

Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des kleinen
Hitzeschockproteins Hsp26 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae***

Thusnelda Stromer

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

Vorsitzender

Univ.-Prof. Dr. Steffen J. Glaser

Prüfer der Dissertation

1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Die Dissertation wurde am 03.04.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 07.05.2003 angenommen.

1	Einleitung	1
1.1	Die Faltung von Proteinen.....	1
1.2	Proteinfaltung <i>in vitro</i> vs. Proteinfaltung <i>in vivo</i>	2
1.3	Die Hitzeschockantwort in der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.4	Molekulare Chaperone.....	6
1.5	Kleine Hitzeschockproteine (sHsps).....	9
1.5.1	Allgemeine Merkmale kleiner Hitzeschockproteine.....	9
1.5.2	Strukturelle Organisation kleiner Hitzeschockproteine	12
1.5.3	Funktion kleiner Hitzeschockproteine	20
1.6	Kleine Hitzeschockproteine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
1.7	Hsp26 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
1.8	Problemstellung	29
2	Material und Methoden	31
2.1	Verwendetes Material.....	31
2.1.1	Organismen und Vektoren	31
2.1.2	Chemikalien	31
2.1.3	Größenstandards und Kits.....	33
2.1.4	Proteine und Enzyme	33
2.1.5	Antikörper.....	34
2.1.6	Chromatographiematerialien.....	34
2.1.7	Sonstiges Material.....	35
2.1.8	Nährmedien und Antibiotika.....	35
2.1.9	Puffer	37
2.1.10	Geräte.....	40
2.1.11	Computerprogramme	42
2.2	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>S. cerevisiae</i>	43
2.2.2	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	43
2.2.3	Allgemeine molekularbiologische Methoden	44
2.2.4	Transformation von <i>E. coli</i>	44
2.2.5	Enzymatische Modifikation von DNA	45
2.3	Präparative Methoden.....	46
2.3.1	Zellaufschluss	46
2.3.2	Reinigung von Hsp26 aus <i>S. cerevisiae</i>	46

2.3.3	Reinigung von Hsp26 Δ N aus <i>E. coli</i>	47
2.3.4	Aufkonzentrierung und Dialyse von Proteinen	48
2.3.5	NaDoc-TCA-Fällung (denaturierende Bedingungen).....	49
2.4	Chromatographie	49
2.4.1	Ionenaustauschchromatographie	50
2.4.2	Gelfiltrationschromatographie.....	50
2.4.3	Affinitätschromatographie.....	51
2.5	Proteinchemische Methoden	51
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	51
2.5.2	Protein-Färbemethoden	52
2.5.3	Densitometrie	53
2.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	54
2.6	Spektroskopie	55
2.6.1	UV-Absorptionsspektroskopie	55
2.6.2	Fluoreszenzspektroskopie.....	57
2.6.3	Stopped flow Messungen	60
2.6.4	CD-Spektroskopie	61
2.7	Sonstige Methoden	64
2.7.1	Analytische Gelfiltration (HPLC)	64
2.7.2	Elektronenmikroskopie - Negativkontrastierung.....	65
2.7.3	Kalorimetrie-Differential Scanning Calorimetrie.....	66
2.8	Chaperon-Assays	67
2.8.1	Der Citratsynthase-Aktivitätstest.....	67
2.8.2	Der α -Glukosidase-Aktivitätstest.....	68
2.8.3	Thermische Aggregation von Citratsynthase.....	69
2.8.4	Thermische Aggregation von α -Glukosidase.....	69
2.8.5	Thermische Aggregation von Rhodanase.....	70
2.8.6	Chemisch induzierte Aggregation von Insulin	70
3	Ergebnisse	71
3.1	Strukturelle Charakterisierung von Hsp26	71
3.1.1	Einfluss chaotroper Agenzien auf die Stabilität von Hsp26	71
3.1.2	Stabilität von Hsp26 gegenüber pH-Änderungen.....	78
3.2	Charakterisierung thermisch induzierter Strukturänderungen	79
3.2.1	Stabilität von Hsp26 gegenüber thermischer Einflüsse	79
3.3	Charakterisierung des reassozierten Hsp26 Komplexes (rHsp26)	93

3.4	Charakterisierung der Interaktion von Hsp26 mit Substratproteinen.....	100
3.4.1	Der Einfluss von Hsp26 auf die Aggregation von Modellsubstraten.....	100
3.4.2	Untersuchung von Hsp26-Substrat Komplexen mittels Gelfiltration	103
3.4.3	Stöchiometrie der Substratbindung - Kooperativität der Komplexbildung.....	104
3.4.4	Elektronenmikroskopische Analyse von Hsp26-Substrat Komplexen.....	106
3.4.5	Ausbildung gemischter Hsp26-Substrat Komplexe	107
	Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass das primär gebundene Substrat die Morphologie der resultierenden Substratkomplexe bestimmt. Weiterhin wird die Promiskuität der Substratbindung kleiner Hsps bestätigt	109
3.4.6	Der Einfluss von Hsp26 auf die thermische Entfaltung von Modellsubstraten	110
3.4.7	Rückfaltung von an Hsp26 gebundenen Substraten.....	111
3.5	Stabilität der Hsp26-Substrat Komplexe	114
3.6	Charakterisierung der C-terminalen (Hsp26ΔN) und N-terminalen (Hsp26ΔC) Domänen von Hsp26.....	117
3.6.1	Strukturelle Charakterisierung von Hsp26 Δ N, der α -Kristallindomäne	118
3.6.2	Analyse der Chaperoneigenschaften von Hsp26 Δ N	122
3.7	Analyse von Hsp26ΔN30.....	123
4	<i>Diskussion</i>.....	129
4.1	Diskussion zur Struktur und Stabilität von Hsp26.....	129
4.2	Hsp26 und Substratproteine	139
4.3	Charakterisierung von Hsp26 Δ N und Hsp26 Δ N30.....	147
5	<i>Zusammenfassung</i>.....	153

Literaturverzeichnis

Abkürzungen

Publikationsliste

1 Einleitung

1.1 Die Faltung von Proteinen

Proteine nehmen in ihrem biologisch aktiven Zustand eine definierte dreidimensionale Struktur ein (Dill *et al.*, 1995). Bei der Proteinbiosynthese werden die entsprechenden Aminosäurebausteine in linearer Folge zusammengefügt. Somit werden Polypeptidketten ohne eindeutige Konformation gebildet, die erst zu ihrer korrekten dreidimensionalen Struktur falten müssen. Anfinsens klassische Experimente zur Faltung von RNase zeigten, dass Proteinfaltung ein thermodynamisch bestimmter Prozess ist. Die Information zur korrekten Strukturbildung ist durch die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette determiniert (Anfinsen *et al.*, 1961; Anfinsen, 1973). Die Ermittlung der korrekten Faltung oder die Vorhersage der Funktion eines Proteins ist bisher anhand der Primärsequenz nur begrenzt möglich (Fersht & Daggett, 2002). Levinthal postulierte, dass der Strukturbildungsprozess über definierte Intermediate, also entlang spezifischer Faltungswege verlaufen muss, da ein statistisches Auffinden der korrekten Struktur in einem biologisch relevanten Zeitraum unmöglich wäre (Levinthal, 1968). Der Faltungsmechanismus ist dabei von der Aminosäuresequenz abhängig. Kleine Proteine, welche nur aus einer Domäne bestehen, können sehr schnell und ohne das Auftreten von intermediären Zuständen falten, sofern nicht geschwindigkeitsbestimmende Schritte an der Faltung beteiligt sind (Sosnick *et al.*, 1994; Schindler *et al.*, 1995). Langsame Prozesse, wie die Isomerisierung von Prolinen oder die Bildung von Disulfidbrücken, führen während des Faltungsvorgangs zur Population von intermediären Zuständen. Das Auftreten von Intermediaten in komplexen Faltungsvorgängen ist jedoch nicht allein auf diese geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionen beschränkt (Kim & Baldwin, 1990; Sanchez & Kiefhaber, 2003).

Die Faltung von großen Multidomänen- und oligomeren Proteinen folgt einem sequenziellen, hierarchischen Mechanismus. Ein schneller hydrophober Kollaps führt zur Bildung von sogenannten „molten globules“ (Kuwajima, 1989; Jaenicke & Lilie, 2000). Während des Kollapses kommt es zu Wechselwirkungen zwischen benachbarten Aminosäureseitenketten. Dies führt zur Ausbildung von Sekundärstrukturelementen und zum Ausschluss von Wasser aus dem hydrophoben Kern des Proteins (Baldwin, 2002). Weitere Sekundärstrukturbildung führt zur Ausbildung von Supersekundärstrukturen. Diese lagern sich zu Domänen

zusammen, welche durch eine definierte, kompakte Tertiärstruktur charakterisiert sind. Die Assemblierung von Monomeren mit nativähnlicher Tertiärstruktur ermöglicht die Bildung von oligomeren Proteinen. Weitere Assoziations- und Umordnungsschritte sind erforderlich, bis der native Zustand erreicht ist (Jaenicke, 1996; Jaenicke & Lilie, 2000). Die Entstehung von nativer Tertiär- und Quartärstruktur ist ein entropisch gesteuerter Prozess, der vor allem hydrophobe Interaktionen beinhaltet (Jaenicke, 1987; Jaenicke & Seckler, 1997). Neben den entropischen Effekten aus dem hydrophoben Kollaps, tragen auch enthalpisch gesteuerte Prozesse zur Strukturfindung von Proteinen bei (Privalov, 1989; Jaenicke, 1996; Jaenicke, 1999; Jaenicke & Lilie, 2000). Hohlräume im Proteininneren wirken destabilisierend (Matthews, 1995), während die dichte Packung des hydrophoben Proteinkerns mit optimalen van-der-Waals Kontakten zu einer starken Stabilisierung des Moleküls führt.

Der klassischen Beschreibung der Proteinfaltung liegt ein sequentieller Faltungsmechanismus mit genau definierten Intermediaten zugrunde. Neuere Faltungstheorien gehen aber, im Gegensatz dazu, von einer Vielzahl von Faltungswegen auf einer Energielandschaft der Faltung aus (Camacho & Thirumalai, 1993; Chan & Dill, 1996; Wolynes *et al.*, 1996; Hagihara & Goto, 1997). In diesen Modellen treten Intermediate nur dann auf, wenn Polypeptidketten auf ihren Faltungswegen zum energetisch günstigsten, nativen Zustand in lokalen Energieminima verweilen. Diesen können sie aufgrund hoher Aktivierungsbarrieren nur langsam wieder entkommen (Baldwin, 1995; Baldwin, 2002).

1.2 Proteinfaltung *in vitro* vs. Proteinfaltung *in vivo*

Die Faltung von Proteinen in der Zelle ist ein vektorieller Prozess: Sie erfolgt kotranslational oder während der Translokation (Braakman *et al.*, 1991) vom N- zum C-Terminus. *In vitro* hingegen wird die Proteinfaltung als integraler Prozess angesehen, die von einem nicht eindeutig definierten, vom Denaturierungsmittel abhängigen, entfalteten Zustand ausgeht. Die Faltung kann an jeder beliebigen Stelle im Protein beginnen. Häufig erreichen Multidomänenproteine und oligomere Proteine *in vitro* nur zu einem bestimmten Teil ihre native Konformation (Jaenicke, 1987; Jaenicke & Seckler, 1997). Der Grund hierfür liegt in der Ausbildung nicht nativer intermolekularer Wechselwirkungen (Kiefhaber *et al.*, 1991), die zur Entstehung von Aggregaten führen. Auch in Bakterienzellen rekombinant exprimierte Proteine führen häufig zur Bildung von großen Aggregaten, sogenannten „inclusion bodies“ (Rudolph *et al.*, 1990). Um optimale Rückfaltungsausbeuten *in vitro* zu erlangen und

unerwünschte Nebenreaktionen wie Aggregation zu vermeiden, müssen Parameter wie Proteinkonzentration, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke optimiert werden (Jaenicke & Rudolph, 1989; Kiefhaber *et al.*, 1991; Jaenicke, 1997).

In vivo hingegen sind die äußeren Bedingungen für alle Proteine konstant. Aggregation ist stark von der lokalen Proteinkonzentration abhängig. Mit einer Proteinkonzentration von 100-200 mg/ml in einer *E. coli* Zelle und einer Syntheserate von 30 000 Polypeptiden pro Minute, ist die apparente Faltungsausbeute *in vivo* nahezu 100 % (Lorimer, 1996; Bukau *et al.*, 2000). Trotzdem erfolgt auch *in vivo* Missfaltung und inkorrekte Assemblierung von Proteinen (Hurtley & Helenius, 1989; Helenius, 1992).

Auftreten und Auswirkungen von Fehlfaltung *in vivo* werden durch ein exaktes Zusammenspiel zelleigener Faktoren minimiert (Hartl, 1996). Zum einen minimieren Faltungshelferproteine und molekulare Chaperone unkorrekte Faltungsprozesse und fördern die korrekte Faltung und Assemblierung von Polypeptiden (Buchner, 1996; Hartl, 1996; Beissinger & Buchner, 1998), zum anderen werden missgefaltete Proteine vom zelleigenen Degradationsapparat abgebaut (Gottesman & Maurizi, 1992; Wickner *et al.*, 1999).

Etwa 30 % aller in *E. coli* synthetisierten cytosolischen Proteine benötigen die Hilfe von Faltungshelferproteinen (Bukau *et al.*, 2000). Faltungshilfe erfolgt sowohl kotranslational, während das Polypeptid synthetisiert wird, als auch posttranslational, nachdem die komplette Polypeptidkette vom Ribosom entlassen wurde (Bukau *et al.*, 2000). Neben der Faltung von naszierenden Polypeptidketten sind viele andere zelluläre Prozesse Chaperon-abhängig. Zum Beispiel ist der Import cytosolisch synthetisierter Proteine in Mitochondrien von Faltungshelferproteinen abhängig, da Proteine nur im linearen, entfalteten Zustand durch eine oder beide mitochondriale Membranen transportiert werden können (Dekker & Pfanner, 1997). Molekulare Chaperone sind in diesem Fall zum einen an der Entfaltung bzw. der Stabilisierung des entfalteten Zustandes auf der cytosolischen Seite der Membran und zum anderen am Transport und der Faltung in den Mitochondrien beteiligt.

Geschwindigkeitsbestimmende Faltungsschritte, wie die Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken und die *cis/trans* Isomerisierung von Prolinen, werden in der Zelle ebenfalls von Faltungshelfern katalysiert. Die Klasse der Proteindisulfidisomerasen (PDI; DsbA) katalysieren *in vitro* Redoxreaktionen von Cysteinen und Disulfiden in Polypeptiden in Abhängigkeit von den Redoxbedingungen (Wunderlich & Glockshuber, 1993; Bardwell, 1994). Die Interaktion der Isomerase mit dem Substrat führt dabei zur Senkung der

Aktivierungsenergie der Isomerisierung und zu einer Beschleunigung dieses Faltungsschrittes. Dadurch wird die Konzentration an Intermediaten während des Faltungsvorgangs verringert. Dies wiederum minimiert die konzentrationsabhängige Aggregation und erhöht die Faltungsausbeute (Weissman & Kim, 1993; Lilie *et al.*, 1994).

Die Klasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIs) katalysiert die Isomerisierung zwischen der *cis*- und *trans*-Form der Peptidbindung vor Prolinresten in Proteinen. Diese Peptidbindung kann im Gegensatz zu allen anderen Peptidbindungen im gefalteten Protein in seiner *cis*-Konformation vorkommen. Die Isomerisierungsreaktion besitzt eine hohe Aktivierungsenergie (ca. 85 kJ/mol) und ist häufig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei Faltungsprozessen (Scholz *et al.*, 1997; Jaenicke & Lilie, 2000).

1.3 Die Hitzeschockantwort in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Extrazellulärer Stress, wie z.B. unphysiologische Temperaturen, führen zu Störungen vieler zellulärer Strukturen und Stoffwechselfunktionen (Nover, 1991; Laszlo, 1992; Dawes, 1999). Abhängig von der Dauer und Stärke kann Stress zum Zellzyklusarrest oder auch zum Zelltod führen (van Dongen & van Wijk, 1988). Ist die Stresseinwirkung nicht letal, so erfolgt bereits nach kurzer Zeit eine Adaptation an die neuen Umweltbedingungen und eine Weiterführung der normalen Zellproliferation ist möglich (Lindquist, 1986).

Hitzestress führt zu einem vorübergehenden Zellzyklusarrest, atypischer Zellteilung (Piper, 1997; Walker, 1999a) und zu einer Reihe von morphologischen und molekularen Veränderungen in den verschiedenen Kompartimenten der Hefezelle. Neben irregulärem Wachstum der Zellwand und einer Zunahme der Zellgröße (Kamada *et al.*, 1995) ist eine deutliche Änderung der Zellmorphologie, bedingt durch die Umgestaltung der Zellmembran und Zellwand, zu beobachten (Piper, 1997).

Hitzestress führt zu Aggregation von integralen Membranproteinen (Kruuv *et al.*, 1983) und beeinflusst das Verhältnis von Lipiden zu Proteinen in der Membran (Piper, 1993). Außerdem kommt es zu einer Zunahme der Membranfluidität und -permeabilität (Burgman & Konings, 1992). Die erhöhte Permeabilität hat, infolge des erhöhten Protoneneinstroms, ein schnelles Absinken des intrazellulären pH-Wertes zur Folge (Coote *et al.*, 1991).

Hitzestress führt auch zu Veränderungen des Hefezytoskeletts. Die Aufrechterhaltung der Zellform wird durch die Zellwand sowie das Aktinfilament- und Mikrotubuli-Netzwerk

ausgeübt. Ein Zusammenbruch des Cytoskeletts führt zu schwerwiegenden Schädigungen, da diese Netzwerke für die Formgebung der Zelle, Bewegung, Anordnung und Transport von Zellorganellen zuständig sind (Mager & Ferreira, 1993).

Stress führt auch zur veränderten Synthese von Makromolekülen. Das Fehlen bestimmter Proteine in der Zelle hat eine Verlangsamung und eine verringerte Effektivität verschiedener metabolischer Stoffwechselabläufe zur Folge (Piper, 1997).

Im Laufe der Evolution haben Hefen und alle anderen Organismen ein effizientes molekulares Schutzsystem entwickelt, um diese negativen Auswirkungen von Stress zu minimieren. Manche Abwehrmechanismen sind intrinsisch bzw. konstitutiv, andere hingegen sind induzierbar (Dawes, 1999).

Hitzestress führt zur Akkumulation von sogenannten protektiven Substanzen, wie z.B. Trehalose (Wiemken, 1990), Sphingolipiden (Jenkins *et al.*, 1997) oder Ubiquitin (Finley & Chau, 1991). Es wird angenommen, dass Trehalose Membranstrukturen stabilisiert (Iwahashi *et al.*, 1995) und die Temperaturstabilität zellulärer Proteine erhöht (Calaco *et al.*, 1992). Sphingolipide sollen einerseits die Membran stabilisieren und andererseits als „second messenger“ oder Signaltransduktoren agieren (Dawes, 1999). Ubiquitin besitzt keine protektive Funktion, sondern ist für die proteolytische Umsetzung denaturierter Proteine verantwortlich (Finley & Chau, 1991). In einem mehrstufigen Prozess wird Ubiquitin an die, für die Proteolyse bestimmten Proteine angehängt, so dass sie vom Ubiquitin-Proteolysesystem erkannt und abgebaut werden (Jentsch, 1992).

Ebenso werden Proteine der Zellwand, wie z.B. Hsp30 und Pir2p verstärkt exprimiert. Hsp30, welches als Regulator der H⁺-ATPase identifiziert wurde, sorgt für die Sicherung der Energiereserven, indem es die Stresstimulation der ATPase schwächt (Piper *et al.*, 1997). Pir2p, ein Glykoprotein der Zellwand, wirkt unter Stressbedingungen der Schwächung der Zellwand entgegen (Kapteyn *et al.*, 2001).

Tabelle 1.1 bietet einem Überblick über die wichtigsten Klassen der Hitzeschockproteine von *S. cerevisiae* mit ihren jeweiligen Funktionen.

Die bei Hitzestress induzierten Hitzeschockproteine (Hsps) helfen der Zelle extreme Umweltbedingungen zu überleben. Sie sind entweder direkt an der Degradation oder an der Reaktivierung von denaturiertem Protein involviert (Parsell & Lindquist, 1993). Hitzeschockproteine stellen eine hochkonservierte Proteinklasse dar, die in allen bekannten Organismen auftritt (Lindquist & Craig, 1988). In *S. cerevisiae* sind unter anderem Hsp104,

Hsp83, Ssa1-Ssa4 (Hsp70), Hsp60 und die kleineren Hsp42, Hsp30, Hsp26 und Hsp12 identifiziert worden (siehe Tabelle 1.1; vergleiche 1.4).

Tabelle 1.1 Auswahl der wichtigsten Hitzeschockproteine aus *S. cerevisiae*. (Piper, 1997; Walker, 1999a)

<i>Hitzeschockprotein</i>	<i>Vermutete physiologische Funktion</i>
Hsp150/Pir2p	Stabilisierung der Zellwand
Hsp104 (Hsp100-Familie)	Für Erwerb der Stresstoleranz notwendig; Konstitutiv in nicht-fermentativ wachsenden Hefen exprimiert und bei Eintritt in die stationäre Phase; Chaperonfunktion
Hsp82 (Hsp90-Familie)	Chaperonfunktion
Ssa1-4 (Hsp70-Familie)	Chaperonfunktion; involviert in posttranslationale Importabläufe; Rolle bei der Proteolyse von Proteinen
Hsp60 (Hsp60-Familie)	Chaperonfunktion; mitochondrial; erleichtert die posttranslationale Assemblierung von Proteinen
CCT	cytosolisch
Hsp30	Lokalisation in der Plasmamembran; Dort vermutlich an der Regulation der H ⁺ -ATPase beteiligt
„Kleine“ Hsps Hsp26 Hsp42	Chaperonfunktion; zelluläre Rolle noch nicht geklärt; involviert bei Eintritt in die stationäre Phase und bei Induktion der Sporulation; an Stabilisierung von Aktin beteiligt (Hsp42)
PPI	Faltungshelfer; Peptidyl-Prolyl-Isomerase
PDI	Faltungshelfer; Protein-Disulfid-Isomerase
Andere	
Glykolytische Enzyme	Enolase (Hsp48), GAPDH (Hsp35), PGK
Katalase	Schutz vor Antioxidantien
Proteine der Hefevakuole	Carboxypeptidase Y, Proteinase A
GP400	Sekretorisches Hsp unbekannter Funktion
Ubiquitin	Für proteolytischen Abbau denaturierter Proteine verantwortlich.

1.4 Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone stellen die größte Gruppe faltungsassistierender Proteine dar (Gething & Sambrook, 1992; Buchner, 1996; Hartl, 1996; Beissinger & Buchner, 1998). Sie verhindern die Akkumulation geschädigter Proteine, indem sie deren Aggregation

unterdrücken (Beissinger & Buchner, 1998; Walter & Buchner, 2002) und unterstützen die korrekte Faltung/Rückfaltung von Proteinen sowohl unter zellulären Stressbedingungen als auch während der Translation und Translokation, ohne selbst integraler Bestandteil der endgültigen Struktur zu sein (Ellis & van der Vies, 1991; Buchner, 1996). Damit stellt das Konzept der molekularen Chaperone keinen Widerspruch zum Prinzip der spontanen Faltung (Anfinsen, 1973) dar, da die Faltungshelferproteine keine Strukturinformation einbringen, sondern durch die Reduktion von Nebenreaktionen, hohe Faltungsausbeuten garantieren (Beissinger & Buchner, 1998).

Die Tatsache, dass molekulare Chaperone unter physiologischen Bedingungen und Hitzestress sowie anderen Stressbedingungen vermehrt exprimiert werden, zeigt ihre Wichtigkeit bei der Aufrechterhaltung zellulärer Prozesse und der Vermittlung von Stresstoleranz (Beissinger & Buchner, 1998). Einige sind für das Zellwachstum essentiell (Becker & Craig, 1994) und werden auch während bestimmter Entwicklungsphasen exprimiert (Morange *et al.*, 1998; Morange, 1999; Davidson *et al.*, 2002). Aufgrund ihrer Überexpression unter Stressbedingungen lassen sich die meisten molekularen Chaperone der Gruppe der Hitzeschockproteine zuordnen (Georgopoulos & Welch, 1993; Buchner, 1996).

Um ihrer Funktion nachzukommen, müssen die Hsps in der Lage sein, zwischen der nativen und denaturierten Struktur eines Substratproteins zu unterscheiden. Dies erfolgt durch Interaktionen mit exponierten hydrophoben Oberflächen und nicht über spezifische Peptidsequenzen (Buchner, 1996).

Anhand von Sequenzhomologien und der molekularen Masse lassen sich die molekularen Chaperone mittlerweile in sieben nicht verwandte Proteinklassen unterteilen: die Hsp100-, Hsp90-, Hsp70-, Hsp60- Proteinfamilie, die Familie der kleinen Hitzeschockproteine, sowie die Familie der Redox-regulierten Chaperone (Hsp33) und die Familie der „Charonine“ (Buchner, 1996; Narberhaus, 2002).

Die bisher am besten untersuchten Chaperone sind DnaK-System und GroE-System, die bakteriellen Vertreter der Hsp70 bzw. der Hsp60 Familie. Beide benötigen für ihre volle Funktionalität Cochaperone und ATP. Die Vertreter der Hsp60 Familie werden auch als Chaperonine bezeichnet.

In eukaryotischen Zellen existieren mehrere, sowohl konstitutiv als auch stressinduzierte Vertreter der Hsp70 Familie (Fink *et al.*, 1997). Sie sind an einer Reihe wichtiger zellulärer Prozesse beteiligt; z.B. binden sie an naszierende Polypeptidketten, propagieren

Translokation über Zellmembranen (Schatz & Dobberstein, 1996) und sind an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt (Yura *et al.*, 1993).

Während das Hsp70 System sowohl für die co- als auch die posttranslationale Proteinfaltung verantwortlich ist, ist das GroE System nur bei der posttranslationale Proteinfaltung aktiv (Xu *et al.*, 1997; Bukau *et al.*, 2000).

Ebenso wie bei Hsp70 wird auch die GroEL-Substratinteraktion durch ATP Bindung und Hydrolyse reguliert (Schmidt *et al.*, 1994). GroEL ist in der Lage, ein breites Spektrum von entfaltenen bis nativ-ähnlichen Substratkonformationen zu binden (Viitanen *et al.*, 1992). Durch die Aufeinanderfolge eines oder mehrere Bindezyklen des Substrates an das Chaperon (*iterative annealing*) kann Faltung im zentralen Hohlraum des GroEL Zylinders erfolgen (Todd *et al.*, 1996). Vertreter der Hsp60 Familie aus Eukaryoten besitzen einen komplexeren Aufbau als bakterielles Hsp60. CCT stellt auch ein spezifisches Chaperon dar, da es hauptsächlich für die Faltung und Assemblierung von Aktin und Tubulin notwendig ist (Llorca *et al.*, 1999; Somer *et al.*, 2002).

Proteine der Hsp90-Familie stellen mit etwa 1 % des löslichen Proteins im eukaryotischen Cytosol eines der am stärksten exprimierten Proteine dar (Walter & Buchner, 2002). Die Proteine dieser Familie agieren vorwiegend in multimeren Komplexen und sind ATP-abhängig. Sie erkennen dabei eine Vielzahl von wichtigen Komponenten der Signaltransduktion und der Zellzyklusregulation mit nativ-ähnlichen Strukturen (Narberhaus, 2002).

Hsp90 Dimere stabilisieren partiell gefaltete Substratproteine und ermöglichen somit die Bindung des Liganden an das Substratprotein z.B. Hormonbindung bei Steroidhormonrezeptoren. Das Substratprotein dissoziiert vom Komplex ab, durchläuft Konformationsänderungen, wandert an seinen Zielort und kann seine Funktion ausüben (Beissinger & Buchner, 1998; Walter & Buchner, 2002).

Neuere Untersuchungen haben Chaperone nicht nur mit Proteinfaltung sondern auch mit Proteinabbau in Verbindung gebracht. So wird postuliert, dass eukaryotisches Hsp70 zusammen mit Hsp90, abhängig von Kofaktoren, als Faltungsmaschinerie agiert oder mit dem Degradationsapparat der Zelle kooperiert (Hohfeld *et al.*, 2001).

Proteine der Hsp100-Familie, sind ATP hydrolysierende Chaperone, die in ringähnliche Strukturen assemblieren (Grimaud *et al.*, 1998; Wickner *et al.*, 1999; Zolkiewski *et al.*, 1999). Sie sind für die Vermittlung von Thermotoleranz verantwortlich (Schirmer *et al.*, 1994). Während einige Vertreter den proteolytischen Abbau von Proteinen vermitteln,

besitzen andere Vertreter die Fähigkeit, Aggregate wieder aufzulösen (Parsell *et al.*, 1994; Diamant *et al.*, 2000). Die Zusammenarbeit von Hsp100 Proteinen mit dem Hsp70/Hsp40 System, führt zur Rückfaltung von bereits aggregierten Substratprotein (Glover & Lindquist, 1998).

„Charonine“ sind multifunktionelle Proteine oder Proteinkomplexe, die an der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt sind und über Rückfaltung oder Degradation von Proteinen entscheiden. Viele Mitglieder der Hsp100 Familie sind Chaperon-Untereinheiten aus Protease Komplexen (Narberhaus, 2002). Sie weisen innerhalb einer einzigen Polypeptidkette sowohl Protease- als auch Chaperonaktivität auf. Zu dieser neuen Familie der monomeren Charonine gehören Lon, FtsH und DegP (Gottesman *et al.*, 1997; Wickner & Maurizi, 1999; Schumann, 1999). Die Chaperonfunktion von DegP z.B. dominiert bei niedrigen Temperaturen wohingegen bei hohen Temperaturen die proteolytische Aktivität vorherrscht (Spiess *et al.*, 1999).

