selbst dabei Bestandteil der letztendlich biologisch funktionellen Struktur zu sein (Hartl, 1996; Bukau und Horwich, 1998). Um dies durchzuführen erkennen Chaperone exponierte, hydrophobe Abschnitte in entstehenden oder fehlgefalteten Polypeptiden, die im nativen Zustand verborgen sind (Dobson et al. 1998). Bindung und Freisetzung von Polypeptidsubstraten durch Chaperone wird oft durch eine ATP-vermittelte Konformationsänderung erreicht, wobei auch mehrere Interaktions-Runden zwischen Substrat und Chaperon stattfinden können. Chaperone sind keine Katalysatoren, insofern als sie typischerweise den Ertrag aber nicht die Geschwindigkeit einer Faltungsreaktion

erhöhen. Dies ist ein Unterschied zu Faltungs-Katalysatoren wie Peptidylprolyl-Isomerasen oder Proteindisulfid-Isomerasen, welche die für eine Faltung notwendigen Isomerisierungsreaktionen katalysieren.

Chaperone sind ubiquitär verbreitet. Viele von ihnen wurden zunächst als Stressproteine klassifiziert, obwohl sie auch unter normalen Bedingungen essentielle Funktionen besitzen (Craig, 1985; Lindquist, 1986; Gething et al., 1994; Frydman und Hartl, 1994). Neben ihrer Funktion bei der *de novo* Proteinfaltung sind Chaperone auch in verschiedene andere zelluläre Prozesse, wie Protein-Targeting, Degradation und Signaltransduktion involviert (Ellis, 2000).

Trotz der hochentwickelten Chaperon-Mechanismen der Zelle gibt es spezielle Fälle, in denen mutierte Proteine mit abweichender Stabilität oder Faltung, fehlgefaltet in der Zelle verbleiben. So wurde in den letzten Jahren erkannt, dass die Ursache für einige Krankheiten (z.B. Creutzfeld-Jakob, Alzheimer- oder Huntington-Krankheit) in einer konformationalen Veränderung oder einer Aggregation von Proteinen liegt (Dobson, 1999; Cohen, 2000; Wanker, 2000).

1.1.1 Chaperon Familien und Faltungsnetzwerke

1.1.1.1 Hsp70-Chaperone

Eine Aggregation von entstehenden Polypeptidketten wird durch die Bindung von Chaperonen und anderen Faktoren an exponierte, hydrophobe Segmente verhindert. In Bakterien gibt es zwei Ribosomen-gebundene Faktoren, die neu-synthetisierte Polypeptidketten erkennen, nämlich die Peptidylprolylisomerase Trigger-Faktor und das 70 kDa Hitzeschockprotein Homolog (Hsp70) DnaK (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). In Hefe binden Ssb Proteine, spezialisierte Hsp70 Vertreter, an naszierende Ketten am Ribosom (Pfund et al., 1998). Mit wachsender Länge der Polypeptidkette binden in Bakterien wie höheren Eukaryonten Chaperone der Hsp70 und Hsp40 Familie an exponierte hydrophobe Oberflächen (Frydman et al., 1994).

Die Hsp70 Familie stellt die am stärksten konservierte Proteinfamilie unter den Hitzeschock Proteinen dar, mit wenigstens 45% Sequenzübereinstimmung zwischen den am weitesten verwandten Vertretern (Bukau und Horwich, 1998). Sie umfasst konstitutiv exprimierte und induzierbare Mitglieder in verschiedenen Zellkompartimenten (z.B. Hsc70 und Hsp70 im Cytosol von Säugerzellen, Ssa1-4 im Hefe-Cytosol, BiP/Grp78 im Endoplasmatischen Retikulum oder mtHsp70 in der Mitochondrien-Matrix). Hsp70

Proteine kommen sehr häufig vor und machen 1-2% des Gesamtproteins einer Zelle aus (Herendeen et al. 1979). Das biochemisch am besten charakterisierte Hsp70 Protein ist das bakterielle DnaK. Es wird aber angenommen, dass die eukaryontischen Hsp70 Proteine im Prinzip in gleicher Weise funktionieren. Der Mechanismus und die Funktion der Hsp70 Proteine und ihrer Hsp40-Cochaperone wird in späteren Kapiteln detaillierter beschrieben.

1.1.1.2 *Chaperonine*

Langsam faltende Proteine mit einer Tendenz zur Aggregation (10-30% aller bakterieller Proteine) können zusätzlich zu ihrer Assoziation mit naszierende Kette-bindenden Chaperonen auch mit einem anderen Chaperonsystem, den Chaperoninen, interagieren. Diese besitzen eine Tonnenform und stellen eine abgetrennte Umgebung für die Faltung bereit (Horwich et al., 1993; Ewalt et al., 1997). Eukaryontische Vertreter sind das cytosolische TriC/CCT und das mitochondriale Hsp60. Das am besten charakterisierte Chaperonin ist jedoch das bakterielle GroEL. Dieses Protein besteht aus 14 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 60 kDa, die sich zu zwei Ringen zusammensetzen und eine zylindrische Struktur mit zwei zentralen Höhlungen formen (Langer et al., 1992; Braig et al., 1994). Im Gegensatz zu Hsp70 Proteinen, die lineare Sequenzen binden, erkennen die Chaperonine kollabierte Faltungs-Intermediate (molten globules) (Hayer-Hartl et al., 1994). Das Cochaperon GroES (Hsp10 in Mitochondrien) verschließt die Höhlung von GroEL, wodurch das Substrat-Molekül vom Chaperonkomplex komplett eingekapselt wird. Die Höhlung bietet eine hydrophile Umgebung, in der sich das Protein in seine native Struktur falten kann (Martin et al., 1993; Mayhew et al., 1996). Dabei wird die Bindung und Freisetzung des Substrates durch die ATPase-Aktivität von GroEL reguliert. Das eukaryontische Chaperonin arbeitet unabhängig von einem GroES Cofaktor, wobei der Grundmechanismus aber wahrscheinlich mit dem GroEL/ES-System vergleichbar ist (Klumpp et al., 1997).

Nur die Hsp70- und die Chaperonin-Systeme sind in der Lage die Faltung von Proteinen zu unterstützen und nicht nur eine Aggregation zu verhindern, wobei sie in manchen Fällen auch zusammenarbeiten. Alle anderen Chaperonfamilien, die in den folgenden Abschnitten erwähnt werden, binden an teilweise ungefaltete Proteine und verhindern ihre Aggregation, aber benötigen die Unterstützung von Hsp70-Chaperonen oder Chaperoninen, um die Faltung zu vermitteln. Andere Chaperone, wie Hsp90, sind dem Hsp70-System nachgeschaltet und erfüllen spezialisierte Funktionen.

1.1.1.3 Hsp90-Chaperone

Die 90 kDa Hitzeschockprotein-Familie (Hsp90) ist ein dem Hsp70-System nachgeschaltetes Chaperonsystem mit einer eingeschränkteren Rolle bei der Proteinfaltung. So scheint das cytosolische Hsp90 bezüglich seiner Klient-Proteine hauptsächlich auf Proteine der Signaltransduktion, wie Steroid Hormon-Rezeptoren oder Kinasen, beschränkt zu sein (Nathan et al., 1997). Hsp90-Chaperone bestehen aus einer N-terminalen ATPase-Domäne, einer zentralen Substratbindungsdomäne und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne (Stebbins et al., 1997). Über die ATPase-Aktivität wird die Bindung und Freisetzung der Substrate reguliert (Obermann et al., 1998). Um seine Funktion auszuüben, kooperiert Hsp90 mit dem Chaperon Hsp70 in definierten Komplexen, die durch das Adapter-Protein Hop (Sti1 in Hefe) aufgebaut werden. Genau wie bei Hsp70 enthält der äußerste C-Terminus von Hsp90 ein EEVD-Motiv, an das Hop mit seinen TPR-Domänen binden kann (Scheufler et al., 2000). Klientproteine werden innerhalb des Komplexes von Hsp70 zu Hsp90 übertragen, wobei Hsp70 die Rolle einer „Fangvorrichtung“ für die Klientproteine übernimmt (Wegele et al., 2006). Hsp90 ist in diesem Komplex dagegen vielmehr an der Reifung von Signalmolekülen beteiligt, als dass es die normale Funktion eines Chaperons übernimmt (Smith, 2000).

Bezüglich seiner Funktion und Rolle bei der Proteinfaltung, ist Grp94, der Hsp90-Vertreter im Endoplasmatischen Retikulum von Säugerzellen, bisher weniger gut charakterisiert (Nicchitta, 1998). Seine Expression wird, wie die verschiedener anderer Chaperone auch, durch die Anhäufung ungefalteter Proteine im ER hochreguliert (Kotzutsumi *et al.*, 1988; Argon und Simen, 1999). Grp94 interagiert nur mit wenigen Proteinsubstraten, z.B. mit Immunglobulinketten, wobei es bevorzugt mit einem späten Faltungsintermediat der leichten Kette assoziiert (Melnick *et al.*, 1992).

1.1.1.4 Die Lektine

Das Endoplasmatische Retikulum enthält mit Calnexin und Calreticulin ein spezielles Lectin-bindendes Chaperonsystem, das an der Faltung von sekretorischen und membrangebundenen Glykoproteinen beteiligt ist. Bei Calnexin handelt es sich um ein Typ I Membranprotein, das in der Nähe des Translokons lokalisiert ist und mit naszierenden Ketten von N-glykosylierten Proteinen interagieren kann (Degen und Williams, 1991; Hochstenbach et al., 1992; Williams, 1995). Calreticulin liegt dagegen löslich im Lumen des ER vor (Ostwald und McLennan, 1974; Michalak et al., 1999). Trotz

ihrer großen Ähnlichkeit unterscheiden sich die beiden Lektine hinsichtlich ihrer Aktivität und Substratspezifität (Molinari et al., 2004).

Die Lektine benötigen zusätzliche Proteine, um ihre Aufgabe bei der Faltung und der Qualitätskontrolle von Glykoproteinen zu erfüllen. Dazu gehören α -Glukosidase I und II, UDP-Glukose:Glykoprotein-Glykosyltransferase (UGGT) und ERp57. Eine Voraussetzung für die Bindung von Calnexin und Calretikulin an neu-synthetisierte Glykoproteine ist die aufeinanderfolgende Tätigkeit der α -Glukosidasen I und II, die zwei Glukosereste abspalten und ein monoglukosyliertes Glykan erzeugen (Hammond et al., 1994; Hebert et al., 1995). Die Oxidoreduktase ERp57, die an Calnexin oder Calretikulin, nicht aber an das Substratprotein selber, bindet, katalysiert die Ausbildung von Disulfidbrücken (Oliver et al., 1999; Zapun et al., 1998). Nach der Dissoziation des Substratproteins von Calnexin oder Calreticulin, was durch Abspaltung des dritten Glukoserestes ausgelöst wird, kann das Protein durch das Enzym UGGT nochmals glykosyliert werden (Helenius et al., 1997; Fernández et al., 1994). UGGT erkennt allerdings nur Proteine, die ihre korrekte Faltung noch nicht erreicht haben (Sousa et al., 1992). Nach erneuter Glykosylierung kann das Protein wiederholt durch Calnexin und Calreticulin gebunden werden. Hammond et al. (1994) schlugen vor, dass das System aus Calnexin, Calretikulin und UGGT eine Qualitätskontrolle für Glykoproteine darstellt, bei dem Proteine so lange in einem Zyklus aus glykosylierter und unglykosylierter Form gehalten werden, bis der korrekte Faltungszustand erreicht ist.

1.1.1.5 *Sonstige Chaperone*

Eine andere Klasse von Chaperonen sind die Hsp100/Cip Proteine. Ihre besondere Funktion ist die Auflösung von Protein-Oligomeren und –Aggregaten, die anschließend durch das Hsp70/Hsp40-System wieder gefaltet oder durch das Proteasom abgebaut werden können (Glover und Lindquist, 1998; Schirmer et al., 1996).

Kleine Hitzeschockproteine sind eine Klasse von Stress-induzierbaren molekularen Chaperonen, die an ungefaltete Proteine binden und eine Aggregation verhindern (van den IJssel et al., 1999). Die anschließende Faltung erfolgt durch die Hsp70- oder Chaperonin-Systeme. Mitglieder dieser Proteinklasse im eukaryontischen Cytosol sind Hsp12, Hsp42 und α -crystallin. Die bakteriellen kleinen Hitzeschockproteine IbpA und IbpB verhindern ebenfalls die Aggregation und wurden in Assoziation mit „inclusion bodies“ gefunden.

1.1.1.6 Faltungsenzyme

Neben den verschiedenen Chaperonen spielen auch Faltungsenzyme bei der Faltung von Proteinen eine wichtige Rolle. Eine dominierende Klasse stellen die Oxidoreduktasen dar, die Thiol Redox-Reaktionen katalysieren, welche zur Bildung von Disulfidbrücken und zur Isomerisierung führen. Sie zeichnen sich durch den Besitz von Thioredoxin-Domänen aus, die dem cytosolischen Protein Thioredoxin verwandt sind.

Diese Proteinklasse kommt bei Eukaryonten auch im ER vor, obwohl aufgrund des hohen oxidativen Potentials im ER Disulfidbrücken spontan gebildet werden können. Der abundanteste Vertreter im Säuger-ER ist das PDI, welches mit ca. 2 % des Gesamtprotein-Anteils das abundanteste ER-Protein überhaupt darstellt (Tu et al., 2000). Neben diesem Hauptvertreter existieren im ER noch weitere Oxidoreduktasen, die homolog zu PDI sind. Das schon erwähnte Erp57 interagiert mit Glykoproteinen über seine Bindung zu Calnexin und Calreticulin (Oliver et al., 1999). Erp72 ist ein durch Stress induzierbares Calcium-bindendes Protein, das drei aktive Thioredoxin-Domänen besitzt (Mazzarella et al., 1990). Es interagiert *in vitro* mit denaturierten Proteinen in einem Komplex mit PDI, BiP und Grp94 (Nigam et al., 1994; Kuznetsov et al., 1994). Neben diesen gut bekannten, abundanten Oxidoreduktasen, wurden in den letzten Jahren viele neue Oxidoreduktasen identifiziert, deren Funktion und Substrate unbekannt sind (Sargsyan et al., 2002; Knoblach et al., 2003). Auch ein interessanter Vertreter ist das PDIp, das nur in Pankreasacinuszellen gebildet wird (de Silva et al., 1997). Es bindet an missgefaltete Proteine und an Peptide und wurde in transientem Kontakt zu sekretorischen Proteinen, die in das ER tranloziert werden, gefunden (Klappa et al., 1998; Volkmer et al., 1997).

1.2 Das Hsp70 Chaperon-System

Die Aktivität von molekularen Chaperonen verschiedener Familien, wie dem Hsp60-System, Hsp70 oder Hsp90, ist von einer ATP-Bindung und Hydrolyse abhängig. Eine weitere Regulation wird durch Cofaktoren erreicht, die unterschiedliche Schritte im Reaktionszyklus des Chaperons beeinflussen. In diesem Kapitel wird das Hsp70 Chaperon-System mit seinen Cochaperonen im Detail beschrieben.

1.2.1 Struktur von Hsp70-Chaperonen

Hsp70-Chaperone bestehen aus zwei funktionellen Domänen: einer hochkonservierten N-terminalen ATPase-Domäne von 45 kDa und einer weniger konservierten Peptidbindungsdomäne nahe am C-Terminus (Abb. 1-1 A). Der äußerste C-Terminus von eukaryontischen Hsp70-Proteinen ist unstrukturiert, enthält aber das Peptidmotiv EEVD, das ein Bindungsmotiv für Cofaktoren aus der TPR Protein-Familie darstellt (Scheufler et al., 2000). Die Kristallstrukturen von ATPase und Peptidbindungsdomäne wurden ursprünglich getrennt voneinander bestimmt. Vor kurzer Zeit ist es jedoch auch gelungen, die Struktur eines fast vollständigen Hsp70-Proteins, dem Hsc70 aus Rind, aufzuklären (Jiang et al., 2005).

Hsp70-Proteine besitzen eine schwache intrinsische ATPase-Aktivität. Die ATPase-Domäne ist von Bakterien bis Säugern hoch konserviert. Ihre Struktur ist nahezu identisch mit Aktin und Hexokinase I (Flaherty et al., 1991). Sie kann in vier Unterdomänen unterteilt werden, die mit IA (AS 1-39 und 116-188), IB (AS 40-115), IIA (AS 189-228 und 307-385) und IIB (AS 229-306) bezeichnet werden (Abb. 1-1 B). Das Zentrum der Struktur bildet eine Nukleotidbindungsfurche, bei der die für die Bindung und Hydrolyse des Nukleotids verantwortlichen Aminosäurereste hauptsächlich in den Unterdomänen IA und IIB lokalisiert sind. Die Phosphatgruppen des gebundenen Nukleotids werden durch ein Mg^{2+} -Ion koordiniert. Zusätzlich sind zwei K^+ -Ionen für eine optimale ATP-Hydrolyse und Freisetzung des Substrates wichtig, indem Mg^{2+}/ADP und P_i in der ATPase-aktiven Stelle koordiniert werden (Palleros et al., 1993; O'Brien und McKay, 1995; Wilbanks und McKay, 1995).

Die Kristallstruktur der Peptidbindungsdomäne von DnaK, dem Hsp70-Homolog aus *E. coli*, wurde in einem Komplex mit einem Heptapeptid aufgelöst (Abb. 1-1 C) (Zhu et al., 1996). Die berechnete Struktur besteht N-terminal aus einer β -Sandwich Unterdomäne

(AS 393-501), die aus acht antiparallelen β -Faltblattmotiven aufgebaut ist und die Peptidbindungsfurche enthält. Die vier unteren Stränge sind durch kurze Schleifen verbunden, während die vier oberen durch längere Schleifen verbunden sind, die nach oben ragen. Der Kontakt zum Peptidsubstrat wird hauptsächlich durch einige hochkonservierte Aminosäurereste vermittelt (Gln433, Phe426, Val436, Ile438, Ile401 und Thr403). Met404 und Ala429 bilden einen hydrophoben Bogen über dem Bindungskanal, der das Peptidrückgrat umschließt. Der C-Terminus der Peptidbindungsdomäne (AS 509-607) wird aus fünf α -Helices (A-E) gebildet. Eine lange Helix (B), die über eine kurze Helix (A) mit dem β -Sandwich verbunden ist, bildet eine Art Deckel, der die Substratbindungsstelle offen legen oder bedecken kann, ohne dabei mit dem Substrat in Wechselwirkung zu treten. Die nachfolgenden drei Helices (C-E) sind von unbekannter Funktion. Der hydrophobe Bogen bildet zusammen mit dem α -helicalen „Deckel“ eine Verschluss-Vorrichtung für die Substratbindungstasche, wobei aber die eigentliche Bindung auf die zentrale Bindungstasche zurückzuführen ist (Mayer et al., 2000).

Die Gesamtstruktur eines Hsp70 Proteins konnte erstmals mit einer verkürzten, aber funktionalen, Form von Hsc70 (AS 1-554) aufgeklärt werden (siehe Abb. 1-1 D). Dieses Konstrukt enthält die Nukleotidbindungsdomäne und die Substratbindungsdomäne, nicht aber die 10 kDa C-terminale Domäne (Jiang et al., 2005). Die Verbindung der Substratbindungsdomäne mit der Nukleotidbindungsdomäne erfolgt über einen exponierten Linker. Helix A der Substratbindungsdomäne, die in einer Furche zwischen Unterdomäne IA und IIA der Nukleotidbindungsdomäne lokalisiert ist, bildet eine Schnittstelle zwischen beiden Domänen, die offenbar für die Kommunikation zwischen den Domänen wichtig ist. In der gefundenen Struktur ist Helix B der Substratbindungsdomäne teilweise entfaltet und besetzt die Substratbindungstasche, was wahrscheinlich durch eine Destabilisierung von Helix B infolge der C-terminalen Verkürzung verursacht wird.

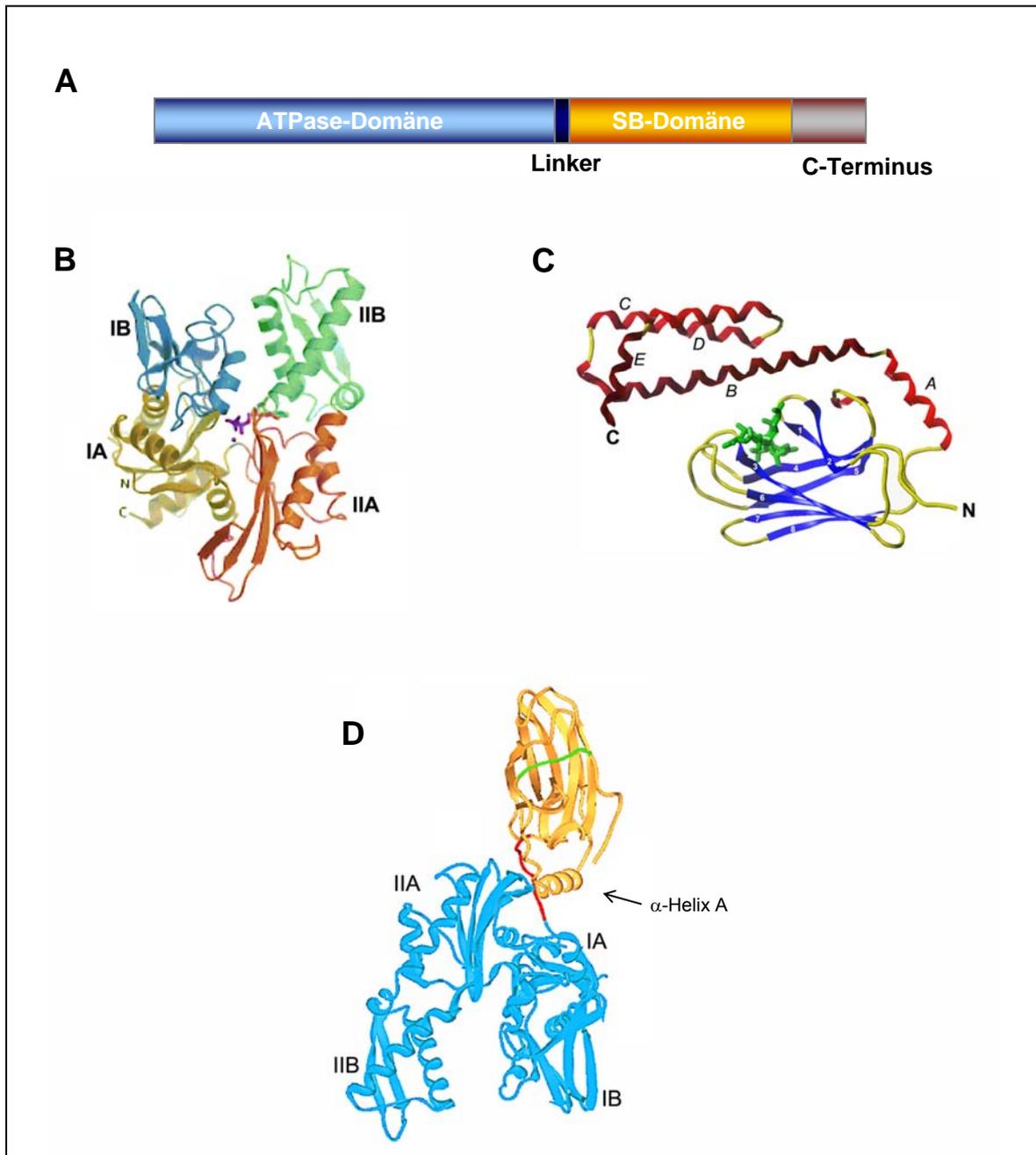


Abb. 1-1: Struktur der Hsp70-Chaperone

(A) Domänenstruktur eines Hsp70-Chaperons. SB-Domäne bedeutet Substratbindungsdomäne. (B) Subdomänenbau der ATPase-Domäne von Rinder-Hsc70 (Flaherty et al., 1990). Die Subdomänen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Gebundenes ADP·Mg ist violett gefärbt. (C) Substratbindungsdomäne von *E. coli* DnaK im Komplex mit einem hepta-Peptid (NRLLLTG) (Zhu et al., 1996). Die β -Stränge sind nummeriert und in Blau dargestellt, das gebundene Peptid in grün. Die fünf α -Helices (A-E) sind rot gefärbt. (D) Gesamtstruktur einer C-terminal verkürzten Form von Rinder-Hsc70 (Jiang et al., 2005). ATPase-Domäne in blau, Substratbindungsdomäne in gelb, Linker in rot und AS 539-544, welche die Substratbindestelle besetzen, in grün.

1.2.2 Der molekulare Mechanismus der Hsp70-Funktion

Chaperone der Hsp70-Familie binden kurze, hydrophobe Abschnitte von ungefalteten Proteinen. Während einer Faltungsreaktion können Substrate mehrmals mit Hsp70 interagieren, bevor sie ihre native Struktur besitzen (Szabo et al., 1994; Buchberger et al., 1996). Eine Modulation dieser Reaktion wird durch ATP-Bindung und Hydrolyse sowie durch verschiedene Cochaperone erreicht, die mit Hsp70 zusammenarbeiten. Das hinsichtlich der Hsp70 Funktion am besten charakterisierte Protein ist DnaK aus *E. coli*. Die funktionelle Beschreibung bezieht sich daher auf DnaK, wobei das allgemeine Prinzip des Chaperon-Mechanismus auch auf eukaryontische Hsp70-Homologe übertragbar ist (Theysen et al., 1996; Ha und McKay, 1994; Ha und McKay, 1995; Takeda und McKay, 1996). Hsp70 wechselt zwischen einem ATP- und einem ADP-gebundenen Zustand. In der ATP-gebundenen Form besitzt es eine schwache Affinität für Substrate mit einer hohen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit, während die ADP-gebundene Form durch eine hohe Substrataffinität und langsamen Austausch charakterisiert ist. Bindung von ATP an DnaK führt zu einem Anstieg der Dissoziationsgeschwindigkeit für Substrate von 2-3 Größenordnungen und gleichzeitig zu einer 50 fachen Steigerung der Substrat-Bindungsgeschwindigkeit (Palleros et al., 1993; Schmid et al., 1994; McCarty et al., 1995).

Zwischen der ATPase-Domäne und der Substratbindungsdomäne existiert ein hoher Grad an intramolekularer Kommunikation. Die Hydrolyse von ATP führt zu Konformationsänderungen innerhalb der C-terminalen Substratbindungsdomäne, welche die geringe Austauschgeschwindigkeit für Substrate verursacht. Strukturell wechselt die Peptidbindungstasche dabei von einer offenen Konformation im ATP-gebundenen Zustand in eine geschlossene Konformation im ADP-Zustand. Die ATP-Hydrolyse wirkt daher als Schrittmacher für die Interaktion zwischen Chaperon und ungefaltetem Polypeptidsubstrat. Wie die Kommunikation zwischen der ATPase- und der Substratbindungs-Domäne genau abläuft, ist noch nicht geklärt. Jiang et al. (2005) konnten mit Hsc70-Mutanten zeigen, dass die Inter-Domänen-Kommunikation über die Schnittstelle, die aus Helix A der Substratbindungsdomäne gebildet wird, stattfindet, wobei aber auch die benachbarte Domänen-Verbindungsschleife involviert ist.

1.2.3 Regulation des Hsp70-Reaktionszyklus durch Cochaperone

Die ATP-Hydrolyse nach einer Peptidbindung ist der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt im Hsp70-Reaktionszyklus (McCarty et al., 1995; Karzai und McMacken, 1996). Die intrinsische ATPase-Aktivität ($0,02-0,2 \text{ min}^{-1}$) ist zu gering, um eine effiziente Chaperon-Funktion und Proteinfaltung zu ermöglichen. Obwohl die Bindung von Peptidsubstraten bereits zu einer 2-10 fachen Stimulation der ATP-Hydrolyserate führt, wird der Reaktionszyklus von Hsp70/DnaK durch das Zusammenspiel mit unterschiedlichen Cofaktoren daher zusätzlich beschleunigt (Flynn et al., 1989; Jordan und McMacken, 1995; McCarty et al., 1995).

1.2.3.1 Die Familie der Hsp40-Cochaperone

Die Haupt-Cochaperone der Hsp70-Proteine gehören zur Hsp40/DnaJ-Familie und stimulieren den ATP-Hydrolyse-Schritt im Hsp70-Reaktionszyklus (Libereck et al., 1991). Diese Cochaperone stellen eine heterogene Gruppe von Multidomänen-Proteinen dar, die aber alle eine konservierte Domäne, die sog. J-Domäne, gemeinsam haben. Sie werden daher auch als J-Proteine bezeichnet. J-Domänen sind etwa 70 Aminosäuren lang und bestehen aus vier α -Helices (Abb. 1-2). Die beiden antiparallelen Helices 2 und 3 bilden dabei einen exponierten Finger, der durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird. Die J-Domäne und insbesondere ihr hochkonserviertes HPD-Motiv in der Schleife zwischen Helix 2 und Helix 3 ist für die Interaktion mit der ATPase-Domäne eines Hsp70-Partners und die Stimulation von dessen ATPase-Aktivität notwendig (Feldheim et al., 1992; Wall et al., 1994). In verschiedenen Studien mit DnaK und DnaJ wurde als Bindungsstelle für das HPD-Motiv der J-Domäne, die Spalte an der Unterseite der DnaK-ATPase identifiziert (Gässler et al., 1998; Green et al., 1998; Suh et al., 1999). Möglicherweise ist dies allerdings nicht die einzige Interaktionsstelle der J-Domäne mit DnaK. In Helix IV der J-Domäne von DnaJ wurde ein QKRAA-Motiv entdeckt, dessen Lysin- und Arginin-Reste in den meisten J-Domänen konserviert sind (Hennessy et al., 2000). Mutationen dieser Reste in der J-Domäne von *E. coli* DnaJ verursachen einen negativen Effekt auf die Interaktion der J-Domäne mit DnaK. Von Suh et al. (1999) wurde vorgeschlagen, dass dieses Motiv eine zusätzliche Bindungsstelle für die Interaktion von DnaJ mit DnaK darstellt, indem es mit der Peptidbindungsdomäne interagiert. DnaJ ist das Haupt-J-Protein im Cytosol von *E.coli*. Zusätzlich zu seinem Effekt auf die ATPase-Aktivität von DnaK besitzt es auch selber eine Chaperon-Funktion, indem es

ungefaltete Peptide bindet und diese an DnaK weitergibt (Langer et al., 1992; Schroder et al., 1993). DnaJ besitzt neben der J-Domäne noch zwei weitere Domänen: eine Glycin/Phenylalanin-reiche Region (G/F-Region) und eine Cystein-reiche Region mit zwei Zinkzentren, bei denen die Zn^{2+} -Ionen durch jeweils vier Cysteinreste koordiniert werden, und die eine Bindung von Substraten ermöglicht (Szabo et al., 1996; Linke et al., 2003). Hsp40 Proteine können nach dem Vorhandensein dieser drei Domänen in drei Klassen eingeteilt werden (Cheetham und Caplan, 1998). In diesem System enthalten Typ I Hsp40 Proteine, wie DnaJ, alle drei Domänen. Typ II Proteine besitzen eine J-Domäne und die G/F-reiche Region, während Typ III Proteine lediglich die J-Domäne mit *E. coli* DnaJ gemeinsam haben (Abb. 1-1).

Durch das Vorhandensein von J-Domänen in verschiedensten Proteinen, die mitunter zusätzliche besondere Strukturmerkmale aufweisen, wird das Hsp40/Hsp70-System zur Ausübung spezialisierter zellulärer Funktionen befähigt. Beispiele hierfür folgen in späteren Kapiteln.

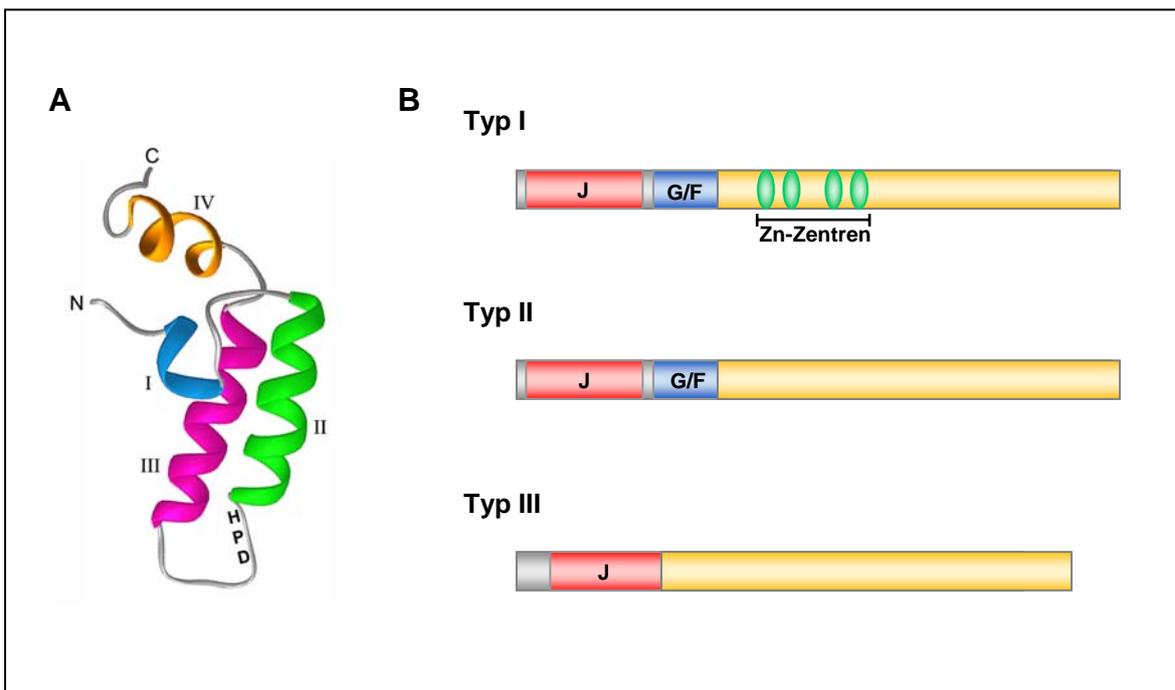


Abb. 1-2: Struktur von Hsp40-Proteinen

(A) Struktur der J-Domäne von *E. coli* DnaJ (Pellecchia et al., 1996) Die vier Helices sind beschriftet und die Lage des konservierten HPD-Motivs ist markiert. **(B)** Einteilung von Hsp40-Proteinen in drei Typ-Klassen mit entsprechender Domänenstruktur (nach Cheetham und Caplan, 1998). J steht für die J-Domäne und G/F bedeutet Gly/Phe-reiche Region.

1.2.3.2 Nukleotidaustauschfaktoren

Bei Anwesenheit eines Hsp40 läuft die ATP-Hydrolyse schnell genug ab, damit der Nukleotidaustausch zum limitierenden Schritt im ATPase-Zyklus wird. Die Freisetzung von ADP und damit des Substrates von DnaK wird in *E. coli* durch den Nukleotidaustauschfaktor GrpE reguliert (Liberek et al., 1991). Die Struktur eines stabilen DnaK/GrpE Komplexes zeigt DnaK in einem nukleotidfreien Zustand, der durch eine Rotation von Unterdomäne IIB der ATPase-Domäne induziert wird, was ein Öffnen der Nukleotidbindungstasche zur Folge hat (Harrison et al., 1997). Die Assoziation von GrpE mit DnaK/ADP reduziert die Affinität von DnaK für ADP etwa um den Faktor 200 und beschleunigt den Nukleotidaustausch ca. 5000-fach (Packschies et al., 1997). Um in der Zelle ein optimales Gleichgewicht zwischen Substratbindung und -freisetzung zu erzielen, ist die Expression der Gene für DnaJ und GrpE coreguliert (Bukau und Horwich, 1998). Abb. 1-3 zeigt ein Modell für den DnaK/DnaJ/GrpE-Reaktionszyklus von *E. coli*.

Auch bei Eukaryonten wurden in Mitochondrien und Chloroplasten, also den Zellkompartimenten prokaryontischen Ursprungs, GrpE-homologe Proteine, die den Nukleotidaustausch beschleunigen, gefunden (Dekker und Pfanner, 1997; Miao et al., 1997). Dagegen sind in Cytosol und ER keine GrpE-Homologen bekannt, wobei es aber auch hier Proteine mit Nukleotidaustauschaktivität gibt. Im Säuger-ER ist das Protein BAP (Sil1p in Hefe) als Nukleotidaustauschfaktor für das Hsp70 BiP beschrieben worden (Chung et al., 2002; Kabani et al., 2000). Im Cytosol gibt es mit HspBP1 und Bag1 zwei Proteine, die als Nukleotidaustauschfaktoren mit Hsp70 bzw. Hsc70 interagieren. Bag1 (Bcl2-associated athanogen) wurde ursprünglich als Bindungspartner von Bcl-2, einem Inhibitor der Apoptose gefunden. Es verstärkt dessen antiapoptotische Funktion und kann auch alleine antiapoptotisch wirken (Takayama et al., 1995). Obwohl Bag1 keine strukturelle Ähnlichkeit mit GrpE aufweist, bewirkt es die gleiche Konformationsänderung in der ATPase-Domäne seines Hsp70-Partners, welche den Nukleotidaustausch verursacht (Sondermann et al., 2001). In *in vitro* Experimenten konnte eine Assoziation von Bag1 über seine N-terminale Ubiquitin-ähnliche Domäne mit dem 26S-Proteasom nachgewiesen werden, was auf eine Verbindung der Proteinfaltungs-Maschinerie mit der Degradations-Maschinerie hindeutet (Lüders et al., 2000). HspBP1 (Hsp70 binding protein 1) bindet ebenfalls an die ATPase-Domäne von Hsp70 und wirkt als Nukleotidaustauschfaktor, der aber nicht mit GrpE oder Bag1 verwandt ist (Kabani et al., 2002b). Es konnte gezeigt werden, dass das Hefe Ortholog, Fes1p, für eine effiziente Proteinfaltung im Cytosol notwendig ist (Shomura et al., 2005). Der Mechanismus der dem Nukleotidaustausch durch HspBP1 zugrunde liegt, unterscheidet sich allerdings von

dem GrpE/Bag1-Mechanismus, so dass in Eukaryonten zwei unterschiedliche Mechanismen für den Nukleotidaustausch vorhanden sind (Shomura et al., 2005).

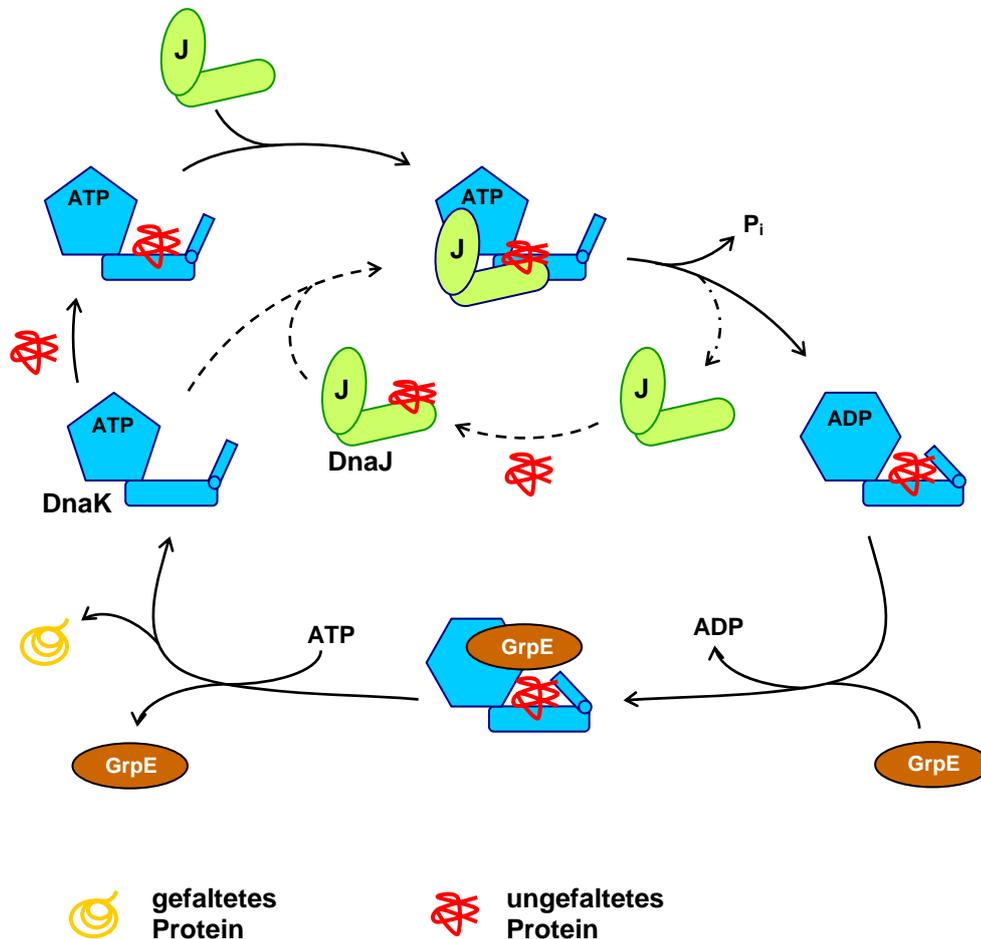


Abb. 1-3: Modell des Chaperon-Zyklus von DnaK/DnaJ/GrpE

Ungefaltete Proteine können entweder von DnaJ gebunden und anschließend auf DnaK übertragen werden (gestrichelte Linien), oder sie werden direkt durch DnaK gebunden. In beiden Fällen muss DnaK in der ATP-Form vorliegen. DnaJ stimuliert die ATP-Hydrolyse, was eine Konformationsänderung in der Peptidbindungsdomäne von DnaK und ein Einschließen des Substrates verursacht. DnaJ verlässt den Komplex und GrpE bindet an die ATPase-Domäne von DnaK, wodurch ADP freigesetzt wird. Dies erlaubt eine Bindung von ATP und die Freisetzung von GrpE, was die Umkehrung der Konformationsänderung und die Freisetzung des Substrates zur Folge hat. Dieses kann sich entweder korrekt falten oder nochmals in den Zyklus eintreten.

1.2.3.3 *Zusätzliche Cofaktoren des Säugerhomologs Hsp70/Hsc70*

Ein 48kDa-Hsp70-interagierendes Protein (Hip/p48) kann an die ATPase-Domäne von Hsp70 in ihrer ADP-Form binden. Es verhindert dort die Freisetzung von ADP und stabilisiert so den Hsp70-Substrat-Komplex (Höhfeld *et al.*, 1995).

Das bereits erwähnte Hsp70- und Hsp90-interagierende Protein Hop bindet im Gegensatz zu Hip an den C-Terminus von Hsp70 (Demand *et al.*, 1998). Hip und Hop interagieren mit Hsp70 über Tetratricopeptid-Domänen (TPR). Hop besitzt neben seiner N-terminalen TPR-Domäne, die für die Interaktion mit Hsp70 verantwortlich ist, noch eine zweite TPR-Region, über die es mit Hsp90 interagieren kann. Die dabei entstehenden Hsp70/Hsp90-Chaperonkomplexe spielen eine bedeutende Rolle bei der Faltung und Reifung von wichtigen regulatorischen Proteinen. Das Hefe-Homolog von Hop, Sti1p, erfüllt die Rolle eines wichtigen Regulators der ATPase-Aktivitäten von Hsp70 und Hsp90. Während Sti1p die ATP-Hydrolyse durch Hsp70 stark stimuliert, wird diejenige von Hsp90 inhibiert (Wegele *et al.*, 2003; Prodromou *et al.*, 1999). Hop scheint dagegen nur die Rolle einer passiven Verbindung zu übernehmen, ohne die ATPase-Aktivitäten zu beeinflussen (Wegele *et al.*, 2006).

Das mit dem C-Terminus von Hsp70 interagierende Protein CHIP ist ein negativer Regulator von Hsp70. Es inhibiert die Stimulation der Hsp70-ATPase durch Hsp40 sowie die Luciferasebindung und Faltung durch Hsp70 (Ballinger *et al.*, 1999). CHIP ist zusammen mit Hsc70 an der Ubiquitinierung und dem anschließenden Abbau des bei der Mukoviszidose mutierten Chloridkanals (cystic fibrosis transmembrane regulator; CFTR) beteiligt (Meacham *et al.*, 2001). CHIP kann auch an Hsp90 binden und fördert den Ubiquitin-abhängigen Abbau von Hsp90-gebundenem Glucocorticoidrezeptor (Connell *et al.*, 2001). Die Ubiquitinierung erfolgt dabei durch CHIP selbst, das zu einer neuen Kategorie von E3-Ubiquitin-Ligasen gehört, die zusammen mit molekularen Chaperonen an der Qualitätskontrolle von cytosolischen Proteinen beteiligt sind (Murata *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2001).

1.2.4 Hsp70/Hsp40-Systeme im Cytosol von *S. cerevisiae*

Im Cytosol von *S. cerevisiae* sind bisher neun verschiedene Hsp70-Homologe und elf Hsp40-Homologe beschrieben (Walsh et al., 2004) (siehe Tab. 1-1). Die Hsp70-Proteine sind nach dem Grad ihrer Verwandtschaft in vier Familien unterteilt: Die Ssa-, Ssb-, Sse- und Ssz1/Pdr13-Familie (Craig und Jacobsen, 1985; Hallstrom und Moyer-Rowley, 2000; Mukai et al., 1993).

Tab. 1-1: Hsp70-Chaperone und ihre Co-Chaperone im Cytosol von *E. coli*, *S. cerevisiae* und Säuger

Organismus	Hsp70	Hsp40-Cochaperone	andere Cofaktoren
<i>E. coli</i>	DnaK Hsc66 HscC	DnaJ, CbpA, Dj1A Hsc20 Dj1B, Dj1C	GrpE
<i>S. cerevisiae</i>	Ssa1-4p Ssb1/2p Sse1/2p Ssz1 (Pdr13p)	Ydj1p Apj1p Sis1p Zuotin Jjj1-3	Xdj1p Hlj1p Djp1p Swa2p Sti1p Sil1p
Säuger	Hsp70 Hsc70 Hsp70L1	Hsp40 (Hdj1) HSDJ (Hdj2) Auxilin CSP MIDA1	p58IPK Mrj HspBP1 Bag1 Hip Hop CHIP

Die vier Proteine der Ssa-Familie (Ssa1-4) sind untereinander zu 80% sequenzidentisch. Es handelt sich um essentielle Proteine, wobei aber nur eines der Proteine vorhanden sein muss, um die Lebensfähigkeit der Zelle zu gewährleisten (Werner-Washburne et al., 1987). Die Ssa-Proteine interagieren funktionell mit dem Hsp40 Ydj1p (Cyr et al., 1992) und sind am Transport von Proteinen in Mitochondrien und das ER beteiligt (Deshaies et al., 1988; Becker et al., 1996; McClellan und Brodsky, 2000). Ein Teil des cytosolischen Ydj1p ist über einen Farnesylrest in der ER-Membran verankert (Caplan et al., 1992), wodurch es beim Targeting eines transportkompetenten Vorläuferproteins behilflich sein könnte (Lyman und Schekman, 1996). Der genaue Targetingvorgang ist jedoch bislang ungeklärt. Neben der Translokation sind Ssa1-4p und Ydj1p auch an der Faltung von

Proteinen im Cytosol beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass Ssa-Homologe in der Faltung von Ornithin-Transcarbamylase involviert sind (Kim et al. 1998).

Die Ssb-Unterfamilie besteht aus Ssb1 und Ssb2, die eine 99%ige Sequenzidentität besitzen und zu 50% ribosomenassoziiert vorliegen. Beide Proteine sind nicht essentiell, wobei aber eine Deletion beider Gene unter anderem zu einer Sensitivität gegenüber Translationsinhibitoren, wie Aminoglykosiden, führt. Das legt den Schluss nahe, dass Ssb1/2 an der Translation beteiligt ist (Nelson et al., 1992; Pfund et al., 1998). Die beiden Hsp40s Zuotin und Sis1p liegen ebenfalls ribosomenassoziiert vor, wobei Sis1p im Gegensatz zu Zuotin an die 40S ribosomale Untereinheit bindet (Yan et al., 1998; Zhong und Arndt, 1993). Zuotin weist an seinem C-Terminus eine geladene Region auf, die für die Bindung an die 60S Untereinheit des Ribosoms verantwortlich ist. Es bildet zusammen mit dem Hsp70-Homolog Ssz1p/Pdr13p einen stabilen Komplex, der als RAC (ribosom associated complex) bezeichnet wird und der die Translokation von naszierenden Polypeptidketten in Mitochondrien stimuliert (Gautschi et al., 2001). Zuotin interagiert im Komplex mit Ssz1p zusätzlich auch noch mit Ssb1/2p, wodurch eine Chaperontriade gebildet wird, die mit naszierenden Polypeptidketten interagiert, welche das Ribosom verlassen (Gautschi et al., 2002).

Die Sse-Unterfamilie besteht ebenfalls aus zwei Mitgliedern, Sse1 und Sse2, die zu 76% sequenzidentisch sind. Diese Proteine, die beide löslich im Cytosol vorkommen, sind bisher weniger gut charakterisiert als die anderen Gruppen cytosolischer Hsp70-Proteine. Weitere Beispiele für Hsp40-Homologe im Hefe-Cytosol sind Djp1, das spezifisch am Import von Proteinen in die Peroxisomen beteiligt ist (Hetteema et al., 1998) oder Swa2p, das am „uncoating“ von Clathrinvesikeln beteiligt ist (Pishvae et al., 2000).

1.2.5 Hsp70/Hsp40-Systeme im Säuger-Cytosol

Im Cytosol von Säugerzellen sind bisher lediglich drei Hsp70- und sieben Hsp40-Homologe bekannt. Bei den Hsp70-Proteinen handelt es sich um das nur unter Stress-Bedingungen exprimierte Hsp70, um das konstitutiv vorhandene Hsc70 (70 kDa heat shock cognate protein) und um Hsp70L1. Die Hsp40-Proteine sind: Hsp40 (Hdj1), HSDJ (Hdj2), Auxilin, Mrj (mammalian relative of DnaJ), CSP (cystein string protein), p58IPK und MIDA1 (mouse Id associated 1).

Eine der Aufgaben von Hsp70/Hsc70 im Cytosol ist es Proteine, die für den Transport in ein anderes Zellkompartiment bestimmt sind, und die mittels posttranslationaler Translokation transportiert werden, in einem transportkompetenten (locker gefalteten)

Zustand zu halten (Zimmermann und Meyer, 1986; Wiech et al., 1987). Für diese Funktion ist noch eine weitere cytosolische Komponente notwendig (Zimmermann et al., 1988), wobei es sich wahrscheinlich um ein Protein der Hsp40-Familie handelt, welches die ATPase-Aktivität des Hsp70 reguliert (Brodsky und Schekman, 1994).

Verschiedene Hsp70-Cochaperone sind innerhalb des Cytosols an unterschiedlichen Membransystemen oder Cytoskelett-Elementen lokalisiert, wo sie Hsp70 rekrutieren, um an diesem Ort spezifische Aufgaben wahrzunehmen. Das J-Domänen Protein Auxilin ist am Hsc70-vermittelten „uncoating“ von Clathrin-umhüllten Vesikeln beteiligt, die sich von der Plasmamembran abknospen (Ungewickell et al., 1995). Hierzu besitzt Auxilin neben einer C-terminalen J-Domäne noch eine zentrale Clathrin-bindende Domäne. Auxilin bindet zunächst an Clathrin-Käfige, woraufhin die J-Domäne die ATPase-Aktivität von freiem Hsc70 stimuliert. Die ADP-Form von Hsc70 bindet anschließend an Clathrin, vermutlich in einer ähnlichen Weise wie an ungefaltete Polypeptide, was dessen Konformation verändert und den Zerfall des Clathrin-Käfigs herbeiführt (Ungewickell et al., 1995; Holstein et al., 1996). Clathrin wird dann kontinuierlich von Hsc70 freigesetzt und wieder gebunden, wodurch es für eine Reassemblierung auf der Plasmamembran stabilisiert wird (Jiang et al., 2000). Auxilin und Hsc70 scheinen allgemein an jedem Clathrin-abhängigen Vesikel-Verkehr beteiligt zu sein (Newmyer und Schmid, 2001).

Ein weiteres spezialisiertes Hsp40-Homolog ist CSP, für das zunächst eine Funktion in der Calcium-aktivierten Exocytose von synaptischen Vesikeln nachgewiesen wurde (Mastrogiacomo et al., 1994). CSP enthält, neben einer N-terminalen J-Domäne, eine zentrale Cystein-reiche Sequenz, mit der es sich über mehrfache Acylierung an Vesikelmembranen heften kann (Chamberlain und Burgoyne, 2000). CSP interagiert mit einigen neuronalen SNARE Proteinen, die für die Zielsteuerung und Fusion von Vesikeln verantwortlich sind (Rothmann, 1994). Für die Rolle von Hsc70, das durch die J-Domäne von CSP zu den Vesikeln rekrutiert wird, wurde eine Stabilisierung von unstrukturierten, monomeren SNAREs vorgeschlagen (Chamberlain und Burgoyne, 2000). Es gibt einige Befunde, dass CSP neben seiner Funktion bei der Fusion von Vesikeln auch an der Regulation der Calcium-Kanäle, welche eine Freisetzung von Neurotransmittern auslösen, beteiligt ist (Maggia et al., 2000).

Mrj spielt eine Rolle bei der Zusammensetzung des Keratin-Filament Cytosketts der Zelle, indem es mit seiner C-terminalen Domäne spezifisch die Keratin18-Komponente erkennt und mit seiner J-Domäne Hsc70 rekrutiert, das vermutlich die Zusammensetzung der Filamente bewerkstelligt (Izawa et al., 2000).

Ein weiterer interessanter Hsp40-Vertreter im Cytosol ist MIDA1, das als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors Id1 (MIDA1: mouse Id associated 1) entdeckt wurde (Shoji et al., 1995). Die Id Proteinfamilie aus Helix-Loop-Helix Proteinen fungiert als

negativer Regulator der Zelldifferenzierung in verschiedenen Zelltypen höherer Eukaryonten sowie als positiver Regulator des Zellwachstums (Norton et al., 1998; Norton und Atherton 1998). An seinem C-Terminus enthält MIDA1 zwei myb-Domänen (Inoue et al., 1999), die auch in den DNA-bindenden Domänen von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie dem Onkoprotein c-Myb, vorkommen (Gabrielsen et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass MIDA1 mit diesen myb-Domänen eine bestimmte DNA-Sequenz erkennt, die innerhalb der 5'-flankierenden Sequenz verschiedener Wachstums-regulierender Gene vorkommt. Der N-Terminus von MIDA1 weist eine ausgeprägte Homologie zu dem bereits erwähnten Hefe-Hsp40 Zuotin auf (36% identische AS-Sequenz). In dieser Region befindet sich neben der Id-Bindungsdomäne auch die J-Domäne sowie ein Bereich der für die Bindung von Z-DNA verantwortlich ist, eine Eigenschaft, die es mit Zuotin gemeinsam hat. Die DNA-Bindungseigenschaften von MIDA1 werden durch die Assoziation mit Id1 reguliert: die Interaktion mit Id1 stimuliert die sequenzspezifische Bindungsaktivität, während die Affinität für Z-DNA herabgesetzt wird (Inoue et al. 1999). Es wird angenommen, dass MIDA1 als Vermittler der wachstumsfördernden Funktion von Id-Proteinen fungiert (Inoue et al., 2000). Über die Rolle von MIDA1 als J-Protein ist bisher nichts bekannt.

1.2.6 Hsp70/Hsp40-Systeme im Endoplasmatischen Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum ist nach dem Cytosol das Haupt-faltungskompartiment der eukaryontischen Zelle. Sekretorische Proteine, Proteine der Plasmamembran sowie Proteine, die entweder im ER oder im Golgikomplex lokalisiert sind, müssen ins Lumen des ER transportiert werden, wo sie gefaltet und gegebenenfalls modifiziert werden. Zu den molekularen Chaperonen des endoplasmatischen Retikulums gehören Proteine der Familien Hsp40, Hsp70, Hsp90 sowie der Lectine (siehe Tab. 1-2).

Tab. 1-2: Vertreter der einzelnen Chaperonfamilien im ER von Säuger und *S. cerevisiae*

Chaperonfamilie	Säuger	<i>S. cerevisiae</i>
Hsp70/ Hsp70-verwandt	BiP (Grp78) Grp170	Kar2p Lhs1p (Ssi1p, Cer1p)
Hsp40	ERj1p (Mtj1p) ERj2p (Sec63p) ERj3p (HEDJ, Dj9) ERj4p (ERdj4p, MDG1) ERj5p (ERdj5p, JPDI)	Scj1p Scj2p (YFR041C) Sec63p Jem1p
Nukleotidaustauschfaktor	BAP	Sil1p
Hsp90	Grp94	---
Lektine	Calnexin Calretikulin	Cne1p

Der Hauptvertreter der Hsp70-Familie im Säuger-ER wurde zuerst als Glucose-reguliertes Protein von 78kDa (Grp78) und später als Immunglobulin schwere Kette bindendes Protein (BiP) beschrieben (Pouysségur et al., 1977; Haas und Wabl, 1983). Grp170 (170 kDa glucose-regulated protein) ist ein Hsp70-verwandtes Glykoprotein im ER. Es besitzt eine N-terminale ATPase-Domäne mit großer Ähnlichkeit zu Hsp70-Proteinen, sowie eine N-terminale peptidbindende-Domäne, die Ähnlichkeiten zur Hsp110-Familie aufweist (Chen et al., 1996). Grp170 wurde aber keiner dieser beiden Proteinfamilien zugeordnet, sondern stellt den Vertreter einer neuen Hsp70-Unterfamilie dar (Park et al., 2003). Im Hefe-ER gibt es mit Kar2p ein entsprechendes BiP-Homolog (Rose et al., 1989; Normington et al., 1989) und mit Lhs1p/Ssi1p/Cer1p ein Grp170-homologes Protein (Craven et al., 1996; Hamilton und Flynn, 1996; Baxter et al., 1996). Abb. 1-4 zeigt das Netzwerk aus Hsp70-Chaperonen und Cochaperonen im Säuger-ER.

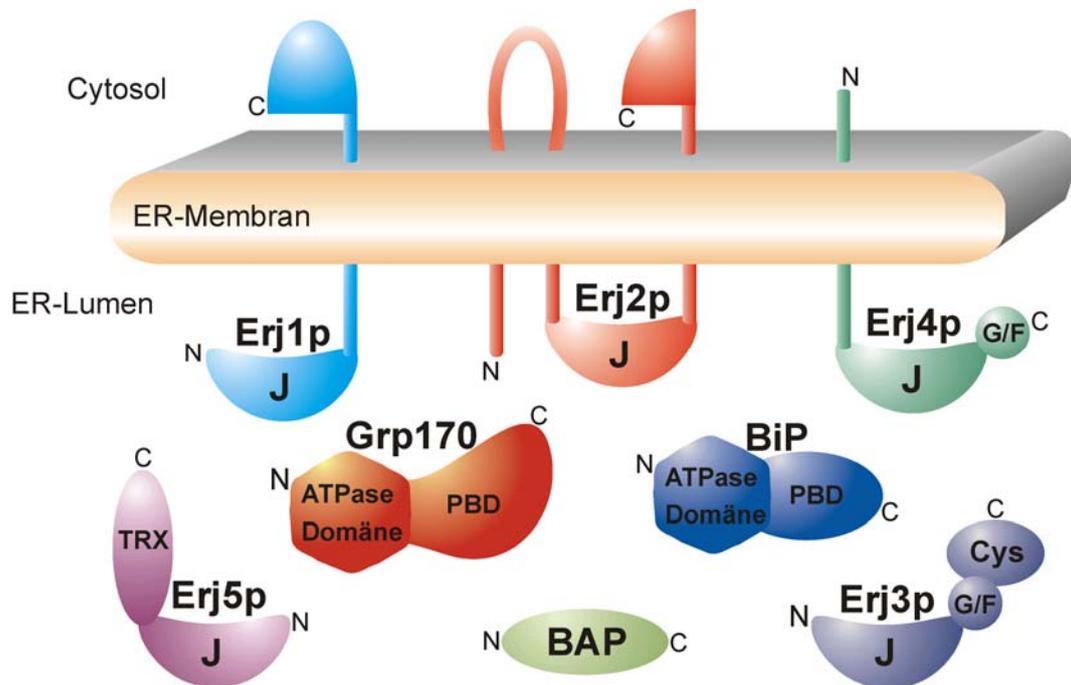


Abb. 1-4: Netzwerk von Hsp70-Chaperonen und Cochaperonen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums von Säugern. PBD: Peptidbindungsdomäne, J: J-Domäne, G/F: Gly/Phe-reiche Region, Cys: Cystein-reiche Region, TRX: Thioredoxin-Domäne, C: Carboxy-Terminus, N: Amino-Terminus.

