

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Arbeitsweise des molekularen Chaperons Hsp70 und
die Rolle der J-Proteine**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Staeck
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Bollmann
 2. Prof. Dr. W. Reutter
 3. Prof. Dr. C. Wagener

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis:

Abstract:	1
Einleitung	2
Material und Methoden	5
Klonierung und Reinigung der J-Domänen	5
Klonierung und Reinigung von BiP und BiP-Mutanten	6
Die Surface Plasmon Resonance-Experimente (SPR-Experimente)	7
ATPase-Experimente	8
Ergebnisse	10
Echtzeitassay zum Nachweis der Interaktion von BiP mit Peptiden	10
Effekte der J-Domäne in Lösung	12
BiP wird durch die J-Domäne aktiviert, an Peptide in direkter räumlicher Nähe zu binden	13
Die BiP-Aktivierung durch die J-Domäne erfolgt katalytisch.....	16
BiP kann nach Aktivierung durch die J-Domäne Peptide und Proteine ganz unterschiedlicher Zusammensetzung binden.....	18
Diskussion	21
Neuer Assay zur Untersuchung der Interaktion der Hsp70 mit ihren J-Partnern und Substraten.....	21
Modell des Peptidbindungszyklus von BiP.....	22
Wie funktioniert die Substratauswahl?	23
Ein gemeinsames Modell für die Kooperation von Hsp70-Proteinen mit ihren J-Partnern.	24
Der posttranslationale Proteintransport in das ER und der Proteintransport in Mitochondrien.....	24
Erneute Faltung von denaturierten Proteinen	26
Deassemblierung von Clathrinkäfigen	26
Hsp70-Proteine beeinflussen den Zellzyklus und die antivirale Abwehr	27
Zusammenfassung	27
Literaturverzeichnis	29
Anteilerklärung	34
Ausgewählte Publikationen	35
J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. Mol Cell. 1998 Nov;2(5):	593-603
Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. J Biol Chem. 1999 Jul 16;274(29):.....	20110-20115
Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. Biol Chem. 1999 Oct;380(10):	1143-1150
Lebenslauf	36
Komplette Publikationsliste	38
Selbstständigkeitserklärung	39
Danksagung	40

Die Arbeitsweise des molekularen Chaperons Hsp70 und die Rolle der J-Proteine

Abstract:

Hitzeschockproteine der Hsp70-Familie sind ATPasen, die man in nahezu allen Organismen in den meisten zellulären Kompartimenten findet. Sie spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie dem Transport ins endoplasmatische Retikulum, dem Transport in Mitochondrien, der Proteinfaltung, der Deassemblierung von Proteinkomplexen sowie der Regulierung des Zellzyklus und der antiviralen Abwehr. Dabei interagieren die Hsp70-Proteine in allen bekannten Systemen mit einer evolutionär konservierten Domäne (J-Domäne) ihrer Partner, den J-Proteinen. Die Rolle der J-Domäne scheint der Schlüssel zum Verständnis des Mechanismus der Hsp70-Proteine zu sein.

Es wurde ein quantitativer Echtzeitassay (SPR-Assay) zum Nachweis der Interaktionen von Hsp70-Proteinen mit ihren J-Partnern und Substraten etabliert. Anhand eines Systems - bestehend aus dem im endoplasmatischen Retikulum vorkommenden Hsp70-Homologen BiP, der J-Domäne des J-Proteins Sec63p und Substratpeptiden - wurde gezeigt, dass BiP-Moleküle durch die J-Domäne katalytisch aktiviert werden können, unspezifisch Peptide zu binden, die sich in unmittelbarer Nähe der J-Domäne befinden. Der Mechanismus der Aktivierung ist durch die Stimulation der ATP-Hydrolyse erklärbar. BiP bindet nach Aktivierung durch die J-Domäne ein breites Spektrum von Substraten, die es alleine nicht bindet. Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich auf andere Mitglieder der Hsp70-Familie übertragbar und legt nahe, dass die Substratspezifität der Hsp70-Systeme hauptsächlich durch ihre J-Partner bestimmt wird.

Einleitung

Die Hsp70-Familie der Hitzeschockproteine (molekulare Chaperone) ist in nahezu allen Organismen evolutionär konserviert und in den meisten zellulären Kompartimenten vertreten. In allen bekannten prokaryontischen und eukaryontischen Systemen arbeiten Hsp70-Proteine mit Kofaktoren, den J-Proteinen, zusammen (Georgopoulos, 1992; Gething und Sambrook, 1992; Hartl, 1996; Kelley, 1998; Mayer und Bukau, 2005).

Es konnte eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Prozesse identifiziert werden, in denen die Familie der Hsp70-Proteine eine wichtige Rolle spielt:

1. Der Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist der erste Schritt des sekretorischen Pfades bei Eukaryonten. Alle extrazellulären Proteine, Proteine des Blutplasmas und die meisten Membranproteine nutzen diesen Weg. Am Beginn steht die Überwindung der Membranbarriere durch einen Proteinkanal beim Eintritt in das ER. Beim posttranslationalen Transport in das ER ist ein luminales Hsp70 (BiP) erforderlich. Der Interaktionspartner ist hier eine J-Domäne des Proteins Sec63p am luminalen Ende des Kanals (Vogel *et al.*, 1990; Brodsky und Schekman, 1993; Scidmore *et al.*, 1993; Walter und Johnson, 1994; Lyman und Schekman, 1995; Panzner *et al.*, 1995; Rapoport, 2007).
2. Der Proteinimport in die Mitochondrien erfolgt analog mit Beteiligung von mitochondrialem mt-Hsp70 und dem Protein TIM44p, das eine Homologie zu J-Proteinen besitzt (Schneider *et al.*, 1994).
3. Die richtige Konformation ist für die Funktion von Proteinen erforderlich. Diese erreichen sie zum Teil spontan, aber auch durch die Interaktion mit Hsp70-Molekülen und J-Proteinen als Partner, die die korrekte Faltung von neu synthetisierten oder denaturierten Proteinen ermöglichen. Dies ist unter anderem am System des bakteriellen Hsp70-Homologen DnaK und seinem J-Partner DnaJ untersucht (Gamer *et al.*, 1992; Langer *et al.*, 1992; Hartl, 1996; Szabo *et al.*, 1996).
4. Die Endozytose von extrazellulären Proteinen oder Membranproteinen vor deren intrazellulärem Abbau wird durch das Abschnüren von Vesikeln aus der Zellmembran ermöglicht. Dafür werden diese von speziellen Proteinen, den Clathrinen, umgeben. Für das Deassemblieren dieser Clathrinkäfige sind ein zytosolisches Hsp70 sowie

das J-Protein Auxillin erforderlich (Goldstein *et al.*, 1985; Chappell *et al.*, 1986; Brodsky, 1988; Ungewickell *et al.*, 1995).

5. Hsp70-Proteine beeinflussen den Zellzyklus und die antivirale Abwehr. SV-40 Viren (Polyomaviren) exprimieren das J-Protein „large T-antigen“. Sie überführen durch Rekrutierung von Hsp70 und konsekutive Inaktivierung des zelleigenen Rb-Tumorsuppressorproteins die Zelle in die Synthesephase und bewirken somit die Virusreplikation (Sheng *et al.*, 1997; Kelley, 1998; DeCaprio, 1999).

Die molekulare Grundlage dieser verschiedenen Funktionen der Hsp70-Proteine ist der Aufbau aus einer Peptidbindungsdomäne mit Deckel und einer ATPase-Domäne, die ATP hydrolysiert (Bukau und Horwich, 1998). Dabei reguliert das in der ATPase-Domäne gebundene Nukleotid die reversible Peptidbindung durch Hsp70-Proteine (Palleros *et al.*, 1993; Schmid *et al.*, 1994). Die ATPase-Aktivität der Hsp70 kann durch die Interaktion mit ihren Partnern, den J-Proteinen, stimuliert werden (Liberek *et al.*, 1991). J-Proteine bestehen jeweils aus einer konservierten J-Domäne von 70 Aminosäuren sowie anderen nicht konservierten Domänen (Kelley, 1998).

Hsp70-Proteine müssen im Rahmen ihrer verschiedenen Aufgaben eine Vielzahl ganz unterschiedlicher ungefalteter und auch gefalteter Proteine binden, jedoch darf die Bindung nicht unspezifisch erfolgen. Die Mechanismen, die der Substratauswahl der Hsp70 zugrunde liegen, waren bisher nicht bekannt. Es wurden zwar umfangreiche Untersuchungen mit tausenden synthetischen Peptiden und isolierten Hsp70 durchgeführt, die eine Affinität zu hydrophoben Peptiden zeigten (Flynn *et al.*, 1991; Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Gragerov *et al.*, 1994; Rudiger *et al.*, 1997). Aber die Relevanz dieser Studien für die physiologische Situation in Anwesenheit der J-Partner und ATP-Hydrolyse war bislang nicht klar. Es konnte gezeigt werden, dass J-Proteine die Bindung von Hsp70 an manche Polypeptide stimulieren (Gamer *et al.*, 1992; Langer *et al.*, 1992; Wawrzynow *et al.*, 1995). Die nichtkonservierten Domänen der J-Partner können direkt und indirekt mit Polypeptiden interagieren und könnten somit die Substratspezifität von Hsp70 regulieren (Alfano und McMacken, 1989; Langer *et al.*, 1992; Schroder *et al.*, 1993; Holstein *et al.*, 1996). Wie genau die Interaktion zwischen Hsp70- und J-Proteinen abläuft, war bisher ungeklärt.

Das Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die folgenden Fragen zu klären: Welche Rolle für die Funktion der Hsp70-Proteine spielt die Interaktion mit den J-Partnern? Wie ist darüber hinaus die Bindung von Hsp70 mit einem weiten Spektrum verschiedener Substrate und zugleich eine spezifische Substratauswahl, angepasst an die verschiedenen Funktionen der Hsp70, erklärbar? Welcher zugrunde liegende Mechanismus ermöglicht es also den Hsp70-Proteinen, in ganz verschiedenen zellulären Prozessen mitzuwirken?

Diese Fragen können nur in einem vereinfachten System untersucht werden, in dem das Hsp70-Protein mit seinem J-Partner interagiert. Im posttranslationalen Transport über die Membran des ER in Hefe ist das luminaire Protein BiP, ein Hsp70-Protein, erforderlich. Interaktionspartner ist die J-Domäne, die sich am luminalen Segment des proteinleitenden Kanalproteins Sec63p befindet (Vogel *et al.*, 1990; Deshaies *et al.*, 1991; Brodsky und Schekman, 1993; Hanein *et al.*, 1996). Wir haben die Interaktion von gereinigtem rekombinanten BiP der Hefe mit der J-Domäne von Sec63p und synthetischen Peptiden in einem Bindungsassay an eine solide Phase untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in drei Veröffentlichungen publiziert. Ihre zentralen Experimente und Schlussfolgerungen werden in der vorliegenden Zusammenfassung dargestellt.

Material und Methoden

Klonierung und Reinigung der J-Domänen

Es wurden zwei verschiedene Versionen der J-Domäne von Sec63 kloniert. Das eine Konstrukt umfasste die Aminosäuren 121-198 von Sec63p (78 Aminosäuren), das andere die Aminosäuren 125-185 (61 Aminosäuren). Die DNA wurde mit Hilfe der PCR vervielfältigt: Für die längere bzw. kürzere Version der J-Domäne wurden die 5' Primer CGGAATTCCCATGGCTACAAAATTATTTGATCCTTATG sowie CGGAATTC CATGGCTGATCCTTATGAAATCCTTGGTATC und die 3' Primer CGGGATCCC-CCGGGTGGATGACCGTATTTCAAATAG sowie CGGGATCCCCCGGGGTTCAGTA-AGGGATTCGTAAG verwendet. Beide Versionen wurden mit Hilfe des Inteinsystems der Firma New England Biolabs (NEB, Massachusetts, USA) in *E. coli* als Proteine hergestellt.