Hsp33 aus *E. coli*, ist ein neu entdecktes Redox-reguliertes Chaperon. Es schützt vor oxidativem Stress indem es, ATP-unabhängig, die Aggregation von Proteinen, unterdrückt (Jakob *et al.*, 1999). Die Chaperonaktivität wird durch das Redoxpotential der Umgebung reguliert. Oxidierende Bedingungen, wie H₂O₂, führen zur Ausbildung von Disulfidbrücken in Hsp33 und damit zur Aktivierung der Chaperonfunktion. Reduziertes Hsp33 liegt als inaktives Monomer vor, während die oxidierte, dimere Form als Chaperon aktiv ist (Vijayalakshmi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001).

Die divergenteste Familie innerhalb der Gruppe der Stressproteine stellen kleine Hitzeschockproteine (sHsps) dar (Haslbeck & Buchner, 2002; Walter & Buchner, 2002).

1.5 Kleine Hitzeschockproteine (sHsps)

1.5.1 Allgemeine Merkmale kleiner Hitzeschockproteine

Die Bezeichnung „kleine Hitzeschockproteine“ (sHsps) weist darauf hin, dass es Proteine mit geringen Monomerenmassen von 12 bis zu 43 kDa sind. Die Einordnung in die Familie der sHsps erfolgt, aufgrund ihrer Überexpression bei Hitze und ihrer geringen Monomerengröße, vor allem aber anhand von konservierten Sequenzhomologien in der C-terminalen Domäne (De Jong *et al.*, 1998). Dieser konservierte Bereich von etwa 90 Aminosäuren wird wegen

der engen Verwandtschaft mit dem Augenlinsenprotein α -Kristallin auch als α -Kristallindomäne bezeichnet (Caspers *et al.*, 1995).

sHsps wurden, mit Ausnahme einiger weniger Bakterienarten wie z.B. *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori* oder *Neisseria meningitis*, in allen bisher untersuchten Organismen gefunden (Kappe *et al.*, 2002), wobei die Anzahl ihrer Vertreter in den verschiedenen Spezies stark variiert (Tabelle 1.2). Eukaryoten besitzen typischerweise mehrere sHsps gleichzeitig. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* befindet sich mit bisher zwei identifizierten sHsps (Hsp26 und Hsp42) am unteren Ende der Skala, wohingegen Pflanzen mit bis zu 19 sHsps bei *Arabidopsis thaliana* am oberen Ende liegen (Narberhaus, 2002).

Die zelluläre Lokalisation von sHsps ist nicht nur auf das Cytosol beschränkt. Einige Vertreter sind auch in Organellen wie z.B. Chloroplasten, Mitochondrien oder im ER lokalisiert (Waters & Vierling, 1999; Scharf *et al.*, 2001). Anhand ihrer Sequenzähnlichkeiten und ihrer zellulären Lokalisation wurden die pflanzlichen sHsps in sechs verschiedene Unter-Familien eingeteilt. Davon treten drei im Cytosol (I, II, III) und je eine in den Chloroplasten, Mitochondrien und im ER auf (Waters, 1995; Waters *et al.*, 1996; Scharf *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002; Narberhaus, 2002). Beim Menschen wurden inzwischen, inklusive α A- und α B-Kristallin, neun sHsp beschrieben (Kappe *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den pflanzlichen sHsps, scheinen die humanen Vertreter auf das Cytosol und den Nucleus beschränkt zu sein. Tabelle 1.2 zeigt eine Zusammenstellung repräsentativer Vertreter der kleinen Hitzeschockproteine.

Tabelle 1.2 Zusammenstellung repräsentativer Vertreter kleiner Hitzeschockproteine [verändert nach (Ehrnsperger *et al.*, 1998a), n.b.: nicht bekannt].

	Protein	Organismus	Quartärstruktur	Kommentar
Archaeen	Hsp16.5	<i>M. jannaschii</i>	24mer	Chaperonaktivität
Prokaryoten	IbpA/IbpB	<i>E.coli</i>	oligomer	Chaperonaktivität, Induktion durch Hitzeschock, in „inclusion bodies“ im Komplex mit anderen Chaperonen
	Hsp16.3	<i>M. tuberculosis</i>	9mer	Chaperonaktivität, immundominantes Oberflächenantigen, „trimer of trimers“
	Hsp16.9	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	~20mer	Chaperonaktivität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>

Tabelle 1.3 Zusammenstellung repräsentativer Vertreter kleiner Hitzeschockproteine [verändert nach (Ehrnsperger *et al.*, 1998a), n.b.: nicht bekannt]. (Fortsetzung)

	Protein	Organismus	Quartär- struktur	Kommentar
Eukaryoten				
Hefe	Hsp26	<i>S. cerevisiae</i>	24mer	Chaperonaktivität, hemmt die Aktin-Polymerisation, kein Phänotyp bei Deletion
	Hsp42	<i>S. cerevisiae</i>	oligomer	konstitutive und induzierte Expression, Rap1p-interagierendes Protein
Invertebraten	Hsp27/26/ 22/23	<i>D. melanogaster</i>	n.b.	Konstitutiv exprimiert, Hormon- und Stress-induziert, Expression ist Entwicklungsabhängig
	Hsp16-2	<i>C. elegans</i>	14 u. 24mer	Chaperonaktivität
	Hsp12.2/12.3	<i>C. elegans</i>	4mer	keine Chaperonaktivität, Expression ist Entwicklungsabhängig
	Hsp30	<i>N. crassa</i>	n.b.	mitochondrial
Vertebraten	Hsp25/27	Säuger	16-32mer/ oligomer	Chaperonaktivität, Thermotoleranz, phosphoryliert,
	Hsp25	Ratte		bei verschiedenen Krankheiten induziert
	HspB2/B3 MKBP	Säuger	oligomer	Muskel, Bindung und Aktivierung der myotonischen Dystrophie Kinase
	α A-Kristallin	alle Vertebraten	32mer / oligomer	Chaperonaktivität; häufigstes Augenlinsenprotein
	α B-Kristallin			in anderen Geweben, nur α B ist Stress-induzierbar, involviert in Thermotoleranz, sowie bei verschiedenen Krankheiten, (auto)phosphoryliert,
	p20 (Hsp20)	Säuger	Dimere/ Oligomere	schwache Chaperonaktivität, Homologes zu Hsp27, Umverteilung nach Hitzeschock
	HspB7/ cvHsp	Mensch	n.b.	Herz, Skelettmuskulatur, Interaktion mit α -Filamin oder Aktin bindendes Protein280
	HspB8/H11	Mensch	n.b.	Ser-Thr Protein Kinase
	HspB9	Mensch	n.b.	Hoden
	HspL27	Mensch	n.b.	Herzmuskel
	Hsp30	<i>Xenopus laevis</i>	n.b.	hitzeinduziert
	p26	Artemia franciscana	Oligomer (27-mer)	Chaperonaktivität Embryonal, Translokation in den Zellkern,
Pflanzen	Hsp16.9	<i>T. aestivum</i>	12mer	Chaperonaktivität, Dissoziation in Subspezies, Kristallstruktur gelöst
	Hsp22	<i>Glycine max</i>	n.b.	ER Retentions Signal, in Endomembran lokalisiert
	Hsp17.7	<i>L. peruvianum</i>	oligomer	Chaperonaktivität, cytosolisch, Klasse I

Hsp17.3	<i>L. peruvianum</i>	oligomer	Chaperonaktivität, cytosolisch, KlasseII
Hsp18.1	<i>P. sativum</i>	12mer	Chaperonaktivität, cytosolisch, Klasse I
Hsp22	<i>P. sativum</i>	12mer	mitochondrial, nur unter extremen Wachstumsbedingungen induziert
Hsp22	<i>Zea mays</i>	4 Formen	mitochondrial, Chaperonaktivität, Phosphoryliert oligomere Formen als Resultat von Phosphorylierung u. alternativem Intron Splicing
Hsp21	<i>A. thaliana</i>	oligomer	Chloroplasten sHsp, hitzeinduziert

1.5.2 Strukturelle Organisation kleiner Hitzeschockproteine

Kleine Hitzeschockproteine setzen sich strukturell aus drei Bereichen zusammen, der charakteristischen α -Kristallindomäne (C-terminale Domäne), flankiert von einer wenig konservierten N-terminalen Region und einer kurzen C-terminalen Extension (De Jong *et al.*, 1993; Caspers *et al.*, 1995) (Abbildung 1.1). Die Sequenzhomologien zwischen verschiedenen sHsps beschränken sich im Wesentlichen auf die α -Kristallindomäne (De Jong *et al.*, 1993). Die Homologie in dieser Domäne variiert zwischen 20 % für entfernt verwandte sHsps, z.B. aus Bakterien und Säugern, und 50-60 % innerhalb der bakteriellen oder Säuger sHsps (Wang *et al.*, 2000; Narberhaus, 2002). Ein Aminosäuresequenzvergleich zwischen bakteriellen und archaealen sHsps zeigte, dass lediglich fünf konservierte Aminosäurereste (entsprechen G62, L111, A122, G127 und L129 aus *M. janaschii*) in über 80 % der untersuchten Sequenzen zu finden sind (Narberhaus, 2002). Die letzten drei Aminosäurereste bilden am Ende der α -Kristallin Domäne ein Konsensus Motiv A-x-x-x-n-G-v-L (Caspers *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1996; Delmas *et al.*, 2001).

Die aminoternale Domäne variiert stark bezüglich Länge und Sequenz. In *MjHsp16.5* beispielsweise besteht sie aus 44 Aminosäuren, in *ScHsp26* aus 93 (Van Montfort *et al.*, 2002). In einigen der sHsp ist lediglich eine Prolin- und Phenylalanin-reiche Region in dieser Domäne konserviert (Ehrnsperger *et al.*, 1998a). Dieses Motiv wird nach seiner Primärstruktur auch als WDPF-Domäne bezeichnet (Ehrnsperger *et al.*, 1998a; Lambert *et al.*, 1999). Die Sekundärstruktur dieser N-terminale Domäne weist vorwiegend ungeordnete Strukturen mit α -helikalen Bereichen auf.

Die α -Kristallindomäne umfasst etwa 80 bis 100 Aminosäuren und weist hauptsächlich β -Faltblattstrukturen auf. Diesem Bereich folgt eine kurze variable Sequenz, die sich durch eine hohe Flexibilität auszeichnet. Die Länge der C-terminalen Extension variiert von 12 Aminosäurenresten in humanem Hsp20 bis 36 Reste in Hsp25 aus Maus (Van Montfort *et al.*,

2002). Die großen Schwankungen im Molekulargewicht von sHsps lassen sich durch die unterschiedlichen Längen der N-terminalen Domänen sowie der C-terminalen Extensionen erklären. Aus Untersuchungen zur Tertiärstruktur verschiedener Spezies postulierten Farnsworth *et al.* (1998), dass die Struktur der Proteine höher konserviert ist als ihre Sequenz.

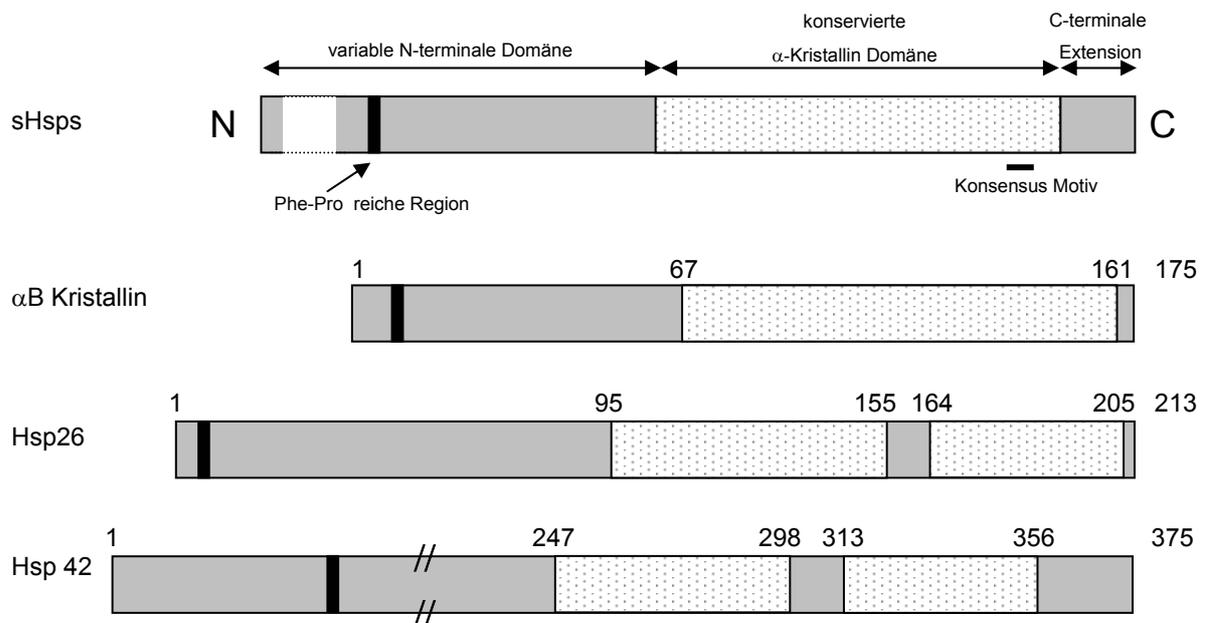


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Aufbaus kleiner Hitzeschockproteine im Vergleich zum Aufbau der sHsps aus *S. cerevisiae*. Die Zahlen geben die Aminosäureposition der α -Kristallindomäne in den einzelnen Proteinen an. Weiß: zur α -Kristallindomäne homologe Bereiche. Grau: nicht homologe, variable Bereiche.

Oligomerisierung von sHsps

Eine charakteristische Eigenschaft kleiner Hitzeschockproteine ist ihre Tendenz große, oligomere Komplexe auszubilden. Diese können bis zu 50 Untereinheiten umfassen, so dass Molekülmassen von 125 kDa bis zu 2 MDa beobachtet werden können (Spector *et al.*, 1971; Arrigo *et al.*, 1988; Andreasi *et al.*, 1995; Ehrnsperger *et al.*, 1997a). So ist Hsp16.3, ein sHsp und Antigen aus *Mycobacterium tuberculosis*, ein Nonamer aus drei Trimeren (Chang *et al.*, 1996). Viele sHsps bilden oligomere Komplexe aus 24 Untereinheiten, so z.B. Hsp26 aus *S. cerevisiae* (Bentley *et al.*, 1992; Walke, 1996; Stromer, 1998) sowie bakterielle sHsps (Roy *et al.*, 1999; Studer & Narberhaus, 2000). Murines Hsp25 wurde als 32-mer (Behlke *et al.*, 1991) und als 16-mer (Ehrnsperger *et al.*, 1997b) beschrieben. Cytosolische pflanzliche sHsps, wie z.B. Hsp18.1 und Hsp17.7 aus Erbse sowie mitochondriales, pflanzliches Hsp22

wurden als Dodekamere charakterisiert (Lee *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1996; Lee & Vierling, 1998) (siehe Tabelle 1.2).

Manche sHsps bilden homogene Strukturen aus. So zum Beispiel Hsp16.5 aus *M. janaschii*, ein 24-mer mit einer monomeren molekularen Masse von 16.5 kDa und einer oligomeren Masse von 396 kDa (Kim *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 1998b) und Hsp16.9 aus Weizen, welches in diskrete Dodekamere assembliert (van Montfort *et al.*, 2001). Andere, Vertreter bilden heterogene Strukturen. Für α -Kristalline wurden Komplexe mit einer Massenverteilung von 300 kDa bis >1 MDa gefunden. Mit einer monomeren Masse von 20 kDa, können also oligomere Komplexe mit bis zu 50 Untereinheiten gebildet werden (Horwitz, 2003). Dies deutet auf dynamische Strukturen mit einem regen Austausch an Untereinheiten hin (Haley *et al.*, 2000).

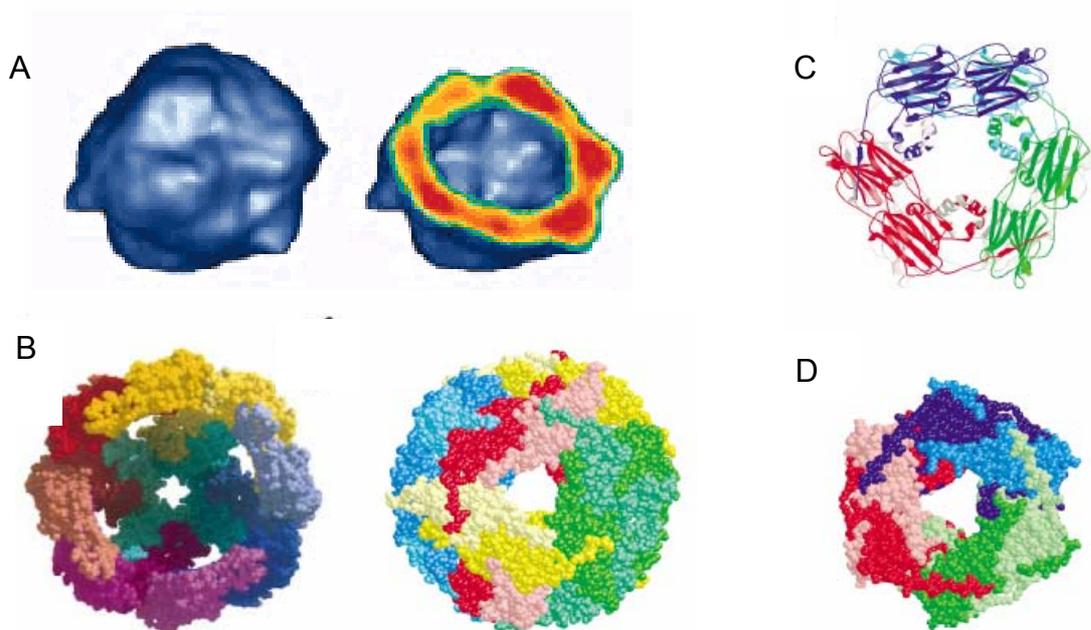


Abbildung 1.2 Vergleich der dreidimensionalen Strukturen kleiner Hitzeschockproteine.

A: Durch Kryo-Elektronenmikroskopie bestimmte Struktur von α B-Kristallin. Dynamische Hohlkugel mit einem Außendurchmesser des 32-mers von 18 nm (Haley *et al.*, 1998). **B:** Kristallstruktur von Hsp16.5 aus *M. janaschii*. Hohlkugel aus 24 Untereinheiten mit einem Außendurchmesser von 12 nm (Kim *et al.*, 1998b). **C/D:** Kristallstruktur von Hsp16.9 aus *T. aestivum*. Dodekamer aus je zwei Scheiben, 9,5 nm breit und 5,5 nm hoch (van Montfort *et al.*, 2001).

Der Austausch der Untereinheiten kann auch innerhalb von sHsps einer Klasse erfolgen. So konnte die Ausbildung von heterooligomeren Komplexen zwischen Hsp18.1 und Hsp16.9, zwei cytosolische Klasse I sHsps beobachtet werden (van Montfort *et al.*, 2001).

Mischkomplexe aus α A-Kristallin, α B-Kristallin, Hsp25 und Hsp27 wurden ebenfalls beschrieben (Merck *et al.*, 1993; Boelens *et al.*, 1998; Liu & Welsh, 1999).

Struktur kleiner Hitzeschockproteine

Obwohl die sHsps bereits seit Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen sind, existieren bis heute nur wenige röntgenkristallographische Strukturen. Es wird vermutet, dass die dynamische Quartärstruktur / polydisperse Natur der sHsps sowie zahlreiche post-translationale Modifikationen der Grund für das Scheitern vieler Kristallisationsversuche sind (Van Montfort *et al.*, 2002).

Negativ-kontrastierte elektronenmikroskopische Untersuchungen, zeigten für verschiedenen sHsps, wie z.B. Hsp25 aus Maus, *PsHsp18.1* und *PsHsp17.7*, HspB und HspC aus *B. japonicum* sowie *MjHsp16.5* globuläre Komplexe mit Durchmessern von 10-25 nm (Lee *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998b; Ehrnsperger *et al.*, 1999; Narberhaus, 2002).

In den letzten Jahren hat sich die Kryo-Elektronenmikroskopie als aussichtsreiche Methode zur Untersuchung von großen Proteinkomplexen und schwer zu kristallisierenden Proteinen etabliert (Saibil & Ranson, 2002). Kryo-Elektronenmikroskopische Untersuchungen von nativem Rinder α B-Kristallin weisen z.B. auf eine variable Quartärstruktur mit einer zentralen Höhlung hin (Haley *et al.*, 1998) (Abbildung 1.2 A). Mittlerweile wurde diese Technologie auch für Hsp16.5, Hsp27, sowie humanes α B-Kristallin angewendet (Haley *et al.*, 2000). In allen Fällen handelte es sich um sphärische Komplexe mit einer zentralen Höhlung (Haley *et al.*, 2000). In Einklang mit den kristallographischen Daten, zeigte Hsp16.5 in Kryo-EM Aufnahmen regelmäßige, symmetrische Strukturen. Für humanes α B-Kristallin sowie Hsp27 konnten jedoch keine exakt symmetrischen Assemblierungen beobachtet werden. Inzwischen existieren die Kristallstrukturen von Hsp16.5, einem sHsps aus dem hyperthermophilen Archaeum *M. janaschii* (Kim *et al.*, 1998b), sowie von Hsp16.9, einem cytosolischen sHsp aus Weizen, *Triticum aestivum* (van Montfort *et al.*, 2001).

Hsp16.5 (Abbildung 1.2 B) bildet eine stabile Hohlkugel aus 24 Untereinheiten, die sich im Komplex in oktaedrischer Symmetrie zusammenlagern und acht dreieckige und sechs viereckige Öffnungen ausbilden. Der äußere und innere Durchmesser der Hohlkugel beträgt etwa 12 bzw. 6,5 nm. Jedes Monomer ist aus 10 β -Strängen und zwei kurzen α -Helices aufgebaut. Die beiden α -Helices bilden ein konserviertes *Helix-Turn-Helix* Motiv, welches auch bei DNA-bindenden Proteinen gefunden wurde (De Jong *et al.*, 1998; Farnsworth & Singh, 2000). Der Kern von Hsp16.5 wird aus zwei parallelen β -Strängen gebildet

(Abbildung 1.3 A), die ein Immunglobulin-ähnliches Faltungsmuster aufweisen. Bereits 1995 führte ein Sequenz-Vergleich von sHsps mit Caf1M, einem periplasmatischen PapD Homologen, zu der Hypothese, dass sHsps ein Immunglobulin-ähnliches Faltungsmuster zeigen (Zav'yalov *et al.*, 1995). Jede Untereinheit des Hsp16.5 Komplexes geht extensive Wechselwirkungen mit anderen Untereinheiten des Komplexes ein, die hydrophobe Kontakte, ionische Interaktionen sowie intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen beinhalten. Die kurze C-terminale Extension ist nach außen (gegen die äußere Seite der Schale) orientiert und interagiert mit benachbarten β -Strängen. Obwohl die Größe der Fenster auf der Oberfläche prinzipiell ein Durchtreten von kleinen Molekülen sowie ungefalteten Polypeptidketten erlauben würde, scheint es unwahrscheinlich, dass Substratproteine von Hsp16.5 in die zentrale Höhlung gelangen. Die ersten 32 Aminosäurenreste von *M. janaschii* Hsp16.5 konnten in der Kristallstruktur nicht aufgelöst werden, es deuten aber diverse Beobachtungen daraufhin, dass Teile der ungeordneten aminoterminalen Domäne bei Hsp16.5 und anderen sHsps Komplexen im Inneren der Hohlkugel liegen (Leroux *et al.*, 1997b; Kim *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 1998b; Haley *et al.*, 2000). Die Oberfläche der Oligomere wird von den C-terminalen Domänen der 24 Untereinheiten gebildet. Die innere Oberfläche von Hsp16.5 ist in seiner Aminosäurenkomposition hydrophober als die äußere Oberfläche (Kim *et al.*, 1998a).

Die Annahme, dass prinzipielle Eigenschaften der Hsp16.5 Struktur auf andere sHsps zutreffen, auch wenn sie keine sphärischen Assemblierungen ausbilden, wurde kürzlich durch die Kristallstruktur von Hsp16.9 aus Weizen unterstützt (van Montfort *et al.*, 2001) (Abbildung 1.2 C/D). Die Strukturen der monomeren und dimeren Subpartikel der Hsp16.5 und Hsp16.9 Komplexe sind sehr ähnlich (vgl. Abbildung 1.3 C), sie bilden aber unterschiedliche Quartärstrukturen aus. Die 12 Untereinheiten von Hsp16.9 aus Weizen assemblieren aber nicht in einen sphärischen Komplex, sondern bilden zwei hexamere Ringe (van Montfort *et al.*, 2001).

Obwohl die „Beta-Sandwich-Faltung“ der α -Kristallin Domäne innerhalb der Familie der sHsp konserviert ist, weisen verschiedene Proteine unterschiedliche oligomere Assemblierungen sowie unterschiedliche biophysikalische und biochemische Eigenschaften auf (Van Montfort *et al.*, 2002).

funktionelle Einheit bezüglich der Chaperonaktivität von sHsps (siehe 0). Die Faltung dimerer sHsp Einheiten ähnelt der Faltung von humanem p23, einem Cochaperon von Hsp90 (van Montfort *et al.*, 2001) (siehe Abbildung 1.3 B). Eine allgemeine Eigenschaft der Strukturen von Hsp16.5, Hsp16.9 und α -Kristallin ist die Lokalisation der N-Termini im Inneren des Oligomers. Aus der Struktur von Hsp16.9 aus Weizen wird deutlich, dass durch die Dissoziation des oligomeren Komplexes in Dimere vier hydrophobe Stellen exponiert werden, eine C-terminale Bindetasche und eine N-terminale Interaktionsstelle (van Montfort *et al.*, 2001). Diese N-terminale, unstrukturierte, hydrophobe Region des Proteins repräsentiert möglicherweise die Substratbindestelle der sHsps.

Funktionelle Regionen der sHsps

Welche strukturelle Domäne der kleinen Hitzeschockproteine für die Oligomerisierung verantwortlich ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Eine essentielle Rolle bei der Ausbildung kleinerer Oligomere von 2-4 Untereinheiten spielt zweifelsohne die α -Kristallindomäne (Van Montfort *et al.*, 2002). Die Bildung der großen Komplexe scheint von der variablen N-terminalen Domäne und von der C-terminalen Extension der sHsps abhängig zu sein. Wird Hsp12.6, ein sHsp aus *C. elegans* auf seine α -Kristallin Domäne reduziert, liegt es als Monomer vor und zeigt keine Chaperonaktivität (Leroux *et al.*, 1997b). Deletionen im aminoterminalen Bereich von Hsp16-2 aus *C. elegans*, führten zu einer verringerten Chaperonaktivität und einer Abnahme der Oligomerengröße (Leroux *et al.*, 1997b; Ding & Candido, 2000). Die Ausbildung großer oligomerer Komplexe konnte auch durch die Deletion der Aminosäurereste 5-23 in Hsp27 aus Hamster verhindert werden, während die Dimerenbildung unbeeinflusst blieb (Lambert *et al.*, 1999). Untersuchungen an Hsp25 zeigten außerdem, dass die Bildung großer Aggregate von der Anwesenheit der WDPF-Domäne, am äußersten Aminoterminus, abhängig ist. Eine Deletion von 33 Aminosäuren im daran anschließenden Bereich beeinflussen weder die Oligomerisierung, noch die Chaperonaktivität (Guo & Cooper, 2000). Diese Beobachtungen deuten auf die Bedeutung der variablen aminoterminalen Domäne, sowohl für die Oligomerisierung, als auch für die Chaperonaktivität, hin (Kokke *et al.*, 1998). Die Stabilisierung des oligomeren Hsp16.9 Komplexes erfolgt durch die sechs geordneten N-terminalen Arme (van Montfort *et al.*, 2001). Der N-terminale Arm im Monomer eines Ringes interagiert mit einem Monomer des anderen Ringes. Dabei werden ungewöhnliche „Knoten-Strukturen“ ausgebildet. Die drei

Knoten stabilisieren das Oligomer durch hydrophobe Kontakte und Wasserstoffbrücken zwischen den N-terminalen α -Helices (van Montfort *et al.*, 2001).

Untersuchungen bezüglich der Rolle der flexiblen C-terminalen Extension auf die Oligomerisierung lieferten kontroverse Ergebnisse. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die negativen Ladungen der flexiblen C-terminalen Extension die Oligomere von α -Kristallin stabilisieren (Boelens *et al.*, 1998). Auch die C-terminalen Extensionen von Hsp16.9 sind am Zusammenhalt des Oligomers beteiligt (van Montfort *et al.*, 2001). Der C-Terminus eines Monomers im Dimer hat Kontakt zum benachbarten Dimer in der gleichen Scheibe, während der C-Terminus des anderen Monomers an ein Dimer in der anderen Scheibe bindet (van Montfort *et al.*, 2001). Andererseits zeigte die Deletion der letzten 18 Aminosäuren von Maus Hsp25 keine Änderungen bezüglich der oligomeren Struktur (Lindner *et al.*, 2000). Lediglich eine Veränderung der Chaperonaktivität von Hsp25 konnte durch diese Reduzierung festgestellt werden (Lindner *et al.*, 2000). Möglicherweise ist der flexible C-terminale Arm an der Wechselwirkung von sHsps mit ihren Substratproteinen beteiligt und beeinflusst dadurch generell die Hydrophobizität des oligomeren Komplexes.

Posttranslationale Modifikationen

Diverse posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Deamidierung, Acetylierung oder Glykosylierung wurden für verschiedene Säuger sHsps beobachtet (Arrigo & Landry, 1994; Ehrnsperger *et al.*, 1998a; Derham & Harding, 1999; MacRae, 2000). Phosphorylierung an einem oder mehreren Serin Resten erfolgt sowohl in verschiedenen Geweben, als auch als Antwort auf verschiedene Umwelteinflüsse, wie z.B. Hitze oder Wachstumsfaktoren.