1.2.6.1 Protein-Import in das Endoplasmatische Retikulum

Sowohl bei Hefe als auch bei Säugern wurde eine Beteiligung von BiP/Kar2p und Grp170/Lhs1p am Proteintransport ins ER nachgewiesen (Dierks et al., 1996; Tyson und Stirling, 2000). Der Transport ins ER kann entweder posttranslational oder cotranslational erfolgen. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein einer meist N-terminalen Signalsequenz, die dafür sorgt, dass die Proteine zur cytosolischen Seite der ER-Membran geleitet werden.

In der Hefe werden die meisten Substrate posttranslational, d.h. nach der Beendigung ihrer Synthese durch das Ribosom, transportiert. In Säugerzellen verläuft der Transport dagegen überwiegend cotranslational. Lediglich für kleine Proteine ist ein posttranslationaler Transport *in vitro* beschrieben worden (Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Müller und Zimmermann, 1987). In beiden Fällen erfolgt der Transport durch eine

Translokationspore, welche durch den trimeren Sec61p-Komplex gebildet wird. Dieser Komplex besteht aus Sec61 α (Sec61p in Hefe), Sec61 β (Sbh1p in Hefe) und Sec61 γ (Sss1p in Hefe) (Deshaies und Schekman, 1987; Stirling et al., 1992; Görlich et al., 1992; Esnault et al., 1993; Görlich und Rapoport, 1993; Hartmann et al., 1994; Panzner et al., 1995). Sec61 α besitzt zehn Transmembrandomänen, die beiden anderen Komponenten jeweils eine (Stirling et al., 1992; Wilkinson et al., 1997). Das Sec61-Translokon bildet einen wässrigen, Ionen-durchlässigen Kanal (Simon und Blobel, 1991; Wirth et al., 2003). Dieser besitzt eine dynamische Struktur, so dass sich sein innerer Durchmesser von 9-15 Å im Ribosomen-freien Zustand (Hamman et al., 1998) bis auf 40-60 Å im aktiven, Ribosomen-gebundenen Zustand weiten kann (Hamman et al., 1997; Wirth et al., 2003).

Posttranslationaler Transport

Beim posttranslationalen Transport werden die Proteine vollständig im Cytosol synthetisiert und anschließend von Hsp70-Chaperonen der Ssa-Familie (Hsc70 in Säugern) in Kooperation mit ihren Hsp40-Cochaperonen in transportkompetenter Form gehalten. Das transportkompetente Protein wird Signalsequenz-abhängig von einem Rezeptorkomplex aus Sec62p, Sec71p und Sec72p in der Membran des Hefe-ER erkannt und gebunden (Müsch et al., 1992; Lyman und Schekman, 1997). Die Freisetzung des Polypeptids von der cytosolischen Bindungsstelle und der anschließende Transport durch den Kanal erfordern die Gegenwart des luminalen Chaperons BiP sowie ATP-Hydrolyse (Lyman und Schekman, 1997; Matlack et al., 1997). Durch eine direkte Bindung von BiP an die translozierende Kette wird die Unidirektionalität des Transportes gewährleistet. Dabei kann BiP *in vitro* durch Antikörper gegen das zu transportierende Protein, bzw. bei einem biotinylierten Vorläufer durch Avidin, ersetzt werden. BiP wirkt somit als „Brownian ratchet“, wobei kein aktives Ziehen am Substrat notwendig ist, auch wenn dies als zusätzlicher Effekt nicht ausgeschlossen werden kann (Matlack et al., 1999; Tydmers, 2002). BiP interagiert zur Ausübung dieser Funktion in der Hefe mit Sec63p, einem Hsp40-Homolog der ER-Membran, dessen luminaire J-Domäne die ATPase-Aktivität von BiP stimuliert (Lyman und Schekman, 1995 und 1997; Corsi und Schekman 1997).

Cotranslationaler Transport

Beim cotranslationalen Transport werden die Proteine während ihrer Synthese ins Lumen des ERs transportiert. Hierbei findet zunächst die Erkennung der N-terminalen Signalsequenz durch das lösliche cytosolische SRP (signal recognition particle) statt, welches eine Zielsteuerung an den membranständigen SRP-Rezeptor vermittelt (Walter und Johnson, 1994). Das SRP ist ein Ribonukleoproteinkomplex aus einem 7S-RNA-

Molekül und sechs verschiedenen Proteinen (SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68, SRP72) (Walter und Blobel, 1982). Die Signalsequenz wird von der SRP54-Untereinheit gebunden, woraufhin die SRP9- und SRP14-Untereinheit einen Translationsarrest herbeiführen (Walter et al., 1981; Walter und Blobel, 1981; Krieg et al., 1986). Dadurch wird verhindert, dass die Translokation der naszierenden Polypeptidkette durch eine zu große Länge der Kette erschwert wird (Walter und Johnson, 1994). Der Ribosom-naszierende Kette-Komplex (RNC) wird über das SRP an den SRP-Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten besteht (α und β), gebunden (Gilmore et al., 1982a und b). Nachdem das SRP abdissoziiert ist, wird der RNC zum Sec61-Komplex transferiert und die wachsende Polypeptidkette wird anschließend direkt ins Lumen des ERs synthetisiert.

Während des gesamten Prozesses der Translokation muss gewährleistet sein, dass die Barrierenfunktion der ER-Membran für Ionen aufrechterhalten bleibt. Dazu muss das Translokon ständig auf wenigstens einer Seite versiegelt bleiben. Auf der cytosolischen Seite wird dies durch das Ribosom erreicht, auf der luminalen Seite durch das Chaperon BiP (Hamman et al., 1998). Während der Translokation öffnet sich der BiP-vermittelte Verschluss nachdem die naszierende Kette eine Länge von ca. 70 Aminosäuren erreicht hat (Crowley et al., 1994; Hamman et al., 1998). Alder et al. (2005) vermuten, dass der Mechanismus mit dem BiP das Schließen und Öffnen der Translokationspore vermittelt, der gleiche ist, mit dem Hsp70-Chaperone an Substrate assoziieren und von diesen wieder dissoziieren. Sie konnten zeigen, dass für den Verschluss der Pore funktionelle Interaktionen zwischen sowohl der Substratbindungsregion als auch der J-Domänen-Bindungsregion von BiP und bisher unbekanntem Membranproteinen notwendig sind. Für den J-Interaktionspartner von BiP gibt es unter den ER-residenten J-Proteinen in Säugerzellen mit ERj1p (Mtj1p) und ERj2p (Sec63p) zwei potentielle Kandidaten, die beide als Transmembranproteine mit dem Sec61-Translokon assoziiert sind. Für beide Proteine wurde auch bereits eine funktionelle Interaktion über ihre luminalen J-Domäne mit BiP nachgewiesen (Corsi und Schekman, 1997; Dudek et al., 2002).

In Hefe wird BiP/Kar2p zusammen mit Sec63p für sowohl den posttranslationalen wie auch für den cotranslationalen Transport benötigt, wobei die genaue Funktion von Sec63p aber nicht bekannt ist (Matlack et al., 1999; Brodsky et al., 1995; Young et al., 2001). Bei Säugern konnte bisher nur die Beteiligung von BiP, nicht aber von Sec63p, am cotranslationalen Transport nachgewiesen werden (Tyedmers et al., 2003). Wie beim posttranslationalen Transport übernimmt BiP auch beim cotranslationalen Transport während der Translokation die Aufgabe, den Transport vektoriell zu machen, d.h. ein Zurückgleiten des Substrates ins Cytosol wird verhindert (Tyedmers et al., 2003).

ERj1p/Mtj1p (Mtj1p: murine tumor cell DnaJ-like protein 1), das in Hefe nicht vorkommt, besitzt neben einer luminalen J-Domäne auch eine cytosolische Domäne, die mit der 28S rRNA der 60S Untereinheit von Ribosomen assoziieren kann und einen Translationsarrest verursacht (Dudek et al., 2002). Innerhalb der cytosolischen Domäne konnte ein positiv geladenes nona-Peptid identifiziert werden, das für diese Effekte verantwortlich ist. ERj1p ist in der Lage gleichzeitig mit einem Ribosom und mit BiP zu interagieren, was dann dazu führt, dass der von ERj1p verursachte Translationsarrest aufgehoben wird (Dudek et al., 2005). Die Interaktion mit BiP hat außerdem den Effekt, dass BiP in unmittelbare Nähe zum translatierten Polypeptid dirigiert wird und dadurch seine Chaperon-Funktion erfüllen kann.

1.2.6.2 *Hsp70/Hsp40-vermittelte Proteinfaltung im ER*

Sobald bei der Translokation ins ER ein Teil der Polypeptidkette das Lumen erreicht, wird er von BiP gebunden, sodass der Beginn der Faltung verzögert wird, bis sich die Polypeptidkette vollständig im ER-Lumen befindet. Dies ist notwendig, um die Ausbildung falscher Kontakte innerhalb einer Polypeptidkette zu verhindern, da oftmals Aminosäuren unterschiedlicher Proteinabschnitte miteinander interagieren müssen, um die korrekte Faltung zu erreichen. BiP bindet an hydrophobe Bereiche innerhalb einer Polypeptidkette, die das heptamere Motiv Hy(W/X)HyXHyXHy aufweisen, wobei es sich bei Hy um einen aromatischen oder hydrophoben, bei X um einen beliebigen Rest handelt (Blond Elguindi et al., 1993). Die Assoziation von BiP mit neusynthetisierten Proteinen ist aber nicht nur von diesem Motiv abhängig, sondern auch von der Geschwindigkeit und Stabilität mit der die Faltung abläuft. BiP bindet bevorzugt an Proteine, die sich langsam falten oder instabile Zwischenzustände aufweisen (Hellman et al., 1999).

Bei der Faltung von Proteinen wird BiP durch verschiedene Cofaktoren unterstützt. Das Typ I J-Domänen Protein ERj3p, das mit Scj1p ein Homolog in Hefe besitzt, ist ein lösliches Glykoprotein im ER-Lumen (Bies et al., 2004). ERj3p ist in der Lage selbstständig an Substratproteine, wie z.B. ungefaltete, leichte Antikörperketten, zu binden und diese bis zum Eintreffen von BiP vor einer Aggregation zu schützen (Shen und Hendershot, 2005). Außerdem wurde eine Interaktion von ERj3p mit SDF2-L1 nachgewiesen (Bies et al., 2004), ein Stress-induzierbares Protein, das signifikante Ähnlichkeiten zum zentralen hydrophilen Teil von Protein-O-Manosyltransferasen besitzt (Fukuda et al., 2001). Aus diesem Grund wird spekuliert, dass ERj3p an der O-Glykosylierung von Proteinen im ER beteiligt ist.

Ein weiteres lösliches Hsp40-Homolog im Säuger-ER ist ERj5p, das neben einer N-terminalen J-Domäne noch vier Thioredoxin-ähnliche Motive besitzt (Hosoda et al., 2003). Thioredoxin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das als Disulfidreduktase und als Wasserstoffdonor für einige Enzyme dient (Holmgren, 1985 und 1989). Thioredoxindomänen findet man auch bei den Proteindisulfidisomerasen, die an der Ausbildung von Disulfidbrücken im ER beteiligt sind. Obwohl bisher für ERj5p keine Oxidoreduktase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wird dennoch vermutet, dass es, eventuell durch ein Zusammenwirken mit BiP, bei der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt ist (Cunnae et al., 2003).

Damit BiP seine Chaperon-Funktion optimal erfüllen kann, muss auch der Nukleotidaustausch reguliert werden. Mit BAP (BiP associated protein) ist ein Protein im ER von Säugern bekannt, das in Abhängigkeit von der Konformation der ATPase-Domäne an BiP bindet und die Freisetzung von ADP aus dessen Nukleotidbindungstasche stimuliert (Chung et al., 2002). Sil1p aus *S. cerevisiae* besitzt eine geringe Ähnlichkeit zu BAP und wurde ebenfalls als Nukleotidaustauschfaktor vorgeschlagen (Kabani et al., 2000). Die Wichtigkeit des Nukleotidaustauschfaktors BAP wurde in einer Studie mit Mäusen deutlich, bei denen das entsprechende Gen zerstört war. Die Mutation führte zur Entwicklung einer Alters-Ataxie mit einem Verlust an Purkinje-Zellen in der Kleinhirnrinde. Dies wird ausgelöst durch eine Akkumulation von Proteinen im ER und im Zellkern, was schließlich zu einer Neurodegeneration führt (Zhao et al., 2005).

Im Hefe-ER wurde eine Nukleotidaustausch-Aktivität bei einem weiteren Protein erkannt. Erstaunlicherweise handelt es sich dabei um das bereits bekannte, Hsp70-verwandte Lhs1p (Steel et al., 2004). Die beiden Chaperone Kar2p und Lhs1p scheinen sich überlappende Funktionen zu besitzen, da Mutationen in jeweils einem der beiden Proteine zu ähnlichen Defekten in beispielsweise der Proteintranslokation ins ER oder der Proteinfaltung im ER führen (Saris et al., 1997; Craven et al., 1996; Dierks et al. 1996). Steel et al. (2004) konnten zeigen, dass Lhs1p und Kar2p spezifisch miteinander interagieren. Lhs1p stimuliert dabei Kar2p, indem es dessen Nukleotidaustausch beschleunigt, wohingegen Kar2p im Gegenzug die ATPase-Aktivität von Lhs1p aktiviert. Aufgrund dieser Kopplung und koordinierten Regulation der ATPase-Aktivitäten der beiden Proteine, wurde ein Wirkmechanismus vorgeschlagen, bei dem es zu einer gleichzeitigen Bindung von beiden Proteinen an unterschiedliche Abschnitte eines Substratproteins kommt (Steel et al., 2004). Zellen, denen Lhs1p fehlt, sind lebensfähig, exprimieren aber konstitutiv Gene der Stressantwort. Auch Sil1p ist kein essentielles Protein, wobei aber eine $\Delta lhs1\Delta sil1$ Doppelmutation lethal ist und mit einer vollständigen Blockade des Proteinimports in das ER korreliert (Tyson und Stirling, 2000). Von Grp170,

dem Säuger-Homolog von Lhs1p, ist bekannt, dass es mit fehlgefalteten Glykoproteinen und nicht-assemblierten Immunglobulinen interagiert. Dabei wurde es in Assoziation mit BiP, dem Hsp90-Chaperon Grp94 und der Oxidoreduktase ERp72 isoliert (Kuznetsov et al., 1997). Außerdem wurde gezeigt, dass es mit hitzedenaturierten Proteinen interagiert und dadurch ihre Aggregation verhindert und ihre Rückfaltung ermöglicht (Park et al., 2003).

1.2.6.3 Die Stressantwort („unfolded protein response“)

Sekretorische Proteine, die nicht in der Lage sind korrekt zu falten, werden im ER zurückgehalten und bilden stabile Komplexe mit BiP und anderen molekularen Chaperonen. In Hefe wie auch in Säugerzellen führt die Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen zu einer Hochregulierung der Transkription vieler Gene, die ER-residente Chaperone und Faltungskatalysatoren kodieren (McMillan et al., 1994; Shamu et al., 1994). Diese zelluläre Reaktion wird als „unfolded protein response“ (UPR) bezeichnet – bei einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine erhöht die Zelle ihre Faltungskapazität. Übermäßiger oder lang anhaltender ER-Stress führt schließlich zur Auslösung der Apoptose der Zelle. Das Signal für die Induktion der UPR ist nicht direkt die Akkumulation fehlgefalteter Proteine, sondern eine Abnahme der Konzentration von freiem BiP im ER, die durch eine Komplexbildung von BiP mit ungefalteten Proteinen zustande kommt (Kohno et al., 1993). Die an den Signalketten der UPR beteiligten ER-Membranproteine ATF6, IRE1 und PERK besitzen Domänen im ER-Lumen, die mit BiP interagieren. Die Bindung von BiP an diese Faktoren führt zu deren Inaktivierung. Bei einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine dissoziiert BiP von den Faktoren und bindet an die fehlgefalteten Proteine, wodurch IRE1 und PERK durch Dimerisierung und ATF6 durch Transport zum Golgi-Apparat aktiviert werden (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2002). Der UPR-Gene aktivierende Transkriptionsfaktor ATF6 wird im Golgi-Apparat von den Proteasen S1P und S2P gespalten (Ye et al., 2000). Die Fragmente werden anschließend in den Zellkern transportiert, wo sie als Transkriptionsfaktoren agieren (Yoshida et al., 2000). Viele UPR-Gene enthalten ein ER-Stress-Element (ERSE) in ihrer Promotorregion. An dieses binden Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ATF6, die über eine Steigerung der Transkription die Synthese von Chaperonen und anderen Faltungsfaktoren erhöhen (Yoshida et al., 1998; Roy und Lee, 1999).

Ein ebenfalls zentrales UPR-Signalprotein der ER-Membran ist IRE1, das bei ER-Stress autophosphoryliert wird und dadurch eine RNase-Aktivität entwickelt. Dies führt zu einem

Spleißen der mRNA von XBP1, wodurch ein weiterer Transkriptionsfaktor der UPR entsteht (Yoshida et al., 2001).

Ein weiterer Effekt bei der UPR ist die Verlangsamung der globalen Proteinsynthese. Hierbei spielt das Membranprotein PERK eine zentrale Rolle (Shi et al., 1998). PERK ist eine Kinase, die bei ER-Stress die α -Untereinheit des Translations-Initiationsfaktors 2 (eIF2 α) phosphoryliert, was zur Folge hat, dass die Ausbildung von Translations-Initiationskomplexen, welche für die Erkennung von AUG-Startkodons notwendig sind, behindert wird (Harding et al., 1999).

ERj4p ist ein Typ II Hsp40-Homolog, das mit einer N-terminalen Signalsequenz in der ER-Membran verankert ist und dessen J-Domäne, die mit BiP funktionell interagieren kann, ins ER-Lumen reicht (Shen et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass ERj4p unter Stress-Bedingungen stark induziert wird, während es unter normalen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Des Weiteren führt seine Überexpression zu einer Hemmung der durch ER-Stress induzierten Apoptose, wobei dieser Effekt offensichtlich auf die J-Domäne zurückzuführen ist (Kurisu et al., 2003). Es wurde daher vorgeschlagen, dass ERj4p die Bindung von BiP an ungefaltete Substrate stabilisiert und dadurch dazu beiträgt, die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER zu verhindern.

Auch für das bereits erwähnte ERj1p wurde von Dudek et al. (2005) eine Rolle bei der Stress-Antwort vorgeschlagen. Aufgrund der Tatsache, dass die cytosolische Domäne von ERj1p durch Interaktion mit Ribosomen die Translation hemmt und dieser Effekt durch die Bindung von BiP an die luminaire J-Domäne aufgehoben wird, ist eine Regulation wie bei ATF6, IRE1 und PERK vorstellbar: bei ER-Stress wird BiP durch die Akkumulation fehlgefalteter Proteine von der J-Domäne von ERj1p wegdirigiert, wodurch die Synthese neuer Proteine an der ER-Oberfläche gebremst wird. Aufgrund der Tatsache, dass ERj1p in einer Computer-gestützten Analyse als potentieller, Membran-verankerter Transkriptionsfaktor identifiziert wurde (Zupicich et al., 2001), und dass die cytosolische Domäne mit dem Kernimport-Faktor Importin- β interagiert und auch im Kern nachgewiesen wurde, ist eine weitere Rolle bei der UPR denkbar. Demnach könnte durch eine regulierte Intramembranproteolyse der cytosolische Teil von ERj1p abgespalten werden und als Transkriptionsfaktor in den Kern gelangen, wo er selektiv die Transkription bestimmter Gene induzieren könnte (Dudek et al., 2005).

1.2.6.4 Der Abbau fehlgefalteter Proteine (ERAD)

Um zu verhindern, dass missgefaltete Proteine ihren Bestimmungsort erreichen, gibt es im ER eine „Qualitätskontrolle“, die diese Proteine erkennt und beseitigt. Wenn ein Protein auch nach einem verlängerten Zeitraum nicht korrekt falten kann, wird es aus dem Faltungsweg entfernt und dem ER-assoziierten Abbau (ERAD, ER-associated protein degradation) zugeführt (McCracken und Brodsky, 1996). Der ERAD-Weg führt missgefaltete Proteine zurück ins Cytosol, wo sie zunächst mit einer Polyubiquitinkette markiert und anschließend vom 26S-Proteasomkomplex abgebaut werden (Hershko und Ciechanover, 1998). Der Rücktransport der ERAD-Substrate aus dem ER ins Cytosol scheint genau wie der Import über Sec61p-Kanäle zu erfolgen. Dies konnte sowohl für Hefe wie auch für Säugerzellen gezeigt werden (Plemper et al., 1998; Bebök et al., 1998). Über die Mechanismen der Erkennung fehlgefalteter Proteine und deren Zurückhalten im ER ist relativ wenig bekannt. Man geht davon aus, dass bei diesen Mechanismen Chaperone des ER wie BiP und Calnexin sowie andere Faltungsfaktoren wie PDI eine zentrale Rolle spielen (Plemper et al., 1997; Gillece et al., 1999; Parodi, 1999). Auch das Hsp40-Homolog ERj3p bindet ERAD-Substrate, was auf eine Rolle des Proteins beim Proteinabbau hindeutet (Shen und Hendershot, 2005). Die fehlgefalteten Proteine werden dabei möglicherweise aufgrund von hydrophoben Sequenzen, die normalerweise nicht exponiert vorliegen, erkannt und dauerhaft gebunden (Fewell et al., 2001). Im Säuger ist eine mögliche Beteiligung von BiP z.B. beim Abbau von leichten Antikörperketten und der β -Untereinheit der Na/K-ATPase beschrieben (Beggah et al., 1996; Chillaron und Haas, 2000). In der Hefe wird Kar2p für den Abbau von Pro- α -Faktor, einer unglykosylierten Form des pp α F oder CPY*, einer Mutante der Carboxypeptidase Y benötigt (Plemper et al., 1997; Brodsky et al., 1999). Obwohl Kar2p beim Import und Export von Proteinen involviert ist, zeigt die Isolierung von Kar2p-Mutanten, die nur Defekte im Export aufweisen, dass beide Vorgänge unterschiedlichen Mechanismen unterliegen (Brodsky et al., 1999).

1.2.7 Spezifität der Hsp40/Hsp70-Interaktion

Es ist bekannt, dass verschiedene Hsp40-Proteine nicht mit jedem beliebigen Hsp70 interagieren oder dies in effizienter Weise tun. So stimuliert beispielsweise MmDjC7, ein Typ III Hsp40-Homolog aus Mauszellen, die ATPase-Aktivität von DnaK, humanem Hsc70 und murinem BiP mit unterschiedlicher Effizienz (Kroczyńska und Blond, 2001). In *E. coli* gibt es definierte Partnerschaften zwischen den Hsp40 und Hsp70 Proteinen. So stimulieren beispielsweise die Hsp40-Proteine Hsc20 und DnaJ nicht die ATPase-Aktivität von HscC (Kluck et al., 2002). DnaJ ist in der Lage, die ATPase-Aktivität des cytosolischen Hsc70 aus Säugern zu stimulieren, nicht aber diejenige von BiP aus dem Säuger-ER (Minami et al., 1996; Chevalier et al., 2000). Um etwas über die Spezifität der Interaktion verschiedener Hsp70/Hsp40-Paare zu erfahren, wurden bereits zahlreiche Domänenaustausch-Experimente durchgeführt, bei denen die J-Domäne eines Hsp40 benutzt wurde, um die J-Domäne eines anderen Hsp40 zu ersetzen. Eines der ersten durchgeführten Experimente zeigte, dass die J-Domäne aus dem mitochondrialen Hefe-Hsp40 Mdj1 (Typ I) die J-Domäne aus DnaJ effektiv ersetzen kann (Deloche et al., 1997). Eine Analyse mit Hefe Hsp40-Proteinen zeigte, dass weder die J-Domäne von Sis1p noch von Mdj1p in der Lage waren die J-Domäne von Sec63p funktionell zu ersetzen, wogegen die J-Domäne von Scj1p dies konnte (Schlenstedt et al., 1995). Sis1p ist ein cytosolisches Typ II Hsp40-Protein und Mdj1p ein mitochondriales Typ I Hsp40-Protein, wohingegen Sec63p und Scj1p in der ER-Membran, mit einer ins Lumen reichenden J-Domäne, lokalisiert sind. Zusätzliche Mutationen (Q13R, K17S, K42V) in der J-Domäne des chimären Sis1J-Sec63 führten zu einem funktionalen Protein, was vermuten lässt, dass diese Aminosäuren wichtige Determinanten sind, welche die Interaktion dieser Proteine mit ihrem Partner-Hsp70 beeinflussen (Schlenstedt et al., 1995). Dies führte zu der Hypothese, dass spezifische J-Domänen die notwendige Information enthalten, um mit spezifischen Hsp70-Proteinen zu interagieren. Man kann andererseits auch nicht ausschließen, dass es Proteine gibt, die ein Hsp70 und sein Hsp40-Partner in einem Komplex zusammenhalten, und so dafür sorgen, dass nur bestimmte Interaktionen stattfinden können. Diese Möglichkeit wurde bei *Thermus thermophilus* bereits beobachtet (Motohashi et al., 1994, 1996).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Hsp70/Hsp40 Chaperonsystems im Endoplasmatischen Retikulum von Hundepankreas-Gewebe, welches vorwiegend aus exokrinen Zellen aufgebaut ist.

Dabei sollte die Funktion des Hsp70-verwandten Grp170 im Chaperon-Netzwerk des ER aufgeklärt werden. Kürzlich wurde von Steel et al. (2004) berichtet, dass das Hefe-Homolog von Grp170, Lhs1p, mit Kar2p interagiert und dessen Nukleotidaustausch beschleunigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich Grp170 im Säuger-ER ebenso verhält. Des weiteren sollten der Nukleotidaustauschfaktor BAP, sowie das Hsp40-Homolog ERj4p, rekombinant in *E. coli* synthetisiert und anschließend als Cochaperone von BiP charakterisiert werden.

Die Interaktion von BiP mit seinen Hsp40-Partnern sollte hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht werden. Außerdem sollte mit Hilfe verschiedener BiP-Mutanten untersucht werden, welche Proteindomänen und welche Eigenschaften für die Hsp70/Hsp40-Interaktion notwendig sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung, des in Säugerzellen vorkommenden, cytosolischen Hsp40-Homologs MIDA1. Der N-Terminus dieses Protein weist eine ausgeprägte Homologie zu dem Hefe-Hsp40 Zuotin auf, das von Gautschi et al. (2001) als Ribosomen-assoziierte Komponente des sog. RAC (ribosom associated complex) beschrieben wurde. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob MIDA1 ebenfalls mit Ribosomen interagieren kann und ob es als Hsp40-Cochaperon mit einem cytosolischen Hsp70 interagiert.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abimed, Düsseldorf: Gilson-Pipetten

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevomatic 60

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: Äkta Explorer 100-Apparatur, Photometer Ultrospec 3000, Spannungsgeräte EPS 3500 und ESP 600, Image Master[®]VDS, PD10-Säulen, Superose6-Gelfiltrationssäule HR16/50, MicroSpin[™] G-50 columns

Beckman, München: GS-6KR Zentrifuge, J2-MC Zentrifuge mit JA-10 und JA-20 Rotor, L-80 Ultrazentrifuge mit Ti 70 und SW55TI Rotor, Optima[™] TLX Ultrazentrifuge mit TLA 100.3 und TLA 100 Rotor

Biacore, Uppsala, Schweden: BiacoreX und Software

BioRad, München: Chromatographiesäulen (20 ml), Trans-Blot[®]Electrophoretic Transfer Cell (Nass-Blot-Apparatur)

Eppendorf, Hamburg: Kühlzentrifuge 5402, Thermostat 5320 (Heizblock), Tischzentrifuge 5415C, Thermomixer

Fröbel, Wasserburg: Geltrockner, Sterilbank, Wipptische, Ultraschallgerät mit VCX-Micro- und Macrotip

Greiner&Söhne, Nürtingen: Petrischalen

Heidolph: Magnetrührer MR 3000

Heraeus, Hanau: Brutschränke

Infors, Bottmingen, CH: Inkubationsschüttler

Julabo, Seelbach: Wasserbäder

Kodak, München: Röntgenfilme X-Omat AR

Merck, Darmstadt: PEI-Cellulose Dünnschichtchromatographie-Platten

Millipore Co., Bedford, USA: Centricon[®]-Centrifugal Filter Devices (2 ml, YM-30 MW), Immobilon-P Transfermembran (Dicke 0,45 µm) (PVDF), Semi-Dry-Blotapparatur

MoBiTec, Göttingen: 500 µl-Säulchen

Molecular Dynamics: Phosphoimager[™]-SF mit Exponierplatten, -Kammer und Belichter, Personal Densitometer

Oncogene, San Diego, USA: Multiple Tissue Blot, Mouse

Pierce, Rockford, USA: Polypropylen-Säulen (5 ml)

Sartorius, Göttingen: Feinwaagen, Membrane Adsorbers Q5F

Schleicher & Schuell, Dassel: Filterpapiere, Sterilfilter (0,2 µm)

Schütt, Göttingen: Autoklav

Scientific Industries, Bohemia N.Y., USA: Vortex-Mixer Genie 2™

Vivascience, Binbrook Lincoln, UK: Vivaspin 4 ML Concentrator (30000 MW)

Waters-Millipore, Milford, USA: Milliporewasseranlage Milli-Q

WTW, Weilheim: pH-Meter pH 537

Elektrophoresekammern (Eigenbau der Werkstatt Biochemie 1, Göttingen)

2.2 Chemikalien und Enzyme

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: ECL-Western Blot Detektionssystem, Glutathion Sepharose® 4B, ConA-Sepharose, [³⁵S]-Methionin (1000 Ci/mmol), [α ³²P]-ATP (4500 Ci/mmol)

BioRad, München: BioRad Protein Assay, „Kaleidoscope prestained SDS-PAGE standards“, Hydroxylapatit

Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, USA: CHAPS, Thrombin

Difco Laboratories, Detroit, USA: Bacto Agar, Bacto Trypton, Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)

Genomed, Bad Oeyenhausen: Midi-Präparation Jetstar

GibcoBRL, Heidelberg: Agarose, 10 kDa Proteinmarker, 1 kb DNA-Leiter

ICN, Eschwege: [γ ³²P]-ATP (4500 Ci/mmol)

Promega Biotec, Madison, USA: RNasin® Ribonuklease-Inhibitor, SP6 RNA-Polymerase

Qiagen, Hilden: Nickel-NTA-Agarose

Riedel de Hahn, Hannover: Aceton, Essigsäure, Trichloressigsäure

Roche, Mannheim: ATP, DTT, Translation Kit (Typ II, Retikulozyten), Restriktionsendonukleasen

Serva, Heidelberg: Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Bisacrylamid, Bromphenol-blau, Coomassie-Brilliant-Blue R250 und G250, Ethanol, Hepes, MOPS, Saccharose, SDS, TEMED, TritonX-100

Sigma-Aldrich, München: β -Mercaptoethanol, Ampicillin, C⁸-ATP-Agarose, BSA, DMSO, EGTA, Glucose, Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), Peroxidase-gekoppelte Anti-IgG-Antikörper, Thrombin

StressGen, Victoria, Canada: Bovine Hsc70, Bovine Hsc70-ATPase, Anti-Hsp70-Proteinfamilie Antikörper 7,10

Whatman, Maidstone, England: DE52-Cellulose

Alle anderen nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.3 Verwendete Plasmide

Tab. 2-1: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung und Herkunft
pGEX-4T-1-MIDA1	enthält die Gesamtsequenz von MIDA1 (EMBL Acc.No. D63784) (MicroMol, Karlsruhe)
pGEX-4T-1-ZRF1	enthält die Gesamtsequenz von ZRF1 (EMBL Acc.No. MM53208) (MicroMol, Karlsruhe)
pGEX-4T-1-ERj4	enthält die Nukleotide 178-780 (EMBL Acc.NO. AB028857), an Position 509 und 554 Austausch T>C (MicroMol, Karlsruhe)
pGEX-2T-Sil1p	enthält die Gesamtsequenz von BAP (MicroMol, Karlsruhe)
pQE10-BAP	enthält die Gesamtsequenz von BAP ohne ER-Signalsequenz (L. Hendershot, Memphis, Tennessee)
pQE10-BiP	enthält die Gesamtsequenz von BiP (L. Hendershot, Memphis, Tennessee)
pQE10-BiPG227D	enthält die Gesamtsequenz von BiP mit der Mutation G227D (L. Hendershot, Memphis, Tennessee)
pQE10-BiPT229G	enthält die Gesamtsequenz von BiP mit der Mutation T229G (L. Hendershot, Memphis, Tennessee)
pQE10-BiPT37G	enthält die Gesamtsequenz von BiP mit der Mutation T37G (L. Hendershot, Memphis, Tennessee)
pQE10-BiP44K	enthält die N-terminale 44 kDa Domäne von BiP (L. Hendershot, Memphis, Tennessee)
pQE10-BiPR197H	enthält die Gesamtsequenz von BiP mit der Mutation R197H (L. Hendershot, Memphis, Tennessee)

2.4 Verwendete Bakterienstämme

E. coli BL21 (DE3)

B⁻ F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻m_B⁻) *gal* 1 (DE3) *endA Tet^r λ(DE3) [pLysS Cam^R]*

E. coli M15

Na^s, Str^s, Rif^s, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺, [pREP4 Kan^R] (Zamenhof und Villarejo, 1972)

2.5 Verwendete Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper gegen die Proteine MIDA1 und ERj4 wurden aus dem Blut von Kaninchen gewonnen. Die Immunisierung der Kaninchen mit Protein sowie die Gewinnung der Antisera wurden von Dr. Nastainczyk (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet.

Tab. 2-2: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Beschreibung
anti-BiP	polyklonaler Proteinantikörper gegen das luminaire ER-Protein BiP (G. Kreibich, Cell Biology, New York University School of Medicine and Kaplan Cancer Center, USA)
anti-MIDA1	polyklonaler Proteinantikörper gegen das cytosolische Protein MIDA1
anti-ERj4	polyklonaler Proteinantikörper gegen den luminalen Anteil des ER-Proteins ERj4
anti-Hsp70	monoklonaler Antikörper gegen Proteine der Hsp70-Familie (Stressgen, Canada)

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli-Probenpuffer: (1fach konzentriert)	60 mM Tris/HCl, pH 6,8 10% (v/v) Glycerin 2% (w/v) SDS 5% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer:	384 mM Glycin 50 mM Tris 0,1% (w/v) SDS

Mit der von Shapiro *et al.* (1967) eingeführten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist es möglich, Proteine in Gegenwart eines SDS-Überschusses und denaturierenden Agenzien entsprechend ihrer Masse elektrophoretisch aufzutrennen. Proteine besitzen als amphotere Makromoleküle einen unterschiedlichen Anteil an positiv und negativ geladenen sowie ionisierbaren Aminosäureresten. Die Mobilität der Proteine im Polyacrylamidgel ist daher nicht nur von der Masse und der Form, sondern insbesondere von der Nettoladung des Moleküls unter den gegebenen Bedingungen abhängig. Die SDS-PAGE bietet den Vorteil einer Auftrennung der Proteine alleine nach ihrer Masse, da die Polypeptidketten gleichmäßig mit dem anionischen Detergenz SDS beladen und die Proteine gleichzeitig denaturiert werden. Die stark negative Ladung des Komplexes aus denaturiertem Protein und SDS ist dabei der Masse des Proteins in etwa proportional. Die elektrophoretische Wanderung im Gel erfolgt so lediglich in Abhängigkeit von der Molekülmasse.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Methode nach Laemmli (1970) angewandt. Hierzu wurde die Probe 1:1 mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden kurz in einer Eppendorf-Tischzentrifuge anzentrifugiert und dann auf ein vertikales Gel (11cm x 14 cm x 1 mm) aufgetragen. Nach Überschichten der Gele mit Lauffpuffer erfolgte die Elektrophorese mit 43 mA (2,5-3 h) oder 5 mA (16 h). Als Längenmarker wurde ein 10 kDa-Standard verwendet, für Gele, die geblottet werden sollten, ein vorgefärbter Marker.

Die verwendeten SDS-Gele bestanden aus einem kurzen Sammelgel und einem langen Trenngel. Das niederprozentige Sammelgel diente zur Fokussierung der Proteine, während die Proteine im Trenngel nach ihrer Masse aufgetrennt wurden.

Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteine wurden die Gele anschließend entweder mit Coomassie-Färbelösung gefärbt (vgl. 2.6.2) oder auf eine PVDF-Membran geblottet (vgl. 2.6.3) und das entsprechende Protein durch Antikörperdetektion (vgl. 2.6.4) identifiziert.

Nachfolgend ist das Pipettierschema für vertikale Gele der Größe 11 cm x 14 cm x 1 mm mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen dargestellt. Die Acrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße des Gels und wird je nach Größe der Proteine variiert. Standardmäßig wurden 12,5%ige Gele verwendet. Der Boden der Gele wurde mit einer 2 %igen Agarlösung abgedichtet.

Pipettierschema für SDS-Gele:

		Trenngel			Sammelgel
Lösung \ AA-Konz.(%)	AA-Konz.(%)	12,5	15	17,5	5
60% (w/v) AA, 0,8% (w/v) BAA (ml)		3,125	3,75	4,4	0,4
H ₂ O bidest (ml)		5,675	5,05	4,4	3,7
1,875 M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)		6,0			-
1 M Tris/HCl, pH 6,8 (ml)		-			0,6
10% (w/v) SDS (µl)		150			48
TEMED (µl)		5			7
10% (w/v) AMPS (µl)		45			45
Gesamtvolumen (ml)		15			4,8

2.6.2 Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant Blue

Färbelösung: 0,2 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue R 250
 0,005 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue G 250
 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärber 1: 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärber 2: 10 % (v/v) Methanol
 5 % (v/v) Essigsäure

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine konnten mit Hilfe der Coomassie-Brillant-Blue-Färbung sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde zunächst für ca. 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Zum Entfärben wurde das Gel nacheinander für 10 min in Entfärber 1 und für mehrere Stunden in Entfärber 2 geschwenkt. Anschließend wurde das

Gel in einer 10%igen Glycerinlösung etwa 30 min lang äquibriert und zwischen Cellophanfolie auf einem Geltrockner getrocknet.

2.6.3 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)

2.6.3.1 „Nass-Blot“-Methode

Transferpuffer: 7,2 g Glycin
 1,5 g TRIS
 mit H₂O bidest. auf 1 Liter aufgefüllt

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für eine immunologische Detektion auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die „Nass-Blot“-Methode in einer Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell der Firma BioRad angewendet.

Die Polyacrylamidgele wurden nach erfolgter Elektrophorese für 15-30 min in kaltem Transferpuffer äquibriert, um Salze und Detergenzien zu entfernen. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde zunächst kurz in Methanol aktiviert, dann mit H₂O bidest. ab gespült, und anschließend ebenfalls in Transferpuffer äquibriert. Schließlich wurde das „Gelsandwich“ mit zwei dünnen, auf Gelgröße zurechtgeschnittenen Whatman-Papieren, so zusammengesetzt, dass sich die PVDF-Membran zwischen Gel und Anode befand und die Proteine somit auf die Membran transferiert wurden. Der Transfer erfolgte dabei für ca. 15 h bei 400 mA und 15°C.

2.6.3.2 „Semi-Dry“-Methode

Transferpuffer: 150 mM Glycin
 20 mM Tris
 20% (v/v) Methanol

Hier wurde der Transfer mit einer Semi-Dry-Apparatur der Firma Millipore Co., Bedford, MA, USA durchgeführt. Die Membran wurde wie oben aktiviert und zusammen mit Gel und 1 mm dicken Whatman-Papieren in Transferpuffer äquibriert. Das „Gelsandwich“ wurde luftblasenfrei zusammengesetzt und mit Transferpuffer überschichtet. Die Dauer des Proteintransfers betrug 16 h bei 0,37 mA/cm².

2.6.4 Immunologische Detektion der transferierten Proteine

TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,4 0,9% (w/v) NaCl
TBST-Puffer:	0,05% (w/v) Triton X-100 in TBS-Puffer
Blocklösung:	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer
Antikörperlösung:	Blocklösung + Antiserum (Verdünnung 1:500 – 1:1000)

Zur Detektion der auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurde die Membran zunächst für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit einer Antikörperlösung des gewünschten Primärantikörpers für mindestens 60 min inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 5 min in TBS-Puffer, zweimal für 10 min in TBST-Puffer und abschließend nochmals zweimal für 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde dann ebenfalls für mindestens 60 min mit einer zweiten Antikörperlösung inkubiert, welche einen Peroxidase gekoppelten anti-IgG-Antikörper (Sekundärantikörper) enthielt. Im Anschluss wurden wiederholt die beschriebenen Waschschriffe durchgeführt, bevor die Proteine mittels Chemilumineszenz nachgewiesen wurden. Zur Detektion wurde das Enhanced Chemiluminescence Detection (ECL)-System verwendet. Hierbei wurde die PVDF-Membran für 2 min in einer Mischung aus gleichen Volumina ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 inkubiert und dann zwischen zwei Folien gelegt. Anschließend konnten Röntgenfilme unterschiedlich lange exponiert werden, um die entstandene Chemilumineszenz zu visualisieren.

2.6.5 TCA-Fällung von Proteinen

Die zu fällende Probe wurde mit einem Viertel Volumen eiskalter 50%iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge für 15 min, bei 2°C und 14.000 Upm wurden auf das entstandene Sediment 500 µl eiskaltes Aceton gegeben, um TCA-Reste zu entfernen. Die Probe

wurde gevortext und anschließend erneut für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in der Speed-Vac getrocknet und für die SDS-PAGE in entsprechender Menge Laemmli-Probenpuffer aufgenommen.

2.6.6 Quantifizierung von Proteinen

2.6.6.1 Bestimmung der optischen Dichte bei 280 nm

Die einfachste Methode der Proteinbestimmung ist die Messung der optischen Dichte bei 280 nm. Diese beruht auf einer Lichtabsorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin in diesem Bereich. Bei einer bekannten Proteinsequenz ergibt sich aus der Anzahl der aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsfaktor AF. Wird dieser mit der OD_{280} multipliziert, erhält man die Proteinkonzentration in mg/ml. Der AF wurde mit Hilfe des DNASTar-Programms von Lasergene bestimmt.

2.6.6.2 Vergleich der Coomassie-Färbung mit einem Eichprotein

Das zu quantifizierende Protein wurde mit verschiedenen Mengen einer BSA-Stammlösung bekannter Konzentration auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung des Gels wurde die Blaufärbung des zu quantifizierenden Proteins mit der Färbung der unterschiedlichen Konzentrationen des Eichproteins verglichen und so die Konzentration des zu quantifizierenden Proteins abgeschätzt.

Für eine densitometrische Auswertung wurden die mit Coomassie angefärbten Proteinbanden mit einem Densitometer quantifiziert. Mit den Eichproteinen wurde eine Eichgerade erstellt, mit der die Konzentrationen der zu bestimmenden Proteine berechnet wurden.

2.6.7 Sequenzierung von Proteinen mittels Edman-Abbau

Die Sequenzierung wurde mit einem Sequenzer (Sequenator Procise 491A) der Firma Perkin Elmer von Dr. W. Nastainczyk (Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) durchgeführt.

Die Proben wurden zuvor durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (vgl. 2.6.1) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (vgl. 2.6.3.1). Diese wurde mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, wobei die Färbelösung und der Entfärber keine Essigsäure enthalten darf. Die Banden von Interesse wurden nach Trocknung der Membran für die Sequenzierung mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

2.7 Präparative Methoden

2.7.1 Präparation von rauen Mikrosomen aus Hundepankreas

Puffer A: (2-fach)	100 mM Triethanolamin/HCl, pH 7,5 500 mM Saccharose 100 mM KAc 12 mM MgCl ₂ 4 mM DTT 2 mM EDTA 0,4 mM PMSF 1:10.000 PLAC
Puffer B:	1 Vol. Puffer A +1 Vol. H ₂ O bidest
Kissen A:	50 mM Triethanolamin/HCl, pH 7,5 1,3 M Saccharose 50 mM KAc 6 mM MgCl ₂ 4 mM DTT 1 mM EDTA 0,4 mM PMSF 1:10.000 PLAC

2. Material und Methoden

Kissen 2,1:	50 mM Triethanolamin/HCl, pH 7,5 2,1 M Saccharose 50 mM KCl 5 mM MgCl ₂
Kissen 1,75:	wie Kissen 2,1, jedoch mit 1,75 M Saccharose
Kissen 1,5:	wie Kissen 2,1, jedoch mit 1,5 M Saccharose
Kissen 1,3:	wie Kissen 2,1, jedoch mit 1,3 M Saccharose
0,2 M Saccharosepuffer:	20 mM Hepes/KOH, pH 7,5 200 mM Saccharose 50 mM KCl
Mg-0,5 M-Saccharosepuffer:	20 mM Hepes/KOH, pH 7,5 500 mM Saccharose 50 mM KCl 2 mM MgAc ₂
MVP:	20 mM Hepes/KOH, pH 7,5 200 mM Saccharose 50 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 2 mM DTT
PLAC (Gemisch aus):	12 mg Pepstatin A/ml DMSO 2 mg Leupeptin/ml DMSO 12 mg Antipain/ml DMSO 12 mg Chymostatin/ml DMSO

Alle Arbeitsschritte der Mikrosomenpräparation aus Hundepankreas erfolgten im wesentlichen nach der Methode von Watts et al. (1983) bei einer Temperatur von 4°C, wenn nicht anders angegeben. Frisches Hundepankreasgewebe (40 g bis 60 g) wurde in

Puffer B vom Bindegewebe befreit und durch eine Presse in 100 ml Puffer A gepreßt, wobei das Gesamtvolumen von 150 ml nicht überschritten wurde. Anschließend wurde das so zerkleinerte Pankreasgewebe portionsweise in einem 60 ml-Motorpotter in drei Durchgängen bei 300 Upm homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde einer Zentrifugation im JA-20 Rotor für 10 min bei 3.000 Upm unterworfen. Der daraus resultierende Überstand wurde erneut für 10 min bei 9.000 Upm zentrifugiert, wodurch Zellkerne und Mitochondrien abgetrennt werden sollten. Der resultierende Überstand enthielt noch cytosolische Bestandteile, sowie vesikuläre Strukturen wie endoplasmatisches Retikulum, Golgi und Vesikel endosomalen und lysosomalen Ursprungs. Die cytosolischen Bestandteile und die vesikulären Strukturen geringerer Dichte wurden im nachfolgenden Ultrazentrifugationsschritt von Vesikeln des rauen endoplasmatischen Retikulums getrennt. Dazu wurden jeweils etwa 17 ml des Überstandes vorsichtig auf eine Vorlage von 9 ml Puffer B in Ti 70-Zentrifugenröhrchen pipettiert und im entsprechenden Rotor bei 45.000 Upm und 2°C für 2,5 h zentrifugiert (*slow accel, no break*). Die so erhaltenen Pellets wurden anschließend in 5 ml Puffer B resuspendiert und im 15 ml-Motorpotter in drei Durchgängen bei 100 Upm homogenisiert. Das gewonnene Homogenat wurde mit Puffer B auf 48 ml aufgefüllt und vorsichtig auf einen diskontinuierlichen Gradienten bestehend aus jeweils 4 ml Kissen 2,1, Kissen 1,75 und Kissen 1,5 in Ti 70-Röhrchen aufgeschichtet. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 17–20 h bei 45.000 Upm (*slow accel, no break*). Nach dieser Zentrifugation waren zwei Banden im Gradienten sichtbar. Die rauen Mikrosomen, die in der unteren weißen Bande angesammelt waren, wurden mit einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen, wobei das Volumen der gesammelten Fraktionen 80 ml nicht überschritt. Mit Puffer B wurden die gesammelten Fraktionen auf 160 ml aufgefüllt, wovon jeweils ca. 17 ml auf 3 ml Kissen 1,3 in Ti 70-Röhrchen aufgetragen und für 2 h bei 45.000 Upm zentrifugiert wurden (*slow accel, slow decel*). Die resultierenden Pellets (raue Mikrosomen) wurden in je 1 ml 0,2 M Saccharose-Puffer resuspendiert, im 2 ml-Glaspotter mit 7 Durchgängen von Hand homogenisiert und mit gleichem Puffer auf 30 ml aufgefüllt. Vom Homogenat wurde eine 1:200 und eine 1:100 Verdünnung in 2%igem SDS hergestellt und die Absorption bei 280 nm gemessen. Anhand der gemessenen Werte wurde die Mikrosomensuspension mit 0,2 M Saccharosepuffer auf eine Absorption von 50 eingestellt.

Zum Verdau von mikrosomaler mRNA wurden die Mikrosomen mit 200 mM CaCl₂-Lösung versetzt (Endkonzentration 1 mM). Anschließend wurde Nuklease-Lösung bis zu einer Volumenaktivität von 40 U/ml zugesetzt. Der Verdau wurde für 10 min bei 20°C durchgeführt und mit EGTA/KOH, pH 7,5 (Endkonzentration 2 mM) und EDTA/KOH, pH 7,5 (Endkonzentration 5 mM) gestoppt. Jeweils 15 ml der so behandelten Lösung wurden

auf 5 ml Mg-0,5 M-Saccharosepuffer in Ti 70-Zentrifugenröhrchen geschichtet und für 2 h bei 40.000 Upm zentrifugiert (*slow accel, slow decel*). Das entstandene Pellet wurde im MV-Puffer resuspendiert und im 2 ml-Glaspotter homogenisiert. Nach erneuter Messung der Absorption bei 280 nm wurde die Mikrosomenkonzentration durch Verdünnung mit MV-Puffer so eingestellt, dass die unverdünnte Mikrosomenkonzentration bei 280 nm eine Absorption von 50 aufwies, was einer Proteinkonzentration von ca. 10 mg/ml entspricht. Abschließend wurde die Mikrosomensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.2 Herstellung eines Detergenzextraktes aus Hundepankreasmikrosomen

Chromatographiepuffer 400:	20 mM Hepes/KOH pH 7,5
	400 mM KCl
	2 mM MgCl ₂
	1 mM EDTA
	0,65% CHAPS

Die Solubilisierung von Hundepankreasmikrosomen erfolgte mit CHAPS unter Hochsalzbedingungen. Das benötigte Volumen einer Mikrosomensuspension wurde im TLA100.3 Rotor für 20 min bei 68.000 Upm und 2°C zentrifugiert, um die Mikrosomen zu pelletieren. Das Pellet wurde im gleichen Volumen Chromatographiepuffer 400 resuspendiert und für 20 min bei 4°C auf dem Schüttler solubilisiert. Um unlösliche Proteine und die Membranen zu entfernen, wurde dann nochmals für 60 min bei 100.000 Upm und 2°C im TLA100.3 Rotor zentrifugiert. Der Überstand enthielt die luminalen Proteine der Mikrosomen und wurde für weitere Versuche verwendet.

2.7.3 Präparation von Ribosomen aus Hundepankreas

RV-Puffer:	20 mM Hepes/KOH, pH 7,5
	150 mM KAc
	2 mM MgAc ₂
	2 mM DTT

Während der Mikrosomenpräparation aus Hundepankreas (siehe 2.7.1) konnten zusätzlich auch cytosolische Ribosomen gewonnen werden. Nach der Zentrifugation des Hundepankreashomogenats durch den diskontinuierlichen Gradienten (Saccharose-Kissen 2,1 M bis 1,3 M) befanden sich die cytosolischen Ribosomen im Pellet. Nach dem Abnehmen der rauhen Mikrosomen und des restlichen Überstands wurden die Ribosomen-Pellets in je 1-2 ml RV-Puffer resuspendiert. Das Gesamtvolumen sollte 10 ml nicht überschreiten, um eine ausreichende Proteinkonzentration zu gewährleisten.

Sollten die Ribosomen versuchsbedingt in einem anderen Puffer vorliegen, so wurde die Ribosomensuspension für 1h bei 68.000 Upm im TLA 100.3 Rotor bei 2°C zentrifugiert. Das ribosomale Pellet wurde in einem Volumen des gewünschten Puffers resuspendiert. Zum vollständigen Resuspendieren erfolgte eine Inkubation für 30-60 min bei 4°C unter ständigem Schütteln.

2.7.4 Carbonatextraktion

Die Methode der Carbonatextraktion wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob ein Protein stabil in die Lipiddoppelschicht der ER-Membran integriert ist. Die Mikrosomen-Membran wird dabei mit Natriumcarbonat pH 11,5 behandelt, was zur Auflösung der mikrosomalen Vesikel und zur Zerstörung der Protein-Protein-Interaktionen führt. Die Lipiddoppelschicht und Lipid-Protein-Interaktionen bleiben dagegen intakt. Die rauhen Mikrosomen wurden zunächst für 30 min bei 68.000 Upm und 2°C im TLA100.3-Rotor pelletiert. Das Pellet wurde dann im doppelten Volumen 100 mM Na₂CO₃ resuspendiert und für 30 min bei 0°C inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand, welcher die löslichen Proteine enthielt, abgenommen. Zu Überstand und Pellet (Membranproteine) wurde Laemmli-Probenpuffer gegeben und bei 95°C für 5 min gekocht. Die Proben wurden schließlich durch SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.6.1) und mittels Antikörperdetektion (vgl. 2.6.4) analysiert.

2.7.5 Entsalzung und Umpufferung

2.7.5.1 PD10-Gelfiltrationssäulen

Um die Eluate der Affinitätschromatographiesäulen zu entsalzen oder in einen für die späteren Versuche geeigneten Puffer zu bringen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Die verwendeten PD10-Gelfiltrationssäulen enthalten als Säulenmaterial 5 ml Sephadex G-25 und können für kleine Volumina bis 3 ml verwendet werden. Die PD10-Säule wurde zuerst mit 20 ml des Zielpuffers äquilibriert. Anschließend wurde das umzupuffernde Protein aufgetragen und anschließend jeweils 1 ml Aliquots des Zielpuffers über die Säule gegeben. Gleichzeitig wurde der Durchlauf der Säule in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch OD₂₈₀-Messung analysiert (vgl. 2.6.6.1). Nach Äquilibrierung mit 20 ml Zielpuffer konnte die Säule nochmals verwendet werden.

2.7.5.2 Dialyse

Eine andere Methode, die zum Umpuffern einer Proteinlösung verwendet wurde, ist die Dialyse. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (Spectra/Por[®]-Dialyseschläuche) mit einem Ausschlussvolumen von 12-14 kDa verwendet. Dieser wurde zunächst in dem auf 4°C vorgekühlten Ziel-Puffer für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Dialyseschlauch an einem Ende mit einer Klemme verschlossen und die Proteinlösung vorsichtig eingefüllt. Nun wurde auch das andere Ende mit einer Klemme so verschlossen, dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden, der Schlauch jedoch auch nicht zu prall gefüllt war. Jetzt wurde der Dialyseschlauch in ein Becherglas mit dem vorgekühlten Ziel-Puffer gelegt, wobei das Volumen des Puffers mindestens das 1.000-fache des Volumens der in den Dialyseschlauch eingefüllten Proteinlösung betrug. Dieser Ansatz wurde unter schwachem Rühren bei 4°C für mindestens 2 h inkubiert. Dann wurde der Puffer gewechselt und für weitere 4 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach dieser Inkubation konnte die Proteinlösung aus dem Dialyseschlauch herauspipettiert und weiter verwendet werden.

2.7.6 Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Hefe Extrakt
10 g NaCl
ad 1 l H₂O bidest., pH 7,0, autoklaviert

LB-Antibiotikum-Platten: 10g Bacto-Trypton
5g Bacto-Hefeextrakt
10g NaCl
15g Agar
ad 1 l H₂O bidest., pH 7,0, autoklaviert
nach dem Abkühlen Zugabe von 1 ml
Antibiotikumlösung

Antibiotikumlösungen: - Ampicillin 100 mg/ml in H₂O
- Kanamycin 25 mg/ml in H₂O
- Chloramphenicol 34 mg/ml in Ethanol

Die Anzucht der *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium bei 37°C (wenn nicht anders angegeben) und 250 Upm in einem Schüttelinkubator. Die Kulturgefäße wurden höchstens bis zu einem Viertel ihres Volumens gefüllt, um einen ausreichenden Gasaustausch zu ermöglichen.

Den jeweiligen Medien wurden die entsprechenden Antibiotikumlösungen (abhängig von den verwendeten Bakterienstämmen) im Verhältnis 1:1000 beigemischt. Für das Wachstum auf Nährböden wurden die verwendeten Bakterienstämme auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C über Nacht.

2.7.7 Synthese und Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Um eine schnelle und sehr spezifische Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* zu ermöglichen, wurden die Proteine mit speziellen „tags“ versehen und als Fusionsproteine synthetisiert. Diese „tags“ vermitteln die Bindung der zu reinigenden

2. Material und Methoden

Proteine an eine geeignete Matrix. Durch anschließendes Waschen der Matrix zur Beseitigung von unspezifisch gebundenem Protein und Elution mit einer geeigneten Substanz wird so gezielt das gewünschte Protein gereinigt. Nach der Reinigung wurde der „tag“, je nach Verwendung, am Protein belassen oder enzymatisch abgespalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine wurden als His₆-Fusionen oder als Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* synthetisiert. Dabei befand sich GST immer am N-Terminus, His₆ dagegen am C-Terminus. Durch diese angehängten „tags“, war es möglich die Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie an Nickel-NTA-Agarose bzw. GSH-Sepharose aus dem Gesamtlisat der Bakterien zu reinigen.

A) Verwendete Puffer für die Synthese und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

PBS/KMT-Puffer: 150 mM NaCl
 5 mM NaH₂PO₄
 20 mM Na₂HPO₄
 1 mM MgCl₂
 3 mM KCl
 0,1% Tween 20 (v/v)
 pH 7,4, sterilfiltriert

GSH-Elutionspuffer: 50 mM Tris
 10 mM Glutathion (reduzierte Form)
 pH 8,0, sterilfiltriert

B) Verwendete Puffer für die Synthese und Reinigung von His₆-Fusionsproteinen

Lyse-Puffer A: 50 mM Tris
 200 mM NaCl
 10 mM Imidazol
 2 mM β-Mercaptoethanol
 pH 8,0, sterilfiltriert

2. Material und Methoden

Lyse-Puffer B :	50 mM Na ₂ HPO ₄ 500 mM NaCl 10 mM Imidazol 1% Triton X-100 (v/v) 10% Glycerol (v/v) pH 8,0, sterilfiltriert
Wasch-Puffer A:	50 mM Tris 300 mM NaCl 20 mM Imidazol 2 mM β-Mercaptoethanol pH 8,0, sterilfiltriert
Wasch-Puffer B :	Lyse-Puffer B ohne 1% Triton X-100
Ni-NTA-Elutionspuffer A:	50 mM Tris 300 mM NaCl 250 mM Imidazol 2 mM β-Mercaptoethanol pH 8,0, sterilfiltriert
Ni-NTA-Elutionspuffer B :	Wasch-Puffer B + 300 mM Imidazol

a) Zellanzucht und Synthese des rekombinanten Proteins

In einem ersten Schritt wurde das entsprechende Plasmid, das für das zu reinigende Protein codierte, in *E. coli* transformiert (vgl. 2.10.3). Es wurden entweder BL21- oder M15-Zellen verwendet, je nachdem welcher Stamm für die Expression und Synthese des Proteins am besten geeignet war. In der Regel wurde der BL21-Stamm verwendet. Er bietet den Vorteil, dass er erstens proteasedefizient ist und zweitens das Plasmid pLysS enthält, das für ein Lysozym-ähnliches Protein codiert. Dieses Protein wird durch Einfrieren und Auftauen der Zellen aktiviert, was zur Folge hat, dass sich die Zellen selbstständig lysieren.