Die PCR-Produkte wurden in den Vektor TYB4 (NEB) kloniert und im Bakterienstamm ER2566 (NEB) zur Expression gebracht. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von 0,2 mM Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert und die Bakterien wurden anschließend über 12 Stunden unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Sie wurden mit einer „french press“ aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile durch einen Zentrifugationsschritt (1 h x 300000 g) abgetrennt.

Zur Proteinaufreinigung wurde der Überstand darauf an eine Chitin-Säule (NEB) gebunden. Die Säule wurde mit einem Niedrigsalzschrift in Anwesenheit von 1% Triton X-100 und mit einem Hochsalzschrift in Anwesenheit von 1,2 M KCl gewaschen. Die J-Domäne konnte vom Rest des Fusionsproteins durch Inkubation der Säule über Nacht mit 50-100 mM Cystein in Puffer A (50 mM Hepes, pH 7,0; 150 mM KCl; 5 mM MgCl₂) abgespalten werden. Während des Abspaltungsschrittes wurde das Cystein als eine weitere Aminosäure mittels einer Peptid-Bindung an den C-Terminus der J-Domäne angefügt. Das Eluat der Chitinsäule wurde gegen Puffer A dialysiert und kurz bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert. Schließlich wurde das Protein in einer „centricon spin column“ (Millipore, Massachusetts, USA) aufkonzentriert und in Aliquots gefroren.

Mit der beschriebenen Prozedur erhält man hochreine Proteine. Die Kontrolle der Proteinreinigung erfolgte in einem SDS-PAGE-Gel. Die gereinigte J-Domäne grenzte

sich als klare Hauptbande mit dem erwarteten Molekulargewicht ab. Verunreinigungen, insbesondere der abgespaltene Interteil des Fusionsproteins, machten weniger als 5% der totalen Proteinmenge aus.

Für einige Experimente wurde die J-Domäne mittels HPLC auf einer Diphenyl-Säule (Grace Vydac, Hesperia, USA) weiter aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit einem Azetonitrilgradienten in 0,6% Trifluoressigsäure. Unter diesen Bedingungen eluiert die J-Domäne bei ungefähr 40% Azetonitril. Die Fraktionen der Elution, die Protein enthielten, wurden neutralisiert und mit 50 mM Dithiothreitol (DTT) reduziert. Die Proteine wurden anschließend gegen 10 mM Hepes/KOH, pH 7,0; 25 mM KCl; 2 mM EDTA dialysiert. Zuletzt wurde das gereinigte Protein in „centricon spin columns“ konzentriert und in Aliquots gefroren.

Die in den Experimenten verwendete J-Domäne des sec63-1 Hefestammes entspricht der längeren Version der J-Domäne des Wildtyps (78 Aminosäuren), trägt aber die Punktmutation A179T, entsprechend einer Mutation von Alanin 179 von Sec63p zu Threonin (Nelson *et al.*, 1993). Die Mutation wurde nach Klonierung der DNA der J-Domäne in den p-Alter Vektor (Promega, Wisconsin, USA) durch *in vitro* Mutagenese eingeführt. Das Protein wurde, wie für den Wildtyp beschrieben, exprimiert und gereinigt.

Klonierung und Reinigung von BiP und BiP-Mutanten

pMR2606 ist ein Plasmid, welches die DNA des Wildtyps von BiP (*Saccharomyces cerevisiae*, Aminosäuren 42-682) ohne Signalsequenz, aber mit einem C-terminalen His-Tag enthält. Es wurde uns von Dr. Mark Rose großzügigerweise überlassen.

Die BiP-Mutante mit Mutation in der ATPase-Domäne (T249G) wurde gemäß früherer Publikationen erstellt (Wei *et al.*, 1995). Die Reinigung der BiP-Proteine erfolgte nach der von Panzner *et al.* beschriebenen Prozedur (Panzner *et al.*, 1995): BiP wurde mit Hilfe der Affinität seines His-Tags an einer Nickel-Säule gereinigt und anschließend an einer DEAE-Säule konzentriert. Für die Deletionsmutanten wurde im zweiten Schritt anstelle der DEAE-Säule eine Q-Sepharose-Säule verwendet. Die Proteine wurden auf einer in Puffer A equilibrierten PD10-Säule (Pharmacia, Stockholm, Schweden) filtriert. In SDS-PAGE-Gelen waren alle BiP-Präparationen sauber und enthielten weniger als 5% Verunreinigungen. Alle Proteinkonzentrationen

wurden mit einem Spektrophotometer nach der von Edelhoich beschriebenen Methode bestimmt (Edelhoich, 1967).

Die Surface Plasmon Resonance-Experimente

Für die Surface Plasmon Resonance-Experimente (SPR-Experimente) wurden eine „BIAcore Upgrade“ Maschine und CM5 Chips, „research grade“ (beides Biacore systems, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) eingesetzt. Als Puffer wurde Puffer A verwendet. Die Temperatur betrug 25°C und die Flussgeschwindigkeit 5-7 µl/min. Peptid P15 (ALLLSAPRRGAGKKC) ist eine modifizierte Version des von Schmid et al. verwendeten Peptides AP5 (Schmid *et al.*, 1994). Sowohl Peptid P15 als auch die J-Domänen wurden unter Verwendung der Reaktivität ihrer einzelnen SH-Gruppe auf der Oberfläche immobilisiert. Die Immobilisation fand unter Beachtung der Herstellerangaben in einem Essigsäurepuffer pH 4-6 mit Hilfe des Crosslinkers 2-(2-Pyridinyldithio-) Ethanaminhydrochlorid (PDEA, BIAcore) statt. Die J-Domäne wurde grundsätzlich zeitlich vor dem Peptid immobilisiert mit Ausnahme des Experimentes in Tabelle 1. Die längere Version der J-Domäne (78 Aminosäuren) wurde in den Experimenten - dargestellt in den Abbildungen 2A, 3A-C und Tabelle 1 - verwendet, die kürzere (61 Aminosäuren) in allen anderen Experimenten. Die Ergebnisse konnten mit identischen Ergebnissen auch mit beiden Versionen der J-Domäne reproduziert (nicht gezeigt).

Nach der Immobilisation erfolgten drei Waschschrirte von jeweils einer Minute mit 6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM Phosphorsäure und 1% Triton X-100. Danach konnte die Menge immobilisierter J-Domäne anhand der Änderung des Refraktionsindex ermittelt werden. Die nachfolgende Immobilisierung des Peptides erfolgte in analoger Weise einschließlich der Waschschrirte. Abschließend wurde überschüssiges Reagens auf der Oberfläche des Chips mit 50 mM Cystein in 1 M NaCl für eine Minute inaktiviert.

In allen SPR-Experimenten wurde die Oberfläche zuerst mit Nukleotid (ATP oder ADP) und einer Mischung aus vier Proteaseinhibitoren (1 µg/ml Leupeptin, 0,5 µg/ml Chymostatin, 0,25 µg/ml Elastatinal, und 0,1 µg/ml Pepstatin A) in Puffer A equilibriert. Danach erfolgte die Injektion des in demselben Puffer gelösten Proteins. Nukleotide wurden in einer Konzentration von 2 mM verwendet (eventuelle

Abweichungen sind angegeben). Die Regenerationsprozedur der Oberfläche nach jeder BiP-Injektion entspricht der Waschprozedur des Immobilisationsprotokolls (siehe oben). Die Oberfläche war weitgehend stabil und hat während zehner Zyklen von BiP-Bindung und -Dissoziation nicht mehr als 5% ihrer Aktivität verloren. Wurde BiP über eine unmodifizierte Oberfläche gegeben, entstand durch Änderung des Brechungsindex aufgrund der Anwesenheit von löslichem BiP ein Signal von 7 RU/ μ M, welches nicht durch Bindung von BiP an die Oberfläche verursacht wurde. Jedes Experiment wurde 2-6-mal reproduziert. Wurden dabei gleiche Mengen Peptid und J-Domäne verwendet, variierte die Menge von BiP, die anschließend gebunden werden konnte, nur um 5-10%.

Die SPR-Experimente mit den Peptiden NB1 (CSHGGHSGGGHSGGHS), NB2 (CKDKNGEKNGDKNGDK), NB3 (CNKKKAINEKAEQN) und NB4 (CADSPRNRKEKSS) wurden analog zu denen mit P15 durchgeführt. Für die Immobilisierung wurden jedoch sättigende Mengen Peptid verwendet, weshalb der Cysteinschritt ausgelassen wurde. Lysozym (Hühnereiweiß, Worthington, 2400 RU) und Cytochrom C (Rinderherz, Sigma, 1800 RU) wurden mittels NH₂-spezifischem Crosslinking nach den Instruktionen des Herstellers (BIAcore) immobilisiert. Um diese Substrate nicht zusätzlich zu entfalten, wurden der Guanidiniumchlorid- und der saure Waschschrift ausgelassen. Die J-Domäne wurde anschließend, wie oben beschrieben, immobilisiert.

Im Experiment, dargestellt in Abbildung 3D, wurde die Dissoziation von BiP in Anwesenheit von 2 mM Peptid P5 (ALLLSAPRR) gemessen.

ATPase-Experimente

Diese Experimente wurden unter „Single-Turnover“-Bedingungen durchgeführt: Es wurde ein großer Überschuss BiP im Verhältnis zum ATP verwendet, so dass kein BiP-Molekül mehr als ein Molekül Nukleotid hydrolysieren konnte. 980 pmol BiP wurden in 25 μ l Puffer A auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 pmol unmarkiertem ATP und 1 μ Ci γ -³²P -ATP (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) gestartet. Nach fünf Minuten wurden 25 μ l Puffer A oder 2,5 nmol der längeren J-Domäne in 25 μ l Puffer A zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dann Proben entnommen und mit einem Überschuss konzentrierter Ameisensäure inaktiviert. Die Abtrennung der Nukleotide

von freigesetztem anorganischen Phosphat erfolgte mit Dünnschichtchromatographie auf Polyethylenimin-Zellulose in einem Puffer aus 0,5 M LiCl und 0,5 M Ameisensäure. Die abschließende Radioaktivitätsanalyse wurde mit einem Phosphoimager (FUJI Inc., Tokyo, Japan) durchgeführt. Die zu den verschiedenen Zeitpunkten freigesetzte Menge Phosphats ist als prozentualer Anteil an der totalen Radioaktivität jeder Probe angegeben.

In allen Assays war BiP für die gesamte ATPase-Aktivität verantwortlich. Hinweise für kontaminierende ATPasen oder andere kontaminierende enzymatische Aktivitäten ergaben sich nicht.

Die Herkunft der Materialien wurde jeweils in Klammern angegeben. Alle sonstigen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Ergebnisse

Echtzeitassay zum Nachweis der Interaktion von BiP mit Peptiden

BiP ist ein Hsp70-Protein, das im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) der Hefe vorkommt. Von BiP konnte in umfangreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass es eine entscheidende Rolle im posttranslationalen Transport von Proteinen über die Membran des ER spielt (Vogel *et al.*, 1990; Deshaies *et al.*, 1991; Brodsky und Schekman, 1993; Hanein *et al.*, 1996). Der J-Partner von BiP ist die luminaire J-Domäne des Proteins Sec63p als Bestandteil des proteintransportierenden Kanals in der Membran des ER (Corsi und Schekman, 1997).