Der Einfluss von ATP und/oder Phosphorylierung auf die Struktur sowie auf die Funktion von sHsps bleibt immer noch widersprüchlich (Clark & Muchowski, 2000; Gaestel, 2002; Kato *et al.*, 2002; Horwitz, 2003).

Die Korrelation zwischen Phosphorylierung, Oligomerisierung und Chaperon Aktivität unterscheidet sich zwischen den individuellen sHsps (Ehrnsperger *et al.*, 1998b). In den meisten Fällen ist Phosphorylierung jedoch mit einer Reduktion der multimeren Größe verbunden. Hsp27, Hsp20, und α B-Kristallin bilden nach Phosphorylierung kleinere oligomere Strukturen (Rogalla *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2002). Kürzlich wurde auch die Phosphorylierung von mitochondrialem Hsp22 aus Mais beobachtet (Lund *et al.*, 2001). sHsps aus Chloroplasten und cytosolische sHsps aus Erbse sowie mitochondriale

sHsps aus Tomate scheinen aber nicht phosphoryliert zu werden (Nover & Scharf, 1984; Suzuki *et al.*, 1998).

1.5.3 Funktion kleiner Hitzeschockproteine

Unter physiologischen Bedingungen variiert die Konzentration an sHsps in Abhängigkeit von Zelltyp und Organismus stark. Der Gehalt an sHsps bewegt sich von unterhalb der Nachweisgrenze bis zu einem Anteil von 1 % (Hsp20 im Herzmuskel) (Sugiyama *et al.*, 2000; Niwa *et al.*, 2000). Unter Stresseinwirkung wird die sHsp Konzentration bis zu 10-fach erhöht (Arrigo & Landry, 1994). Die Überexpression von sHsps führt in höheren Eukaryoten zur Vermittlung transienter Thermotoleranz (Landry *et al.*, 1989; Merck *et al.*, 1993; van den IJssel *et al.*, 1994), die unmittelbar mit der sHsp Konzentration korreliert (Arrigo & Landry, 1994). sHsp vermittelte Thermotoleranz konnte in Säugerzellen für humanes Hsp27, Hsp25 aus Maus, α A- und α B-Kristallin gezeigt werden, was auf eine generelle thermoprotektive Funktion dieser Proteine hinweist (Landry *et al.*, 1989; Mehlen *et al.*, 1993; van den IJssel *et al.*, 1994). Mittlerweile wurde für sHsps aus *Neurospora crassa* (Plesofsky-Vig & Brambl, 1995), *Synechocystis sp.* (Lee *et al.*, 2000; Giese & Vierling, 2002) und *E. coli* (Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2002) gezeigt, dass ein knock-out der sHsp Gene zu einer verminderten Thermotoleranz führt.

Wie sHsps ihre thermoprotektive Rolle in der Zelle erfüllen, ist noch weitgehend unklar. Wichtige Aspekte könnten aber zum einen ihre Fähigkeit sein, das Cytoskelett der Zelle zu stabilisieren (Lavoie *et al.*, 1993; Benndorf *et al.*, 1994; Lavoie *et al.*, 1995), zum anderen können sHsps die irreversible Inaktivierung von zellulären Proteinen, wie sie bei Hitzeschock auftritt, verhindern. Chaperonaktivität konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Die Überexpression von sHsps wurde aber nicht nur nach Temperaturerhöhung beobachtet. Sie erfolgt auch als Antwort auf eine Reihe weiterer Stressfaktoren.

Die Chaperonfunktion kleiner Hitzeschockproteine

Viele der beschriebenen Faktoren, die zu einer verstärkten Expression von sHsps führen, beeinflussen direkt oder indirekt auch die native Konformation von zellulären Proteinen.

Bereits Anfang der 90er Jahre wurde gezeigt, dass sHsps einige Eigenschaften von molekularen Chaperonen aufweisen, d.h. sie sind in der Lage sowohl thermisch als auch chemisch denaturierte Modellsubstrate vor irreversibler Aggregation zu schützen.

Wechselwirkungen mit nicht-nativen Proteinen wurden für α -Kristallin (Horwitz, 1992), murines Hsp25, menschliches Hsp27 (Jakob *et al.*, 1993; Ehrnsperger *et al.*, 1997b), Hsp18.1 aus Erbse (Lee *et al.*, 1997), Hsp17.3 und Hsp17.7 aus Tomate (Low *et al.*, 2000), Hsp16.6 aus *Synechocystis spc.* (Giese & Vierling, 2002), Hsp26 aus *S. cerevisiae* (Haslbeck *et al.*, 1999), sowie XIHsp30 (Fernando *et al.*, 2002) gezeigt. Dabei weisen sie kaum Substratspezifität auf und können Komplexe mit Proteinen in einem breiten Molekulargewichtsbereich bilden. Promiskuität in den Bindungseigenschaften wurde unter anderem für Hsp25 aus Maus, Hsp18.1 aus Erbse und α -Kristallin gezeigt (Rao *et al.*, 1993; Das *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997b; Rawat & Rao, 1998).

Im Gegensatz zu anderen Chaperonen binden sHsps mehrere nicht-native Proteine gleichzeitig. Die Stöchiometrie der Komplexe zwischen sHsps und Substratproteinen scheint sowohl vom verwendeten Protein als auch seiner Größe abhängig zu sein (Lee *et al.*, 1997). Mit Stöchiometrien von bis zu einem Substratmolekül pro Untereinheit weisen sie unter den Hsps die größte Bindekapazität für nicht-native Proteine auf (Horwitz, 1992; Jaenicke & Creighton, 1993; Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997b) und sind damit in vielen Anwendungen effektiver als z.B. GroEL. Die hohe Substratbindekapazität deutet auf mehrere Substratbindestellen pro sHsp Oligomer. Diese Annahme ist in Einklang mit der Beobachtung, dass ein α -Kristallin Monomer ein bis zwei bis-ANS oder 1,5-AZNS Bindestellen aufweist (Sharma *et al.*, 1998a; Sharma *et al.*, 1998b).

Die Konformation, in der Substratmoleküle bevorzugt gebunden werden, ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass bevorzugt frühe Entfaltungsintermediate, die hohe Aggregationsneigung zeigen, erkannt werden (Carver *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1996), während stabil denaturierte Polypeptide, wie carboxymethyliertes α -Lactalbumin nicht gebunden werden (Carver *et al.*, 1995).

Weder der Mechanismus der Substratbindung, noch die Lokalisation der Substratbindestelle sind geklärt. Erste Annahmen gingen davon aus, dass die Substrate, wie bei GroEL, im Inneren der sHsps Hohlkugel gebunden werden (Boyle *et al.*, 1993). Die Bindekapazität von bis zu einem Substrat pro Untereinheit spricht jedoch gegen diese Annahme. Desweiteren sind gebundene Substrate inaktiv und Protease zugänglich (Van Montfort *et al.*, 2002). Auch elektronenmikroskopische und chemische Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Substrate an der Oberfläche der sHsps Oligomere gebunden sind (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997b). Die konservierte α -Kristallin-Domäne scheint dabei an der Bindung der Substrate beteiligt zu sein. Die Disruption von Teilen der C-terminalen Domäne

von Hsp27 und α -Kristallin (Mehlen *et al.*, 1993; Takemoto *et al.*, 1993) sowie gerichtete Punktmutationen in diesem Bereich (Muchowski *et al.*, 1999c) führten zu sinkenden Chaperonaktivitäten. Für die isolierte α -Kristallin Domäne von Hsp25 konnte *in vitro* allerdings keine Chaperonaktivität nachgewiesen werden (Merck *et al.*, 1993; Ehrnsperger *et al.*, 1997b). Auch für die C-terminale Extension (Carver & Lindner, 1998; Lindner *et al.*, 2000) als auch für die N-terminale Domäne (Lee *et al.*, 1997) wurde eine Funktion in der Substratbindung postuliert. Anhand der *TaHsp16.9* Kristallstruktur postulierten van Montfort *et al.* (2001), dass die unstrukturierten, hydrophoben, N-terminalen Regionen, die im Inneren der Struktur eingebettet sind, die Substratbindestellen von sHsps repräsentieren. Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die konservierte α -Kristallindomäne für die Substratbindung und die damit einhergehende Chaperonfunktion zwar wichtig, aber nicht ausreichend ist und zusätzliche Bereiche der beiden flankierenden Regionen am Substratbindungsprozess beteiligt sind.

Der Einfluss von ATP und/oder Phosphorylierung auf die Funktion von sHsps wird kontrovers diskutiert (Gaestel, 2002; Kato *et al.*, 2002; Horwitz, 2003). Meist wurde die Chaperonaktivität kleiner Hsp nicht mit ATP Bindung oder Hydrolyse in Verbindung gebracht (Horwitz, 1992; Jakob *et al.*, 1993; Merck *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995). In jüngster Zeit allerdings wurde ein Einfluss von ATP auf die Chaperonaktivität vor allem von α -Kristallin postuliert (Muchowski & Clark, 1998; Muchowski *et al.*, 1999c). Nach der Bindung von ATP traten in α B-Kristallin strukturelle Umlagerungen auf, die mit einer Änderung der Oberflächenhydrophobizität einhergingen (Reddy *et al.*, 1992; Palmisano *et al.*, 1995; Rawat & Rao, 1998). Im Zuge dieser Umlagerungen werden vier konservierte Aminosäurereste in der α -Kristallin Domäne gegen den Abbau durch Chymotrypsin geschützt. Dies deutet auf eine ATP-abhängige strukturelle Modifikation in der α -Kristallin Domäne und auf ein ATP-bindendes Motiv hin (Muchowski *et al.*, 1999a; Muchowski *et al.*, 1999c). α -Kristallin ist auch in der Lage diverse andere Nukleotide, sowie viele nicht-verwandte Moleküle, wie z.B. 1-Anilino-Naphtalen-8-Sulfonsäure (ANS), Dexamethasone oder den Farbstoff Cibacron Blau F3GA, zu binden (Smulders & De Jong, 1997; Stevens & Augusteyn, 1997; Jobling *et al.*, 2001; Horwitz, 2003). Zusätzlich wurde berichtet, dass in Gegenwart von ATP die Chaperonaktivität von Hsp18 aus Tabak unterdrückt wird (Smykal *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen war die Chaperonfunktion der meisten

sHsps *in vitro* von der Bindung und Hydrolyse von ATP unabhängig (Horwitz, 1992; Jakob *et al.*, 1993; Merck *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; Haslbeck *et al.*, 1999). Eine ATP Hydrolyse durch sHsp konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Vielmehr scheint die Anlagerung von ATP die Struktur einiger sHsps und deren Wechselwirkung mit Substraten zu beeinflussen (Muchowski & Clark, 1998; Smykal *et al.*, 2000), was bei der Regulation der sHsps *in vivo* eine Rolle spielen könnte (Narberhaus, 2002).

Ungeklärt bleibt auch der Einfluss der Phosphorylierung auf die Chaperonfunktion. Frühere Arbeiten postulierten für α A- und α B-Kristallin keinen Einfluss der Phosphorylierung auf die Chaperonfunktion (Nicholl & Quinlan, 1994; Wang & Spector, 1995). Nachgeahmte Phosphorylierung in α B-Kristallin und Hsp27 Komplexen führte aber neben einer Abnahme in der Größe, zu einer signifikanten Abnahme der Chaperonfunktion (Rogalla *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2001). Die Oligomerisierung scheint hier eine strukturelle Voraussetzung für die Chaperonfunktion zu sein (Leroux *et al.*, 1997b; van de Klundert *et al.*, 1998; Kokke *et al.*, 1998).

Kleine Hitzeschockproteine im Kontext der zellulären Chaperonmaschinerie

Die meisten sHsps bilden sehr stabile Komplexe mit ihren Substraten aus (Lee *et al.*, 1995; Wang & Spector, 1995; Farahbakhsh *et al.*, 1995; Lee & Vierling, 2000; Torok *et al.*, 2001). Somit sind sie sehr potente, effiziente molekulare „Schwämme“ die ungefaltete oder denaturierte Proteine abfangen, immobilisieren und diese so vor irreversibler Aggregation schützen und sie in einem rückfaltbaren Zustand halten (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997b; Haslbeck & Buchner, 2002; Narberhaus, 2002).

Für viele gebundene Substrate konnte keine spontane Loslösung aus diesem Reservoir beobachtet werden (Ehrnsperger *et al.*, 1997b). Für ein Chaperonsystem wäre es aber ineffizient, Substrate zwar zu binden, aber keine Reaktivierung dieser Substrate unter permissiven Bedingungen zu erlauben. Lee *et al.* (1995) postulierte, dass bei pflanzlichen sHsps das Substrat in einer löslichen Form gehalten wird, um anschließend dem Degradationsapparat der Zelle zugeführt zu werden. Die ersten Hinweise, dass die sHsps-Substrat Komplexe nicht nur zum Abbau bestimmt sind, wurden mit Hsp25 und CS geliefert (Ehrnsperger *et al.*, 1997b). Mit Hilfe von Oxalacetat, einem stabilisierenden Liganden konnte CS vom Komplex losgelöst werden und zurückfalten. In der Zelle muss es aber entsprechend physiologische Faktoren geben, die die Loslösung und Reaktivierung einleiten. Es wird angenommen, dass der Komplex bestehend aus sHsp und ungefaltetem

Substrat mit einem weiteren Chaperonsystem interagiert. Für Hsp25 und Hsp18.1 konnte gezeigt werden, dass Hsp70 eventuell im Zusammenspiel mit Hsp40 die Reaktivierung von gebundenen Substraten in Gegenwart von ATP verstärkt (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997b; Lee & Vierling, 2000). An IbpB (*E. coli*) gebundene Malatdehydrogenase und Laktatdehydrogenase konnte gezielt an das DnaK-DnaJ-GrpE System übergeben und reaktiviert werden (Veinger *et al.*, 1998). Einen weiteren Hinweis auf die Zusammenarbeit von sHsps mit Hsp70 Chaperonen lieferte die Sequenzierung des Eubakteriums *T. maritima*. Gene für Hsp70 und einem 17 kDa sHsp sind hier in einem Operon organisiert (Michelini & Flynn, 1999). Neuste Untersuchungen postulieren, dass ATP die Loslösung des gebundenen Substrates von α -Kristallin initialisiert und das Substrat anschließend mit dem Hsp70 System interagieren kann. Die Renaturierungseffizienz ist allerdings mit lediglich 6 % Ausbeute sehr gering, während bei Hsp25 und CS immerhin 32 % Aktivität zurück gewonnen werden konnten (Ehrnsperger *et al.*, 1997b; Wang & Spector, 2001).

Man nimmt an, dass sHsps unter Stresssituationen, möglicherweise aufgrund einer Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten einer kleineren Spezies, hydrophobe Oberflächen exponieren, die dann in der Lage sind natives Protein zu binden und so die irreversible Aggregation der Proteine unterbinden. Die teilweise gefalteten Polypeptidketten werden in Protein-Reservoirs für die spätere Rückfaltung unter permissiven Bedingungen gelagert. Andere ATP-abhängige Chaperonsysteme sind für die Ablösung und Reaktivierung der Substratproteine vom Komplex mit den sHsps erforderlich. Ob und welche weiteren Faktoren an diesem Prozess beteiligt sind, muss noch geklärt werden.

Die Stellung von sHsps im Kontext eines dynamischen und synergistischen Multichaperon-Netzwerkes in der gestressten Zelle wurde von Haslbeck (2002) zusammenfassend dargestellt. In Abwesenheit kleiner Hsps können denaturierte Proteine entweder mit Hilfe der Haupt-Chaperonmaschinerien zurückfalten, oder sie bilden große unlösliche Aggregate, die zur Degradation bestimmt sind. sHsps bieten einen alternativen Weg an, der Entfaltungsintermediate einfängt, bevor sie aggregieren. Die Zelle kann diese Reservoirs von faltungskompetenten Proteinen unter besseren Rückfaltungsbedingungen nutzen. Es wird angenommen, dass sHsps als „Notfall-Chaperone“ dienen wenn DnaK und GroEL besetzt sind und/oder ATP limitierend wird. sHsps reduzieren dann den Fluß von nicht nativen Proteinen Richtung Aggregation und leiten sie zum Faltungsweg um.

Im Zentrum der Augenlinse gibt es jedoch keinen Hinweis darauf, dass andere Chaperonsysteme involviert sind. Hier wird angenommen, dass α -Kristalline als irreversible

Abfangbehälter agieren, indem sie die ungefalteten Proteine binden. Dadurch kontrollieren sie die während des normalen Alterns unvermeidliche Aggregation und Lichtstreuung und sorgen für den Erhalt der Linsentransparenz (Horwitz, 2003).

Weitere Funktionen kleiner Hitzeschockproteine

Neben ihrer Chaperonaktivität werden kleine Hitzeschockproteine mit einer ständig wachsenden Zahl an zellulären Funktionen in Verbindung gebracht. Dazu zählen die Vermittlung von Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Huot *et al.*, 1995; Mehlen *et al.*, 1995a; Huot *et al.*, 1996; Rogalla *et al.*, 1999) und einer Vielzahl cytotoxischer Agenzien, wie z.B. Cytochalasin D (Lavoie *et al.*, 1993; Lavoie *et al.*, 1995), Tumornekrosefaktor α (Mehlen *et al.*, 1995b) und einigen Antitumormedikamenten (Oesterreich *et al.*, 1993). Weitere zelluläre Aktivitäten sind die Erhaltung der Linsentransparenz (Brady *et al.*, 1997; Horwitz, 2003), die Vermittlung von Thermotoleranz (Landry *et al.*, 1989; Knauf *et al.*, 1992; van den IJssel *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000) und die Resistenz gegen Apoptose (Arrigo, 1998; Arrigo *et al.*, 2002). sHsps agieren als negative Regulatoren der Apoptose indem sie die CytochromC abhängige Aktivierung von Kaspasen blockieren (Bruey *et al.*, 2000). Sowohl für α -Kristalline als auch für andere sHsps wurde gezeigt, dass sie in der Zelle mit verschiedenen Komponenten des Cytoskeletts interagieren (Nicholl & Quinlan, 1994; Benndorf *et al.*, 1994; Kudva *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Liang & MacRae, 1997; Muchowski *et al.*, 1999b; Quinlan, 2002). Es wird angenommen, dass sie an der Ausbildung und Regulierung eines Gleichgewichts zwischen Assemblierung und Dissoziation von Intermediär- und Aktinfilamenten beteiligt sind.

Ferner wurde berichtet, dass sHsps mit ubc9, einem Ubiquitin konjugierenden Enzym (Joanisse *et al.*, 1998), einer proteasomalen Untereinheit (C8/ α 7) (Boelens *et al.*, 2001), A β 1-42 Amyloid Peptiden (Kudva *et al.*, 1997) und eIF4G (Cuesta *et al.*, 2000) interagieren. Kleine Hitzeschockproteine werden mit verschiedenen Entwicklungsprozessen in Tieren (Leroux *et al.*, 1997b), Pflanzen (Waters *et al.*, 1996) und Bakterien (Heidelbach *et al.*, 1993) in Verbindung gebracht. Sie sollen an verschiedenen menschlichen Erkrankungen (Clark & Muchowski, 2000), sowie an der Erhaltung der Membranintegrität (Tsvetkova *et al.*, 2002) beteiligt sein. Es wurde postuliert, dass sHsps mit Membranen interagieren, um die durch Hitzeschock induzierte Membranfluidität zu reduzieren (Vigh *et al.*, 1998; Torok *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002).

Eine Vielzahl an Beobachtungen bringt α B-Kristallin mit verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten wie Alexanders- (Iwaki *et al.*, 1989), Kreuzfeld-Jakob- (Iwaki *et al.*, 1992; Renkawek *et al.*, 1992), Alzheimer- (Lowe *et al.*, 1992a; Lowe *et al.*, 1992b), Parkinson-Krankheit (Iwaki *et al.*, 1992) und Anderen in Verbindung. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass α B-Kristallin bei *in vitro* Untersuchungen zur Alzheimer-Krankheit in der Lage ist, die Amyloidbildung zu unterdrücken, aber keinen Einfluss auf die Toxizität der Proteinplaques hat (Stege *et al.*, 1999).

Die Betrachtung dieser zahlreichen zellulären Vorgänge unterstreicht die Vielseitigkeit von sHsps nicht nur bei der Protektion von Proteinen sondern auch beim Schutz von Membranen.

1.6 Kleine Hitzeschockproteine in *Saccharomyces cerevisiae*

Das bekannteste kleine Hitzeschockprotein aus *S. cerevisiae* ist Hsp26. Beobachtungen von Petko und Lindquist (1986) zeigten jedoch, dass eine Deletion von HSP26 in *S. cerevisiae* keinen erkennbaren Phänotyp lieferte und auch keinen Einfluss auf die Thermotoleranz der Hefe hatte. Dies führte zu der Vermutung, dass in *S. cerevisiae* noch weitere sHsps existieren, die das Fehlen von Hsp26 kompensieren können (Petko & Lindquist, 1986; Bossier *et al.*, 1989).

Praekelt und Maecock (1990) entdeckten, ein weiteres etwa 12 kDa großes Protein in *S. cerevisiae*, welches beim Eintritt in die stationäre Phase und unter Hitzestress stark überexprimiert wird. In der Promotorregion von Hsp12 befinden sich neben einem HSE-Element, das die starke Expression unter Hitzeschockbedingungen reguliert, mehrere STRE-Elemente, die dafür sprechen, dass Hsp12 nicht nur unter Hitzeschockbedingungen überexprimiert wird. Sie führen zu einer Repression der Expression von Hsp12 unter fermentativen Bedingungen (Varela *et al.*, 1995). Eine verstärkte Synthese von Hsp12 konnte auch bei osmotischem und oxidativem Stress, bei hohen Ethanolkonzentrationen oder unter Glucosemangel beobachtet werden (Varela *et al.*, 1992; Piper, 1993; Jamieson *et al.*, 1994; Varela *et al.*, 1995), was darauf hindeutet, dass die Expression von Hsp12 verschiedenen Mechanismen unterliegt. Aufgrund seiner geringen Größe und der Tatsache, dass HSP12 unter Hitzestress überexprimiert wird, wurde es in die Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine eingeordnet. Ein Sequenzvergleich mit anderen sHsps, wie z.B. Hsp26 oder α -Kristallin, lässt allerdings keine deutlichen Homologien in der ansonsten

konservierten α -Kristallindomäne erkennen. Auch fehlt Hsp12 die variable N-terminale Domäne (Praekelt & Meacock, 1990; Stone *et al.*, 1990).

Ob Hsp12 ein Mitglied der Familie der kleinen Hitzeschockproteine ist, wird kontrovers diskutiert. Es konnten weder die für sHsps häufig beschriebene Chaperonfunktion (Jakob *et al.*, 1993) noch die Ausbildung der typisch hocholigomeren Komplexe gezeigt werden. Neueste Untersuchungen schließen Hsp12 aus der Familie der kleinen Hitzeschockproteine aus (Fischer, 2003). Hsp12 konnte strukturell der Gruppe der nativ entfalteten Proteine zugeordnet werden und wurde als Bestandteil der Zellwand von *S. cerevisiae* identifiziert. Es scheint an der Stabilisierung von Aktin-Patches, der Verankerung der Aktinfilamenten an der Plasmamembran, beteiligt zu sein. Allgemein ist es an der Stabilisierung der Hefezelle beteiligt, indem es die Plasmamembran bei Einwirkung ungünstiger Temperaturen oder osmotisch unvorteilhaften Bedingungen schützt und festigt (Fischer, 2003). Im Einklang mit den kürzlich postulierten Funktionen von sHsps im Zusammenhang mit der Membranfluidität (Cobb & Petrash, 2000; Van Montfort *et al.*, 2002), könnte Hsp12 das „kleine Protein“ sein, welches in *S. cerevisiae* für die Stabilität der Membran verantwortlich ist, indem es einerseits an die Membranoberfläche bindet aber auch die Lipid-Doppelschicht penetriert.

Später wurde von Wotton *et al.* (1996) in der Bäckerhefe ein mögliches drittes kleines Hitzeschockprotein, Hsp42 identifiziert. Auch die Deletion von Hsp26 in Kombination mit Hsp42 führte zu keinem messbaren Defekt in der Vermittlung von Thermotoleranz (Wotton *et al.*, 1996). In seiner C-terminalen Domäne ist Hsp42 hoch homolog zu Hsp26 und anderen sHsps. Sein N-terminaler Bereich ist im Vergleich zu anderen sHsps aber ungewöhnlich lang (vgl. Abbildung 1.1) und weist kaum Homologien zu anderen sHsps auf. Hsp42 bildet hocholigomere Komplexe mit einer heterogenen Größenverteilung aus. Es kann mit sich selbst wechselwirken, wobei die Wechselwirkung vom Vorhandensein der C-terminalen Domäne abhängig ist (Wotton *et al.*, 1996). Wie alle sHsps bildet Hsp42 große oligomere Komplexe aus und ist als Chaperon aktiv, indem es die Aggregation von Modellsubstraten unterdrückt (Haslbeck, 2001).

Die Expression von Hsp42 erfolgt stressinduziert (DeRisi *et al.*, 1997; Haslbeck, 2001). Die gleichzeitige Disruption mehrerer potentieller sHsps in *S. cerevisiae* führt erstaunlicherweise zu keinem signifikanten Phänotypen (Susek & Lindquist, 1989; Praekelt & Meacock, 1990; Wotton *et al.*, 1996), was die funktionelle Untersuchung der sHsps in Hefe erschwert.

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* besitzt somit mit Hsp42 und Hsp26 nur zwei bisher bekannte, ausdrückliche Vertreter der Familie der kleinen Hitzeschockproteine (Van Montfort *et al.*, 2002).

1.7 Hsp26 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Hsp26 weist in der C-terminalen Domäne starke Sequenzhomologien zu anderen sHsps, besonders zu Vertretern aus Prokaryoten und niederen Eukaryoten auf (Petko & Lindquist, 1986; Susek & Lindquist, 1989). Charakteristisch für sHsps bildet auch Hsp26 große homooligomere Komplexe aus (Kurtz *et al.*, 1986; Rossi & Lindquist, 1989; Bentley *et al.*, 1992). Die Größe von 550 kDa entspricht vermutlich 24 Untereinheiten (Walke, 1996; Stromer, 1998). Die Hsp26-Expression erfolgt in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen sowie vom Entwicklungs- und Differenzierungsgrad der Zelle (Arrigo & Landry, 1994). Hsp26 wird beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase und im Verlauf der Sporulation synthetisiert (Kurtz *et al.*, 1986). Neben der Expression unter Hitzeschock wird Hsp26 auch unter vielen anderen Stressbedingungen, wie Nahrungsmangel (Kurtz *et al.*, 1986; Varela *et al.*, 1992), niedrigen pH-Werten (Carmelo & Sa-Correia, 1997) oder hohen Salzkonzentrationen (Kurtz *et al.*, 1986) überexprimiert.

Auffallend ist, dass die Überexpression unter Stressbedingungen mit einer Translokation des normalerweise cytosolischen Hsp26 in den Zellkern einhergeht (Rossi & Lindquist, 1989; Mehlen *et al.*, 1993). Dieser Vorgang scheint allerdings von der Stresssituation und dem physiologischen Zustand der Zelle abhängig zu sein (Mehlen *et al.*, 1993).

Die Disruption des HSP26 Gens führt weder zu verändertem Wachstum bei verschiedenen Temperaturen, noch zeigt sie Einfluss auf die Vermittlung von Thermotoleranz (Petko & Lindquist, 1986).

Auf posttranslatonaler Ebene wurden an sHsps aus Säugern diverse Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung gefunden (siehe 1.5.2) (Welch & Suhan, 1985; Arrigo & Landry, 1994). Diese Modifikation scheint bei Säugern und vermutlich auch bei Pflanzen für die Regulation der sHsps-Funktion von Bedeutung zu sein (Lund *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2002). Hsp26 verfügt über potentielle Phosphorylierungsstellen (Susek & Lindquist, 1989). Phosphorylierung konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Ein ähnliches Verhalten wie bei Säuger sHsps wäre prinzipiell denkbar. Die engere Verwandtschaft zu pflanzlichen sHsps, bei denen Phosphorylierung bisher nur für mitochondriales Hsp22 aus

Mais bekannt ist, spricht jedoch dagegen (Waters *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 2001).

Die genaue zelluläre Funktion von Hsp26 ist noch unbekannt. Rahman postulierte, das Hsp26 *in vitro* die Aktin-Polymerisation unterdrücken kann (Rahman *et al.*, 1995). Walke (1996) konnte aber keinen Einfluss von Hsp26 auf die Aktin-Polymerisation feststellen. Eine schwache Interaktion von Hsp26 mit Aktin wurde von Gu *et al.* (1997) beobachtet. Überexprimiertes Hsp26 war in der Lage, Defekte des Cytoskeletts, induziert durch in Hefe exprimiertes humanes Vpr, zu unterdrücken (Gu *et al.*, 1997). Dies könnte jedoch ein indirekter Effekt sein.

In vitro Versuche zeigten, dass Hsp26 Chaperonaktivität aufweist (Walke, 1996; Stromer, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass Hsp26 Oligomere Komplexe mit Durchmessern von ca. 15 nm ausbilden. Nach Substratbindung, z.B. Citratsynthase (CS) werden jedoch große, weitgehend regelmäßige Hsp26-CS Komplexe in der Größenordnung von 34-45 nm Durchmesser gebildet (Walke, 1996; Stromer, 1998).

Unter Hitzeschockbedingungen zerfällt dabei der oligomere Komplex über Zwischenstufen in eine dimere Spezies (Stromer, 1998). Dieser Zerfallsprozess geht mit einer Steigerung der Chaperonaktivität und einer Exposition von hydrophoben Oberflächen einher (Walke, 1996; Stromer, 1998). Zusätzlich zu der hoch komplexen Regulation der Hsp26-Expression (Kurtz *et al.*, 1986; Varela *et al.*, 1992; Carmelo & Sa-Correia, 1997) scheint diese Dissoziation, ähnlich der Phosphorylierungs-induzierten Dissoziation bei Säuger Hsps, ein zweiter regulatorischer Mechanismus von Hsp26 zu sein.