Mit der Übernacht-Kultur des Transformationsansatzes wurde 1 l LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Alle verwendeten Plasmide tragen eine Ampicillinresistenz. Zusätzlich muss bei den *E. coli* BL21-Zellen zur Erhaltung des

2. Material und Methoden

Lyseplasmids Chloramphenicol zugegeben werden. Bei einer OD_{600} von 0,5-0,7 wurde mit Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Die Zugabe von IPTG inaktiviert den lac-Repressor, der auf dem Plasmid codiert ist und die Expression des einklonierten Proteins unterdrückt. Entsprechend den optimalen Induktionsbedingungen für das jeweilige Protein wurde die Kultur weiter inkubiert (vgl. Tab. 2-3). Nach Beendigung der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 2°C für 10 min im JA-10 Rotor geerntet. Die Zellen wurden anschließend in 40 ml des entsprechenden Lyse-Puffers (siehe Tab. 2-4) resuspendiert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

Tab. 2-3: Verwendete Bakterien-Stämme und Expressionsbedingungen für die Synthese der rekombinanten Fusionsproteine

Protein	<i>E. coli</i> -Stamm	Induktions-Temperatur [°C]	IPTG-Konzentration [mM]	Induktions-Zeit [h]
GST-MIDA1	BL21	37	0,3	2
GST-ZRF1	BL21	37	0,3	2
GST-ERj4	BL21	30	0,08	1
GST-BAP	BL21	15	0,3	3
BAP-His ₆	M15	17	0,1	18
BiP-His ₆ (WT + Mutanten)	BL21	30	0,3	2

Tab. 2-4: Verwendete Lyse- und Elutionspuffer bei der Reinigung der rekombinanten Fusionsproteine

Protein	Lysepuffer	Elutionspuffer
GST-MIDA1	PBS-KMT	GSH-Elutionspuffer
GST-ZRF1	PBS-KMT	GSH-Elutionspuffer
GST-ERj4	PBS-KMT (0,5% Tween20, 250 mM NaCl)	GSH-Elutionspuffer + 150 mM NaCl
GST-BAP	PBS-KMT	GSH-Elutionspuffer + 150 mM NaCl
His ₆ -BAP	Lyse-Puffer B	Ni-NTA-Elutionspuffer B
His ₆ -BiP (WT + Mutanten)	Lyse-Puffer A	Ni-NTA-Elutionspuffer A

b) Zellaufschluß

Die Lyse der BL21–Zellen erfolgte durch Einfrieren bei -80°C für mindestens 3 h und anschließendes Wiederauftauen. Durch Zentrifugation bei 50.000 Upm und 2°C für 60 min mit dem Ti70-Rotor wurden die Zelltrümmer von den löslichen Bestandteilen getrennt.

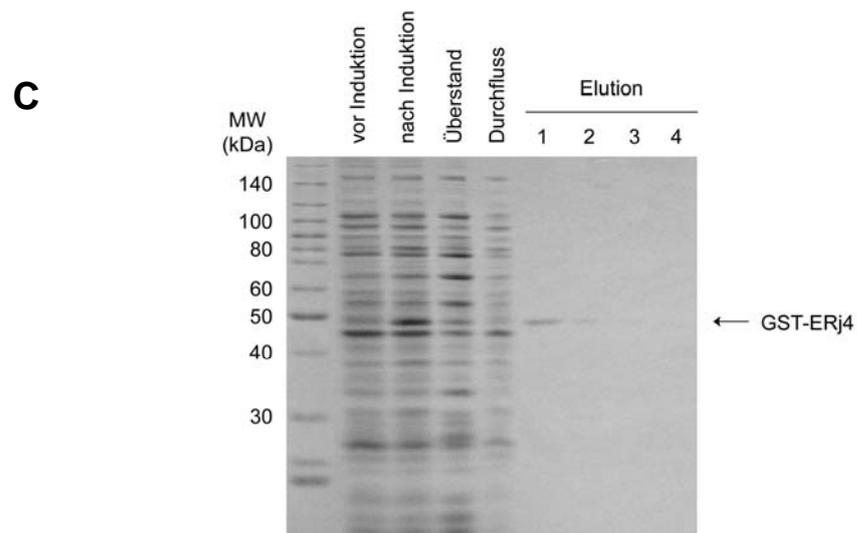
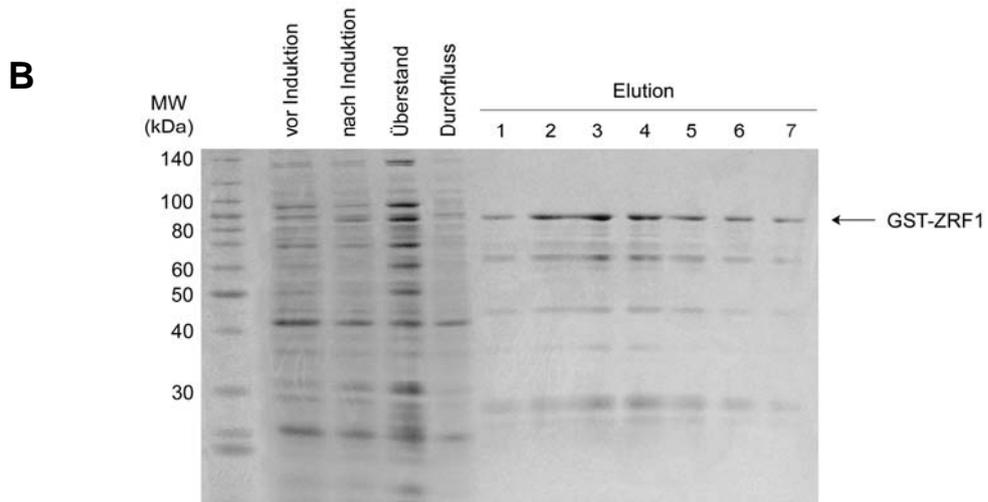
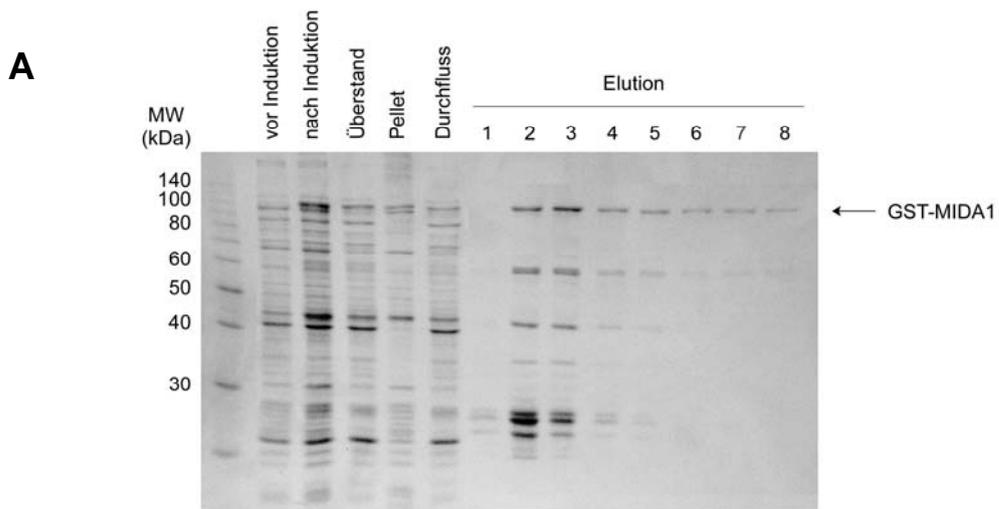
Die M15–Zellen wurden mittels Ultraschall für 3 x 1 min mit jeweils 3 min Pause bei 40% Amplitude (VCX-Macrotip) im Eisbad lysiert und die löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation bei 20.000 Upm und 4°C für 30 min im JA-20 Rotor von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

c) Reinigung durch Affinitätschromatographie

2.7.7.1 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Überstände nach Lyse und Zentrifugation der GST-Fusionsproteine wurden über GSH-Sepharose-Säulen weiter aufgereinigt. Die Glutathion-S-Transferase, die für diese Affinitätsreinigung verwendet wird, ist ein cytoplasmatisches Enzym aus *Schistosoma japonicum* mit einem Molekulargewicht von 26 kDa, das hochspezifisch an den GSH-Anteil der verwendeten Sepharose bindet.

1,5 ml des Säulenmaterials wurden zunächst 3 x mit jeweils 20 ml PBS/KMT äquilibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation der lysierten Zellen wurde mit dem Säulenmaterial mindestens für 1 h bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine 20 ml Chromatographie-Säule überführt, mit einer Fritte oben verschlossen und 2 x mit 20 Bettvolumen PBS/KMT gewaschen. Eluiert wurde mit 8 ml GSH-Elutionspuffer in 1 ml Fraktionen, die im Anschluß an eine OD_{280} - Proteinbestimmung bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurden. Abb. 2-1 zeigt die Synthese und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine.



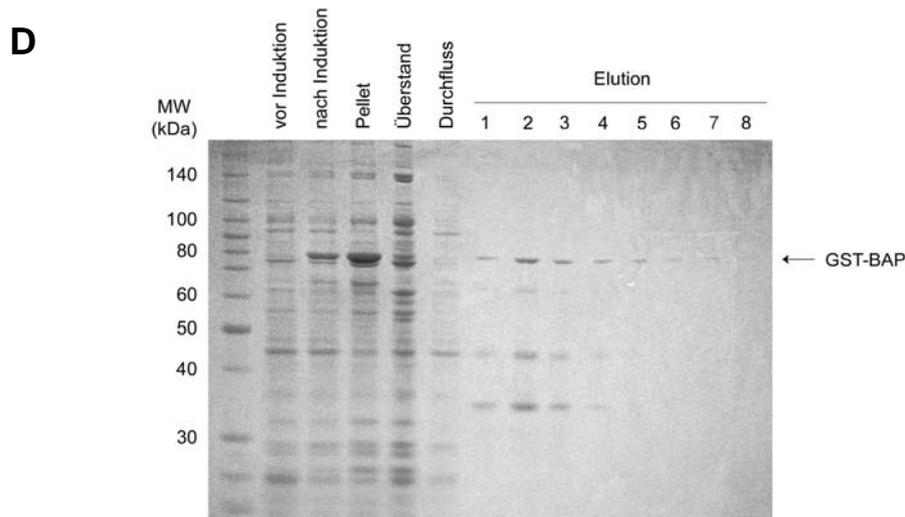


Abb. 2-1: Synthese und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine GST-MIDA1 (A), GST-ZRF1 (B), GST-ERj4 (C) und GST-BAP (D)

Die *E. coli*-Zellen wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert (Spur „vor Induktion“). Dann wurde bei der entsprechenden Temperatur für 1-3 h mit IPTG induziert (vgl. Tab. 2-3). Nach Beendigung der Induktion (Spur „nach Induktion“), wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 2°C für 10 min geerntet. Der Aufschluss erfolgte durch Einfrieren und Auftauen der *E. coli* BL21-Zellen. Nach Abtrennung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (Spur „Pellet“), wurde der Überstand (Spur „Überstand“) mit GSH-Sepharose für 1h bei 4°C inkubiert. Der Durchfluss der Säule wurde aufgefangen (Spur „Durchfluss“), die Säule mit Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer in 1 ml-Fractionen eluiert (Spuren „Elution“). Aliquots der Fractionen wurden über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine wurden mit Coomassie-Färbelösung gefärbt.

2.7.7.2 Reinigung von His₆-Fusionsproteinen

Die Lysat-Überstände nach Lyse und Zentrifugation der His₆-Fusionsproteine exprimierenden *E. coli* BL21- oder M15-Zellen wurde über eine Nickel-NTA-Agarose-Säule weiter aufgereinigt. Die kovalent an die Säulenmatrix gekoppelten Ni²⁺-NTA-Moleküle bilden einen Metall-Chelat-Komplex. Die NTA-Liganden belegen dabei 4 der 6 Koordinationsstellen des Ni²⁺-Ions. Die anderen zwei Koordinationsstellen stehen für die Bindung des His₆-tags zur Verfügung.

Die Aufreinigung erfolgte im Prinzip wie für die Reinigung der GST-Fusionsproteine beschrieben (vgl. 2.7.7.1). Hier wurde 1,5 ml Nickel-NTA-Agarose gewaschen und mit *E. coli*-Lysat inkubiert. Die Elution erfolgte mit 8 ml Imidazol-haltigem Elutionspuffer in 1 ml Aliquots (siehe Abb. 2-2). Das Eluat wurde über eine PD10-Säule (vgl. 2.7.5.1) in den für die späteren Versuche benötigten Puffer gebracht und bei -80°C gelagert. Die Umpufferung diente auch der Entfernung des Imidazols, das beim Wiederauftauen mit dem Protein ausfallen kann.

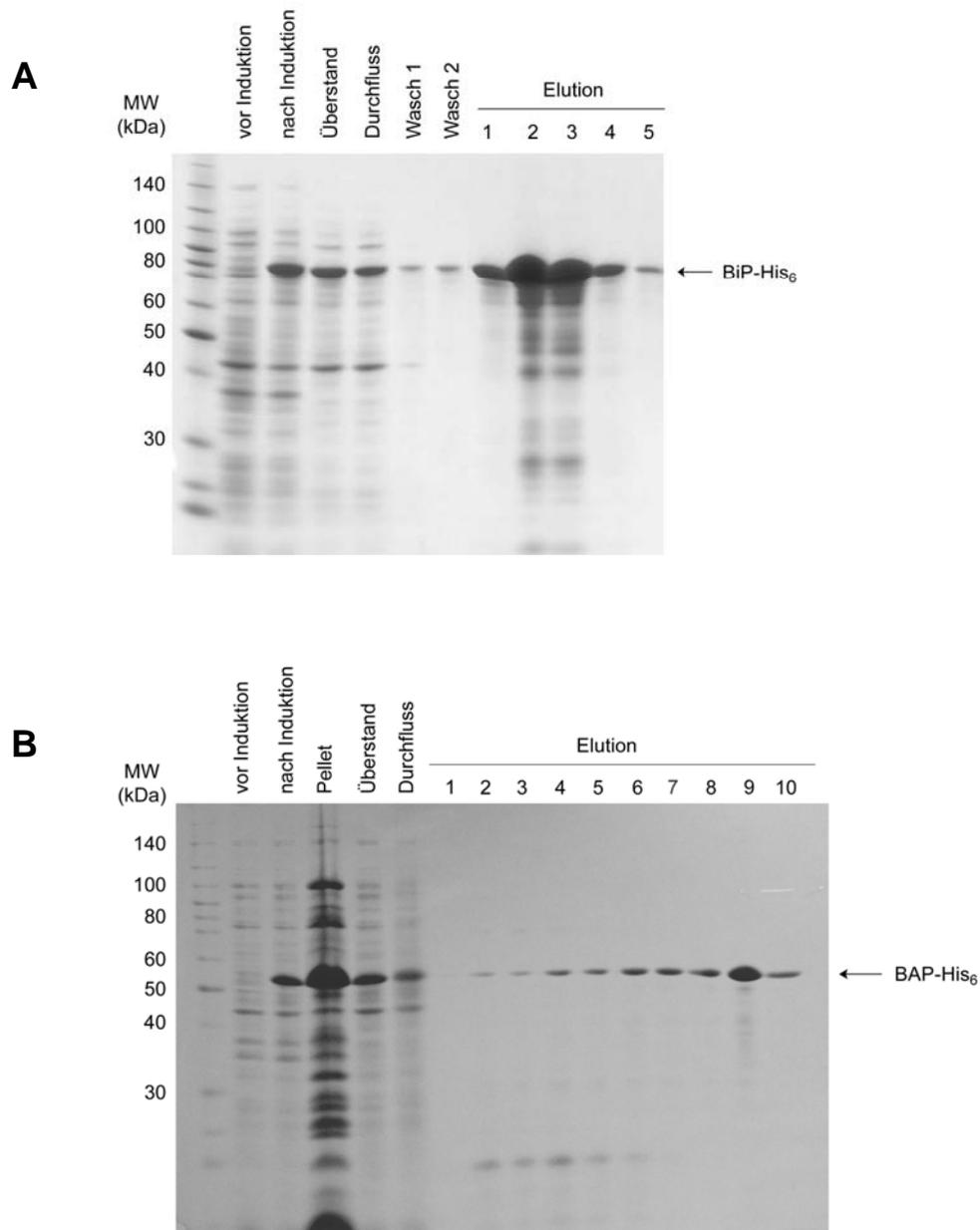


Abb. 2-2: Synthese und Reinigung der His₆-Fusionsproteine BiP-His₆ (A) und BAP-His₆ (B)

Die *E. coli*-Zellen wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert (Spur „vor Induktion“). Dann wurde bei der entsprechenden Temperatur für 2 h (A) oder 18 h (B) mit IPTG induziert (vgl. Tab. 2-3). Nach Beendigung der Induktion (Spur „nach Induktion“) wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 2°C für 10 min geerntet. Der Aufschluss erfolgte durch Einfrieren und Auftauen (BL21-Zellen (A)) oder durch Ultraschall (M15-Zellen (B)). Nach Abtrennung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (Spur „Pellet“), wurde der Überstand (Spur „Überstand“) mit Ni-NTA-Agarose für 1h bei 4°C inkubiert. Der Durchfluss der Säule wurde aufgefangen (Spur „Durchfluss“), die Säule mit Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer in 1 ml-Fractionen eluiert (Spuren „Elution“). Aliquots der Fractionen wurden über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine wurden mit Coomassie-Färbelösung gefärbt.

2.7.8 Spaltung von GST-MIDA1 mit Thrombin

Spaltungspuffer:	25 mM Tris/HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	2,5 mM CaCl ₂
	0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol
	10% (v/v) Glycerin

Zur Herstellung von Antikörpern gegen das als GST-Fusion heterolog in *E. coli* exprimierte Protein MIDA1, musste der GST-tag wegen seiner stark immunogenen Eigenschaften abgespalten werden. Der pGEX-4T-1-Vektor, der zur Expression des GST-Fusionsproteins verwendet wurde, codiert unmittelbar hinter dem GST für eine Thrombinschnittstelle und bietet so die Möglichkeit, den GST-tag spezifisch mittels der Protease Thrombin abzuspalten.

Die Spaltung erfolgte dabei auf der GSH-Sepharose-Säule. Das Vorbinden des Fusionsproteins an GSH-Sepharose und das Waschen erfolgten wie unter 2.7.7.1 beschrieben. Im Anschluß an den letzten Waschschrift wurde die Säule mit 10 Bettvolumina Spaltungspuffer äquilibriert. Dann wurde die Säule am unteren Ende verschlossen, und es wurden 5 ml Spaltungspuffer mit 0,1 U Thrombin pro µg Fusionsprotein zugegeben. Die Säule wurde auch oben verschlossen und auf einer Wippe für 4 h bei 4°C inkubiert. Die benötigte Thrombinmenge, sowie die Spaltungszeit wurden in einem Vorversuch mit 10 µg Protein bestimmt. Im Anschluß wurde das abgespaltene MIDA1 durch Auslaufen der Säule eluiert, wogegen der GST-tag an der Säulenmatrix immobilisiert blieb. Es erfolgte abschließend noch eine zweite Elution mit 1 Bettvolumen Spaltungspuffer. Das Thrombin wurde über Ionenaustauschchromatographie mittels eines SourceQ-Filters (vgl. 2.9.6) entfernt.

2.7.9 Herstellung von Proteinantikörpern

Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen Proteine wurden Kaninchen mit den Antigenen immunisiert. Die Immunisierung erfolgte in einem 2 Wochen-Rhythmus mit jeweils 350 µl Proteinlösung einer Konzentration von mindestens 0,7 mg/ml. Jeweils 7 Tage nach jeder Immunisierung wurde Blut entnommen, aus dem zwischen 5 und 15 ml Serum hergestellt werden konnten. Die Immunisierung sowie die Gewinnung des

Antiserums wurden von Dr. Nastainczyk (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Antikörper gegen das Protein MIDA1 und ein Antikörper gegen das Protein ERj4 hergestellt.

2.7.9.1 Herstellung des anti-ERj4-Antikörpers

Zur Herstellung des anti-ERj4-Antikörpers musste auf denaturiertes Protein, welches noch den GST-tag enthielt, zurückgegriffen werden. Dies war notwendig, da sich GST-ERj4 nicht in ausreichender Menge reinigen ließ, um es für eine Immunisierung einzusetzen. Bei der Synthese in *E. coli* wurde das GST-Fusionsprotein zwar in großer Menge hergestellt, jedoch lag es fast ausschließlich in unlöslicher Form vor und konnte daher nicht an GSH-Sepharose gebunden werden. Daher wurde das unlösliche Protein nach Zellaufschluss und Abtrennung der löslichen Proteine (siehe Abb. 2-3 A) durch Zentrifugation (50.000 Upm, 2°C, 60 min, Ti70-Rotor) in einer 40 mM Tris (pH 7,4), 2% SDS-Lösung aufgenommen und gelöst. Das somit denaturierte Protein wurde auf eine Konzentration von 1,5 mg/ml eingestellt und für die Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt.

Um zu testen, ob sich in dem gewonnenen Serum Antikörper gegen ERj4 befanden, wurde ein Blot dekoriert, auf dem sich Spuren mit GST-ERj4, RMs und GST befanden (siehe Abb. 2-3 B). In der Spur mit GST-ERj4 wurden zwei Proteine bei ca. 38 und 48 kDa erkannt, wobei es sich bei der unteren Bande wahrscheinlich um ein Abbauprodukt handelt. In der Spur mit den Mikrosomen ist im Bereich um 20 kDa eine prominente Bande zu sehen, bei der es sich vermutlich um ERj4 handelt. Da für die Immunisierung GST-getagtes Protein verwendet wurde, ist in der GST-Spur eine sehr starke Bande bei 26 kDa zu erkennen, was mit dem stark immunogenen Charakter von GST zu erklären ist.

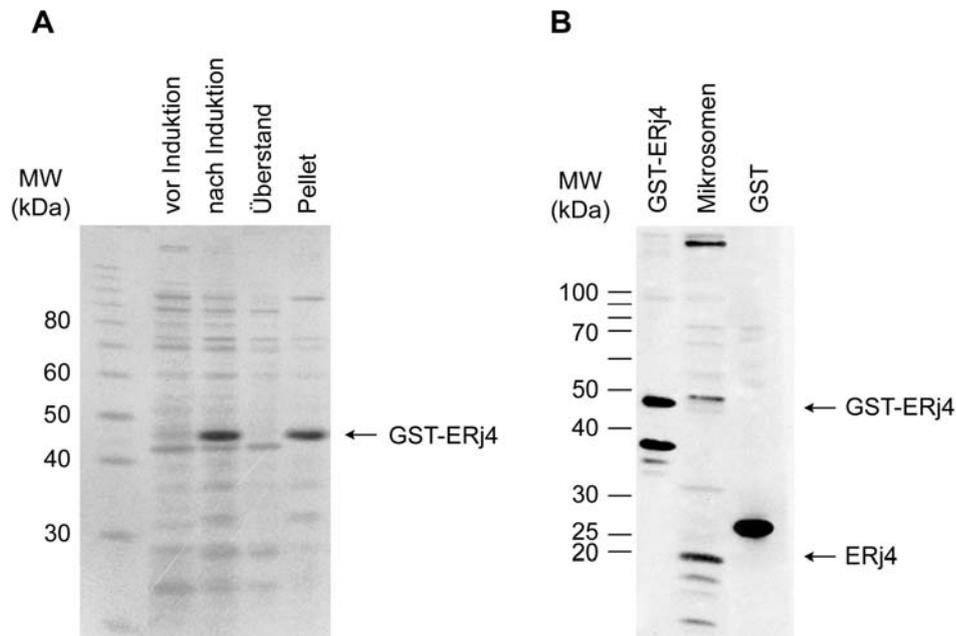


Abb. 2-3: Synthese von GST-ERj4 und Immunologische Detektion mit dem anti-GST-ERj4-Serum

(A) BL21 *E. coli*-Zellen wurden mit dem Plasmid pGEX-4T-1-ERj4 transformiert und bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert (Spur „vor Induktion“). Dann wurde bei einer Temperatur von 30°C für 1 h mit 0,08 M IPTG induziert. Nach Beendigung der Induktion (Spur „nach Induktion“), wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 2°C für 10 min geerntet. Der Aufschluss erfolgte durch Einfrieren und Auftauen der BL21-Zellen, woraufhin unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt wurden (Spur „Pellet“). **(B)** 1 µg GST-ERj4, 5 µl Hundemikrosomen und 1 µg GST wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit anti-GST-ERj4-Serum (1:500). Die Antikörpersignale wurden mit dem ECL-Detektionssystem und Röntgenfilmen visualisiert.

2.7.9.2 Herstellung des anti-MIDA1-Antikörpers

Das Protein MIDA1 wurde in *E. coli* als GST-Fusion synthetisiert und mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose aufgereinigt (vgl. 2.7.7). Der GST-tag wurde vor der Immunisierung mit Thrombin abgespalten (vgl. 2.7.8). Die Konzentration der Proteinlösung, die für die Immunisierung verwendet wurde, betrug ca. 1,4 mg/ml.

Um zu testen, ob sich in dem gewonnenen Antiserum der ersten Blutung Antikörper gegen das Protein MIDA1 befanden, wurde eine immunologische Detektion von MIDA1 aus Hundepankreas-mikrosomen und Mauszellen (Zelllinie PIEF p53-r P21) auf einer PVDF-Membran durchgeführt (siehe Abb. 2-4). Im Vergleich zum Präimmunserum wurden mit dem anti-MIDA1-Serum 3 Proteine in Spur 3 (Mauszellen) bei ca. 40, 70 und 80 kDa detektiert. Das Molekulargewicht von MIDA1 beträgt ca. 72 kDa, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich zumindest bei einem der detektierten

Proteine bei 70 bzw. 80 kDa um MIDA1 handelt. Möglicherweise stellt das 70 kDa Protein eine verkürzte Form dar, was jedoch nicht geklärt werden konnte. Wie zu erwarten, wurden diese Banden in den RM-Spuren (Spuren 2 und 4) nicht detektiert, da es sich bei MIDA1 um ein cytosolisches Protein handelt.

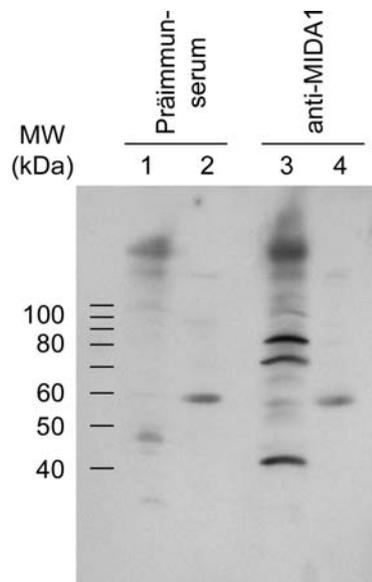


Abb. 2-4: Immunologische Detektion mit dem anti-MIDA1-Serum

Jeweils 5 μ l Hundemikrosomen (Spuren 2 und 4) und 10 μ l Mauszellen [PIEF p53-r P21] (Spuren 1 und 3) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit anti-MIDA1-Serum (1:500, 1. Blutung, Spuren 3 und 4), sowie Präimmunserum (1:500, Spuren 1 und 2) als Vergleich. Die Antikörpersignale wurden mit dem ECL-Detektionssystem und Röntgenfilmen visualisiert.

2.8 Methoden zur Charakterisierung von Proteinen

2.8.1 Bindungsversuche (pull-down-assays)

Der sogenannte „pull-down assay“ dient der *in vitro*-Untersuchung von Protein/Protein-Interaktionen. Dazu kamen in *E. coli* synthetisierte GST-Fusionsproteine zum Einsatz, die an GSH-Sepharose immobilisiert wurden. Die so immobilisierten Proteine wurden mit ihren potentiellen Interaktionspartnern inkubiert, die entweder auch rekombinant in *E. coli* synthetisiert und gereinigt wurden oder in einem Protein-Gemisch vorlagen.

Für die Immobilisierung der GST-Fusionsproteine wurden pro Ansatz 30 μ l GSH-Sepharose verwendet. Die für den gesamten Bindungsversuch benötigte Menge an GSH-

Sepharose wurde im „batch“ dreimal mit PBS/KMT gewaschen und dann so auf die einzelnen 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, dass sich in jedem Gefäß eine Suspension von 30 µl GSH-Sepharose in 500 µl PBS/KMT befand. Danach wurden 6-8 µg des jeweiligen GST-Fusionsproteins zu dieser Suspension zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C für 1 h unter ständiger Durchmischung. Der Überstand wurde durch kurzes Anzentrifugieren in der Tischzentrifuge von der Sepharose getrennt und dann abgenommen. Diese wurde nachfolgend dreimal mit je 1 ml PBS/KMT gewaschen. Nach der Zugabe der Proteine, die auf eine mögliche Interaktion mit dem GST-Fusionsprotein getestet werden sollten, wurde das Volumen mit PBS/KMT auf 300 µl eingestellt. Die Ansätze wurden wieder für 1 h bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert und anschließend dreimal mit je 1 ml PBS/KMT gewaschen, nachdem die Überstände abgenommen wurden. Die Elution erfolgte dann durch Zugabe von 40 µl 1x Laemmliprobenpuffer und Kochen bei 95°C für 5 min. Von den Überständen wurden entweder jeweils 40 µl abgenommen und mit 10 µl 5x Laemmliprobenpuffer versetzt und wie die Elutionen behandelt, oder der gesamte Überstand wurde TCA-gefällt (vgl. 2.6.5). Elutionen und die zugehörigen Durchflüsse wurden schließlich mittels SDS-PAGE oder Immundekoration analysiert.

2.8.2 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Das BIACORE-System

Mit Hilfe des BIACORE-Systems lassen sich Interaktionen zwischen Biomolekülen in Echtzeit darstellen, ohne dass es notwendig ist, bestimmte „Label“ in den Interaktionspartnern einzuführen. Einer der Interaktionspartner (Ligand) wird auf der Oberfläche eines Sensorchips gebunden, während der andere (Analyt) in Lösung über die Oberfläche fließt. Dabei werden Massenänderungen auf der Oberfläche des Sensorchips detektiert, die durch Assoziation bzw. Dissoziation zwischen Ligand und Analyt verursacht werden.

Bei dem physikalischen Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) wird der refraktive Index nahe der Oberfläche des Sensorchips gemessen. Dieser besteht aus einem dünnen Glasplättchen, das mit einem Goldfilm überzogen ist. Das Gold wird für das SPR-Detektionsprinzip benötigt. Sobald Moleküle durch Interaktionen an der Sensoroberfläche gebunden werden, kommt es zu einer

Änderung des refraktiven Index. Dabei kann eine SPR-„Response“ beobachtet werden, die proportional zur gebundenen Masse ist. Die „Response“ pro Masseneinheit (gemessen in *resonance units* RU) ist für die meisten Proteine die gleiche. Um die SPR zu beobachten, wird polarisiertes Licht auf der Glasseite des Sensorchips reflektiert. Das SPR-Phänomen resultiert in einer Reduktion der Intensität des reflektierten Lichts bei einem spezifischen Winkel, der vom refraktiven Index der Lösung nahe der Sensoroberfläche abhängig ist. Die SPR-„Response“ wird gemessen indem man den Winkel bestimmt, bei dem die reflektierte Intensität am niedrigsten ist. Bei einer Änderung des refraktiven Index kommt es auch zu einer Änderung des Winkels, die in einem Sensorgramm aufgezeichnet wird.

Die Analyt- bzw. Ligand-Lösungen werden über ein Flusssystem zu der Sensoroberfläche geleitet. Der Flusskanal bildet an der Sensoroberfläche zwei hintereinander geschaltete Flusszellen (Fc1 und Fc2), in denen verschiedene Liganden an die Chipoberfläche gebunden werden können. Die Flusszelle Fc2 wird in der Regel als Referenzzelle verwendet. In dieser Zelle wird die Referenzsubstanz gebunden, in der Zelle Fc1 der zu untersuchende Ligand. Für die mathematische Auswertung der Sensorgramme wird die Differenz der beiden Flusszellen verwendet (Fc1 – Fc2).

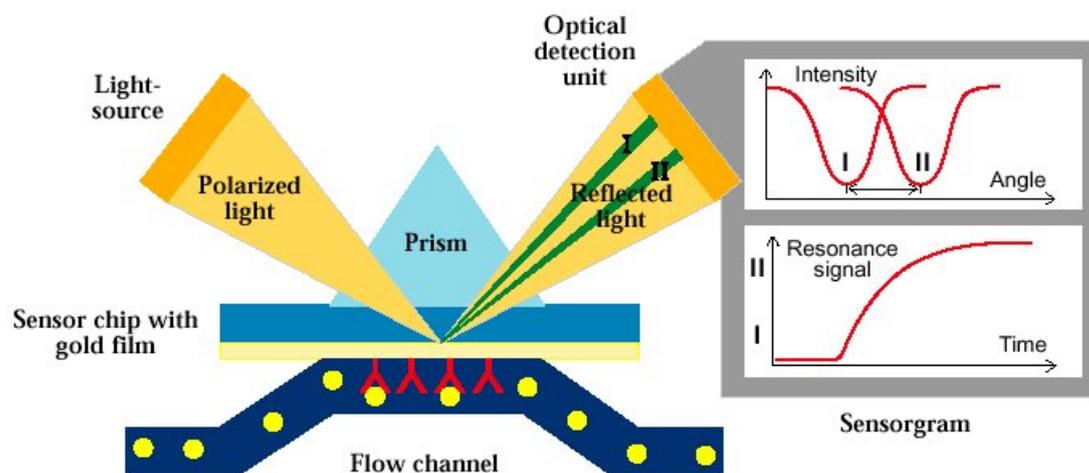


Abb. 2-5 Das Detektionsprinzip des BIACORE-Systems

(aus BIAjournal, No.1-1999) Polarisiertes Licht wird an der Goldoberfläche des Sensorchips totalreflektiert. Oberflächenplasmonresonanz in der Goldoberfläche des Chips führt zur Extinktion des reflektierten Lichts bei einem spezifischen Winkel. Dieser Winkel ist abhängig vom Brechungsindex der Lösung in unmittelbarer Nähe der Goldoberfläche, der sich wiederum mit Bindung von Molekülen aus der Lösung an die auf dem Chip immobilisierten Proteine ändert. Die Änderungen des Brechungsindex werden über die resultierenden Winkeländerungen gemessen und in einem sogenannten Sensorgramm aufgezeichnet.

Die Messungen erfolgten in einem BiaCoreX-Gerät mit Hilfe der BiaCoreX Control Software 2.1.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten CM5-Sensorchips ist auf den Goldfilm eine Dextranschicht aufgebracht, über die sich die Liganden kovalent an den Sensorchip koppeln lassen. Als Kopplungsstrategie wurde das „GST capturing“ verwendet, bei dem GST-Fusionsproteine (Ligand) über einen zuvor kovalent an die Chipoberfläche gekoppelten GST-Antikörper gebunden werden.

Die Kopplung des GST-Antikörpers an die CM5-Chips wurde nach Anweisung des Herstellers mit Hilfe des GST-Kopplungs-Kits durchgeführt:

- Flussrate 5 µl/min, Flusszelle 1 und 2
- 35 µl NHS/EDC (→ Aktivierung des Chips durch Modifizierung der COOH-gruppen der Dextranreste an der Chipoberfläche)
- 35 µl GST-Antikörper in Kopplungspuffer
- 35 µl Ethanolamin (→ Inaktivierung ungekoppelter aktivierter COOH-Gruppen)

Über den gekoppelten Antikörper wurden zwischen 300 und 500 RU GST-Fusionsprotein vorgebunden (Flussrate: 5 µl/min, PBS/KMT-Puffer, Flusszelle 1). In der Referenzzelle (Flusszelle 2) wurde die gleiche Menge an GST immobilisiert.

Die eigentlichen Messungen erfolgten dann bei einer Flussrate von 15 µl/min mit PBS/KMT als Laufpuffer. Dabei wurde mit wenigstens fünf verschiedenen Konzentrationen des Analyts gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mit der Biaevaluation Software 3.1 ausgewertet und somit die Affinitäten der Protein/Protein-Interaktionen bestimmt.

2.8.3 ATPase-Versuch unter „steady state“ Bedingungen

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität von Hsp70-Proteinen erfolgte in einem Versuch, in welchem radioaktiv markiertes ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) verwendet wurde. Die Hydrolyse-Aktivität konnte dabei anhand der freigesetzten Menge an radioaktivem P_i bestimmt werden. Um „steady state“ Bedingungen zu erreichen, enthielt der Reaktionsansatz ATP in großem Überschuss, so dass die Reaktion nicht durch das Substrat limitiert wurde.

Die zu untersuchenden Proteine wurden in Konzentrationen von 0,3 bis 2 µM in einem 20 µl Reaktionsansatz bei 37°C auf einem Thermoblock inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt 40 mM HEPES/KOH (pH7,4), 25mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 , 500 µM ATP sowie 0,1

μCi [γ - ^{32}P]ATP. Die ATP-Lösung wurde dabei als letztes zugegeben, wodurch die Reaktion gestartet wurde (Zugabe von 1 μl einer Lösung aus 10 mM ATP und 10 μCi [γ - ^{32}P]ATP). Nach 3, 5, 10, 30 und 60 min wurde jeweils 3 μl Probe entnommen und zu einer Vorlage von 3 μl einer 60 mM EDTA-Lösung pipettiert, um die Reaktion zu stoppen. Nach Beendigung der Probennahmen wurden jeweils 4 μl der Proben auf halbierte Dünnschichtchromatographie-Platten aus Polyethylenimin (PEI)-Cellulose 1,5 cm vom unteren Rand entfernt aufgetropft. Der Abstand zwischen den einzelnen Auftragspunkten betrug ebenfalls 1,5 cm. Die Platten wurden anschließend in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert, bis die Lauffront 1 cm vom oberen Rand entfernt war. Die Laufstrecke betrug dabei etwa 7,5 cm. Dann wurden die Platten getrocknet und in Frischhaltefolie eingepackt. Schließlich wurde für 1,5 - 2 h eine Phosphorscreenplatte aufgelegt.

Nach dem Scannen der Phosphorscreenplatte mit einem Phosphoimager (Molecular Dynamics) wurden die Banden des verbliebenen radioaktiv markierten ATP sowie des freigesetzten P_i mit der ImageQuant-Software (Version 3.3) quantifiziert. Mit den erhaltenen Werten konnte dann die Menge an hydrolysiertem ATP [μM] wie folgt berechnet werden:

$$\text{hydrolysiertes ATP } (\mu\text{M}) = ([\gamma^{32}\text{P}]\text{P}_i / ([\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP} + [\gamma^{32}\text{P}]\text{P}_i)) * 500 \mu\text{M}$$

2.8.4 Nukleotidaustausch-Versuch

Mit dieser Methode war es möglich den Nukleotidaustausch bei Hsp70-Proteinen zu beobachten. Dazu wurde ein Hsp70 mit radioaktiv markiertem ATP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) vorbeladen und anschließend die Menge an noch gebundenem ATP bzw. ADP nach verschiedenen Zeiten bestimmt.

Die Vorbeladung erfolgte durch eine 20 minütige Inkubation des zu untersuchenden Hsp70-Proteins mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bei Raumtemperatur. Hierzu wurden 5 μM rekombinantes BiP (aus Hamster) in einem 40 μl Ansatz mit 100 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oder 2,5 μM Grp170 (aus Hundepankreas isoliert) in einem 20 μl Ansatz mit 50 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Des weiteren enthielten diese Ansätze 85 mM Hepes/KOH (pH 7,4) sowie 1,5 mM MgCl_2 . Nach dieser Inkubation wurde ungebundenes ATP entfernt, indem der Reaktionsansatz durch ein G50 MicroSpin- Säulchen zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde das ATP-beladene Hsp70-Protein auf verschiedene 50 μl Reaktionsansätze aufgeteilt, welche unmarkiertes ATP enthielten, so dass bei einem Nukleotidaustausch das vorgebundene

radioaktive ATP durch nichtradioaktives ATP ersetzt wurde. Die Reaktionsansätze wurden bei 16°C inkubiert und enthielten neben 100 µM ATP noch 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 40 mM Hepes/KOH (pH 7,4) sowie unterschiedliche Mengen an Proteinen, deren Effekt auf den Nukleotidaustausch untersucht werden sollte. Nach 0, 1 und 3 min (oder 0, 3 und 6 min) wurden 15 µl Proben entnommen und sofort durch ein G50 MicroSpin-Säulchen zentrifugiert, um ungebundenes Nukleotid erneut zu entfernen. Nach Beendigung der Probennahme wurden 2 µl von jeder Probe auf vorbereitete Dünnschichtchromatographie-Platten wie unter 2.8.3 beschrieben aufgetropft. Die DC-Platten wurden dann wie beschrieben weiter behandelt. Mit der ImageQuant-Software wurden schließlich die Mengen an gebundenem radioaktivem ATP und ADP quantifiziert.

2.8.5 Untersuchung der Ribosomenbindung von Proteinen

Saccharose-Kissen:	40 mM Hepes/KOH, pH 7,4
	150 mM KAc
	2 mM DTT
	0,5 mM Saccharose
	0,5 mM MgAc ₂
	0,8 U/µl RNasin
	1:1.000 PLAC

Bei diesem Test auf Ribosomenbindung wurden Ribosomen, nachdem sie mit dem zu untersuchenden Protein inkubiert wurden, mittels Ultrazentrifugation durch ein Saccharose-Kissen sedimentiert. Kam es zu einer Assoziation des zu testenden Proteins an die Ribosomen, wurde dieses gemeinsam mit den Ribosomen sedimentiert. Kam es nicht zu einer Assoziation war das Protein nach der Ultrazentrifugation im Überstand zu finden.

Das zu testende Protein wurde zuerst für 60 min einer Ultrazentrifugation bei 100.000 Upm und 2°C im TLA100 Rotor unterworfen. Dies diente dazu, unlösliche Protein-Aggregate zu entfernen, da diese das spätere Versuchsergebnis verfälschen würden. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand für den weiteren Versuch verwendet.

Es wurden 5 µl Ribosomen (in MVP, vgl. 2.7.3) mit 12 µg des zu testenden Proteins für 15 min bei 30°C in einem Thermomixer bei 800 Upm inkubiert. Dieser Ansatz enthielt des weiteren 5 mM MgCl₂, 2,5 mM ATP und wurde mit MV-Puffer auf ein Volumen von 25 µl gebracht. Ein Ansatz ohne Ribosomen diente zur Kontrolle, dass das eingesetzte Protein

nicht von sich aus sedimentiert. Nach der Inkubation wurden die kompletten Ansätze vorsichtig auf 20 µl Saccharose-Kissen in TLA100-Zentrifugenröhrchen geschichtet. Es erfolgte anschließend für 90 min eine Ultrazentrifugation bei 100.000 Upm und 2°C im TLA100-Rotor. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und 30 µl davon einer SDS-PAGE unterworfen. Das Ribosomensediment in den Zentrifugenröhrchen wurde in 15 µl 2x Laemmliprobenpuffer gelöst und ebenfalls per SDS-PAGE analysiert.

2.8.6 *In vitro*-Synthese von Präprolactin

Die *in vitro*-Synthese und radioaktive Markierung von Präprolactin (ppL) wurde im Kaninchen-Retikulozytenlysat des Translations-Kit Typ II (Roche) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Das nukleasebehandelte Lysat besitzt keine endogene mRNA, so dass eine gezielte Synthese einzelner Proteine durch Zugabe der entsprechenden DNA oder mRNA möglich ist.

Die Synthese und radioaktive Markierung von Proteinen erfolgten unter Einsatz von *in vitro*-transkribierter mRNA für ppL (siehe 2.10.5). Zur radioaktiven Markierung wurde [³⁵S]-Methionin (1000 Ci/mmol) eingesetzt. Zusätzlich waren während der Reaktion verschiedene Proteine, deren Einfluss auf die Translation untersucht werden sollte, anwesend.

<u>Reaktionsansatz:</u>	Retikulozyten-Lysat II	20 % (v/v)
(60 µl)	MgAc ₂	1,5 mM
	KAc	100 mM
	AS-Mix ohne Met	8 % (v/v)
	[³⁵ S]-Met	48 µCi
	ppL-Transkript	6 % (v/v)
	Protein XY	X µM

Die Reaktionsansätze wurden bei 30°C inkubiert. Nach 10, 20 und 40 min wurden jeweils 3 µl Probe entnommen und zum Abstoppen der Translationsreaktion zu 20 µl vorgelegtem 2x Lämmliprobenpuffer pipettiert. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und auf einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt.

Zum Nachweis von [³²S]-markierten Proteinen in SDS-Gelen wurden diese nach der Elektrophorese für 15 min in Entfärber-Lösung und für 30 min in Neutralisationslösung

inkubiert. Danach wurden sie auf Filterpapier unter Vakuum getrocknet. Die getrockneten Gele wurden auf Phosphorscreen-Platten exponiert und mit Hilfe des Phosphoimagers analysiert. Eine Quantifizierung der Bandenschwärzung erfolgte mit Hilfe der Software Image-Quant (Version 3.3).

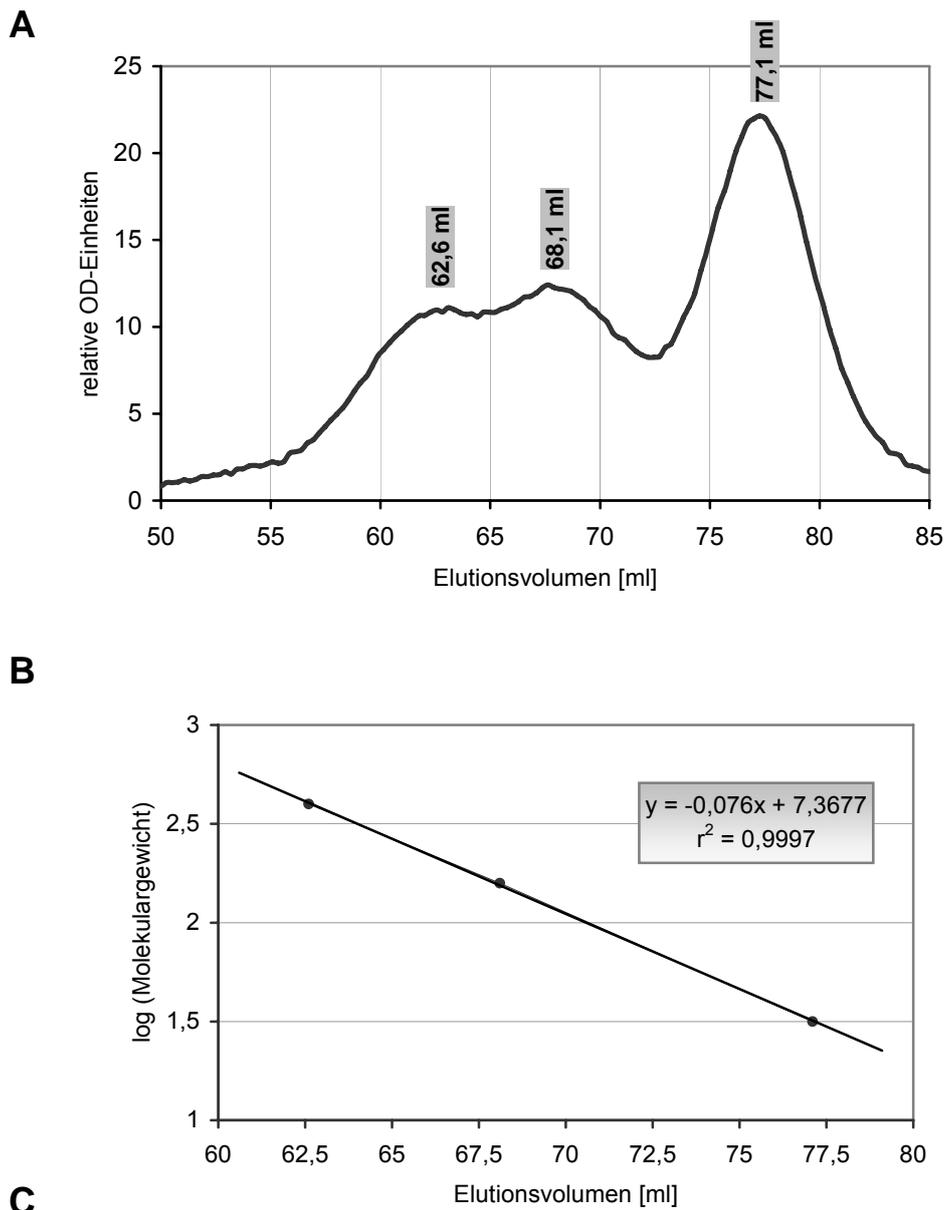
2.9 Chromatographische Methoden

2.9.1 Gelfiltration

Die Methode der Gelfiltration wurde angewendet, um Protein/Protein-Interaktionen zu untersuchen. Dabei können nicht nur Bindungen zwischen verschiedenen Proteinen aufgedeckt werden, sondern es kann auch der Oligomerisierungsgrad eines Homo-Oligomers bestimmt werden.

Die Gelfiltration wurde mit der Äkta Explorer 100-Anlage durchgeführt. Die verwendete Superose 6 HR16/50 Gelfiltrationssäule wurde zunächst mit Hilfe des „molecular weight marker kit“ geeicht. Hierzu wurden jeweils 500 µg dreier Eichproteine gemischt (Apoferitin, Alkoholdehydrogenase und Carboanhydrase), mit CP400-Puffer (mit 30% Glycerin) auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt und über eine 500 µl-Probenschleife auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Dabei wurde die Säule zunächst mit einem Säulenvolumen (100 ml) CP400-Puffer äquilibriert, dann die Proteine aus der Probenschleife aufgetragen und schließlich mit CP400-Puffer eluiert. Der Gesamte Eichlauf erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min.

Nach dem Auftrag der Proteine wurde die Elution in 1,4 ml-Fraktionen gesammelt. Von den Elutionsfraktionen wurden je 200 µl entnommen, die darin enthaltenen Proteine mittels TCA-Fällung pelletiert (vgl. 2.6.5), in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Während des Laufes wurde die optische Dichte des Eluates bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet, so dass das genaue Elutionsvolumen jedes Proteins ermittelt werden konnte. Aus dem ermittelten Elutionsvolumen und der molaren Masse des jeweiligen Proteins wurde eine Eichgerade erstellt (siehe Abb. 2-6), mit deren Hilfe die molare Masse von Proteinkomplexen berechnet werden konnte.



Eichprotein	Elutionsvolumen [ml]	log (MW)	MW [kDa]
Apoferritin	62,6	2,6	443
Alkoholdehydrogenase	68,1	2,2	150
Carboanhydrase	77,1	1,5	29

Abb. 2-6: Eichung der Superose 6 HR16/50 Säule

Es wurden jeweils 500 µg der drei Eichproteine Apoferritin, Alkoholdehydrogenase und Carboanhydrase gemischt, mit CP400-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt und über eine 500 µl-Probenschleife auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen, die zuvor mit CP400-Puffer äquilibriert worden war. Anschließend wurde mit CP400-Puffer eluiert und die optische Dichte des Eluates bei 280 nm aufgezeichnet. Die ermittelten Elutionsvolumina wurden gegen den Logarithmus der molaren Masse der Eichproteine aufgetragen und eine Eichgerade berechnet (B und C).

Um die Komplexbildung zwischen verschiedenen Proteinen zu untersuchen, wurde ein Gemisch der Proteine in CP400-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l gebracht. Das Proteingemisch wurde dann wie für die Eichproteine beschrieben auf die Gelfiltrations-säule aufgetragen und analysiert. Anschließend wurde mit Hilfe der zuvor erstellten Eichgerade die Masse der Proteine oder der vorhandenen Komplexe berechnet, wodurch Rückschlüsse auf die Stöchiometrie der Komplexe gezogen werden konnten.

2.9.2 Chromatographie an ATP-Agarose

Chromatographie-Puffer:

CCP:	20 mM Hepes/KOH, pH 7,5 400 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 2 mM DTT 30% (v/v) Glycerin 0,65% (w/v) CHAPS
CACP:	CCP + 4 mM Mg-ATP
CKACP:	20 mM Hepes/KOH, pH 7,5 2 M KCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 2 mM DTT 10 mM Mg-ATP 0,65% (w/v) CHAPS

Zur Isolierung von Grp170 aus Hundepankreasmikrosomen wurde als erster Reinigungsschritt eine Chromatographie an C₈-ATP-Agarose durchgeführt. Bei dieser Affinitätschromatographie binden ATP-bindende Proteine an das kovalent an die Agarose-Matrix gekoppelte ATP und können anschließend mit einer ATP-Lösung eluiert werden.

Es wurde aus ca. 15 ml Hundepankreas-mikrosomen (vgl. 2.7.1) ein Detergenzextrakt hergestellt (vgl. 2.7.2) und mit 2 M KCl auf eine Salzkonzentration von von 400 mM gebracht. Die Proteinlösung wurde mit CCP auf ein Volumen von 30 ml aufgefüllt und anschließend auf die mit CCP equilibrierte 20 ml ATP-Agarose-Säule aufgetragen. Die Auftragsgeschwindigkeit betrug dabei 5 ml/h. Die Säule wurde dann mit 70 ml CCP und einer Flussgeschwindigkeit von ebenfalls 5 ml/h gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 ml CACP bei einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/h, wobei 2 ml-Fractionen gesammelt wurden. Jeweils 100 µl dieser Fractionen wurden abgenommen und einer TCA-Fällung unterzogen (vgl. 2.6.5), um schließlich mittels SDS-PAGE analysiert zu werden. Die Eluat-Fractionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Das Ergebnis einer solchen Aufreinigung ist in Abb. 2-7 zu sehen. Die eluierten Proteine bei 140 kDa und 80 kDa konnten durch Sequenzierung mittels Edman-Abbau (vgl. 2.6.7) als Grp170 und BiP identifiziert werden. Das Protein unterhalb von BiP bei 70 kDa konnte dagegen noch nicht identifiziert werden.

Um die ATP-Agarose anschließend von auf der Säule verbliebenem Protein zu säubern, wurde eine Hochsalz-Elution mit 50 ml CKACP durchgeführt. Nach dieser Prozedur konnte die Säule für die nächste Aufreinigung verwendet oder in 20% Ethanol gelagert werden.

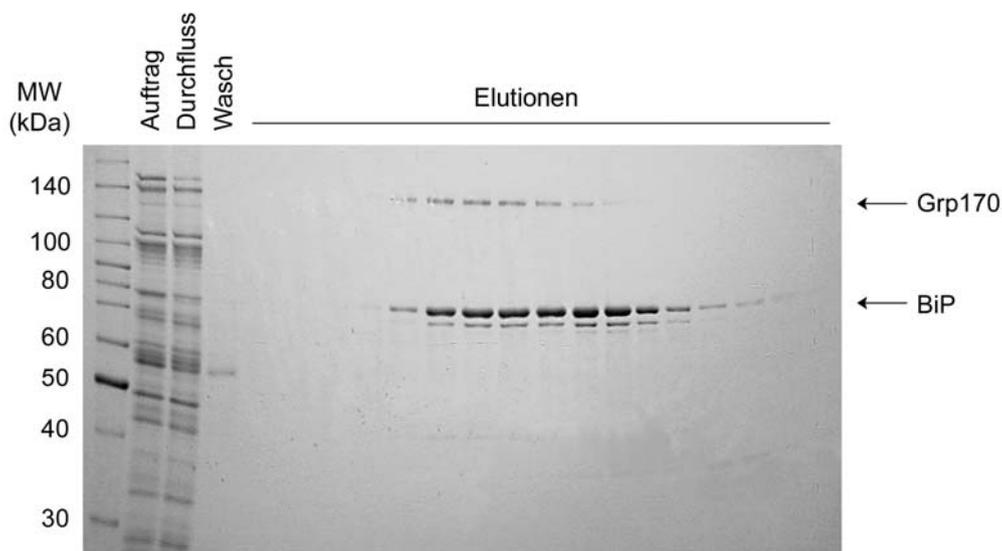


Abb. 2-7: ATP-Agarose-Chromatographie mikrosomaler Proteine

Ein Detergenzextrakt aus 15 ml Mikrosomen wurde auf eine 20 ml ATP-Agarose-Säule aufgetragen. Nach Waschen mit CCP wurde mit 4 mM Mg-ATP in CCP eluiert und das Eluat in 2 ml Fractionen aufgefangen. Von den Fractionen wurden jeweils 100 µl entnommen und nach TCA Fällung elektrophoretisch auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend mittels Coomassi-Färbung sichtbar gemacht.

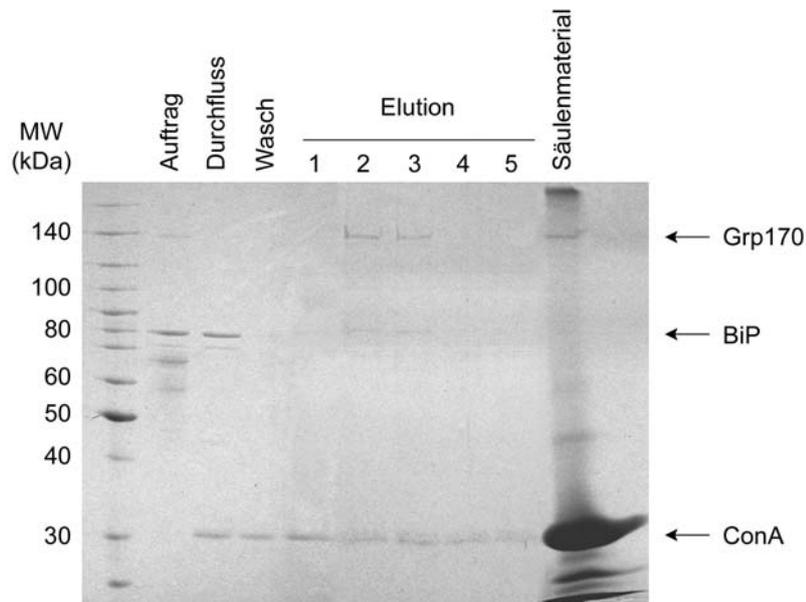


Abb. 2-8: Chromatographie des ATP-Agarose-Eluates an ConA-Sepharose

Grp170 enthaltende ATP-Agarose Eluatfraktionen wurden nach Dialyse auf eine 5 ml ConA-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer 0.2 wurde mit 1 M α -Methylmannosid in Puffer 0.2 eluiert, wobei 1 ml Fraktionen gesammelt wurden. Von den Fraktionen wurden jeweils 100 μ l abgenommen und nach TCA-Fällung auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach erfolgter Elution wurde eine Spatelspitze ConA-Sepharose aus der Säule entnommen, mit Laemmli-Probenpuffer ausgekocht und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Färbelösung.

2.9.4 Chromatographie an Hydroxylapatit

Puffer 0.2: siehe ConA-Chromatographie, 2.9.3

Phosphatpuffer: Puffer 0.2
+ 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,5

Da die Chromatographie an ConA-Sepharose wegen der sehr geringen Ausbeute an Grp170 nicht zufriedenstellend verlief, wurde stattdessen eine Chromatographie an Hydroxylapatit getestet. Bei Hydroxylapatit handelt es sich um hydroxyliertes Calciumphosphat, mit dem man Proteine aufgrund ihrer Ladung und Phosphataffinität trennen kann.