BiP erfüllt seine verschiedenen Funktionen wie alle Mitglieder der Hsp70-Familie, indem Substrate reversibel gebunden werden. Um am Beispiel von BiP die Interaktion von Hsp70 mit verschiedenen Peptidsubstraten quantitativ und kinetisch zu verfolgen, wurde der Surface Plasmon Resonance Assay (SPR-Assay) etabliert. Im SPR-Assay wird eine Komponente auf einer Oberfläche immobilisiert und der Interaktionspartner wird gelöst über diese geleitet. Eine Bindung der beiden Partner resultiert in einem Anstieg des Refraktionsindex an der Oberfläche. Das Signal (Einheit: Response Units; RU) ändert sich dabei proportional zu der an der Oberfläche gebundenen Masse. Damit ist es möglich, die Assoziation und Dissoziation von Proteinen in Echtzeit quantitativ zu verfolgen (Fägerstam *et al.*, 1990).

Zuerst wurde bestätigt, dass sich die Peptidbindung durch BiP in Abwesenheit der J-Domäne ähnlich verhält, wie bereits in vorangegangenen Studien gezeigt. Es wurde ein Substratpeptid P15 (ALLLSAPRRGAGKKC) mit einem hydrophoben Motiv verwendet, das bereits für andere Hsp70 als Modellpeptid untersucht wurde (Schmid *et al.*, 1994). Dieses Peptid wurde an der Oberfläche des SPR-Chips kovalent immobilisiert, dann eine Lösung mit gereinigtem rekombinanten BiP über den Chip geleitet. Die Veränderung des Refraktionsindex wurde kontinuierlich erfasst. Während der Injektion von BiP mit ADP stieg das Signal zeitabhängig an (Abbildung 1, Kurve ADP). BiP band das immobilisierte Peptid und erreichte nach einigen

Minuten ein Plateau. Wurde die Injektion der BiP-ADP-Lösung nachfolgend durch Puffer ersetzt, fiel das Signal wieder auf das Ausgangsniveau ab, was der Dissoziation von BiP und dem immobilisierten Peptid entsprach. In Anwesenheit von ATP war die Affinität von isoliertem BiP zum immobilisierten Peptid deutlich geringer als in Anwesenheit von ADP (Abbildung 1, Kurve ATP).

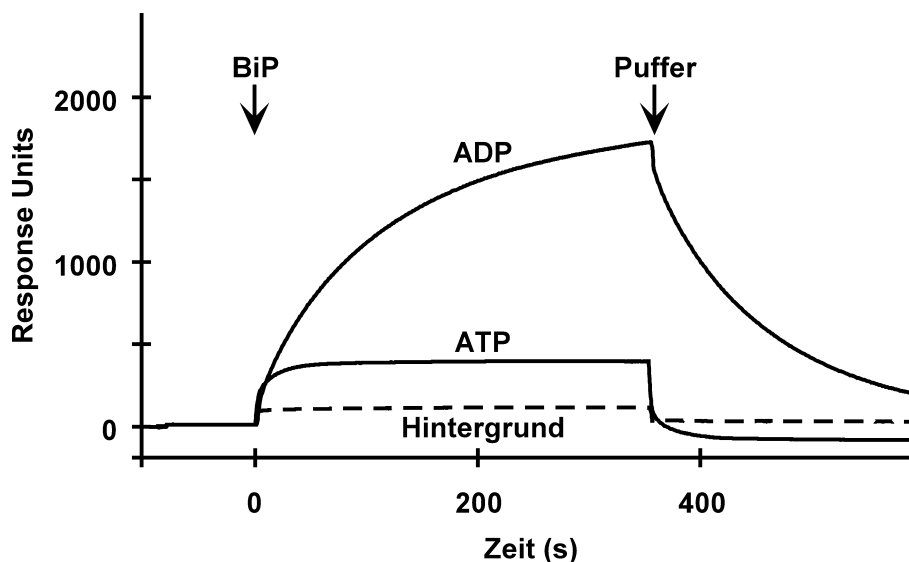


Abbildung 1:
BiP bindet an ein hydrophobes Peptid

Das Peptid P15 (ALLLSAPRRGAGKKC) wurde über sein C-terminales Cystein kovalent an die Oberfläche eines SPR-Chips gebunden. Zum Zeitpunkt Null (Pfeil, BiP) wurde ein kontinuierlich über die Oberfläche gespülter Puffer durch eine Lösung mit 20 μM BiP in Anwesenheit von entweder 2 mM ATP oder ADP in einem ansonsten identischen Puffer ersetzt. BiP band an das Peptid P 15 auf der Oberfläche des Chips. Dadurch stieg das Signal des SPR-Assays. Das Signal wird in "Response Units" (RU) angegeben und ist direkt proportional zur Masse von BiP, die an die Oberfläche des Chips gebunden ist. Zu einem späteren Zeitpunkt (Pfeil, Puffer) wurde die BiP-Lösung durch Puffer ersetzt. BiP dissoziierte jetzt von der Oberfläche und die Kurven begannen zu fallen. Bedingt durch die höhere Affinität von BiP zum Peptid in Gegenwart von ADP war das Signal mit ADP höher als mit ATP. Die langsame Assoziation und Dissoziation in Anwesenheit von ADP, bzw. die schnelle in Anwesenheit von ATP, sind ebenfalls sichtbar. Die gestrichelte Kurve (Hintergrund) entsprach dem Signal, das BiP an einer Oberfläche ohne P15 verursacht. Es wurde durch Effekte von BiP in Lösung, nicht durch Bindung an die Oberfläche verursacht.

Die Assoziationskinetiken konnten nicht durch eine einfache bimolekulare Reaktion beschrieben werden. Die Dissoziationskinetiken entsprachen einer einfachen Exponentialfunktion. Wie bereits für andere Hsp70 gezeigt, assoziierte und dissoziierte BiP-ATP mit wesentlich schnellerer Kinetik als BiP-ADP (Schmid *et al.*, 1994). Durch Titration der BiP-Konzentration ließen sich Dissoziationskonstanten von 20 μM in Anwesenheit von ADP und 200 μM in Anwesenheit von ATP bestimmen (nicht gezeigt).

Gelöstes Peptid P15 verhinderte die Bindung von BiP an immobilisiertes P15 mit einer Inhibitionskonstante von ebenfalls etwa 20 μM (nicht gezeigt). BiP band somit

das Peptid, unabhängig davon, ob es gelöst oder immobilisiert war. Auch ein Peptid mit reverser Sequenz oder ein Peptid, das über einen 20 Aminosäuren langen Abstandshalter immobilisiert wurde, wurde mit denselben Bindungskonstanten gebunden (nicht gezeigt). Somit wurde das Peptid als Substrat von BiP gebunden, unabhängig davon unter welchen Bedingungen es an der Oberfläche immobilisiert war. Kontrollen zeigten keine Hintergrundbindung von BiP an die Oberfläche ohne Peptid (Abbildung 1, Kurve BG).

Somit bestätigt dieser neue Assay die Modelle der isolierten Peptidbindung von Hsp70 in anderen Assays: ATP-Bindung an BiP öffnet die Peptidbindungstasche, die Affinität zum Peptidsubstrat ist gering, die Bindung und Dissoziation erfolgt schnell. ADP-Bindung an BiP schließt die Peptidbindungstasche, die Affinität ist höher, die Bindung und Dissoziation erfolgt langsam (Bukau und Horwich, 1998). Die Ergebnisse zeigen, dass dieser SPR-Assay geeignet ist, die Kinetik der Interaktion von BiP mit Substratpeptiden zu verfolgen.

Effekte der J-Domäne in Lösung

J-Proteine sind wichtige Partner der Hsp70-Proteine. Untersucht wurden die Interaktionen mit der gereinigten rekombinanten J-Domäne von Sec63p, dem Interaktionspartner von BiP beim posttranslationalen Transport ins endoplasmatische Retikulum. Wie bereits im vorangegangenen Experiment wurde Peptid P15 an die Oberfläche des Chips gekoppelt und dann BiP, gemischt mit verschiedenen Konzentrationen der J-Domäne in Lösung, über den Chip geleitet (Abbildung 2A). Zu einer Stimulation der Bindung von immobilisiertem Peptid kam es weder in der Anwesenheit von ADP noch von ATP. Im Gegenteil kam es unter hohen Konzentrationen von gelöster J-Domäne in Anwesenheit von ADP zu einer geringen Inhibition der Interaktion von BiP mit dem immobilisierten Peptid. Dies erklärt sich durch eine schwache kompetitive Bindung der gelösten J-Domäne in diesem Falle auch in der Peptidbindungstasche von BiP als Peptidsubstrat.

Die Aktivität der verwendeten rekombinanten J-Domäne ließ sich jedoch in einem single turnover ATPase-Assay nachweisen: Substöchiometrische Mengen radioaktiven ATPs wurden mit BiP inkubiert. Anschließend wurde dann die Hydrolyse

nach Zugabe von entweder J-Domäne (Kurve +J) oder Puffer (Kurve +Puffer) anhand der Produktion von radioaktivem anorganischen Phosphat verfolgt (Abbildung 2B). Die J-Domäne stimulierte die ATPase-Aktivität von BiP etwa um den Faktor 50. Eine Interaktion von J-Domäne und BiP ist somit auch in Lösung nachweisbar.

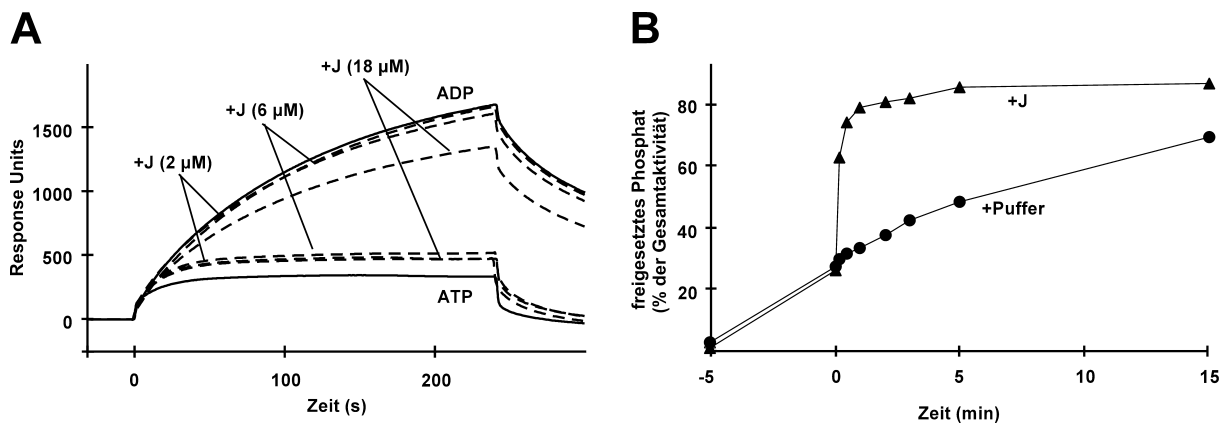


Abbildung 2:

Die J-Domäne von Sec63p stimuliert die ATP-Hydrolyse durch BiP

(A) Das Peptid P15 wurde auf dem SPR-Chip immobilisiert, und die Oberfläche wurde kontinuierlich mit Puffer gespült. Zum Zeitpunkt Null wurde der Puffer durch eine ansonsten identische Lösung mit 10 μ M BiP und 2 mM ATP bzw. ADP sowie der angegebenen Konzentration von gelöster J-Domäne (J) ersetzt (gestrichelte Kurven). An dem Punkt, an dem die Kurven beginnen abzufallen, wurden die Lösungen wieder durch Puffer ersetzt. Die gelöste J-Domäne stimulierte die Peptid-Bindung von BiP nicht. In Anwesenheit von ADP ist eine leichte Inhibition erkennbar.