1.8 Problemstellung

Kleine Hitzeschockproteine (sHsps) können in allen Organismen nachgewiesen werden und zeigen unter physiologischen Bedingungen, vor allem aber unter Stressbedingungen, hohe Expressionsraten (De Jong *et al.*, 1998). Durch ihre Chaperonaktivität, also ihre Fähigkeit irreversible Nebenreaktionen bei der Faltung und Entfaltung von Proteinen zu verhindern (Haslbeck, 2002), vermitteln viele sHsps Toleranz gegenüber einer Vielzahl von zellulären Stressfaktoren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das kleine Hitzeschockprotein Hsp26 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* auf seine strukturellen und funktionellen Eigenschaften hin untersucht werden.

Aussagen über die Stabilität von Hsp26 sollten einerseits mittels chemisch induzierter Entfaltung und Rückfaltung getroffen werden, andererseits sollte die Stabilität mittels kalorimetrischer Messungen ermittelt werden.

Ein wichtiger Aspekt kleiner Hitzeschockproteine ist die Ausbildung oligomerer Strukturen. Die strukturelle Grundlage der Oligomerisierung und die oft dynamische Struktur kleiner Hsps ist noch weitgehend ungeklärt. Kleine Hitzeschockproteine setzen sich strukturell aus drei Regionen zusammen, der charakteristischen α -Kristallindomäne, flankiert von einer wenig konservierten N-terminalen Region und einer kurzen C-terminalen Extension (De Jong *et al.*, 1998). Die kleinste, konservierte Bildungseinheit der Oligomere ist das Dimer (Van Montfort *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe von Deletionskonstrukten Aussagen über die strukturellen Domänen, die für die Oligomerisierung essentiell sind, getroffen werden. Ferner sollte versucht werden, die Bereiche, die für die Chaperonaktivität und Substratbindung verantwortlich sind, zu identifizieren.

Unter Hitzeschockbedingungen dissoziiert Hsp26 zu, als Chaperon aktiven, Dimeren, die unter physiologischen Bedingungen wieder zu inaktiven Hsp26 Oligomeren reassoziieren. Von Interesse war besonders die stressabhängige Änderung der oligomeren Struktur. Um mehr Einblick in Aufbau, Organisation, Stabilität und Dynamik von Hsp26 Komplexen zu erhalten, sollte die temperaturabhängige Dissoziation und Assoziation genauer untersucht werden.

In vitro agieren sHsps als molekulare Chaperone, indem sie entfaltete Proteine vor irreversibler Aggregation schützen und sie in einer rückfaltbaren Form halten. Aufgrund ihrer hohen Bindekapazität von bis zu einem Substratmolekül pro Untereinheit, sind sie in dieser Beziehung deutlich effizienter als andere Chaperone. Die Interaktion von Hsp26 mit verschiedenen Testsubstraten sollte Einblick in die Art und Stabilität der Interaktion mit nicht nativen Proteinen liefern. Dabei sollten auftretende Hsp26-Substratkomplexe auf ihre Stöchiometrie, auf die Kinetik ihrer Entstehung und auf ihre Struktur hin untersucht werden. Auch die Morphologie und Stabilität von Hsp26-Substrat Komplexen sollte ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendetes Material

2.1.1 Organismen und Vektoren

Tabelle 2.1 fasst die in dieser Arbeit verwendeten Organismen zusammen.

Tabelle 2.1 Bakterien- und Hefestämme

Bakterienstämme	Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ omp T lon (r _B ⁻ m _B ⁻)	Stratagene, La Jolla, USA
Hefestämme		
SEY6211	MATa <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 suc2-9</i> GAL	(ATCC 96100, (Robinson <i>et al.</i> , 1988))
W303	MATα <i>ura3-52 his3-200 lys2-801 trp1-901 leu2-3,112 suc2-9</i>	(Palmer <i>et al.</i> , 1979)

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor (pET28(mod) - T7-Expressionsvektor; Kanamycin Resistenz; N-terminalem His-Tag) wurde von M. Haslbeck zur Verfügung gestellt

Der Hefestamm JT(DIP) GPD26(A) wurde von Prof. S. Lindquist (Universität Chicago, USA) zur Verfügung gestellt. Der Stamm ist chromosomal Wildtyp und wurde mit dem Plasmid pJV517 transformiert. Das Plasmid besitzt das Hsp26 Gen unter Kontrolle des konstitutiven GPD-Promotors (Bitter & Egan, 1984; Mumberg *et al.*, 1995).

2.1.2 Chemikalien

Acetyl-CoA, Trilithiumsalz	Roche (Mannheim, Deutschland)
Acrylamidlösung (38% mit 2% Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Dinatriumsalz	Roche (Mannheim, Deutschland)

Agarose, ultra pure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bacto Agar	Difco (Detroit, USA)
Bacto Trypton	Difco (Detroit, USA)
Bacto Yeast Extract	Difco (Detroit, USA)
Bromphenolblau S	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Mannheim, Deutschland)
Coomassie Brilliant-Blue R-250	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce (Rockford, USA)
5,5' Dithio-bis-Nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma (St. Louis, USA)
1,4-Dithioerythrit (DTE)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
ECL-Westernblot Detektionssystem	Amersham, Upsalla (Schweden)
Ethylendiamintetraessigsäure, Titriplex III (EDTA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, p.a.	Riedel de Haen AG (Seelze, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma (St. Louis, USA)
Formaldehyd, 37 % p.A.	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glutaraldehyd, 25% in Wasser	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Glycerin, 99 %	ICN, Costa Mesa, USA
Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'2-	ICN (Costa Mesa, USA)
Ethansulfonsäure (HEPES)	
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
β -Mercaptoethanol, reinst	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Oxalacetat	Sigma (St. Louis, USA)

Polyoxyethylen-Sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Restriktionsenzyme	Roche (Mannheim, Deutschland)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
T4-Ligase	Promega (Madison, USA)
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN, Costa Mesa, USA
Uranyl-Acetat (1-2%)	S. Weinkauff (TU München)
Yeast Nitrogen Base	Difco (Detroit, USA)

Weitere verwendete Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen und haben, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad z.A..

2.1.3 Größenstandards und Kits

Low-Range-Molekulargewichtsstandard (LMW, SDS-PAGE)	BioRad Laboratories (München, Deutschland)
High-Range-Molekulargewichtsstandard (HMW, SDS-PAGE)	BioRad Laboratories (München, Deutschland)
Rainbow markers	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
DNA-BstEII	New England Biolabs (Beverly, USA).
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche (Mannheim, Deutschland)
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche (Mannheim, Deutschland)
QIAquick, Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Eichproteine für HPLC	Roche (Mannheim, Deutschland)

2.1.4 Proteine und Enzyme

Albumin aus Rinderserum, rein	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Citratsynthase (mitochondrial) aus Schweineherz	Roche (Mannheim, Deutschland)

α -Glukosidase aus Hefe	Roche (Mannheim, Deutschland)
GroEL/GroES aus <i>E. coli</i>	H. Grallert (München, Deutschland)
Hsp25 rekombinant aus <i>E. coli</i>	M. Gaestel (Hannover, Deutschland)
Hsp27 rekombinant aus <i>E. coli</i>	M. Gaestel (Hannover, Deutschland)
Hsp104 aus Hefe	B. Bösl (München, Deutschland)
Insulin aus Rind	Sigma (St. Louis, USA)
α B-Kristallin	Sigma (St. Louis, USA)
α -Laktalbumin (Typ III)	Sigma (St. Louis, USA)
Rhodanase aus Rind	Sigma (St. Louis, USA)
Ssa1 aus Hefe	B. Bösl (München, Deutschland)
Ydj1 aus Hefe	B. Bösl (München, Deutschland)

2.1.5 Antikörper

Polyklonales Serum gegen Hsp26 (Hase)	Dr. J. Pineda Antikörper Service (Berlin, Deutschland)
Polyklonales Serum gegen CS (Hase)	Dr. J. Pineda Antikörper Service (Berlin, Deutschland)
Monoklonaler IgG-Antikörper gegen Penta Histidin (Maus)	Sigma (St. Louis, USA)
Monoklonaler IgG-POD Konjugat gegen Hasen-IgG (Schaf)	Sigma (St. Louis, USA)

2.1.6 Chromatographiematerialien

DEAE-Sepharcel	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Ni-NTA-Superflow	Qiagen (Hilde, Deutschland)
Resource-Q; Source 15 (FPLC)	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 75 Prep Grade	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 200 Prep Grade	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
TSK G3000PW HPLC-Gelfiltrationssäule	Tosohaas GmbH (Stuttgart, Deutschland)
TSK G4000PW HPLC-Gelfiltrationssäule	Tosohaas GmbH (Stuttgart, Deutschland)

2.1.7 Sonstiges Material

Amicon-Ultrafiltrationsmembran YM10/30	Amicon (Witten, Deutschland)
Centricon 10/30-Mikrokonzentratoren	Amicon (Witten, Deutschland)
Dialyseschläuche Spectra/Por (6-8 kDa)	Spectrum (Houston, USA)
Einmalküvetten 1,5 ml halbmikro	Zefa (München, Deutschland)
Filterpapier	Whatman (Maidstone, England)
Immobilon-P(PVDF)-Membran	Millipore (Bedford, USA)
Immobilon-NC(Nitrocellulose)-Membran	Millipore (Bedford, USA)
Küvetten	Starna GmbH (Pfungstadt, Deutschland)
Kohle Trägerfilme für EM S160, 200 mesh- Netzchen von 3,05 mm	Plano (Wetzlar, Deutschland)
pH-Indikatorstreifen	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Polyacrylamidfertiggele (10-20 % Tricine)	Novex (Frankfurt, Deutschland)
Röntgenfilme X-OMAT AR	Eastman Kodak (Rochester, USA)
Scientia EM-Film 23D56 (6,5x9 cm)	Agfa Gevaert (Belgien)
Sterilfilter 0,2µm	Zefa (München, Deutschland)

Alle sonstigen Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma Zefa (München, Deutschland) bezogen.

2.1.8 Nährmedien und Antibiotika

Puffer und Lösungen wurden mit quarzbidestilliertem Wasser hergestellt. Für Medien wurde entionisiertes Wasser verwendet. Der pH-Wert der Lösungen wurde unter Berücksichtigung des Temperaturkoeffizienten der entsprechenden Puffersubstanz bei der jeweils angegebenen Temperatur eingestellt. Lösungen, Puffer und Medien für Arbeiten mit Hefen oder Bakterien wurden direkt nach ihrer Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte im Kühlraum bei 4 °C.

Medien zu Anzucht von *S. cerevisiae*

YPD:	Hefeextrakt	5 g
	Bacto Pepton	10 g
	Glukose	20 g
	1M NaOH	1 ml
	H ₂ O	ad 1l
	Für Platten: 20 g Bacto Agar	

URA-Selektionsmedium (ohne Uracil)	Yeast Nitrogen Base	6,7 g
	Supplement-Aminosäure-Mix (ohne Uracil)	0,6 g
	Glukose	20 g
	1 M NaOH	1 ml
	H ₂ O	ad 1l
	Für Platten: 20 g Bacto Agar	

Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB ₀ :	Bacto Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1l
	Mit NaOH auf pH 7,2 einstellen	
	Für LB ₀ -Platten: 12 g Bacto Agar	

Selektion bei *E. coli*:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	35 µg/ml

2.1.9 Puffer

Lösungen für Molekularbiologische Methoden

TAE (50x):	2 M Tris/Acetat pH 8.0 50 mM EDTA	
Gelauftragspuffer	50 % (v/v) Glycerin 10 mM EDTA (pH 8.0) 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol	
1 % Agarose-Lsg:	1 g Agarose 100 ml TAE (1x) 1 µl Ethidiumbromid-Lsg	
Lösung A	3 M NaAc (pH 5.5) 1 M CaCl ₂ 2.8 M MnCl ₂ H ₂ O	13 ml 100 ml 25 ml 862 ml
Lösung A+Glycerin	Glycerin (87%) Lösung A	69 ml 331 ml

Lösungen für Proteinchemische Methoden

Laufpuffer (10x):	0,25 M Tris 2 M Glycin 1 % SDS einstellen auf pH 8.8 mit HCl
Laemmli Auftragspuffer (5x):	10 % (w/v) SDS 50 % (w/v) Glycerin 300 mM Tris 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol

Transferpuffer:	Glycin	36 g
	Tris	7,6 g
	Methanol	500 ml
	H ₂ O	ad 2.5 l
PBS (-T):	NaCl	5,84 g
	Na ₂ HPO ₄	11,5 g
	NaH ₂ PO ₄	2,96 g
	H ₂ O	ad 1l
	(Tween-20	1 ml)

Für die Hsp26-Reinigung verwendete Puffer:

Aufschlußpuffer/	40 mM Hepes-KOH, pH 7,5
Aufbewahrungspuffer	50 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTE
Elutionspuffer A	40 mM Hepes-KOH, pH 7,5
	50 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTE
Elutionspuffer B	40 mM Hepes-KOH, pH 7,5
	500 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTE

Alle Experimente mit Hsp26 wurden, falls nicht anders angegeben, in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,7 durchgeführt.

Für die Hsp26 Δ N Reinigung verwendete Puffer:

Aufschlusspuffer	40 mM Na-P, pH 7,5 150 mM NaCl 10 mM Imidazol
Ni-NTA- Waschpuffer	40 mM Na-P, pH 6,8 150 mM NaCl 20 mM Imidazol
Ni-NTA- Elutionspuffer	40 mM Na-P, pH 6,8 150 mM NaCl 300 mM Imidazol
Dialyse Puffer	40 mM Hepes-KOH, pH 8,0 50 mM NaCl 1 mM EDTA
Resource Q-Elutionspuffer	40 mM Hepes-KOH, pH 8,0 500 mM NaCl 1 mM EDTA
Sonstige Puffer:	
Laufpuffer (HPLC)	100 mM Hepes-KOH, pH 7.5 150 mM KCl
TE-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA
Tris-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Rhodanase-Assay	40 mM Na-P, pH 7,7

Puffer und Lösungen wurden mit quarzbidestilliertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde unter Berücksichtigung des Temperaturkoeffizienten der entsprechenden Puffersubstanz bei der jeweils angegebenen Temperatur eingestellt. Alle Puffer für die Proteinreinigung wurden sterilfiltriert und entgast.

2.1.10 Geräte

Absorptionsspektrophotometer:

Varian Cary 50 Bio UV-Vis-Spektrophotometer (Varian, Palo Alto, USA)

Biotech Ultrospec 3000 UV-VIS-Spektrophotometer (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Pharmacia Biochrom 4060, UV/VIS Spektrophotometer (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Perkin Elmer Lambda 5, UV/VIS Spektrophotometer

Circulardichroismus-Spektropolarimeter:

Jasco J715 mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

Fluoreszenz-Spektrophotometer:

Spektrofluorometer: Fluoromax mit temperierbarem Küvettenhalter (Spex: Edison, USA)

Spektrofluorometer: Fluoromax II mit temperierbarem Küvettenhalter (Spex, Edison, USA)

Stopped-flow Instrument

Pbp05-109 SpectraKinetik Monochromator (Applied Photophysics, Surrey, UK)

Sequential Stopped Flow Sample Handling Unit (Applied Photophysics, Surrey, UK)

Microcalorimeter

VP-DSC MicroCalorimeter (MicroCal Incorporated, Northhampton, USA)

Chromatographieanlagen:

FPLC-Anlage, isokratisch (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

FPLC-Pumpe P-500
Ventil V-7
UV-Monitor Uvicord S II
Fraktionskollektor RediFrac
Einkanalschreiber REC 101

HPLC-Anlagen:

HPLC-Anlage (Jasco, Großumstadt, Deutschland)
Pumpsystem: PU-1580
Fluoreszenzdetektor: FP-920
UV-Detektor: UV-1575

Gelelektrophorese und Blotapparaturen:

RHU10X (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Hofer Mighty Small II (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Fast Blot B44 Apparatur (Biometra, Göttingen, Deutschland)
Peqlab Gelapparatur P8DS für Novex-Tricin-Gele (Novex, Frankfurt, Deutschland)

Spannungsgeräte:

LKB-GPS 200/400 Spannungsgerät (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Pharmacia EPS 3500, 301 und EPS 1001 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Waagen:

Analysenwaagen BP 121 S (Satorius, Göttingen, Deutschland)
Halbmikrowaage BL 310 (Satorius, Göttingen, Deutschland)

Zentrifugen:

Rotina 46 R Kühlzentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Avanti J25 mit JA-10 und JA-25.50-Rotoren (Beckmann, Wien, Österreich)

Weitere Geräte:

Varioklav-Dampfsterilisator EPZ
H+P (Oberschleißheim, Deutschland)

Digitalthermometer mit Thermofühler	Keithly Instr. (Cleveland, USA)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, Deutschland)
Elektronenmikroskop JEOL 100 CX	JEOL (München, Deutschland)
Eppendorf-Thermomixer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kulturschüttler Certomat S	Braun (Melsungen, Deutschland)
Magnetrührer Heidolph MR2000	Heidolph (Kehlheim, Deutschland)
Metallblockthermostat TB 1	Biometra (Göttingen, Deutschland)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Thermocycler	MWG (Ebersberg, Deutschland)
Ultrafiltrationszelle 8050	Amicon (Danvers, USA)
Ultraschallaufschlußgerät Sonifier B-12	Branson Company (Danbury, USA)
Umluftinkubator	New Brunswick Scientific (Nürtingen, Deutschland)
Wasserbad Haake F6-K	Haake (Karlsruhe, Deutschland)
Zellaufschlußgerät Basic Z	Constant Systems(Warwick, UK)

2.1.11 Computerprogramme

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems (San Jose, USA)
Borwin	Jasco (Großumstadt, Deutschland)
ImageMaster-1D	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
LabScan	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Microsoft Office XP	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
Origin (Microcal)	MicroCal Incorporated (Northampton, USA)
ProtParam Tool	Expasy (http://expasy.hcuge.ch/)
Reference Manager 10	ISI ResearchSoft (Berkeley, USA)
Sigma Plot 2001	SPSS, Chicago, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

Zur Anzucht von Mikroorganismen und zu molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Lagerung erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei 4 °C.

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht der *S. cerevisiae*-Kulturen erfolgte auf YPD oder URA-SM bei 30 °C entweder durch Animpfen aus einer Glycerinkultur oder aus einer Einzelkolonie von einer Agarplatte. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 595 nm (OD_{595}) verfolgt. Eine $OD_{595}=1$ entspricht dabei einer Zelldichte von etwa 10^7 Zellen/ml (Walker, 1999b).

Die Hefestämme wurden für maximal 4 Monate als stationäre Flüssigkultur im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Eine längerfristige Aufbewahrung erfolgte mittels Glycerinkulturen, zu deren Herstellung 1 ml einer Übernachtskultur mit 15 % (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurde.

2.2.2 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium in einem Umluftinkubator mit Schüttelfunktion (200 Upm). Bei plasmidtragenden Stämmen wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agar Platten oder durch Animpfen aus einer Glycerinkultur. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei 595 nm ($OD_{595}=1=$ ca. 8×10^8 Zellen/ml) verfolgt (Sambrook *et al.*, 1989).

LB-Agar-Platten wurden maximal 8 Wochen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Eine längerfristige Aufbewahrung erfolgte mittels Glycerinkulturen, zu deren Herstellung 850 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl 87 % (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde.

2.2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die analytische und die präparative Auftrennung von DNA erfolgte in 1 %igen (0,3-10 kb) bis 2 %igen (0,1-1 kb) Agarosegelen, die 0,4 µg/ml EtBr enthielten. Die Elektrophorese wurde in 1 x TAE-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 120 mA durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe eines UV-Leuchtschirmes sichtbar gemacht und dokumentiert. Als Längenstandard diente der Lambda DNA-BstEII Verdau (New England Biolabs, Beverly, USA).

DNA Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der im Handel erhältliche *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet.

DNA-Fragmente wurden mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben gereinigt.

2.2.4 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden die zu transformierenden Stämme nach Sambrook *et al.* (1989) kompetent gemacht. Dazu wurde eine frische 100 ml *E. coli* Flüssigkultur mit einer OD₅₉₅ von 0,5 – 1,0 mit 2 ml 1M MgCl₂ versetzt und 10 min weiter im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 1 h auf Eis gekühlt und 5 min bei 4 °C und 5 000 UpM abzentrifugiert. Das Sediment wurde später in 20 ml Lösung A resuspendiert und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 5 000 UpM wurde das Sediment in 2 ml Lösung A + Glycerin aufgenommen und zu je 200 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden entweder direkt daran anschließend mit Plasmid-DNA transformiert, oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden je 200 µl kompetente Zellen mit der entsprechenden DNA vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschritt – 1 min bei 42°C – wurde der Ansatz wieder auf Eis abgekühlt und in 1 ml LB₀ für 60 min bei 37°C geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (3 min., 5 000 UpM, RT) wurde das Bakteriensediment auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und diese bei 37°C inkubiert.

2.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für die analytische und die präparative Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme wurden in der Regel je 0,5 µg DNA, 3 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Die Spaltung erfolgte unter Zugabe von 0,1 Ansatzvolumina 10 x Restriktionspuffer unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen für das entsprechende Restriktionsenzym.

Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation von geschnittenen Plasmiden (Vektor) ausschließen zu können, wurden diese im Anschluss an die Restriktion mit Alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim, Deutschland) behandelt. Dazu wurden pro µg Plasmid-DNA, 0,1 Einheiten Alkalische Phosphatase und 0,1 Ansatzvolumina 10 x Phosphatase-Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 75 °C deaktiviert und das DNA-Fragment gereinigt.

Ligation der DNA-Fragmente

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit den entsprechenden Vektoren wurde die T4-DNA-Ligase (Promega, Madison, USA) verwendet. In der Regel wurden etwa 100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Menge an einzusetzender Fragment-DNA wurde nach der Formel:

$$\frac{\text{ngVektor} \times \text{kbGrößedesInserts}}{\text{kbGrößedesVektors}} \times 3$$

bestimmt. Pro 1 µg Gesamt-DNA-Menge wurde 1 Einheit T4-DNA-Ligase und 0,2 Ansatzvolumina 5 x T4-Ligasepuffer (Promega, Madison, USA) eingesetzt und ÜN bei 4°C inkubiert.

2.3 Präparative Methoden

2.3.1 Zellaufschluss

Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einer Zellaufschlussmaschine (BasicZ, Constant Systems, Warwick, England) mittels Prallstrahlverfahren (PSV). Dabei wird eine Suspension mittels einer Hochdruckpumpe auf Drücke von bis zu 2,5 kbar verdichtet und dann durch eine Düse entspannt. Nach dem Durchtritt durch die Düse wird die Suspension im Freistrahle auf eine Prallplatte geführt, wo sie mit hoher Geschwindigkeit auftrifft. Die Beanspruchung der Zellen erfolgt sowohl durch Kavitationen im Bereich der Düse, als auch durch die schlagartige Verzögerung auf die Prallplatte.

Der Aufschluss von Hefezellen erfolgte mit einem Druck von 2,5 kbar und einem Düsendurchmesser von 35 µm, der Aufschluss von *E. coli*-Zellen erfolgte mit einem Druck von 1,8 kbar. Vorhandene genomische DNA wurde danach durch 4*10 s Ultraschall (1,5 cm Tellersonde, Stärke 6; Sonifier B-12, Branson, Danbury, USA) zerkleinert.

Zur Abtrennung intakter Zellen, unlöslicher Bestandteile und von Zell- und Membrantrümmern wurde der Zellaufschluss anschließend 60 min bei 30 000 g und 4 °C abzentrifugiert.

2.3.2 Reinigung von Hsp26 aus *S. cerevisiae*

Die Reinigung von Hsp26 erfolgte nach einer leicht modifizierten Reinigungsvorschrift nach Walke (1996) und Stromer (1998). Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C, falls nicht anders angegeben.

Die Anzucht von Hefe JT(DIP) GPD26(A) (pJV517) erfolgte in URA-Selektionsmedium bei 30 °C über Nacht.

Die Zellernte erfolgte in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (5000 Upm, 15 min, 4 °C, JA10.). Die sedimentierten Zellen wurden mit Aufschlusspuffer gewaschen, nochmals abzentrifugiert und in Aufschlusspuffer mit Protease-Inhibitoren resuspendiert (1 Protease Inhibitor Tablette wurde in 50 ml Aufschlußpuffer bei 4 °C gelöst). Der Zellaufschluss erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben.

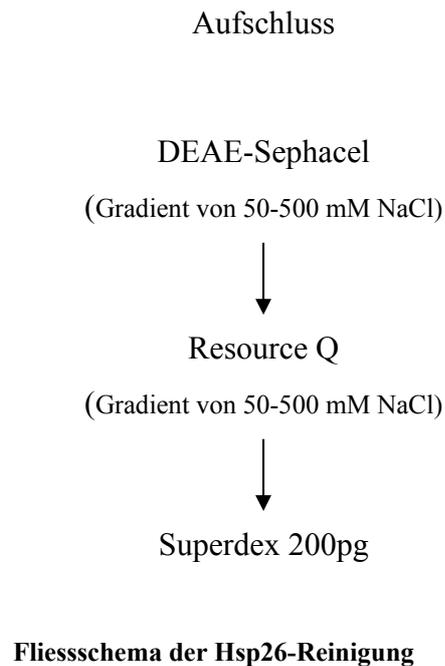
Nach dem Abzentrifugieren des Rohaufschlusses erfolgte die Haupt- und Feinreinigung von Hsp26 über chromatographische Verfahren. Dazu wurde der lösliche Überstand auf eine mit

Aufschlusspuffer äquilibrierte DEAE-Sephacel-Säule (Volumen: 70 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte durch lineare Erhöhung der Salzkonzentration von 50-500 mM NaCl mit Elutionspuffer A und B. Hsp26-haltige Fraktionen wurden anhand eines 12%igen Coomassie-Gels gepoolt. Um eine Bindung der Hsp26-haltigen Fraktionen an die Resource-Q Säule (Volumen: 6 ml) zu gewährleisten, wurden die Fraktionen mit Aufschlusspuffer auf einen Salzgehalt von 50 mM NaCl verdünnt. Die Elution erfolgte durch Erhöhung der Ionenstärke (Elutionspuffer A und B) mit einem linearen Salzgradienten von 50-500 mM NaCl.

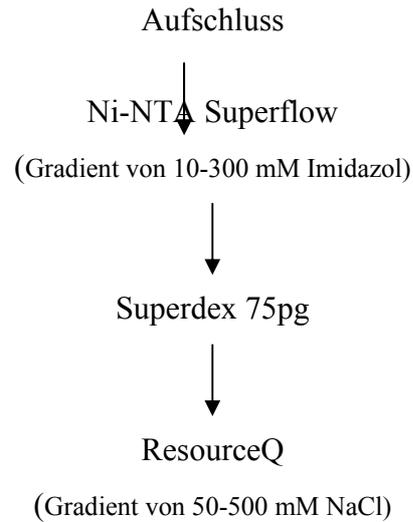
Die Hsp26-haltigen Fraktionen der Resource-Q-Läufe wurden mittels einer Amicon-Ultrafiltrationszelle eingengt und in 5 ml Portionen auf die in Aufschlusspuffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Superdex 200pg, Volumen: 320 ml) aufgetragen. Die sauberen Hsp26-haltigen Fraktionen wurden aufkonzentriert (Amiconmembran YM 30), die Konzentration durch UV-Absorption bestimmt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.3 Reinigung von Hsp26ΔN aus *E. coli*

Zur Reinigung von Hsp26ΔN wurde das Gen in einen pET28(mod) Vektor kloniert (aminoterminaler His-Tag). Dieses Plasmid wurde in BL21DE3 codon+ transformiert. Es wurden 5 Liter *E. coli* bei 37 °C im Fermenter unter konstantem Schütteln (296 UpM), bei pH 7,12 und pO₂ von 57,9 % angezogen. Bei einer optischen Dichte von OD₅₉₅ = 2,5 wurde die Expression mit 2 mM IPTG induziert und 3,5 Stunden später die Zellen durch Zentrifugation geerntet (15 min, 5000 UpM, 4 °C). Nach einem Waschschritt mit 100 ml Aufschlusspuffer (40 mM Na-P, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol) wurden die Zellen nochmals pelletiert. Anschließend wurden sie in 100 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und wie unter (2.3.1) beschrieben aufgeschlossen und abzentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Affinitätssäule aufgetragen und ungebundene Proteine mit



Waschpuffer (40 mM Na-P, pH 6,8, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol) von der Säule entfernt. Gebundene Proteine wurden über einen linearen Gradienten von 10-300 mM Imidazol über 120 ml und einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetrennt. Die Hsp26ΔN enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels einer Amiconfiltrationszelle aufkonzentriert. Die weitere Reinigung erfolgte mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule (Superdex 75pg) in Aufschlusspuffer. Nachdem keine zufrieden stellende Aufreinigung durch diese Säule erfolgte, wurde das Protein gegen 40 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA dialysiert und auf eine Anionenaustauschersäule (ResourceQ, 1 ml) aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten von 50-500 mM NaCl eluiert. Hsp26ΔN zeigte zwar keine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial, allerdings konnte aufgrund der Bindung von anderen Proteinen ein deutlicher Reinigungseffekt erzielt werden. Der Hsp26ΔN haltige Durchlauf wurde mittels einer YM10 Amiconmembran aufkonzentriert und mögliche Aggregate abzentrifugiert (14000UpM, 60 min, 4 °C). Der hohe Reinheitsgrad des Proteins wurde durch ein Silbergefärbtes SDS-PAGE sowie dem UV-Spektrum, keine Verunreinigungen durch Nukleinsäuren, bestätigt (nicht gezeigt). Die Proteinlösung, mit einer Konzentration von 3,8 mg/ml wurde in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.