Wie bei der Vorbereitung zur ConA-Chromatographie wurden die Grp170-enhaltenden Eluatfraktionen von der ATP-Agarose-Säule vereinigt und zunächst mittels Dialyse in Puffer 0.2 umgepuffert (vgl. 2.7.5.2). Dann erfolgte der Auftrag auf eine mit Puffer 0.2 equilibrierte 10 ml Hydroxylapatit-Säule mit einer Flussrate von 5ml/h. Das nachfolgende Waschen der Säule erfolgte bei gleicher Flussrate mit 30 ml Puffer 0.2. Die anschließende Elution wurde mit einem linearen Phosphatgradienten von 0-100 mM Phosphat durchgeführt, der durch Mischen von 20 ml Puffer 0.2 und 20 ml Phosphatpuffer erzeugt wurde. Die Flussgeschwindigkeit bei der Elution betrug 3 ml/h und es wurden dabei Fraktionen zu je 1,5 ml gesammelt. Von den gesammelten Fraktionen wurden jeweils 100 µl abgenommen und nach TCA-Fällung (vgl. 2.6.5) mittels SDS-PAGE analysiert.

Abb. 2-9 zeigt eine Aufreinigung eines ATP-Agarose-Eluates über eine Hydroxylapatit-Säule. Wie beim Vergleich von Auftrag und Durchfluss zu erkennen ist, hatten alle im Auftrag vorhandenen Proteine an das Säulenmaterial gebunden. Bei der Elution konnte ein Teil des Grp170 von BiP getrennt werden (erste beiden Elutionsfraktionen). Allerdings wurden zwei Proteine (bei 70 und ca. 44 kDa), deren Identität noch nicht geklärt werden konnte, mit Grp170 co-isoliert. Dennoch wurden die beiden Fraktionen ohne BiP mittels Centricon-Konzentratoren konzentriert und für weitere Experimente verwendet.

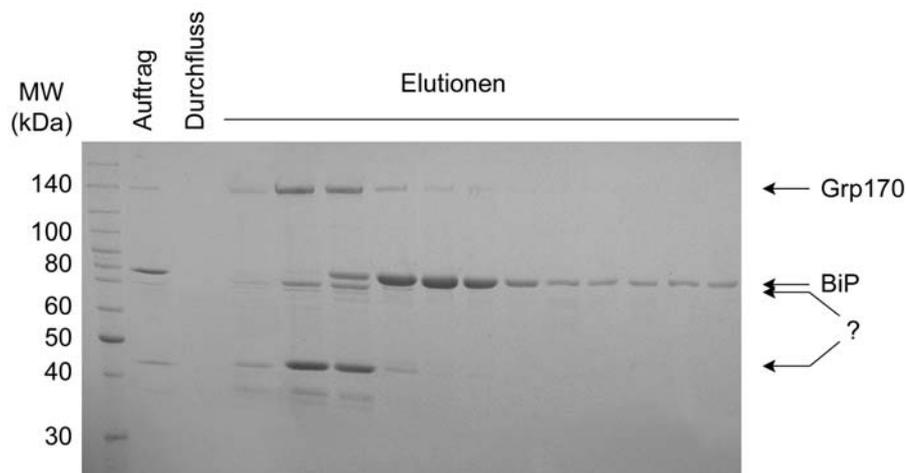


Abb. 2-9: Chromatographie eines ATP-Agarose-Eluates an Hydroxylapatit

Grp170 enthaltende ATP-Agarose-Eluatfraktionen wurden nach Dialyse auf eine 10 ml Hydroxylapatit-Säule aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer 0.2 wurde mit einem linearen Phosphatgradienten (0-100 mM) eluiert, wobei 1,5 ml Fraktionen gesammelt wurden. Von den Fraktionen wurden jeweils 100 µl abgenommen und nach TCA-Fällung auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassi-Färbelösung.

2.9.5 Chromatographie an DE52-Cellulose

Equilibrierungspuffer: 20 mM Hepes/KOH, pH 7,5
 50 mM KCl
 2 mM EDTA
 1,5 mM MgCl₂
 15 % (v/v) Glycerin

Elutionspuffer Puffer 0.2
 siehe 2.9.3, ConA-Chromatographie

Die Chromatographie an DE52-Cellulose wurde als dritter Reinigungsschritt bei der Isolation von Grp170 aus Hundepankreasmikrosomen nach einer ConA- und einer Hydroxylapatit-Säule angewendet.

Grp170-enhaltende Fraktionen aus der Hydroxylapatit-Chromatographie wurden vereinigt und gegen Equilibrierungspuffer dialysiert. Anschließend erfolgte der Auftrag auf eine zuvor equilibrierte DE52-Säule (6 ml Säulenvolumen) mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/h. Nach dem Waschen der Säule mit 20 ml Equilibrierungspuffer, erfolgte die Elution mit einem linearen Salzgradienten von 50-200 mM KCl, der durch Mischen von jeweils 15 ml Equilibrierungspuffer und Elutionspuffer erzeugt wurde. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei ebenfalls 5 ml/h. Bei der Elution wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt, von denen jeweils 100 µl nach TCA-Fällung (vgl. 2.6.5) mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

Beim Vergleich von Auftrag und Durchfluss in Abb. 2-10 ist zu erkennen, dass alle Proteine im Auftrag an die DE52-Cellulose gebunden hatten. Bei der Elution konnte eine weitere Aufreinigung von Grp170 erzielt werden. Die Fraktionen 6-10 enthielten neben Grp170 noch ein unbekanntes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 67 kDa. Diese Fraktionen wurden vereinigt und weiterverwendet.

Der Auftrag der Spaltungseluate auf den Filter erfolgte, ebenso wie die nachfolgenden Wasch- und Elutionsschritte, mittels einer Einwegspritze. Die Spaltprodukte binden dabei an den Filter, wogegen das Thrombin im Durchfluss verbleibt. Die gebundenen Spaltprodukte wurden dann mit 5 ml Puffer A gewaschen. Die anschließende Elution erfolgte mit 40% Puffer B in Puffer 0 (400 mM NaCl) in 1 ml-Fraktionen. Der Filter wurde nochmals mit 5 ml Puffer B gespült und mit 5 ml Puffer 0 äquilibriert. Er konnte dann bei 4°C gelagert und nochmals verwendet werden.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Probenpuffer:	0,25% (v/v) Bromphenolblau
(6-fach)	0,25% (v/v) Xylencyanol
	40% (v/v) Saccharose

TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat
	1 mM EDTA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proben wurden mit einem Fünftel Ihres Volumens an DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Um die DNA-Fragmente anzufärben, wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) nach leichtem Abkühlen der Agaroselösung zugegeben. Die Lösung wurde in horizontale Flachbettkammern gegossen und nach Auspolymerisieren des Geles mit TAE-Puffer überschichtet.

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 200 mA für 30–60 min. Die Gele wurden zur Analyse unter UV-Licht fotografiert. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde eine 1 kb-DNA-Leiter als Längenstandard verwendet.

2.10.2 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen

Puffer 1: 100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂
 30 mM Kaliumacetat
 10 mM CaCl₂
 15% (v/v) Glycerin
 pH-Wert mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt

Puffer 2: 75 mM CaCl₂
 10 mM MOPS (freie Säure)
 10 mM RbCl
 15% (v/v) Glycerin
 pH-Wert mit verdünnter KOH auf 6,5 eingestellt

Die Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Hanahan (1983). 2 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert. Die Kultur wurde in Zentrifugenbecher überführt, für 5 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 4°C und 6.000 Upm (JA-10 Rotor) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 80 ml Puffer 1 resuspendiert und nochmals für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und das Zellpellet in 8 ml Puffer 2 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.10.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Kompetente *E. coli*-Zellen (100 µl Zellsuspension pro Ansatz) wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurde 500 ng Plasmid-DNA hinzugegeben, gut gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort für 1 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C gerollt. Für eine über Nacht-Kultur wurde der gesamte 500 µl-Ansatz in die benötigte Menge LB-Medium + Antibiotikum überführt.

Das Antibiotikum wurde je nach *E. coli*-Stamm ausgewählt: Bei dem Stamm BL21 wurde Ampicillin und Chloramphenicol eingesetzt (Endkonzentrationen 100 µg/ml und 34 µg/ml), bei M15-Zellen wurde Ampicillin und Kanamycin eingesetzt (Endkonzentrationen 100 µg/ml und 25µg/ml).

2.10.4 Plasmid-DNA Midipräparation

Lösung E1: (Zellresuspendierung)	50 mM Tris 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH mit HCl auf 8,0 eingestellt
Lösung E2: (Zelllyse)	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung E3: (Neutralisation)	3,1 M Kaliumacetat pH mit Essigsäure auf 5,5 eingestellt
Lösung E4: (Equilibrierung der Säulen)	600 mM NaCl 100 mM Natriumacetat 0,15% Triton X-100 pH mit Essigsäure auf 5,0 eingestellt
Lösung E5: (Waschen der Säulen)	800 mM NaCl 100 mM Natriumacetat pH mit Essigsäure auf 5,0 eingestellt
Lösung E6: (Elution der DNA)	1,25 M NaCl 100 mM Tris pH mit HCl auf 8,5 eingestellt

Zur Midipräparation von Plasmid-DNA wurde der „Jetstar“-Kit der Firma Genomed verwendet. Die DNA wird dabei nach alkalischer Lyse an eine Anionenaustauscher-Säule gebunden, gewaschen und wieder von der Säule eluiert.

Hierzu wurden 50 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 250 Upm bis zum Erreichen

der stationären Phase kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min im JA-20 Rotor bei 5.000 Upm und 4°C geerntet. Nach Resuspendieren in 4 ml Lösung E1 wurden die Zellen durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde 4 ml Lösung E3 zur Neutralisation hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 10 min bei 20°C und 14.000 Upm im JA-20 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, sterilfiltriert und dann auf eine mit 10 ml Lösung E4 äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml Lösung E5 gewaschen und die gereinigte DNA daraufhin mit 5 ml Lösung E6 eluiert. Die eluierte DNA wurde mit 5 ml kaltem Isopropanol gefällt und für 30 min bei 4°C und 15.000 Upm im JA-20 Rotor zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 2 ml 70%igem Ethanol aufgenommen und in 1,5 ml-Reagiergefäße überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14.000 Upm wurde das Pellet in der Speed-Vac für 10 min getrocknet und in 50-100 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

2.10.5 *In vitro*-Transkription mit SP6 RNA-Polymerase

Salzlösung: (10fach konzentriert)	400 mM Hepes/KOH, pH 7,4 60 mM MgAc ₂ 20 mM Spermidin
Nukleotid-Mix:	je 50 mM ATP, CTP, UTP in 10 mM Hepes/KOH, pH 7,4
Prämix A:	$\frac{1}{10}$ Volumen Salzlösung (10fach) 0,1 mg/ml BSA 10 mM DTT 0,5 mM Nukleotid-Mix 0,1 mM GTP
m ⁷ GpppG-Lösung:	5 U m ⁷ GpppG in 300 µl 10 mM Hepes/KOH, pH 7,9

Zur Transkription mit SP6 RNA-Polymerase wurde das Plasmid pB4 eingesetzt, welches die kodierenden Sequenzen für das Protein Präprolactin (ppL) unter Kontrolle eines SP6-Promotors enthält. Wurden Plasmide mit einer Restriktionsendonuklease linearisiert, die

„stromabwärts“ der kodierenden Sequenz spaltet, erhöhte sich die Ausbeute an Translationsprodukt nach *in vitro*-Transkription und anschließender *in vitro*-Translation. Das Plasmid pB4 mit der kodierenden Sequenz für ppL wurde daher mit EcoRI linearisiert (vgl. 2.10.6). Im folgenden ist das Pipettierschema für den *in vitro*-Transkriptionsansatz dargestellt:

Prämix A	30 µl
Plasmid-DNA	1 µg
m ⁷ GpppG-Lösung	2,5 µl
RNasin (40 U/µl)	1,5 µl
SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl)	1 µl
<hr/>	
H ₂ O bidest	ad 50 µl

Nach Inkubation für 3 h bei 40°C wurde die Polymerasereaktion durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Das Transkript wurde entweder direkt zur *in vitro*-Translation eingesetzt (siehe 2.8.6) oder bei -80°C aufbewahrt.

2.10.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die analytischen Spaltungen der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller für optimale Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die entsprechenden Spaltungen wurden nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt:

analytische Spaltung

DNA	0,5 – 1 µl (ca. 1 µg)
Enzym	0,2 µl (=2 Enzymeinheiten)
Puffer (10x)	1 µl
BSA (1 mg/ml)	1 µl
H ₂ O bidest.	ad 10µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA-Probenpuffer gestoppt und zur Auftrennung der DNA-Fragmente einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

3 Ergebnisse

3.1 Das cytosolische Hsp40-Homolog MIDA1

MIDA1 (murine Id associated 1) wurde entdeckt als ein Protein, das mit dem Transkriptionsfaktor Id1 interagieren kann und dadurch die Regulation des Zellwachstums beeinflusst (Shoji et al. 1995). Der N-Terminus von MIDA1 weist eine ausgeprägte Ähnlichkeit zu dem Hefe-Hsp40 Zuotin auf, weshalb es auch als ZRF (Zuotin related factor) bezeichnet wurde. MIDA1 besitzt genau wie Zuotin ein DnaJ-Motiv, welches für eine Interaktion von Hsp40-Proteinen mit Hsp70-Chaperonen notwendig ist. Aus diesem Grund ist für MIDA1 als weitere Funktion eine Rolle als Cochaperon im Cytosol denkbar, was im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte.

3.1.1 Verteilung von MIDA1 in unterschiedlichen Geweben der Maus

Um das Vorkommen von MIDA1 in unterschiedlichen Geweben zu untersuchen, wurde eine immunologische Detektion mit den aus Kaninchenblut gewonnenen polyklonalen Antikörpern (vgl. 2.7.9.2) durchgeführt. Dabei wurde ein kommerziell erhältlicher Blot (Oncogene) verwendet, auf dem verschiedene Gewebeproben der Maus aufgetrennt waren (Leber, Hirn, Lunge, Niere, Milz, Hoden, Eierstock, Herz und Pankreas). Die Proben wurden gewonnen indem Gewebe-Homogenate hergestellt und davon jeweils 75 µg Protein in SDS-Lysepuffer solubilisiert wurden. Dieser Blot wurde nach seiner Blockierung mit anti-MIDA1-Antikörpern (1:1000) und dann mit einem Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper (1:1000) inkubiert (vgl. 2.6.4).

Abb. 3-1 zeigt das Ergebnis des Western-Blots nachdem die vom Antikörper erkannten Proteine mit dem ECL-System mittels Chemilumineszenz nachgewiesen wurden. Wie beim Test des anti-MIDA-Serums (vgl. 2.7.9.2) wurden auch hier 3 Proteine unterschiedlicher Größe (ca. 35, 60 und 70 kDa) erkannt, die in variablen Mengen in den verschiedenen Gewebeproben vorkommen. Dabei fällt auf, dass beim Hirngewebe weder die 60 kDa noch die 70 kDa Bande auftritt, während bei allen anderen Gewebeproben zumindest die Bande bei 70 kDa sichtbar ist. Das Pankreasgewebe ist die einzige Probe bei der das 60 kDa Protein in größerer Menge als das 70 kDa Protein auftritt, wobei im Lebergewebe etwa gleichgroße Mengen vorhanden sind. Bei den Proben aus Lunge,

Hoden, Eierstock und Herz ist das 70 kDa Protein in großer Menge vorhanden, während das 60 kDa Protein nur im Pankreas-Gewebe in großer Menge vorkommt und bei Lunge, Niere und Herz kaum oder gar nicht zu erkennen ist. Des weiteren ist beim Herzgewebe das besonders große Vorkommen eines Proteins bei ca 35 kDa auffällig, das in allen anderen Proben in sehr viel geringerer Konzentration oder gar nicht vorhanden ist.

Die vorausgesagte Größe von ca. 72 kDa (Swiss-Prot-Database) für MIDA1 stimmt ziemlich genau mit dem größten detektierten Protein überein, so dass vermutet werden kann, dass es sich dabei um MIDA1 handelt. Bei den beiden anderen Banden kann es sich um eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem anderen Protein handeln. Andererseits könnte auch eine (oder zwei) verkürzte Variante(n) von MIDA1 detektiert worden sein.

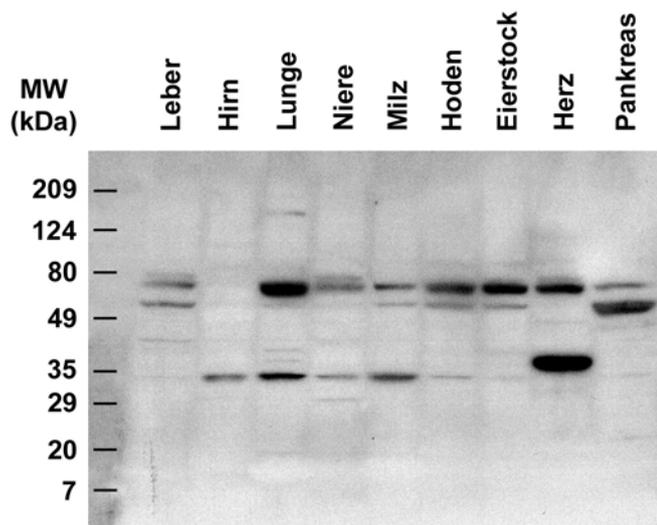


Abb. 3-1: Verteilung von MIDA1 in verschiedenen Geweben der Maus

Ein Blot, auf dem unterschiedliche Gewebe der Maus aufgetrennt waren (Oncogene), wurde mit dem MIDA1-Antikörper inkubiert. Die Gewebeprobe wurden gewonnen indem Gewebe-Homogenate hergestellt und davon jeweils 75 µg Protein in SDS-Lysepuffer solubilisiert wurden. Die Elektrophorese erfolgte in einem 4-20%igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel, woraufhin die Proben auf eine PVDF-Membran transferiert wurden. Das Antikörpersignal wurde über die Peroxidase des sekundären anti-Kaninchen-Antikörpers mittels des ECL-Systems und anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

3.1.2 MIDA1 interagiert mit Hsc70

Ein Charakteristikum der Hsp40-Proteine ist ihre Fähigkeit, mit molekularen Chaperonen der Hsp70-Familie zu interagieren und ihre ATPase-Aktivität zu stimulieren. Diese

Interaktion wird durch die für Hsp40-Proteine typische J-Domäne vermittelt (Silver und Way, 1993). Durch Sequenzvergleiche war bekannt, dass MIDA1 eine J-Domäne besitzt, so dass vermutet wurde, dass MIDA1 mit Hsp70-Vertretern interagieren kann (Shoji et al. 1995).

Um zu testen, ob MIDA1 mit einem Hsp70-Chaperon des Cytosols interagiert, wurde GST-MIDA1 in *E. coli* synthetisiert und dann an GSH-Sepharose immobilisiert (vgl. 2.8.1). Das immobilisierte MIDA1 wurde anschließend mit Retikulozyten-Lysat (Roche) in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP inkubiert. Dies ermöglichte eine Unterscheidung zwischen ATP-abhängiger oder -unabhängiger Bindung von Interaktionspartnern. Nachdem unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt wurde, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Die Elutionsproben und Aliquots der Überstände mit ungebundenem Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran immunologisch analysiert. Dabei wurde als Primärantikörper ein Anti-Hsp70-Antikörper verwendet, welcher die unterschiedlichen Proteine der Hsp70-Familie erkennt. Das Ergebnis der Immundetektion ist in Abb. 3-2 A dargestellt. In Anwesenheit von ATP (Spur 3) wurde ein Protein von 70 kDa gebunden, das in Abwesenheit von ATP (Spur 2) nicht gebunden wurde. Die Bandenintensitäten der zugehörigen Überstände (Spuren 5 und 6) zeigen, dass das Protein in Anwesenheit von ATP (Spur 6) aus dem Retikulozyten-Lysat depletiert wurde. In einem Kontrollexperiment, bei dem GST anstelle von GST-MIDA1 immobilisiert wurde, war keine Bindung des 70 kDa Proteins in Anwesenheit von ATP zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Eine unspezifische Bindung des Proteins an die GSH-Sepharose oder an den GST-Anteil des Fusionsproteins konnte somit ausgeschlossen werden.

Wie bereits erwähnt, erkennt der verwendete Antikörper spezifisch Vertreter der Hsp70-Familie. Da im Cytosol von Säugerzellen nur ein konstitutiv exprimierter Vertreter der Hsp70-Familie, nämlich Hsc70 (heat shock cognate protein 70), bekannt ist, wurde in einem weiteren Versuch die Bindung von diesem Protein an MIDA1 getestet. Bei dem dabei verwendeten Hsc70 aus Rind handelte es sich um ein rekombinant in *E. coli* hergestelltes und gereinigtes Protein, das von der Firma StressGen bezogen wurde. Der Versuch wurde analog zum vorhergehenden Versuch durchgeführt, mit dem Unterschied, dass Hsc70 anstelle von Retikulozyten-Lysat eingesetzt wurde. Die Proteine wurden nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 3-2 B). In Abwesenheit von ATP (Spuren 2 und 3) ist keine Bindung von Hsc70 an GST-MIDA1 zu erkennen. Dagegen wurde in Anwesenheit von ATP ein, wenn auch geringer, Anteil des eingesetzten Hsc70 von MIDA1 gebunden (Spuren 4 und 5). Die Kontrollansätze mit GST (Spuren 7 und 8) zeigen, dass Hsc70 von MIDA1 und nicht vom

GST-Anteil oder unspezifisch von der GSH-Sepharose gebunden wurde. Das Ergebnis dieses Versuches stimmt mit dem des vorangegangenen Versuches, bei dem Retikulozyten-Lysat verwendet wurde, überein. Die Vermutung, dass es sich bei dem gebundenen Hsp70-Protein um Hsc70 handelt, wurde somit bekräftigt.

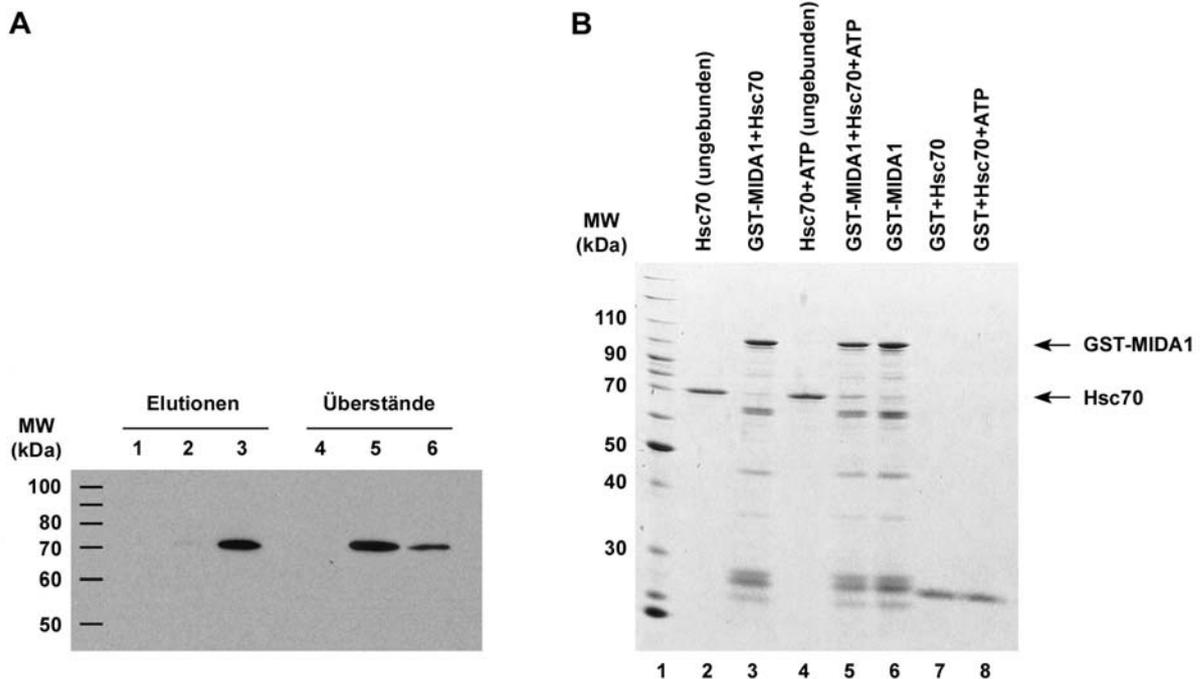


Abb. 3-2: MIDA1 interagiert ATP-abhängig mit Hsc70

(A) Je Ansatz wurden 30 µl GSH-Sepharose mit 300 µl GST-MIDA1-Lysat inkubiert und anschließend mit PBS/KMT gewaschen. Ein Ansatz wurde dann mit 100 µl Retikulozyten-Lysat (Spuren 2 und 5), ein zweiter Ansatz zusätzlich mit 2 mM ATP (Spuren 3 und 6), für 2 h inkubiert. Beide Ansätze wurden mit PBS/KMT auf ein Volumen von 200 µl gebracht. Der dritte Ansatz wurde lediglich mit 200 µl PBS/KMT inkubiert (Spuren 1 und 4). Ungebundenes Material wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS/KMT entfernt. Die Elution erfolgte mit 40 µl Laemmli-Probenpuffer und einer Inkubation für 5 min bei 95°C. Von den Überständen und den Eluaten wurden jeweils 40 µl durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer immunologischen Detektion mit dem anti-Hsp70-Antikörper unterzogen. Die Antikörpersignale wurden über die Peroxidase des sekundären anti-Kaninchen-Antikörpers mit dem ECL-System und anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. **(B)** Je Ansatz wurden 30 µl GSH-Sepharose mit 8 µg GST-MIDA1 oder mit 2 µg GST für 1 h inkubiert und anschließend mit PBS/KMT gewaschen. Die Ansätze wurden dann mit 3 µg Hsc70 (Spuren 2,3 und 7) oder 3 µg Hsc70 und 2 mM ATP (Spuren 4,5 und 8), bzw. ohne Zusatz (Spur 6) für 1 h unter ständiger Durchmischung inkubiert. Dafür wurden die Ansätze mit PBS/KMT auf ein Volumen von 200 µl gebracht. Ungebundenes Material wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS/KMT entfernt. Die Elution erfolgte mit 40 µl 2x Laemmli-Probenpuffer und einer Inkubation für 5 min bei 95°C. Von den Überständen wurden jeweils 50 µl, von den Eluaten 40 µl durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Farbreagenz angefärbt. Spur 1: 10 kDa Proteinmarker

3.1.3 MIDA1 stimuliert die ATP-Hydrolyserate von Hsc70

Hsc70 besitzt eine N-terminale ATPase-Domäne, die für die Hsp70-Familie typisch ist (Hartl, 1996). Die geringe intrinsische ATP-Hydrolyserate dieser Moleküle wird in der Regel durch DnaJ-Cochaperone stimuliert (Cyr *et al.*, 1994, Rassow *et al.*, 1995). Da im vorangegangenen Versuch gezeigt werden konnte, dass das Hsp40-Homolog MIDA1 mit Hsc70 interagiert, sollte weiter untersucht werden, ob bei dieser Interaktion auch die ATP-Hydrolyserate von Hsc70 stimuliert wird.

Hsc70 wurde dazu in gleichem molaren Verhältnis mit MIDA1 sowie 500 μM ATP in Anwesenheit von 0,1 μCi [γ - ^{32}P]ATP inkubiert (vgl. 2.8.3). Das verwendete MIDA1 wurde als GST-Fusion in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.7.7.1) und vor dem Einsatz im ATPase-Versuch mittels Thrombin-Spaltung von seinem GST-tag befreit (vgl. 2.7.8). Aus den bei 37°C inkubierten Reaktionsansätzen wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. ATP und gebildetes P_i wurden anschließend dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden mit einem Phosphorimager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet. Abb. 3-3 zeigt die schwache intrinsische ATPase-Aktivität von Hsc70 sowie eine ca. 2,3 fache Stimulation in Anwesenheit von MIDA1. Dabei steigt die ATP-Hydrolyserate von 0,24 auf 0,56 mol ATP/mol Hsc70*min.

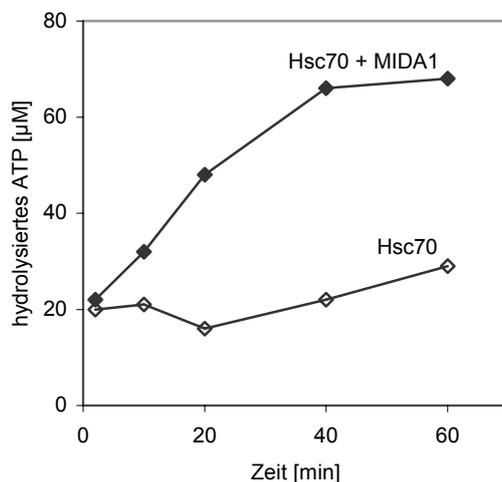


Abb. 3-3: MIDA1 stimuliert die ATPase-Aktivität von Hsc70

Hsc70 (2 μM) wurde in An- und Abwesenheit von MIDA1 (2 μM) in einem HEPES-Puffer mit 500 μM ATP und 0,1 μCi [γ - ^{32}P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 3, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und freigesetztem P_i für ca. 10 min in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Radioaktiv markiertes ATP und P_i wurden durch Auflegen einer Phosphorimager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software quantifiziert.

3.1.4 MIDA1 interagiert mit Ribosomen

Der N-Terminus von MIDA1 (AS 1-433) zeigt eine ausgeprägte Ähnlichkeit zu dem cytosolischen Hefe-Hsp40 Zuotin. Für Zuotin konnte eine Bindung an Ribosomen nachgewiesen werden. Die Interaktion erfolgt dabei über eine geladene Region, die neben Z-DNA auch ribosomale RNA binden kann (Yan et al. 1998). Zuotin bildet zusammen mit dem Hsp70-Homolog Ssz1p am Ribosom einen stabilen Komplex, der als RAC (ribosom associated complex) bezeichnet wird und der möglicherweise mit naszierenden Polypeptidketten bei ihrem Austritt aus dem Ribosom interagiert (Gautschi et al. 2001). Für MIDA1 konnte ebenfalls eine Bindung von Z-DNA nachgewiesen werden, nicht jedoch eine Bindung von ribosomaler RNA (Inoue et al. 1999). Da aufgrund der ausgeprägten Homologie von MIDA1 zu Zuotin eine ähnliche Funktion vermutet werden kann, sollte hier auf eine putative Assoziation von MIDA1 an Ribosomen getestet werden. Für diesen Versuch wurde zunächst eine GST-MIDA1-Lösung mit BSA und Proteaseinhibitor (PLAC) versetzt, um einen proteolytischen Abbau von MIDA1 während des Versuches zu verhindern. Anschließend wurde die Proteinlösung einer Ultrazentrifugation unterzogen, um unlösliche Proteinaggregate, die das Versuchsergebnis verfälschen würden, zu entfernen. Der Überstand nach Zentrifugation wurde dann für das eigentliche Experiment verwendet. GST-MIDA1 wurde mit oder ohne Ribosomen in Anwesenheit von ATP bei einer Temperatur von 30 °C für 15 min inkubiert. Im Anschluß wurden die Ansätze auf ein Saccharose-Kissen in einem Zentrifugenröhrchen geschichtet und einer Ultrazentrifugation unterzogen. Dabei sedimentieren Proteine, die an Ribosomen gebunden haben, gemeinsam mit diesen, während ungebundene Proteine im Überstand verbleiben. Die Ribosomensedimente wurden nach Abnahme der Überstände in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und zusammen mit den Überständen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abb. 3-4). Beim Vergleich der Ribosomensedimente (Spur 5 u. 6) ist zu erkennen, dass ein Teil des eingesetzten GST-MIDA1 zusammen mit den Ribosomen pelletierte. Der Ansatz ohne Ribosomen (Spur 2 u. 4) diente dazu, ein selbstständiges Pelletieren von GST-MIDA1 zu erkennen, was jedoch nicht der Fall war. Aufgrund dieser Befunde kann von einer Bindung des Proteins GST-MIDA1 an Ribosomen ausgegangen werden.

Auf der Grundlage der zuvor nachgewiesenen Bindung von Hsc70 und MIDA1 sollte in einem nächsten Experiment untersucht werden, ob die beiden Proteine in der Lage sind, gemeinsam als Chaperon-Paar mit Ribosomen zu assoziieren.

Hierzu wurde eine GST-MIDA1-Lösung wiederum zunächst zentrifugiert, um ausgefallene Proteinaggregate zu entfernen. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Inkubation mit Hsc70 bei 4°C in Anwesenheit von ATP. Daraufhin wurden Ribosomen und *E. coli*-Gesamtlisat zugesetzt und für 15 min bei 30°C inkubiert. Weitere Ansätze enthielten nur Hsc70 und Ribosomen bzw. keine Ribosomen. Die Ansätze wurden nach der Inkubation auf ein Saccharosekissen geschichtet und wie zuvor beschrieben weiterbehandelt.

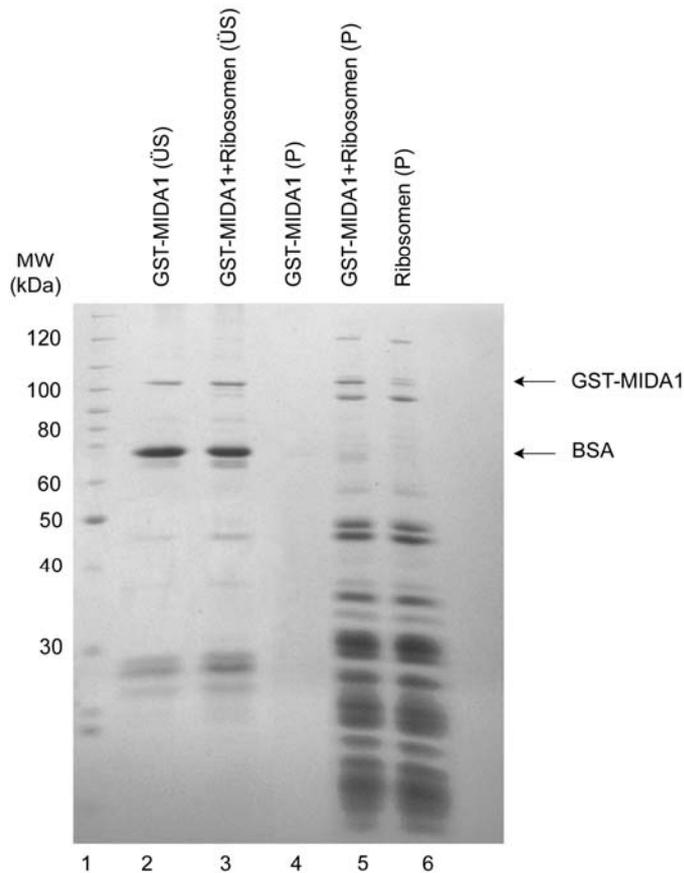


Abb. 3-4: MIDA1 bindet an Ribosomen

GST-MIDA1 (20 µg) wurde nach Zugabe von BSA (6 µg) und PLAC (1:4000) einer Zentrifugation (2°C, 60 min, TLA100-Rotor, 100.000 Upm) unterzogen. Der Überstand wurde auf 2 Ansätze aufgeteilt und mit (Spuren 3 und 5) oder ohne (Spuren 2 und 4) 1,3 µl Ribosomen in Anwesenheit von 2 mM Mg/ATP für 10 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Ansätze wurden dann auf 20 µl eines 0,5 mM Saccharose-Kissen geschichtet und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die Sedimente in 30 µl 2x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und zusammen mit den Überständen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Farbreagenz. Spur 1: 10 kDa Proteinmarker

Abb. 3-5 zeigt das Resultat des Bindungsversuches. Die Ansätze ohne Ribosomen mit GST-MIDA1 +/- Hsc70 (Spur 2, 3, 6 und 7) dienten als Kontrollen, um ein Pelletieren der Proteine in Abwesenheit von Ribosomen zu erkennen. Dies war hier jedoch

3. Ergebnisse

weitestgehend nicht der Fall. Nach der Inkubation von Ribosomen mit GST-MIDA1 und Hsc70 (Spur 4 und 8) ist beim Vergleich mit aufgetragenen Ribosomen (Spur 10) zu erkennen, dass ein Teil beider Proteine gemeinsam mit den Ribosomen sedimentiert war. Hsc70 war aber zum Teil auch im Ribosomensediment vorhanden, wenn es in Abwesenheit von GST-MIDA1 mit Ribosomen inkubiert wurde (Spur 5 und 9). Da bei der Vorinkubation von Hsc70 mit GST-MIDA1 davon ausgegangen werden muss, dass nicht alles Hsc70 an MIDA1 gebunden hatte, konnte bei der anschließenden Inkubation mit Ribosomen auch freies Hsc70 direkt an die Ribosomen binden und mit diesen sedimentieren. Somit konnte eine Ribosomen-Assoziation des Chaperon-Paares Hsc70/MIDA1, bei der Hsc70 über MIDA1 an das Ribosom gebunden wird, nicht eindeutig nachgewiesen werden.

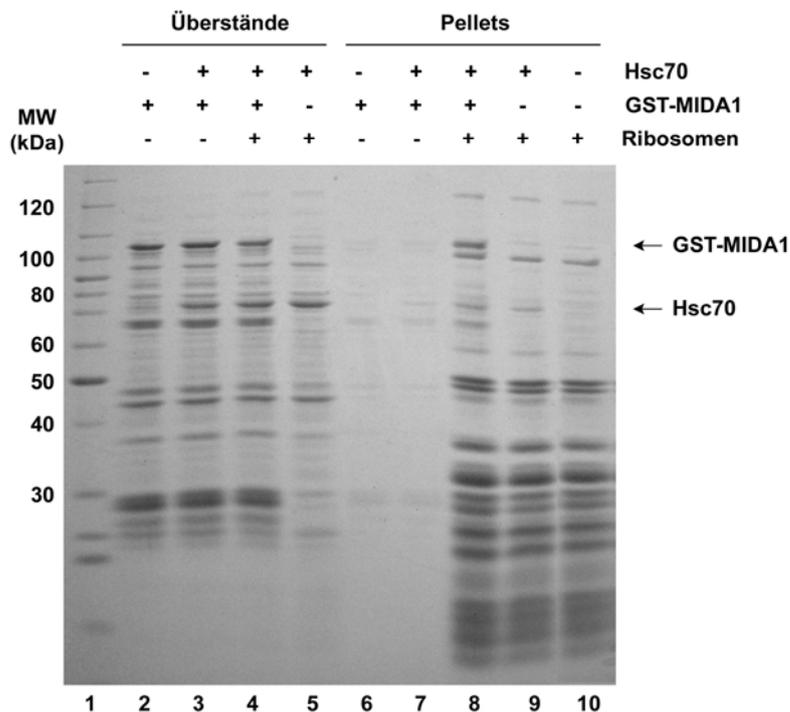


Abb. 3-5: Ribosomenbindung von GST-MIDA1 und Hsc70

GST-MIDA1 (30 µg) wurde zunächst abzentrifugiert (2°C, 60 min, TLA100-Rotor, 100.000 Upm) und der Überstand in 3 Ansätze aufgeteilt. Davon wurden dann 2 Ansätze mit oder ohne 0,8 µg Hsc70 in Anwesenheit von 2 mM ATP für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 1 µl Ribosomen mit GST-MIDA1/Hsc70 oder Hsc70 in Anwesenheit von 2 mM ATP und *E. coli*-Lysat für 15 min bei 30°C inkubiert. Außerdem wurden die gleichen Ansätze ohne Ribosomen verarbeitet. Die Ansätze wurden dann auf 20 µl eines 0,5 mM Saccharose-Kissen geschichtet und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die Sedimente in 30 µl 2x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und zusammen mit den Überständen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Farbreagenz. Spur 1: 10 kDa Proteinmarker

3.1.5 ERj1C-ΔC beeinflusst die Ribosomenbindung von MIDA1

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob eine Ribosomenbindung von ERj1C-ΔC einen Einfluss auf die Ribosomenbindung von MIDA1 hat. Bei ERj1p handelt es sich um ein Hsp40-Homolog, das über eine Transmembrandomäne in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert ist. Dabei ist die N-terminale J-Domäne im ER-Lumen lokalisiert, der C-Terminus dagegen im Cytosol. Für dieses Protein konnte eine Bindung an Ribosomen nachgewiesen werden, die durch ein geladenes Peptid am N-terminalen Bereich des cytosolischen C-Terminus vermittelt wird (Dudek et al. 2002). Würde ein Ribosomen-gebundenes ERj1p eine Bindung von MIDA1 verhindern, könnte man darauf schließen, dass MIDA1 an die gleiche oder eine eng benachbarte Stelle am Ribosom wie ERj1p bindet. Bei dem für den Versuch eingesetzten ERj1p-Fragment ERj1C-ΔC handelt es sich um die C-terminal verkürzte cytosolische Domäne (AS 173-467), die das geladene Peptid besitzt und somit in der Lage ist an Ribosomen zu binden. Es wurden zunächst Ribosomen mit unterschiedlichen Mengen an ERj1C-ΔC in Anwesenheit von ATP für 15 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde für eine weitere Inkubation GST-MIDA1 zugegeben, das zuvor durch Zentrifugation von unlöslichen Proteinaggregaten befreit wurde. Daraufhin wurden die Ansätze auf ein Saccharose-Kissen in einem Zentrifugenröhrchen geschichtet und einer Ultrazentrifugation unterzogen. Die Ribosomensedimente wurden nach Abnahme der Überstände in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und zusammen mit den Überständen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abb. 3-6). Es ist zu erkennen, dass die Menge an gebundenem GST-MIDA1 in den Pellet-Fractionen mit steigender Menge vorgebundenem ERj1C-ΔC abnahm (Spur 8-11). Entsprechend stieg die Menge an ungebundenem GST-MIDA1 in den Überständen mit der Menge an verwendetem ERj1C-ΔC an (Spur 3-6). Aber auch andere Proteine im hochmolekularen Bereich bei ca. 120 kDa und ca. 100 kDa wurden mit steigender Menge an ERj1C-ΔC zunehmend vom Ribosom verdrängt. Die Tatsache, dass bei Anwesenheit von ERj1C-ΔC mehrere Proteine vom Ribosom verdrängt wurden, spricht gegen eine spezifische Konkurrenz von ERj1C-ΔC mit MIDA1. Es besteht die Möglichkeit, dass ERj1C-ΔC unspezifisch an verschiedene Stellen am Ribosom bindet und so verschiedene Proteine verdrängt. Alternativ könnte die Verdrängung eines Proteins durch ERj1C-ΔC eine Destabilisierung anderer Proteine bewirken, welche sich dann ebenfalls vom Ribosom lösen. Allerdings ist aufgrund der großen Menge an Ribosomen-gebundenem ERj1C-ΔC eine unspezifische Bindung an mehrere Stellen des Ribosoms wahrscheinlicher. Somit kann die Frage, ob MIDA1 und ERj1C-ΔC an die

3. Ergebnisse

gleiche oder eine eng benachbarte Stelle des Ribosoms binden, mit diesem Versuch nicht beantwortet werden.

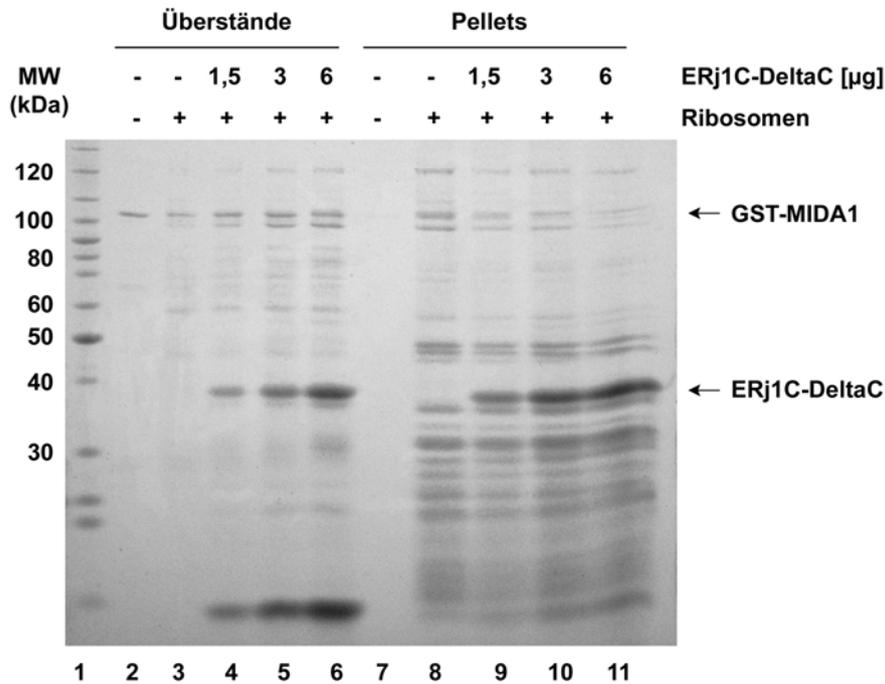


Abb. 3-6: Einfluss von ERj1C- Δ C auf die Ribosomenbindung von MIDA1

Es wurden 4 von 5 Ansätzen mit 5 μ l Ribosomen und 0-6 μ g ERj1C- Δ C in Anwesenheit von 2 mM ATP für 15 min bei 30 °C inkubiert. Ein Ansatz enthielt weder Ribosomen noch ERj1C- Δ C. Anschließend wurden 40 μ g GST-MIDA1 abzentrifugiert (2°C, 60 min, TLA100-Rotor, 100.000 Upm) und der Überstand auf die 5 Ansätze aufgeteilt. Nach einer weiteren Inkubation unter gleichen Bedingungen wurden die Ansätze dann auf 20 μ l eines 0,5 mM Saccharose-Kissen geschichtet und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die Sedimente in 30 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und zusammen mit den Überständen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Farbstoff. Spur 1: 10 kDa Proteinmarker

3.1.6 MIDA1 hemmt die Translation von Präprolactin

Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von MIDA1 mit Ribosomen sollte untersucht werden. Für die cytosolische Domäne von ERj1p konnte eine Bindung an Ribosomen sowie eine Hemmung der Translation *in vitro* nachgewiesen werden (Dudek et al. 2002). Die Ribosomenbindung wird dabei durch ein Segment vermittelt, welches viele geladene Aminosäuren enthält. Obwohl ein ähnliches Segment in der MIDA1-Sequenz nicht gefunden wurde (Daten nicht gezeigt), konnte gezeigt werden, dass MIDA1 ebenfalls in der Lage ist mit Ribosomen zu assoziieren. Es sollte daher weiter untersucht werden, ob MIDA1 auch wie der C-Terminus von ERj1p einen hemmenden Einfluss auf die Translation von Präprolactin (ppL) *in vitro* ausübt.

Der Einfluß von MIDA1 auf die Translation von ppL wurde in einem zellfreien Translationssystem getestet. Bei diesem Versuch wurde neben dem normalen MIDA1 eine C-terminal verkürzte Variante (ZRF1) eingesetzt, bei der die zweite Myb-Domäne fehlt und sich die letzten 9 Aminosäuren der ersten Myb-Domäne von MIDA1 unterscheiden. Beide Proteine wurden in *E. coli* als GST-Fusionen synthetisiert und affinitätschromatographisch gereinigt (vgl. 2.7.7.1). Der GST-tag der Proteine wurde vor ihrer Verwendung mit Thrombin abgespalten (vgl. 2.7.8). Die *in vitro*-Synthese und radioaktive Markierung von ppL erfolgte im Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von Puffer, MIDA1, ZRF1 oder ERj1C-ΔC (Positivkontrolle). Die Synthese wurde bei 30°C durchgeführt, wobei nach 10, 20 und 40 min Aliquots entnommen wurden, um die Menge an gebildetem ppL zu bestimmen. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte die Visualisierung von radioaktiv markiertem ppL durch Phosphoimaging. Die synthetisierte Proteinmenge wurde anschließend quantifiziert. Die graphische Darstellung der Quantifizierung für ppL ist in Abb. 3-7 wiedergegeben, wobei die finale Menge des in Gegenwart von Puffer synthetisierten Proteins als 100% gesetzt wurde. Da die hemmende Wirkung von ERj1C-ΔC auf die Translation bekannt war, wurde es als Positivkontrolle verwendet. Sowohl MIDA1 als auch die ZRF1-Variante üben wie ERj1C-ΔC einen negativen Effekt auf die Synthese von ppL aus. Dieser Effekt ist dabei abhängig von der verwendeten Konzentration der Proteine. Die beobachtete Hemmung fällt jedoch wesentlich geringer aus als diejenige, die durch ERj1C-ΔC verursacht wird. Der Effekt auf die Translation ist dabei bei MIDA1 und der ZRF1-Variante identisch.

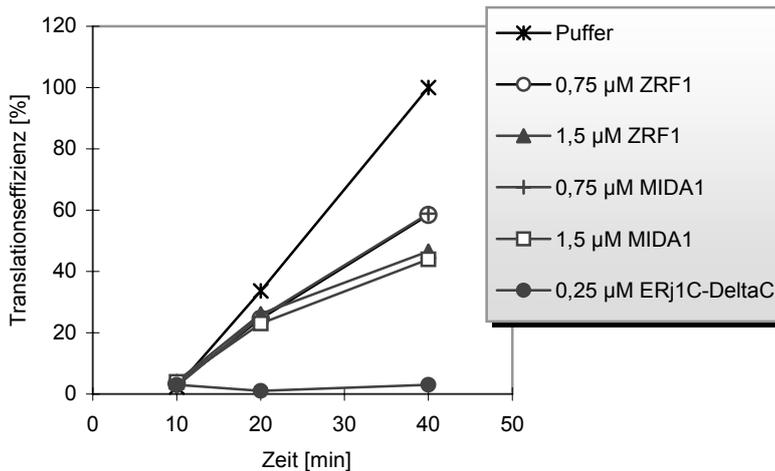


Abb. 3-7: Effekt von MIDA1 auf die Translationseffizienz von ppL im Retikulozyten-Lysat

Unterschiedliche Mengen MIDA1, ZRF1 und ERj1C- Δ C wurden im Translationsmix (Retikulozyten-Lysat II, Roche) zusammen mit ppL-Transkript (vgl. 2.10.5) bei 30°C in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin inkubiert. Nach 10, 20 und 40 min wurden Aliquots entnommen und die Translation durch eine Inkubation für 5 min bei 95°C mit Lämmli-Probenpuffer gestoppt. Nach SDS-PAGE wurden radioaktiv markierte Proteine durch Phosphoimaging sichtbar gemacht, quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Menge der synthetisierten Proteine ist gegen die Translationszeit aufgetragen, wobei die Menge des final in Gegenwart von Puffer synthetisierten Proteins als 100% festgesetzt wurde.

Da MIDA1 die Translation von ppL offenbar weit weniger stark hemmt als ERj1C- Δ C, wurde in einem weiteren Experiment getestet, ob die starke Hemmung von ERj1C- Δ C durch die Anwesenheit von MIDA1 zum Teil aufgehoben werden kann. Dies wäre dann der Fall, wenn MIDA1 in der Lage wäre ERj1C- Δ C vom Ribosom zu verdrängen. Der Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt, wobei MIDA1 in dreifacher molarer Konzentration von ERj1C- Δ C eingesetzt wurde. Die grafische Auswertung des Experiments zeigt Abb. 3-8, wobei die finale Menge des in Gegenwart von Puffer synthetisierten Proteins wiederum als 100% festgelegt wurde. Während die Translation von ppL in Anwesenheit von ERj1C- Δ C praktisch komplett inhibiert wird, führt MIDA1 nur zu einer Hemmung auf 56% der Pufferkontrolle. Sind beide Proteine gleichzeitig anwesend kommt es wie mit ERj1C- Δ C zu einer kompletten Inhibition der Translation. Das zeigt, dass ERj1C- Δ C nicht durch MIDA1 vom Ribosom verdrängt werden kann.

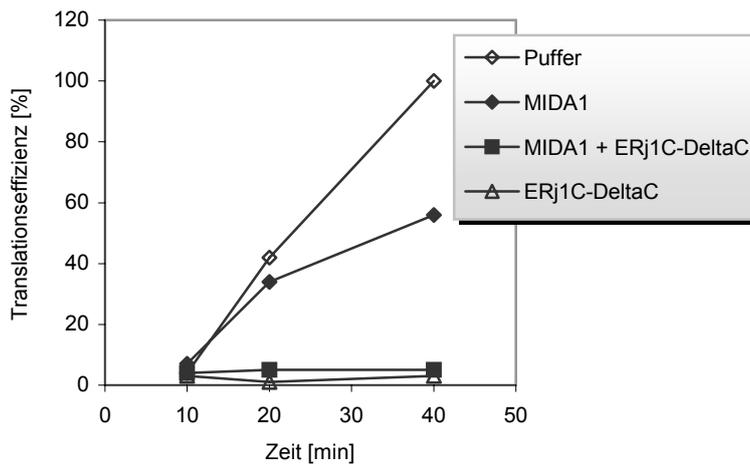


Abb. 3-8: Effekt von MIDA1 auf die Translationshemmung von ERj1C- Δ C

1,5 μ M MIDA1 und 0,5 μ M ERj1C- Δ C wurden zusammen oder getrennt im Translationsmix (Retikulozyten-Lysat II, Roche) zusammen mit ppL-Transkript (vgl. 2.10.5) bei 30°C in Anwesenheit von [35 S]-Methionin inkubiert. Nach 10, 20 und 40 min wurden Aliquots entnommen und die Translation durch eine Inkubation für 5 min bei 95°C mit Lämmli-Probenpuffer gestoppt. Nach SDS-PAGE wurden radioaktiv markierte Proteine durch Phosphoimaging sichtbar gemacht, quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Menge des synthetisierten ppL ist gegen die Translationszeit aufgetragen, wobei die Menge des final in Gegenwart von Puffer synthetisierten Proteins als 100% festgesetzt wurde.

3.2 ERj4p, ein Hsp40-Homolog im ER

Bei dem von Shen *et al.* (2002) beschriebenen ERj4p handelt es sich um das vierte entdeckte DnaJ-Homolog des Endoplasmatischen Retikulums in Säuger-Zellen. ERj4p wurde charakterisiert als ein Typ II DnaJ-Homolog, das über eine N-terminale Signalankersequenz in der Membran des ER lokalisiert ist und eine luminal J-Domäne besitzt. Wie alle anderen Hsp40-Homologen im ER interagiert ERj4p mit BiP und stimuliert dessen ATPase-Aktivität. Bei ER-Stress wird die Produktion von ERj4p erhöht, was darauf hinweist, dass es entweder an der Faltung von sekretorischen Proteinen oder an der Entfaltung von Proteinen vor dem Export aus dem ER beteiligt sein könnte (Shen *et al.*, 2002).

3.2.1 Nachweis von ERj4p in der Membran von rauen Mikrosomen

ERj4p wurde als Membranprotein des ER mit einer luminalen J-Domäne beschrieben, wobei die Insertion in die Membran über seine N-terminale Signalankersequenz geschieht (Shen et al., 2002). Es sollte zunächst getestet werden, ob ERj4p auch in den Membranen der in unserem Labor präparierten Hundepankreasmikrosomen vorhanden ist. Hierzu wurde eine Carbonatextraktion (siehe 2.7.4) von Hundepankreasmikrosomen durchgeführt.

Die Carbonatextraktion stellt eine Methode dar, mit der integrale Membranproteine von löslichen und membranassoziierten Proteinen getrennt werden können. Dazu wurden Hundepankreasmikrosomen durch Zentrifugation pelletiert, mit Na_2CO_3 inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Die Behandlung mit Na_2CO_3 führt zur Auflösung der mikrosomalen Vesikel und zur Zerstörung von Protein/Protein-Interaktionen. Die Lipiddoppelschicht und Lipid/Protein-Interaktionen bleiben dagegen intakt. Bei der Zentrifugation sedimentieren die Membranfragmente mit integrierten Proteinen, während lösliche und von der Membran abgelöste Proteine im Überstand verbleiben. Die Proteine in den Überständen und Pellets wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der für ERj4p gewonnenen Antikörper (siehe 2.7.9.1) wurde ein immunologischer Nachweis durchgeführt. ERj4p konnte dabei bei den aufgetragenen rauen Mikrosomen sowie in der Sedimentfraktion nachgewiesen werden (Abb. 3-9 Spur 1 und 4). In den Überständen (Spur 2 und 3) war ERj4p dagegen nicht nachzuweisen. Das bedeutet, ERj4p ist in den untersuchten rauen Mikrosomen als integrales Membranprotein vorhanden.

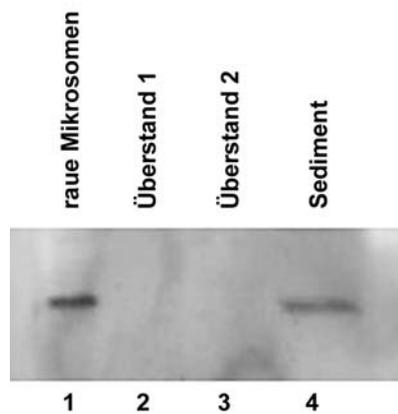


Abb. 3-9: Carbonatextraktion von Hundepankreasmikrosomen und immunologischer Nachweis von ERj4p

5 μ l Mikrosomensuspension wurden mit MVP auf ein Volumen von 100 μ l gebracht und für 60 min mit 68.000 Upm bei 2°C zentrifugiert (Überstand 1). Das Sediment wurde in 200 μ l 100 mM Na₂CO₃ resuspendiert und für 30 min bei 0°C inkubiert. Es erfolgte anschließend eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen (Überstand 2, Sediment). 5 μ l unbehandelte Mikrosomensuspension wurde ebenso zentrifugiert (Spur 1). Die Überstände wurden gefällt (Wessel-Flügge) und dann genau wie das Sediment in 20 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 56°C inkubiert. Die Proben wurden schließlich mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem „semi-dry“-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert, wo eine immunologische Detektion mit dem anti-ERj4p-Antikörper erfolgte. Die Antikörpersignale wurden mit dem ECL-Detektionssystem und Röntgenfilmen visualisiert.

3.2.2 Test auf Funktionalität von GST-ERj4p

Um ERj4p *in vitro* zu charakterisieren, wurde das Protein als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt. Die Klonierung von ERj4p aus Mausgewebe wurde von der Firma MicroMol durchgeführt, wobei die Signalankersequenz des Proteins (AS1-22) entfernt wurde. Dennoch lag GST-ERj4p nach der Synthese in *E. coli* fast vollständig in unlöslicher Form vor und konnte nur in sehr geringen Mengen in löslicher Form gewonnen werden (vgl. Abb. 2-1 C).

3.2.2.1 GST-ERj4p interagiert ATP-abhängig mit BiP

Hsp40-Proteine sind in der Lage unter Anwesenheit von ATP mit molekularen Chaperonen der Hsp70-Familie zu interagieren. Diese Interaktion wird durch die für Hsp40-Proteine typische J-Domäne vermittelt (Silver und Way, 1993). Es sollte daher

zunächst die Funktionalität des rekombinant in *E. coli* synthetisierten GST-ERj4p anhand seiner Bindungseigenschaften mit BiP überprüft werden.

Dazu wurde GST-ERj4p an GSH-Sepharose immobilisiert und mit RM-Extrakt in An- und Abwesenheit von ATP inkubiert. Zusätzlich wurde GST als Negativkontrolle genau wie GST-ERj4p behandelt. Der Extrakt wurde durch Solubilisierung von Hundepankreas-mikrosomen unter Benutzung von Detergenz und anschließender Abtrennung von Membranbestandteilen durch Zentrifugation gewonnen (vgl. 2.7.2). Nachdem unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt wurde, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Die Elutionsproben und Aliquots der Überstände mit ungebundenem Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem anti-BiP-Antikörper immunologisch analysiert (siehe Abb. 3-10 A). Beim Betrachten des ungebundenen Materials (Spur 1 und 4) ist zu erkennen, dass im verwendeten RM-Extrakt BiP in relativ großer Menge vorhanden war. In Anwesenheit von ATP wurde, im Gegensatz zu dem Ansatz ohne ATP, eine geringe Menge BiP von GST-ERj4p gebunden (Spur 2 und 5). Bei den Negativkontrollen (Spur 3 und 6) war keine Bindung festzustellen, so dass eine Interaktion von BiP mit dem GST-tag oder der GSH-Sepharose ausgeschlossen werden konnte.