(B) Indem ein großer Überschuss BiP (980 pmol) mit geringen Mengen ATP (50 pmol) inkubiert wurde, konnte ein einzelner Zyklus der ATP-Hydrolyse von BiP betrachtet werden (single-turnover). So konnte ein BiP-Molekül höchstens ein Molekül ATP hydrolysieren. Zum Zeitpunkt -5 min wurde BiP mit radioaktivem γ - 32 P-markierten ATP gemischt. BiP band ATP und hydrolysierte es mit seiner basalen Hydrolyserate. Zum Zeitpunkt Null wurde entweder Puffer (Kreise) oder J-Domäne (Dreiecke) zugegeben. Die Menge des entstandenen 32 P-Phosphates wurde mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt und als Prozentsatz der Gesamtradioaktivität angegeben. Die J-Domäne steigerte die ATP-Hydrolyse von BiP mindestens um den Faktor 50.

BiP wird durch die J-Domäne aktiviert, an Peptide in direkter räumlicher Nähe zu binden

Beim posttranslationalen Transport in das ER werden die Proteine entfaltet und Aminosäure für Aminosäure durch einen proteinleitenden Kanal hindurchgeführt. Dieser wird in der Hefe durch einen Proteinkomplex, den Sec-Komplex, gebildet. Bestandteil dieses Kanals ist das Membranprotein Sec63p, an dessen luminalem Segment eine J-Domäne lokalisiert ist. Somit befindet sich diese J-Domäne in unmittelbarer Nähe zu jedem Polypeptidsubstrat, das sich am Beginn des

Transportes im Kanal befindet. Diese räumliche Nähe könnte entscheidend für die Aktivierung von luminalem BiP durch die J-Domäne sein.

Eine räumliche Nähe von J-Domäne und Substratpeptid ließ sich experimentell durch die kovalente Koimmobilisierung von Peptid-P15 und J-Domäne auf demselben SPR-Chip erreichen. In Anwesenheit von ATP band BiP diese Oberfläche nun wesentlich stärker als mit immobilisiertem Peptid alleine (Abbildung 3A, vergleiche die Kurven ATP gegen P15 alleine, ATP). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten war diese Bindung wesentlich stärker in Anwesenheit von ATP als in Anwesenheit von ADP. Die J-Domäne konnte BiP in ATP zur Peptidbindung aktivieren. In Anwesenheit von ADP war die Bindung gleich, unabhängig davon, ob die J-Domäne koimmobilisiert war oder nicht (Abbildung 3A, Kurven ADP und P15 alleine, ADP). War die J-Domäne alleine immobilisiert, führte dies nur zu einer geringen Hintergrundbindung von BiP an den Chip (Abbildung 3 A, Kurve J alleine, ATP).

Eine BiP-Mutante, bei der die ATP-Hydrolyse durch eine Punktmutation in der ATPase-Domäne defekt ist (Hydrolysemutante), war in der Lage, ATP oder ADP zu binden, nicht jedoch ATP zu hydrolisieren (Wei *et al.*, 1995 und unsere Daten). Diese Mutante wurde nicht durch die J-Domäne stimuliert (Abbildung 3B).

In einem anderen Hefestamm (Sec63-1) verhinderte eine bekannte Punktmutation in der J-Domäne die Stimulation der ATPase Aktivität von BiP (Nelson *et al.*, 1993; Corsi und Schekman, 1997 und unsere Daten). Auch diese mutierte J-Domäne war koimmobilisiert nicht in der Lage, die Peptidbindung von BiP zu stimulieren (Abbildung 3C). Die Daten zeigten, dass die unmittelbare Nachbarschaft von J-Domäne und Substratpeptid in Abhängigkeit von der ATP-Hydrolyse zu einer J-aktivierten Peptidbindung durch BiP führten.

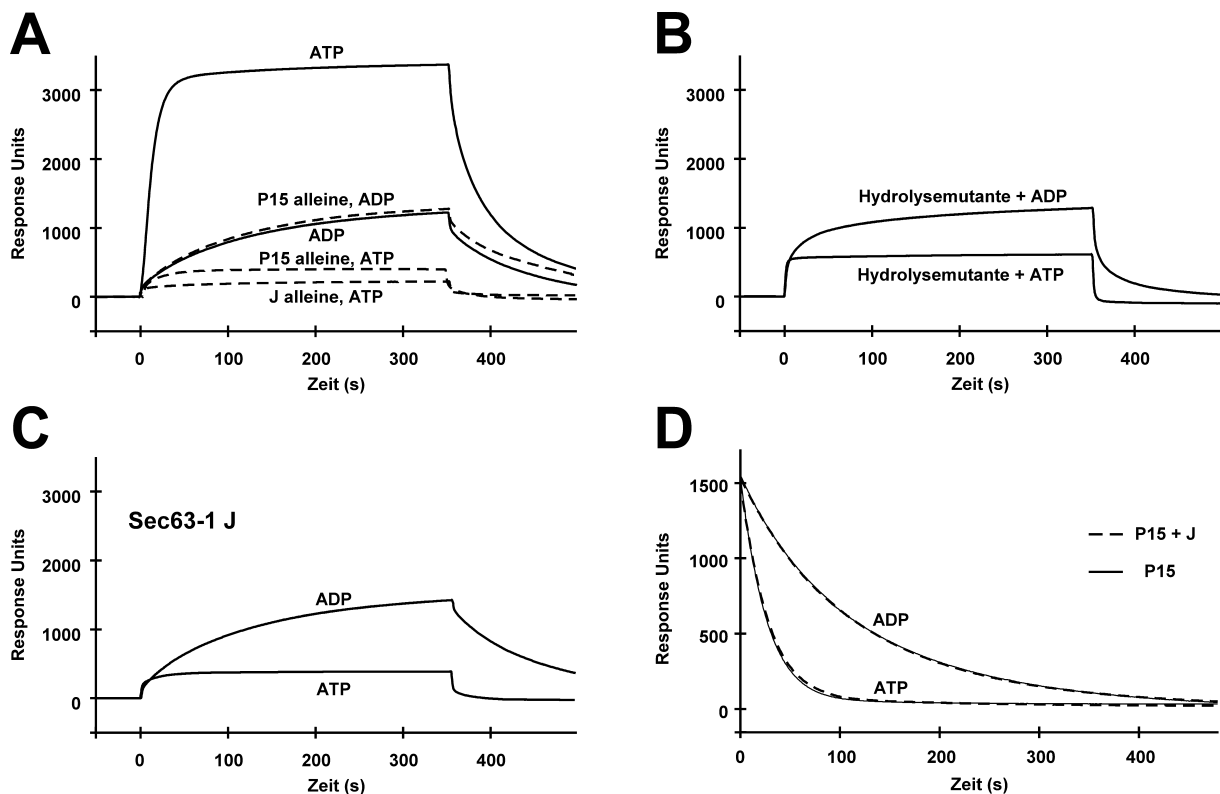


Abbildung 3: J-aktivierte Peptid-Bindung

(A) Peptid P15 und die gereinigte J-Domäne wurden auf demselben SPR-Chip koimmobilisiert (etwa 1000 RU Peptid und 100 RU J-Domäne). Die Koimmobilisation brachte das Peptid P15 in räumliche Nähe zur J-Domäne. Zum Zeitpunkt Null wurden 15 μ M BiP in 2 mM ATP bzw. ADP über die Oberfläche geleitet (ausgezogene Kurven, ATP, ADP). Durch die J-Domäne auf der Oberfläche wurde die Peptid-Bindung von BiP in ATP stimuliert. Die Peptid-Bindung war in ATP jetzt viel stärker als in ADP. In ADP hatte die J-Domäne keinen Einfluss auf die Peptid-Bindung durch BiP. In Kontrolleexperimenten (gestrichelte Kurven) wurde die Bindung von BiP entweder an die einzeln immobilisierte J-Domäne (J alleine, ATP) oder an das einzelne Peptid (P15 alleine, ATP, ADP) untersucht. Eine Aktivierung von BiP war nicht nachweisbar.

(B) Wie in (A); anstelle von BiP wurde aber eine Hydrolysemutante von BiP verwendet: Eine Punktmutation in der ATPase-Domäne der BiP-Mutante verhindert die Hydrolyse des gebundenen ATP. Die Peptid-Bindung der Hydrolysemutante wurde durch die J-Domäne nicht verstärkt.

(C) Wie in (A); anstelle der J-Domäne wurde aber eine defekte J-Domäne, die J-Domäne der Sec63-1-Mutante, mit dem Peptid P15 koimmobilisiert. Die defekte J-Domäne konnte die Peptid-Bindung von BiP nicht aktivieren.

(D) BiP wurde an die Oberfläche mit immobilisiertem Peptid P15 (durchgezogene Kurven) oder mit Peptid P15 sowie koimmobilisierter J-Domäne (gestrichelte Kurven) vorgebunden. Die Dissoziation von BiP von der jeweiligen Oberfläche wurde entweder in Anwesenheit von 2 mM ATP oder ADP verfolgt. Der Dissoziationspuffer enthielt außerdem 2 mM Kompetitorpeptid, um die erneute Bindung von dissoziiertem BiP an den Chip zu verhindern. Für die Darstellung wurden identische Signale in RU als Startpunkte der Dissoziationskurven gewählt. Dies war möglich, da sich die Dissoziationskinetiken monophasisch verhielten: Jede der gezeigten Kurven konnte mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden (nicht gezeigt). Die beiden Kurven der Dissoziation in ADP sind exakt deckungsgleich. Genauso können die beiden Kurven in ATP übereinander projiziert werden. Die Dissoziation von J-aktiviertem BiP vom Peptid (gestrichelte Kurven) ist demnach identisch zu der von nicht aktiviertem BiP (ausgezogene Kurven). In Anwesenheit von ATP fand sich eine schnellere Dissoziationskinetik als in Anwesenheit von ADP.

Zum Vergleich wurde BiP einerseits J-aktiviert, andererseits in Anwesenheit von ADP und ohne J-Domäne an den Chip gebunden. Danach wurde die Dissoziation verfolgt (Abbildung 3D). Die identischen monophasischen Dissoziationskinetiken zeigten,

dass BiP mit oder ohne Aktivierung durch die J-Domäne bei der finalen Bindung in gleicher Weise an das Peptid gebunden war und keinen Kontakt zur J-Domäne mehr hatte. Die Dissoziation war in Anwesenheit von ATP schneller, sie erfolgte nach Nukleotidaustausch von ADP zu ATP mit offener Bindungstasche.

Diese nukleotidabhängige Kinetik der aktivierten Bindung von BiP an Substratpeptide legt ein Modell der Aktivierung nahe: In Anwesenheit der J-Domäne bindet BiP-ATP mit schneller Kinetik entsprechend einer offenen Peptidbindungstasche an das Substratpeptid. Die Dissoziation nach aktivierter Peptidbindung erfolgt jedoch mit der langsamen Kinetik, die charakteristisch für BiP-ADP mit geschlossener Peptidbindungstasche ist.