Fluoreschema der His-Hsp26ΔN-Reinigung

2.3.4 Aufkonzentrierung und Dialyse von Proteinen

Zur Aufkonzentrierung von Volumina über 5 ml wurde eine Amicon-Ultrafiltrationszelle (50 ml) eingesetzt. Als Membran dienten dabei für Hsp26ΔN Amicon YM10-Membranen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa. Für Hsp26 wurden YM30-Membranen mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa verwendet. Der Überdruck der Stickstoffbegasung von etwa 3 bar presst die Proteinlösung durch die Membran, wobei allerdings nur die Pufferlösung

passieren kann und das Protein in der Zelle verbleibt. Um eine Erwärmung der Proteinlösung zu vermeiden, wurde die Amicon-Zelle auf Eis gekühlt.

Bei Volumina unter 5 ml wurden Centrikon-Mikrokonzentratoren (Ausschlußgröße: 10 kDa oder 30 kDa) verwendet und die Lösung durch Zentrifugation (Hettich-Swing-Out Rotor mit Adaptoren, 5 000 Upm, 4°C) eingengt. Dabei wird die Pufferlösung durch die auf sie wirkende Zentrifugalkraft durch eine Membran mit definierter Ausschlußgröße getrieben die Proteine werden über der Membran aufkonzentriert.

Zur Veränderung der Pufferbedingungen wurde gegen das 100-1000fache des entsprechenden Ausgangsvolumens bei 4 °C dialysiert. Für eine effektive Dialyse wurde der Puffer einmal gewechselt. Der Pufferaustausch erfolgte über eine semipermeable Membran.

2.3.5 NaDoc-TCA-Fällung (denaturierende Bedingungen)

Zum Aufkonzentrieren von Proteinfractionen nach analytischen HPLC-Gelfiltrationsläufen wurde eine kombinierte NaDoc-TCA-Fällung durchgeführt (verändert nach Mahuran *et al.*, 1983). Zur Proteinlösung, mit möglichst leicht basischem pH, wurde 1 / 1000 Volumen einer 10 % (w/v) NaDoc-Lösung (in Wasser) gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von eiskalter Trichloressigsäure auf eine Endkonzentration von 6 - 8 % TCA (z.B. 1/15 Volumen einer 100 %igen TCA-Lösung) gebracht. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (30 min) und Zentrifugation (Eppendorf-Kühlzentrifuge, 14000 UpM, 45 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das getrocknete Präzipitat in 1x Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Der eventuell resultierende saure pH-Wert der resuspendierten Lösung (Gelbfärbung) konnte durch Zugabe von NaOH neutralisiert werden (Blaufärbung). Die denaturierten und aufkonzentrierten Proteine konnten anschließend für eine Gelelektrophorese verwendet werden.

2.4 Chromatographie

Die im Folgenden beschriebenen chromatographischen Methoden wurden bei den unter 2.3.2 und 2.3.3 beschriebenen Proteinreinigungen angewendet. Der Reinigungserfolg wurde nach jedem Schritt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kontrolliert.

2.4.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung geladener Ionen: Ein Probenmolekül konkurriert mit Salz-Ionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauscher-Matrix. In einem ersten Schritt bindet das Molekül an die fixierten Ladungen der stationären Phase, und im zweiten Schritt erfolgt die Verdrängung und Elution des Proteins durch die steigende Salzkonzentration (Erhöhung der Ionenstärke) oder durch die Änderung der Nettoladung des Eluenten.

Proteine tragen, aufgrund der sauren und basischen Seitenketten einzelner Aminosäuren, negative oder positive Ladungen und binden daher an geladenen Trägermaterialien. Im sauren pH-Bereich sind die Aminogruppen, hauptsächlich von Lys, Arg und His, protoniert, so dass das Protein ein kationisches Verhalten zeigt. Dagegen überwiegen im basischen pH-Bereich die negativen Ladungen an den Seitenketten von Asp und Glu und das Protein liegt als Anion vor. Der Gesamtladungszustand ist somit abhängig vom pH-Wert der umgebenden Lösung. Je stärker das Protein geladen ist, desto stärker ist die Bindung an den Ionenaustauscher.

Nach der Art der geladenen Gruppen unterscheidet man zwischen Anionenaustauschern, die positive Ladungen an der Oberfläche des Trägermaterials aufweisen und Kationenaustauschern, die negative Ladungen besitzen.

Die Menge an Protein, die an einen Austauscher gebunden werden kann, hängt von der Molekülgröße ab. Für große Moleküle ist nur die Oberfläche eines Ionenaustauschers zugänglich, und die Kapazität ist relativ gering. Dagegen können kleine Moleküle auch das innere der stationären Phase ausnutzen.

In dieser Arbeit verwendete Anionenaustauscher: DEAE-Sephacel, Resouce Q

2.4.2 Gelfiltrationschromatographie

Proteine lassen sich mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie nach ihrem hydrodynamischen Radius auftrennen. Die Matrix dieser Säulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk definierter Porengröße. Proteine, deren Durchmesser größer ist als die Porengröße, sind nicht in der Lage in die Poren des Trägermaterials einzudringen und eluieren daher gemeinsam mit der Lösungsmittelfront. Kleinere Partikel können dagegen in die Gelporen eindringen und wandern daher langsamer durch die Säule als die größeren

Moleküle (Lottspeich, 1998). Ihr Elutionsvolumen entspricht der Summe des internen Porenvolumens und des Partikelzwischenraums. Der Trennbereich einer Gelfiltrationssäule wird folglich durch die Porengröße bestimmt. Die Elution erfolgt mit Puffern mittlerer Ionenstärke, um ionische Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix zu unterdrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zu minimieren.

In dieser Arbeit verwendete Gelfiltrationssäule: Superdex 75pg (Hsp26ΔN-Reinigung) und Superdex 200pg (Hsp26-Reinigung)

2.4.3 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Typische Bindungspaare sind beispielsweise Antigene und Antikörper oder Enzyme und Coenzyme. Ein verfügbarer affiner Bindungspartner wird kovalent an eine Matrix gebunden und dient als immobilisierter Ligand. Die biospezifische Wechselwirkung mit dem Zielmolekül wird genutzt, um diesen Adsorbenten selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Adsorbenten wird dann entweder durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung erreicht oder durch einen Konformationswechsel aufgrund einer Änderung des pH-Werts oder der Ionenstärke. Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen (Lottspeich, 1998).

In dieser Arbeit verwendete Affinitätssäulen: Ni-NTA (Hsp26ΔN-Reinigung)

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinextrakten und Zellaufschlüssen und zur Kontrolle des Reinigungsverlaufes wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Trenn- und Sammelgel benutzt (Laemmli, 1970; Fling & Gregerson, 1986). Bei diesem Verfahren werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse

getrennt. Das negativ geladene SDS im Auftragspuffer bindet im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an das Protein und verleiht ihm damit eine negative Überschussladung, die proportional ist zur Größe des Proteins. Die Proteine wandern daher im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese nur von ihrer Größe abhängig ist. Die Trennung der Proteine in der Gelmatrix anhand ihrer Größe erfolgt daher proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Es wurde folgendes Gelsystem verwendet:

Gelgröße: 9x7x0.075 cm³

Elektrophoresebedingungen: ½-1 h bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA

Verwendete Lösungen:

10x Laufpuffer:	250 mM Tris/HCl, pH 8,8, 2 M Glycin, 1% SDS
5x Auftragspuffer:	10% SDS (w/v), 50% Glycerin (v/v), 300 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,05% Bromphenolblau (w/v), 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Trenngelpuffer (4x)	0,8 % SDS, 5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer (2x)	0,4 % SDS, 0,25 M Tris/HCl, pH 6,8
Acrylamid (40 % w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid = 38:2

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese entweder in 1x Auftragspuffer aufgenommen oder mit 5x Laemmli-Puffer versetzt. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde dem Auftragspuffer 5% β-Mercaptoethanol zugegeben. Für eine vollständige Denaturierung der Proteine, wurden die Proben direkt vor dem Auftragen auf das Gel 5 min. bei 95 °C inkubiert (Laemmli, 1970).

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard (LMW oder HMW) der Firma Biorad (München, Deutschland) je SDS-PAGE-Gel mit aufgetragen.

2.5.2 Protein-Färbemethoden

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

Die Gele werden hierbei nach elektrophoretischer Auftrennung in Lösung A gefärbt und nachfolgend schrittweise in den Lösungen B, C und D entfärbt. Durch kurzes Aufkochen der

Proteingele konnten die Inkubationszeiten in den verschiedenen Lösungen abweichend von der Originalvorschrift auf etwa 10 min verkürzt werden.

Verwendete Lösungen:

Lösung A:	25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) techn. Essigsäure, 0,05% Coomassie Blau R
Lösung B:	10% Isopropanol, 10% techn. Essigsäure, 0,005% Coomassie Blau R
Lösung C:	10% techn. Essigsäure, 0,002% Coomassie Blau R
Lösung D:	10% techn. Essigsäure

Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei etwa 100 ng Protein.

Silberfärbung (Heukeshoven & Dernick, 1988)

Die Silberfärbung repräsentiert eine sehr empfindliche Färbemethode mit einer Nachweisgrenze von 10 ng Protein.

Die Silberfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Fixierer 1:	10-30 min	30 % (v/v) techn. Ethanol, 10 % (v/v) techn. Eisessig
Fixierer 2:	30-60 min	2 ml 25 % (v/v) Glutaraldehyd, 0,1 g Natriumdithiosulfat ad 100 ml mit: 0,4 M Natriumacetat, 0,5 % (v/v) techn. Eisessig, 30 % (v/v) techn. Ethanol
Waschen:	3 x 10 min	H ₂ O
Färbelösung:	45 min	0,5 ml 1,2 M Silbernitratlösung, 25 µl Formaldehyd (37 % (w/v)) ad 100 ml aqua bidest
Entwickler:	1-8 min	5 g Natriumcarbonat (wasserfrei), 75 µl Formaldehyd (37 % (w/v)) ad 200 ml aqua bidest
Stop-Lösung:	> 10 min	50 mM EDTA, pH 7,5

2.5.3 Densitometrie

Gelelektrophoretisch aufgetrennte und gefärbte Proteine können quantitativ erfaßt werden. Zur quantitativen Auswertung von Färbungsintensitäten, wird die Lichtabsorption einer elektrophoretischen Bande in einem Gel gemessen.

Es wird eine bewegliche Lichtquelle über das Gel geführt und die Absorption an jeder Stelle des Gels gemessen und computerunterstützt verarbeitet (Scanner). Bei eindimensionalen Gelen erhält man eine Kurve der Extinktion $\ln I_0/I$ über die Gellänge, wobei I_0 die eingestrahlte Intensität und I , die am Detektor gemessene Intensität darstellen. Als Lichtquellen werden Laser oder Weißlichtlampen verwendet, die durch entsprechende Filter auf den optimalen Wellenlängenbereich eingestellt werden.

Im ersten Schritt wurden die Umrisse von auszuwertenden Proteinbanden markiert. Spezialisierte Software übernimmt die Subtraktion der Hintergrundfärbung und die Quantifizierung. Die Auswertung erfolgt über photographische Graukeile unter Einbeziehung der Tatsache, dass Proteinkonzentration und Bandenintensität proportional zueinander sind.

2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung eines Farbstoffes vor allem an basische und aromatische Aminosäuren in Proteinen (Bradford, 1976). Aus der Bindung resultiert eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm (rotviolett) nach 595 nm (blau). Die kommerziell erhältliche Färbelösung (Coomassie Protein Assay Reagent) wurde vor Gebrauch 1:1 mit H_2O bidest verdünnt. Je 1 ml dieser Lösung wurden mit 100 μ l Probe versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt.

Die Proteinkonzentration konnte dann über eine BSA-Eichgerade ermittelt werden unter der Annahme, dass der Farbstoff mit beiden Proteinen in gleicher Effizienz wechselwirkt (BSA: $A_{280\text{ nm}, 0,1\%} = 0,667$).

Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorption

Proteine absorbieren ultraviolettes Licht im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 290 nm. Dies beruht auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und in geringerem Maß auch Phenylalanin. Die A_{280} -Methode orientiert sich maßgeblich an Tryptophan, das ein Absorptionsmaximum bei 279 nm aufweist.

Mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes kann bei bekannten Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{ nm}, 0,1\%}$ die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm errechnet werden.

$$\text{Lambert Beer'sches Gesetz: } \mathbf{A = \epsilon \cdot c \cdot d}$$

- A: Absorption bei 280 nm
 ϵ : Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1 \%}$ [$\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$]
c: Proteinkonzentration [M]
d: Schichtdicke der Küvette [cm]

2.6 Spektroskopie

Bei allen spektroskopischen Untersuchungen wurden die aufgenommenen Spektren gegen entsprechende Pufferspektren als Referenz korrigiert. Diese Referenzen enthielten anstatt der Proteinlösung gleiche Mengen des Dialysepuffers, gegen den das verwendete Protein zuletzt dialysiert worden war.

Vor der Verwendung zur spektroskopischen Analyse wurden die Proteinstammlösungen zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge, 14 000 UpM, 30 min, 4 °C), um möglicherweise vorhandene Aggregate abzutrennen. Anschließend wurde die Konzentration mittels UV-Absorptionsspektroskopie bestimmt.

2.6.1 UV-Absorptionsspektroskopie

Absorption elektromagnetischer Strahlung im UV/VIS-Bereich erfolgt, wenn delokalisierte π -Elektronen aus ihrem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand überführt werden. Verschiedene funktionelle Gruppen eines Proteins besitzen Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm. Im Bereich von 180 bis 240 nm absorbiert vor allem die Peptidbindung mit ihrer Carbonylfunktion. Im Bereich von 250 bis 300 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, und in geringerem Maße auch Phenylalanine und Disulfidbrücken. Tyrosin und Tryptophan liefern den größten Beitrag zur Absorption, da ihre Extinktionskoeffizienten um fast eine Größenordnung höher liegen, als die des Phenylalanins und der Disulfidbrücken. In der folgenden Tabelle sind die molaren Extinktionskoeffizienten und die Wellenlänge maximaler Absorption der freien Aminosäuren in Wasser und bei neutralem pH-Wert zusammengestellt (Cantor & Schimmel, 1980a):

Tabelle 2.2 Absorptionseigenschaften von Trp, Tyr, Phe und S-S-Brücken.

Aminosäure	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Tryptophan	280	5700
Tyrosin	274	1400
Phenylalanin	257	200
Disulfidbrücke	250	300

Die spektralen Absorptionseigenschaften der aromatischen Aminosäuren hängen von der Polarität des sie umgebenden Mediums ab. So sind bei einer Änderung der Umgebungspolarität Signalverbreiterungen, Wellenlängenverschiebungen und Intensitätsänderungen zu erkennen. Bei einer Zunahme dieser Polarität findet eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen statt (so genannter „blue shift“). Die UV-Absorptionsspektroskopie kann daher Aufschluss über Konformationsänderungen und Änderungen in der Lösungsmittelzugänglichkeit der aromatischen Aminosäuren geben.

Lichtstreuungskorrektur

Zur Korrektur eines Absorptionsspektrums um den Lichtstreuungsanteil wird eine Extrapolation des Signals im Wellenlängenbereich von 320 bis 400 nm in den UV-Bereich durchgeführt.

Die Intensität der Lichtstreuung ist proportional zu $1/\lambda^4$.

$$f(\lambda) = a/\lambda^4$$

Dazu wurden die reziproken Absorptionswerte ab 320 nm sowie die entsprechenden Wellenlängen in die nachfolgende Gleichung eingesetzt. Aus Programmtechnischen Gründen wurden die reziproken Absorptionswerte gewählt.

$$1 / f(\lambda) = \lambda^c / a$$

$$a \approx 100\,000\,000$$

$$c \approx 4$$

Mit den errechneten Parameter a und c wurde schließlich der Anteil der Lichtstreuung am Spektrum für alle Wellenlängen berechnet.

Die Subtraktion des „Korrekturspektrums“ von der entsprechenden, gemessenen Absorption ergab die durch das Protein bedingte Absorption.

2.6.2 Fluoreszenzspektroskopie

Durch die Absorption eines Lichtquants werden Elektronen von ihrem Grundzustand in einen angeregten Zustand angehoben. Bei der Rückkehr der angeregten Elektronen in den energieärmeren Grundzustand wird die dabei freiwerdende Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung abgegeben. Gleichzeitig kann Schwingungsenergie dissipiert werden. Die Quanten der emittierten Strahlung sind daher längerwellig, bzw. energieärmer, als die der absorbierten Strahlung (Stoke'sche Verschiebung). Das unterschiedliche Ausmaß an Energiedissipation führt zu einem kontinuierlichen Emissionsspektrum.

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind aufgrund ihres delokalisierten π -Elektronensystems für die so genannte „intrinsische Fluoreszenz“ der Proteine verantwortlich. Dabei wird das Fluoreszenzverhalten von Proteinen mit allen drei aromatischen Aminosäuren zum Größtenteil von Tryptophan bestimmt.

Zwei Gründe sind für die starke Fluoreszenz von Tryptophan verantwortlich: Zunächst absorbiert Tryptophan von den drei aromatischen Aminosäuren am stärksten Lichtquanten. Zusätzlich ist es durch Energietransfer möglich, dass Tryptophan durch das Emissionslicht von Tyrosinen und Phenylalaninen (Cantor & Schimmel, 1980b; Schmid, 1989), aufgrund der Überlappung der Tyrosin- und Phenylalanin-Emissionsspektren mit dem Tryptophan-Anregungsspektrum, angeregt wird. Daher ergeben sich relative Empfindlichkeiten für die Fluoreszenz zu etwa:

$$\text{Trp} : \text{Tyr} : \text{Phe} = 1100 : 200 : 8$$

Ähnlich wie bei der UV-Absorption wird auch die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren stark durch ihre molekulare Umgebung im Protein bzw. im Lösungsmittel bestimmt. In nativen Proteinen liegt das Emissionsmaximum der Tryptophane bei 333 nm. Dies entspricht der Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz von freiem Tryptophan in hydrophober Umgebung. Durch die Denaturierung werden die Tryptophanreste dem

hydrophilen Lösungsmittel exponiert. Das Maximum eines Tryptophanspektrums in wässriger Umgebung liegt bei 353 nm, so dass es im denaturierten Zustand meistens zu einer deutlichen Verschiebung des Emissionsmaximums zu höheren Wellenlängen kommt. Die Fluoreszenzintensität nimmt dabei ab, weil im denaturierten Zustand aufgrund der größeren Entfernung voneinander kein effizienter Energietransfer mehr von Tyrosinen auf Tryptophane erfolgen kann. Im Falle eines reinen Tyrosinspektrums kann man zwar auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachten, wenn die Umgebung hydrophiler wird, jedoch keine Verschiebung des Emissionsmaximums, welches in der Regel bei 303 nm liegt. Fluoreszenzmessungen können aufgrund dieser Sensitivität gegenüber lokalen Veränderungen, zur Untersuchung der Proteinkonformation verwendet werden. Zu beachten ist hier allerdings die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz. Eine Temperaturzunahme führt zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Denaturierung und Denaturierungsübergang:

Für die Denaturierung wurde eine Proteinstammlösung in unterschiedliche Konzentrationen Harnstoff (in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5) verdünnt. Nach einer Inkubation von 20 h bei 25°C wurde die Denaturierung fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Dazu wurden Fluoreszenzspektren im Bereich von 295 nm bis 400 nm aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, die Spaltbreiten wurden entsprechend der Proteinkonzentration gewählt, um im für das Gerät optimalen Intensitätsbereich zu messen. Alle Spektren wurden gegen Puffer korrigiert.

Renaturierungsübergang:

Für die Renaturierung wurde die Proteinstammlösung für 9 h in 4 M Harnstoff (für Renaturierung mit 0,3 mg/ml) oder für 3,5 h in 6 M Harnstoff (für Renaturierung von 0,05 mg/ml Hsp26) denaturiert und anschließend in den Renaturierungsansatz verdünnt. Nach 88 h Inkubation bei 25°C wurde die Renaturierung fluoreszenzspektroskopisch wie bei den Denaturierungsübergängen untersucht.

Renaturierungskinetiken von Hsp26

Hierzu wurde das Protein für 3 h bei Raumtemperatur in 4 M Harnstoff denaturiert und anschließend in den Renaturierungsansatz verdünnt. Dabei wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 315 nm verfolgt.

Die Spalten wurden entsprechend der Proteinkonzentration eingestellt: je 3 nm für 0,3 mg/ml und je 5 nm für 0,05 mg/ml Hsp26.

Temperaturinduzierte Dissoziation und Assoziation

Um die Geschwindigkeit der Dissoziation und Assoziation von Hsp26 zu untersuchen, wurde das Protein in vortemperierte Pufferlösungen zugegeben. Dabei wurde die Änderung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 315 nm verfolgt. Die Spalten wurden entsprechend der Proteinkonzentration eingestellt: je 3 nm für 0,3 mg/ml und je 5 nm für 0,05 mg/ml Hsp26.

Die genauen Harnstoff-Konzentrationen wurden mit Hilfe des Refraktometers nach folgender Formel (Schmid, 1989) berechnet:

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66(\Delta N) + 29,753 (\Delta N)^2 + 185,56 (\Delta N)^3$$

ΔN : Differenz der Brechungsindices mit und ohne Harnstoff

Die Harnstoff- und Temperaturinduzierten Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken, wurden mit folgenden Exponentialfunktionen ausgewertet (siehe Abbildungsunterschriften):

Exponentialfunktion erster Ordnung

$$y = y_0 + a \cdot e^{-bx} \text{ oder } y = y_0 + a (1 - e^{-bx})$$

Exponentialfunktion zweiter Ordnung

$$y = y_0 + a \cdot e^{-bx} + c \cdot e^{-dx} \text{ oder } y = y_0 + a \cdot (1 - e^{-bx}) + c \cdot (1 - e^{-dx})$$

mit:

y: gemessene Fluoreszenzintensität

y_0 : gemessene Endintensität

a, c: Anteil der einzelnen Phasen an der Gesamtintensitätsänderung

b, d: Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Phasen

2.6.3 Stopped flow Messungen

Viele chemische Reaktionen laufen so schnell ab, dass ihre Reaktionsgeschwindigkeit mit üblichen Mitteln (Spektroskopie, Temperatur-, pH-, Konzentration- oder Leitfähigkeitsmessung) nicht mehr verfolgt werden kann. Bei herkömmlichen Methoden liegt die untere Zeitgrenze im Sekundenbereich und wird vor allem durch die Effizienz und Schnelligkeit des Mischvorgangs limitiert.

Die Einführung einer neuen Mischtechnik in den 20er Jahren machte es möglich Reaktionen mit Halbwertszeiten im Millisekundenbereich zu messen. Dabei werden die zu untersuchenden Komponenten durch Spritzen in eine Mischkammer gedrückt und nach vollständiger Vermischung durch eine Beobachtungszelle geleitet, wo der Fluss zum stehen kommt (*stopped-flow*). Dort wird das Verhalten der Reaktanden spektroskopisch untersucht.

Aus der Strömungsgeschwindigkeit und der Konzentration kann mit der *stopped-flow*-Methode die Reaktionsgeschwindigkeit bis in den Bereich von 0,1 ms bestimmt werden. Die Untersuchung von Hochgeschwindigkeitsreaktionen hat besonders bei der Aufklärung von Zwischenstufen beobachteter Reaktionsmechanismen eine Bedeutung. In der Biochemie sind dies vor allem Enzymreaktionen und Faltungen (Khundkar & Zewail, 1990). In dieser Arbeit wurde ein *stopped flow* Gerät von Applied Photophysics verwendet, um die Dissoziation von 10 µg/ml und 50 µg/ml Hsp26 in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 zu untersuchen. Die Signalintensität nimmt bei Dissoziation von Hsp26 ab. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Die Emission wurde durch Verwendung eines entsprechenden *cut-off*-Filters oberhalb von 315 nm gemessen. Die Spaltbreiten betragen 2 und 4 nm. Für die Messung der Dissoziation wurde eine 1 mg/ml bzw. 5 mg/ml Hsp26-Lösung in einer Spritze bei 25°C vorinkubiert und anschließend 1:100 mit unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff aus der anderen Spritze gemischt.

Es wurden jeweils vier Läufe mit der gleichen Harnstoffkonzentration durchgeführt. Der erste Lauf wurde verworfen, da noch nicht von einem korrekten Mischungsverhältnis ausgegangen werden konnte. Die restlichen drei Läufe wurden gefittet und die Mittelwerte der Geschwindigkeitskonstanten für die Auswertung der Dissoziationskinetik verwendet.

Die verwendeten Konzentrationen, die genauen Messbedingungen sowie die Auswertung der Daten sind im Ergebnisteil beschrieben.

Die Denaturierungskinetiken wurden mit einer doppelten Exponentialfunktion ausgewertet:

$$I) \quad y = y_0 + a \cdot e^{-bx} + c \cdot e^{-dx}$$

mit:

y: gemessene Fluoreszenzintensität

y₀: gemessene Endintensität

a, c: Anteil der einzelnen Phasen an der Gesamtintensitätsänderung

b, d: Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Phasen

2.6.4 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus ist die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle, links und rechts-polarisiertes Licht gleicher Wellenlänge unterschiedlich stark zu absorbieren. Die optische Aktivität von Proteinen tritt in Form von asymmetrischen Kohlenstoffatomen und/oder aromatischen Aminosäuren auf. Proteine, die sich aus einer großen Anzahl von optisch aktiven Aminosäuren zusammensetzen und Sekundärstruktur besitzen, die auch zur dichroitischen Absorption beiträgt, weisen Circulardichroismus auf.

In der CD-Spektroskopie unterscheidet man je nach Wellenlängenbereich zwei Regionen.

Die Nah-UV-Region umfaßt den Bereich zwischen 250 nm und 350 nm. In diesem Bereich sind asymmetrisch angeordnete aromatische Aminosäuren für das Signal verantwortlich. Die Umgebung dieser Aminosäuren ist von der Tertiärstruktur des Proteins abhängig. Ein Signal in diesem Bereich dient als „Fingerabdruck“ des Proteins. Denaturierte Proteine weisen in diesem Bereich kein Signal auf, da ihre aromatischen Aminosäuren nicht mehr in asymmetrischer Umgebung vorliegen. Änderungen bei 285 und 275 nm reflektieren Beiträge sowohl von Tryptophanen als auch von Tyrosinen, während im Bereich von 295 nm nur Tryptophane für das Signal verantwortlich sind. Änderungen im Bereich von 259 nm und 264 nm resultieren aus Änderungen der Phenylalanin Umgebung.

In der Fern-UV-Region (170-250 nm; Amidregion) erzeugt die Konformation der Polypeptidkette ein charakteristisches CD-Signal. α -Helices ergeben zwei benachbarte Minima bei 208 nm und 222 nm. β -Faltblattstrukturen zeigen ein weniger deutlich ausgeprägtes Signal mit einem einzigen Minimum bei 218 nm. Das Fern-UV-CD-Signal liefert daher Informationen über die Sekundärstruktur der untersuchten Proteine.

Die Elliptizität Θ (in Grad) wird als quantitatives Maß für die Ausprägung an Struktur verwendet. Die Berechnung der molaren Elliptizität, d.h. der Elliptizität bezogen auf das

durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren, erfolgt nach folgender Formel (Schmid F.X., 1989):

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

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

Genauere Angaben zu Messparametern wie Temperatur, Puffer und Proteinkonzentration befinden sich bei den zugehörigen Abbildungen.

Fern-UV-CD Spektroskopie wurde unter anderem verwendet, um die Temperatur-induzierte Dissoziation und Reassoziaton zu untersuchen. Die gemessenen Kinetiken wurden mit einer einfachen Exponentialfunktion ausgewertet:

Exponentialfunktion erster Ordnung
 $y = y_0 + a \cdot e^{-bx}$ oder $y = y_0 + a (1 - e^{-bx})$

mit:

- y: gemessene Fluoreszenzintensität
- y_0 : gemessene Endintensität
- a: Anteil der einzelnen Phasen an der Gesamtintensitätsänderung
- b: Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Phasen

Durch die graphische Auftragung des natürlichen Logarithmus der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (lnk) gegen den reziproken Wert der Temperatur in Kelvin (1/T) kann, mit Hilfe der aus der Regressionsgeraden ermittelten Steigung a ($y = y_0 + a \cdot x$) die benötigte Aktivierungsenergie (E_A) berechnet werden (Kiefhaber, 2003).

Empirisch wurde von van't Hoff und Arrhenius gefunden, dass die Temperaturabhängigkeit von Geschwindigkeitskonstanten oft durch

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (1)$$

in kleinen Temperaturbereichen beschrieben werden kann, wobei

k:	Geschwindigkeitskonstante
A:	Präexponentieller Faktor (temperaturabhängig)
E_A :	Aktivierungsenergie [kJ/mol]
R:	molare Gaskonstante ($R=8,3143\text{J/mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
T:	Temperatur [K]

Da diese Beziehung in nicht zu großen Temperaturbereichen gilt, wird besser geschrieben:

$$\frac{d \ln k}{d \frac{1}{T}} = -\frac{E_A}{R} \quad (2)$$

Die Steigung a der Regressionsgeraden entspricht dem Quotienten aus

$$\frac{d \ln k}{d \frac{1}{T}}$$

Durch Umformung der Gleichung kann die benötigte Aktivierungsenergie (E_A) berechnet

werden. Es gilt: $\frac{d \ln k}{d \frac{1}{T}} \cdot R = -E_A \quad E_A = -a \cdot R$

Mit Hilfe der Eyring Gleichung (Kiefhaber, 2003)

$$k = \frac{k_b T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}}$$

mit:	k_b :	Boltzmann Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$)
	h :	Planck'sche Konstante ($6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$)

kann durch Auftragung von $\ln(k/T)$ gegen $1/T$ und der daraus ermittelten Steigung der Regressionsgeraden, die Reaktionsenthalpie (ΔH^*) bestimmt werden. Die Steigung der

Regressionsgeraden aus der Auftragung von $T \cdot \ln(k/T)$ gegen die Temperatur [K] führt zur Ermittlung der Reaktionsentropie (ΔS^*). Nach

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^*$$

kann die konformationelle Stabilität des Systems ermittelt werden.

2.7 Sonstige Methoden

2.7.1 Analytische Gelfiltration (HPLC)

Die High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) ist ein Verfahren, bei dem eine flüssige mobile Phase unter hohem Druck (bis zu 250 bar) über eine Säule gepumpt wird. Dabei läßt sich eine sehr gute Auftrennung bei geringen Laufzeiten erreichen, wobei die Trennschärfe von der Laufgeschwindigkeit abhängig ist.