Um das Ergebnis zu bestätigen wurde ein ähnlicher Bindungsversuch mit rekombinant in *E. coli* synthetisiertem BiP-His₆ anstelle von RM-Extrakt durchgeführt. Hier wurden die Elutionsproben und Aliquots der Überstände mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (siehe Abb. 3-10 B). Auch bei diesem Versuch kam es nur bei Anwesenheit von ATP zu einer Bindung von BiP an ERj4p (Spur 5). Bei der Aufreinigung des verwendeten BiP-His₆ an Ni-NTA-Agarose wurde neben dem vollständigen BiP auch ein N-terminal verkürztes Fragment isoliert (Spur 2 und 4). Dieses Fragment war nicht in der Lage an ERj4p zu binden (Spur 5), was zeigt, dass die N-terminale ATPase-Domäne von BiP an dieser Interaktion beteiligt ist.

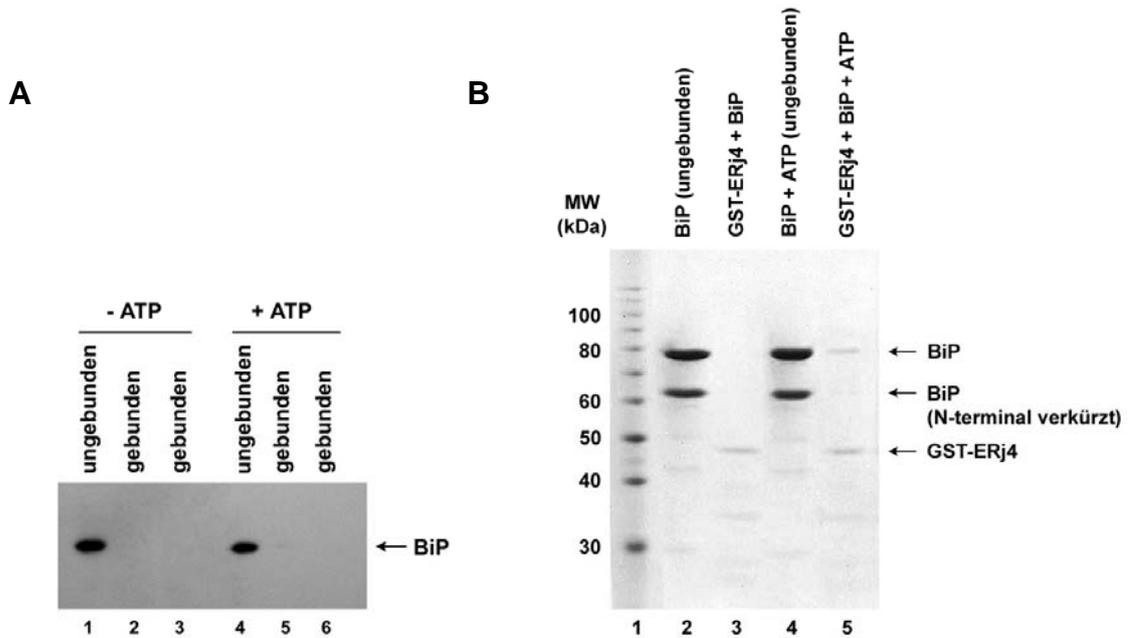


Abb. 3-10: ERj4p interagiert ATP-abhängig mit BiP

(A) Je Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sepharose mit 5 μ g GST-ERj4p (Spur 2 und 5) bzw. 3 μ g GST (Negativkontrolle, Spur 3 und 6) für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS/KMT gewaschen. Die immobilisierten Proteine wurden dann in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP mit 50 μ l RM-Extrakt (vgl. 2.7.2) und 80 μ l CCP0 für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach der Abnahme der Überstände (Spur 1 und 4), wurde ungebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit CCP200 entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Inkubation mit 40 μ l Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C. Von den Überständen und den Elutionen wurden jeweils 40 μ l mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer immunologischen Detektion mit einem anti-BiP-Antikörper unterzogen. Die Antikörpersignale wurden mit dem ECL-Detektionssystem auf Röntgenfilmen visualisiert. **(B)** Je Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sepharose mit 5 μ g GST-ERj4p für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS/KMT gewaschen. Die Ansätze wurden dann mit 8 μ g BiP in An- (Spur 4 und 5) oder Abwesenheit (Spur 2 und 3) von 2 mM ATP für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden dazu mit PBS/KMT auf ein Volumen von 200 μ l gebracht. Nach der Abnahme der Überstände (Spur 2 und 4), wurde ungebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit PBS/KMT entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Inkubation mit 40 μ l Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C. Von den Überständen und den Elutionen wurden jeweils 40 μ l mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Reagenz gefärbt. Spur 1: 10 kDa Proteinmarker

3.2.2.2 GST-ERj4p stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP

Im vorangegangenen Versuch konnte eine ATP-abhängige Interaktion von GST-ERj4p mit dem Chaperon BiP, wie sie von Shen *et al.* (2002) gezeigt wurde, bestätigt werden. Als weiterer Test zur Funktionalität des heterolog synthetisierten GST-ERj4p wurde daher der Einfluss auf die ATPase-Aktivität von BiP untersucht. Eine funktionelle Interaktion eines J-Proteins mit seinem Hsp70-Partner führt zu einer Stimulation von dessen intrinsischer ATPase-Aktivität (Cyr *et al.*, 1994, Rassow *et al.*, 1995).

BiP wurde für diesen Versuch in equimolarem Verhältnis mit GST-ERj4p eingesetzt. Bei dem verwendeten BiP handelte es sich um rekombinant in *E. coli* synthetisiertes His₆-getaggttes Hamster-BiP, das mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt wurde (vgl. 2.7.7.2). Die Proteine wurden zusammen mit 500 μM ATP sowie 0,1 μCi [γ ³²P]ATP bei 37°C inkubiert (vgl. 2.8.3). Aus den Reaktionsansätzen wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. ATP und freigesetztes P_i wurden anschließend dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden schließlich mit einem Phosphorimager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet. Abb. 3-11 zeigt eine ca. 2,5 fache Stimulation der intrinsischen ATPase-Aktivität von BiP in Anwesenheit von GST-ERj4p. Dabei stieg die ATP-Hydrolyserate von 0,48 auf 1,2 mol ATP/mol BiP*min. Diese Ergebnisse zeigen, dass das rekombinant in *E. coli* synthetisierte GST-ERj4p in der Lage ist, funktionell mit BiP zu interagieren.

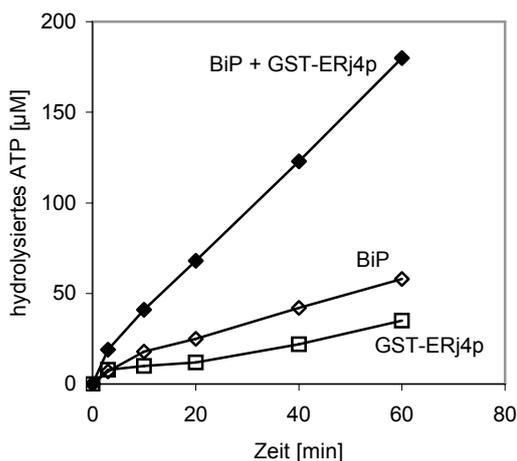


Abb. 3-11: GST-ERj4p stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP

2 μM BiP wurden in An- und Abwesenheit von 2 μM GST-ERj4p in einem HEPES-Puffer mit 500 μM ATP und 0,1 μCi [γ ³²P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 3, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und freigesetztem P_i für ca. 10 min in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Die radioaktiven Adeninnukleotide wurden durch Auflegen einer Phosphorimager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software ausgewertet.

3.2.3 Bestimmung der Affinität der BiP/ERj4p-Bindung

Nachdem die Funktionalität der Interaktion von BiP mit GST-ERj4p in den vorangegangenen Versuchen bestätigt werden konnte, sollte anschließend die Affinität der Bindung bestimmt werden, um sie mit schon bekannten Affinitäten anderer Hsp40-Bindungspartner zu vergleichen.

Die Bindungsaffinität wurde dabei mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie) mit einem BiaCoreX-Gerät bestimmt (vgl. 2.8.2). Das DnaJ-Homolog ERj4p wurde als GST-Fusion (Ligand) in einer Flusszelle (Fc1) auf der Oberfläche eines Sensorchips über einen kovalent gebundenen anti-GST-Antikörper immobilisiert. BiP-His₆ wurde als Analyt in verschiedenen Konzentrationen in einem Flusssystem über die Oberfläche des Sensorchips geleitet. Die Konzentration von BiP-His₆ wurde zuvor über einen BSA-Abgleich densitometrisch bestimmt (vgl. 2.6.6.2).

Über die SPR-Detektion konnte die Bindung des Analyten an den Liganden beobachtet werden. Bei jeder Messung wurde zusätzlich in einer Referenzzelle (Fc2) GST alleine auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Für die mathematische Auswertung wurde die Differenz der Sensorgramme der beiden Flusszellen (Fc1–Fc2) verwendet. Somit konnten eventuell auftretende unspezifische Bindungen an GST berücksichtigt werden. Die Bindungsaffinität des Proteinkomplexes wurden mit Hilfe der BIAevaluation-Software bestimmt.

Abb. 3-12 zeigt die Sensorgramme für verschiedene Analyt-Konzentrationen, die für die Bindung von BiP-His₆ an GST-ERj4p in Anwesenheit von ATP, aufgezeichnet wurden. BiP-His₆ hatte während der Assoziationsphase an das immobilisierte GST-ERj4p gebunden, und dissoziierte wieder ab, sobald es durch den Laufpuffer ersetzt wurde. Aus den aufgezeichneten Sensorgrammen konnten mit Hilfe der BiaEvaluation-Software für die BiP-ERj4p-Interaktion Werte für k_a und k_d sowie ein K_D -Wert (k_d/k_a) berechnet werden. Die Daten wurden mit dem von der Software zur Verfügung gestellten Modell für eine 1:1-Bindung ausgewertet. Es muss darauf hingewiesen werden, dass sich dabei zum Teil hohe Abweichungen von den Idealkurven ergaben.

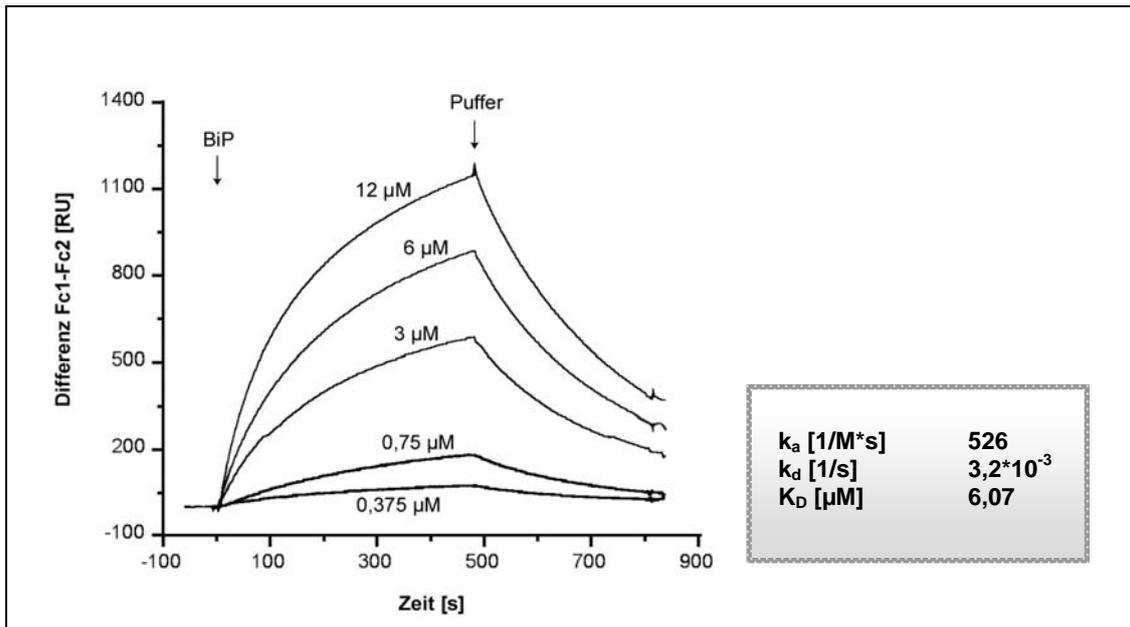


Abb. 3-12: Affinität der Interaktion von GST-ERj4p mit BiP in Gegenwart von ATP

Ein monoklonaler anti-GST-Antikörper wurde nach Anweisung des Herstellers an einen CM5-Chip gekoppelt. Das Fusionsprotein GST-ERj4p wurde über diesen GST-Antikörper auf dem Chip in Flusszelle 1 (Fc1) immobilisiert. In Flusszelle 2 (Fc2) wurde die gleiche Menge GST als Referenz gebunden. Dann wurde BiP-His₆ in den angegebenen Konzentrationen und in Gegenwart von 1 mM ATP mit einer Flussgeschwindigkeit von 15 µl/min über die Chipoberfläche injiziert. Nach jeder Injektion wurde PBS/KMT-Puffer (mit 1 mM ATP) über den Chip geleitet. Die aufgezeichneten Sensorgramme zeigen die Differenz zwischen der Messzelle mit immobilisiertem GST-ERj4p und der Referenzzelle mit immobilisiertem GST.

3.3 Der Nukeotidaustaschfaktor BAP

Wie alle Mitglieder der Hsp70-Familie bindet und hydrolysiert auch BiP ATP, was seine Chaperon-Funktion steuert (Bukau und Horwich 1998). Nachdem gebundenes ATP zu ADP hydrolysiert wurde, findet ein Nukleotidaustausch statt, bei dem ADP freigesetzt und ein neues ATP-Molekül in die Nukleotidbindungsstelle des Hsp70-Proteins gelangt. Durch diesen Schritt kommt es zu einer ATP-induzierten Konformationsänderung, was ein Öffnen der Substratbindungstasche und die Freisetzung eines gebundenen Substrates zur Folge hat. In Bakterien und den Mitochondrien eukaryontischer Zellen regulieren GrpE-Proteine den Austausch der Nukleotide und fördern damit die Faltung von Hsp70-

Substraten (Liberek et al. 1991). Obwohl keine GrpE-Homologen im Hefe- und im Säuger-ER identifiziert werden konnten, gibt es dort ebenfalls Nukleotidaustauschfaktoren. Im Säuger-ER wurde bisher ein Protein mit Nukleotidaustausch-Aktivität identifiziert. Es handelt sich dabei um BAP (BiP associated protein), ein ER-residentes Glykoprotein, welches mit der ATPase-Domäne von BiP interagiert. Chung et al. (2002) konnten zeigen, dass BAP sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit von ERj4p die ATPase-Aktivität von BiP stimuliert, indem der Nukleotidaustausch beschleunigt wird.

3.3.1 BAP stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP

Hier sollte zunächst in ATPase-Versuchen geklärt werden, ob rekombinant in *E. coli* synthetisiertes BAP in der Lage ist, funktionell mit BiP zu interagieren. Eine entsprechende cDNA wurde von der Firma MicroMol isoliert und für die Synthese des Proteins als GST-Fusion wurde daraus das Plasmid pGEX-2T-Sil1p hergestellt.

GST-BAP wurde nach Reinigung an GSH-Sepharose (vgl. 2.7.7.1) für die ATPase-Versuche verwendet. Dazu wurde BiP zusammen mit GST-BAP und den GST-getaggten J-Domänen von ERj1p oder ERj2p sowie 500 μ M ATP in Anwesenheit von 0,1 μ Ci [γ - 32 P]ATP bei 37°C inkubiert (vgl. 2.8.3). Bei BiP handelt es sich um rekombinant in *E. coli* exprimiertes His₆-getaggtetes Hamster-BiP, das mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt wurde (vgl. 2.7.7.2). Alle Proteine wurden für die Versuche in einem equimolaren Verhältnis eingesetzt. Aus den Reaktionsansätzen wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. ATP und freigesetztes P_i wurden anschließend dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden mit einem PhosphorImager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet. Bei Anwesenheit von GST-BAP kam es sowohl in Verbindung mit ERj1J (Abb. 3-13 A) wie auch mit ERj2J (Abb. 3-13 B) zu einer zusätzlichen Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP. Dabei wurde die ATP-Hydrolyserate durch BAP in beiden Fällen zusätzlich um das 2,1 fache gesteigert. Es konnte jedoch keine BAP-induzierte Stimulation von BiP bei Abwesenheit eines J-Proteins beobachtet werden (Abb. 3-13 A), was den Ergebnissen von Chung et al. (2002) widerspricht. Da im Reaktionszyklus von Hsp70-Proteinen die ATP-Hydrolyse den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt darstellt, ist es denkbar, dass sich ein beschleunigter Nukleotidaustausch erst bemerkbar macht, wenn auch die ATP-Hydrolyserate stimuliert wird.

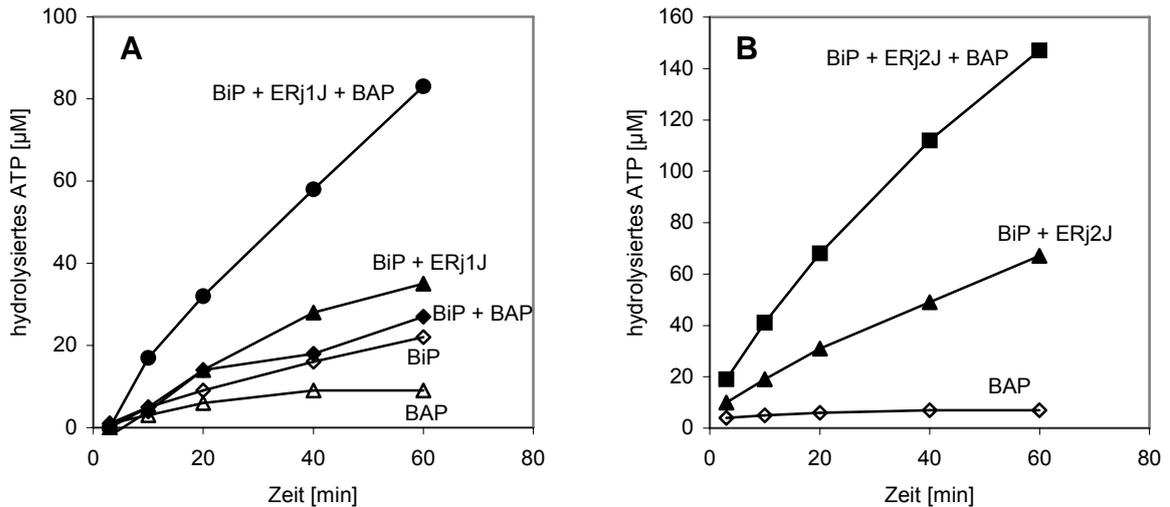


Abb. 3-13: BAP stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP in Anwesenheit einer J-Domäne

Die jeweiligen Proteine bzw. angezeigten Protein-Kombinationen wurden in einer Konzentration von je 2 μM in einem Hepes-Puffer mit 500 μM ATP und 0,1 μCi [γ - ^{32}P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 3, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und P_i für ca. 10 min in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Radioaktiv markiertes ATP und P_i wurden schließlich durch Auflegen einer Phosphormager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software quantifiziert.

3.3.2 BAP beschleunigt den Nukleotidaustausch bei BiP

In dem folgenden Experiment wurde die Nukleotidaustausch-Aktivität von BAP direkt untersucht. Hierbei wurde nicht GST-getaggtetes BAP verwendet, sondern an Ni-NTA-Agarose gereinigtes BAP-His₆, das ebenfalls rekombinant in *E. coli* synthetisiert wurde (vgl. 2.7.7.2). Für diesen Versuch wurde BiP mit radioaktiv markiertem ATP vorbeladen, indem es mit [α - ^{32}P]ATP inkubiert wurde (vgl. 2.8.4). Bei dem hierbei verwendeten BiP handelte es sich wiederum um in *E. coli* synthetisiertes His₆-getaggtetes Hamster-BiP, das ebenfalls mittels Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt wurde (vgl. 2.7.7.2). Nachdem ungebundenes ATP entfernt wurde, folgte eine Inkubation des ATP-beladenen BiP's in An- oder Abwesenheit der J-Domäne von ERj1p oder BAP sowie mit beiden Proteinen. Dabei wurden J-Domäne und BAP in doppeltem molarem Verhältnis zu BiP eingesetzt. Bei dieser Inkubation war unmarkiertes ATP zugegen, so dass gebundenes markiertes Nukleotid gegen nichtmarkiertes ATP ausgetauscht werden konnte. Die J-Domäne von ERj1p wurde in *E. coli* als GST-Fusion synthetisiert und über GSH-Sepharose gereinigt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, die unmittelbar von

3. Ergebnisse

nichtgebundenem Nukleotid befreit wurden. Somit konnte der Austausch des markierten Nukleotids bei BiP verfolgt werden. Das gebundene Nukleotid in den Proben wurde anschließend mittels Dünnschicht-chromatographie auf DC-Platten aufgetrennt und mit einem Phosphorimager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet (siehe Abb. 3-14 A).

Bei Anwesenheit der J-Domäne wurde wie erwartet die ATP-Hydrolyse stimuliert, was an der reduzierten ATP-Menge erkennbar ist. BAP verursachte dagegen keinen solchen Effekt. Jedoch ist bei Anwesenheit von BAP eine Abnahme der ADP-Menge nach 1 und 3 min im Vergleich zur Ausgangsmenge bei 0 min zu erkennen. Dies bedeutet, dass der Austausch von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ gegen unmarkiertes ATP sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit der J-Domäne durch BAP beschleunigt wurde. In Abb. 3-14 B wurde der Nukleotidaustausch grafisch dargestellt, indem die Menge an BiP-gebundenem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$ nach drei Minuten im Verhältnis zur Ausgangsmenge (0 min) betrachtet wurde. Die Funktion von BAP als Nukleotidaustauschfaktor konnte somit bestätigt werden. Die beiden rekombinant hergestellten BAP-Proteine (GST-BAP, BAP-His₆) interagieren also in der Tat in funktioneller Weise mit BiP.

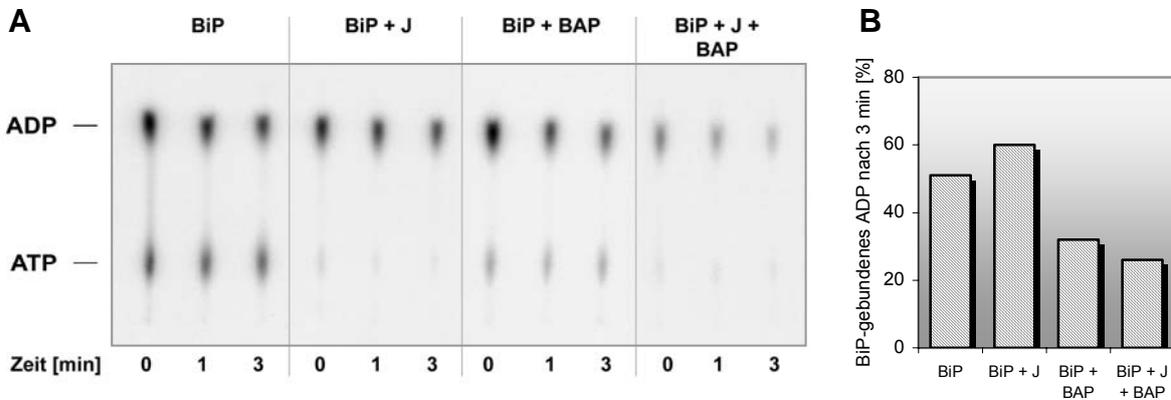


Abb. 3-14: BAP beschleunigt den Nukleotidaustausch bei BiP

(A) BiP (5 μM) wurde zusammen mit 100 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol) für 30 min bei 24°C in 85 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 1,5 mM MgCl_2 inkubiert, um den BiP- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Komplex zu bilden. Der Komplex wurde durch Zentrifugation in G-50 MicroSpin Säulchen von ungebundenem Nukleotid befreit. 1 μM vorbeladenes BiP wurde für 0, 1 und 3 min bei 16°C alleine oder in Kombination mit 2 μM ERj1J und BAP im gleichen Puffer mit zusätzlich KCl (25 mM) und 100 μM unmarkiertem ATP inkubiert. Ungebundenes Nukleotid wurde durch eine erneute Zentrifugation durch ein G-50 MicroSpin Säulchen entfernt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und ADP in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid für 10 min chromatographiert. Die radioaktiven Adeninnukleotide wurden durch Auflegen einer Phosphorimager-Platte für 1 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software ausgewertet. **(B)** Die Menge an verbliebenem BiP-gebundenem ADP nach 3 min ist dargestellt als prozentualer Anteil der Anfangsmenge bei 0 min.

3.4 Grp170, ein Hsp70-verwandtes Protein im ER

Grp170 (170 kDa glucose-regulated protein) ist ein Hsp70-verwandtes Protein des Endoplasmatischen Retikulums, das einige Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen der Hsp70- und Hsp110-Familie aufweist. So besitzt es, wie alle Vertreter der Hsp70-Familie, eine ATPase- und eine peptidbindende-Domäne (Chen et al. 1996). Aufgrund seiner Größe und verschiedener Strukturmerkmale wurde es aber keiner der beiden Proteinfamilien, sondern einer eigenständigen Familie zugeordnet (Park et al. 2003). Im Gegensatz zu Hsp70-Proteinen wurde Grp170 noch sehr wenig erforscht, so dass über seine Rolle im Chaperon-Netzwerk des ER bisher noch sehr wenig bekannt war. Seine Funktion sollte daher näher untersucht werden.

3.4.1 Aufreinigung von Grp170

Da es sich bei Grp170 um ein Glykoprotein handelt konnte es nicht im *E. coli* Expressionssystem synthetisiert werden. Das Protein wurde daher aus Hundepankreas-mikrosomen isoliert, wozu verschiedene chromatographische Methoden getestet und kombiniert wurden. Als erster Reinigungsschritt kam dabei stets eine Chromatographie an ATP-Agarose zum Einsatz (vgl. 2.9.2). Dabei konnten im Wesentlichen BiP und Grp170 isoliert werden (siehe Abb. 2-7). Für einige Versuche war es aber notwendig, Grp170 ohne BiP zu verwenden. Daher wurde versucht, das nach der ATP-Agarosesäule erhaltene Proteingemisch durch eine Chromatographie an ConA-Sepharose von BiP zu befreien (vgl. 2.9.3). Diese Methode stellte sich jedoch als problematisch heraus, da Grp170 vermutlich wegen Bildung unlöslicher Aggregate nur noch in sehr geringer Menge vom Säulenmaterial eluiert werden konnte (siehe Abb. 2-8). Daher wurde stattdessen eine Chromatographie an Hydroxylapatit verwendet (vgl. 2.9.4). Mit dieser Methode konnte ein Teil des eingesetzten Grp170 von BiP getrennt werden, wobei allerdings zwei Proteine (70 kDa und ca. 44 kDa), deren Identität nicht geklärt werden konnte, mit Grp170 co-isoliert wurden (siehe Abb. 2-9). Alternativ wurde eine Aufreinigungsstrategie getestet, bei der nacheinander Chromatographien an ConA-Sepharose, Hydroxylapatit und DE52-Cellulose zum Einsatz kamen (vgl. 2.9.5). Hierbei konnte, im Vergleich zu den anderen Methoden, eine relativ große Menge an Grp170 isoliert werden, wobei ein unbekanntes Protein bei ca. 67 kDa in geringerer Menge co-isoliert wurde (siehe Abb. 2-10).

3.4.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens von BiP und Grp170 mittels Gelfiltration

Bei der Chromatographie an ATP-Agarose zur Isolierung von Grp170 aus solubilisierten Hundepankreas-mikrosomen wurden neben Grp170 auch große Mengen des ATP-bindenden Hsp70-Chaperons BiP aufgereinigt. Dabei kam BiP in allen Grp170-enthaltenden Fraktionen in größerer Menge als Grp170 vor (vgl. Abb. 2-7). Es war bekannt, dass Grp170 genau wie BiP eine ATPase-Domäne besitzt, nicht jedoch ob diese auch in der Lage ist ATP zu binden. Daher war es unklar, ob Grp170 bei seiner Aufreinigung über ATP-Agarose direkt an ATP gebunden hatte, oder ob es zusammen mit BiP, das bekanntermaßen ATP binden kann, co-isoliert wurde, indem es mit dem auf der ATP-Agarose-Säule immobilisierten BiP interagiert. Um zunächst das Bindungsverhalten von BiP und Grp170 zu untersuchen wurden Gelfiltrationen mit den Grp170/BiP-enthaltenden Elutionsfraktionen von einer ATP-Agarose-Säule durchgeführt. Würde Grp170 nicht mit BiP interagieren, könnten die beiden Proteine aufgrund ihres Größenunterschiedes (BiP: 78 kDa, Grp170: 160 kDa) durch eine Gelfiltration voneinander getrennt werden. Das würde auch bedeuten, dass Grp170 in der Lage sein müsste, selbst ATP zu binden. In diesem Fall würde die Gelfiltration eine weitere Möglichkeit darstellen, Grp170 nach der ATP-Agarose-Chromatographie weiter aufzureinigen. Da bekannt ist, dass das Bindungsverhalten von BiP von seinem Nukleotidstatus abhängig ist, wurden Gelfiltrationen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von ATP durchgeführt. Für den Versuch wurde eine Superose 6 HR160/50 Säule verwendet, die zuvor mit Molekulargewichtsstandards geeicht wurde (vgl. 2.9.1). Für den Auftrag auf die Gelfiltrationssäule wurden mehrere Grp170-enthaltende Elutionsfraktionen einer ATP-Agarose-Säule vereinigt und mittels Centricon®-Konzentratoren auf ein Volumen von 500 µl gebracht. Wurde die Gelfiltration in Abwesenheit von ATP durchgeführt, musste das Grp170/BiP-Gemisch mittels Dialyse zuvor von ATP befreit werden, da die Elution von der ATP-Agarose-Säule mit 4 mM ATP durchgeführt wurde. Nach der Elution von der Gelfiltrationssäule wurden Aliquots der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Anhand der Elutionsvolumina konnte das entsprechende Molekulargewicht mit Hilfe der zuvor ermittelten Gleichung der Eichgeraden berechnet werden. In Abwesenheit von ATP (Abb. 3-15 A) eluierte Grp170 in einem breiten Peak, der einem Molekulargewichtsbereich von 160-430 kDa entspricht (Spuren 3-8). Ein Großteil von BiP eluierte unter diesen Bedingungen mit einem Elutionsmaximum bei ca. 80 kDa, was seinem tatsächlichen monomeren Molekulargewicht entspricht. Ein kleiner Anteil von BiP cofraktionierte jedoch mit Grp170,

hauptsächlich in einem Bereich von ca. 240 kDa (Spuren 5 und 6), was der Summe der Molekulargewichte beider Proteine entspricht und auf eine Interaktion hindeutet. Das Vorkommen von Grp170 und BiP bei höheren Molekulargewichten könnte auf die Bildung von Hetero- und Homooligomeren zurückzuführen sein. In Anwesenheit von ATP (Abb. 3-15 B) ist dagegen fast keine Überlappung der Grp170- und BiP-Elutionen vorhanden. Das Elutionsmaximum von BiP (Spur 11) entspricht ca. 100 kDa, was in etwa mit seinem tatsächlichen monomeren Molekulargewicht von 78 kDa übereinstimmt. Das Elutionsmaximum von Grp170 bei ca. 380 kDa (Spur 4) stimmt jedoch nicht mit seinem tatsächlichen Molekulargewicht von 160 kDa überein. Da dies in etwa dem doppelten Molekulargewicht entspricht muss von einer Dimerisierung ausgegangen werden. Zusammenfassend kann man daraus schließen, dass Grp170 in Abwesenheit von ATP mit BiP assoziiert vorliegt, in Anwesenheit von ATP dagegen nicht mit BiP sondern, unter den hier gewählten Bedingungen, mit sich selber interagiert und Dimere bildet. Somit eignet sich die Gelfiltrationschromatographie in Anwesenheit von ATP ebenfalls dazu, Grp170 im Anschluss an eine Chromatographie an ATP-Agarose von BiP zu trennen.

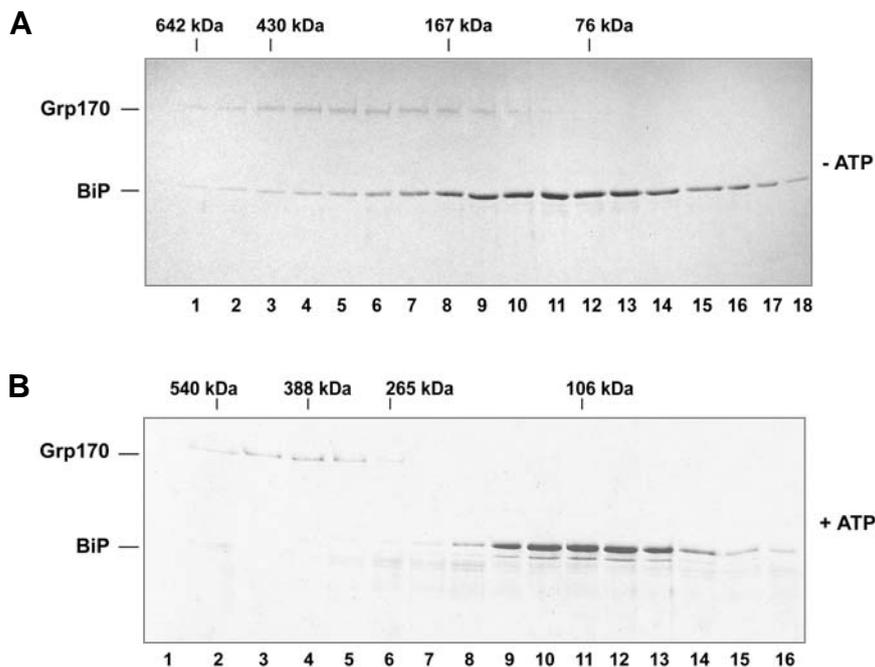


Abb. 3-15: Gelfiltration eines Grp170/BiP-Proteingemisches in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von ATP

Das verwendete Proteingemisch stammt aus einer ATP-Agarose-Chromatographie von solubilisierten Hundepankreas-mikrosomen. Mehrere Grp170- und BiP-enthaltende Elutionsfraktionen der ATP-Agarose-Säule wurden vereinigt, mit Centricon®-Konzentratoren auf ein Volumen von 500 µl gebracht und auf eine geeichte Superose 6-Gelfiltrationssäule (100 ml Säulenvolumen) aufgetragen (A). Enthaltene ATP wurde vor dem Säulenauftrag durch Dialyse aus dem Proteingemisch entfernt (B). Die Gelfiltration wurde an einer Äkta Explorer 100-Anlage mit CCP400 als Laufpuffer durchgeführt. Von den gesammelten Fraktionen wurden jeweils 100 µl TCA gefällt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

3.4.3 Grp170 ist in der Lage ATP zu binden

Die Ergebnisse der Gelfiltrationen deuten darauf hin, dass Grp170 in der Lage ist, ATP zu binden. Um diese Eigenschaft direkt zu untersuchen, wurde auf eine Bindung von zuvor aufgereinigtem Grp170 an ATP-Agarose getestet. Das dazu verwendete Grp170 stammte aus einer Aufreinigung aus Hundepankreas-mikrosomen mittels nacheinander durchgeführter Chromatographien an ConA-Sepharose, Hydroxylapatit und DE52-Cellulose und enthielt kein BiP (siehe Abb. 2-10).

Für diesen Versuch wurde ATP-Agarose mit Grp170 inkubiert und anschließend in ein Mobitec-Säulchen überführt, wo nach dem Waschen der Agarose die Elution mit 4 mM ATP stattfand. Von Auftrag, Durchfluss und den Elutionen wurden Aliquots entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 3-16). Beim Vergleich von Auftrag und Durchfluss wird deutlich, dass nur ein sehr geringer Anteil des eingesetzten Grp170 an die ATP-Agarose gebunden hatte. Das gebundene Grp170 konnte während der Elution von der ATP-Agarose gewaschen werden, so dass von einer funktionellen Bindung ausgegangen werden kann. Die ATPase-Domäne von Grp170 kann also in der Tat ATP binden. Beim Großteil des eingesetzten Grp170 handelt es sich vermutlich um nicht-funktionelles Protein. Der hierbei verwendete Weg der Aufreinigung über Chromatographien an ConA-Sepharose, Hydroxylapatit und DE52-Cellulose stellte sich damit als unbrauchbar heraus, um Grp170 in funktioneller Form im präparativen Maßstab zu isolieren.

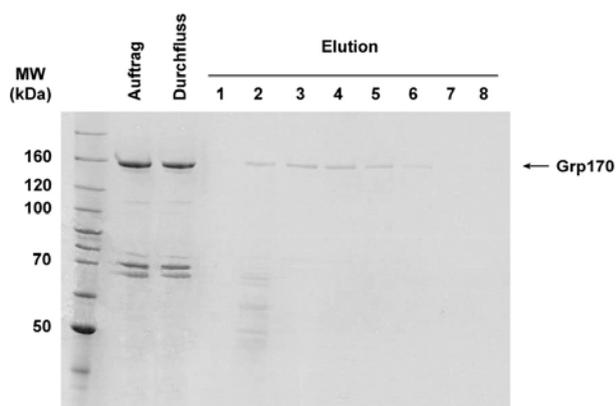


Abb. 3-16: Bindung von Grp170 an ATP-Agarose

600 µl ATP-Agarose wurden nach Equilibrierung mit CCP400 mit Grp170 aus einer Aufreinigung aus Hundemikrosomen mittels ConA-, Hydroxylapatit- und DE52-Cellulose-Chromatographie für 1,5 h bei 4°C inkubiert. Die Agarose wurde anschließend in ein Mobitec-Säulchen überführt und mit 3 ml CCP400 gewaschen. Die Elution erfolgte dann mit 8 x 300 µl CCP400 + 4 mM Mg/ATP. Von Auftrag, Durchfluss und den Elutionen wurden jeweils 30 µl mit 20 µl 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden schließlich mittels SDS-PAGE in einem 12%igen Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Reagenz gefärbt.

3.4.4 Funktionelle Charakterisierung von Grp170 im ATPase-Versuch

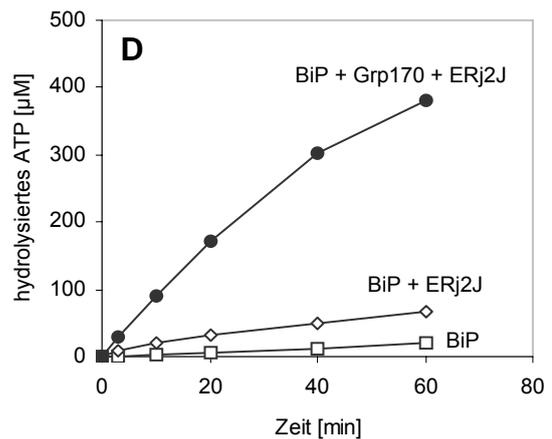
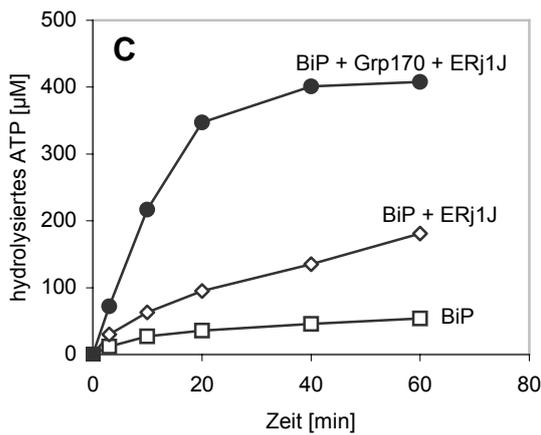
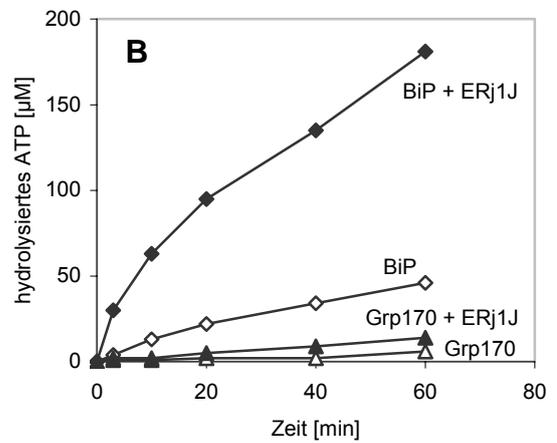
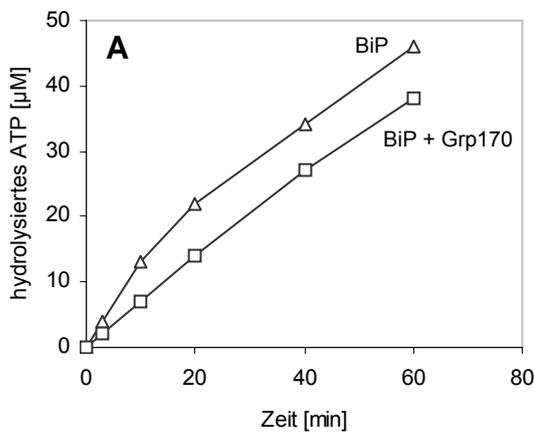
Über das Hefe-Homolog von Grp170, Lhs1p, ist bekannt, dass es spezifisch mit Kar2p (Hefe-Homolog von BiP) interagiert, wobei die beiden Proteine ihre entsprechenden Aktivitäten koordinierend regulieren. Dabei stimuliert Lhs1p den Nukleotidaustausch bei Kar2p, wogegen Kar2p die ATPase von Lhs1p im Gegenzug aktiviert (Steel et al., 2004). Mittels ATPase-Versuchen, bei denen die ATP-Hydrolyserate bestimmt wird, sollte untersucht werden, ob Grp170 einen Effekt auf den ATPase-Zyklus von BiP ausübt, und ob BiP oder eine J-Domäne die ATPase von Grp170 stimulieren kann. Die ATPase-Versuche wurden unter „steady-state“-Bedingungen durchgeführt, d.h. das Substrat ATP war im Überschuss vorhanden und konnte den Reaktionsablauf nicht limitieren. Für die Ansätze mit BiP und Grp170 wurde ein Proteingemisch aus beiden Proteinen verwendet, das aus Hundepankreas-mikrosomen mittels ATP-Agarose-Chromatographie aufgereinigt wurde (vgl. 2.9.2). Das verwendete BiP stammte ebenfalls aus Hundepankreas-mikrosomen und wurde auf die gleiche Weise aufgereinigt. Bei den eingesetzten J-Proteinen (ERj3p und ERj4p) bzw. J-Domänen (ERj1J und ERj2J) handelt es sich um GST-Fusionen, die in *E. coli* synthetisiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt wurden (vgl. 2.7.7.1). Kam Grp170 ohne BiP zum Einsatz, stammte das Protein aus einer Aufreinigung aus Hundepankreas-mikrosomen mittels ATP-Agarose-Chromatographie und weiterer Aufreinigung über ConA-Sepharose (vgl. 2.9.3). Die Ansätze enthielten neben den verwendeten Proteinen 500 μ M ATP sowie 0,1 μ Ci [γ - 32 P]ATP in ATPase-Puffer (vgl. 2.8.3). Aus den bei 37°C inkubierten Reaktionsansätzen wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die Reaktionen mit EDTA gestoppt. ATP sowie nach Hydrolyse freigesetztes P_i wurden anschließend dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden mit einem Phosphorl-mager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet.

Die ATPase von Grp170 zeigte keine oder eine sehr geringe intrinsische Aktivität und ließ sich durch die J-Domäne von ERj1p nur geringfügig stimulieren (Abb. 3-17 B). Im Vergleich dazu wurde die höhere intrinsische ATPase-Aktivität von BiP in Anwesenheit von ERj1J um das vierfache erhöht. Wurde BiP zusammen mit Grp170 inkubiert, war kein Effekt auf die ATP-Hydrolyserate zu erkennen (Abb. 3-17 A), was darauf hindeutet, dass unter dieser Konstellation weder die ATPase von BiP noch diejenige von Grp170 stimuliert wurde.

Es war bekannt, dass alle fünf im ER vorkommenden J-Proteine stimulierend auf die ATP-Hydrolyserate von BiP einwirken (Chevalier et al. 2000, Misselwitz et al. 1999, Bies et al. 2004, Shen et al. 2002, Cunnea et al. 2003). Mit den vier hier verwendeten J-Proteinen

3. Ergebnisse

bzw. J-Domänen konnte dieser Effekt bestätigt werden (Abb. 3-17 C-F). Die Anwesenheit von Grp170 hatte hierbei in allen Fällen zu einem deutlichen zusätzlichen Anstieg der ATP-Hydrolyserate geführt. Bei den beiden J-Domänen ERj1J und ERj2J war dieser Effekt besonders deutlich ausgefallen, bei den J-Proteinen ERj3p und ERj4p etwas weniger deutlich. Es muss angemerkt werden, dass im Falle von ERj1J (Abb. 3-17 C) das eingesetzte ATP während des Versuches vollständig verbraucht wurde und die Hydrolyse-Kurve aus diesem Grund bereits nach 20 min abflachte.



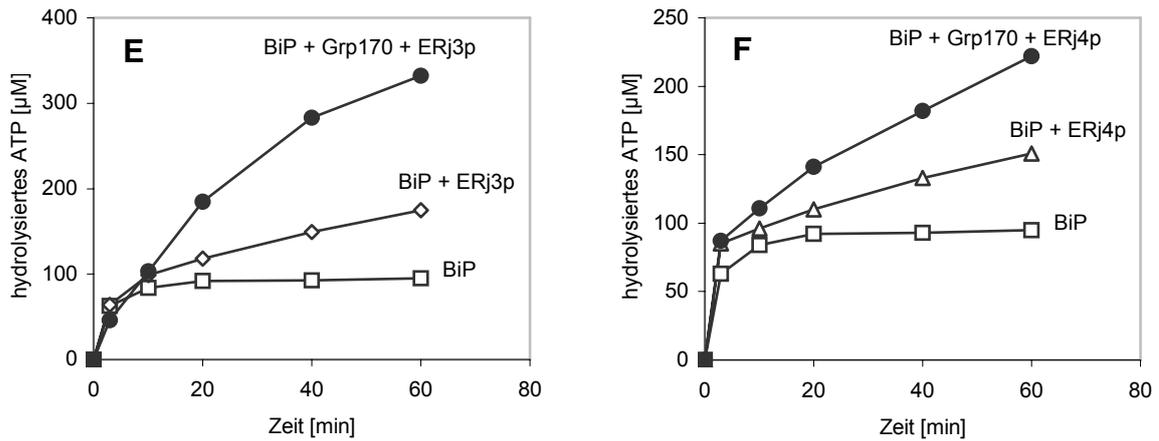


Abb. 3-17: Effekt von Grp170 und J-Proteinen auf die ATPase-Aktivität von BiP

(A) BiP (2 µM) oder ein Proteingemisch aus BiP (2 µM) und Grp170 (0,5 µM) wurde in einem HEPES-Puffer mit 500 µM ATP und 0,1 µCi [γ - 32 P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 3, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und entstandenem P_i in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid für ca. 10 min chromatographiert. Radioaktiv markiertes ATP und P_i wurden durch Auflegen einer Phosphorimager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software quantifiziert. (B) Grp170 (0,3 µM) oder BiP (1 µM) wurden in An- oder Abwesenheit von ERj1J (1 µM) in einem HEPES-Puffer mit 500 µM ATP und 0,1 µCi [γ - 32 P]ATP bei 37°C inkubiert und wie oben beschrieben weiterbehandelt. (C-D) BiP (2 µM) oder ein Proteingemisch aus Grp170 (0,5 µM) und BiP (2 µM) wurde in An- oder Abwesenheit von 2 µM ERj1J bzw. ERj2J wie beschrieben inkubiert und weiterbehandelt. (E-F) 1 µM BiP oder ein Proteingemisch aus 0,5 µM Grp170 und BiP (2 µM) wurde in An- oder Abwesenheit von 1 µM ERj3p bzw. ERj4p wie beschrieben inkubiert und weiterbehandelt.

3.4.5 Grp170 agiert als Nukleotidaustauschfaktor für BiP

Bei der Bestimmung der ATP-Hydrolyserate von BiP in Anwesenheit eines J-Proteins unter „steady state“-Bedingungen kam es bei zusätzlicher Anwesenheit von Grp170 zu einem signifikanten Anstieg der ATPase-Aktivität (vgl. Abb. 3-17 C-F). Jedoch konnte mit diesen Versuchen die Ursache für den beobachteten Effekt nicht geklärt werden. Der Reaktionszyklus von Hsp70-Chaperonen kann an zwei Stellen beschleunigt werden, was sich jeweils mit einer gesteigerten ATP-Hydrolyse in den durchgeführten Versuchen bemerkbar machen würde: zum einen kann die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i selber beschleunigt werden, was bekanntermaßen durch J-Proteine oder Peptidsubstrate geschieht (Cyr et al. 1994, Flynn et al. 1989), zum anderen kann aber auch der

Nukleotidaustausch stimuliert werden. Als Nukleotidaustauschfaktor, der die ATPase-Aktivität von BiP reguliert, wurde bereits das Protein BAP (BiP-associated protein) beschrieben (Chung et al., 2002). Um diese Möglichkeiten der Beeinflussung des ATPase-Zyklus von BiP zu untersuchen, wurden Nukleotidaustausch-Versuche mit BiP und Grp170 durchgeführt. Damit war es möglich die ATP-Hydrolyse und den Nukleotidaustausch von beiden Proteinen getrennt zu betrachten.

Zunächst wurde die potentielle Nukleotidaustausch-Aktivität von Grp170 analysiert. Für diesen Versuche wurde BiP vorab mit [α - 32 P]ATP inkubiert und so mit radioaktiv markiertem ATP vorbeladen. Bei dem hierbei verwendeten BiP handelte es sich um rekombinant in *E. coli* synthetisiertes His₆-getaggttes Hamster-BiP, das mittels Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt wurde (vgl. 2.7.7.2). Nachdem ungebundenes ATP entfernt wurde, folgte eine Inkubation des ATP-beladenen BiP's in An- oder Abwesenheit der J-Domäne von ERj1p oder Grp170 sowie mit beiden Proteinen. Zusätzlich wurde BiP zum Vergleich und als Positivkontrolle mit der J-Domäne und dem Nukleotidaustauschfaktor BAP inkubiert. Dabei wurden J-Domäne und BAP in doppeltem molaren Verhältnis zu BiP eingesetzt, wogegen das Verhältnis Grp170:BiP nur 1:3 betrug. Bei dieser Inkubation war nichtmarkiertes ATP zugegen, so dass gebundenes markiertes Nukleotid gegen nichtmarkiertes ATP ausgetauscht werden konnte. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, die unmittelbar von nichtgebundenem Nukleotid befreit wurden. Somit konnten der Austausch des markierten Nukleotids und die ATP-Hydrolyse bei einem einzelnen Protein verfolgt werden. Das gebundene Nukleotid in den Proben wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie auf DC-Platten aufgetrennt und mit einem Phosphorimager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet (siehe Abb. 3-18 A und B). Das bei dem Versuch verwendete BAP wurde in *E. coli* als His₆-Fusion synthetisiert und über Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt, die J-Domäne von ERj1p als GST-Fusion über GSH-Sepharose (vgl. 2.7.7.1). Grp170 stammte aus Hundepankreasmikrosomen und wurde mittels Chromatographie an ATP-Agarose und ConA-Sepharose gereinigt (vgl. 2.9.3).

Wie erwartet kam es zu einer Stimulation der Umwandlung von BiP:ATP zu BiP:ADP durch die J-Domäne (Abb. 3-18 A). Dagegen verursachte Grp170 keinen solchen Effekt. Jedoch wurde der Austausch von [α - 32 P]ADP gegen unmarkiertes ATP sowohl in Anwesenheit wie auch Abwesenheit der J-Domäne durch Grp170 beschleunigt. Dieser Effekt ist ebenfalls mit BAP im Kontrollexperiment zu erkennen (Abb 3-18 B), wobei Grp170 aber sehr viel effizienter zu sein scheint, wenn man das verwendete molare Verhältnis berücksichtigt (Grp170:BAP ca. 1:6). In Abb. 3-18 C wurde der Nukleotidaustausch dargestellt, indem die Menge an BiP-gebundenem [α - 32 P]ADP nach einer Minute im Verhältnis zur Ausgangsmenge (0 Minuten) betrachtet wurde. Grp170 ist also in

3. Ergebnisse

der Tat ein Nukleotidaustauschfaktor für BiP, was die zusätzliche Stimulation der durch die J-Proteine bereits stimulierten ATPase-Aktivität von BiP in den ATPase-Versuchen (Abb. 3-17 C-D) erklärt.

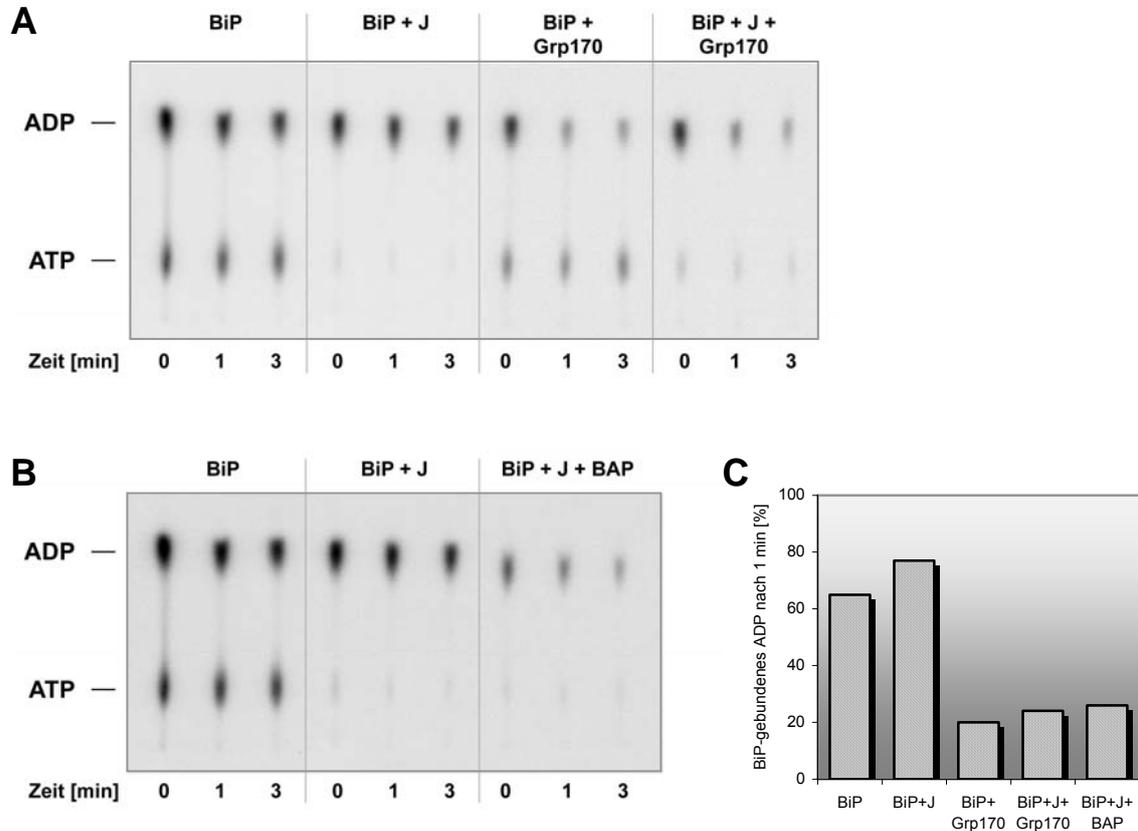


Abb. 3-18: Grp170 wirkt als Nukleotidaustauschfaktor im ATPase-Zyklus von BiP

(A-B) 5 μ M BiP wurde zusammen mit 100 μ Ci [α - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol) für 30 min bei 24°C in 85 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 1,5 mM MgCl₂ inkubiert, um den BiP-[α - 32 P]ATP-Komplex zu bilden. Der Komplex wurde durch Zentrifugation in G-50 MicroSpin Säulchen von ungebundenem Nukleotid befreit. 1 μ M vorbeladenes BiP wurde für 0, 1 und 3 min bei 16°C alleine oder in Kombination mit 2 μ M ERj1J, BAP und 0,3 μ M Grp170 im gleichen Puffer mit zusätzlich KCl (25 mM) und 100 μ M unmarkiertem ATP inkubiert. Ungebundenes Nukleotid wurde durch eine erneute Zentrifugation durch ein G-50 MicroSpin Säulchen entfernt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und ADP in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid für 10 min chromatographiert. Die radioaktiven Adeninnukleotide wurden durch Auflegen einer Phosphorlmager-Platte für 1 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software ausgewertet. (C) Die Menge an verbliebenem BiP-gebundenem ADP nach 1 min ist dargestellt als Prozentanteil der Anfangsmenge bei 0 min.

3.4.6 Die ATPase von Grp170 ist stimulierbar

Da Grp170 genau wie BiP eine ATPase-Domäne besitzt, besteht die Möglichkeit, dass die durch Grp170 gesteigerte ATP-Hydrolyse in den ATPase-Versuchen (siehe Abb. 3-17) neben der nachgewiesenen Nukleotidaustausch-Aktivität zum Teil auch durch eine Stimulation der Grp170-ATPase verursacht wurde. Obwohl die ATPase von Grp170 weder durch BiP noch durch die J-Domäne von ERj1p nennenswert stimuliert werden konnte (vgl. Abb. 3-17 A u. B), kann eine Stimulation bei gleichzeitiger Anwesenheit von BiP und einem J-Protein nicht ausgeschlossen werden.

Um dies zu klären, wurde der gleiche Versuch wie unter 3.4.5 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass jetzt Grp170 anstelle von BiP mit markiertem ATP vorbeladen wurde. Das hierzu verwendete Grp170 wurde aus Hundepankreasmikrosomen durch Chromatographie an ATP-Agarose und Hydroxylapatit isoliert (vgl. 2.9.4). Nach dem Entfernen von ungebundenem [α - 32 P]ATP wurde das ATP-beladene Grp170 in An- oder Abwesenheit der J-Domäne von ERj1p sowie mit BiP oder mit beiden Proteinen zusammen inkubiert. Das hierbei verwendete BiP (aus Hamster) wurde rekombinant als His₆-Fusion in *E. coli* synthetisiert und über Nickel-NTA-Agarose gereinigt (vgl. 2.7.7.2). J-Domäne und BiP wurden in dem Versuch in dreifachem molaren Überschuss gegenüber Grp170 eingesetzt. Abb. 3-19 A zeigt die mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennten radioaktiv-markierten Adenin-Nukleotide. Unter den Versuchsbedingungen ist so gut wie keine Umwandlung von Grp170:ATP zu Grp170:ADP zu erkennen, wenn Grp170 alleine inkubiert wurde. Auch in Anwesenheit der J-Domäne oder von BiP ist keine signifikante Aktivität zu erkennen. Dies stimmt mit den Resultaten der ATPase-Versuche überein (vgl. Abb. 3-17 A u. B) und bedeutet, dass Grp170 eine sehr schwache intrinsische ATPase-Aktivität besitzt, die durch J-Proteine nicht nennenswert stimuliert wird. Wurde jedoch Grp170 in gleichzeitiger Anwesenheit von BiP und der J-Domäne inkubiert, kam es zu einer vermehrten ATP-Hydrolyse durch Grp170, wie an der größeren Menge entstandenem ADP zu erkennen ist. Abb. 3-19 B vergleicht die Hydrolyse von Grp170-gebundenem ATP zu Beginn des Versuches als prozentuales Verhältnis von entstandenem ADP zum Gesamtnukleotid. Es muss angemerkt werden, dass es für die gesteigerte ATP-Hydrolyse noch eine alternative Erklärung gibt: das markierte ATP könnte auch durch BiP hydrolysiert worden sein, nachdem es durch direkten Transfer von der ATP-Bindungsstelle von Grp170 auf die ATP-Bindungsstelle von BiP übertragen wurde.