Die initiale Interaktion von BiP mit dem Substrat erfolgt somit in der physiologisch vorherrschenden ATP-Konformation. Die J-Domäne in unmittelbarer Nähe stimuliert die Hydrolyse des ATP und bei der Umwandlung von BiP in die ADP-Konformation schließt sich die Peptidbindungstasche um ein gebundenes Substrat herum. BiP-ADP dissoziiert nur langsam und hat das Substrat in seiner Tasche gefangen. Die Aktivierung durch die J-Domäne ermöglicht eine Interaktion mit schneller Assoziationskonstante und langsamer Dissoziationskonstante. Nach dem Massenwirkungsgesetz folgt daraus eine hohe Affinität. Die aktivierte Peptidbindung ist somit kein thermodynamisches Gleichgewicht, sondern ein Fließgleichgewicht mit kontinuierlicher ATP-Hydrolyse. Ein stabiler Zustand in dem dynamischen System wird durch ständigen Umsatz aufrechterhalten. Nur durch Energieverbrauch kann die aktivierte Bindung von Hsp70 an das Peptid erreicht werden.

In Anwesenheit von ATP, was der physiologischen Situation entspricht, erfolgt die Dissoziation von BiP vom Substrat nach dem Nukleotidaustausch mit schneller Kinetik in der BiP-ATP-Konformation, und der aktivierte Peptidbindungszyklus ist somit beendet.

Die BiP-Aktivierung durch die J-Domäne erfolgt katalytisch

Die quantitative Natur des SPR-Assays ermöglichte es zu berechnen, wie viele Bip-Moleküle von einem einzigen J-Molekül zu Substratbindung aktiviert werden können. Das Signal des SPR-Assays ist unabhängig von der Art und Konformation der

eingesetzten Moleküle direkt proportional zur Masse der Proteine, die an die Oberfläche gebunden sind. Daher entsprechen die Verhältnisse der Signalveränderungen (Einheit: Response Units) den Massenverhältnissen und können unter Berücksichtigung der Molekulargewichte in molare Verhältnisse umgerechnet werden. Um eine genaue Bestimmung der an den Chip gebundenen J-Domäne zu ermöglichen, wurde das Protein mittels HPLC weiter aufgereinigt und dann mit oder ohne P15-Peptid kovalent an den Chip gebunden. Darauf wurde BiP-Lösung mit ADP oder ATP über den Chip geleitet und die Response Units der Plateaulevel in molare Verhältnisse umgerechnet (Tabelle 1).

	Peptid P15 auf der Oberfläche	J-Domäne auf der Oberfläche	BiP-Bindung in ADP (RU)	BiP-Bindung in ATP (RU)
1	+	+	1290	9000
2	-	+	120	230
1 - 2			1170	8770
J-aktiviertes BiP			Δ 7600 RU	
Massenverhältnis J-aktiviertes BiP pro J			76	
Molares Verhältnis J-aktiviertes BiP pro J			10,1	

Tabelle 1: Ein Molekül der J-Domäne kann viele Moleküle BiP aktivieren.

Es wurden SPR-Chips hergestellt, die entweder die HPLC-gereinigte J-Domäne alleine immobilisiert (100 RU) oder beides, das Peptid P15 (810 RU) und koimmobilisiert die J-Domäne (100 RU), enthielten. BiP-Lösung (10 μ M) wurde in Anwesenheit von ADP bzw. ATP über die Oberfläche geleitet. Die Plateauwerte der Kurven sind angegeben (Zeilen 1, 2). Die Hintergrundbindungen an die J-Domäne alleine wurden von der Bindung an das mit der J-Domäne koimmobilisierte Peptid abgezogen (Zeile 1-2).

J-aktiviertes BiP ist definiert als die Differenz zwischen den kalkulierten ATP- und ADP-Werten aus Zeile 1-2. Dieser Wert dividiert durch die RU immobilisierter J-Domäne (100 RU) ergibt das Massenverhältnis von aktiviertem BiP zur J-Domäne. Wenn man die unterschiedlichen Molekulargewichte in Betracht zieht (BiP hat ein 7,55-fach höheres Molekulargewicht als die J-Domäne) erhält man molare Verhältnisse. Demnach kann ein Molekül J-Domäne durchschnittlich 10,1 Moleküle BiP aktivieren. Bei höheren BiP-Konzentrationen von 20, 40 bzw. 80 μ M betrug die Zahl der aktivierten BiP-Moleküle sogar 10,9 desweiteren 11,7 und 12,7 pro Molekül der J-Domäne (nicht gezeigt). Die Ergebnisse konnten in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden.

Die Daten zeigen, dass ein J-Molekül mindestens 10 BiP-Moleküle aktiviert, Peptidsubstrat zu binden. Die J-Domäne wirkt somit katalytisch, die Interaktion zwischen J-Domäne und BiP muss transient sein. Der entstandene Komplex besteht lediglich aus BiP und Peptidsubstrat. Diese Daten sprechen gegen einen stabilen Dreierkomplex aus J-Domäne, BiP und Peptid.

BiP kann nach Aktivierung durch die J-Domäne Peptide und Proteine ganz unterschiedlicher Zusammensetzung binden

Durch andere Gruppen wurde gezeigt, dass isolierte Hsp70 lediglich eine Affinität zu hydrophoben Substraten haben (Flynn *et al.*, 1991; Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Gragerov *et al.*, 1994; Rudiger *et al.*, 1997). Das in den bisherigen Experimenten verwendete hydrophobe Peptid P15 ist demnach ein gutes Substrat für isoliertes BiP. Diese beschränkte Spezifität isolierter Hsp70 erklärt jedoch weder ihre Interaktion mit ganz verschiedenen, auch hydrophilen Proteinstrukturen, zum Beispiel beim Transport der Proteine in das ER oder in die Mitochondrien, noch die Interaktion mit gefalteten Proteinen, beispielsweise beim Aufbrechen von Clathrinkäfigen oder bei der Inaktivierung des Rb-Tumorsuppressorproteins.

Wir haben daher geprüft, ob BiP nach Aktivierung durch die J-Domäne in der Lage ist, Substrate zu binden, die es sonst nicht binden würde. Wir entwarfen daher verschiedene Peptide mit nicht verwandten hydrophilen Sequenzen (NB1-NB4). Alle diese hydrophilen Sequenzen sollten nicht an isolierte Hsp70-Moleküle binden, entsprechend einem Algorithmus, der für das bakterielle Hsp70-Homologe DnaK entwickelt wurde (Rudiger *et al.*, 1997).

Die bekannte Spezifität isolierter Hsp70 für hydrophobe Sequenzen bestätigte sich: In Abwesenheit der J-Domäne wurde keines der hydrophilen Peptide von BiP in ADP oder ATP gebunden (Abbildung 4 B-E, gestrichelte Kurven -J ADP/ATP). Zum Vergleich ist die konzentrationsabhängige Bindung vom hydrophoben Peptid P15 gezeigt (Abbildung 4 A, gestrichelte Kurven).

Bei Koimmobilisierung der hydrophilen Peptide und der J-Domäne zeigte sich in Anwesenheit von ATP überraschenderweise eine signifikante Bindung von BiP an die hydrophilen Peptide (Abbildung 4 B-E, durchgezogene Kurven +J ATP).

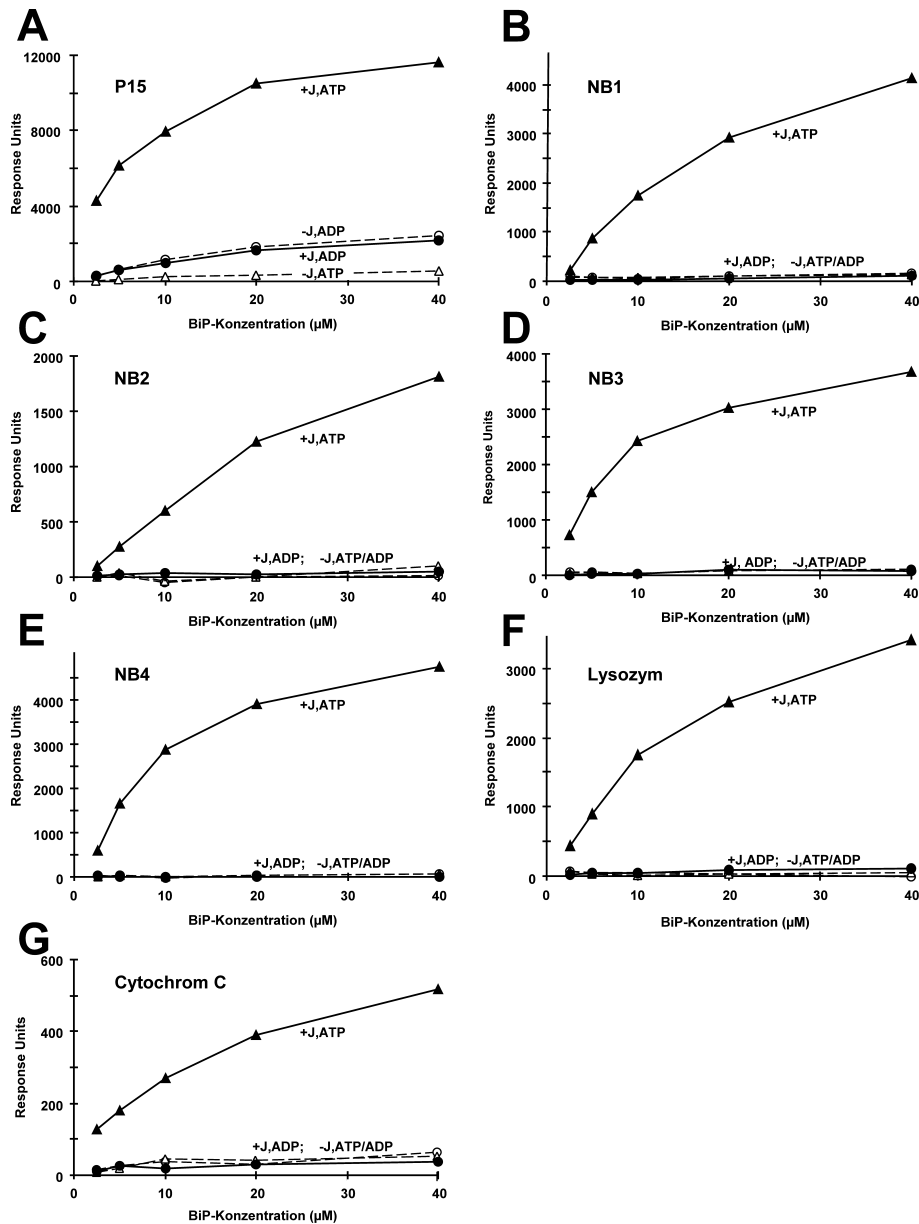


Abbildung 4: Die J-Domäne aktiviert BiP Substrate zu binden, die es alleine nicht binden würde

(A) Die verwendeten SPR-Chips enthielten entweder Peptid P15 alleine (offene Symbole, gestrichelte Linien) oder beides, P15 und J-Domäne (geschlossene Symbole, durchgezogene Linien). BiP wurde in steigenden Konzentrationen in Anwesenheit von ATP oder ADP über diese Oberflächen geleitet. Die zeitabhängige Assoziation wurde verfolgt und die Plateauwerte der Kurven wurden als Funktion der jeweiligen BiP-Konzentration angegeben. Die Hintergrundbindung von BiP an einen Chip mit allein immobilisierter J-Domäne wurde für jede BiP-Konzentration ebenfalls bestimmt und von den mit J-Domäne und Peptid ermittelten Werten subtrahiert. Die größten abgezogenen Werte bei der größten BiP-Konzentration waren 600-700 RU in ATP bzw. 330-350 RU in ADP. Es zeigte sich eine J-abhängige Aktivierung der Peptidbindung von BiP.