Für diese Arbeit wurde eine temperierbare Tosohaas G3000PW Gelfiltrationssäule mit einem Trennbereich von 0,5-800 kDa und eine Tosohaas G 4000PW mit einem Trennbereich von 10-1500 kDa verwendet. Die Säulen sind in einem Temperaturbereich von 10-80 °C einsetzbar. Für Experimente bei erhöhter Temperatur wurden Säule und Puffer in einem Säulenofen temperiert. Eine Abkühlung des Puffers zwischen Vorratsgefäß und Pumpe wurde vernachlässigt, da die dünnen Schlauchverbindungen zwischen Pumpe und Säule bereits wieder temperiert wurden und einen schnellen Temperatúrausgleich erlauben sollten.

Mit Hilfe der HPLC-Gelfiltration wurde, unter anderem, die Stabilität des Hsp26-Komplexes unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Harnstoff) sowie die Dynamik der Dissoziation und Reassoziaton bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Weiterhin wurde die Komplexbildung der Hsp26-Substrat Komplexe sowie die Stabilität von Hsp26-CS Komplexen gegenüber Harnstoff untersucht.

Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Elution in 0,1 M Hepes-KOH, pH 7,5, 150 mM KCl mit einer Flussrate von 0,75 ml/min. Die Proteindetektion erfolgte mittels Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 323 nm. Die Signalverstärkung wurde je nach Notwendigkeit von gain 10 bis gain 1000 gewählt.

Zur Analyse einzelner Elutionspeaks wurden Fraktionen direkt am Ausgang des Fluoreszenzdetektors gesammelt und gefällt (siehe 2.3.5).

Die genauen Versuchsbedingungen sind den entsprechenden Bildunterschriften zu entnehmen.

2.7.2 Elektronenmikroskopie - Negativkontrastierung

Die Negativkontrastierung mit Schwermetallsalzen erlaubt die Darstellung von Proteinen und Proteinaggregaten mit einer Auflösung von 1,0-1,5 nm. Das entspricht Proteindomänen mit ca. 5-15 Aminosäuren.

Dazu wurden mit amorpher Kohlefolie bedampfte Kupfernetzchen (Grids) verwendet. Diese hydrophoben Objektträger wurden vor dem Aufbringen der wässrigen Probe durch das Beglimmen unter Hochvakuum bei hoher Spannung benetzbar gemacht. Dabei werden Ladungen auf die Kohlefolie gebracht, so dass sie vorübergehend einen hydrophilen Charakter erhält. Dies ermöglicht die Adsorption von partiell geladenen Makromolekülen auf dem Träger.

Anschließend wurde 10 µl Aliquots (ca. 150 µg Protein) der zu untersuchenden Probe auf die Kupfer-Grids aufgebracht und maximal 1 Minute inkubiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde mittels eines Filterpapiers abgezogen, wobei das Präparat nicht eintrocknen durfte und mit einer 1-2 %igen, wässrigen Uranylacetat-Lösung (pH 3,5-4,5) negativ kontrastiert.

Eine gängige Methode zur Kontrasterhöhung biologischer Makromoleküle, adsorbiert auf festen, elektronentransparenten Substraten (z.B. Kohlefolie), ist die Einbettung in Schwermetallsalze. Dabei füllt die Schwermetallsalz-Lösung den nicht vom Objekt eingenommenen Raum aus und erhöht dadurch den Kontrast des Untergrundes gegenüber dem Objekt (Bremer *et al.*, 1992). Das Kontrastmittel dringt dabei zum Teil in die hydrophilen Bereiche des Objektes ein.

Elektronenmikroskopische Bilder wurden bei einer Anodenspannung von 100 kV und einer Vergrößerung von 33 000x oder 66 000x mit einem Philips CM 120 Transmissions-Elektronenmikroskop aufgenommen. Die Aufnahmen wurden entweder auf Negativen, Positiven oder durch digitale Bildverarbeitung dokumentiert.

In dieser Arbeit wurden mittels Negativkontrastierung Hsp26, reassoziertes Hsp26 sowie die Komplexbildung von Hsp26 mit verschiedenen Modell-Substraten untersucht. Dazu wurde jeweils ein Tropfen der Proteinlösung auf die kohlebefilmte Seite des Trägernetzes, die durch Glimmentladung hydrophilisiert wurde, aufgebracht und eine Minute lang inkubiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde mit Filterpapier abgezogen, wobei das Präparat nicht

eintrocknen durfte. Zum Schluss wurde mit einem Tropfen Uranylacetat (1-2%ige wässrige Lösung, pH 3,5-4,5) negativ kontrastiert.

2.7.3 Kalorimetrie-Differential Scanning Calorimetrie

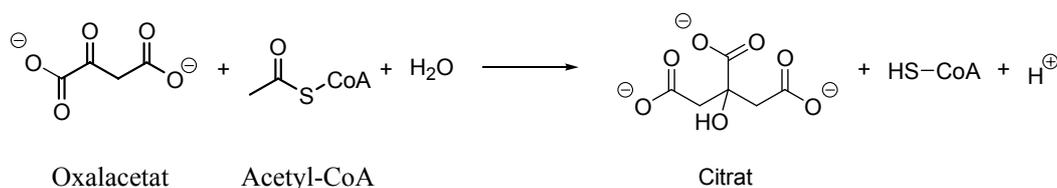
Mit dieser Methode wird die molare Wärmekapazität eines Proteins oder Makromoleküls in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Das Gerät registriert dabei die Leistung, die benötigt wird, um zwei Zellen, gefüllt mit Probe und Referenz, auf dieselbe Temperatur zu erwärmen. Die Leistungsdifferenz wird nach Subtraktion der Pufferbasislinie über die Proteinkonzentration, das Molekulargewicht, das partielle spezifische Volumen des Proteins und das Volumen der Probenzelle (0,5 ml) in die partielle molare Wärmekapazität umgerechnet. Durch entsprechende Berechnungen können aus diesen Daten in der Regel verschiedene Arten an Informationen gewonnen werden. Neben der partiellen Wärmekapazität eines Moleküls können die thermodynamischen Parameter wie Änderung der Enthalpie ΔH , der Entropie ΔS und der Wärmekapazität ΔC_p , verbunden mit dem temperaturinduzierten Übergang, und zuletzt der Population von Intermediatzuständen und deren thermodynamischen Parametern ermittelt werden. Die Messungen wurden in einem VP-DSC der Firma MicroCal durchgeführt. Alle Proben wurden unter Rühren im Exsikkator für ca. eine Stunde entgast. Als Referenz wurde ein Aliquot des Dialysepuffers ebenfalls unter Rühren entgast. Danach wurde mittels UV-Absorptionsmessung die Proteinkonzentration bestimmt. Vor der Messung der Proteinprobe wurden mehrere Pufferbasislinien (Puffer in beiden Zellen) unter den gleichen Bedingungen wie später die Messung aufgenommen, um die Stabilität des DSC zu erhöhen. Zuletzt wurde eine Basislinie mit dem Dialysepuffer gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Hsp26, Hsp26 Δ N, Hsp27 und α B-Kristallin auf 90°C aufgeheizt, abgekühlt und wieder aufgeheizt. Dabei wurden unterschiedliche Aufheizraten, sowie Proteinkonzentrationen eingesetzt. Hsp26 wurde auch mehrfach zwischen 20°C und 55°C untersucht. Alle Übergänge wurden Puffer korrigiert.

2.8 Chaperon-Assays

2.8.1 Der Citratsynthase-Aktivitätstest

Mitochondriale Citratsynthase katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat, Acetyl-CoA und Wasser zu Citrat und Coenzym A (Srere, 1966). An diese Aldolkondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA unter Bildung von Citryl-CoA schließt sich die Hydrolyse von Citryl-CoA zu Citrat und CoA-SH an.



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

Im Aktivitätstest wurde der Einfluß von Hsp26 auf die thermische Inaktivierung und Reaktivierung thermisch inaktivierter Citratsynthase untersucht. Die Citratsynthase (15µM Monomer) wurde 1:100 im Testansatz verdünnt und bei 43°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden 20 µl entnommen und sofort in den Aktivitätstest eingesetzt. Die Inaktivierung bzw. die Reaktivierungsversuche fanden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 statt.

Die Renaturierung erfolgte zu bestimmten Zeitpunkten entweder durch einen Temperaturshift auf 25°C oder 30°C und durch die Zugabe von weiteren Hefe-Chaperonen und Hefezellysate (Endkonzentration im Testansatz ist den Bildunterschriften zu entnehmen).

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

930 µl	TE-Puffer
10 µl	10 mM DTNB (in TE-Puffer, pH 8,0)
10 µl	10 mM Oxalacetat (in 50 mM Tris)
30 µl	5 mM Acetyl-CoA (in 50 mM TE-Puffer, pH 8,0)

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

$$\text{spez. Akt.} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \times \frac{V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot c}$$

- V: Testvolumen [ml]
 ε: molarer Extinktionskoeffizient [= 13600 1/M x cm]
 d: Schichtdicke [cm]
 v: Probenvolumen [ml]
 c: Konzentration des Enzyms [mg/ml]

Zur Interpretation der Werte wurde die Aktivität der nativen Citratsynthase zum Zeitpunkt Null (vor Beginn der Inaktivierung) gleich 100 Prozent gesetzt.

2.8.2 Der α-Glukosidase-Aktivitätstest

Die Enzymaktivität von α-Glukosidase wird durch eine Farbreaktion bestimmt (Kopetzki *et al.*, 1989). α-Glukosidase spaltet das farblose Substrat p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranosid (PNG) und generiert gelbes p-Nitrophenolat, sowie α-D-Glucose. Die Bildung des farbigen p-Nitrophenolations wird durch die Messung der Absorptionzunahme im UV-Spektrophotometer bei 406 nm verfolgt.

α-Glukosidase ist ein cytosolisches Enzym und liegt nativ als Monomer mit einem Molekulargewicht von 68 500 Da vor. Es ist eine Exoglykosidase und spaltet in Hefe Polysaccharide und kleinere Oligosaccharide wie Maltose in seine Glucose Bausteine. α-Glukosidase kann als Substrat für Chaperon Assays benutzt werden da es unter Hitzeschockbedingungen sehr schnell denaturiert und aggregiert (Höll-Neugebauer *et al.*, 1991).

Im Aktivitätstest wurde der Einfluss von Hsp26 auf die thermische Inaktivierung der α-Glucosidase untersucht. Die α-Glucosidase (15 μM Stammlösung in 10 mM Natriumphosphat, pH 6,8) wurde im Testansatz 1: 50 verdünnt und bei 46°C oder wie im Text und den Abbildungsunterschriften beschrieben, inkubiert. Zur Inaktivierung bzw. Reaktivierung wurden verschiedene Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen beigegeben (siehe Text und Abbildungsunterschriften). Zu definierten Zeitpunkten wurden 30 μl Aliquots

entnommen und in den Aktivitätstest eingesetzt. Die Inaktivierung bzw. die Reaktivierungsversuche fanden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 statt.

Für den Aktivitätstest werden 970 μ l Substratpuffer (2 mM PNG in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,8) in Halbmikroplastikküvetten vorgelegt und auf 25°C temperiert. Nach Zugabe von 30 μ l Enzymlösung und gründlicher Mischung wird die Absorptionzunahme 1 min lang bei 406 nm gemessen. Aus der Steigung der linearen Absorptionzunahme $dA_{406\text{ nm}}/dt$ wird die Enzymaktivität berechnet.

2.8.3 Thermische Aggregation von Citratsynthase

Citratsynthase aus Schweineherz ist ein Enzym der mitochondrialen Matrix und liegt nativ als Homodimer mit einer monomeren molekularen Masse von 43,5 kDa vor. Die Inkubation nativer CS bei erhöhter Temperatur (43°C) in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 führt bereits nach kurzer Zeit zur quantitativen Proteinaggregation (Buchner *et al.*, 1998b).

Die Zunahme der Aggregation wird durch Messung der Lichtstreuung verfolgt (siehe 2.6.1 und 2.6.2). Der Entfaltungsprozess wurde durch die Messung der apparenten Absorption bei 360 nm in 100 μ l UV-Küvetten (temperierbarer Küvettenhalter) und einer Schichtdicke von 1 cm verfolgt. Ein Temperaturfühler in einer Referenzküvette diente zur Temperaturkontrolle.

Die Aggregation von 150 nM CS (Monomer) wurde in Gegenwart steigender Konzentrationen an Hsp26 untersucht. Gleichzeitig wurde in einer Referenzküvette die Kontrolle mit dem entsprechenden Puffer der variablen Komponente durchgeführt.

2.8.4 Thermische Aggregation von α -Glukosidase

Aggregationsmessungen wurden bei 46°C in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 durchgeführt. α -Glukosidase wurde zu einer Endkonzentration von 0,25 μ M in eine 5 min bei 46°C vortemperierte Küvette zupipettiert. Die Lichtstreuung wurde bei 360 nm in einem FluoroMax Stektrofluorometer mit temperierbarem Küvettenhalter gemessen. Der Einfluss steigender Mengen an Hsp26 auf die Aggregation von α -Glukosidase wurde untersucht.

2.8.5 Thermische Aggregation von Rhodanase

Monomere Rhodanase (33 kDa) besteht aus zwei strukturellen Domänen, die bei Temperaturerhöhung (44°C) hydrophobe Oberflächen exponieren und aggregieren (Mendoza *et al.*, 1992; Bhattacharyya & Horowitz, 2001). In dieser Arbeit wurde der Einfluss steigender Mengen Hsp26 auf die Unterdrückung der Aggregation von 0,3 µM Rhodanase in 40 mM NaP, pH 7,7 untersucht. Die Lichtstreuung wurde bei 360 nm in einem FluoroMax Stektrofluorometer mit temperierbarem Küvettenhalter gemessen.

2.8.6 Chemisch induzierte Aggregation von Insulin

Einige Proteine z.B. Insulin können durch die Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücken entfaltet werden. Insulin ist ein Polypeptidhormon und besteht im prozessierten Zustand aus einer A-Kette (21 Aminosäuren) und einer B-Kette (30 Aminosäuren), die über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die A-Kette besitzt noch eine intramolekulare Disulfidbrücke. Das C-Peptid wird bei der Prozessierung abgespalten. Durch Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT, aggregiert und präzipitiert die B-Kette von Insulin, während die A-Kette in Lösung bleibt (Sanger, 1949; Farahbakhsh *et al.*, 1995). Dieser Entfaltungsprozeß kann durch die Messung der apparenten Absorption aufgrund der zunehmenden Lichtstreuung, verfolgt werden.

Hier wurde die Absorptionzunahme bei 360 nm in einem Photometer, mit temperierbarem Küvettenhalter, gemessen.

Der Einfluss steigender Hsp26 Konzentrationen auf die Aggregation von Insulin (45 µM) wurde bei unterschiedlichen Temperaturen verfolgt. Der Aggregations Assay wurde in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 durchgeführt. Um Puffereffekte auszuschließen, wurde zu jedem Ansatz eine entsprechende Spontankontrolle, mit der jeweiligen Menge an Dialyse-Puffer oder dem Puffer des entsprechenden variablen Faktors, aufgenommen. Die Experimente wurden in 100 µl UV-Küvetten, mit einer Schichtdicke von 1 cm, durchgeführt. Die Ansätze wurden in den Küvetten zusammenpipettiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von DTT (20 mM Endkonzentration) gestartet.

3 Ergebnisse

3.1 Strukturelle Charakterisierung von Hsp26

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass gereinigtes Hsp26 (siehe 2.3.2) aus *Saccharomyces cerevisiae* unter physiologischen Bedingungen als hocholigomerer Komplex von 550 kDa vorliegt (Walke, 1996; Stromer, 1998). Mit einer monomeren molekularen Masse von 23 748 Da (Bossier *et al.*, 1989; Susek & Lindquist, 1989) entspricht das beobachtete Oligomer einem Komplex aus 24 Untereinheiten.

In Temperaturbereichen, die physiologisch relevant für die Funktion von Hsp26 sind, treten Änderungen der Quartärstruktur auf (Walke, 1996; Stromer, 1998). Hsp26 dissoziiert unter Hitzeschockbedingungen in eine aktive, dimere Spezies (Haslbeck *et al.*, 1999).

Um mehr Einblick in die Strukturänderungen zu bekommen, wurde der Einfluss von Harnstoff auf die Dissoziation / Entfaltung von Hsp26, vor allem in Bezug auf die Änderung der Geschwindigkeitskonstanten, untersucht. Die Untersuchung der chemisch induzierten Entfaltung und der Rückfaltung nach Harnstoff Denaturierung sollten Aussagen über die Stabilität des Proteins ermöglichen.

3.1.1 Einfluss chaotroper Agenzien auf die Stabilität von Hsp26

Walke (1996) zeigte, dass unter dem Einfluss von Harnstoff Hsp26 in einer monophasischen Reaktion mit einem Übergangsmittelpunkt von 400 mM Harnstoff denaturiert. Dabei weist natives Hsp26 ein typisches Tryptophanspektrum mit einem Emissionsmaximum bei 327 nm auf, während denaturiertes Hsp26 eine Verschiebung des Emissionsmaximums nach 353 nm verursacht. Zusätzlich ist ein lokales Tyr-Maximum bei 303 nm detektierbar. Um Aussagen über Faltungs- bzw. Assoziationsintermediate zu treffen, wurden kinetische Untersuchungen der Denaturierung und Renaturierung durchgeführt. Dazu wurde der Einfluss unterschiedlicher Harnstoffkonzentrationen auf die Entfaltungskinetik von 0,3 mg/ml und 0,05 mg/ml Hsp26 untersucht. Die zeitlich aufgelösten Fluoreszenzmessungen der Entfaltung waren für manuelle Mischtechniken zu schnell. Vor allem bei hohen Harnstoffkonzentrationen traten Mischartefakte auf, deshalb wurden die Entfaltungskinetiken mittels „stopped flow“ gemessen. Die Denaturierungskinetiken und Renaturierungskinetiken

wurden mit einer Exponentialfunktion 2. Ordnung ausgewertet (Abbildung 3.1; siehe Material und Methoden).

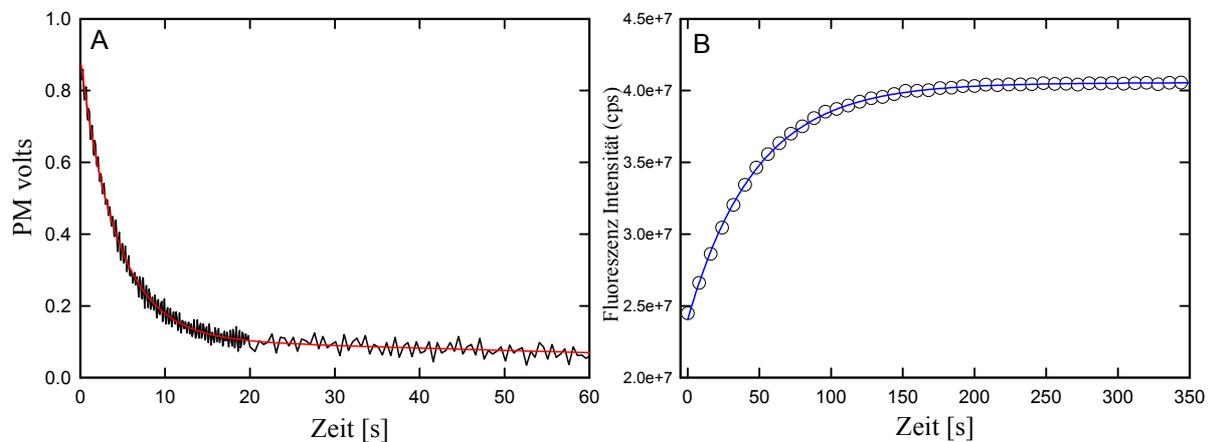


Abbildung 3.1 Exemplarische Beispiele von De- und Renaturierungskinetiken. Fluoreszenzmessung von 50 $\mu\text{g/ml}$ Hsp26 bei 25°C in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 + Harnstoff. Anregung bei 280 nm, Emission bei 315 nm. **A:** Denaturierung im *stopped flow* in 1,0 M Harnstoff (—). Die Kinetiken wurden mit einer doppelten Exponentialfunktion (—) ausgewertet. **B:** Renaturierung im Spektrofluorimeter in 0,1 M Harnstoff (○). Spaltbreite, je 5 nm. Die Kinetiken wurden mit einer doppelten Exponentialfunktion (—) ausgewertet.

Bei Dissoziation handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung, da Dissoziation und Denaturierung normalerweise nicht konzentrationsabhängig sind. Die zweite beobachtete Geschwindigkeitskonstante blieb, unabhängig von der Harnstoffkonzentration relativ konstant (Daten nicht gezeigt) und konnte auf das Auftreten von *Photobleaching* zurückgeführt werden.

Assoziation ist eine Reaktion zweiter Ordnung. Das heißt unterschiedliche Proteinkonzentrationen wirken sich auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus, falls die Assoziation einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Faltung darstellt.

Die Auftragung des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen die Harnstoffkonzentration zeigt eine sehr schnelle Dissoziation und Entfaltung von Hsp26 (Abbildung 3.2 A). Bei Harnstoffkonzentrationen größer als 1 M ist ein Abknicken der schnellen Entfaltungsphase zu beobachten. Dies deutet auf eine Änderung des Entfaltungsweges und auf das Auftreten von Intermediaten hin (Schonbrunner *et al.*, 1997; Wildegger & Kiefhaber, 1997). Bei einer Harnstoffkonzentration von 0,6 M stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem sich ein Großteil des Proteins wohl im denaturierten Zustand befindet. Dieser Übergangsmittelpunkt ist im Vergleich zu dem von S. Walke gemessenen Daten um 0,2 M verschoben.

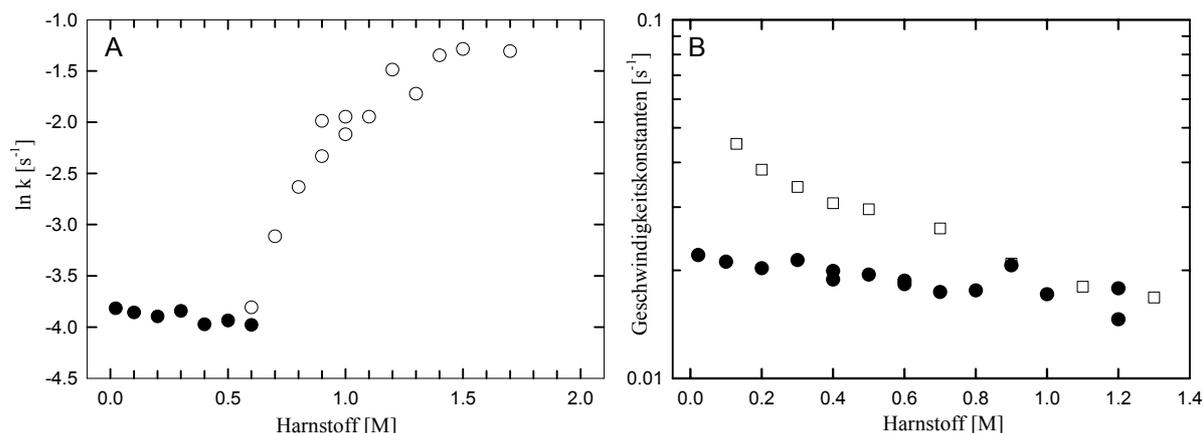


Abbildung 3.2 Kinetische Untersuchung von De- und Renaturierung. A: Chevron Plot: Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Fluoreszenzmessung von 50 µg/ml Hsp26 bei 25°C in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 + Harnstoff. Anregung bei 280 nm, Emission bei 315 nm. Denaturierung im *stopped flow* (○) und Renaturierung im Spektrofluorimeter (●) gemessen. B: Konzentrationsabhängigkeit der Renaturierung. 300 µg/ml Hsp26 (□) und 50 µg/ml (●).

Für die Renaturierung wurde Hsp26 jeweils für 2 h in 4 M Harnstoff denaturiert und anschließend bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen renaturiert. Bei den Renaturierungskinetiken wurde nur ein Teil der Gesamtamplitude erfasst, da es in den ersten Millisekunden, der so genannten *burst phase*, nach der Verdünnung in den Renaturierungsansatz bereits zu einem hydrophoben Kollaps und zur Bildung von Intermediaten wie den *molten globules* kommt (Jaenicke, 1991), die aufgrund der Mischzeit nicht oder nur mit sehr aufwendigen Techniken detektiert werden können.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierung sind von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängig (Abbildung 3.2 B). Dies deutet darauf hin, dass die Assoziation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Renaturierung darstellt.

Um die Dauer der Reassoziations zu bestimmen, wurde Hsp26 in 6 M Harnstoff denaturiert und eine Kinetik der Reassoziations von 0,05 mg/ml Hsp26 mittels Gelfiltration verfolgt (nicht gezeigt). Die Reassoziations nach Entfaltung in 6 M Harnstoff ist ein langsamer Prozess. Erst nach 15 min Inkubation bei 25°C ist der oligomere Peak detektierbar. Nach 9 h sind bereits 50 % des ursprünglichen Signals nachweisbar.

Nachdem festgestellt wurde, dass die Dissoziation ein schneller Prozess ist, der bereits in Gegenwart geringer Harnstoffkonzentrationen erfolgt, die Reassoziations hingegen sehr lange dauert, wurde die Stabilität gegenüber Harnstoff mittels Gleichgewichtsübergängen untersucht.

Für die Entfaltung wurden verschiedene Hsp26-Konzentrationen in steigenden Konzentrationen (0 – 6 M) Denaturierungsmittel verdünnt und für 22 h bei 25°C inkubiert. Die Renaturierung erfolgte durch Verdünnung der denaturierten Probe in unterschiedlich konzentrierte Renaturierungsansätze. Nach 88stündiger Inkubation bei 25°C wurden Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur mittels Fern-UV-CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie verfolgt. Der Oligomerisierungsgrad wurde mittels Gelfiltration untersucht.

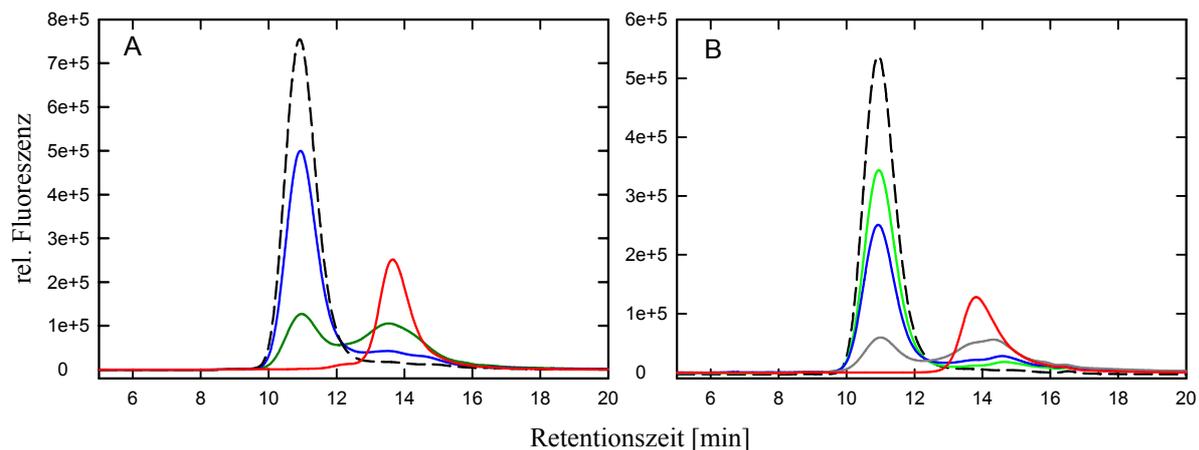


Abbildung 3.3 Dissoziation und Reassoziierung in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration.

Auswahl an Elutionsprofilen. **A:** Dissoziation (22 h) von Hsp26 (0,3 mg/ml) in Gegenwart von 0 M (---), 0,2 M (—), 0,4 M (—) und 1 M (—) Harnstoff. **B:** Reassoziierung (88 h) von 0,3 mg/ml Hsp26 erfolgte in 0 M (---), 0,13 M (—), 0,2 M (—), 0,5 M (—) und 1 M (—) Harnstoff, nach Dissoziation in 4 M Harnstoff. Die Proben (100 µl) wurden auf eine mit der jeweiligen Harnstoffkonzentration äquilibrierten Gelfiltrationssäule, TSK4000PW aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,75 ml/min und die Detektion des Proteins erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm, einer Emissionswellenlänge von 323 nm und gain 100.

Aus Abbildung 3.3 A geht hervor, dass die vollständige Dissoziation der Hsp26-Oligomere bereits bei einer Konzentration von 0,4 M Harnstoff erfolgte, während die Tertiärstruktur langsam über einen Denaturierungsmittelbereich von 0 bis 2 M Harnstoff verloren geht (Abbildung 3.4 A). Hsp26 denaturiert in einer monophasischen Reaktion mit einem Übergangsmittelpunkt bei ca. 0,8 M Harnstoff.

Die Sekundärstruktur des Proteins erweist sich als relativ stabil, obwohl von Anfang an eine Signalabnahme zu beobachten ist (Abbildung 3.4 B). Im Bereich von 1,5 M bis 3,5 M Harnstoff erfolgt jedoch eine deutliche Änderung des Entfaltungsübergangs (vgl. Abbildung 3.5 A und B).

In Rückfaltungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Denaturierung von Hsp26 in Harnstoff ein reversibler Prozess ist, der zu nativ assembliertem und aktivem Protein führte. Das ursprüngliche Signal konnte weder bei Messung der Fluoreszenz noch bei der Messung des CD-Signals vollständig zurückgewonnen werden (Abbildung 3.4). Vermutlich resultiert

der Signalverlust aus der Adsorption des Proteins an der Küvettenwand. Ein Signalverlust durch Aggregation müsste bei der höheren Konzentration (0,3 mg/ml) zu höheren Signalverlusten führen, da Aggregation ein konzentrationsabhängiger Prozess ist.