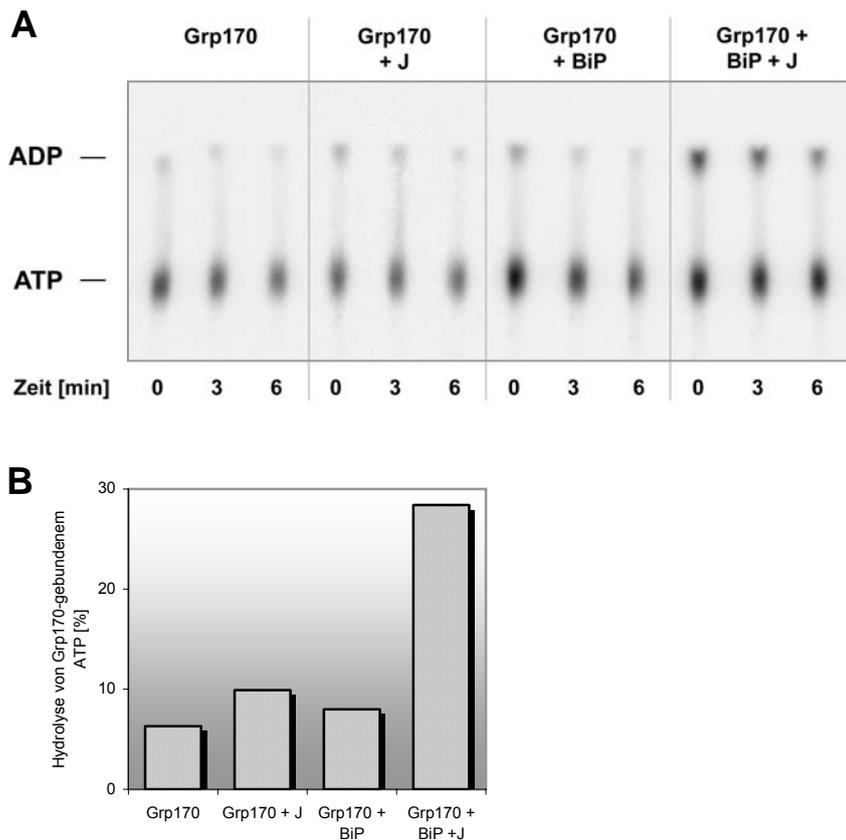


Abb. 3-19: Funktionelle Charakterisierung von Grp170 im Nukleotidaustausch-Versuch

(A) 2,5 μM Grp170 wurde zusammen mit 50 μCi [α - ^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol) für 20 min bei 24°C in 85 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 1,5 mM MgCl_2 inkubiert, um den Grp170- $[\alpha$ - ^{32}P]ATP-Komplex zu bilden. Der Komplex wurde durch Zentrifugation in G-50 MicroSpin Säulchen von ungebundenem Nukleotid befreit. 0,3 μM vorbeladenes Grp170 wurde für 0, 3 und 6 min bei 16°C alleine oder in Kombination mit 1 μM ERj1J und 1 μM Grp170 im gleichen Puffer mit zusätzlich KCl (25 mM) und 100 μM unmarkiertem ATP inkubiert. Ungebundenes Nukleotid wurde erneut durch eine Zentrifugation durch ein G-50 MicroSpin Säulchen entfernt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und ADP in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid für 10 min chromatographiert. Die radioaktiven Adeninnukleotide wurden durch Auflegen einer Phosphorimager-Platte für 1 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software ausgewertet. **(B)** Die Hydrolyse von Grp170-gebundenem ATP wurde berechnet, indem die Menge an ADP als Prozentanteil der Summe aus ADP und ATP zum Zeitpunkt 0 min bestimmt wurde.

3.4.7 Grp170 zeigt keine Bindung an die J-Domäne von ERj1J

Die Daten des Nukleotidaustausch-Versuches haben gezeigt, dass die ATPase von Grp170 möglicherweise bei gleichzeitiger Anwesenheit von BiP und der J-Domäne von ERj1p, nicht jedoch wenn nur eines der beiden Proteine anwesend ist, stimuliert wird (vgl. Abb. 3-19). Es sollte daher untersucht werden, ob Grp170 bei Anwesenheit von BiP und

ATP an die J-Domäne binden kann. Bekanntermaßen führt die Anwesenheit von ATP zu einer Interaktion von BiP mit der J-Domäne von ERj1J (Dudek et al., 2002). Da die Ergebnisse der Gelfiltrationen gezeigt hatten, dass Grp170 in Anwesenheit von ATP nicht mit BiP assoziiert vorliegt, konnte im voraus ausgeschlossen werden, dass Grp170 über BiP an die J-Domäne bindet und so eine J-Interaktion vorgetäuscht wird.

Für den Versuch wurde GSH-Sepharose mit einem Gemisch aus Grp170 und BiP sowie ATP in An- und Abwesenheit der GST-getaggten J-Domäne von ERj1J inkubiert. Das Grp170/BiP-Gemisch stammte aus einer ATP-Agarose-Chromatographie, GST-ERj1J wurde in *E. coli* synthetisiert und dann an GSH-Sepharose gereinigt. Nachdem unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt wurde, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Aliquots der Elutionsproben und der Überstände mit ungebundenem Protein wurden gelelektrophoretisch analysiert. Abb. 3-14 zeigt, dass BiP wie erwartet an GST-ERj1J gebunden hatte und somit an der GSH-Sepharose immobilisiert wurde, nicht jedoch Grp170 (Spur 2 und 4). Unter den hier gewählten Bedingungen ist Grp170 also nicht in der Lage mit der J-Domäne von ERj1J stabil zu interagieren.

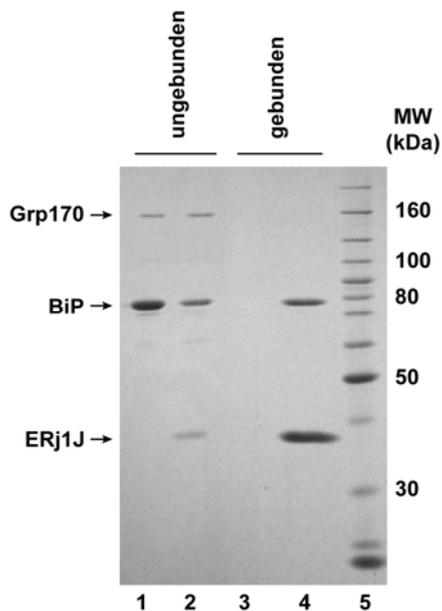


Abb. 3-20: Grp170 zeigt keine stabile Interaktion mit der J-Domäne von ERj1J

35 µl GSH-Sepharose wurden mit einem Gemisch aus 1 µg Grp170 und 10 µg BiP sowie 2 mM ATP in An- (Spur 2 und 4) und Abwesenheit (Spur 1 und 3) von 9 µg GST-ERj1J für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit CP200-Puffer auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die GSH-Sepharose mit CP200 gewaschen. Die Elution erfolgte durch Inkubation der Sepharose mit 100 µl 2x Laemmli-Probenpuffer bei 95°C für 5 min. Von den Überständen (Spur 1 und 2) und den Elutionen (Spur 3 und 4) wurden jeweils 40 µl mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Reagenz gefärbt. Spur 5: BenchMark® Protein-Ladder

3.5 Charakterisierung der Hsp70/Hsp40-Interaktion

In diesem Kapitel sollte untersucht werden, wie Hsp40-Proteine mit ihren Hsp70-Partnern interagieren. Nach den Ergebnissen von Misselwitz et al. (1999), die die Interaktion von Hefe-BiP (Kar2p) mit Sec63p untersuchten, kann vermutet werden, dass das J-Protein in Abwesenheit eines Substrates selber in der Substratbindungstasche wie ein Peptidsubstrat gebunden wird, woraus ein stabiler ADP·Hsp70/Hsp40-Komplex resultiert. Zuvor muss es aber zu einer kurzzeitigen Interaktion der J-Domäne mit der ATPase-Domäne von Hsp70 kommen, um die ATP-Hydrolyse zu aktivieren und damit die Substratbindungsdomäne in die hochaffine Konformation zu bringen.

3.5.1 Bindungsstudien verschiedener BiP-Mutanten

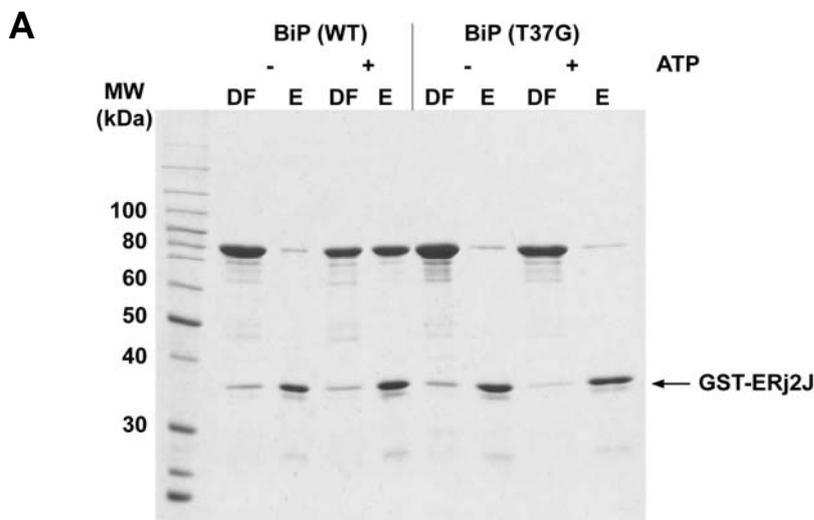
Um zu untersuchen welche Proteindomänen, bzw. welche Eigenschaften von BiP für die Interaktion mit seinen Hsp40-Partnern notwendig sind, wurden zunächst Bindungsversuche mit verschiedenen BiP-Mutanten und der J-Domäne von ERj2p durchgeführt. Die Mutanten G227D, T229G und T37G, die von Wei et al. (1995) charakterisiert wurden, besitzen an unterschiedlichen Stationen des ATPase-Zyklus eine Blockade: Bei G227D handelt es sich um eine ATP-Bindungs-Mutante, die ATP nicht stabil binden kann. T229G ist nicht in der Lage ATP zu hydrolysieren, während bei der Mutante T37G die ATP-induzierte Konformationsänderung, die ein Öffnen der Substratbindungstasche zur Folge hat, blockiert ist, was zur Folge hat, dass der ATPase-Zyklus nicht ablaufen kann. Bei K44 handelt es sich um die isolierte ATPase-Domäne von BiP (44 kDa N-terminales Fragment). Die Mutante R197H ist aufgrund des AS-Austausches in ihrer ATPase-Domäne nicht mehr in der Lage mit dem HPD-Motiv von J-Domänen zu interagieren und bindet daher keine J-Proteine.

Für den Versuch wurde GST-ERj2J an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit den verschiedenen BiP-Mutanten in An- oder Abwesenheit von ATP inkubiert. Nachdem unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt wurde, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Aliquots der Überstände mit ungebundenem Protein und der Eluate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 3-21 A und B).

Wie zu erwarten, kam es zu einer ATP-abhängigen Bindung von BiP(WT) an die J-Domäne von ERj2p (Abb. 3-21 A). Bei den verwendeten Mutanten war lediglich bei der

3. Ergebnisse

ATP-Bindungs-Mutante (G227D) eine Bindung an die J-Domäne unter Anwesenheit von ATP festzustellen (Abb. 3-21 A und B). Die Menge an gebundenem BiP(G227D) war jedoch geringer als die Menge an gebundenem BiP(WT). Die Bindung dieser Mutante an die J-Domäne ist damit zu erklären, dass ihre ATP-Bindung zwar beeinträchtigt ist, aber immer noch stattfindet und somit der ATPase-Zyklus ablaufen kann. Die Tatsache dass das K44-Fragment, welches lediglich die ATPase-Domäne von BiP enthält, nicht an die J-Domäne bindet, zeigt, dass die Substratbindungstasche von BiP für eine stabile Bindung der J-Domäne notwendig ist. Die R197H Mutante zeigte ebenfalls keine Bindung an die J-Domäne. Da bei dieser Mutante eine funktionsfähige Substratbindungstasche vorhanden ist, die Interaktion der J-Domäne mit der ATPase-Domäne von BiP jedoch beeinträchtigt ist, deutet dies darauf hin, dass die J-Domäne für eine stabile Bindung sowohl mit der ATPase- als auch mit der Substratbindedomäne von BiP interagieren muss. Das Nichtbinden der T37G und T229G Mutanten kann damit begründet werden, dass die J-Domäne nicht in die Substratbindungstasche von BiP gelangen kann, bzw. in dieser nicht festgehalten wird. Bei der T37G Mutante ist die ATP-induzierte Öffnung der Substratbindungstasche blockiert, so dass die J-Domäne nicht hineingelangen kann. Dagegen findet bei der T229G Mutante keine ATP-Hydrolyse statt, wodurch die geschlossene Konformation der Substratbindungstasche nicht erreicht wird und somit keine stabile Bindung der J-Domäne in der Substratbindungstasche möglich ist.



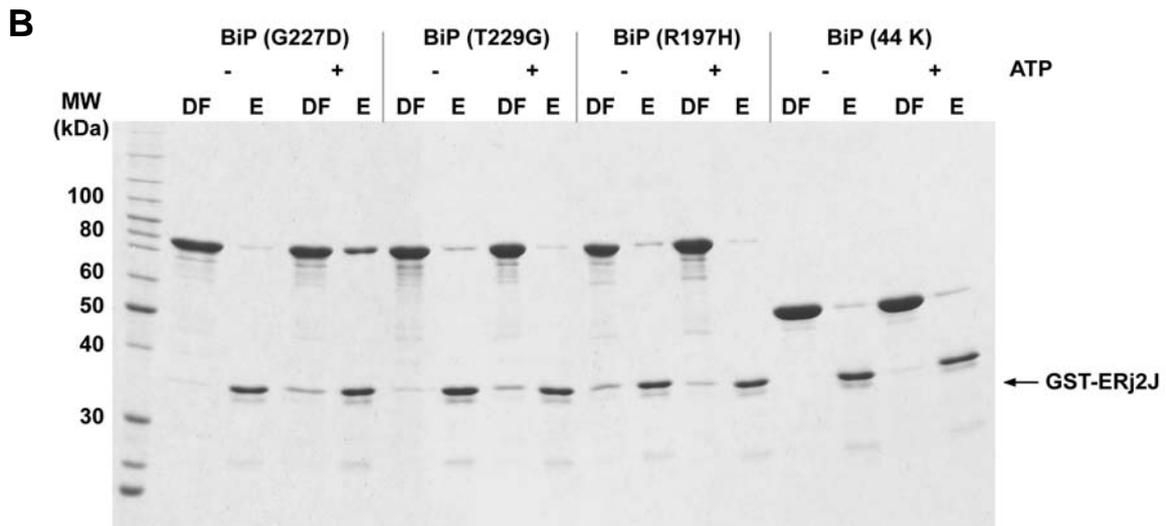


Abb. 3-21: Untersuchung der Bindung unterschiedlicher BiP-Mutanten an ERj2J

Je Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sepharose mit 6 μ g GST-ERj2J in CP200 für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit dem gleichen Puffer gewaschen. Anschließend wurde die vorgebundene J-Domäne mit jeweils 20 μ g BiP (WT) bzw. einer der BiP-Mutanten in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP in CP200 für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes und dreimaligem Waschen der GSH-Sepharose, erfolgte die Elution durch eine 10 minütige Inkubation mit je 40 μ l Laemmli-Probenpuffer bei 56°C. Von den Überständen wurden jeweils 100 μ l nach einer Aceton/MeOH-Fällung zusammen mit 20 μ l der Eluate auf einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbelösung. DF: Durchfluss, E: Eluat

3.5.2 Die ATPase von BiP(R197H) ist durch ein Peptidsubstrat stimulierbar

Die BiP-Mutante R197H ist aufgrund ihres AS-Austausches nicht in der Lage mit dem HPD-Motiv von J-Domänen zu interagieren und kann aus diesem Grund keine Verbindung zu Hsp40-Proteinen eingehen. Es ist bekannt, dass Hsp70-Proteine in ihrer ATPase-Aktivität durch bestimmte Peptide, die in der Substratbindungstasche gebunden werden, stimuliert werden können. Es wurde daher untersucht, ob das hydrophobe BiP-Peptidsubstrat P15 (ALLLSAPRRGAGKKC, Schmid *et al.*, 1994; Misselwitz *et al.*, 1998) einen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von BiP(R197H) ausüben kann. Darüber hinaus wurde auch auf einen eventuellen Effekt einer J-Domäne getestet.

Die BiP-Mutante R197H wurde alleine oder mit GST-ERj2J bzw. P15 sowie 500 μ M ATP und 0,1 μ Ci [γ - 32 P]ATP bei 37 °C inkubiert (vgl. 2.8.3). Zusätzlich wurden zum Vergleich die Versuche analog mit BiP(WT) durchgeführt. Aus den Reaktionsansätzen wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. ATP

und gebildetes P_i wurden dann im Anschluss dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden mit einem Phosphorimager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet (siehe Abb. 3-22).

Wie es zu erwarten war, wurde BiP(WT) sowohl durch die J-Domäne von ERj2p als auch durch das Peptidsubstrat P15, in seiner ATPase-Aktivität stimuliert. Dabei fiel die Stimulation durch die J-Domäne deutlich größer aus als diejenige durch das Peptidsubstrat. Dagegen wurde die Mutante R197H lediglich durch das Peptid stimuliert, nicht jedoch durch die J-Domäne. Die Stimulation durch das Peptidsubstrat zeigt, dass die ATPase von BiP(R197H) funktionsfähig ist. Die Tatsache, dass die J-Domäne keinen stimulierenden Effekt bewirkte, zeigt dass die Interaktion mit dem HPD-Motiv der J-Domäne für eine Stimulation notwendig ist.

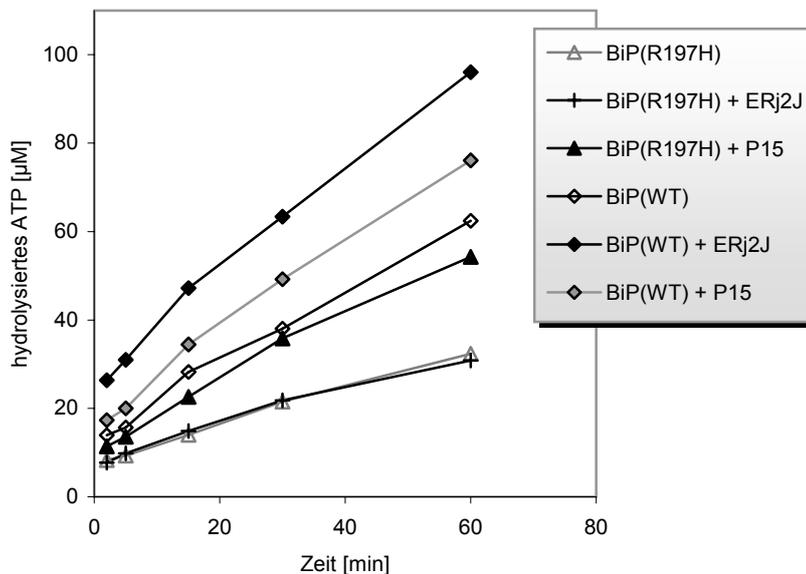


Abb. 3-22: Die ATPase-Aktivität von BiP(R197H) ist durch das Peptid P15, nicht aber durch ERj2J, stimulierbar

2 μM BiP(WT) und BiP(R197H) wurden jeweils mit oder ohne 2 μM ERj2J oder 250 μM P15 in einem HEPES-Puffer mit 500 μM ATP und 0,1 μCi [γ - ^{32}P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 2, 5, 15, 30 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und freigesetztem P_i für ca. 10 min in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Radioaktiv markiertes ATP und P_i wurden durch Auflegen einer Phosphorimager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software quantifiziert.

3.5.3 Isolierte Hsp70-ATPase-Domänen sind nicht durch J-Domänen stimulierbar

Der Bindungsversuch mit der isolierten ATPase-Domäne von BiP hatte gezeigt, dass eine J-Domäne keine oder zumindest keine stabile Interaktion mit dieser eingehen kann. Es ist jedoch bekannt, dass J-Domänen über ihr HPD-Motiv mit der ATPase-Domäne interagieren, und dass diese Interaktion für die Stimulation der ATPase-Aktivität notwendig ist (Feldheim et al., 1992; Wall et al., 1994). Möglicherweise kommt es zu einer sehr kurzzeitigen Interaktion der J-Domäne mit der isolierten ATPase-Domäne, die mit dem durchgeführten Bindungsversuch nicht nachweisbar ist. Wenn dies der Fall wäre könnte es auch zu einer Stimulation der isolierten ATPase-Domäne kommen. Dies sollte in einem ATPase-Versuch unter „steady-state“-Bedingungen mit der J-Domäne von ERj1p untersucht werden. Zusätzlich wurde dieser Versuch mit der ATPase-Domäne von Hsc70 durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass auch Hsc70 durch J-Domänen von Hsp40-Homologen des ER stimulierbar ist (vgl. 3.6.2).

Die ATPase-Domänen von BiP und Hsc70 wurden im gleichen molaren Verhältnis mit oder ohne GST-ERj1J sowie 500 μM ATP und 0,1 μCi [γ - ^{32}P]ATP bei 37 °C inkubiert (vgl. 2.8.3). Aus den Reaktionsansätzen wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. ATP und gebildetes P_i wurden anschließend dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden mit einem Phosphorimager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet (siehe Abb. 3-23).

Die ATP-Hydrolyserate beider ATPase-Domänen ließ sich nicht durch die verwendete J-Domäne von ERj1p stimulieren. Beide ATPase-Domänen wiesen hier eine deutlich höhere intrinsische Aktivität auf, als es für die vollständigen Proteine in vergleichbaren Versuchen beobachtet wurde. Die ATPase-Domäne von BiP zeigte allerdings eine ca. 5 mal höhere Aktivität als diejenige von Hsc70. Eine Interaktion mit der J-Domäne konnte somit wegen der ausgebliebenen Stimulation der ATPase-Aktivität nicht nachgewiesen werden. Sie kann aber auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da für eine Stimulation möglicherweise die Substratbindungsdomäne vorhanden sein muss.

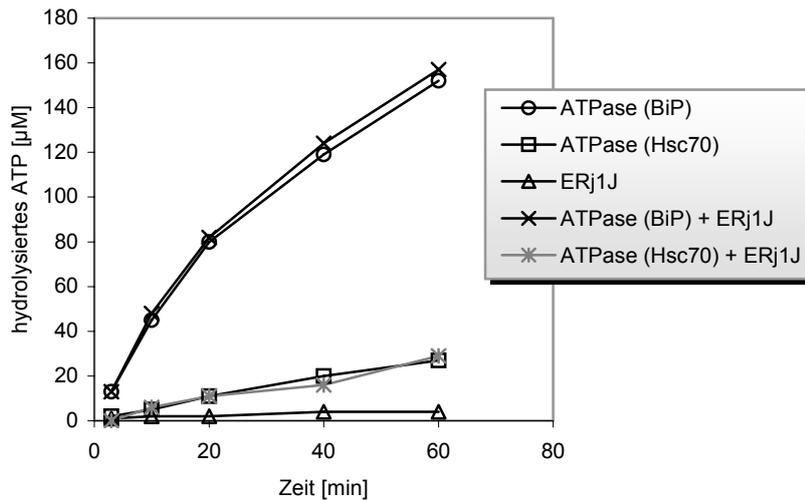


Abb. 3-23: Die isolierten ATPase-Domänen von BiP und Hsc70 sind nicht durch ERj1J stimulierbar

Die ATPase-Domänen von BiP und Hsc70 (2 µM) wurden jeweils mit oder ohne 2 µM ERj1J in einem Hepes-Puffer mit 500 µM ATP und 0,1 µCi [γ ³²P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 3, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und freigesetztem P_i für ca. 10 min in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Radioaktiv markiertes ATP und P_i wurden durch Auflegen einer Phosphormager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software quantifiziert.

3.5.4 Bestimmung der Bindungsaffinität von GST-ERj5J und BiP

Von C. Bies wurden im Rahmen ihrer Dissertation (2002) die Affinitäten der Bindungen von BiP mit ERj1J, ERj2J, ERj3p, ERj3J und ERj5p mittels SPR (Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie) bestimmt. Zum Vergleich mit den Affinitäten von ERj5p sowie den anderen J-Proteinen des ER, wurde hier die Bindungsaffinität von BiP und der J-Domäne von ERj5p ermittelt.

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität wurde ein BiaCoreX-Gerät verwendet (vgl. 2.8.2). GST-ERj5J wurde als Ligand in einer Flusszelle (Fc1) auf der Oberfläche eines Sensorchips mittels eines kovalent gebundenen anti-GST-Antikörpers immobilisiert. Anschließend wurde BiP-His₆ als Analyt in verschiedenen Konzentrationen in einem Flusssystem über die Oberfläche des Sensorchips geleitet. Die Konzentration von BiP-His₆ wurde zuvor über einen BSA-Abgleich densitometrisch bestimmt (vgl. 2.6.6.2). Mittels der SPR-Detektion konnte die Bindung von BiP-His₆ an das immobilisierte GST-ERj5J beobachtet werden. Bei jeder Messung war zusätzlich GST in einer Referenzzelle (Fc2)

immobilisiert. Für die mathematische Auswertung wurde die Differenz der Sensorgramme der beiden Flusszellen ($Fc1-Fc2$) verwendet. Somit konnten eventuell auftretende unspezifische Bindungen an GST berücksichtigt werden. Die Bindungsaffinität des Proteinkomplexes wurde mit Hilfe der BIAevaluation-Software bestimmt.

Abb. 3-24 zeigt die Sensorgramme für verschiedene Analyt-Konzentrationen, die für die Bindung von BiP-His₆ an GST-ERj5J in Anwesenheit von ATP, aufgezeichnet wurden. BiP-His₆ assoziierte mit dem immobilisierten GST-ERj5J während es über den Chip geleitet wurde, und dissoziierte wieder ab, sobald es durch den Laufpuffer ersetzt wurde. Aus den aufgezeichneten Sensorgrammen konnten mit Hilfe der BiaEvaluation-Software für die BiP-ERj5J-Interaktion Werte für k_a und k_d sowie ein K_D -Wert (k_d/k_a) berechnet werden. Die Daten wurden mit dem von der Software zur Verfügung gestellten Modell für eine 1:1-Bindung ausgewertet, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass sich dabei zum Teil hohe Abweichungen von den Idealkurven ergaben. Der berechnete K_D -Wert von 0,59 μM für die J-Domäne von ERj5p unterscheidet sich kaum von dem von C. Bies (2002) ermittelten Wert für die Bindung von BiP mit dem vollständigen ERj5p (0,45 μM). Der Proteinanteil außerhalb der J-Domäne scheint also keinen Einfluss auf die Bindung des J-Proteins an BiP auszuüben.

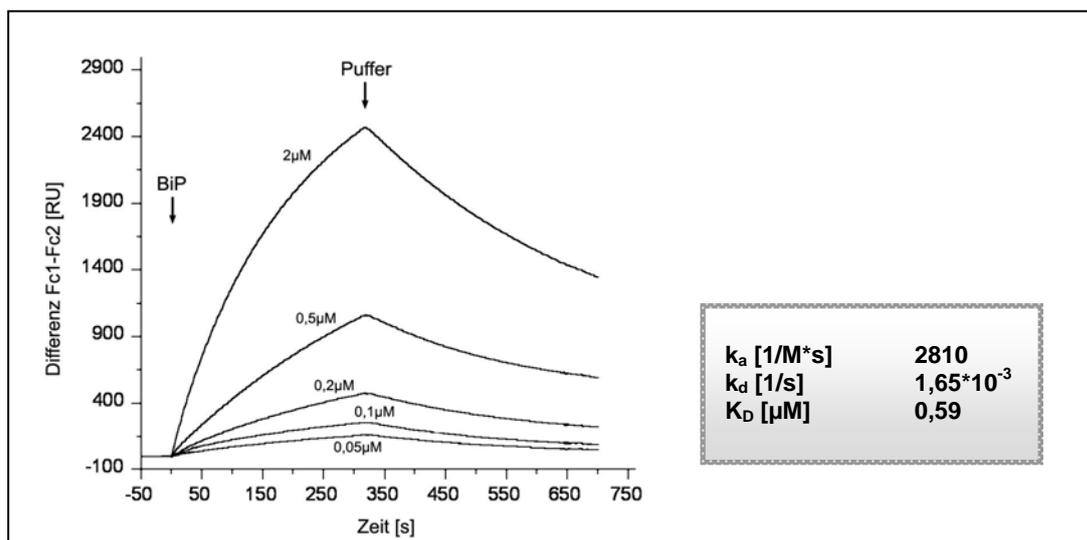


Abb. 3-24: Affinität der Interaktion von GST-ERj5J mit BiP in Gegenwart von ATP

Ein monoklonaler anti-GST-Antikörper wurde nach Anweisung des Herstellers an einen CM5-Chip gekoppelt. Das Fusionsprotein GST-ERj5J wurde über diesen GST-Antikörper auf dem Chip in Flusszelle 1 (Fc1) immobilisiert. In Flusszelle 2 (Fc2) wurde die gleiche Menge an GST als Referenz gebunden. Dann wurde in Gegenwart von 1 mM ATP BiP-His₆ in den angegebenen Konzentrationen mit einer Flussgeschwindigkeit von 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die Chipoberfläche injiziert. Nach jeder Injektion wurde PBS/KMT-Puffer über den Chip geleitet. Die aufgezeichneten Sensorgramme zeigen die Differenz zwischen der Messzelle mit immobilisiertem GST-ERj5J und der Referenzzelle mit immobilisiertem GST.

3.6 Spezifität der Hsp70/Hsp40-Interaktion

Das Endoplasmatische Retikulum, als ein separates Kompartiment innerhalb der Zelle, enthält fünf Hsp40-Proteine, die alle in der Lage sind mit BiP, dem Hsp70-Vertreter des ER, zu interagieren. Aufgrund der Tatsache, dass das ER vom Cytosol abgetrennt und auf bestimmte Aufgaben spezialisiert ist, ist es vorstellbar, dass sich seine Chaperone von Chaperonen anderer Zellkompartimente, bezüglich des Mechanismus und der Spezifität ihrer Interaktionen untereinander, unterscheiden. Hier sollte untersucht werden, ob die Hsp40-Proteine auf spezifische Weise mit ihrem zellulären Partner-Hsp70 interagieren, oder ob der Interaktionsmechanismus von universeller Natur ist und sich die Interaktionspartner austauschen lassen.

3.6.1 Hsp40-Homologe aus dem ER interagieren mit Hsc70

Um die Spezifität der Interaktion der Hsp40-Proteine des ER mit ihrem Partner-Hsp70 BiP zu untersuchen, wurde getestet, ob die J-Domänen der Membranproteine ERj1p und ERj2p sowie das lösliche ERj3p in der Lage sind, auch mit Hsc70, einem Hsp70-Vertreter des Cytosols, mit dem sie in der intakten Zelle aufgrund der räumlichen Trennung nicht in Kontakt treten können, zu interagieren.

Für den Versuch wurden GST-ERj1J, GST-ERj2J und GST-ERj3p zunächst an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit Hsc70 in An- oder Abwesenheit von ATP inkubiert. Nachdem unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt wurde, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Aliquots der Überstände mit ungebundenem Protein wurden zusammen mit den Eluaten mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 3-25).

In allen drei Fällen kam es in Anwesenheit von ATP, nicht aber in Abwesenheit von ATP, zu einer Interaktion mit Hsc70. Dabei war die Bindung von Hsc70 an das vollständige ERj3p wesentlich schwächer als die Bindung an die J-Domänen von ERj1p und ERj2p. Bei der Bestimmung von Bindungsaffinitäten für die Interaktion von BiP mit ERj3p sowie der J-Domäne von ERj3p, konnte ein Affinitätsunterschied zwischen J-Domäne und dem vollständigen Protein jedoch nicht festgestellt werden (Bies, Dissertation, 2002). Das bei diesem Versuch gezeigte Bindungsverhalten ist typisch für Hsp70/Hsp40-Interaktionen

und deutet darauf hin, dass die untersuchten J-Proteine, bzw. J-Domänen aus dem ER nicht nur mit ihrem ER-Partner BiP, sondern auch mit dem cytosolischen Hsp70-Vertreter Hsc70, funktionell interagieren können.

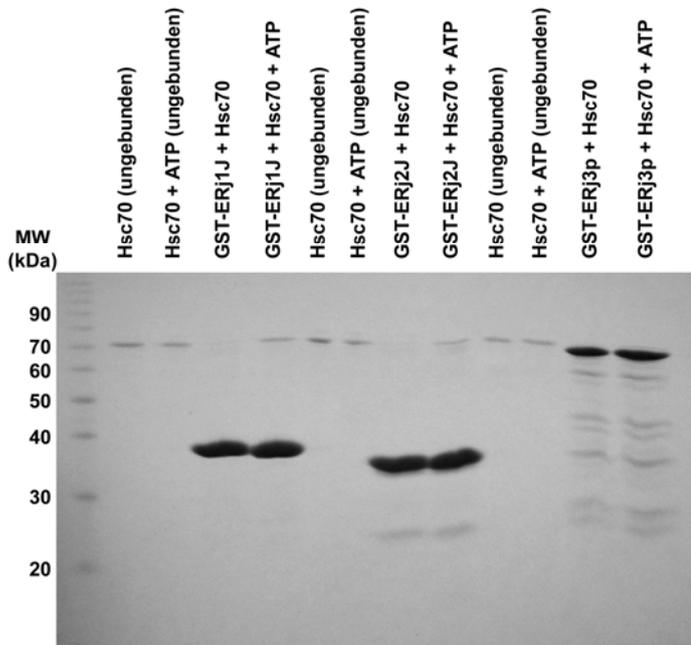


Abb. 3-25: Interaktion von ERj1J, ERj2J und ERj3p mit Hsc70

Je Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sepharose mit 15 μ g GST-ERj1J, GST-ERj2J oder GST-ERj3p in PBS/KMT für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit dem gleichen Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die vorgebundenen Proteine mit jeweils 3 μ g Hsc70 in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP in 300 μ l PBS/KMT für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme der Überstände und dreimaligem Waschen der GSH-Sepharose, erfolgte die Elution durch eine 5 minütige Inkubation mit je 40 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer bei 95°C. Von den Überständen wurden jeweils 50 μ l zusammen mit den Eluaten auf einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbelösung.

Bindungsversuche mit der ATPase-Domäne von BiP und einer BiP-Mutante, bei der die Interaktion mit J-Domänen durch einen Aminosäureaustausch (R197H) an der J-Domänen-Bindungsstelle der ATPase-Domäne blockiert war, hatten gezeigt, dass beide Hsp70-Domänen für eine stabile J-Bindung notwendig sind (vgl. 3.5.1). Um zu untersuchen, ob die Bindung von Hsc70 mit den Hsp40-Vertretern des ER ebenfalls auf dem Vorhandensein beider Domänen basiert, wurden Bindungsversuche mit der ATPase-Domäne sowie der C-terminalen Domäne von Hsc70 durchgeführt. Bei der ATPase-Domäne handelt es sich um ein N-terminales Fragment mit einer Masse von 44 kDa. Das verwendete C-terminale Fragment besitzt eine Masse von 32 kDa und enthält die Substratbindungstasche von Hsc70.

Für den Versuch wurden wiederum GST-ERj1J, GST-ERj2J und GST-ERj3p an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit Hsc70, Hsc70-ATPase oder dem C-Terminus von Hsc70 (CT70) in Anwesenheit von ATP inkubiert. Nachdem unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt wurde, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Aliquots der Überstände mit ungebundenem Protein wurden zusammen mit den Eluaten mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 3-26).

Wie im vorangegangenen Versuch kam es zu einer Bindung von Hsc70 an die J-Domänen von ERj1p, ERj2p sowie an das J-Protein ERj3p. Dagegen zeigte weder die ATPase-Domäne noch der C-Terminus von Hsc70 eine Bindung an eine der immobilisierten J-Domänen. Dies deutet darauf hin, dass sich die beobachtete Interaktion des cytosolischen Hsc70 mit den J-Proteinen aus dem ER nicht von einer ER-internen Hsp70/Hsp40-Interaktion unterscheidet.

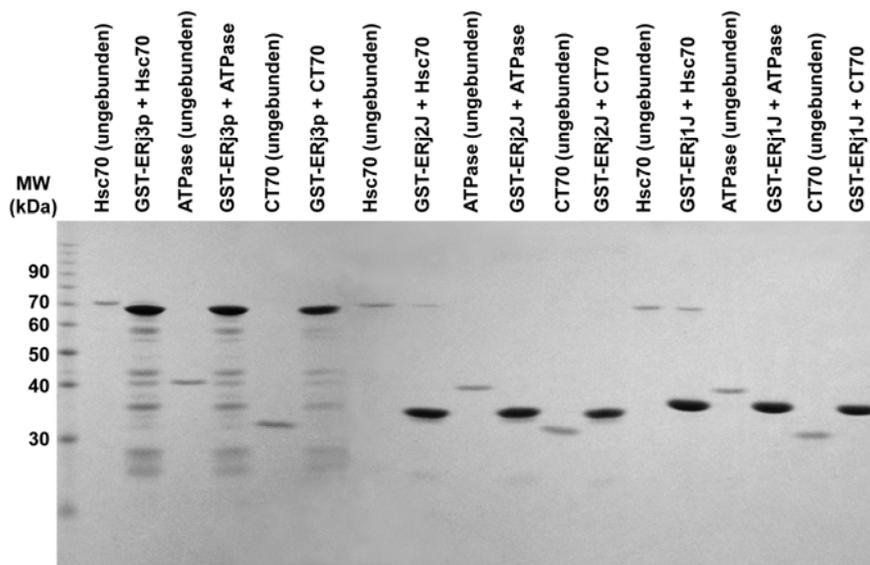


Abb. 3-26: ERj1J, ERj2J und ERj3p zeigen keine Interaktion mit der ATPase-Domäne und der C-terminalen Domäne von Hsc70

Je Ansatz wurden 30 µl GSH-Sepharose mit 7 µg GST-ERj1J, GST-ERj2J oder GST-ERj3p in PBS/KMT für 1 h bei 4°C inkubiert und dann mit dem gleichen Puffer gewaschen. Die vorgebundenen Proteine wurden anschließend mit jeweils 2 µg Hsc70, Hsc70-ATPase-Domäne oder Hsc70-C-Terminus (CT70) in Anwesenheit von 2 mM ATP in 300 µl PBS/KMT für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme der Überstände und dreimaligem Waschen der GSH-Sepharose, erfolgte die Elution durch eine 5 minütige Inkubation mit je 40 µl 2x Laemmli-Probenpuffer bei 95°C. Von den Überständen wurden jeweils 50 µl zusammen mit den Eluaten auf einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbelösung.

3.6.2 Hsp40-Homologe des ER stimulieren die ATPase von Hsc70

Bei einer funktionellen Interaktion eines Hsp70 mit einem Partner-Hsp40 kommt es durch eine Stimulation der Hsp70-ATPase immer auch zu einer Beschleunigung der ATP-Hydrolyse. Um die Funktionalität der Interaktion des cytosolischen Hsc70 mit den Hsp40-Proteinen aus dem ER zu überprüfen, wurde daher mittels „steady-state“-ATPase-Versuchen auf eine Stimulation der ATPase-Aktivität von Hsc70 getestet.

Hsc70 wurde dazu mit den J-Domänen von ERj1p und ERj2p sowie den J-Proteinen ERj3p und ERj4p in gleichem molaren Verhältnis in Anwesenheit von 500 μ M ATP und 0,1 μ Ci [γ ³²P]ATP inkubiert (vgl. 2.8.3). Die verwendeten J-Proteine und J-Domänen wurden als GST-Fusion in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.7.7.1). Aus den bei 37°C inkubierten Reaktionsansätzen wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. ATP und gebildetes P_i wurden anschließend dünn-schicht-chromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden dann mit einem PhosphorImager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet (siehe Abb. 3-27).

In allen vier Fällen kam es zu einer starken Stimulation der geringen intrinsischen ATPase-Aktivität (0,05 mol ATP/mol Hsc70*min) von Hsc70. Dabei fiel das Ausmaß der Stimulation durch die unterschiedlichen J-Proteine, bzw. J-Domänen sehr unterschiedlich aus: ERj1J stimulierte die ATPase-Aktivität um das 15 fache, ERj2J um das 8 fache, ERj3p um das 13 fache und ERj4p sogar um das 23 fache. Aufgrund dieses Befundes kann man davon ausgehen, dass es sich bei der Interaktion von Hsc70 mit den J-Proteinen des ER in der Tat um eine funktionelle Hsp70/Hsp40-Wechselwirkung handelt.

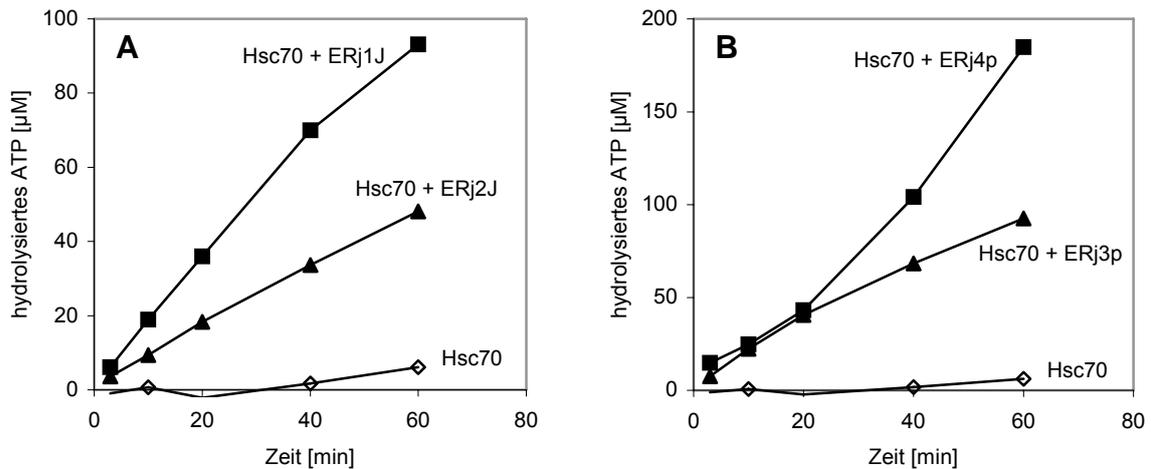


Abb. 3-27: Stimulation der ATPase-Aktivität von Hsc70 im „steady-state“-ATPase-Versuch

Hsc70 (2 µM) wurde in An- und Abwesenheit von 2 µM ERj1J (**A**), ERj2J (**A**), ERj3p (**B**) oder ERj4p (**B**) in einem HEPES-Puffer mit 500 µM ATP und 0,1 µCi [γ - 32 P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 3, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und freigesetztem P_i für ca. 10 min in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Radioaktiv markiertes ATP und P_i wurden durch Auflegen einer Phosphorimager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software quantifiziert.

3.6.3 BiP interagiert mit dem cytosolischen MIDA1

Nachdem eine funktionelle Interaktion aller getesteten Hsp40-Homologen des Endoplasmatischen Retikulums mit dem cytosolischen Hsc70 nachgewiesen werden konnte, sollte nun auch ein umgekehrter Fall untersucht werden: die Interaktion des cytosolischen Hsp40 MIDA1 mit BiP, dem Hsp70-Vertreter des ER. In einem Bindungsversuch wurde zunächst getestet, ob es zu einer ATP-abhängigen Bindung zwischen BiP und MIDA1 kommt.

Hierzu wurde in *E. coli* synthetisiertes GST-MIDA1 an GSH-Sepharose immobilisiert (vgl. 2.8.1). Das immobilisierte MIDA1 wurde anschließend mit ebenfalls in *E. coli* synthetisiertem BiP-His₆ (aus Hamster) in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP inkubiert. Parallel wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der GST anstelle von GST-MIDA1 verwendet wurde. Nachdem unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt wurde, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Die Elutionsproben und Aliquots der Überstände mit ungebundenem Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abb. 3-28 A).

In Abwesenheit von ATP (Spur 2 und 3) ist eine schwache Bindung von BiP an GST-MIDA1 zu erkennen. Dagegen wurde in Anwesenheit von ATP ein deutlich größerer Anteil des eingesetzten BiP von MIDA1 gebunden (Spuren 4 und 5). Die Kontrollansätze mit GST (Spuren 7 und 8) zeigen, dass BiP an MIDA1 und nicht an den GST-Anteil oder unspezifisch an die GSH-Sepharose gebunden hatte.

Um die Funktionalität dieser Bindung zu überprüfen, wurde anschließend in einem ATPase-Versuch auf Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP durch MIDA1 getestet. BiP wurde dazu mit MIDA1 im gleichen molaren Verhältnis sowie mit 500 μM ATP und 0,1 μCi [γ ³²P]ATP inkubiert (vgl. 2.8.3). Das verwendete MIDA1 wurde als GST-Fusion in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.7.7.1) und vor dem Einsatz im ATPase-Versuch mittels Thrombin-Spaltung von seinem GST-tag befreit (vgl. 2.7.8). Aus den bei 37°C inkubierten Reaktionsansätzen wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. ATP und gebildetes P_i wurden anschließend dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden mit einem Phosphorimager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet.

Abb. 3-28 B zeigt die geringe intrinsische ATPase-Aktivität von BiP sowie eine ca. 3,5 fache Stimulation in Anwesenheit von MIDA1. Dabei stieg die ATP-Hydrolyserate von 0,29 auf 1,02 mol ATP/mol BiP*min. Diese Befunde zeigen, dass das Hsp70-Chaperon BiP, das im ER lokalisiert ist, auch mit einem Hsp40-Protein des Cytosols eine funktionelle Hsp70/Hsp40-Interaktion eingehen kann.

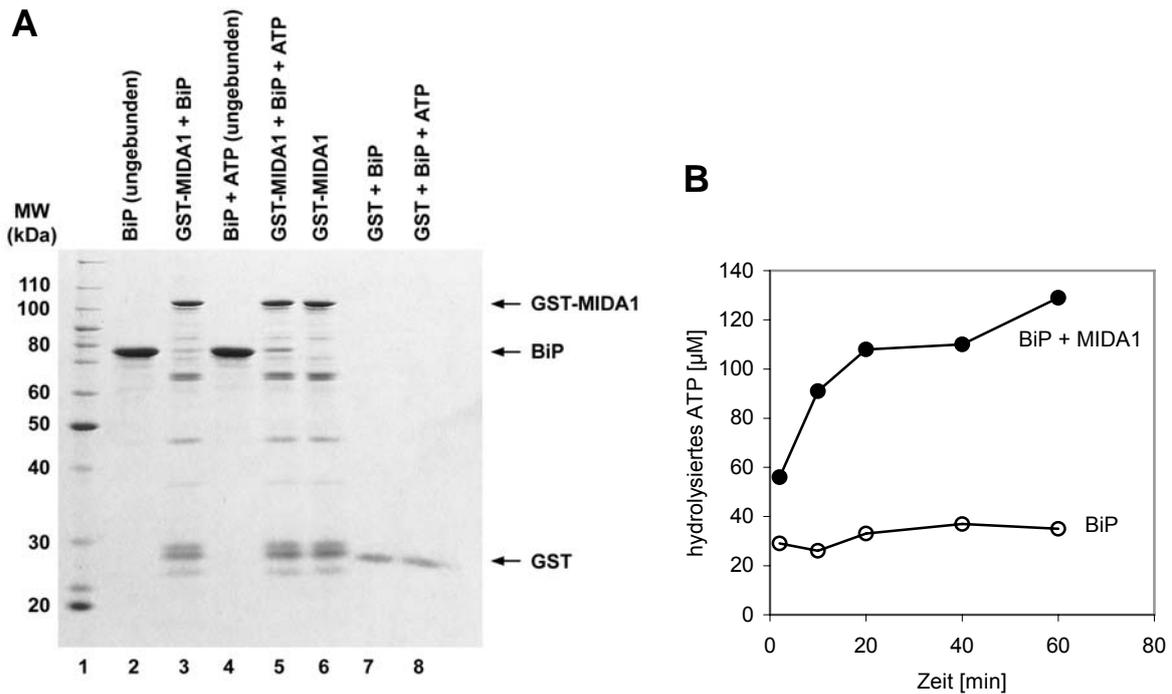


Abb. 3-28: MIDA1 interagiert ATP-abhängig mit BiP und stimuliert dessen ATPase-Aktivität

(A) Je Ansatz wurden 30 µl GSH-Sepharose mit 8 µg GST-MIDA1 oder mit 2 µg GST für 1 h inkubiert und anschließend mit PBS/KMT gewaschen. Die Ansätze wurden dann mit 15 µg BiP-His₆ (Spuren 2,3 und 7) oder 15 µg BiP-His₆ und 2 mM ATP (Spuren 4,5 und 8), bzw. ohne Zusatz (Spur 6) für 1 h unter ständiger Durchmischung inkubiert. Dafür wurden die Ansätze mit PBS/KMT auf ein Volumen von 200 µl gebracht. Ungebundenes Material wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS/KMT entfernt. Die Elution erfolgte mit 40 µl 2x Laemmli-Probenpuffer und einer Inkubation für 5 min bei 95°C. Von den Überständen wurden jeweils 50 µl von den Eluaten 40 µl durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Farbreagenz angefärbt. Spur 1: BenchMark® Protein-Ladder. **(B)** BiP-His₆ (2 µM) wurde in An- und Abwesenheit von 2 µM MIDA1 in einem Hepes-Puffer mit 500 µM ATP und 0,1 µCi [γ -³²P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 2, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und freigesetztem P_i für ca. 10 min in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Radioaktiv markiertes ATP und P_i wurden durch Auflegen einer Phosphorimager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software quantifiziert.

3.6.4 Bestimmung der Affinität der BiP/MIDA1-Bindung

Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass weder in den Bindungsstudien noch in den ATPase-Experimenten Unterschiede bei den Interaktionen von BiP bzw. Hsc70 mit Hsp40-Homologen des ER oder des Cytosols festgestellt werden konnten. Daher wurde die Affinität der Bindung von BiP mit dem cytosolischen MIDA1 bestimmt,

um sie mit den bekannten Bindungsaffinitäten von BiP mit seinen ER-Cochaperonen zu vergleichen.

Die Bestimmung der Affinität der BiP/MIDA1-Bindung erfolgte mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie) in einem BiaCoreX-Gerät (vgl. 2.8.2). MIDA1 wurde als GST-Fusion (Ligand) in einer Flusszelle (Fc1) auf der Oberfläche eines Sensorchips über einen kovalent gebundenen anti-GST-Antikörper immobilisiert. BiP-His₆ wurde als Analyt in verschiedenen Konzentrationen in einem Flusssystem über die Oberfläche des Sensorchips geleitet. Die Konzentration von BiP-His₆ wurde zuvor über einen BSA-Abgleich densitometrisch bestimmt (vgl. 2.6.6.2). Mittels der SPR-Detektion konnte die Bindung des Analyten an den Liganden beobachtet werden. Bei jeder Messung war zusätzlich GST in einer Referenzzelle (Fc2) auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Für die mathematische Auswertung wurde die Differenz der Sensorgramme der beiden Flusszellen (Fc1 – Fc2) verwendet. Somit konnten eventuell auftretende unspezifische Bindungen an GST berücksichtigt werden. Die Bindungsaffinität des Proteinkomplexes wurde mit Hilfe der BIAevaluation-Software bestimmt.

Abb. 3-29 zeigt die Sensorgramme für verschiedene BiP-Konzentrationen, die für die Bindung an das immobilisierte GST-MIDA1 aufgezeichnet wurden. BiP-His₆ hatte während der Assoziationsphase an GST-MIDA1 gebunden, und dissoziierte wieder ab, sobald es durch den Laufpuffer ersetzt wurde. Aus den aufgezeichneten Sensorgrammen konnte mit Hilfe der BiaEvaluation-Software für die BiP/MIDA1-Interaktion Werte für k_a und k_d sowie ein K_D -Wert (k_d/k_a) berechnet werden. Die Daten wurden mit dem von der Software zur Verfügung gestellten Modell für eine 1:1-Bindung ausgewertet, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass sich dabei zum Teil hohe Abweichungen von den Idealkurven ergaben. Der berechnete K_D -Wert von 2,68 μM für die BiP/MIDA1-Bindung liegt in einem Größenbereich, in dem sich auch die Affinitäten für die Bindung von BiP mit seinen ER-Cochaperonen befinden (z.B. 6,07 μM für BiP/ERj4p, 0,59 μM für BiP/ERj5J). Das heißt, auch bezüglich der Bindungsaffinitäten gibt es keine offensichtlichen Unterschiede zwischen einer Interaktion von BiP mit seinen „normalen“ Cochaperonen und mit „Fremd“-Cochaperonen.

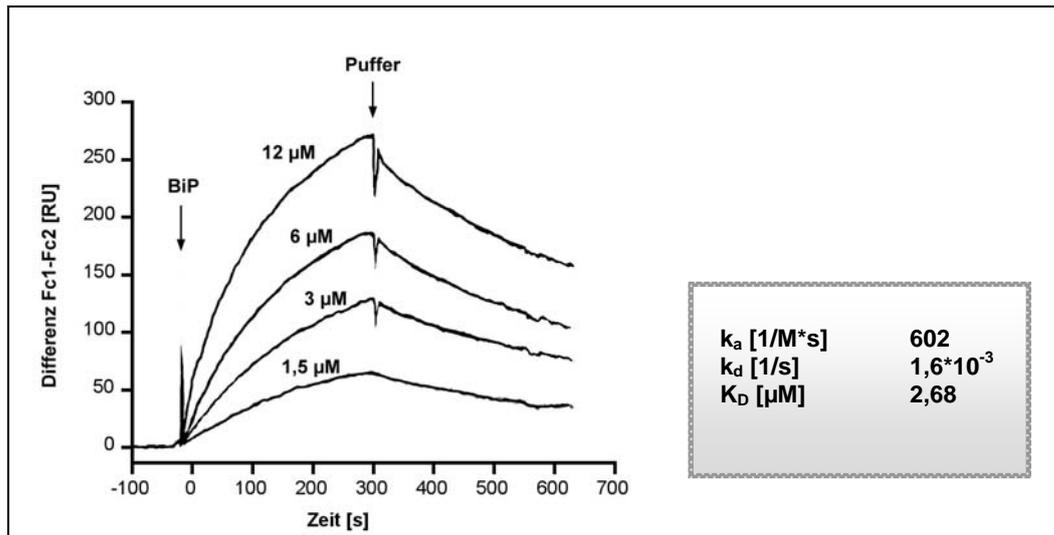


Abb. 3-29: Affinität der Interaktion von GST-MIDA1 mit BiP in Gegenwart von ATP

Ein monoklonaler anti-GST-Antikörper wurde nach Anweisung des Herstellers an einen CM5-Chip gekoppelt. Das Fusionsprotein GST-MIDA1 wurde über diesen GST-Antikörper auf dem Chip in Flusszelle 1 (Fc1) immobilisiert. In Flusszelle 2 (Fc2) wurde die gleiche Menge an GST als Referenz gebunden. Dann wurde in Gegenwart von 1 mM ATP BiP-His₆ in den angegebenen Konzentrationen mit einer Flussgeschwindigkeit von 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die Chipoberfläche injiziert. Nach jeder Injektion wurde PBS/KMT-Puffer über den Chip geleitet. Die aufgezeichneten Sensorgramme zeigen die Differenz zwischen der Messzelle mit immobilisiertem GST-MIDA1 und der Referenzzelle mit immobilisiertem GST.

3.6.5 Kar2p, das Hefe-Ortholog von BiP, interagiert mit den Säuger-Hsp40s ERj1p und ERj2p

Eine Aufgabe von BiP ist es im ER den Translokationskanal des Sec61 Translokons zu verschließen. Nach Alder et al. (2005) ist das BiP Äquivalent aus Hefe, Kar2p, nicht in der Lage die Funktion von BiP beim Verschließen der Pore in Säuger-RMs zu übernehmen. Vielmehr zeigt Kar2p einen dominant-negativen Effekt bezüglich des Verschließens der Pore, wenn es gemeinsam mit BiP anwesend ist. Es wurde ebenfalls bereits beschrieben, dass ein Austausch von BiP gegen verschiedene andere Hsp70-Proteine bei der Translokation von neusynthetisierten Proteinen ins ER nicht möglich ist (Brodsky et al. 1993, Wiech et al. 1993). Das Schließen der Pore benötigt funktionelle Interaktionen sowohl zwischen der Substratbindungsregion als auch der J-Domänen-Bindungsregion von BiP und Membranproteinen (Alder et al. 2005). Eine mögliche Ursache für die Unfähigkeit von Kar2p die Translokationspore zu verschließen, könnte in einer fehlenden Chaperon/Cochaperon-Interaktion begründet sein. Da ERj1p und ERj2p die beiden

wahrscheinlichsten Kandidaten für eine Interaktion mit BiP beim Verschließen der Translokationspore sind, wurde hier untersucht, ob die beiden Cochaperone in der Lage sind in funktioneller Weise mit Kar2p zu interagieren.

In einem Bindungsversuch wurde zunächst das Bindungsverhalten von Kar2p an die J-Domänen von ERj1p und ERj2p bei An- und Abwesenheit von ATP untersucht. Zu diesem Zweck wurden GST-ERj1J und GST-ERj2J an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit Kar2p oder BiP in An- oder Abwesenheit von ATP inkubiert. Das hierbei verwendete Kar2p stammte von einer Reinigung aus Hefe-Mikrosomen mittels ATP-Agarose (vgl. 2.9.2). BiP wurde als His₆-Fusion in *E. coli* synthetisiert und anschließend über Nickel-NTA-Agarose isoliert (vgl. 2.7.7.2). Nachdem unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt wurde, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Aliquots der Überstände mit ungebundenem Protein und der Eluate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 3-30).

Es fällt auf, dass Kar2p sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit von ATP an die J-Domäne von ERj1p gebunden hatte (Spur 3 und 5). Ohne ATP hatte etwas weniger Kar2p gebunden, wobei dieser Unterschied im Vergleich mit den entsprechenden BiP-Kontrollen (Spur 7 und 9) allerdings gering war. Die Bindung von Kar2p an die J-Domäne von ERj2p (Spur 11 und 13) fiel im Vergleich zur Bindung an ERj1J deutlich geringer aus. Aber auch die Menge an gebundenem BiP in Anwesenheit von ATP (Spur 15 und 17) war geringer als bei der Bindung an ERj1J. Zwischen den Ansätzen mit und ohne ATP war kein Unterschied in der gebundenen Kar2p-Menge festzustellen. Die Bindung von Kar2p an die J-Domänen in Abwesenheit von ATP ist untypisch für eine Hsp70/Hsp40-Interaktion, bei der es normalerweise nur in Anwesenheit von ATP zu einer stabilen Bindung der J-Domäne an ihr Partner-Hsp70 kommt.