(B-E) Wie in (A); anstelle des hydrophoben Peptides P15 wurden die hydrophilen Peptide NB1-4 mit der J-Domäne koimmobilisiert. Die Bindung von BiP an die hydrophilen Peptide alleine war vernachlässigbar niedrig, sowohl in ADP als auch in ATP. In Anwesenheit von J-Domäne und ATP band BiP jedoch alle getesteten hydrophilen Peptide. Die Aktivierung durch die J-Domäne ermöglicht es BiP, Peptide zu binden, bei denen andernfalls keine Bindung nachweisbar war.

(F und G) Wie in (A); statt der Peptide wurden die Proteine Lysozym bzw. Cytochrom C mit der J-Domäne koimmobilisiert. Wieder war die Bindung an die Proteine vernachlässigbar in ADP bzw. ohne J-Domäne. In Anwesenheit von J-Domäne und ATP konnte BiP jedoch auch diese Proteine binden.

Auch eine Bindung von BiP an gefaltete Proteine konnte durch die J-Domäne stimuliert werden. Kovalent an die Oberfläche gebundenes Lysozym oder Cytochrom C, beides stabil gefaltete Proteine, wurden erwartungsgemäß von isoliertem BiP nicht gebunden (Abbildung 4 F,G; gestrichelte Kurven –J ADP/ATP). Die zusätzliche Immobilisierung der J-Domäne an den Chip ermöglichte die Bindung auch dieser gefalteten Proteine (Abbildung 4 F, G, durchgezogene Kurven +J ATP). Dennoch war die Bindung nicht völlig unspezifisch. Die Amplitude der Bindung an verschiedene Substrate ist unterschiedlich (zu beachten sind die unterschiedlichen Maßstäbe der Y-Achsen). Das extrem stabile Streptavidin wurde auch nach Immobilisation in Anwesenheit der J-Domäne nicht gebunden (nicht gezeigt). BiP bindet gefaltete Proteine wahrscheinlich über Peptidmotive, die durch spontane Entfaltung zugänglich sind.

Zusammengefasst kann BiP, aktiviert durch die J-Domäne, nicht nur hydrophobe und hydrophile Peptide, sondern auch gefaltete Proteine binden.

Diskussion

In unseren Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine J-Domäne das kooperierende Hsp70 zur Bindung von Peptiden aktivieren kann, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der J-Domäne befinden. Dabei ist ein J-Molekül in der Lage, durch eine transiente Interaktion mehrere BiP-Moleküle zur Peptidbindung zu stimulieren. Die J-Domäne wirkt katalytisch.

Der Mechanismus der Aktivierung ist durch die Stimulation der ATP-Hydrolyse erklärbar. BiP bindet nach Aktivierung durch die J-Domäne Substrate, die es alleine nicht bindet. Sowohl Hsp70-Moleküle als auch J-Domänen sind evolutionär hochkonserviert. Daher tragen unsere Ergebnisse auch zum Verständnis der Mechanismen anderer Homologe der Hsp70-Familie bei.

Neuer Assay zur Untersuchung der Interaktion der Hsp70 mit ihren J-Partnern und Substraten

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine neue experimentelle Methode entwickelt, die es ermöglicht, die Interaktion eines Hsp70-Proteins mit seinem J-Partner und Substraten zu untersuchen. Durch gemeinsame Bindung des Substratpeptides und der kooperierenden J-Domäne an eine Oberfläche kann im SPR-Assay eine räumliche Nähe hergestellt werden. Ausgehend von den in Tabelle 1 dargestellten Daten kann abgeschätzt werden, dass der durchschnittliche Abstand zweier Peptide ungefähr 68 Å und der der J-Moleküle etwa 250 Å beträgt. Durch diese Nähe ist die J-Domäne in der Lage, die Peptidbindung des Hsp70 zu stimulieren.

Die isolierte J-Domäne in Lösung ist jedoch nicht in der Lage, die Peptidbindung von Hsp70 zu stimulieren. Dieses Ergebnis stimmt mit zuvor veröffentlichten Experimenten mit fluoreszenz- oder radioaktiv markierten Substraten in Lösung überein. In diesen vorangegangenen Experimenten konnte lediglich der Einfluss der J-Domäne auf die ATP-Hydrolyse durch Hsp70, nicht jedoch eine Stimulation der Substratbindung von Hsp70 gezeigt werden (Banecki und Zylicz, 1996; Pierpaoli *et al.*, 1997). Das aktivierte Stadium des Hsp70-Proteins ist zu kurzlebig, als dass man es in Lösung detektieren könnte.

Weiterhin erlaubt es der quantitative SPR-Assay, die flüchtige, katalytische Natur der BiP-J-Interaktion zu zeigen. Jedes Molekül der J-Domäne hat durchschnittlich zehn BiP-Moleküle zur Peptidbindung aktiviert. Daher besteht der nach aktivierter Bindung entstandene Komplex lediglich aus BiP und seinem Peptidsubstrat. Folglich sind auch die Dissoziationskinetiken identisch, unabhängig davon, ob der BiP-Peptid-Komplex in Anwesenheit oder Abwesenheit von der J-Domäne gebildet wurde.

Modell des Peptidbindungszyklus von BiP

Auf der Grundlage dieser Resultate kann das folgende Modell des Peptidbindungs- und ATPase-Zyklus von BiP vorgeschlagen werden (Abbildung 5): BiP liegt unter den Bedingungen in der Zelle physiologisch hauptsächlich als BiP-ATP vor. Durch eine transiente Interaktion mit der J-Domäne wird BiP stimuliert, das gebundene ATP schnell zu hydrolysieren. Dabei schließt sich die zuvor in der ATP-Konformation offene Peptidbindungstasche und fängt jedes Peptid, das sich in der Tasche befindet. Das Resultat ist ein relativ stabiler Komplex aus BiP-ADP und dem gefangenen Peptid. Der Bindungszyklus wird durch den Austausch des ADP gegen ATP in der Nukleotidbindungsdomäne von BiP beendet. Die Tasche öffnet sich und das Peptid dissoziiert. BiP-Substrat-Bindung und Dissoziation erfolgen demnach auf Kosten der ATP-Hydrolyse. Die Energie der ATP-Hydrolyse ermöglicht es BiP, seine Konformation im richtigen Moment zu wechseln.

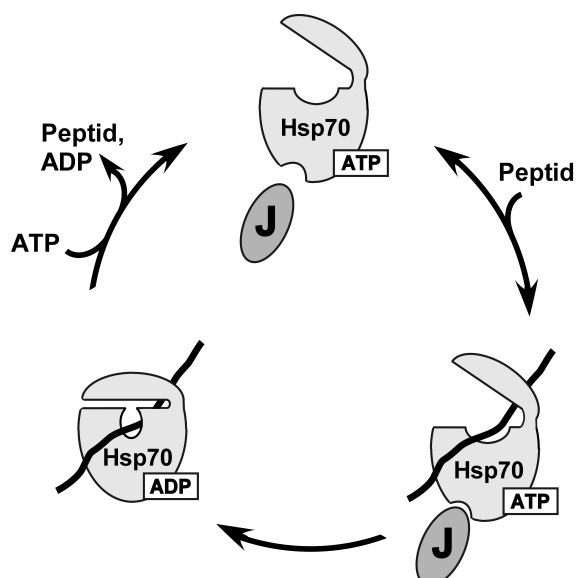


Abbildung 5: Modell für die Verbindung von ATP-Hydrolyse und Peptidbindung bei der J-aktivierten Peptidbindung durch Hsp70-Proteine

BiP liegt initial mit offener Peptidbindungstasche in seiner ATP-Form vor (Bild oben Mitte). Die Bindung an das Substratpeptid und Dissoziation vom Peptid erfolgen mit schneller Kinetik. Die J-Domäne in unmittelbarer Nähe des Substrates stimuliert die Hydrolyse des ATP und bei der Umwandlung von BiP in die ADP-Konformation schließt sich die Peptidbindungstasche um jedes gebundene Substrat herum und fängt dieses so ein. BiP-ADP dissoziiert nur langsam und hat das Substrat in seiner Tasche gefangen. Daraus folgt eine hohe Affinität. Die Dissoziation des Substrates von BiP erfolgt nach dem Nukleotidaustausch von ADP zu ATP mit dem Öffnen der Peptidbindungstasche. Der aktivierte Peptidbindungszyklus ist somit beendet.

Dieser von der ATP-Hydrolyse abhängige Mechanismus ist die Basis für die erweiterte Substratbindung von BiP nach Aktivierung durch die J-Domäne. Diese relativ unspezifische Bindung wird vermutlich durch die Beschaffenheit der Peptidbindungstasche ermöglicht. Die Betrachtung der Röntgen- und NMR-Strukturanalyse des bakteriellen BiP-Homologen DnaK legt nahe, dass die große Peptidbindungstasche entfaltete Peptidsegmente mit einer großen Varianz von Sequenzen aufnehmen kann (Zhu *et al.*, 1996; Revington *et al.*, 2004). In Abwesenheit der J-Domäne können Peptide assoziieren und dissoziieren, wodurch ein Equilibrium erreicht wird. Wie für das Peptid P15 gezeigt, interagieren nur besonders hydrophobe Peptide mit den Wänden der Tasche, und es kommt spontan zu einer schwachen Bindung auch in Abwesenheit der J-Proteine (Flynn *et al.*, 1991; Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Gragerov *et al.*, 1994; Rudiger *et al.*, 1997).

Im Fließgleichgewicht nach dem J-abhängigen Schließen der Tasche verbleiben auch Segmente in der Tasche, die nicht perfekt passen. Die Affinität von BiP zum Substrat ist hoch und die Bindung relativ unspezifisch. Die J-aktivierte Bindung auch an gefaltete Proteine ist über Proteinsegmente erklärbar, die dauerhaft oder durch thermale Fluktuation exponiert sind.

Wie funktioniert die Substratauswahl?

Wie die Substrate von Hsp70-Proteinen ausgewählt werden, konnte bisher nicht beantwortet werden. Unter der Annahme, dass die Spezifität isolierter Hsp70 für die Auswahl der geeigneten Substrate verantwortlich ist, wurden in der Vergangenheit umfangreiche Untersuchungen mit großen Peptidbibliotheken durchgeführt (Flynn *et al.*, 1991; Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Gragerov *et al.*, 1994; Rudiger *et al.*, 1997). Diese Experimente kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass isolierte Hsp70 lediglich eine Affinität zu Peptidsequenzen von mindestens sieben Aminosäuren Länge und mit hydrophoben Seitenketten haben. Alle diese Studien wurden mit isolierten Hsp70 und in der Anwesenheit von ADP durchgeführt. Da Hsp70-Proteine *in vivo* jedoch in Anwesenheit von ATP und in Zusammenarbeit mit J-Proteinen funktionieren, blieb die Bedeutung dieser Spezifität unklar.