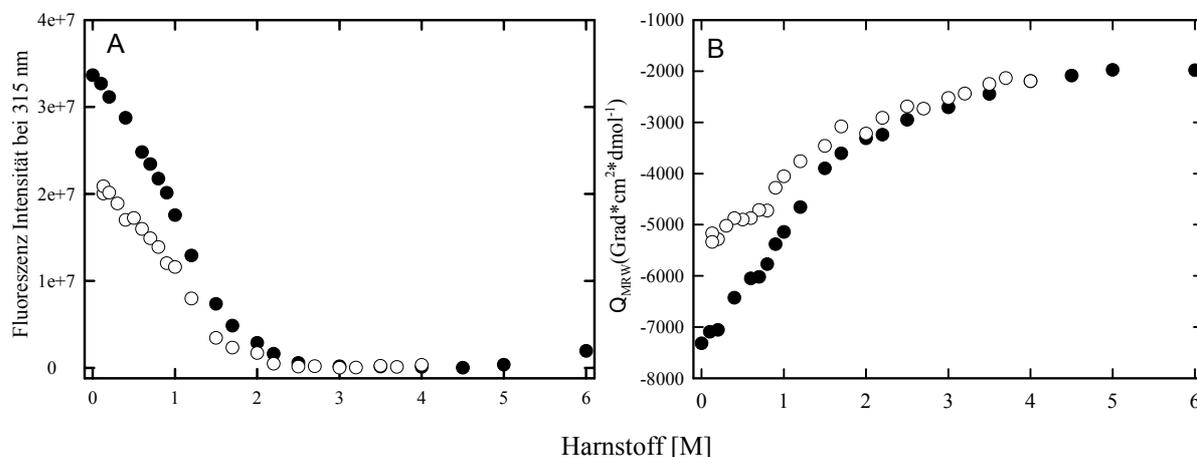


Abbildung 3.4 Entfaltung und Rückfaltung von Hsp26 in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Hsp26 (0,3 mg/ml) wurde in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 und steigenden Harnstoffkonzentrationen (von 0 bis 6 M) für 22 h bei 25°C inkubiert. Denaturierung (●), Renaturierung (○). **A:** Änderung des Fluoreszenzverhaltens bei 315 nm **B:** Fern-UV-CD Übergang (Änderung der Elliptizität des Mittelwerts von 220-225 nm verfolgt). Die Dissoziation erfolgte für 22 h bei 25°C, die Reassoziierung (nach Dissoziation für 9 h in 4 M Harnstoff) erfolgte für 88 h bei 25°C. Ansatzgröße: 350 µl.

Die Entfaltung von Hsp26 erfolgt über mehrere Schritte (Abbildung 3.5 A und B). Der erste Schritt, die Dissoziation des Oligomers in Dimere ist ein konzentrationsunabhängiger Prozess. Anschließend kommt es zu weiteren strukturellen Änderungen. Der Entfaltungsübergang ist von der Komplexdissoziation unabhängig. Bei 0,5 M Harnstoff sind nur noch Dimere vorhanden (siehe Abbildung 3.3 A), die Signale für die Tertiär- und Sekundärstruktur ändern sich dabei nur um 15% (Abbildung 3.5 A).

Der vollständige Verlust der Struktur verläuft biphasisch. Bis etwa 1,2 M Harnstoff verlaufen die Änderung der Fluoreszenz und der Elliptizität mit einer ähnlichen Kinetik. Ab 1,2 M Harnstoff nimmt das Fern-UV-CD Signal langsamer ab als das Fluoreszenzsignal. Diese unterschiedliche Signaländerung ist auch bei der Rückfaltung zu beobachten (Abbildung 3.5 C, D). In diesem Harnstoffbereich scheint ein langsamer Entfaltungs bzw. Faltungsschritt des Proteins zu erfolgen.

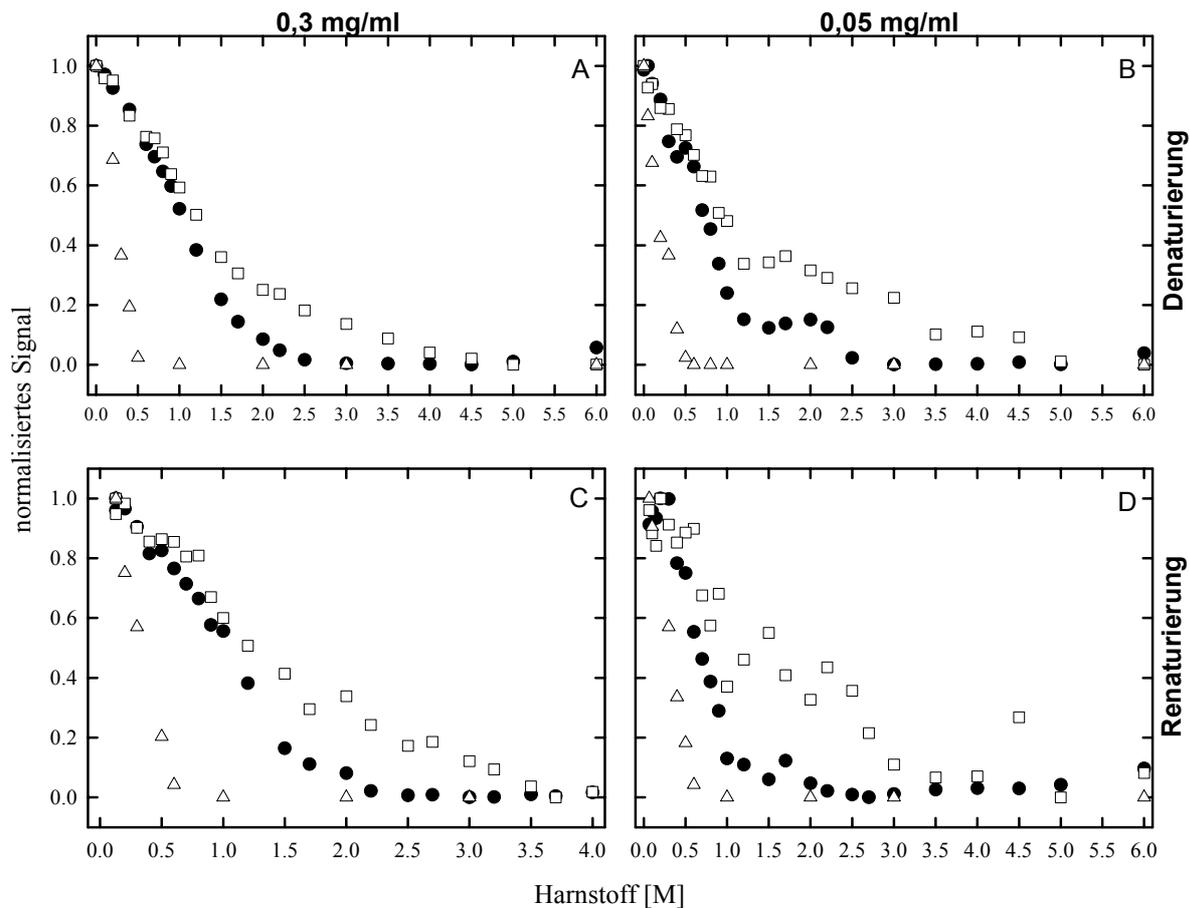


Abbildung 3.5 Denaturierung (A, B) und Renaturierung (C, D) von Hsp26 in Gegenwart steigender Harnstoffkonzentrationen. Die Übergänge von 0,3 mg/ml Hsp26 (A, C) und 0,05 mg/ml Hsp26 (B, D) wurden normiert, um miteinander vergleichbar zu sein. Der Einfluss von Harnstoff wurde mittels Fluoreszenz (●), Fern-UV-CD (□) und Gelfiltration (Δ) untersucht. Die Denaturierung erfolgte durch Inkubation von Hsp26 für 22 h bei 25°C in 40 mM HEPES-KOH, pH 7,5 mit steigenden Harnstoffkonzentrationen. Die Renaturierung erfolgte durch Verdünnung der denaturierten Hsp26 Probe (bei 0,05 mg/ml: Denaturierung für 4 h in 6 M Harnstoff; bei 0,3 mg/ml: Denaturierung für 9 h in 4 M Harnstoff) in unterschiedlich konzentrierte Renaturierungspuffer. Inkubation für 88 h bei 25°C. Versuchsdurchführung siehe Material und Methoden.

Eine Konzentrationsabhängigkeit der Reassoziations konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden. Sowohl mit 0,3 mg/ml als auch mit 0,05 mg/ml Hsp26 wurden nach 88 h Renaturierung in 0,5 M Harnstoff ca. 12% Oligomer detektiert, in 0,2 M Harnstoff schon ca. 45% (nicht gezeigt).

Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte auch für die Sekundärstrukturänderung nicht beobachtet werden. Lediglich das Fluoreszenzsignal ist von der Hsp26 Konzentration abhängig (Abbildung 3.6 A). Die Änderung des Fluoreszenz-Signals beruht ab einer Konzentration von 0,6 M Harnstoff auf einem konzentrationsabhängigen Prozess, der unabhängig von der Dissoziation und Assoziation des Oligomers ist. Möglicherweise erfolgt

in diesem Bereich die Dissoziation des Dimers in Monomere. Ein Unterschied im Verlauf der Denaturierung und Renaturierung ist jedoch nicht zu beobachten (Abbildung 3.6 B).

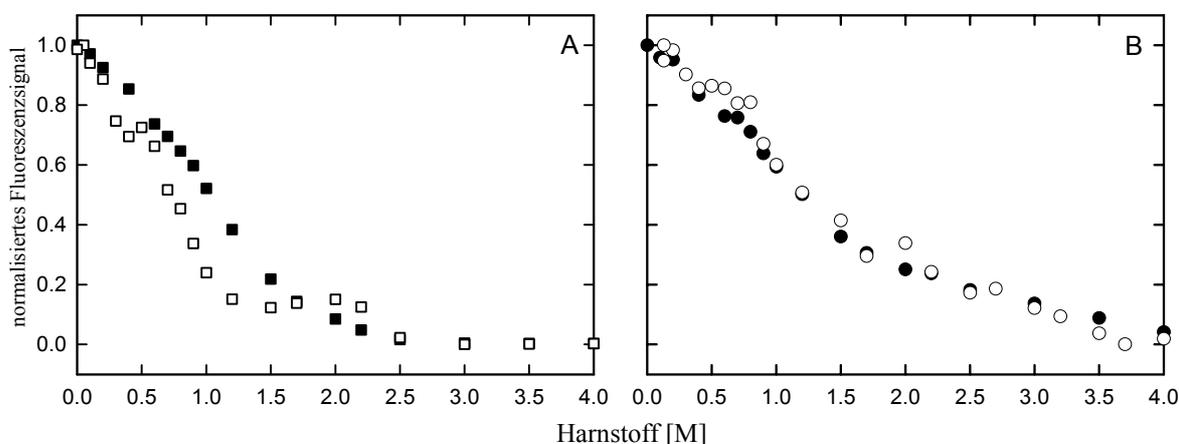


Abbildung 3.6 Vergleich der Harnstoff-Fluoreszenz-Übergänge. A: Konzentrationsabhängigkeit des Fluoreszenz-Übergangs: 0,3 mg/ml (■) und 0,05 mg/ml (□) Hsp26 B: Vergleich der Denaturierungs und Renaturierungsübergänge von 0,3 mg/ml Hsp26. Denaturierung (●), Renaturierung (○)

Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierungskinetiken bestätigen eine Konzentrationsabhängigkeit der Änderung des Fluoreszenzverhaltens (vgl. Abbildung 3.2 B). In Tabelle 3.1 sind die mit unterschiedlichen Methoden ermittelten Renaturierungsausbeuten zusammengefasst.

Tabelle 3.1 Signalausbeute nach 88 h Renaturierung

Methode	300 µg/ml Hsp26	50 µg/ml Hsp26
CD	70%	59%
Fluoreszenz	62%	42%
SEC	46%	41%

Mit Hilfe von harnstoffinduzierten Dissoziationskinetiken kann der Zerfall von Hsp26 in Dimere nur im Bereich von 0 bis 0,5 M Harnstoff untersucht werden. Die Dissoziation führt kaum zu Änderungen des Fluoreszenzsignals, d.h., dass an den Kontaktflächen keine Tryptophane beteiligt sind. Im Bereich von 0,6 M bis 1,5 M Harnstoff erfolgt unter anderem die Dissoziation des Dimers in Monomere (da konzentrationsabhängig). Eine reine Aufspaltung des Dimers in Monomere sollte in einem engeren Bereich erfolgen, d.h. weitere Vorgänge müssen in diesem Bereich stattfinden. Im Bereich von 1,5 M Harnstoff bis 3,5 M Harnstoff kommt es zur vollständigen Entfaltung des Proteins.

3.1.2 Stabilität von Hsp26 gegenüber pH-Änderungen

Um die pH-Abhängigkeit der Stabilität von Hsp26 zu bestimmen, wurde Hsp26 in Puffer verschiedener pH Werte für 20 h bei 20°C inkubiert. Fluoreszenzspektroskopie wurde verwendet, um Strukturänderungen in Abhängigkeit vom pH im Bereich von pH 1 bis pH 11 zu ermitteln.

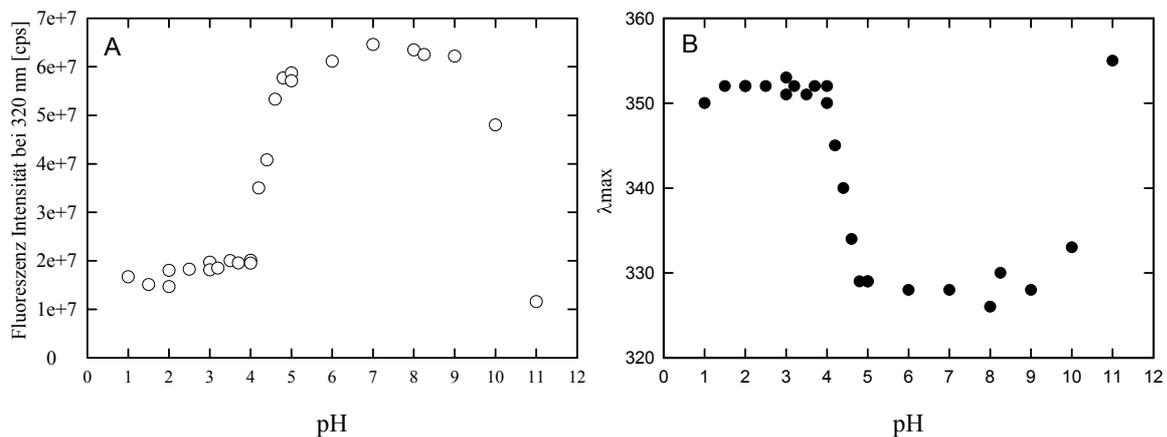


Abbildung 3.7 pH- Übergang von Hsp26. Hsp26 (25 µg/ml) wurde für 20 h bei 20°C in unterschiedlichen Puffern inkubiert und die Änderung der Fluoreszenz verfolgt. **A:** Änderung des Fluoreszenzsignals bei 320 nm in Abhängigkeit vom pH-Wert. **B:** Änderung der maximalen Wellenlänge in Abhängigkeit vom pH-Wert. Spaltbreite: Anregung 5nm und Emission 7,5 nm. Spektren sind Puffer korrigiert.

Um unterschiedliche stabilisierende und destabilisierende Wirkungen einzelner Pufferkomponenten ausschließen zu können, wurde ein Puffersystem nach Theorell und Stenhagen verwendet, das die Pufferung in einem breiten Bereich von pH 2 bis pH 12 erlaubt (Rauscher *et al.*, 1982). Die Puffer wurden auf die gleiche Ionenstärke hin korrigiert. Im Bereich des Pufferwechsels wurden die Fluoreszenzspektren überlappend gemessen, um durch verschiedene Puffer verursachte Signalschwankungen auszuschließen.

Der Übergang zeichnet sich durch eine hohe Kooperativität zwischen pH 4 und pH 5 aus (Abbildung 3.7 A). Im Bereich von pH 5 bis pH 9 liegt Hsp26 im nativen Zustand vor. In pH Bereichen kleiner pH 4 und größer pH 9 kommt es zur Entfaltung des Proteins. Die Fluoreszenzintensität bei 326 nm nahm stark ab und das Intensitätsmaximum verschob sich auf 353 nm (Abbildung 3.7 B).

3.2 Charakterisierung thermisch induzierter Strukturänderungen

3.2.1 Stabilität von Hsp26 gegenüber thermischer Einflüsse

Erhöhte Temperaturen führen zu Änderungen der Quartärstruktur von Hsp26 (Walke, 1996; Stromer, 1998). Während Hsp26 bei 25°C als einzelner scharfer Peak in der analytischen Gelfiltration eluiert, führt die Inkubation bei 43°C zum Verschwinden des oligomeren Komplexes und zur Bildung einer neuen, kleineren Spezies (Abbildung 3.8).

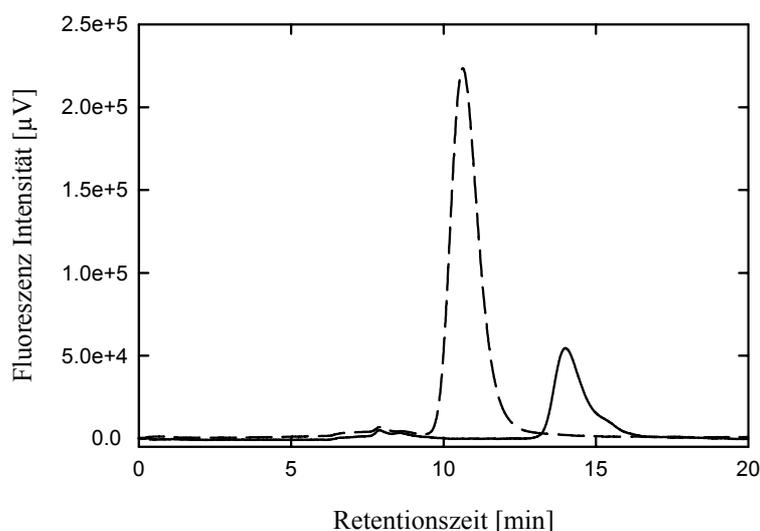


Abbildung 3.8 Änderung der Quartärstruktur von Hsp26 in Abhängigkeit von der Temperatur. 0,05 mg/ml Hsp26 wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 für 15 min bei 25°C (---) oder bei 43°C (-) inkubiert und auf die jeweils bei der Inkubationstemperatur temperierte TSK4000PW-Säule aufgetragen. Flussrate: 0,75 ml/min, gain 100, Anregung: 280 nm, Emmission: 323 nm.

Der Vergleich mit Eichproteinen zeigte, dass die kleine Spezies ein Dimer ist (Stromer, 1998). Dieses Ergebnis wurde durch blaue Nativ-Gelelektrophorese bestätigt (Haslbeck *et al.*, 1999).

Untersuchung der Sekundärstruktur von Hsp26 durch Circular dichroismus (CD).

CD-Spektren im Fern-UV-Bereich (170-250 nm) geben Auskunft über die Sekundärstruktur von Proteinen (Schmid, 1989). In Abbildung 3.9 B sind Fern-UV-CD-Spektren von Hsp26 bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Wie bereits beschrieben (Walke, 1996), zeigt Hsp26 bei 20°C ein für sHsps charakteristisches Spektrum, mit einem Minimum bei 216 nm und niedriger Signalintensität. Dies spricht für einen hohen β -Faltblattanteil. α -Helices erzeugen Doppelminima bei 208 und 220 nm (Schmid, 1989). Die dominante β -Struktur von

sHsps wurde bereits für mehrere Mitglieder dieser Familie beschrieben (Merck *et al.*, 1993; Dudich *et al.*, 1995). Der Wert der Elliptizität von etwa $-8000 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, liegt für eine reine β -Struktur jedoch zu tief (siehe Abbildung 3.9 A). Für andere sHsps wurden Werte im Bereich von -4000 und $-6000 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ermittelt (Caspers *et al.*, 1995; De Jong *et al.*, 1998).

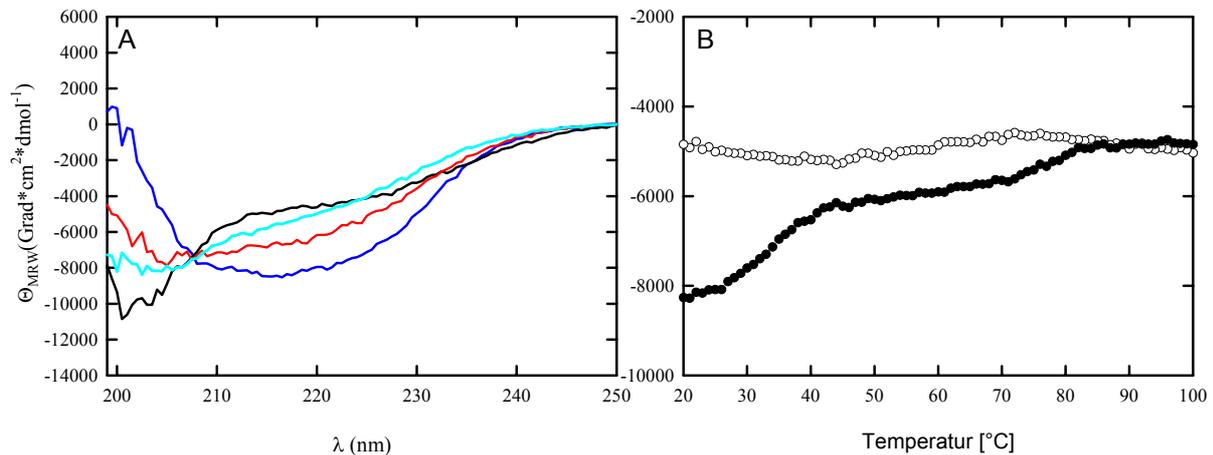


Abbildung 3.9 Einfluss der Temperatur auf die Sekundärstruktur von Hsp26. A: Auswahl an Fern-UV-CD-Spektren von Hsp26 bei 20°C (blau), 43°C (rot), 100°C (türkis), sowie am Ende des Abkühlvorgangs bei 20°C (schwarz). Spektren wurden jeweils 10x akkumuliert und gegen Puffer korrigiert. Messbereich: 250-198 nm. B: Thermischer Fern-UV-CD-Übergang. 300 $\mu\text{g/ml}$ Hsp26 in 10 mM NaP, pH 7,5; Heizrate 30°C/h; 0,1 cm Quarzküvette; Elliptizität wurde bei 220 nm aufgezeichnet, (●) Aufheizvorgang, (○) Abkühlvorgang.

Geringe α -helikale Anteile können zu einer deutlich höheren negativen Elliptizität führen. RNase A besitzt nur 15 % α -Helices und weist dennoch ein Minimum kleiner als $-11000 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ auf (Schmid, 1989). Sekundärstrukturvorhersagen für Hsp26 ergaben mehrere kurze, α -helikale Abschnitte in der N-terminalen Domäne (nicht gezeigt), die für eine Verringerung der Elliptizität verantwortlich sein könnten.

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität von Hsp26 wurde die Änderung der Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt (Abbildung 3.9 B). Der Temperaturübergang zeigt eine deutliche Abnahme der Elliptizität in Abhängigkeit von der Temperatur. Zwei charakteristische Bereiche sind dabei auffällig. Der erste Übergang, mit einem Mittelpunkt bei 35°C und ein zweiter Übergang, mit einem Mittelpunkt bei 77°C. Zwischen 50°C und 70°C ist ein schwacher Signalanstieg zu beobachten. Die Fern-UV-CD Spektren deuten allerdings auf keine signifikanten Änderungen hin (nicht gezeigt). Spektren bei Temperaturen $>80^\circ\text{C}$ zeigten einen hohen Strukturverlust. Das Protein ist bei 100°C nicht

komplett entfaltet. Reststruktur ist noch vorhanden (Abbildung 3.9 A). Der Übergang ist jedoch nicht reversibel.

Zur weiteren Analyse der Stabilität von Hsp26 gegenüber Temperaturerhöhung wurden kalorimetrische Messungen durchgeführt. Dabei wurde Hsp26 zuerst auf 90°C aufgeheizt, danach abgekühlt und ein zweites Mal auf 90°C aufgeheizt. Abbildung 3.10 zeigt den ersten Aufheizvorgang. Vier Übergangsmittelpunkte bei 37°C, 47°C, 62°C und 72,5°C sind detektierbar. Der erste und letzte Übergang stimmt mit den beiden Fern-UV-CD Übergängen (vgl. Abbildung 3.9) überein. Lediglich ein geringer Anteil der Umwandlung bei 73°C war reversibel (Abbildung 3.10).

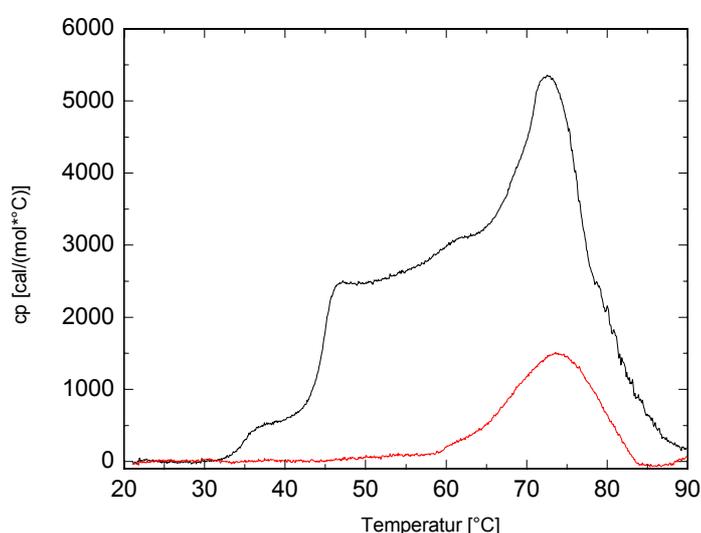


Abbildung 3.10 Kalorimetrische Untersuchung zur Stabilität von Hsp26 gegenüber Temperaturerhöhung. Hsp26 (7 mg/ml) wurde in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 mit einer Heizrate von 15°C pro Stunde aufgeheizt (—), abgekühlt und wieder aufgeheizt (—). Der Übergang ist Puffer korrigiert.

Eine Überprüfung der Aktivität des Proteins nach dem DSC-Übergang zeigte, dass Hsp26 nicht als Chaperon aktiv ist. Beim Aufheizen über 72°C treten irreversible strukturelle Änderungen auf, die mit dem Verlust der Aktivität einhergehen.

Eine Berechnung der thermodynamischen Parameter der einzelnen Übergänge ist nur bei reversiblen Prozessen möglich. Die komplette Umwandlung von Hsp26 konnte jedoch integriert werden und die berechneten Energien werden als Anhaltspunkte für die Stabilität des Proteins gesehen. Für die Entfaltung des Proteins wurde eine Enthalpie von 130 kcal/mol berechnet. Wird über die erste Umwandlung eine halbe Gauß' Kurve gelegt, so wurde für die Dissoziation des Oligomers in Dimere eine Enthalpie von 4 kcal/mol berechnet. Die

Integration der Umwandlung des zweiten Aufheizvorgangs bei 73°C lieferte eine Änderung der freien Enthalpie von 20 kcal/mol.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten deutlich, dass über einer Temperatur von 70°C irreversible Veränderungen im Protein stattgefunden haben. Es stellte sich die Frage, ob die durch Temperaturerhöhung induzierten konformationellen Änderungen bei Hsp26 reversibel sind, wenn lediglich bis 50°C aufgeheizt wird. DSC Daten zeigten, dass die Übergänge reversibel sind und mehrfaches Aufheizen und Abkühlen möglich ist (nicht gezeigt). Eine Auswertung dieser Übergänge zur Berechnung thermodynamischer Parameter war unmöglich, da keine Basislinie in den Übergang hineingelegt werden konnte.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Dissoziation von Hsp26 ein kinetisch kontrollierter Prozess ist, da die Übergänge Abhängigkeiten von der Heizrate aufweisen (nicht gezeigt).

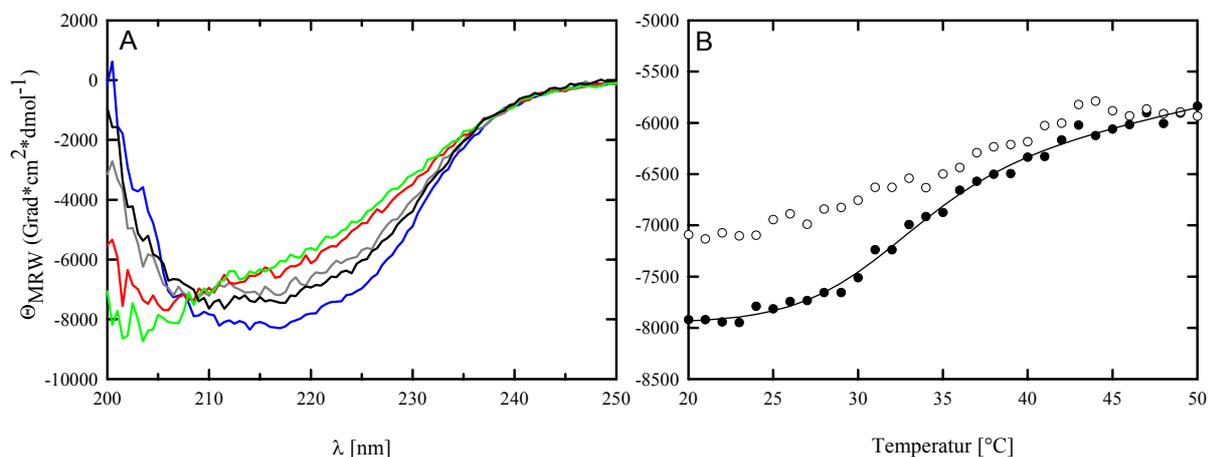


Abbildung 3.11 Reversibilität der Sekundärstrukturänderung in Abhängigkeit von der Temperatur. **A:** Auswahl an Fern-UV-CD-Spektren von Hsp26 bei 20°C (blau), 35°C (grau), 43°C (rot), 50°C (grau), sowie am Ende des Abkühlvorgangs bei 20°C (schwarz). Spektren wurden jeweils 5x akkumuliert und gegen Puffer korrigiert. Messbereich: 250 – 198 nm. **B:** Thermischer Fern-UV-CD Übergang von 20 bis 50°C. 300 µg/ml Hsp26 in 10 mM NaP, pH 7,5; Heizrate 30°C/h; 0,1 cm Quarzküvette; Elliptizität wurde bei 220 nm aufgezeichnet, (●) Aufheizvorgang, (○) Abkühlvorgang.