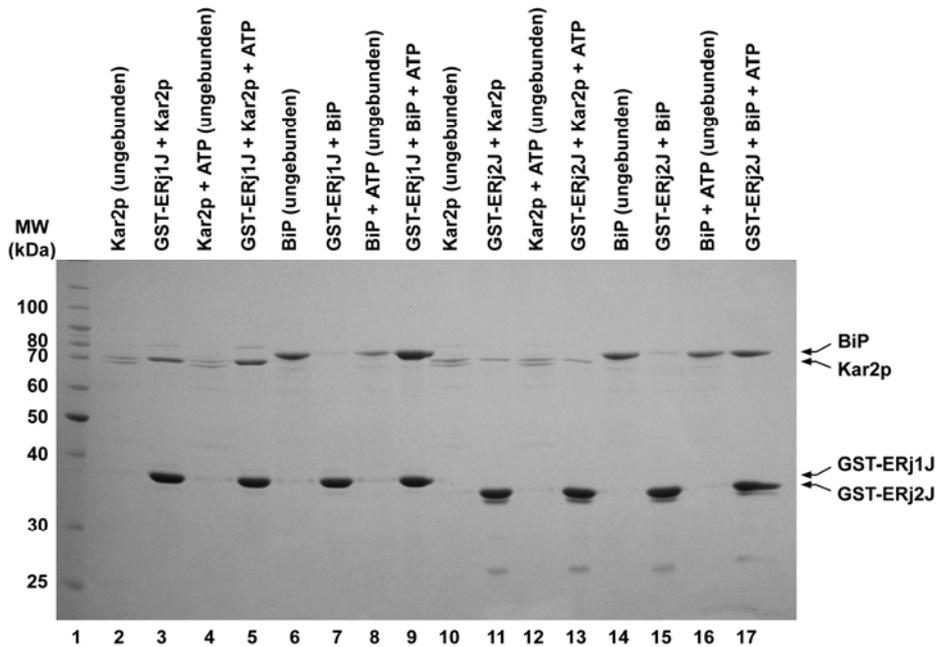


Abb. 3-30: Kar2p bindet sowohl an ERj1J wie auch an ERj2J

Je Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sepharose mit 7 μ g GST-ERj1J (Spur 2-9) oder GST-ERj2J (Spur 10-17) in PBS/KMT für 1 h bei 4°C inkubiert und daraufhin mit dem gleichen Puffer gewaschen. Die vorgebundenen Proteine wurden anschließend mit jeweils 4 μ g Kar2p (Spur 2-5, 10-13) oder 8 μ g BiP (Spur 6-9, 14-17) in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP in 300 μ l PBS/KMT für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme der Überstände und dreimaligem Waschen der GSH-Sepharose, erfolgte die Elution durch eine 5 minütige Inkubation mit je 50 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer bei 95°C. Von den Überständen und den Eluaten wurden jeweils 40 μ l auf einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetragen. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbelösung. Spur 1: BenchMark® Protein-Ladder

3.6.6 ERj1J und ERj2J stimulieren die ATPase-Aktivität von Kar2p

Um die Funktionalität der Interaktionen von Kar2p mit den J-Domänen von ERj1p und ERj2p aus dem Säuger-ER zu überprüfen, wurden ATPase-Versuche durchgeführt, mit denen untersucht wurde, ob die beiden J-Domänen in der Lage sind, die ATPase-Aktivität von Kar2p zu stimulieren.

Die Bestimmung der ATPase-Aktivitäten erfolgte unter „steady-state“-Bedingungen, d.h. das Substrat ATP wurde in nicht-limitierender Menge eingesetzt. Für den Versuch wurde Kar2p in halbem molaren Verhältnis mit GST-ERj1J und GST-ERj2J sowie 500 μ M ATP und 0,1 μ Ci [γ - 32 P]ATP bei 37 °C inkubiert (vgl. 2.8.3). Aus den Reaktionsansätzen wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt.

ATP und gebildetes P_i wurden anschließend dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden mit einem Phosphormager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet (siehe Abb. 3-31).

Der Versuch zeigt, dass sowohl die J-Domäne von ERj1J wie auch diejenige von ERj2J einen stimulierenden Effekt auf die ATPase-Aktivität von Kar2p ausüben. Dabei fällt dieser Effekt bei ERj2J nur wenig schwächer aus als bei ERj1J, obwohl ERj2J im Bindungsversuch eine deutlich schwächere Bindung an Kar2p gezeigt hatte (vgl. Abb. 3-30). Die Stimulation der ATPase-Aktivität von Kar2p zeigt in beiden Fällen, dass die J-Proteine aus dem Säuger-ER in funktioneller Weise mit dem Hefe-Hsp70 Kar2p interagieren, obwohl im Bindungsversuch kein typisches Bindungsverhalten für eine Chaperon/Cochaperon-Interaktion festgestellt werden konnte.

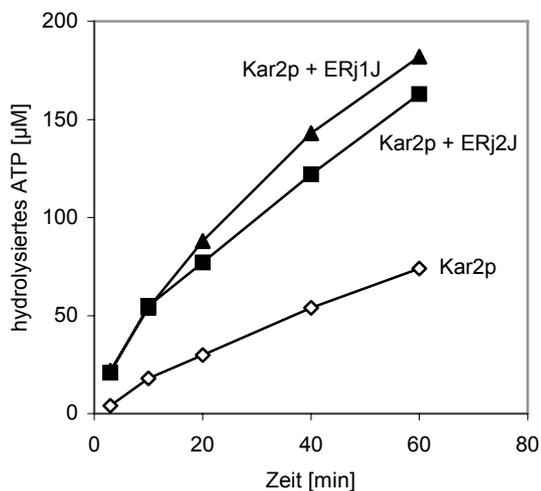


Abb. 3-31: ERj1J und ERj2J stimulieren die ATPase-Aktivität von Kar2p

Kar2p (1 μM) wurde in An- und Abwesenheit von 2 μM ERj1J und ERj2J in einem HEPES-Puffer mit 500 μM ATP und 0,1 μCi [γ - ^{32}P]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 3, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetropft und zur Trennung von ATP und freigesetztem P_i für ca. 10 min in 1M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Radioaktiv markiertes ATP und P_i wurden durch Auflegen einer Phosphormager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software quantifiziert.

3.6.7 **Kompetition von Kar2p und BiP um die Bindung an ERj1p und ERj2p**

Obwohl sowohl die J-Domäne von ERj1p wie auch diejenige von ERj2p funktionell mit Kar2p interagieren, ist Kar2p nicht in der Lage die Funktion von BiP beim Verschließen der Translokationspore in Säuger-RMs zu übernehmen. Aufgrund der Tatsache, dass Kar2p auch in Abwesenheit von ATP an die beiden J-Proteine bindet und nicht wie es für Hsp70/Hsp40-Wechselwirkungen typisch ist, nur in Anwesenheit von ATP, wäre es denkbar, dass BiP, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kar2p, von seinem Hsp40-Interaktionspartner am Translokation verdrängt wird. Dies würde den dominant-negativen Effekt von Kar2p beim Verschließen der Pore erklären.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Bindungsversuche durchgeführt, bei denen GST-ERj1J oder GST-ERj2J zunächst an GSH-Sepharose immobilisiert und dann gleichzeitig mit BiP und Kar2p in Anwesenheit von ATP inkubiert wurden. Nach dem Entfernen von unspezifisch gebundenem Protein durch Waschen von der GSH-Sepharose, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer. Aliquots der Überstände mit ungebundenem Protein und die Eluate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 3-32).

Wurde GST-ERj1J sowohl mit BiP als auch mit Kar2p inkubiert (Spur 3), fällt auf, dass fast kein Kar2p an die J-Domäne gebunden hatte. Dagegen wurde Kar2p in dem Ansatz ohne BiP (Spur 2) in relativ großer Menge gebunden. Mit GST-ERj2J (Spur 5-7) wurde prinzipiell das gleiche Ergebnis erhalten, was jedoch aufgrund der ohnehin schwachen Bindung von Kar2p an ERj2J nicht so deutlich ausfiel. Es kam hier also in beiden Fällen zu einer Verdrängung von Kar2p durch BiP. Nach diesem Ergebnis kann der dominant negative Effekt von Kar2p bei der Verschließung der Translokationspore also nicht durch eine Verdrängung von BiP von seinem Hsp40-Partner durch Kar2p verursacht werden.

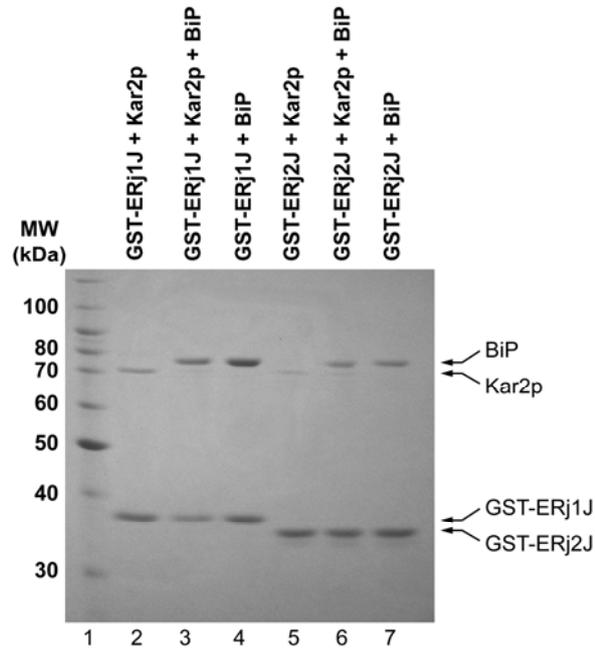


Abb. 3-32: Konkurrenz von Kar2p und BiP um die Bindung an ERj1J und ERj2J

Je Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sepharose mit 2 μ g GST-ERj1J (Spur 2-4) oder GST-ERj2J (Spur 5-7) in PBS/KMT für 1 h bei 4°C inkubiert und daraufhin mit dem gleichen Puffer gewaschen. Die vorgebundenen Proteine wurden anschließend mit jeweils 4 μ g Kar2p (Spur 2 und 5), 6 μ g BiP (Spur 4 und 7) oder beiden Proteinen (Spur 3 und 6) in Anwesenheit von 2 mM ATP in 300 μ l PBS/KMT für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme der Überstände und dreimaligem Waschen der GSH-Sepharose, erfolgte die Elution durch eine 5 minütige Inkubation mit je 40 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer bei 95°C. Die Eluate und jeweils 40 μ l der Überstände wurden auf einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbelösung. Spur 1: BenchMark® Protein-Ladder

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von MIDA1

MIDA1 wurde ursprünglich von Shoji et al. (1995) als ein cytosolisches Protein der Maus beschrieben, das mit dem Transkriptionsfaktor Id1 interagieren kann (mouse Id associated 1). Der N-terminale Teil seiner Aminosäuresequenz weist eine Ähnlichkeit zu dem Hefeprotein Zuotin auf, das in der Lage ist Z-DNA zu binden und als Cochaperon mit Ribosomen zu assoziieren (siehe Abb. 4-1) (Zhang et al., 1992; Yan et al., 1998; Gautschi et al., 2002). Die Zuotin-ähnliche Region enthält ein DnaJ-Motiv und die Id-Bindungsdomäne. Von Inoue et al. (1999) wurde gezeigt, dass auch MIDA1 eine Z-DNA-Bindungsaktivität besitzt, die durch die Assoziation mit Id moduliert wird. Zusätzlich enthält sein C-Terminus zwei c-Myb-ähnliche Domänen, die für eine sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität verantwortlich sind (Inoue et al., 2000).

Proteine, die ein DnaJ-Motiv (J-Domäne) enthalten, werden zur Hsp40-Familie gezählt und agieren als Cochaperone der Hsp70-Chaperone. Dabei vermittelt die J-Domäne die Interaktion zwischen den Hsp40-Homologen und ihren spezifischen Hsp70-Partnern, wobei die ATPase-Aktivität des Hsp70-Proteins stimuliert wird. Die Grundfunktion der Hsp70-Chaperone besteht aus der Bindung und Freisetzung von hydrophoben Segmenten ungefalteter Polypeptidketten in einem ATP-hydrolysierenden Reaktionszyklus (Flynn et al., 1991). Hieraus resultiert die Fähigkeit, ungefaltete oder partiell gefaltete Polypeptidketten zu binden, wodurch sie deren Aggregation verhindern und bei deren Faltung assistieren (Hartl, 1996).

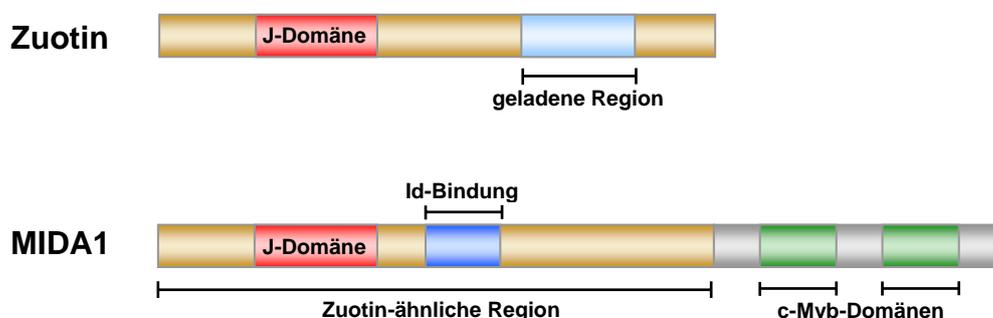


Abb. 4-1: Domänenstruktur von Zuotin und MIDA1

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war über eine Funktion von MIDA1 als cytosolisches Cochaperon noch nichts bekannt. Da MIDA1 lediglich die J-Domäne mit *E. coli* DnaJ gemeinsam hat, erfüllt es weder die Kriterien für ein Typ I (G/F-reiche und Cys-reiche Region) noch für ein Typ II (G/F-reiche Region) Hsp40-Homolog und zählt deshalb zu den Typ III Hsp40-Homologen. 1995 wurde von Hughes et al. mit ZRF1 (Zuotin related factor 1) die cDNA eines Mausproteins isoliert, das fast vollständig mit MIDA1 identisch ist. Es unterscheidet sich von MIDA1 lediglich durch einen verkürzten C-Terminus (mit nur einer myb-Domäne) und seine letzten 13 Aminosäuren, die von der MIDA1-Sequenz abweichen. Das Protein wurde allerdings seitdem nicht mehr beschrieben und es ist fraglich, ob es sich dabei eventuell um ein alternatives Spleiß-Produkt oder nur um ein Artefakt handelt. Alle in dieser Arbeit mit MIDA1 durchgeführten Versuche wurden auch mit ZRF1 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden allerdings nicht gezeigt, da sie sich nicht von den mit MIDA1 erhaltenen Daten unterscheiden. Der verkürzte C-Terminus hatte also auf die hier untersuchten Eigenschaften keine Auswirkung.

4.1.1 Interaktion von MIDA1 mit Hsc70

Im Cytosol von Säugerzellen sind neben MIDA1 noch sechs weitere Hsp40-Homologe bekannt, die unterschiedliche Funktionen wahrnehmen und dabei alle mit Hsc70/Hsp70 interagieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch MIDA1 mit dem unter Nicht-Stress-Bedingungen vorkommenden Hsp70-Homolog des Cytosols, Hsc70, in ATP-abhängiger Weise interagiert. MIDA1 aus Maus wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und an GSH-Sepharose immobilisiert. Eine Inkubation des immobilisierten MIDA1 mit Retikulozyten-Lysat führte in Anwesenheit, nicht aber in Abwesenheit, von ATP zur Bindung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 70 kDa. Das ATP-abhängige Bindungsverhalten ist eine typische Eigenschaft von Hsp70/Hsp40-Interaktionen. Da sich das Protein mit einem anti-Hsp70-Familie Antikörper immunologisch detektieren ließ, konnte vermutet werden, dass es sich dabei um Hsc70 handelte. Diese Vermutung konnte durch die Verwendung von rekombinant in *E. coli* hergestelltem Hsc70 bestätigt werden. Wurde immobilisiertes MIDA1 mit in *E. coli* synthetisiertem und gereinigtem, bovinem Hsc70 inkubiert, kam es ebenfalls zu einer ATP-abhängigen Bindung. Yoshida et al. (2004) konnten in ihren Arbeiten *in vivo* eine Bindung von MIDA1 an das unter Stress-Bedingungen exprimierte Chaperon Hsp70 zeigen. Da sich Hsc70 und Hsp70 kaum voneinander unterscheiden, bestätigt dies die gefundene Interaktion von MIDA1 mit Hsc70.

Nachdem eine ATP-abhängige Interaktion von MIDA1 und Hsc70 in Bindungsversuchen nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob sich diese Interaktion auch funktionell auf die ATPase-Aktivität von Hsc70 auswirkt. Für fast alle bisher untersuchten Hsp70/Hsp40-Interaktionen ist beschrieben, dass die ATPase-Aktivität des Hsp70-Partners durch sein Hsp40-Cochaperon stimuliert wird. So wurde beispielsweise eine Stimulation der ATPase-Aktivität von Hsc70 infolge der Interaktion mit Hsp40 (Hdj1p) beschrieben, wobei diese Interaktion offenbar für eine effiziente Beladung von Hsc70 mit einem Peptidsubstrat notwendig ist (Minami et al. 1996).

Um die ATPase-Aktivität von Hsc70 in An- und Abwesenheit von MIDA1 zu bestimmen, wurden ATPase-Versuche durchgeführt, bei denen die Mengen an freigesetztem P_i und verbliebenem ATP nach verschiedenen Zeitintervallen bestimmt wurde. Die intrinsische ATPase-Aktivität von Hsc70 lag dabei bei 0,24 mol ATP/mol Hsc70*min, ein Wert, der ziemlich genau mit dem von Minami et al. (1996) bestimmten Wert von 0,2 mol ATP/mol Hsc70*min übereinstimmt. Die Anwesenheit von MIDA1 führte zu einer 2,3 fachen Stimulation der Hsc70-ATPase. Dies zeigt, dass MIDA1 mit Hsc70 in funktioneller Weise interagiert und somit *in vivo* gemeinsam mit Hsc70 eine spezifische Aufgabe im Cytosol übernehmen könnte.

4.1.2 Assoziation von MIDA1 an Ribosomen

Das Hsp40/Hsp70-System ist in der Lage spezialisierte zelluläre Funktionen unterschiedlichster Art auszuführen. Während die J-Domäne der Hsp40-Proteine für die Interaktion mit einem Hsp70-Partner verantwortlich ist, wird die spezifische Funktion eines Hsp40/Hsp70-Paares durch verschiedene Struktureigenschaften der Hsp40-Proteine außerhalb der J-Domäne determiniert. So besitzt beispielsweise Auxilin, ein Hsp40-Homolog im Cytosol von Säugerzellen, neben einer C-terminalen J-Domäne noch eine zentrale Clathrin-bindende Domäne. Im Zusammenspiel mit Hsc70 ist Auxilin am „uncoating“ von Clathrin-umhüllten Vesikeln beteiligt (Ungewickell et al., 1995). Auch das Hefe-Homolog von MIDA1, Zuotin, ist aus mehreren Domänen aufgebaut. Es besitzt neben der J-Domäne noch eine geladene Region, die für die Bindung an Ribosomen verantwortlich ist. Dort ist es gemeinsam mit zwei Hsp70-Proteinen in die Interaktion mit naszierenden Polypeptidketten involviert, welche das Ribosom verlassen (Gautschi et al., 2002). Mit dem Hsp70 Ssz1p bildet Zuotin einen stabilen Komplex, der als ribosome associated complex (RAC) bezeichnet wurde. Es handelt sich dabei aber nicht um eine typische Hsp70/Hsp40-Interaktion, da der Komplex auch in Anwesenheit von ATP oder

ADP stabil ist und die ATPase-Aktivität von Ssz1p nicht stimuliert wird. Vielmehr stimuliert Zuotin, jedoch nur in Verbindung mit Ssz1p, die ATPase von Ssb1/2p, das dann mit der naszierenden Polypeptidkette interagiert (Huang et al., 2005). MIDA1 besitzt im Vergleich mit Zuotin zusätzlich am C-Terminus zwei myb-Domänen (Inoue et al., 1999). Diese Eigenschaft teilt MIDA1 mit ERj1p (Mtj1p), einem Hsp40-Homolog der ER-Membran, das ebenfalls zwei myb-Domänen besitzt. Diese besonderen Strukturmerkmale sind aus den DNA-bindenden Domänen verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie dem Onkoprotein c-Myb, bekannt (Kanei-Ishii et al., 1990; Gabrielsen et al., 1991) und auch bei MIDA1 konnte eine DNA-Bindung über diese Domänen nachgewiesen werden (Inoue et al., 2000). Basierend auf der Tatsache, dass MIDA1 zu einem großen Teil Ähnlichkeit mit dem an Ribosomen bindenden Hefe Hsp40 Zuotin besitzt, wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet, ob auch MIDA1 an Ribosomen assoziieren kann und somit möglicherweise eine ähnliche Aufgabe wie Zuotin besitzt.

Zum Test auf eine Assoziation mit Ribosomen wurden aus Hundepankreas-Gewebe isolierte Ribosomen mit MIDA1 inkubiert und anschließend mittels Zentrifugation durch ein Saccharose-Kissen reisoliert. Bei diesem Versuch sedimentierte MIDA1 zusammen mit den Ribosomen, wogegen zugesetztes BSA in Lösung blieb. Somit konnte gezeigt werden, dass MIDA1 in der Lage ist an Ribosomen zu binden. Weiter wurde untersucht, ob Hsc70, dessen Interaktion mit MIDA1 nachgewiesen wurde, in einem Komplex mit MIDA1 an Ribosomen binden kann. Da es bei diesem Versuch auch ohne zugesetztes MIDA1 zu einer Bindung von Hsc70 an die Ribosomen kam, kann keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob Hsc70 über MIDA1 am Ribosom lokalisiert werden kann. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten wäre eine direkte Bindung von Hsc70 an ribosomale Proteine, was aber bisher nicht beschrieben wurde. Andererseits könnten auch andere ribosomenassoziierte Proteine vorhanden sein, die mit Hsc70 interagieren. So ist in Hefe neben Zuotin ein weiteres Hsp40-Protein (Sis1p) bekannt, das an Ribosomen assoziiert und mit Hsp70-Proteinen (Ssa1-4) interagieren kann (Horton et al., 2001).

Vor kurzem wurde auch eine Assoziation von Mpp11, dem Zuotin-Homolog in humanen Zellen, an Ribosomen beschrieben (Hundley et al., 2005; Otto et al., 2005). Des Weiteren konnte mit Hsp70L1 ein Hsp70-Interaktionspartner von Mpp11 identifiziert werden. Hsp70L1 und Mpp11 bilden einen stabilen Komplex, der in Analogie zu RAC (ribosom-associated complex) aus Hefe, als mRAC (mammalian RAC) bezeichnet wurde (Otto et al., 2005). In Komplementations-Experimenten konnte gezeigt werden, dass mRAC in der Lage ist RAC in der Hefe funktionell zu ersetzen. Somit kann vermutet werden, dass mRAC in der Säugerzelle die gleiche oder eine ähnliche Funktion wie RAC in der Hefezelle übernimmt. Zuotin interagiert am Ribosom neben Ssz1p, mit dem es den

Ribosom-assoziierten Komplex bildet, noch mit einem zweiten Hsp70, nämlich Ssb1/2p, wodurch eine Chaperontriade entsteht. Im Gegensatz zu Zuotin benötigt Mpp11 kein Ssb1/2p, wenn es in Hefe die Rolle von Zuotin übernimmt. Stattdessen interagiert es mit Ssa, ein weiteres Hsp70-Homolog der Hefe, das dann offensichtlich an die Stelle von Ssb tritt (Hundley et al., 2005). Ssa ist dem Säuger Hsc70 ähnlich, wohingegen kein entsprechendes Säugerprotein für Ssb bekannt ist. Somit ist es nicht verwunderlich, dass Mpp11 bevorzugt mit einem Ssa-Protein interagiert anstelle von Ssb. Auch im Säugersystem ist eine solche Chaperontriade vorstellbar. Hierbei könnte Hsc70, das als Interaktionspartner von MIDA1 im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurde, als zweites Hsp70-Protein mit MIDA1/Mpp11 interagieren und die Rolle von Ssb1/2p übernehmen. Hsc70 wäre somit in direkter Nähe zur naszierenden Kette und könnte schon beim Verlassen des Ribosomenausgangskanals an bestimmte Peptidsequenzen binden und das neu entstehende Polypeptid vor einer Aggregation oder Missfaltung schützen.

Das bereits erwähnte ERj1p ist ebenfalls in der Lage, mit Ribosomen zu interagieren (Dudek et al., 2002). Dieses Hsp40-Homolog ist über eine Transmembrandomäne in der ER-Membran verankert und besitzt neben einer luminalen J-Domäne, die mit BiP interagieren kann, auch eine cytosolische Domäne. Innerhalb der cytosolischen Domäne konnte im N-terminalen Bereich ein geladenes Nona-Peptid identifiziert werden, das für die Ribosomenbindung verantwortlich ist. Die Bindung erfolgt dabei über die 28S rRNA der 60S ribosomalen Untereinheit (Dudek et al., 2005). Auch bei Zuotin konnte die Assoziation an Ribosomen einer geladenen Region nahe am C-Terminus, die ebenfalls an rRNA bindet, zugeschrieben werden (Yan et al., 1998). Die Stelle am Ribosom, an die Zuotin bindet, muss sich in der Nähe des Ribosomenausgangskanals befinden, da das mit Zuotin interagierende Ssb1/2p durch einen Crosslinker mit der naszierenden Kette verbunden werden konnte (Gautschi et al., 2002). Wegen der Ähnlichkeit von MIDA1 zu Zuotin in der geladenen Region, kann darauf spekuliert werden, dass die Ribosomenbindung in gleicher Weise und an der gleichen Stelle am Ribosom erfolgt. Auch für die Assoziation von ERj1p am Ribosom konnte die Bindungsstelle am Ausgangskanal lokalisiert werden (Dudek et al., 2005; Blau et al., 2005). Es stellte sich daher die Frage, ob MIDA1 und ERj1p die gleiche Stelle am Ribosom besetzen. Dies sollte in einem Wettbewerbsversuch geklärt werden, bei dem der Einfluss von einem ERj1p-Fragment (ERj1C- Δ C, AS 173-467) auf die Ribosomenbindung von MIDA1 untersucht wurde. Bei diesem ERj1p-Fragment handelt es sich um die c-terminal verkürzte cytosolische Domäne, die das geladene Peptid besitzt, das für die Bindung an Ribosomen notwendig ist. Tatsächlich hatte die Menge an Ribosomen-gebundenem

MIDA1 mit steigender Menge an vorgebundenem ERj1C- Δ C abgenommen. Es scheint also als besetze MIDA1 tatsächlich die gleiche Bindungsstelle am Ribosom wie ERj1C- Δ C. Diese Folgerung muss allerdings in Frage gestellt werden, da bei dem Versuch sehr große Mengen an ERj1C- Δ C an die Ribosomen gebunden werden konnten, was nicht mit der Bindung an eine einzige Stelle am Ribosom vereinbar ist. Dies deutet vielmehr darauf hin, dass das Protein unspezifisch an viele Stellen am Ribosom gebunden hat. Auch die Tatsache, dass neben MIDA1 noch weitere Proteine vom Ribosom verdrängt wurden spricht für diese Annahme.

Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion von MIDA1 mit Ribosomen zu untersuchen, wurde der Einfluss von MIDA1 auf die Translationseffizienz betrachtet. Rekombinant hergestelltes MIDA1 wurde einem *in vitro*-Translationsansatz zugesetzt, in welchem Präprolactin translatiert wurde. Die Anwesenheit von MIDA1 verursachte dabei eine Hemmung der Translation um ca. 40%. Eine Verdopplung der eingesetzten MIDA1-Menge führte dabei nur zu einer leichten Erhöhung des Hemmeffektes, wobei eine Hemmung von ca. 55% erreicht wurde. Da MIDA1 im Vergleich zu den Ribosomen im Überschuss vorlag, kann von einer 50-60%igen maximalen Hemmwirkung auf die Synthese von Präprolactin ausgegangen werden. Wenn ERj1p an das Ribosom bindet, verursacht es eine nahezu komplette Blockade der Proteinsynthese. In einem Wettbewerbsversuch bei dem MIDA1 und ERj1p gleichzeitig bei der Translation von Präprolactin anwesend waren, kam es ebenfalls zu einer vollständigen Inhibition der Proteinsynthese. Obwohl MIDA1 in diesem Versuch in dreifachem molarem Überschuss gegenüber ERj1p vorhanden war, konnte es offensichtlich ERj1p nicht vom Ribosom verdrängen. Für den Fall, dass beide Proteine die gleiche Bindungsstelle am Ribosom besitzen, müsste ERj1p also eine wesentlich größere Affinität besitzen. Bei der cotranslationalen Translokation wäre es folglich denkbar, dass Ribosomen, welche die ER-Membran erreichen, von der cytosolischen Domäne von ERj1 gebunden werden, nachdem MIDA1 freigesetzt wurde.

Die biologische Bedeutung für die beobachtete Hemmung der Proteinsynthese durch MIDA1 ist schwer vorherzusagen. Möglicherweise ist eine Verlangsamung der Proteinsynthese notwendig damit Proteine, die mit der naszierenden Kette interagieren, genügend Zeit erhalten, um die neusynthetisierte Polypeptidkette nach ihrem Austritt aus dem Ribosom zu erreichen. Hierbei könnte es sich um Hsp70-Chaperone handeln, welche mit der Polypeptidkette interagieren oder um SRP (signal recognition particle), das die Signalsequenz von cotranslational ins ER zu transportierenden Proteinen erkennt.

4.1.3 Nachweis von MIDA1 in verschiedenen Geweben der Maus

Um das Vorkommen von MIDA1 in unterschiedlichen Geweben zu untersuchen, wurde eine immunologische Detektion mit polyklonalen Antikörpern, die aus Kaninchenblut gewonnen wurden, durchgeführt. Dabei wurden Proben von unterschiedlichen Geweben der Maus verwendet (Leber, Hirn, Lunge, Niere, Milz, Hoden, Eierstock, Herz und Pankreas). In dem molekularen Größenbereich, der für MIDA1 (72 kDa, laut Swiss-Prot-Database) in Frage kommt, wurden zwei Proteine, bei ca. 60 kDa und ca. 70 kDa, von dem Antikörper erkannt. Lediglich in der Probe des Hirngewebes konnte keines der beiden Proteine detektiert werden. Dagegen war in allen anderen Geweben zumindest eines der beiden Proteine nachweisbar. Da ZRF1, die verkürzte Variante von MIDA1, ein vorhergesagtes Molekulargewicht von etwa 60 kDa besitzen würde (59,5 kDa, laut Swiss-Prot-Database), könnte es sich bei dem vom α -MIDA1-Antikörper erkannten Protein bei 60 kDa um ZRF1 handeln. Bei der Mengenverteilung der beiden Proteine war auffällig, dass lediglich beim Pankreasgewebe das 60 kDa Protein in größerer Menge als das 70 kDa Protein vorkam. Bei allen anderen Geweben war es umgekehrt. Die Gewebeprobe mit den größten Mengen des 70 kDa Proteins stammten aus Lunge, Hoden, Eierstock und Herz. Da die Identität der detektierten Proteine nicht geklärt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eines der Proteine möglicherweise aufgrund einer Kreuzreaktion des Antikörpers erkannt wurde.

4.2 Charakterisierung von Grp170

Grp170 (glucose-regulated protein of 170 kDa) ist ein Hsp70-verwandtes Chaperon im Endoplasmatischen Retikulum von Säugerzellen, über das bisher noch nicht sehr viel bekannt ist. Die N-terminale, glykosylierte Domäne von Grp170 besitzt 30% Übereinstimmung mit der ATPase-Domäne von DnaK. Dagegen zeigt der Rest des Proteins eher eine Verwandtschaft mit Hsp110, einem cytosolischen Chaperon der Hsp110/SSE-Familie. Grp170 wurde aber weder der Hsp70- noch der Hsp110-Familie zugeordnet, sondern wird als eigene Gruppe zu der Hsp70-Superfamilie gezählt, zu der auch die Hsp110-Familie gehört (Easton et al., 2000). Grp170 interagiert mit nicht-assemblierten Immunglobulinen und wurde in Assoziation mit BiP und Grp94 gefunden, weshalb eine Rolle bei der Assemblierung/Faltung von sekretorischen Proteinen diskutiert wurde (Kuznetsov et al., 1997). Von Park et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass Grp170 eine Hitze-induzierte Protein-Aggregation verhindert, indem es die denaturierten Proteine bindet. Hierbei benötigt es kein ATP und arbeitet offensichtlich effizienter als Hsp70. Im Gegensatz zu Hsp70 oder Hsp110 scheint Grp170 zwei getrennte Regionen zu besitzen, die in der Lage sind Proteine zu binden. In Verbindung mit Retikulozyten-Lysat und ATP können die, von Grp170 in einem faltungskompetenten Zustand gehaltenen, denaturierten Proteine, wieder rückgefaltet werden. Grp170 muss bei diesem Vorgang also mit einem oder mehreren, bisher unbekannt Proteinen, zusammenarbeiten (Park et al., 2003).

4.2.1 Isolation von Grp170 aus Hundepankreas-Mikrosomen

Um Grp170 aus Hundepankreas-Mikrosomen zu isolieren, wurden verschiedene chromatographische Aufreinigungsstrategien angewendet. Eine Aufreinigung, bei der nacheinander Chromatographien an ConA-Sepharose, Hydroxylapatit und DE52-Cellulose zum Einsatz kamen, stellte sich als am ertragreichsten heraus. Allerdings zeigte sich in nachfolgenden Experimenten, dass es sich bei dem überwiegenden Anteil, des auf diese Weise isolierten Grp170, offenbar um nicht-funktionales Protein handelte. Als am sinnvollsten für die Isolation von Grp170 stellte sich die Chromatographie über ATP-Agarose als erster Aufreinigungsschritt heraus. Hierbei konnte im wesentlichen Grp170 zusammen mit BiP isoliert werden, wobei BiP, als das abundantere Protein im ER, im Vergleich zu Grp170 in vielfacher Menge vorhanden war. Zur weiteren Aufreinigung

wurde entweder eine Chromatographie über ConA-Sepharose oder Hydroxylapatit angeschlossen.

Die Fähigkeit der ATP-Bindung von BiP ist seit langer Zeit bekannt. Es war allerdings unklar, ob Grp170 mit seiner N-terminalen Hsp70-ähnlichen Domäne ebenfalls ATP binden kann. Außerdem stellte sich die Frage, ob Grp170 mit BiP interagieren kann. In diesem Fall wäre es denkbar, dass Grp170 bei der Aufreinigung über ATP-Agarose zusammen mit BiP co-isoliert wurde und nicht direkt an die ATP-Agarose gebunden hatte. Um zu untersuchen, ob Grp170 mit BiP interagiert, wurden mit den ATP-Agarose-Eluaten Gelfiltrationen durchgeführt. Da das Bindungsverhalten von BiP bekanntermaßen ATP-abhängig ist, wurden diese sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von ATP durchgeführt. Bei Anwesenheit von ATP wurde Grp170 von BiP getrennt und BiP lag dabei in monomerer Form vor. Das bei der Gelfiltration erhaltene Elutionsmaximum für Grp170 entsprach einem Molekulargewicht von ca. 380 kDa, was mit dem Vorhandensein von Grp170-Dimeren übereinstimmte. Bei Abwesenheit von ATP zeigte sich dagegen ein anderes Verhalten. Jetzt cofraktionierte ein geringer Anteil von BiP mit Grp170, was auf eine Interaktion der beiden Proteine hindeutet. Die Elution von Grp170 erfolgte bei diesen Bedingungen in einem sehr breiten Peak (in einem Bereich von 160–430 kDa), so dass von der Bildung verschiedener Oligomerisierungszustände mit und ohne BiP ausgegangen werden muss. Auch bei Cer1p (Lhs1p), dem Hefe-Homolog von Grp170, wurde die Bildung von Oligomeren beobachtet. Die Zugabe von ATP oder einem Peptid führte bei Cer1p zur Auflösung der Oligomeren (Hamilton et al., 1999). Die Tatsache, dass Grp170 bei Anwesenheit von ATP nicht mit BiP assoziiert, schließt eine Bindung von Grp170 an BiP auf der ATP-Agarosesäule aus, was bedeutet, dass Grp170 selbst ATP binden kann. Dies konnte später auch direkt durch die Bindung von Grp170 an ATP-Agarose in Abwesenheit von BiP bestätigt werden. Ob Grp170 ATP nicht nur bindet, sondern auch hydrolysiert, also eine funktionale ATPase besitzt, konnte hiermit aber nicht geklärt werden.

4.2.2 Grp170 stimuliert den Nukleotidaustausch von BiP

Auch Lhs1p, das Hefe-Homolog von Grp170, interagiert mit Kar2p, wobei die beiden Proteine ihre Aktivitäten koordiniert regulieren (Steel et al., 2004). Lhs1p wirkt dabei als Nukleotidaustauschfaktor, indem es den Nukleotidaustausch bei Kar2p beschleunigt. Im Gegenzug wird die ATPase-Aktivität von Lhs1p durch Kar2p aktiviert. Diese Stimulation der Lhs1p-ATPase ist nicht von der Bindung der beiden Proteine abhängig, sondern von

der ATPase-Aktivität von BiP. Die beiden ATPasen sind also miteinander gekoppelt. Allgemein führt die Interaktion von J-Proteinen mit Hsp70-Proteinen zu einer Stimulation von deren schwacher, intrinsischer ATPase-Aktivität. Dies gilt auch für die J-Proteine des ER und ihren Hsp70-Partner BiP, was in dieser Arbeit auch bestätigt werden konnte. ATPase-Versuche unter „steady state“-Bedingungen, bei denen die ATP-Hydrolyse von Grp170 in An- und Abwesenheit der J-Domäne von ERj1p bestimmt wurde, zeigten, dass Grp170 keine oder eine sehr geringe intrinsische ATPase-Aktivität besitzt. Zugabe von ERj1-J führte bei diesem Versuch nicht zu einem signifikant höheren ATP-Umsatz. Die ATPase von Grp170 ist also im Gegensatz zu BiP durch ERj1-J nicht stimulierbar. Auch bei Lhs1p wurde von einer sehr geringen intrinsischen ATPase-Aktivität berichtet, die durch die J-Domäne von Sec63p nicht beeinflusst wird (Steel et al., 2004). Wurde BiP zusammen mit Grp170 im ATPase-Versuch inkubiert, lag die ATP-Hydrolyserate nicht über der intrinsischen Hydrolyserate von BiP. Dies zeigt, dass weder die ATPase von BiP noch diejenige von Grp170 stimuliert wurde. Wurde dagegen BiP zusammen mit einer J-Domäne sowie Grp170 im ATPase-Versuch unter „steady state“-Bedingungen eingesetzt, kam es zu einer deutlichen Steigerung des ATP-Umsatzes im Vergleich zu der ATP-Hydrolyserate, die durch J-stimuliertes BiP erreicht wurde. Die Versuche wurden mit den J-Proteinen ERj3p und ERj4p, sowie den J-Domänen von ERj1p und ERj2p durchgeführt. Dabei wurde in Verbindung mit den J-Domänen von ERj1p und ERj2p ein sehr großer Effekt durch Grp170 beobachtet, während dieser Effekt mit den J-Proteinen ERj3p und ERj4p nicht so deutlich ausfiel. Die Ursache für den zum Teil sehr starken Anstieg des ATP-Umsatzes konnte mit diesen Versuchen jedoch nicht geklärt werden. Da bei den Versuchen mit Grp170 und BiP zwei Proteine mit einer ATPase-Domäne zugegen waren, konnte zum einen nicht beantwortet werden, welches Protein für den Effekt verantwortlich war. Zum anderen war auch unklar, welcher Schritt im ATPase-Zyklus von BiP oder Grp170 beeinflusst wurde. So war sowohl eine Beschleunigung der ATP-Hydrolyse oder aber eine Beschleunigung des Nukleotidaustausches bei einem der Proteine oder bei beiden Proteinen denkbar. Um die Ursache des erhöhten ATP-Umsatzes in Gegenwart von Grp170 zu ergründen, wurden Nukleotidaustauschexperimente mit BiP sowie mit Grp170 durchgeführt, bei denen die Freisetzung und Hydrolyse von markiertem Nukleotid verfolgt wurden. Hiermit war es möglich sowohl den Nukleotidaustausch, wie auch die ATP-Hydrolyse von beiden Proteinen getrennt zu betrachten. Es stellte sich heraus, dass die Umwandlung von BiP:ATP zu BiP:ADP durch Grp170 nicht beeinflusst wurde, wohl aber der Austausch von ADP gegen ATP. Dies war sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit der J-Domäne von ERj1p der Fall. Das Resultat des „steady-state“-ATPase-Versuches, nach dem der ATP-Umsatz von BiP durch Grp170 nicht angehoben wird, stellt scheinbar eine Diskrepanz zu der Beobachtung des Nukleotidaustausches dar. Dies kann

aber damit erklärt werden, dass die ATP-Hydrolyse im ATPase-Zyklus von BiP den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt darstellt und sich dadurch ein Effekt durch den Nukleotidaustausch nicht bemerkbar macht. Somit ist Grp170, neben BAP, ein weiteres Protein im Säuger-ER, das den Nukleotidaustausch bei BiP positiv beeinflusst. Die Existenz von zwei Nukleotid-austauschfaktoren im ER erklärt die Tatsache, dass eine Zerstörung des Gens von BAP zwar die UPR aktiviert, nicht aber letal wirkt (Zhao et al., 2005). Anscheinend kann Grp170 unter diesen Bedingungen teilweise die Aufgabe von BAP übernehmen. Da in den durchgeführten Experimenten die beobachteten Effekte von Grp170 und BAP, trotz einer wesentlich geringeren Konzentration an Grp170, in etwa gleich waren, kann vermutet werden, dass Grp170 der effektivere Nukleotid-austauschfaktor ist.

4.2.3 Stimulation der Grp170-ATPase

Bei der Betrachtung des Nukleotidstatus von Grp170 konnten zunächst die im ATPase-Versuch gemachten Beobachtungen bestätigt werden: Grp170 besitzt keine oder nur eine sehr geringe intrinsische ATPase-Aktivität, die weder durch eine J-Domäne noch durch BiP nennenswert stimuliert wird. Dies änderte sich allerdings, sobald Grp170 gleichzeitig mit BiP und einer J-Domäne inkubiert wurde. Unter diesen Bedingungen wurde die ATP-Hydrolyse von Grp170 ca. vierfach beschleunigt. Diese Ergebnisse unterscheiden sich zum Teil von den von Steel et al. (2004) gemachten Beobachtungen im Hefesystem. Von ihnen wurde beschrieben, dass die ATP-Hydrolyse-Aktivität von Lhs1p ebenfalls bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kar2p und einer J-Domäne stimuliert wird. Allerdings wurde diese Stimulation auch durch Kar2p alleine, ohne die Anwesenheit einer J-Domäne, beobachtet. Da die Stimulation der ATPase von Grp170 nur in Anwesenheit einer J-Domäne stattfand, wurde in einem Bindungsversuch getestet, ob Grp170 in Anwesenheit von BiP und ATP an die J-Domäne binden kann. Bei diesem Experiment konnte jedoch nur die bekannte BiP/J-Interaktion bei vorhandenem ATP beobachtet werden und keine Interaktion von Grp170 mit der J-Domäne. Es scheint also, als wenn Grp170 nur mit BiP interagiert, nicht aber mit der J-Domäne. Die Stimulation der ATPase-Aktivität von Grp170 müsste somit durch BiP erfolgen, welches zuvor durch eine J-Domäne selbst aktiviert wurde. Für diese Stimulation könnte entweder die ATP-Hydrolyse durch BiP oder die Bindung eines Substrates durch BiP verantwortlich sein. Unter der Voraussetzung einer potentiellen Bindung von J-Domänen in der Substratbindungsstelle

von BiP bei Abwesenheit eines Substrates (Misselwitz et al., 1999), sind beide Möglichkeiten denkbar.

Für die beobachtete ATP-Hydrolyse von Grp170 bei gleichzeitiger Anwesenheit von BiP und einer J-Domäne ist allerdings noch eine andere Erklärung denkbar: basierend auf der Tatsache, dass Grp170 als Nukleotidaustauschfaktor fungiert, könnte es, wenn es mit BiP interagiert, sein eigenes ATP-Molekül auf BiP übertragen, wo es dann zur Hydrolyse kommt. Dies würde bedeuten, dass Grp170 selbst keine ATPase-Aktivität, sondern nur die Fähigkeit ATP zu binden, besitzt. Die fehlende ATP-Hydrolyse in Abwesenheit der J-Domäne widerspricht eigentlich dieser Annahme, jedoch ist es möglich, dass die ATP-Hydrolyse durch BiP ohne die stimulierende Wirkung der J-Domäne zu langsam abläuft, um in der kurzen Zeitspanne des Versuches einen Effekt zu erzielen. Der ATP-Transfer von Grp170 auf BiP würde einen neuen Mechanismus des Nukleotidaustausches darstellen. Die bisher bekannten Nukleotidaustauschfaktoren, wie HspBP1 oder BAG1, binden an die ATPase-Domäne von BiP und induzieren dort eine strukturelle Veränderung, welche die Affinität für das gebundene Nukleotid herabsetzt und seine Freisetzung begünstigt (Shomura et al., 2005). Im Falle der Beobachtungen von Steel et al. (2004) kann für Lhs1p solch ein direkter Transfer von ATP auf BiP jedoch ausgeschlossen werden, da hier eine Lhs1p-vermittelte ATP-Hydrolyse sowohl mit als auch ohne J-Domäne im gleichen Umfang beobachtet wurde. Käme es hier zu einem ATP-Transfer von Lhs1p auf Kar2p, müsste in Anwesenheit der J-Domäne aufgrund ihrer stimulierenden Wirkung auf die ATPase von Kar2p, ein stärkerer ATP-Umsatz zu beobachten sein.

Park et al. (2003) konnten zeigen, dass eine Grp170-Mutante mit deletierter ATPase-Domäne in der Lage war, die Aggregation von denaturierter Luciferase in gleichem Maße zu verhindern wie das Wildtyp-Protein. Offensichtlich scheint also die ATPase-Domäne für die Funktion, bzw. für eine bestimmte Funktion von Grp170 gar nicht notwendig zu sein. Hierbei spielt Grp170 aber eher eine passive Rolle, da es die denaturierten Proteine lediglich in einem faltungskompetenten Zustand hält, aber nicht in der Lage ist, eine Rückfaltung zu bewerkstelligen. Hierzu sind weitere Proteine sowie ATP notwendig. Die Tatsache, dass die ATPase-Domäne für diese Funktion von Grp170 nicht benötigt wird, könnte dafür sprechen, dass die ATPase nicht funktional ist und nur die Aufgabe einer ATP-Bindung übernimmt. Möglicherweise besitzt Grp170 aber noch andere Funktionen, die eventuell auch eine ATPase-Funktion benötigen.

Grp170 wurde zusammen mit BiP, Grp94, Protein Disulfid Isomerase (PDI) und anderen Faltungsenzymen in einem großen Multiproteinkomplex gefunden, der mit nicht-assemblierten und unvollständig gefalteten schweren Ketten von Immunglobulinen assoziieren kann (Meunier et al., 2002). Da sich der Komplex auch in Abwesenheit einer

Proteinsynthese gebildet hatte, wurde angenommen, dass ein Teil der vorhandenen Chaperone in solchen Netzwerken organisiert sind und als Komplex mit Substraten assoziieren. Der Nukleotidaustauschfaktor BAP konnte in diesem Komplex nicht nachgewiesen werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass Grp170 in diesem Komplex die Rolle des Nukleotidaustauschfaktors von BiP übernimmt. Das Hsp40-Homolog ERj3p wurde in diesem Komplex nur gefunden, wenn dieser mit dem Substrat assoziiert vorlag. Unter diesen Bedingungen könnten sich BiP und Grp170 gegenseitig stimulieren und so ihre größtmögliche Aktivität entfalten.

4.2.4 Modell für eine mögliche Wirkungsweise von Grp170 bei der Proteinfaltung und Translokation

Abb. 4-2 zeigt ein mögliches Modell für die Funktion von Grp170 bei der Faltung/Assemblierung von neusynthetisierten und/oder bei der Rückfaltung von denaturierten Proteinen. Dabei hält Grp170 das Substratprotein durch seine Bindung in einem faltungskompetenten Zustand und verhindert dadurch eine Aggregation. Die Faltung bzw. Rückfaltung des Substratproteins wird in diesem Modell durch das BiP/Hsp40-System vermittelt, das zu diesem Zweck mit Grp170 zusammenarbeitet.

Der Grp170-Zyklus beginnt mit der Bindung von Grp170 an ein Substratprotein (Pos. 1). Zusätzlich kommt es zu einer J-vermittelten Bindung von BiP an eine andere Stelle des Substrates (Pos. 2-4). Alternativ kann Grp170 auch an ein bereits von BiP gebundenes Substrat binden (Pos. 4^{*}). In dem nach J-Aktivierung erreichten ADP-Zustand von BiP ist Grp170 in der Lage mit diesem zu interagieren. Es kommt zur Stimulation der Grp170-ATPase, wodurch Grp170·ADP entsteht, und zur Stimulation des Austausches von ADP gegen ATP bei BiP, so dass wieder die Konformation mit offener Substratbindungstasche regeneriert wird (Pos. 5). Dies hat zur Folge, dass BiP das Substrat verlässt. Nachdem Grp170 ein neues ATP-Molekül gebunden hat kann der Zyklus von neuem ablaufen oder Grp170 dissoziiert vom Substrat, falls dessen native Faltung erreicht wurde (Pos. 6).

Bei der Translokation von Vorstufen über das Sec61-Translokon scheint neben BiP auch Grp170 involviert zu sein (Dierks et al., 1996). In Hefe führt das Fehlen von Lhs1p zu einem Translokationsdefekt bei verschiedenen sekretorischen Vorstufenproteinen (Craven et al., 1996). Damit Grp170 eine Rolle bei der Translokation übernehmen kann, müsste es direkt am Sec61-Komplex positioniert sein. Hierzu könnte es eine substratartige Bindung mit einem luminalen Loop des Sec61-Komplexes eingehen. Grp170 würde sich dann in unmittelbarer Nähe zu BiP, das die Translokationspore

verschließt, befinden und könnte somit mit diesem interagieren. Eines der beiden, mit dem Sec61-Komplex assoziierten J-Proteine (ERj1p oder ERj2p), könnte bei dieser Interaktion, entsprechend des vorgeschlagenen Modells, ebenfalls eine Rolle spielen.

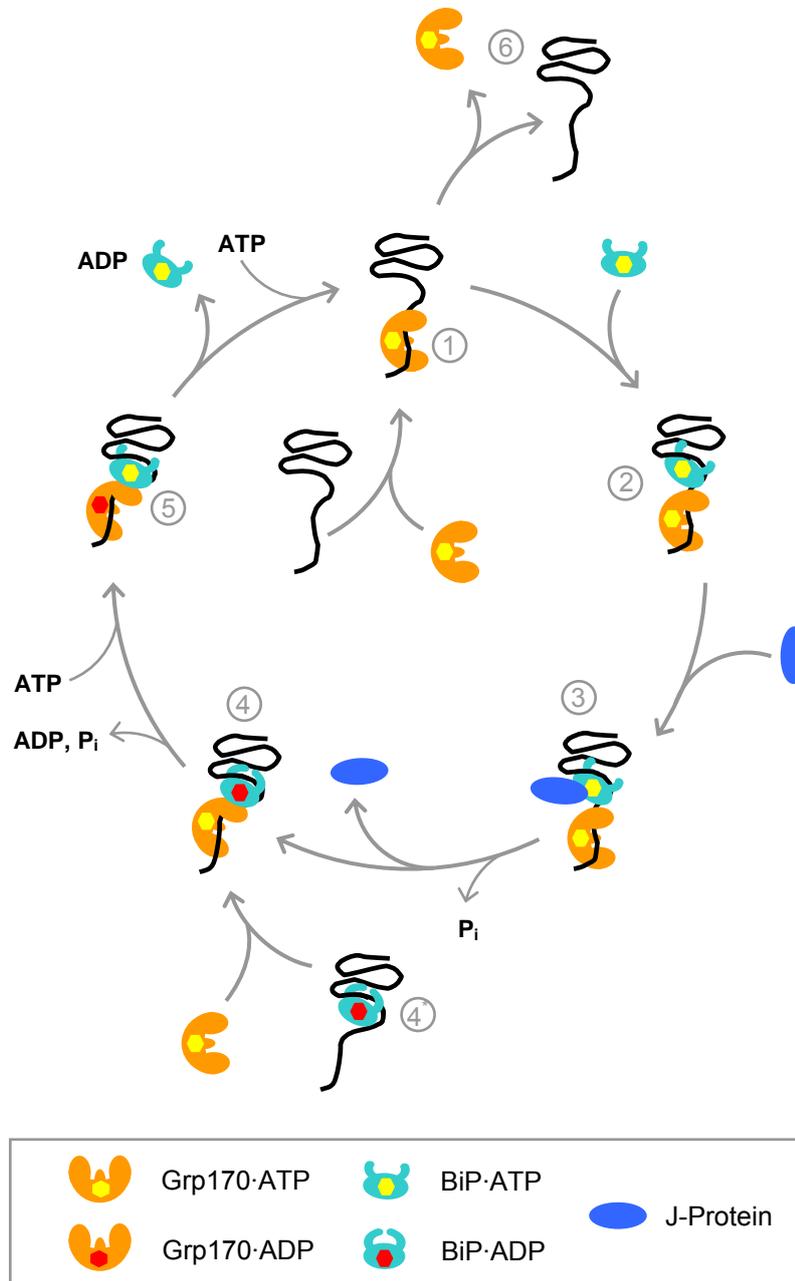


Abb. 4-2: Modell für das Zusammenspiel von Grp170 mit dem BiP/Hsp40-System bei der Faltung/Assemblierung von neusynthetisierten Proteinen und bei der Rückfaltung von denaturierten Proteinen. Erklärung siehe Text.

4.3 Der Nukleotidaustauschfaktor BAP

Das Protein BAP (BiP associated protein) wurde von Chung et al. (2002) als Nukleotidaustauschfaktor von BiP beschrieben. Dabei führte die Anwesenheit von BAP zu einer ca. zweifachen zusätzlichen Stimulation der durch die ERj4-J-Domäne stimulierten BiP-ATPase. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BAP auch in Verbindung mit den J-Domänen der Membran-verankerten Hsp40-Proteinen ERj1p und ERj2p die ATPase von BiP zusätzlich beschleunigt. Als zusätzlicher Effekt wurde dabei eine 2,37 fache bzw. eine 2,19 fache Stimulation erreicht. BAP konnte in RMs nur in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden (siehe Tab. 4-1). Da Grp170, das nach den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls als Nukleotidaustauschfaktor wirkt, in deutlich höherer Konzentration gefunden wurde, handelt es sich bei diesem vermutlich um den dominierenden Nukleotidaustauschfaktor. Im Vergleich mit BiP ist die Konzentration von Grp170 allerdings immer noch zehnfach geringer. Da Grp170 zusammen mit BiP und anderen Chaperonen in einem Multiproteinkomplex gefunden wurde (Meunier et al., 2002), ist es vorstellbar, dass in der lebende Zelle alles Grp170 im Komplex mit BiP vorliegt. BAP könnte dagegen möglicherweise als freier Austauschfaktor bei Bedarf mit BiP interagieren.

4.4 Die Hsp40-Homologen ERj4p und ERj5p

ERj4p wurde von Shen et al. (2002) als in der ER-Membran verankertes Hsp40-Homolog beschrieben, dessen luminale J-Domäne mit BiP interagiert. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit mit der Methode der Carbonatextraktion, mit der Membran-verankerte von löslichen und membranassoziierten Proteinen getrennt werden können, bestätigt werden. Obwohl das Vorhandensein von ERj4 in den in unserem Labor präparierten RMs somit nachgewiesen werden konnte, war es nicht möglich eine Quantifizierung vorzunehmen. Hierzu war entweder die Konzentration an ERj4p in den RMs zu gering und/oder die verwendeten Antikörper für eine eindeutige Detektion nicht gut genug. Nach Kurisu et al. (2003) wird ERj4p unter ER-Stress-Bedingungen induziert, was eine Erklärung für das geringe Vorkommen in den RMs sein könnte. Die mittels SPR bestimmte K_D zeigt mit 6 μM die niedrigste Affinität aller ER-J-Proteine für die Interaktion

mit BiP (vgl. Tab. 4-1). Auch die Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP ist am geringsten (1,59 fache Stimulation) von allen Hsp40-Homologen des ER. Diese beiden Werte in Verbindung mit der geringen Konzentration in den RM-Membranen lassen die Vermutung zu, dass ERj4 unter normalen Bedingungen keine große Rolle für die Funktion von BiP spielt. Dies wird sich jedoch ändern, sobald das Protein aufgrund von ER-Stress hochreguliert wird, wobei es dann eine Rolle bei der Stabilisierung von BiP/Substrat-Bindungen in einer J-Domänen-abhängigen Weise spielen und so die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER verhindern könnte.

Die Bestimmung der Affinität der J-Domäne von ERj5p lieferte eine K_D von 0,59 μM . Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der zuvor bestimmte Wert von 0,45 μM für das vollständige Protein. Für ERj3p wurden K_D -Werte sowohl für die J+G/F-Domäne als auch für das komplette Protein bestimmt. Auch in diesem Fall stimmen die berechneten Werte von 3,5 μM und 3,6 μM fast überein. Dies deutet darauf hin, dass der Proteinabschnitt außerhalb der J-Domäne für die Bindung an BiP nicht entscheidend ist. Die J-Domäne selbst bzw. ein bestimmter Abschnitt der J-Domäne könnte, nach Aktivierung von BiP durch Interaktion mit der ATPase-Domäne, in der Substratbindungstasche gebunden werden. Da alle Affinitätsbestimmungen im Biacore-System mit GST-getaggten Fusionsproteinen durchgeführt wurden, ist es auch denkbar, dass BiP nach seiner Aktivierung durch die J-Domäne, an den GST-tag des jeweiligen Fusionsproteins gebunden hat und die Affinität von der Aktivierung durch die jeweilige J-Domäne abhängt.

4.5 Zusammenfassung der Interaktionsdaten des Hsp70-Chaperon-Systems des Säuger-ER's

Das Hsp70-Chaperonsystem des rauen Endoplasmatischen Retikulums aus Hundepankreas-Gewebe wurde in den vergangenen Jahren im Rahmen mehrerer Arbeiten charakterisiert. Dabei wurden die verschiedenen Proteine in rauen Mikrosomen quantifiziert und ihre Interaktionen untereinander mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie und ATPase-Experimenten untersucht. Die gesammelten Ergebnisse sind in Tab. 4-1 zusammengestellt, wobei die während dieser Arbeit gewonnenen Daten grün unterlegt sind.

Tab. 4-1: Zusammenfassung der Interaktionsdaten der Hsp70-Chaperone des Säuger-ER's und ihren Cochaperonen. Die grün unterlegten Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit gewonnen, die anderen Daten stammen aus früheren Arbeiten (Tyedmers et al., 2000; Dudek et al., 2002; Bies, Dissertation, 2002). nb: nicht bestimmt

	Konz. in RM-Suspension [μM]	rekombinantes Protein	Affinität für BiP bei Anwesenheit von ATP (K_D [μM])	Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP (fach)	weitere Stimulation durch	
					Grp170	BAP
BiP	5,00	BiP-His ₆ (20-655)	---	---	---	---
Grp170	0,50	---	nb	keine	---	---
ERj1p	0,36	GST-J (44-140)	0,12	5,17	5,6	2,37
ERj2p	1,98	GST-J (91-189)	5,00	3,53	5,7	2,19
ERj3p	0,29	GST-ERj3 (18-336)	3,60	1,84	1,9	1,33
		GST-J+G/F (18-119)	3,50	nb	nb	nb
ERj4p	nb	GST-ERj4 (23-222)	6,07	1,59	1,5	nb
ERj5p	2,00	GST-ERj5 (26-793)	0,45	3,87	nb	1,11
		GST-J (26-113)	0,59	1,84	nb	keine
BAP	0,005	GST-BAP (39-461)	nb	keine	---	---

4.6 Charakterisierung der BiP/J-Interaktion

Bei dem in der ER-Membran von Hefe bis Säugern vorkommenden Sec63p, handelt es sich um ein Typ III Hsp40-Homolog, das eine im ER-Lumen lokalisierte J-Domäne besitzt. Experimente mit der als GST-Fusion gereinigten J-Domäne von Sec63p haben Einblicke in den Mechanismus der Interaktion mit dem luminalen Hsp70-Chaperon BiP gebracht. So konnte gezeigt werden, dass die J-Domäne von Sec63p aus der Hefe *S. cerevisiae* eine ATP-abhängige Bindung an BiP vermittelt und dessen ATPase-Aktivität stimuliert (Corsi und Scheckman, 1997). Die Interaktion zwischen BiP und der J-Domäne scheint dabei infolge der schnellen, durch die J-Domäne induzierten ATP-Hydrolyse, sehr kurzlebig zu sein, so dass ein Komplex aus J-Domäne, BiP und ATP nicht detektiert werden kann. Bei Anwesenheit eines Substrates wird BiP zu dem Substrat transferiert, woraufhin das Erreichen des ADP-Zustandes zu dessen fester Bindung führt. Der finale Komplex dieser Reaktionsabfolge enthält nicht die J-Domäne, sondern besteht aus BiP, ADP und Substrat. In Abwesenheit eines Substrates kommt es dagegen zur Bildung eines stabilen

Komplexes aus J-Domäne, BiP und ADP, wobei die J-Domäne anscheinend in gleicher Weise wie ein Peptid-Substrat an BiP bindet und die Peptidbindungstasche besetzt (Misselwitz et al., 1998 und 1999).