In unseren Experimenten konnte gezeigt werden, dass BiP nach Aktivierung durch die J-Domäne in der Lage ist, ATP-abhängig eine große Varianz verschiedener Substrate relativ unspezifisch zu binden, wenn sie sich in der Nähe der J-Domäne

befinden. Die für die Aktivierung erforderliche Nähe zwischen J-Domäne und Substrat wird in unseren Experimenten durch die gemeinsame Bindung an eine Oberfläche erreicht. In vivo interagieren in allen bekannten Systemen die J-Proteine durch ihre nichtkonservierten weiteren Domänen direkt oder indirekt mit den Substraten. Dadurch wird die J-Domäne der J-Proteine in die Nähe der Substrate gebracht. Die Substratauswahl erfolgt folglich durch die J-Proteine, und eine Hsp70-Aktivierung ist somit auch in Lösung möglich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Hsp70-Proteine alleine nur sehr wenige ausgewählte Sequenzen spontan binden. Sind damit weitgehend inaktiv. Ihre Funktion der relativ unspezifischen Peptidbindung erfüllen sie nicht alleine, sondern nur nach Stimulation durch die J-Domäne, ATP-Hydrolyse und in der Nähe der J-Partner. Die Substratauswahl erfolgt jeweils durch die weiteren Domänen der J-Proteine, indem das Substrat in der Nähe der J-Domäne präsentiert wird.

Ein gemeinsames Modell für die Kooperation von Hsp70-Proteinen mit ihren J-Partnern

In nahezu allen bekannten Systemen funktionieren Hsp70-Proteine nur zusammen mit ihren Partnern, den J-Proteinen. Diese präsentieren das Substrat, das dann von Hsp70 relativ unspezifisch gebunden wird. Der Funktion der Hsp70-Proteine in einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Prozesse scheint ein einfacher einheitlicher Mechanismus zugrunde zu liegen.

Der posttranslationale Proteintransport in das ER und der Proteintransport in Mitochondrien

Bei Eukaryonten müssen alle Proteine des sekretorischen Pfades aus dem Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden. Die Membranbarriere wird durch einen proteintransportierenden Kanal überwunden. Beim posttranslationalen Proteintransport in das ER binden die zu transportierenden Substrate in einem passiven Bindungsschritt an die zytosolische Seite des Kanals und werden in den Kanal eingefädelt. Die J-Domäne des J-Proteins Sec63p ist als Teil des Kanalkomplexes am luminalen Ende des Kanals im ER lokalisiert. Die zu transportierende Polypeptidkette wird von diesem Kanal während des Transfers durch die Membran umgeben (Vogel *et al.*, 1990; Brodsky und Schekman, 1993;

Scidmore *et al.*, 1993; Walter und Johnson, 1994; Panzner *et al.*, 1995; Rapoport, 2007). Unsere Daten weisen nun darauf hin, dass die räumliche Nähe zwischen der J-Domäne und dem luminalen Ausgang des Proteinkanals im ER ausreicht, um einen Transfer von BiP-Molekülen auf die Polypeptidkette zu bewirken, sobald die zu transportierende Polypeptidkette den Kanal auf der luminalen Seite verlässt. Somit wäre die Rückdiffusion des Substrates durch den Kanal nicht möglich. Wenn durch thermische Bewegung der Polypeptidkette im Kanal weitere Segmente auf der luminalen Seite des Kanals erscheinen, würden diese ebenfalls J-aktiviert reversibel durch BiP gebunden werden. BiP kann somit als molekulare Ratsche den gerichteten Transport von Proteinen in das ER ermöglichen. Die Energie für diesen Transport wird mittels ATP-Hydrolyse durch BiP bereitgestellt. Die Dissoziation der BiP-Moleküle von dem Polypeptidkomplex nach dem Nukleotidaustausch kann die korrekte Faltung des Proteins im endoplasmatischen Retikulum ermöglichen. Die niedrige Substratspezifität von BiP erklärt, warum das System praktisch jedes Substrat in das ER transportieren kann. Dieses Ratschen-Modell konnte in einer Serie von nachfolgenden Experimenten an einem löslichen Translokationssystem bestätigt werden (Matlack *et al.*, 1999).

Aufgrund der unspezifischen Bindung an viele Peptidsubstrate könnte die Bindung von BiP an Peptidsegmente des Translokons in Abwesenheit eines Translokationssubstrates physiologisch bedeutsam sein. Es war eine ungelöste Frage, wieso der proteinleitende Kanal einerseits für Polypeptide durchlässig, andererseits für kleine Ionen wie Calcium dicht ist. Unserem Modell entsprechend wurde die Hypothese aufgestellt, dass BiP, aktiviert durch die J-Domäne, das luminale Ende des proteinleitenden Kanals für kleine Moleküle verschließt und so die Barriere der ER-Membran aufrechterhält (Hamman *et al.*, 1998). Sobald ein Translokationssubstrat auftaucht, würde BiP das Translokationssubstrat anstelle des Kanals binden und anfangen, als Ratsche zu arbeiten. Die Funktion von BiP als ein dynamischer Deckel für das Translokon konnte nachfolgend bestätigt werden (Alder *et al.*, 2005).

Der Proteintransport in Mitochondrien könnte durch einen vergleichbaren Mechanismus funktionieren (Schneider *et al.*, 1994). Obwohl der Partner des mitochondrialen mtHsp70 an der inneren Membran (TIM44) nur teilweise Homologien zu J-Proteinen aufweist, weisen nachfolgende Studien darauf hin, dass

der Proteinimport in Mitochondrien entsprechend unserem Modell ebenfalls im Sinne einer molekularen Ratsche abläuft (Neupert und Brunner, 2002; Okamoto *et al.*, 2002).

Erneute Faltung von denaturierten Proteinen

Die dreidimensionale Faltung von Proteinen ist für ihre Funktion entscheidend. Einige denaturierte Proteine können durch Mitglieder der Hsp70-Familie und ihre J-Partner zurückgefaltet werden (Hartl, 1996).

Dieses wurde am Beispiel des bakteriellen Systems des Hsp70-Homologen DnaK und seines J-Partners (DnaJ) nachgewiesen. DnaJ kann mit einer Domäne direkt an ungefaltete Proteine binden, und diese können in Anwesenheit von DnaK und ATP zurückgefaltet werden (Szabo *et al.*, 1996). Angesichts unserer Resultate kann angenommen werden, dass während der relativ transienten Bindung von DnaJ an denaturierte Proteinbereiche multiple Moleküle von DnaK auf die entfaltete Polypeptidkette übertragen werden. Wenn alle entfalteten Bereiche durch DnaK besetzt sind und die Peptidkette vollständig entfaltet ist, würde keine Bindung durch DnaJ mehr erfolgen. Die langsame Dissoziation der DnaK Moleküle würde die korrekte Neufaltung des Proteins ermöglichen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Unsere Ergebnisse zur transienten Hsp70-J-Interaktion, Aktivierung von Hsp70 und Substratauswahl durch die J-Proteine konnten nach unserer Veröffentlichung von anderen Arbeitsgruppen auch für das bakterielle Hsp70-System (DnaK/DnaJ) reproduziert werden (Laufen *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 2000; Rudiger *et al.*, 2001; Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Wittung-Stafshede *et al.*, 2003; Mayer und Bukau, 2005).

Deassemblierung von Clathrinkäfigen

Extrazelluläre Proteine oder Membranproteine werden durch Endozytose zum Abbau wieder in die Zelle aufgenommen, indem sich Vesikel von der Zellmembran abschnüren. Dafür werden sie von einem dichten Käfig aus Clathrinmolekülen umgeben. Innerhalb weniger Minuten wird dann der Clathrinkäfig aufgebrochen. Für das Deassemblieren der Clathrinmultimere sind ein zytosolisches Hsp70, das J-Protein Auxillin und ATP erforderlich. Auxillin hat neben der J-Domäne eine Domäne mit Affinität zum Clathrin. Unserem Modell entsprechend bindet Auxillin an die Clathrinkäfige. Hsp70 wird dann durch die J-Domäne des Auxillins stimuliert, die

Clathrinmoleküle zu binden. Durch diese Bindung werden die Clathrin-Clathrin Interaktionen destabilisiert und der Käfig löst sich auf (Fotin *et al.*, 2004). Nach der Deassemblierung bleibt Hsp70-ADP noch für kurze Zeit an das Clathrin gebunden und dissoziiert nach dem Nukleotidaustausch gegen ATP (Ungewickell *et al.*, 1995; Holstein *et al.*, 1996; Ungewickell *et al.*, 1997).

Hsp70-Proteine beeinflussen den Zellzyklus und die antivirale Abwehr

Papoviren wie der SV-40 Virus (Simian Virus 40) aus der Gattung der Polyomaviren synthetisieren nach Infektion von Zellen ein J-Protein, das „large T-Antigen“. Infizieren diese Viren eine Zelle, benötigen sie zum Replizieren die DNA-Synthesemaschinerie der Zelle. Dafür muß die Zelle im Zellzyklus die G1-Phase (Ruhephase) verlassen und in die S-Phase (Synthesephase) eintreten. Dieser Prozess wird durch mehrere Tumorsuppressorproteine überwacht. So muss für die Progression des Zellzyklus in die S-Phase unter anderem das Rb-Tumorsuppressorprotein inaktiviert werden.

Die Inaktivierung von Rb erfolgt durch das „Large T-Antigen“ des SV40-Virus. Das Virusprotein besteht aus einer J-Domäne sowie aus einer Domäne in der Mitte des Proteins, die mit dem Rb-Tumorsuppressorprotein interagieren kann. Es wurde gezeigt, dass für das Ausschalten von Rb die Aktivität beider Domänen, sowohl der J-Domäne als auch der Rb-bindenden-Domäne, erforderlich ist und dass sich die beiden intakten Domänen auf demselben Protein befinden müssen. Wiederum scheint eine räumliche Nähe zwischen der J-Domäne und dem Substrat erforderlich zu sein (Sheng *et al.*, 1997; Kelley, 1998; DeCaprio, 1999). Folgt man unserem Modell, dann bindet das Large-T-Antigen an Rb und präsentiert dieses zelleigenem Hsp70. Die J-Domäne würde dann ein Hsp70 dazu aktivieren, das präsentierte Rb zu binden und dadurch zu inaktivieren. Dadurch kann die Zelle in die Synthesephase überführt und das Virus repliziert werden. Das Virus missbraucht also durch Synthese eines J-Proteins zelleigenes Hsp70, um die antivirale Abwehr der Zelle auszuschalten. (Sullivan und Pipas, 2002).

Zusammenfassung

Es konnte durch unsere Untersuchungen gezeigt werden, dass Hsp70 durch die J-Domäne der J-Proteine katalytisch aktiviert wird, Substrate in unmittelbarer Nähe zu binden. Nach Aktivierung durch die J-Domäne binden Hsp70-Proteine ein weites

Spektrum unterschiedlicher Peptidsequenzen und Proteine, die sie alleine nicht binden würden. Die Substratauswahl erfolgt durch die weiteren nicht konservierten Domänen der J-Proteine. Der Bindungsmechanismus ist über die ATPase-Aktivität der Hsp70-Moleküle erklärbar.

Angesichts der vielfältigen Funktionen der Hsp70-Proteine in einer Vielzahl verschiedener Organismen und Zellkompartimente erklärt ein erstaunlich einfacher einheitlicher Mechanismus die Zusammenarbeit von Hsp70- und J-Proteinen.

Literaturverzeichnis

1. Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE (2005) The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.*, 168, 389-399.
2. Alfano C und McMacken R (1989) Ordered assembly of nucleoprotein structures at the bacteriophage lambda replication origin during the initiation of DNA replication. *J.Biol.Chem.*, 264, 10699-10708.
3. Banecki B und Zylicz M (1996) Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone machine action. *J.Biol.Chem.*, 271, 6137-6143.
4. Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething MJ (1993) Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, 75, 717-728.
5. Brodsky FM (1988) Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic. *Science*, 242, 1396-1402.
6. Brodsky JL und Schekman R (1993) A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J.Cell Biol.*, 123, 1355-1363.
7. Bukau B und Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92, 351-366.
8. Chappell TG, Welch WJ, Schlossman DM, Palter KB, Schlesinger MJ, Rothman JE (1986) Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell*, 45, 3-13.
9. Corsi AK 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, 1483-1493.
10. DeCaprio JA (1999) The role of the J domain of SV40 large T in cellular transformation. *Biologicals*, 27, 23-28.
11. Deshaies RJ, Sanders SL, Feldheim DA, Schekman R (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, 349, 806-808.
12. Edelhoch H (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6, 1948-1954.
13. Fägerstam LG, Frostell A, Karlsson R, Kullman M, Larsson A, Malmqvist M, Butt H (1990) Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to epitope mapping. *J.Mol.Recognit.*, 3, 208-214.
14. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE (1991) Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, 353, 726-730.

15. Fotin A, Cheng Y, Grigorieff N, Walz T, Harrison SC, Kirchhausen T (2004) Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature*, 432, 649-653.
16. Gamer J, Bujard H, Bukau B (1992) Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32. *Cell*, 69, 833-842.
17. Georgopoulos C (1992) The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem.Sci.*, 17, 295-299.
18. Gething MJ und Sambrook J (1992) Protein folding in the cell. *Nature*, 355, 33-45.
19. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu.Rev.Cell Biol.*, 1, 1-39.
20. Gragerov A, Zeng L, Zhao X, Burkholder W, Gottesman ME (1994) Specificity of DnaK-peptide binding. *J.Mol.Biol.*, 235, 848-854.
21. Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*, 92, 747-758.
22. Hanein D, Matlack KE, Jungnickel B, Plath K, Kalies KU, Miller KR, Rapoport TA, Akey CW (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, 87, 721-732.
23. Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-579.
24. Hartl FU und Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295, 1852-1858.
25. Holstein SE, 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.
26. Kelley WL (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem.Sci.*, 23, 222-227.
27. Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*, 356, 683-689.
28. Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J, Bukau B (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96, 5452-5457.

-
29. 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.U.S.A*, 88, 2874-2878.
 30. Lyman SK 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.
 31. Matlack KE, Misselwitz B, Plath K, Rapoport TA (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, 97, 553-564.
 32. Mayer MP und Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol.Life Sci.*, 62, 670-684.
 33. Mayer MP, Schroder H, Rudiger S, Paal K, Laufen T, Bukau B (2000) Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat.Struct.Biol.*, 7, 586-593.
 34. Nelson MK, Kurihara T, Silver PA (1993) Extragenic suppressors of mutations in the cytoplasmic C terminus of SEC63 define five genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 134, 159-173.
 35. Neupert W und Brunner M (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 3, 555-565.
 36. Okamoto K, Brinker A, Paschen SA, Moarefi I, Hayer-Hartl M, Neupert W, Brunner M (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J.*, 21, 3659-3671.
 37. Palleros DR, Reid KL, Shi L, Welch WJ, Fink AL (1993) ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K⁺ but not ATP hydrolysis. *Nature*, 365, 664-666.
 38. Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, 81, 561-570.
 39. Pierpaoli EV, Sandmeier E, Baici A, Schonfeld HJ, Gisler S, Christen P (1997) The power stroke of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone system. *J.Mol.Biol.*, 269, 757-768.
 40. Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450, 663-669.
 41. Revington M, Holder TM, Zuiderweg ER (2004) NMR study of nucleotide-induced changes in the nucleotide binding domain of *Thermus thermophilus* Hsp70 chaperone DnaK: implications for the allosteric mechanism. *J.Biol.Chem.*, 279, 33958-33967.

-
42. Rudiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Bukau B (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.*, 16, 1501-1507.
 43. Rudiger S, Schneider-Mergener J, Bukau B (2001) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.*, 20, 1042-1050.
 44. Schmid D, Baici A, Gehring H, Christen P (1994) Kinetics of molecular chaperone action. *Science*, 263, 971-973.
 45. Schneider HC, Berthold J, Bauer MF, Dietmeier K, Guiard B, Brunner M, Neupert W (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, 371, 768-774.
 46. Schroder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.*, 12, 4137-4144.
 47. Scidmore MA, Okamura HH, Rose MD (1993) Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. *Mol.Biol.Cell*, 4, 1145-1159.
 48. Sheng Q, Denis D, Ratnofsky M, Roberts TM, DeCaprio JA, Schaffhausen B (1997) The DnaJ domain of polyomavirus large T antigen is required to regulate Rb family tumor suppressor function. *J.Virol.*, 71, 9410-9416.
 49. Sullivan CS und Pipas JM (2002) T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 66, 179-202.
 50. Szabo A, Korszun R, Hartl FU, 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.
 51. Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE (1997) Functional interaction of the auxilin J domain with the nucleotide- and substrate-binding modules of Hsc70. *J.Biol.Chem.*, 272, 19594-19600.
 52. Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, Martin B, Greene LE, Eisenberg E (1995) Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 378, 632-635.
 53. Vogel JP, Misra LM, Rose MD (1990) Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J.Cell Biol.*, 110, 1885-1895.
 54. Walter P und Johnson AE (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu.Rev.Cell Biol.*, 10, 87-119.
 55. Wawrzynow A, Banecki B, Wall D, Liberek K, Georgopoulos C, Zylicz M (1995) ATP hydrolysis is required for the DnaJ-dependent activation of DnaK

-
- chaperone for binding to both native and denatured protein substrates. *J.Biol.Chem.*, 270, 19307-19311.
56. Wei J, Gaut JR, Hendershot LM (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.
57. Wittung-Stafshede P, Guidry J, Horne BE, Landry SJ (2003) The J-domain of Hsp40 couples ATP hydrolysis to substrate capture in Hsp70. *Biochemistry*, 42, 4937-4944.
58. Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272, 1606-1614.

Anteilsklärung

Die vorliegende Promotionsarbeit ist Ergebnis der engen Zusammenarbeit mit Dr. Benjamin Misselwitz. Diese Aufgabenteilung wurde mit dem Arbeitsgruppenleiter Prof. Tom Rapoport abgesprochen.

Herr Oliver Staeck hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

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

*These authors contributed equally to this work

50 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Etablieren des SPR-Assays für die Peptid-Bindung von BiP und Durchführung sämtlicher veröffentlichter SPR-Experimente. Weiterhin Expression und Reinigung der BiP-Proteine und BiP-Mutanten. Anteilweise Klonierung und Reinigung der J-Domänen. Beitrag zum Etablieren und zur Durchführung der ATPase-Experimente.

Publikation 2:

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

40 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung der veröffentlichten SPR-Assays mit BiP, den BiP-Mutanten und dem GST-J Fusionsprotein sowie Durchführung der Experimente mit dem immobilisierten Sec-Komplex. Anteilweise Klonierung, Expression und Reinigung der BiP-Proteine und BiP-Mutanten sowie des GST-J Proteins.

Publikation 3:

T.A. Rapoport, K.E. Matlack, K. Plath, B. Misselwitz, and O. Staeck (1999), "Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum." Biol. Chem. Vol. 380 pp. 1143-1150

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Entwicklung des spezifischen Modells für die Interaktion von BiP, J-Domäne und Substrat für den posttranslationalen Transport

Ausgewählte Publikationen

Impact Factor 1999:

- Misselwitz B* Staeck O*, Rapoport TA 18,14
J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. Mol Cell. 1998 Nov;2(5):593-603
*These authors contributed equally to this work
- Misselwitz B, Staeck O, Matlack KE, Rapoport TA 7,67
Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. J Biol Chem. 1999 Jul 16;274(29):20110-5
- Rapoport TA, Matlack KE, Plath K, Misselwitz B, Staeck O 3,36
Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. Biol Chem. 1999 Oct;380(10):1143-50

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

PUBLIKATIONSLISTE

Misselwitz B* Staeck O*, Rapoport TA
J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol Cell*. 1998 Nov;2(5):593-603

*These authors contributed equally to this work

Misselwitz B, Staeck O, Plath K, Matlack KE, Rapoport TA
Realtime Analysis of the Interactions of Bip with the J-Domain of Sec63p and with Peptides. *Molecular Chaperones and the Heat Shock Response*, CSHL Press, USA 1998

Staeck O, Misselwitz B, Rapoport TA
The J-Domain of Sec63p activates Kar2p for Peptide Binding
Molecular Biology Meeting, Harvard Medical School, Boston, USA 1998
(Posterbeitrag)

Misselwitz B, Staeck O, Matlack KE, Rapoport TA
Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J Biol Chem*. 1999 Jul 16;274(29):20110-5

Rapoport TA, Matlack KE, Plath K, Misselwitz B, Staeck O
Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem*. 1999 Oct;380(10):1143-50

Harrisons Innere Medizin, 16. Auflage, deutsche Ausgabe; 2005
Kapitelherausgeber

Denecke T, Staeck O, Amthauer H, Hänninen EL
PET/CT visualises inflammatory activity of pulmonary artery aneurysms in Behçet disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007 Jun;34(6):970.

Staeck O, Hofmann J, Günther S, Schmidt-Chanasit J, Frank C, Stark K, Bärwolff S
Patientin mit fulminanter Hepatitis A und einer Rift-Valley-Fieber-Infektion nach Kenia-Aufenthalt. *Epidemiologisches Bulletin* 11/2008: 90-91

Harrisons Innere Medizin, 17. Auflage, deutsche Ausgabe; 2008
Kapitelherausgeber

Fatal outcome of Hepatitis A infection in a traveler with incomplete HAV vaccination and evidence of Rift Valley fever virus infection. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3850-2

Erklärung

„Ich, Oliver Staeck, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Arbeitsweise des molekularen Chaperons Hsp70 und die Rolle der J-Proteine“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Danksagung

Benjamin Misselwitz danke ich für die kreative, produktive Zusammenarbeit und für die Freundschaft, durch die diese Arbeit zustande gekommen ist. Tom Rapoport möchte ich herzlich für Möglichkeit danken, in der hervorragenden Umgebung seines Labors zu arbeiten. Seine Betreuung und persönliche Unterstützung waren ausgezeichnet.

Ich danke allen Mitarbeitern des Rapoport-Labors, die mich während meiner Zeit in Boston fachlich wie privat begleitet haben, besonders Ben, Andrea, Lars, Kathrin, Walther und Kent.

Herrn Prof. Dr. Bollmann danke ich sehr für die Übernahme dieser Dissertation als betreuender Hochschullehrer.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reutter, der mich für die Molekularbiologie begeistert hat und in dessen Labor ich erste Erfahrungen sammeln konnte.

Ich bedanke mich bei Mandy Mangler für ihre Unterstützung während der schriftlichen Zusammenfassung, bei Lars Neeb und Maximilian Hort für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Gertrud und Wolfgang Staeck sowie meiner Tante und meinem Onkel, Ursel und Dieter Anders, für ihre andauernde Unterstützung und dafür, dass sie mir das Studium der Humanmedizin und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.