Um die funktionellen Voraussetzungen für eine BiP/J-Interaktion zu untersuchen, wurden verschiedene BiP-Mutanten auf ihre Fähigkeit, eine Bindung mit der J-Domäne von humanem ERj2p/Sec63p einzugehen, getestet. Die dabei verwendeten Mutanten sind nachfolgend aufgeführt:

- G227D: verminderte ATP-Bindung
- T229G: kann ATP nicht hydrolysieren
- T37G: führt die ATP-induzierte Konformationsänderung nicht aus
- R197H: interagiert nicht mit dem HPD-Motiv der J-Domäne
- K44: 44 kDa ATPase-Fragment

In den Bindungsstudien zeigte lediglich die BiP(G227D)-Mutante eine ATP-abhängige Bindung zu der an GSH-Sepharose immobilisierten J-Domäne. Dies ist mit einer nicht gänzlich blockierten ATP-Bindung dieser Mutante zu erklären. Bei allen anderen Mutanten war keine Bindung an die J-Domäne zu erkennen. Dies deutet wie die Ergebnisse von Misselwitz et al. (1998) auf eine biphasische Interaktion hin, wobei eine stabile Bindung in der Substratbindungstasche von BiP erfolgt. Dementsprechend zeigt das K44-Fragment, bei dem die Substratbindungsdomäne fehlt, dass die ATPase-Domäne für eine stabile BiP/J-Interaktion nicht ausreicht. Bei der Untersuchung zur Stimulierbarkeit der isolierten ATPase-Domänen von BiP und Hsc70 zeigte sich, dass beide ATPase-Fragmente durch eine J-Domäne nicht stimulierbar sind. Obwohl die Stimulation der ATPase von Hsp70-Proteinen durch eine Interaktion der J-Domäne mit der ATPase-Domäne selber vermittelt wird (Feldheim et al., 1992; Wall et al., 1994), scheint diese Interaktion alleine nicht zu genügen. Dies stimmt mit den Resultaten von Gässler et al. (1998) überein, die zeigen konnten, dass die isolierte ATPase-Domäne von *E. coli* DnaK weder an DnaJ bindet noch durch dieses stimuliert wird.

Die Mutante R197H besitzt einen AS-Austausch innerhalb der ATPase-Domäne, der die Interaktion mit dem J-Domänen typischen HPD-Motiv verhindert. In ATPase-Versuchen zeigte sich, dass die ATPase dieser Mutante durch ein Peptidsubstrat stimulierbar ist, genau wie es auch für Wildtyp-BiP beschrieben wurde (Misselwitz et al., 1998). Dagegen konnte die verwendete J-Domäne auch hier keinen stimulierenden Effekt ausüben. Die fehlende Bindung dieser Mutante an die J-Domäne zeigt, dass eine stabile Bindung nur stattfinden kann, wenn zuvor die ATP-Hydrolyse durch Interaktion des HPD-Motivs mit der ATPase-Domäne aktiviert wurde, und damit die Substratbindungstasche in die hochaffine,

geschlossene Konformation gebracht wurde. Dies lässt vermuten, dass die J-Domäne in der Substratbindungstasche, ähnlich wie ein Substrat, gebunden wird, und dass eine Interaktion der J-Domäne an zwei Stellen von BiP erfolgen muss. Auch die fehlende J-Bindung und –Stimulation der isolierten ATPase-Domänen deutet auf eine biphasische Bindung hin. Dabei wäre es denkbar, dass zwei unabhängige Bindungsinteraktionen simultan zwischen zwei verschiedenen Oberflächen der J-Domäne und zwei verschiedenen Oberflächen des Hsp70-Proteins erfolgen. Neben der bekannten Interaktion der Hsp70-ATPase mit dem HPD-Motiv der J-Domänen (Gässler et al., 1998; Green et al., 1998), gibt es Hinweise, dass auch ein bestimmtes Motiv (QKRAA) in Helix IV der J-Domäne von DnaJ, dessen Lysin- und Arginin-Reste konserviert in den meisten J-Domänen vorkommen, für die Interaktion mit DnaK notwendig ist (Auger und Roudier, 1997). Es wurde vorgeschlagen, dass dieses Motiv eine Bindungsstelle für die Interaktion von DnaJ mit DnaK sein könnte, indem es mit der Substratbindungsstelle interagiert (Suh et al., 1999). Nach ATP-Hydrolyse und dem Erreichen der geschlossenen Konformation der Substratbindungstasche, wäre die J-Domäne fest in dieser gebunden. Auch die nicht vorhandene Bindung der T229G und T37G Mutanten an die J-Domäne sprechen für eine Substrat-ähnliche Bindung der J-Domäne. Die T229G Mutante ist unfähig ATP zu hydrolysieren und kann somit die ADP-Konformation mit geschlossener Substratbindungstasche nicht erreichen. Die J-Domäne kann zwar mit ihrem HPD-Motiv mit der ATPase-Domäne transient interagieren, kann aber nicht dauerhaft in der Substratbindungsstelle gebunden werden. Die T37G Mutante kann dagegen die ATP-induzierte Konformationsänderung nicht durchführen. Bei ihr befindet sich die Substratbindungstasche ständig in der geschlossenen Konformation, wodurch die J-Domäne nicht hinein gelangen kann.

Wenn bei der Hsp70/Hsp40-Interaktion die J-Domäne die Substratbindungsstelle des Hsp70-Proteins besetzt, stellt sich die Frage, wie es dann überhaupt zu einer Substratbindung kommen kann. Zunächst muss bedacht werden, dass sich die Bedingungen in der lebenden Zelle stark von den Bedingungen in den Bindungs- und ATPase-Experimenten unterscheiden. In den durchgeführten Versuchen waren zum einen, im Gegensatz zu der *in vivo*-Situation, keine Hsp70-Substrate anwesend und zum anderen war die J-Konzentration im Vergleich zur Hsp70-Konzentration sehr viel höher als dies *in vivo* der Fall ist. Da in der lebenden Zelle ständig eine hohe Konzentration an Substratproteinen vorhanden ist und auch verschiedene J-Proteine selber in der Lage sind Substrate zu binden und diese an ein Hsp70-Chaperon weiterzuleiten, ist es denkbar, dass unter diesen Bedingungen eine Bindung der J-Domäne in der Hsp70-Substratbindungstasche nicht vorkommt oder nur bei bestimmten Hsp40/Hsp70-Kombinationen eine Rolle spielt. Hierauf deuten auch die Daten von Misselwitz et al.

(1999) hin, die zeigen konnten, dass ein vorhandenes Peptidsubstrat die Bindung der Sec63-J-Domäne an BiP verhindern kann, ohne die J-vermittelte Stimulation der ATPase zu beeinflussen. Ob es bei der J-Aktivierung des Hsp70-Proteins, die zur Bindung eines Substrates führt, nur zu einer einfachen Interaktion der J-Domäne mit der ATPase-Domäne, oder auch hier zu einer zusätzlichen transienten Interaktion mit der Substratbindungsdomäne kommt, kann nicht beantwortet werden. Eine mögliche Funktion einer Substrat-ähnlichen Bindung von J-Domänen könnte in der Verhinderung unproduktiver Bindungen von Hsp70-Proteinen mit z.B. Peptidfragmenten aus Abbaureaktionen liegen. Hierbei könnte dann die Affinität der J-Domäne und eines potentiellen Substrates darüber entscheiden, ob das Substrat die J-Domäne aus der Substratbindungstasche verdrängen kann und anschließend selber gebunden wird. Eine feste Bindung zwischen Hsp40- und Hsp70-Proteinen könnte bei membranverankerten J-Proteinen eine Rolle spielen, indem das Hsp70-Protein an einer lokalen Position gehalten wird und an dieser für eine bestimmte Aufgabe zur Verfügung steht. Dies könnte beim BiP-vermittelten Verschluss der Sec61-Translokationspore in der ER-Membran der Fall sein, ein Vorgang bei dem auch ein Hsp40-Protein involviert ist (Alder et al., 2005).

4.7 Spezifität der Hsp70/Hsp40-Interaktion

Das Endoplasmatische Retikulum ist ein separates Kompartiment innerhalb der eukaryontischen Zelle, welches fünf Hsp40-Proteine enthält, die alle in der Lage sind mit dem gleichen Hsp70-Protein zu interagieren. Die Tatsache, dass das ER für bestimmte Aufgaben spezialisiert und vom Cytosol abgegrenzt ist, führt zu der Möglichkeit, dass sich seine Hsp70- und Hsp40-Chaperone von Chaperonen anderer Zellkompartimente, hinsichtlich ihres Interaktionsmechanismus und der Spezifität ihrer Interaktionen untereinander, unterscheiden. Ein Indiz hierfür stellen die Ergebnisse von Schlenstedt et al. (1995) dar, die mittels Domänenaustausch-Experimenten zeigten, dass die J-Domänen eines cytosolischen und eines mitochondrialen Hsp40, die J-Domäne eines Hsp40 aus dem ER nicht funktional ersetzen können. Da bei den meisten Hsp40-Homologen zwischen den Proteinabschnitten außerhalb der J-Domäne nur eine geringe Ähnlichkeit vorhanden ist und bei verschiedenen membranverankerten Hsp40-Proteinen nur die J-Domäne für eine Interaktion mit einem Hsp70 zur Verfügung steht, kann die Spezifität der Bindung eines Hsp70 mit seinem Hsp40-Partner nur durch die J-Domäne vermittelt

werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von J-Proteinen/-Domänen aus dem ER mit dem cytosolischen Hsc70, sowie von dem cytosolischen MIDA1 mit dem ER-Hsp70, BiP, betrachtet. Außerdem wurde die Interaktionsfähigkeit des Hefe-Homologs von BiP, Kar2p, mit den J-Domänen von ERj1p und ERj2p aus dem Säuger-ER untersucht.

Die Untersuchungen zur Interaktion verschiedener Hsp40-Homologen des ER mit dem cytosolischen Hsp70-Homolog Hsc70 führten in allen Fällen zu einem positiven Ergebnis mit der Schlussfolgerung, dass sich diese Interaktionen nicht von ER-internen Hsp70/Hsp40-Interaktionen unterscheiden. Diese Folgerung beruht auf folgenden experimentellen Daten: Erstens konnte mit an GSH-Sepharose immobilisierten Fusionsproteinen gezeigt werden, dass ERj3p sowie die J-Domänen von ERj1p und ERj2p in Anwesenheit aber nicht in Abwesenheit von ATP an Hsc70 binden. Dieses ATP-abhängige Bindungsverhalten ist typisch für eine Hsp70/Hsp40-Interaktion. Zweitens konnte unter gleichen Bedingungen keine Bindung der isolierten ATPase-Domäne und Substratbindungsdomäne von Hsc70 an die J-Proteine beobachtet werden. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass auch für die isolierte ATPase-Domäne von BiP keine J-Interaktion nachgewiesen werden konnte, und dass eine potentielle Bindung mit der Substratbindungsdomäne nur nach Interaktion mit der ATPase-Domäne stattfinden kann. Drittens konnte in ATPase-Experimenten eine Stimulation der ATPase-Aktivität von Hsc70 durch ERj3p und ERj4p sowie durch die J-Domänen von ERj1p und ERj2p nachgewiesen werden. Auch dies ist in Übereinstimmung mit der Stimulation von BiP durch die gleichen J-Proteine. Die intrinsische ATPase-Aktivität von Hsc70, die wesentlich geringer war als diejenige von BiP, konnte durch die J-Proteine in weitaus größerem Umfang stimuliert werden als dies durch die gleichen J-Proteine bei BiP der Fall war. So kam es z.B. bei Anwesenheit von ERj1J zu einer 15 fachen Stimulation der Hsc70-ATPase, aber nur zu einer fünffachen Stimulation der BiP-ATPase. ERj4p verursachte sogar eine 23 fache Stimulation von Hsc70, aber nur eine 1,6 fache Stimulation von BiP. Auch bei der Interaktion von Hsc70 mit seinen cytosolischen Hsp40-Partnern ist keine solche ungewöhnlich hohe ATPase-Stimulation bekannt. So stimuliert das cytosolische Hdj1p die Hsc70-ATPase um den Faktor sechs (Minami et al. 1996), und die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Stimulation durch MIDA1 erreichte lediglich den Faktor 2,3. Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Interaktion der Hsp40-Homologen des ER mit Hsp70-Proteinen um einen universellen Mechanismus handelt. Dieser befähigt sie auch mit Hsc70, mit dem sie *in vivo* aufgrund der räumlichen Trennung nicht in Kontakt treten können, in funktioneller Weise zu interagieren. Das bedeutet allerdings nicht, dass in der lebenden Zelle die Funktion eines bestimmten Hsp70-Proteins durch ein fremdes Hsp70-Protein aus einem anderen

Zellkompartiment übernommen werden könnte. So deutet die ungewöhnlich hohe Stimulation der Hsc70-ATPase durch die Hsp40-Proteine aus dem ER auf eine fehlende Feinabstimmung zwischen den interagierenden Proteinen hin. Eine derart hohe Stimulation würde möglicherweise die Funktionen von Hsc70 in der lebenden Zelle negativ beeinflussen.

Ein umgekehrter Fall, die Interaktion des cytosolischen Hsp40-Homologs MIDA1, mit BiP aus dem ER, wurde ebenfalls untersucht. Auch hier konnte eine ATP-abhängige Bindung nachgewiesen werden. Die Funktionalität dieser Interaktion konnte hier ebenfalls durch eine Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP (3,5 fach) belegt werden. Bei der Bestimmung der Affinität der BiP/MIDA1-Bindung mittels SPR wurde ein K_D -Wert von 2,68 μM erhalten. Dieser Wert befindet sich im gleichen Größenbereich wie die, für die Interaktion von BiP mit seinen ER-Hsp40-Partnern ermittelten, K_D -Werte (vgl. Tab. 4-1). Diese Daten zeigen, dass BiP offensichtlich in der gleichen Weise mit dem cytosolischen MIDA1 interagiert, wie es dies mit seinen natürlichen Hsp40-Partnern im ER tut. Eine Spezifität bei der Hsp70/Hsp40-Interaktion, welche die Interaktion von nur bestimmten Hsp70/Hsp40-Paaren zulässt, und die sich durch die räumliche Abgrenzung von Proteinen durch die Zellkompartimente innerhalb der eukaryontischen Zelle entwickelt haben könnte, ist bei den hier untersuchten Hsp70/Hsp40-Paaren nicht zu erkennen.

Neben den verschiedenen Hsp70/Hsp40-Kombinationen aus unterschiedlichen Zellkompartimenten, wurde auch die mögliche Interaktion von Kar2p, des Hefe-Homologs von BiP, mit den Säuger-Hsp40-Proteinen ERj1p und ERj2p untersucht. Diese Kombinationen waren insofern interessant, da Alder et al. (2005) von einer Unfähigkeit von Kar2p berichtet hatten, die Funktion von BiP beim Verschließen der Translokationspore in Säuger-RMs zu übernehmen. Kar2p übt sogar einen dominant-negativen Effekt auf das Verschließen der Pore aus, wenn es gemeinsam mit BiP zugegen ist. Eine mögliche Ursache für die Unfähigkeit von Kar2p die Translokationspore zu verschließen, könnte in einer fehlenden Interaktionsfähigkeit mit einem Hsp40-Protein begründet sein, wobei ERj1p oder ERj2p als wahrscheinlichster Interaktionspartner in Betracht kommen. Es stellte sich heraus, dass Kar2p in der Lage ist, an die J-Domänen beider Proteine zu binden. Dies geschah aber sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von ATP, was kein typisches Bindungsverhalten für eine Hsp70/Hsp40-Interaktion ist. Dennoch muss von einer funktionellen Interaktion ausgegangen werden, da in den durchgeführten ATPase-Versuchen eine Stimulation durch die J-Domänen nachgewiesen werden konnte. Obwohl in den Bindungsstudien eine deutlich stärkere Bindung von Kar2p an ERj1J als an ERj2J beobachtet wurde, war beim Ausmaß der ATPase-Stimulation fast kein Unterschied zwischen den beiden J-Domänen aufgetreten (ERj1J: 2,2 fach; ERj2J: 2,4 fach). Die von Alder et al. (2005) nachgewiesene Unfähigkeit

von Kar2p, den Verschluss der Translokationspore in Säuger-RMs zu vollziehen, kann somit nicht auf eine fehlende oder nicht-funktionale Interaktion mit einem J-Protein zurückgeführt werden. Das beobachtete ATP-unabhängige Bindungsverhalten von Kar2p könnte aber möglicherweise seinen dominant-negativen Effekt beim Verschließen der Translokationspore erklären. Es wäre denkbar, dass Kar2p aufgrund der fehlenden ATP-Regulation dauerhaft an ERj1p oder ERj2p bindet und somit BiP von seinem J-Interaktionspartner am Translokon verdrängt. Diese Möglichkeit konnte jedoch mittels eines Bindungsversuches, bei dem die immobilisierte J-Domäne von ERj1p bzw. ERj2p gleichzeitig mit BiP und Kar2p inkubiert wurde, ausgeschlossen werden. Unter diesen Bedingungen wurde nicht BiP durch Kar2p von den J-Domänen verdrängt, sondern Kar2p durch BiP. Offenbar besitzt der *in vivo*-Interaktionspartner BiP eine größere Affinität als Kar2p. Wie der dominant negative Effekt von Kar2p beim Verschließen der Translokationspore zustande kommt, konnte hier nicht geklärt werden. Möglicherweise spielt noch ein weiteres Protein, das in unmittelbarer Nähe zum Translokon lokalisiert ist eine Rolle.

In *E. coli*, wo es keine abgegrenzten Zellkompartimente gibt, sind offenbar stringenter Spezifitäten zwischen den Hsp70- und Hsp40-Proteinen vorhanden, die zu definierten Partnerschaften führen. So interagieren beispielsweise nur drei der sechs bekannten J-Proteine mit DnaK (Hennessy et al., 2005). Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit durchgeführten Studien, zeigen, dass eine Spezifität der Hsp70/Hsp40-Interaktion bei Eukaryonten eher durch die intrazelluläre Lokalisation als durch die Aminosäuresequenz der J-Domänen zustande kommt. Obwohl der Reaktionsmechanismus bei der Interaktion offenbar von universeller Natur ist, muss es aber dennoch Unterschiede zwischen den verschiedenen J-Domänen geben, welche die Affinitätsunterschiede und die unterschiedlich hohe Stimulation der Hsp70-ATPase begründen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde MIDA1 als cytosolisches Homolog des ER-Hsp40 ERj1p charakterisiert. Eine Hsp70/Hsp40-typische Interaktion von MIDA1 mit Hsc70 konnte nachgewiesen werden, bei der die ATPase-Aktivität von Hsc70 stimuliert wurde. Weiter konnte gezeigt werden, dass MIDA1 an Ribosomen binden kann, was zu einer Reduktion der Translationseffizienz führte. In Analogie zu ERj1p befindet sich die Bindungsstelle von MIDA1 am Ribosom möglicherweise in unmittelbarer Nachbarschaft zum Ribosomenausgangskanal. Daher ist es denkbar, dass Hsc70 durch MIDA1 zum Ribosom rekrutiert wird, um dort mit der naszierenden Kette, sobald diese den Ribosomenausgangskanal verlässt, zu interagieren.

Darüber hinaus wurde das Hsp40/Hsp70-Chaperonnetzwerk des ER des Pankreas weiter charakterisiert:

Grp170, ein Hsp70-verwandtes Protein im ER, konnte aus Hundepankreas-Mikrosomen isoliert werden. Mit Gelfiltrationen konnte die Bildung eines Komplexes aus Grp170 und BiP nachgewiesen werden, der bei Anwesenheit von ATP dissoziiert. Weiter konnte gezeigt werden, dass der Nukleotidaustausch von BiP durch Grp170 stimuliert wird. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von BiP und einem J-Protein wurde auch eine Stimulation der Grp170-ATPase beobachtet, ohne dass es dabei offenbar zu einer Bindung des J-Proteins an Grp170 kommt.

Das bereits als Nukleotidaustauschfaktor bekannte Protein BAP wurde rekombinant in *E. coli* synthetisiert und seine Nukleotidaustausch-Aktivität bestätigt. Anschließend konnte die durch BAP bewirkte zusätzliche Stimulation des durch ERj1p oder ERj2p aktivierten ATPase-Zyklus von BiP bestimmt und mit dem Effekt von Grp170 verglichen werden.

Das Hsp40-Homolog ERj4p konnte ebenfalls in *E. coli* synthetisiert und seine Funktionalität durch die Interaktion mit BiP einschließlich einer Stimulation von dessen ATPase-Aktivität gezeigt werden. Die Affinität von ERj4p sowie der J-Domäne von ERj5p zu BiP wurden im Biacore-System bestimmt.

Somit konnte das Hsp40/Hsp70-Chaperonnetzwerk des ER eines definierten Zelltyps erstmals vollständig quantitativ charakterisiert werden.

Summary

The cytosolic Hsp40-homologue MIDA1 and the Hsp70/Hsp40-chaperone network of the endoplasmic reticulum in pancreatic cells has been characterized. A typical Hsp70/Hsp40-interaction of MIDA1 with Hsc70 was demonstrated, at which the ATPase activity of Hsc70 was stimulated. Further more, an association of MIDA1 to ribosomes has been shown, leading to a reduction in transcriptional efficiency. The binding site at the ribosome is possibly located in close proximity to the ribosomal exit site. Therefore one can speculate, that the function of MIDA1 is to recruit Hsc70 to the ribosome where it can bind to the nascent chain leaving the exit tunnel.

Grp170 is a Hsp70-related protein in the lumen of the ER. It has been demonstrated, that Grp170 forms a complex together with the other luminal Hsp70 BiP in the absence but not in the presence of ATP. Grp170 accelerates the nucleotide exchange of BiP and in countermove a J-activated BiP stimulates the ATPase activity of Grp170. Besides Grp170, there is another luminal protein, namely BAP, that shows a nucleotide exchange activity. The additional stimulation by BAP of the ERj1 and ERj2 stimulated BiP ATPase turnover has been determined. Further, the affinity of ERj4 and the J-domain of ERj5 for the binding to BiP has been determined by surface plasmon resonance spectroscopy and compared with affinities of other J-proteins.

6 Literaturverzeichnis

Alder, N.N., Shen, Y., Brodsky, J.L., Hendershot, L.M., Johnson, A.E. (2005) The molecular mechanism underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **168**: 389-399

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230

Argon, Y. und Simen, B.B. (1999) GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Cell Dev. Biol.* **10**: 495-505

Auger, I. und Roudier, J. (1997) A function for the QKRAA amino acid motif: Mediating binding of DnaJ to DnaK. Implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4. *J. Clin. Invest.* **99**: 1818-1822

Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, X., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.-Y. und Patterson, C. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein, that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol.Cell.Biol.* **19**: 4535-4545

Baxter, B.K., James, P., Evans, T. und Craig, E. (1996) SSI1 encodes a novel Hsp70 of the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6444-6456

Bebök, Z., Mazzochi, C., King, S.A. Hong, J.S., Sorscher, E.J. (1998) The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61 β and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J. Biol. Chem.* **273**: 29873-29878

Becker, J., Walter, W., Yan, W. und Craig, E.A. (1996) Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4378-4386

Beggah, A., Mathews, P., Beguin, P. und Geering, K. (1996) Degradation and endoplasmic reticulum retention of unassembled α - and β -subunits of Na, K-ATPase correlate with interaction of BiP. *J. Biol. Chem.* **271**: 20895-20902

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**: 326-332

Bies, C. (2002) Qualitative und quantitative Untersuchungen zur Interaktion der Hsp40-Homologen des Endoplasmatischen Retikulums mit dem Hsp70-Chaperon BiP. Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III – Chemie, Pharmazie und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes

Bies, C., Blum, R., Dudek, J., Nastainczyk, W., Oberhauser, S., Jung, M., Zimmermann, R. (2004) Characterization of pancreatic ERj3p, a homolog of yeast DnaJ-like protein Scj1p. *Biol. Chem.* **385**: 389-395

Blau, M., Mullapudi, S., Becker, T., Dudek, J., Zimmermann, R., Penczek, P.A. und Beckmann, R. (2005) ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 1015-1016

Blond-Elguindi, S., Cwirla, S.E., Dower, W.J., Lipshutz, R.J., Sprang, S.R., Sambrook, J.F. und Gething, M.-J.H. (1993) Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* **75**: 717-728

Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. und Sigler, P.B. (1994) The Crystallographic structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**: 578-586

Brodsky, J.L., Goekeler, J. und Schekman, R. (1995) BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9643-9646

Brodsky, J.L. und Schekman, R. (1994) in: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones (Morimoto, R. I., Tissieres, A., Georgopoulos, C., Ed.) Cold Spring Laboratory Press, Plainview, NY, pp. 85-109

Brodsky, J.L., Hamamoto, S., Feldheim, D., Schekman, R. (1993) Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc70. *J. Cell Biol.* **120**: 95-102

Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goeckeler, J.L., Kruse, K.B. und McCracken, A.A. (1999) The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J. Biol. Chem.* **274**: 3453-3460

Buchberger, A., Schröder, H., Hestekamp, T., Schönfeld, H.-J. und Bukau, B. (1996) Substrate shuttling between DnaK und GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J. Mol. Biol.* **261**: 328-333

Bukau, B. und Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366

Caplan, A.J., Cyr, D.M. und Douglas, M.G. (1992) Ydj1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71**: 1143-1155

Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D. (2000) Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *J. Neurochem.* **74**: 1781-9

Cheetham, M.E. und Caplan, A.J. (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaption of chaperone function. *Cell Stress & Chaperones* **3**: 28-36

Chen, X., Easton, D., Oh, H.J., Lee-Zoon, D., Liu, X., Subject, J. (1996) The 170 kDa glucose regulated stress protein is a large HSP70-HSP110-like protein of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **380**: 68-72

Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E.C., Blond, S.Y. (2000) Interaction of murine BiP/GRP78 with DnaJ homologue MTJ1. *J. Biol. Chem.* **275**: 19620-19627

Chillarón, J. und Haas, I.G. (2000) Dissociation from BiP and retrotranslocation of unassembled immunoglobulin light chains are tightly coupled to proteasome activity. *Mol. Biol. Cell* **11**: 217-226

Chung, K.T., Shen, Y., Hendershot, L.M. (2002) BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J. Biol. Chem.* **277**: 47557-47563

Cohen, F.E. (2000) Prions, peptides and protein misfolding. *Mol. Med. Today* **6**: 292-3

Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Höfeldt, J. und Patterson, C. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nature Cell Biol.* **3**: 93-96

Corsi, A.K. und Schekman, R. (1997) The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **137**: 1483-93

Craig, E.A. (1985) The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **18**: 239-280

Craig, E.A. and Jacobsen, K. (1985) Mutations in cognate genes of *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. *Mol. Cell Biol.* **5**: 3517-3524

Craven, R.A., Egerton, M., Stirling, C.J. (1996) A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J.* **11**: 2640-2650

Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D., Johnson, A.E. (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* **78**: 461-471

Cunnea, P.M., Miranda-Vizuet, A., Bertoli, G., Simmen, T., Damdimopoulos, A.E., Hermann, S., Leinonen, S., Huikko, M.P., Gustafsson, J.A., Sitia, R., Spyrou, G. (2003) ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *J. Biol. Chem.* **278**: 1059-1066

Cyr, D.M., Lu, X. und Douglas, M.G. (1992) Regulation of hsp70 function by a eucaryotic DnaJ homolog. *J. Biol. Chem.* **267**: 20927-20931

Cyr, D.M., Langer, T. and Douglas, M.G. (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 176-181

Degen, E. und Williams, D.B. (1991) Participation of a novel 88-kDa protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J. Cell Biol.* **112**: 1099-1115

Dekker, P.J. und Pfanner, N. (1997) Role of mitochondrial GrpE and phosphate in the ATPase cycle of matrix Hsp70. *J. Mol. Biol.* **270**: 321-327

Deloche, O., Kelly, W.L. und Georgopoulos, C. (1997) Structure-function analyses of Ssc1p, Mdj1p and Mge1p *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 6066-75

Demand, J, Lüders, J. und Höhfeld, J. (1998) The carboxy-terminal domain of Hsp70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2023-2028

Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. und Schekman, R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**: 800-805

Deshaies, R.J. und Schekman, R. (1987) A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **195**: 633-645

de Silva, M.G., Notkins, A.L. und Land, M.S. (1997) Molecular characterization of a pancreas-specific protein disulfide isomerase, PDIp. *DNA and Cell Biology* **16**: 269-274

Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk A. und Bukau, B. (1999) Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**: 693-696

Dierks, T., Volkmer, J., Schlenstedt, G., Jung, C., Sandholzer, U., Zachmann, K., Schlotterhose, P., Neifer, K., Schmidt, B. und Zimmermann, R. (1996) A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **15**: 6931-6942

Dobson, C.M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 329-32

Dobson, C.M., Sali, A. und Karplus, M. (1998) Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angewandte Chemie* **110**: 908-935

Dudek, J., Greiner, M., Müller, A., Hendershot, L.M., Kopsch, K., Nastainczyk, W. und Zimmermann, R. (2005) ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat. Struc. Mol. Biol.* **12**: 1008-14

Dudek, J., Volkmer, J., Bies, C., Guth, S., Müller, A., Lerner, M., Feick, P., Schäfer, K.H., Morgenstern, E., Hennessy, F., Blatch, G.L., Janoscheck, K., Heim, N., Fien, M., Nastainczyk, W., Zimmermann, R. (2002) A novel type of cochaperone mediates transmembrane recruitment of Dank-like chaperones to ribosomes. *EMBO J.* **21**: 2958-2967

Easton, D.P., Kaneko, Y. und Subject, J.R (2000) The Hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress & Chap.* **5**: 276-290

Ellis, R.J. (1997) Molecular chaperones: avoiding the crowd. *Curr. Biol.* **7**: 531-533

Ellis, R.J. (2000) Chaperone substrates inside the cell. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 210-212

Esnault, Y., Blondel, M.-O., Deshaies, R., Schekman, R. und Kepes, F. (1993) The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **12**: 4083-4093

Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A. und Hartl, F.U. (1997) In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* **90**: 491-500

Feldheim, D., Rothblatt, J., Schekman, R. (1992) Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3288-3296

Fernández, F., Trombetta, S., Hellman, U. und Parodi, A. (1994) Purification to homogeneity of UDP-Glc:glycoprotein-glycosyltransferase from *Schizosaccharomyces pombe* and apparent absence of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**: 30701-30706

Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S. und Brodsky, J.L. (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 149-191

Flaherty, K.M., Deluca-Flaherty, C. und McKay, D.B. (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**: 623-628

Flaherty, K.M., McKay, D.B., Kabsch, W. und Holmes, K.C. (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5041-5

Flynn, G.C., Chappell, T.G., Rothman, J.E. (1989) Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* **245**: 385-390

Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T. und Rothman, J.E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Science* **353**: 726-730

Frydman, J. und Hartl, F.U. (1994) Molecular chaperone function of hsp70 and hsp60 in protein folding, in: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A., Georgopoulos, C., Ed.) Cold Spring Laboratory Press, Plainview, NY, pp. 251-284

Frydman, J., Nimmegern, E., Ohtsuka, K. und Hartl, F.U. (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**: 111-117

Fukuda, S., Sumii, M., Masuda, Y., Takahashi, M., Koike, N., Teishima, J., Yasumoto, H., Itamoto, T., Asahara, T., Dohi, K. und Kamiya, K. (2001) Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress- inducible gene that encodes a new member of the Pmt/rt protein family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**: 407-414

Gabrielsen, O.S., Sentenac, A. und Fromageot, P. (1991) Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif. *Science* **253**: 1140-1143

Gässler, C.S., Buchberger, A., Laufen, T., Mayer, M.P., Schroder, H., Valencia, A., Bukau, B. (1998) Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15229-34

Gautschi, M., Lilie, H., Fünfschilling, U., Mun, A., Ross, S., Lithgow, T., Rücknagel, P., Rospert, S. (2001) RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **7**: 3762-3767

Gautschi, M., Mun, A., Ross, S. und Rospert, S. (2002) A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 4209-4214

Gething, M.J., Blond-Elguindi, S., Mori, K., Sambrook, J. (1994) Structure, function, and regulation of the endoplasmic reticulum chaperone BiP, in: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. und Georgopoulos, C., Ed.) Cold Spring Laboratory Press, Plainview, NY, pp. 111-136

Gillece, P., Lutz, J.M., Lennarz, W.J., de La Cruz, F.J., Römisch, K. (1999) Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J. Cell Biol.* **147**: 1443-1456

Gilmore, R., Blobel, G. und Walter, P. (1982a) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J. Cell Biol.* **95**: 463-469

Gilmore, R., Walter, P. und Blobel, G. (1982b) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.* **95**: 470-477

Glover, J.R. und Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82

Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.-U. und Rapoport, T.A. (1992) A mammalian homolog of Sec61p and SecY is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* **71**: 489-503

Görlich, D. und Rapoport, T.A. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**: 615-630

Green, M.K., Maskos, K. und Landry, S.J. (1998) Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6108-6113

Ha, J.-H. und McKay, D.B. (1994) ATPase kinetics of recombinant bovine 70 kDa heat shock cognate protein and its amino-terminal ATPase domain. *Biochemistry* **33**: 14625-14635

Ha, J.-H. und McKay, D.B. (1995) Kinetics of nucleotide-induced changes in the tryptophan fluorescence of the molecular chaperone Hsc70 and its subfragments suggest the ATP-induced conformational change follows initial ATP binding. *Biochemistry* **34**: 11635-11644

Haas, I.G. und Wabl, M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**: 387-389

Hallstrom, T.C. and Moye-Rowley, W.S. (2000) Hyperactive forms of the Pdr1p transcription factor fail to respond to positive regulation by the hsp70 protein Pdr13p. *Mol. Microbiol.* **36**: 402-413

Hamilton, T.G. und Flynn, G. (1996) Cer1p, a novel Hsp70-related protein required for posttranslational endoplasmic reticulum translocation in yeast. *J. Biol. Chem.* **271**: 30610-30613

Hamilton, T.G., Norris, T.B., Tsuruda, P.R. und Flynn, G.C. (1999) Cer1p functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 5298-5307

Hamman, B.D., Hendershot, L.M., Johnson, A.E. (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early translocation. *Cell* **92**: 747-758

Hammond, C., Braakman, I. und Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose-trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 913-917

Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**: 271-274

Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F. und Kuriyan, J. (1997) Crystallographic structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**: 431-435

Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579

Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T.A. (1994) Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367**: 654-657

Hayer-Hartl, M.K., Ewbank, J.J., Creighton, T.E. und Hartl, F.U. (1994) Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin. *EMBO J.* **13**: 3192-3202

Hebert, D.N., Foellmer, B. und Helenius, A. (1995) Glucose-trimming and reglycosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**: 425-433

Helenius, A., Trombetta, E.S., Hebert, D.N. und Simons, J.F. (1997) Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* **7**: 193-200

Hellman, R., Vanhove, M., Lejeune, A., Stevens, F.J., Hendershot, L.M. (1999) The in vivo association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. *J. Cell Biol.* **1**: 21-30

Hennessy, F., Cheetham, M.E., Dirr, H.W., Blatch, G.L. (2000) Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress Chaperones* **5**: 347-358

Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E. und Blatch, G.L. (2005) Not all J domains are created equal: Implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Prot. Science* **14**: 1697-1709

Herendeen, S.L., VanBogelen, R.A. und Neidhardt, F.C. (1979) Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* **139**: 185-194

Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425-479

Hettema, E.H., Ruigrok, C.C.M., Koerkamp, M.G., van den Berg, M., Tabak, H.F., Distel, B. und Braakman, I. (1998) The cytosolic DnaJ-like protein djp1p is involved specifically in peroxisomal protein import. *J. Cell Biol.* **142**: 421-434

Hochstenbach, F., David, V., Watkins, S., Brenner, M.B. (1992) Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T- and B-cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during their assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4734-8

Höhfeld, J., Minami, Y. und Hartl, F.U. (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eucaryotic Hsp70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**: 589-598

Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 237-71

Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**: 13963-13966

Holstein, S.E., Ungewickell, H., Ungewickell, E. (1996) Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin. *J. Cell Biol.* **135**: 925-937

Horton, L.E., James, P., Craig, E.A. and Hensold, J.O. (2001) The yeast hsp70 homologue Ssa is required for translation and interacts with Sis and Pab1 on translating ribosomes. *J. Biol. Chem.* **276**: 14426-14433

Horwich, A.L., Low, K.B., Fenton, W.A., Hirshfield, I.N. und Furtak, K. (1993) Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell* **74**: 909-917

Hosoda, A., Kimata, Y., Tsurs, A. und Kohno, K. (2003) JPDI, a novel endoplasmic reticulum-resident protein containing both a BiP-interacting J-domain and thioredoxin-like motifs. *J. Biol. Chem.* **278**: 2669-2676

Huang, P., Gautschi, M., Walter, W., Rospert, S., Craig, E.A. (2005) The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 497-504

Hughes, R., Chan, F.Y., White, R.A. und Zon, L.Z. (1995) Cloning and chromosomal localization of a mouse cDNA with homology to the *Saccharomyces cerevisiae* gene zuotin. *Genomics* **29**: 546-550

Hundley, H.A., William, W., Bairstow, S., Craig, E.A. (2005) Human Mpp11 J protein: Ribosome-tethered molecular chaperones are ubiquitous. *Science* **308**: 1032-1034

Inoue, T., Shoji, W. und Obinata, M. (1999) MIDA1, an Id-associating protein, has two distinct DNA binding activities that are converted by the association with Id1: a novel function of Id protein. *Biophys. Res. Com.* **266**: 147-151

Inoue, T., Shoji, W. und Obinata, M. (2000) MIDA1 is a sequence specific DNA binding protein with novel DNA binding properties. *Genes to Cell* **5**: 699-709

Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K., Ohtsuka, K., Inada, H., Inagaki, M. (2000) Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 family protein, as a keratin 8/18 filament regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 34521-7

Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Höhfeld, J. und Patterson, C. (2001) CHIP is a U-box-dependent E3-ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **276**: 42938-42944

Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E.M. und Sousa, R. (2005) Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 Chaperone. *Mol. Cell* **20**: 513-524

Jiang, R., Gao, B., Prasad, K., Greene, L.E., Eisenberg, E. (2000) Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes. *J. Biol. Chem.* **275**: 8439-47

Jordan, R. und McMacken, R. (1995) Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **270**: 4563-9

Kabani, M., Beckerich, J.-M. und Gaillardin, C. (2000) Sls1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 6923-6934

Kabani, M., McLellan, C., Raynes, D.A., Guerriero, V., Brodsky, J.L. (2002) HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS Lett.* **531**: 339-342

Kanei-Ishii, C., Sarai, A., Sawazaki, T., Nakagoshi, H., He, D.N., Ogata, K., Nishimura, Y., Ishii, S. (1990) The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the myb protooncogene product. *J. Biol. Chem.* **265**: 19990-5

Karzai, A.W. und McMacken, R. (1996) A bipartite signalling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 11236-46

Kim, S., Schilke, B., Craig, E.A. und Horwich, A. (1998) Folding *in vivo* of a newly translated yeast cytosolic enzyme is mediated by the SSA class of cytosolic yeast Hsp70 proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 12860-12865

Klappa, P., Ruddock, L., Darby, N. und Freedman, R.B. (1998) The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. EMBO J. **17**: 927-935

Kluck, C.J., Patzelt, H., Genevoux, P., Brehmer, D., Rist, W., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. und Mayer, M.P. (2002) Structure –function analysis of HscC, the *Escherichia coli* member of a novel subfamily of specialized Hsp70 chaperones. J. Biol. Chem. **277**: 41060-9

Klumpp, M., Baumeister, W. und Essen, L.O. (1997) Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin. Cell **91**: 263-270

Knoblach, B., Keller, B.O., Groenendyk, J., Aldred, S., Zheng, J., Lemire, B.D., Li, L., Michalak, M. (2003) ERp19 and ERp46, new members of the thioredoxin family of endoplasmic reticulum proteins. Mol. Cell Proteomics **2**: 1104-1119

Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J., Mori, K. (1993) The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. Mol. Cell Biol. **13**: 877-890

Kotzutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.-J. und Sambrook, J. (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. Nature **332**: 462-464

Krieg, U.C., Walter, P. und Johnson, A.E. (1986) Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54 kDa polypeptide of the signal recognition particle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 8604-8608

Kroczyńska, B. und Blond, S.Y. (2001) Cloning and characterization of a new soluble murine J-domain protein that stimulates BiP, Hsc70 and DnaK ATPase activity with different efficiencies. Gene **273**: 267-274

Kurusu, J., Honma, A., Miyajima, H., Kondo, S., Okumura, M. und Imaizumi, K. (2003) MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppress cell death induced by ER stress. *Genes Cells* **8**: 189-202

Kuznetsov, G., Chen, L.B. und Nigam, S.K. (1994) Several endoplasmic reticulum stress proteins, including ERp72, interact with thyroglobulin during its maturation. *J. Biol. Chem.* **269**: 22990-22995

Kuznetsov, G., Chen, L.B. und Nigam, S.K. (1997) Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **272**: 3057-3063

Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K. und Hartl, F.U. (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**: 683-689

Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W. und Hartl, F.U. (1992) Chaperonin mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J.* **11**: 4757-65

Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C., Zylicz, M. (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2874-2878

Lindquist, S. (1986) The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1151-1191

Linke, K., Wolfram, T., Bussemer, J. und Jakob, U. (2003) The roles of two zinc binding sites in DnaJ. *J. Biol. Chem.* **278**: 44457-66

Lüders, J., Demand, J. und Höfeld, J. (2000) The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **275**: 4613-4617

Lyman, S.K. und Schekman, R. (1995) Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **131**: 1163-1171

Lyman, S.K. und Schekman, R. (1996) Polypeptide translocation machinery of the yeast endoplasmic reticulum. *Experientia* **52**: 1042-9

Lyman, S.K. und Schekman, R. (1997) Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* **88**: 85-96

Magga, J.M., Jarvis, S.E., Arnot, M.I., Zamponi, G.W., Braun, J.E. (2000) Cysteine string protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels. *Neuron* **28**: 195-204

Martin, J., Mayhew, M., Langer, T. und Hartl, F.U. (1993) The reaction GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding. *Nature* **366**: 228-233

Mastrogiacomo, A., Parsons, S.M., Zampighi, G.A., Jenden, D.J., Umbach, J.A., Gundersen, C.B. (1994) Cysteine string proteins: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca²⁺ channels. *Science* **263**: 981-982

Matlack, K.E.S., Misselwitz, B., Plath, K. und Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of Prepro- α -factor across the ER membrane. *Cell* **97**: 553-564

Matlack, K.E.S., Plath, K., Misselwitz, B. und Rapoport, T.A. (1997) Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* **277**: 938-941

Mayer, M.P., Schroder, H., Rudiger, S., Paal, K., Laufen, T. und Bukau, B. (2000) Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 586-593

Mayhew, M., da Silva, A.C., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Hartl, F.U. (1996) Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* **379**: 420-426

Mazzarella, R.A., Srinivasan, M., Haugejorden, S.M. und Green, M. (1990) ERp72, an abundant luminal endoplasmic reticulum protein, contains three copies of the active site sequences of protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* **265**: 1094-1101

McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J. und Bukau, B. (1995) The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* **249**: 126-137

McClellan, A.J. und Brodsky, J. (2000) Mutation of the ATP-binding pocket of Ssa1 indicates that a functional interaction between Ssa1p und Ydj1p is required for posttranslational translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Genetics* **156**: 501-512

McCracken, A.A. und Brodsky, J.L. (1996) Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J. Cell Biol.* **132**: 291-298

McMillan, D.R., Gething, M.J., Sambrook, J. (1994) The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**: 540-545

Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. und Cyr, D.M. (2001) The Hsc70-cochaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nature Cell Biol.* **3**: 100-105

Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T. und Hendershot, L.M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol. Biol. Cell* **13**: 4456-4469

Melnick, J., Aviel, S. und Argon, Y. (1992) The endoplasmic reticulum stress protein, GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *J. Biol. Chem.* **267**: 21303-21306

Miao, B., Davis, J.E. und Craig, E.A. (1997) Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **265**: 541-552

Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K. und Opas, M. (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* **344**: 281-292

Minami, Y., Höhfeld, J., Ohtsuka, K. und Hartl, F.U. (1996) Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homologue Hsp40. *J. Biol. Chem.* **271**: 19617-24

Misselwitz, B., Staeck, O. und Rapoport, T.A. (1998) J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol. Cell* **2**: 593-603

Misselwitz, B., Staeck, O., Matlack, K.E., Rapoport, T.A. (1999) Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J. Biol. Chem.* **274**: 20110-20115

Motohashi, K., Taguchi, H., Ishii, N. und Yoshida, M. (1994) Isolation of the stable hexameric DnaK-DnaJ complex from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **269**: 27074-9

Motohashi, K., Yohda, M., Endo, I. und Yoshida, M. (1996) A novel factor required for the assembly of the DnaK and DnaJ chaperones of *Thermus thermophilus* *J. Biol. Chem.* **271**: 17343-8

Mukai, H., Kuno, T., Tanaka, H., Hirata, D., Miyakawa, T., Tanaka, C. (1993) Isolation and characterization of SSE1 and SSE2, new members of the yeast HSP70 multigene family. *Gene* **132**: 57-66

Müller, G. und Zimmermann, R. (1987) Import of honeybee preproinsulin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *EMBO J.* **6**: 2099-2107

Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. und Tanaki, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* **2**: 1133-1138

Müsch, A., Wiedmann, M. und Rapoport, T.A. (1992) Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **69**: 343-352

Nathan, D.F., Vos, M.H. und Lindquist, S. (1997) In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12949-56

Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. und Craig, E.A. (1992) The translation machinery and 70kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* **71**: 97-105

Netzer, W.J., und Hartl, F.U. (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. Trends Biochem. Sci. **23**: 68-73

Newmyer, S.L., Schmid, S.L. (2001) Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. J. Cell Biol. **152**: 607-60

Nicchitta, C. V. (1998) Biochemical, cell biological and immunological issues surrounding the endoplasmic reticulum chaperone GRP94/gp96. Curr. Opin. Immunol. **10**: 103-109

Nigam, S.K., Goldberg, A.L., Ho, S., Rohde, M.F., Bush, K.T. und Sherman, M.Y. (1994) A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca²⁺-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily. J. Biol. Chem. **269**: 1744-1749

Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.-J. and Sambrook, J. (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. Cell **57**: 1223-1236

Norton, J.D., Deed, R.W., Craggs, G., Sablitzky, F. (1998) Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. Trends Cell Biol. **2**: 58-65

Norton, J.D. und Atherton, G.T. (1998) Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. Mol. Cell Biol. **18**: 2371-81

Obermann, W.M., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P. und Hartl, F.U. (1998) In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. J. Cell Biol. **143**: 901-910

O'Brien, M.C. und McKay, D.B. (1995) How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. I. Potassium is required for optimal ATPase activity. J. Biol. Chem. **270**: 2247-50

Oliver, J.D., Llewelyn Roderick, H., Llewelyn, D.H. und High, S. (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. Mol. Biol. Cell **10**: 2573-2582

Ostwald, T.J. und MacLennan, D.H. (1974) Isolation of a high-affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **249**: 974-979

Otto, H., Conz, C., Maier, P., Wölfle, T., Suzuki, C.K., Jenö, P., Rücknagel, P., Stahl, J., Rospert, S. (2005) The chaperones MPP11 and Hsp70L1 form the mammalian ribosome-associated complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 10064-9

Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R.S. und J. Reinstein (1997) GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* **36**: 3417-3422

Palleros, D.R., Reid, K.L., Shi, L., Welch, W.J. und Fink, A.L. (1993) ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K⁺ but not ATP hydrolysis. *Nature* **365**: 664-666

Panzer, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. und Rapoport, T.A. (1995) Post-translational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**: 561-570

Park, J., Easton, D.P., Chen, X., MacDonald, I.J., Wang, X.-Y., Subject, J.R. (2003) The chaperoning properties of mouse Grp170, a member of the third family of Hsp70 related proteins. *Biochemistry* **42**: 14893-14902

Parodi, A.J. (1999) Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **1426**: 287-295

Pishvae, B., Costaguta, G., Yeung, B.G., Ryazantsev, S., Greener, T., Greene, L.E., Eisenberg, E., McCaffery, J.M., Payne, G.S. (2000) A yeast DNA J protein required for uncoating of clathrin-coated vesicles in vivo. *Nat. Cell Biol.* **12**: 958-963

Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B.A., Lopez-Buesa, P., Walter, W.A., Wiedmann, M. und Craig, E.A. (1998) The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J.* **17**: 3981-9

Plemper, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., Wolf, D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**: 891-895

Plemper, R.K., Egner, R., Kuchler, K., Wolf, D.H. (1998) Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **273**: 32848-32856

Pouyssegur, J., Shiu, R.P.C. und Pastan, I. (1977) Induction of two transformation-sensitive membrane-polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell* **11**: 941-947

Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., Pearl, L.H. (2004) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* **18**: 754-62

Rassow, J., Voos, W. und Pfanner, N. (1995) Partner proteins determine multiple functions of Hsp70. *Trends Cell Biol.* **5**: 207-212

Rose, M.D., Misra, L.M. und Vogel, J.P. (1989) KAR2, a karyogamy gene is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* **57**: 1211-1221

Rothman, J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**: 55-63

Roy, B. und Lee, A.S. (1999) The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stressinducible complex. *Nucl. Acids Res.* **27**: 1437-1443

Sargsyan, E., Baryshev, M., Szekely, L., Sharipo, A., Mkrtchian, S. (2002) Identification of ERp29, an endoplasmic reticulum luminal protein, as a new member of the thyroglobulin folding complex. *J. Biol. Chem.* **277**: 17009-17015

Saris, N., Holkeri, H., Craven, R.A., Stirling, C.J., Makarow, M. (1997) The Hsp70 homologue Lhs1p is involved in a novel function of the yeast endoplasmic reticulum, refolding and stabilization of heat-denatured protein aggregates. *J. Cell Biol.* **4**: 813-824

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. und Moarefi, I. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**: 199-210

Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. und Lindquist, S. (1996) HSP100/Cip proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 289-296

Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R. und Silver, P.A. (1995) A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J. Cell Biol.* **129**: 979-988

Schlenstedt, G. und Zimmermann, R. (1987) Import of frog prepropeptide Gla into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *EMBO J.* **6**: 699-703

Schmid, D., Baici, A., Gehring H. und Christen P. (1994) Kinetics of molecular chaperone action. *Science* **263**: 971-973

Schroder, H., Langer, T., Hartl, F.U. und Bukau, B. (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* **12**: 4137-44

Shamu, C.E., Cox, J.S., Walter, P. (1994) The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends Cell Biol.* **4**: 56-60

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Dev. Cell* **3**: 99-111

Shen, Y. und Hendershot, L.M. (2005) ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol. Biol. Cell.* **16**: 40-50

Shen, Y., Meunier, L., Hendershot, L.M. (2002) Identifikation and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J. Biol. Chem.* **277**: 15947-15956

Shi, Y., Vattam, K.M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., Wek, R.C. (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell Biol.* **18**: 7499-7509

Shoji, W., Inoue, T., Yamamoto, T., Obinata, M. (1995) MIDA1, a protein associated with Id, regulates cell growth. *J. Biol. Chem.* **270**: 24818-24825

Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H.C., Tzvetkov, N., Young, J.C., Brodsky, J.L., Guerriero, V., Hartl, F.U., Bracher, A. (2005) Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol. Cell* **17**: 367-379

Silver, P.A. und Way, J.C. (1993) Eukaryotic DnaJ homologues and the specificity of Hsp70 activity. *Cell* **74**: 5-6

Simon, S.M. und Blobel, G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**: 371-380

Smith, D.F. (2000) Chaperones in progesterone receptor complexes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**: 45-52

Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Höhfeld, J., Hartl, F.U. und Moarefi, I. (2001) Structure of a Bag/Hsc70 Complex: Convergent Functional Evolution of Hsp70 Nucleotide Exchange Factors. *Science* **291**: 1553-1557

Sousa, M., Ferrero-García, M., Parodi, A.J. (1992) Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glycosyltransferase. *Biochemistry* **31**: 97-105

Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U. und Pavletich, N.P. (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**: 239-250

Steel, G.J., Fullerton, D.M., Tyson, J.R. und Stirling, C.J. (2004) Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science* **303**: 98-101

Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R. und Schekman, R. (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **3**: 129-142

Suh, W.-C., Lu, C.Z. und Gross, C.A. (1999) Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *J. Biol. Chem.* **274**: 30534-30539

Szabo, A., Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B. und Hartl, F.U. (1994) The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70-system-DnaK, DnaJ and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10345-10349

Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F.U. und Flanagan, J. (1996) A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.* **15**: 408-417

Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A. und Reed, J.C. (1995) Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**: 279-284

Takeda, S. und McKay, D.B. (1996) Kinetics of peptide binding to the bovine 70 kDa heat shock cognate protein, a molecular chaperone. *Biochemistry* **35**: 4636-44

Teter, S.A., Houry, W.A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. und Hartl, F.U. (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* **97**: 755-765

Theysen, H., Schuster, H.P., Packschies, L., Bukau, B. und Reinstein, J. (1996) The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* **263**: 657-670

Tu, B.P., Ho-Schleyer, S.C., Travers, K.J., Weissman, J.S. (2000) Biochemical basis of oxidativ protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* **290**: 1571-1574

Tyedmers, J. (2002) Zur Rolle von Hsp40- und Hsp70-Chaperonen beim Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum des Säugers. Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III – Chemie, Pharmazie und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes

Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M.H., Haas, I.G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J., Zimmermann, R. (2000) Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 7214-9

Tyedmers, J., Lerner, M., Wiedmann, M., Volkmer, J., Zimmermann, R. (2003) Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. EMBO Rep. **5**: 505-510

Tyson, J.R., Stirling, C.J. (2000) *LHS1* and *SIL1* provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. EMBO J. **19**: 6440-6452

Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S.E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L.E., Eisenberg, E. (1995) Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. Nature **378**: 632-5

van den IJssel, P., D. G. Norman und R. A. Quinlan (1999) Small heat shock proteins in the limelight. Curr. Biol. **9**: 103-105

Volkmer, J., Guth, S., Nastainczyk, W., Knippel, P., Klappa, P., Gnau, V. und Zimmermann, R. (1997) Pancreas specific protein disulfide isomerase, PDIp, is in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. FEBS Lett. **406**: 291-295

Wall, D., Zylicz, M., Georgopoulos, C. (1994) The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for λ replication. J. Biol. Chem. **269**: 5446-5451

Walter, P. und Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* **91**: 557-561

Walter, P. und Blobel, G. (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* **299**: 691-698

Walter, P., Ibrahimi, I. und Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to *in vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* **91**: 545-550

Walter, P. und Johnson, A.E. (1994) Signal sequence recognition and endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **2**: 499-516

Wanker, E.E. (2000) Protein aggregation in Huntington's and Parkinson's disease: implications for therapy. *Mol. Med. Today* **6**: 387-391

Wegele, H., Halsbeck, M., Reinstein, J. und Buchner, J. (2003) Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. *J. Biol. Chem.* **278**: 25970-6

Wegele, H., Wandinger, S.K., Schmid, A.B., Reinstein, J., Buchner, J. (2006) Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J. Mol. Biol.* **356**: 802-811

Wei, J., Gaut, J.R., Hendershot, L.M. (1995) *In vitro* dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **270**: 26677-26682

Werner-Washburne, M., Stone, D.E. und Craig, E.A. (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2568-2577

Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, M., Zimmermann, R., Jakob, U. (1993) Hsc70, BiP and Hsp90 differ in their ability to stimulate transport of precursor proteins into mammalian microsomes. *J. Biol. Chem.* **268**: 7414-7421

Wiech, H., Sagstetter, M., Müller, G., Zimmermann, R. (1987) The ATP requiring step in assembly of M13 procoat protein into microsomes is related to preservation of transport competence of the precursor protein. *EMBO J.* **6**: 1011-1016

Wilbanks, S.M., McKay, D.B. (1995) How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. II. Potassium binds specifically in the ATPase active site. *J. Biol. Chem.* **270**: 2251-7

Wilkinson, B.M., Enault, Y., Craven, R.A., Skiba, F., Fieschi, J., Kepes, F. und Stirling, C.J. (1997) Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. *EMBO J.* **16**: 4549-4559

Williams, D.B. (1995) Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem. Cell Biol.* **73**: 123-132

Wirth, A., Jung, M., Bies, C., Frie, M., Tyedmers, J., Zimmermann, R., Wagner, R. (2003) The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. *Mol. Cell* **12**: 261-268

Yan, W., Schilke, B., Pfund, C., Walter, W., Kim, S., Craig, E.A. (1998) Zuotin, a ribosom-associated DnaJ molecular chaperone. *EMBO J.* **16**: 4809-4817

Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same protease that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**: 1355-1364

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1998) Identification of the *cis*-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**: 33741-33749

Yoshida, M., Inoue, T., Shoji, W., Ikawa, S., Obinata, M. (2004) Reporter gene stimulation by MIDA1 through its DnaJ homology region. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **324**: 325-332

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in Response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**: 881-891

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the *cis*-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* **20**: 6755-6767

Young, B.P., Craven, R.A., Reid, P.J., Willer, M. und Stirling, C.J. (2001) Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. *EMBO J.* **20**: 262-271

Zapun, A., Darby, N.J., Tessier, D.C., Michalak, M., Bergeron, J.J.M. und Thomas, D.Y. (1998) Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J. Biol. Chem.* **273**: 6009-6012

Zhang, S., Lockshin, C., Herbert, A., Winter, E., Rich, A. (1992) Zuo1in, a putative Z-DNA binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **11**: 3787-3796

Zhao, L., Long-Guess, C., Harris, B.S., Lee, J.-W. und Ackerman S.L. (2005) Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat. Gen.* **37**: 974-979

Zhong, T. und Arndt, K.T. (1993) The yeast SIS1 protein, a DnaJ homolog, is required for the initiation of translation. *Cell* **73**: 1175-1186

Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Craig, M.O., Gottesman, M.E. & Hendrickson, W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**: 1606-1614

Zimmermann, R. und Meyer, D.I. (1986) 1986: a year of new insights into how proteins cross membranes. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 512-515

Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M.J., Pelham, H.R.B. (1988) Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J.* **7**: 2875-2880

Zupicich, J., Brenner, S.E. und Skarnes, W.C. (2001) Computational prediction of membrane-tethered transcription factors. *Genome Biol.* **2**: 501-506

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard Zimmermann angefertigt. Die experimentellen Arbeiten wurden von Dezember 2001 bis Oktober 2005 durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann, der mir das interessante Thema für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat und darüber hinaus durch seine immerwährende Unterstützung und Geduld zu deren Gelingen beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt danke ich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Dr. Wolfgang Nastainczyk und Mitarbeitern danke ich für die Herstellung von Proteinantikörpern und die Protein-Sequenzierungen.

Bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Zimmermann und PD Dr. Gabriel Schlenstedt bedanke ich mich für die überaus gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit sowie die immense Hilfsbereitschaft, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.