Die Änderung der Sekundärstruktur im Bereich von 20-55°C mittels Fern-UV-CD Spektroskopie bestätigte die DSC-Daten. Der Übergang ist reversibel (Abbildung 3.11), allerdings ist ein Signalverlust zu beobachten. Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Messung deutet auf Proteinverlust hin. Mit steigender Temperatur nehmen hydrophobe Interaktionen zu, die zum Kleben des Proteins an der Küvettenwand führen können. Diese Adsorption konnte durch vorheriges Spülen der Küvette mit einer 1% igen Brij-35 Lösung, einem Detergenz, nicht verhindert werden.

Die thermische Übergangskurve wurde gefittet und die Änderung der Enthalpie bestimmt. Für den CD-Übergang wurde ein Übergangsmittelpunkt von 37°C berechnet und eine Änderung der freien Enthalpie von $\Delta H_m = 209,4$ kJ/mol. Temperaturübergänge mit niedrigeren Hsp26 Konzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Eine Konzentrationsabhängigkeit wurde nicht beobachtet.

Die Reversibilität konnte auch durch Messung der Fluoreszenzänderung im Temperaturbereich von 20-55°C bestätigt werden. Eine Entfaltung des Proteins verursacht eine Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit der aromatischen Seitenketten. Dies führt zur Änderung der Fluoreszenzintensität und zur Verschiebung des Fluoreszenz Maximums. Da die Fluoreszenzintensität stark von der Temperatur abhängig ist, deutet eine lineare Intensitätsabnahme nicht auf eine Veränderung der Proteinstruktur hin, sondern stellt einen intrinsischen Effekt dar.

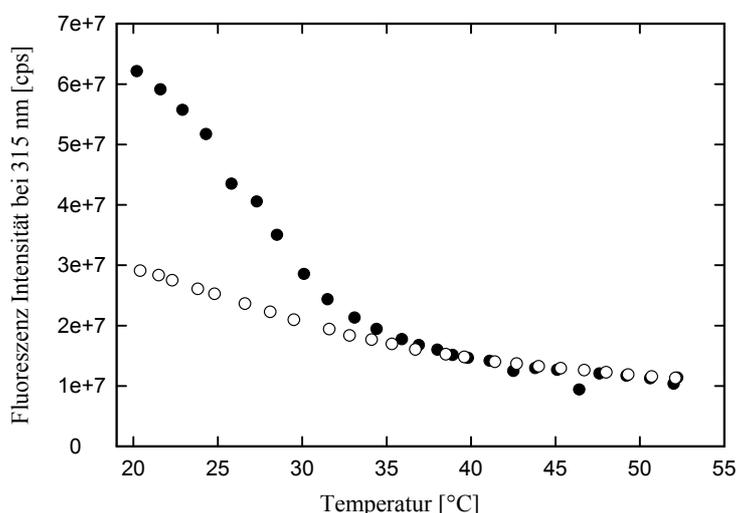


Abbildung 3.12 Reversibilität der Dissoziation in Abhängigkeit von der Temperatur. Hsp26 (50 µg/ml) wurde in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 mit einer Heizrate von 10°C pro Stunde bis 53°C aufgeheizt (●) und wieder abgekühlt (○).

Abbildung 3.12 gibt den Temperaturverlauf der Fluoreszenzmessung wieder. Ab 32°C erfolgt eine Abweichung von der linearen Intensitätsabnahme, d.h. es kommt zu einer Veränderung der Umgebung der fluoreszierenden Aminosäurereste. Diese Beobachtung stimmt mit dem Beginn der Dissoziation, mittels Gelfiltration bestimmt, überein. Durch die Dissoziation des Proteins werden die aromatischen Aminosäuren vermutlich dem Lösungsmittel exponiert. Die dimere Hsp26 Spezies zeigt das Fluoreszenzspektrum eines entfalteten Proteins, mit einem Fluoreszenzmaximum bei 353 nm (vgl. 3.6.1, Abbildung 3.42). Ab 40°C ist keine weitere Steigungsänderung zu beobachten.

Die Fluoreszenzänderungen beim Abkühlen deuten nicht auf eine komplette Reversibilität der Dissoziation hin. Eine Überprüfung der Proteinlösung mittels SEC bestätigte allerdings die Reassoziierung der nativen oligomeren Spezies.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Hitzeschocktemperaturen zur Dissoziation von Hsp26 führen. Dieser Prozess ist reversibel, wenn Hsp26 Temperaturen bis 55°C ausgesetzt wird. Bei Temperaturen > 60°C kommt es zu irreversiblen Strukturänderungen, die eine Assoziation zum Oligomer, möglicherweise zum Dimer verhindern.

Dynamik der Hsp26 Komplexe

Für viele kleine Hitzeschockproteine wurde postuliert, dass sie in einem schnellen Dissoziations / Assoziations Gleichgewicht mit suboligomeren Spezies stehen (Sobott *et al.*, 2002). Diese kleinere, dominante Austauschereinheit scheint das Dimer zu sein (Kim *et al.*, 1998b; van Montfort *et al.*, 2001).

Hsp25 liegt beispielsweise bei 20°C als Hexadekamer, Tetramer und Dimer vor. Die Verteilung dieser oligomeren Spezies ist konzentrationsabhängig. Eine Abnahme der Proteinmenge führte zur verstärkten Dissoziation. Hexadekamere dissoziierten zum Teil zu Tetrameren, während ursprüngliche Tetramere ihre Quartärstruktur nicht änderten (Ehrnsperger, 1998; Ehrnsperger *et al.*, 1999). Eine Änderung der oligomeren Spezies aufgrund Temperaturerhöhung wurde nicht beobachtet.

Untersuchungen von Hsp26 mittels analytischer Gelfiltration zeigten, dass die Dissoziation temperaturbedingt konzentrationsabhängig verläuft (Stromer, 1998). Verschiedene Hsp26 Konzentrationen zeigten bei 25°C stets nur die hocholigomere Spezies. Es stellte sich die Frage, ob das Hsp26 Oligomer unter physiologischen Bedingungen in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht mit einer dimeren Hsp26 Spezies steht.

Dazu wurden 15 µM Hsp26 auf eine bei 25°C temperierte Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Spitze des Komplexpeaks (ca. 200 µl Aliquot) wurde aufgesammelt und rechromatographiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, dabei wurde die Konzentration des Proteins jeweils um den Faktor ~10-15 verdünnt. Proteinkonzentrationen im Bereich von 15 µM bis 0,15 nM wurden somit untersucht.

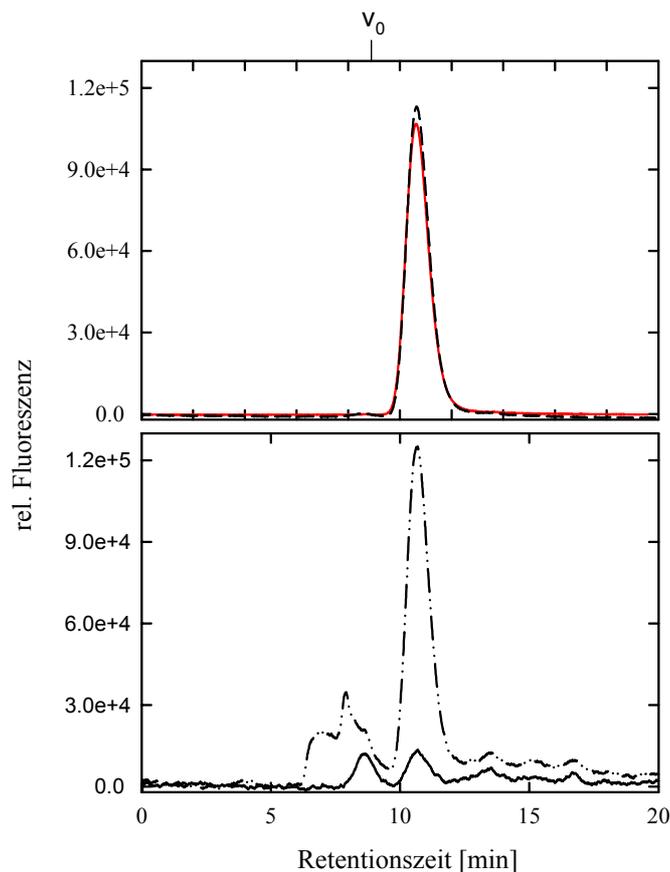


Abbildung 3.13 Analyse des konzentrationsabhängigen Gleichgewichtes der Hsp26 Oligomere und Dimere mittels analytischer Gelfiltration. 15 μM Hsp26 wurden in 40 mM HEPES-KOH, pH 7,5 für 10 min bei 25°C inkubiert und anschließend auf die TSK4000PW Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Spitze des Komplexpeaks wurde aufgesammelt und rechromatographiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Hsp26 Konzentrationen von (—) $\sim 1,5 \mu\text{M}$, (---) $\sim 0,15 \mu\text{M}$, (-·-·-) $\sim 15 \text{ nM}$, und (—) $\sim 1,5 \text{ nM}$ wurden somit untersucht. Laufgeschwindigkeit: 0,75 ml/min. Anregung bei 280 nm, Emission bei 323 nm, gain 10 bei 1,5 μM , 100 bei 0,15 μM und gain 1000 bei den übrigen Konzentrationen. Laufpuffer: 0,1 M HEPES-KOH, 150 mM KCl, pH 7,5.

Abbildung 3.13 zeigt, dass Hsp26 als distinkter, singulärer Peak eluiert. Mit sinkender Konzentration nahm der Komplexpeak ab und Aggregate wurden beobachtet. Ein konzentrationsabhängiges Gleichgewicht zwischen Hsp26 Oligomer und einer kleineren Spezies konnte nicht bestätigt werden.

Untersuchungen mittels Mikrodialyse ermöglichen eine kinetische Untersuchung der Dynamik der Untereinheiten. Die Porengröße der Membran wurde so gewählt, dass die dimere Spezies in der Lage war die Membran zu durchtreten, während größere Spezies bzw. das Oligomer im Reaktionsgefäß retardiert wurden. Selbst nach 24 h bei 25°C konnte kein Durchtreten einer kleineren Spezies durch die Dialysemembran beobachtet werden. Darüberhinaus konnte mittels Gelfiltration keine Änderung der Quartärstruktur im Reaktionsgefäß beobachtet werden (nicht gezeigt).

Zusammengefasst zeigen die experimentellen Ansätze, dass unter physiologischen Bedingungen Hsp26 in keinem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht mit der dimeren Spezies steht.

Kinetische Untersuchung der Dissoziation und Assoziation

Hsp26 dissoziiert bei erhöhten Temperaturen über Zwischenstufen in Dimere. Unter physiologischen Bedingungen reassoziieren diese kleinen Spezies und bilden oligomere Komplexe aus.

Die Dissoziation in kleinere Hsp26 Spezies beginnt bei 32°C (nicht gezeigt) und verläuft über mehrere intermediäre Spezies (Stromer, 1998). Vor allem bei 37°C ist eine konzentrationsabhängige Population von Dissoziations-Intermediaten zu beobachten. Neben der oligomeren und der dimeren Spezies wird noch eine tetramere oder hexamere Spezies detektiert. Die Geschwindigkeit des Dissoziationsprozesses ist von der Inkubationstemperatur abhängig. Bei Temperaturen über 40°C ist nur noch die dominante dimere Spezies detektierbar (Stromer, 1998).

Um die Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der Reassoziation zu untersuchen wurden zwei Proteinlösungen unterschiedlicher Konzentration für 15 min bei 43°C inkubiert und die Reassoziation bei unterschiedlichen Temperaturen mittels Gelfiltration untersucht. Abbildung 3.14 A und C zeigen die Gelfiltrationsläufe der Reassoziation von 0,3 mg/ml und 0,05 mg/ml Hsp26 im Temperaturbereich von 5°C bis 25°C. Ausbeuten bis zu 76% des ursprünglichen Oligomers wurden bei höheren Hsp26 Konzentrationen beobachtet, während mit niedrigen Hsp26 Konzentrationen lediglich 30% Oligomer detektiert werden konnte (Abbildung 3.14 B, D). Eine Quantifizierung der Ausbeute ist nur möglich, da im Bereich von 5-20°C der Einfluss der Temperatur auf das Fluoreszenzsignal vernachlässigbar ist.

Die Reassoziation ist nicht nur ein konzentrationsabhängiger sondern auch ein temperaturabhängiger Prozess. Im Temperaturbereich von 5-15°C erfolgt die Reassoziation sehr schnell, während sie zwischen 15 und 25°C langsamer verläuft.

Aus Abbildung 3.14 ist ersichtlich, dass die reassozierte Hsp26 Spezies (rHsp26) im Vergleich zum ursprünglichen 24mer eine erhöhte Retentionszeit aufweist (siehe 3.3).

Um die Geschwindigkeit der Reassoziation zu untersuchen, wurde die zeitliche Zunahme des Oligomers bei verschiedenen Temperaturen verfolgt. Die Reassoziation von 0,05 mg/ml Hsp26 wurde bei 10°C, 15°C und 25°C durchgeführt (vgl. Abbildung 3.14 D).

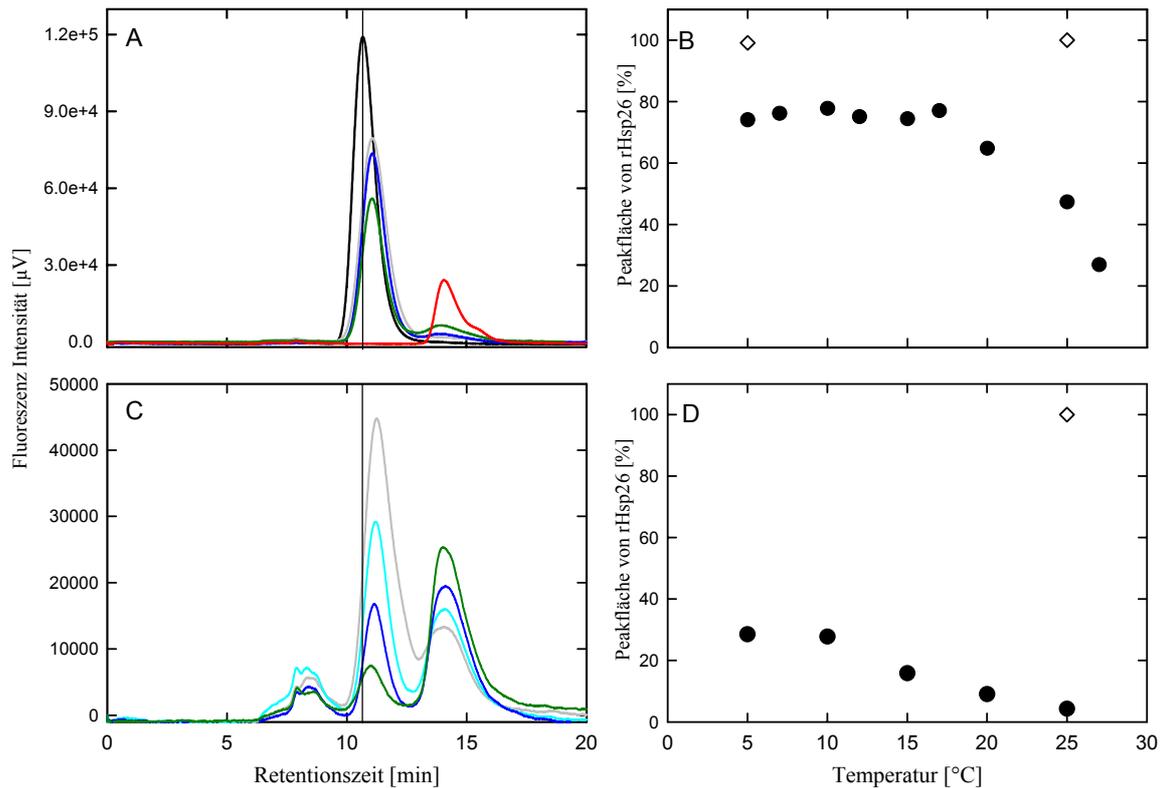


Abbildung 3.14 Temperatur- und konzentrationsabhängige Reassoziierung von Hsp26 Oligomeren. 0,3 mg/ml (A, B) oder 0,05 mg/ml (C, D) Hsp26 in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 wurden für 15 min bei 43°C inkubiert und sofort auf die unterschiedlich temperierte Gelfiltrationssäule aufgetragen. **A und C:** Gelfiltrationslauf bei 25°C (schwarz) dient als Referenz. Das Dimer (rot) nach 15 min bei 43°C und die reassozierten oligomeren Spezies bei 25°C (dunkelgrün), 20°C (blau), 15°C (cyan) und 10°C (grau). Laufgeschwindigkeit: 0,75 ml/min, Anregung bei 280 nm, Emission bei 323 nm, Auftragsvolumen 20 µl, gain 10 (bei A) bzw. 100 (bei C). **B und D:** Ausbeute an reassoziertem Komplex in Abhängigkeit von der Temperatur (●). Als 100 %-Werte dienen die Peakflächen bei 25°C und 5°C (◇).

Abbildung 3.15 zeigt die zeitliche Zunahme des oligomeren Peaks bei 10 und 25°C. Geschwindigkeitskonstanten von $k=0,166 \text{ min}^{-1}$ bei 25°C und $0,288 \text{ min}^{-1}$ bei 10°C deuten auf eine schnelle, temperaturabhängige Reaktion. Je niedriger die Temperatur, umso schneller die Reassoziierung. In beiden Fällen ist bereits nach 10minütiger Inkubation die maximale Ausbeute erreicht, 45 % bei 10°C und 25 % bei 25°C. Längere Inkubationen von über sechs Stunden führten zu keinen höheren Ausbeuten sondern zur erneuten Abnahme des oligomeren Peaks (nicht gezeigt). Eine Zunahme der kleinen Spezies ist nicht zu beobachten, d.h. ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Oligomer und Dimer ist auch nach längeren Inkubationszeiten nicht nachzuweisen. Es wird vermutet, dass das Protein abgebaut wird.

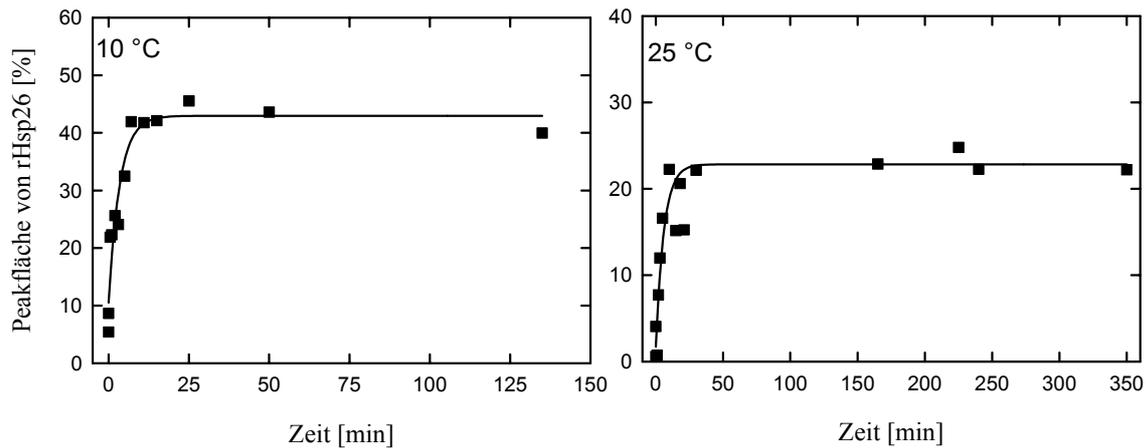


Abbildung 3.15 Reassoziationskinetiken in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Dissoziation von Hsp26 (0,05 mg/ml) in 40 mM Hepes, pH 7,5 erfolgte durch Inkubation für 15 min bei 43°C. Die Reassoziations wurde durch einen Temperaturshift auf 10°C bzw. 25°C gestartet. Nach definierten Zeitpunkten wurden 20 µl Proben auf die temperierte Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die resultierenden Peakflächen (■) wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen und die Werte mittels einer einfachen Exponentialfunktion (—) nach der Gleichung $y=y_0+a(1-e^{-bx})$ ausgewertet.

Reassoziations ist ein konzentrationsabhängiger Prozess. Konzentrationen um 0,3 mg/ml lieferten innerhalb der Totzeit maximale Ausbeuten von 88% bei 10°C sowie 75% bei 25°C. Eine Geschwindigkeitskonstante der Reassoziations konnte nicht bestimmt werden.

Aus der Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Reassoziations von 0,05 mg/ml Hsp26 bei 10°C, 15°C und 25°C in einem Arrhenius Plot, konnte eine Aktivierungsenergie von $E_A=26,1$ kJ/mol berechnet werden.

Die Kinetik der Dissoziation und Assoziations wurde auch mittels Fluoreszenz verfolgt. Um die Geschwindigkeit der Dissoziation von Hsp26 zu untersuchen, wurde das Protein in unterschiedlich temperierte Pufferlösungen zugegeben und die Kinetik bei 315 nm aufgezeichnet. Aus Abbildung 3.16 A ist deutlich zu erkennen, dass nur ein Teil der Gesamtamplitude erfasst wurde. Die Abnahme des Signals von Hsp26 (siehe Abbildung 3.16 A, (—)) bei 25°C wird aufgrund der intensiven Bestrahlung der Probe durch *Photobleaching* verursacht. Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten (k) wurden mit Hilfe einer einfachen Exponentialfunktion ermittelt.

Durch die graphische Auftragung des natürlichen Logarithmus der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten ($\ln k$) gegen den reziproken Wert der Temperatur in Kelvin ($1/T$) kann die benötigte Aktivierungsenergie (E_A) ermittelt werden (Abbildung 3.16 B).

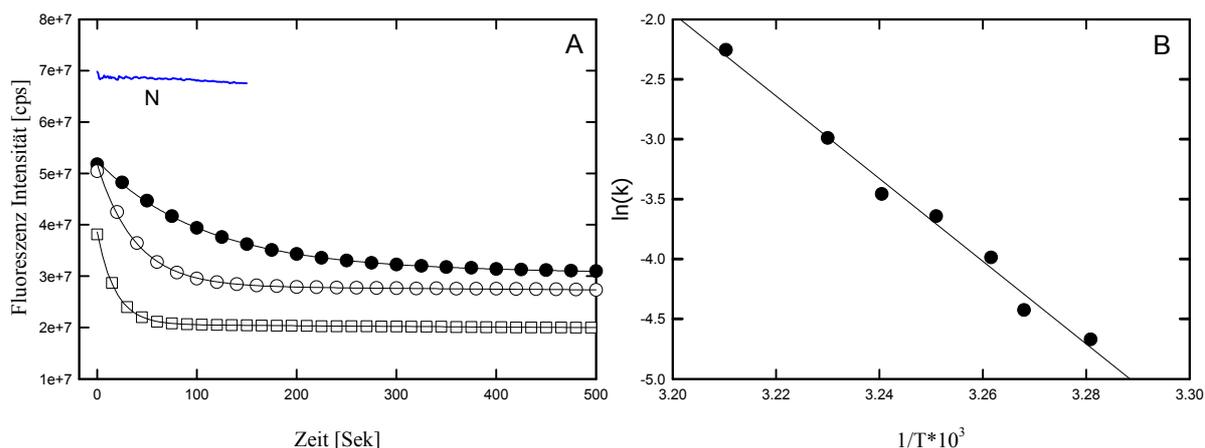


Abbildung 3.16 Fluoreszenzkinetiken zur Bestimmung der Aktivierungsenergie für die Dissoziation. **A:** Hsp26 (0,05 mg/ml) wurde in unterschiedlich temperierte Pufferlösungen zugegeben und die Kinetik der Dissoziation bei 315 nm aufgezeichnet. Hsp26 bei 25°C (—), Dissoziation bei 32°C (●), 35°C (○) und 37°C (□). Die Kinetiken wurden mit einer einfachen Exponentialfunktion ausgewertet (—). **B:** Die Auftragung des natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation gegen die reziproke Temperatur (in Kelvin). Die Steigung a der Ausgleichsgeraden beträgt $-34,468$.

Durch lineare Extrapolation von k kann aus der Steigung der Geraden eine Aktivierungsenergie für die Dissoziation ($E_{A \text{ diss}}$) von $E_A = 286,5 \text{ kJ/mol}$ berechnet werden.

Die Dissoziation von $10 \mu\text{g/ml}$ Hsp26 zeigte einen ähnlichen Energiebedarf von 330 kJ/mol .

Die Kinetik der Reassoziations konnte mittels Änderung der Fluoreszenz nicht verfolgt werden. Unmittelbar nach der Verdünnung in den Reassoziationsansatz war die Reaktion schon beendet.

Dissoziation und Reassoziations wurden auch mittels Fern-UV-CD Spektroskopie untersucht. Dazu wurden aus einem Großansatz jeweils $300 \mu\text{l}$ Proteinlösung in die Küvette überführt und im Wasserbad bei 25°C oder 43°C inkubiert. Zur Ermittlung der Dissoziationskinetiken wurde die Proteinlösung für fünf Minuten bei 25°C inkubiert und im CD-Gerät mit unterschiedlich temperiertem Küvettenhalter (32°C bis 50°C) vermessen. Die Aufzeichnung der Kinetik wurde ca. 20 Sekunden vor der Überführung der Küvette in das Gerät gestartet, um die *burst-phase* mit aufzuzeichnen.

Die Inkubation der Proteinlösung musste in der Küvette erfolgen, da eine Vorinkubation im Eppendorf Reaktionsgefäß mit anschließendem Überführen der Proteinlösung in die Küvette (mittels temperierter Pipettenspitzen) zu keinen verwertbaren Ergebnissen führte. Die Reaktion erfolgte so schnell, dass sie nach dem Mischvorgang schon beendet war.

Für die Reassoziationskinetik wurde die Proteinlösung (0,3 mg/ml Hsp26) zunächst für 15 min bei 43°C in der Küvette inkubiert. Anschließend wurde bei verschiedenen Temperaturen (von 5°C bis 37°C) die Assoziationskinetik im CD verfolgt.

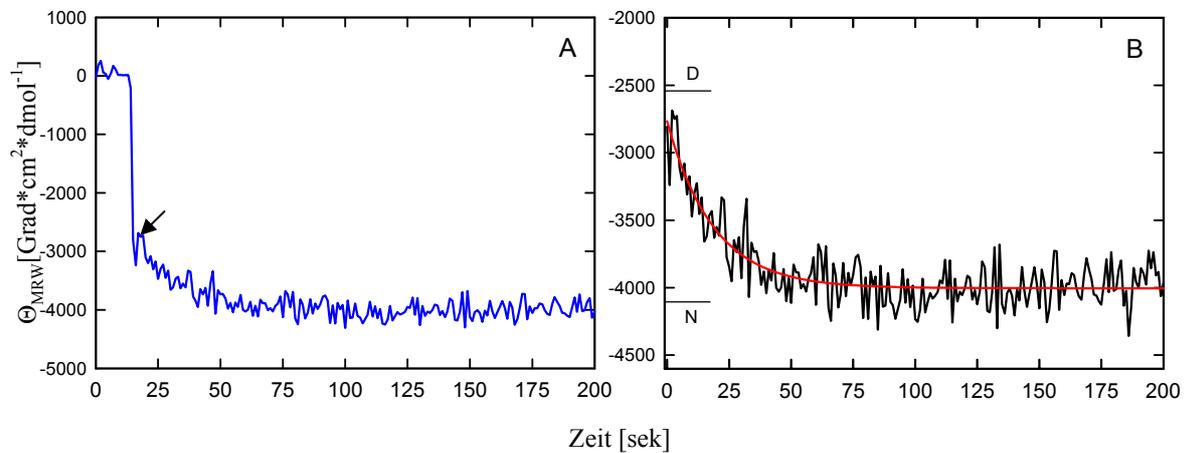


Abbildung 3.17 Fern-UV-CD Reassoziationskinetik von Hsp26. Hsp26 (0,3 mg/ml) wurde jeweils für 15 min bei 43°C in der Küvette in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 inkubiert und die Reassoziationskinetik bei 230 nm und unterschiedlichen Temperaturen verfolgt. **A:** Eine Beispielkinetik der Reassoziationskinetik bei 15°C. Die Datenaufzeichnung wurde gestartet, bevor die Küvette mit der vorinkubierten Proteinlösung hineingestellt wurde. Der Pfeil zeigt den Startpunkt der Kinetik an **B:** Die ausgewertete Reassoziationskinetik bei 15°C (schwarz) und der dazugehörige einfache exponentielle Fit (rot). Intensitäten von denaturiertem (— D) und nativem (— N) Hsp26.

Die Dissoziations- und Assoziationskinetiken wurden, wie in Abbildung 3.17 dargestellt, ausgewertet. Abbildung 3.17 A zeigt die Rohdaten einer Assoziationskinetik und B die ausgewertete Kinetik. Eine deutliche Zunahme der negativen Elliptizität ist zu beobachten. Die Geschwindigkeitskonstanten (k) wurden mit Hilfe einer einfachen Exponentialfunktion ermittelt.

Die graphische Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (logarithmische Skalierung der y-Achse) gegen die Temperatur (Abbildung 3.18 A) zeigt ein so genanntes V-Schema. Der Schnittpunkt der beiden Regressionsgeraden des Chevron Plots gibt die Temperatur an, bei der das System im Gleichgewicht ist. Bei 37,5°C sind Dissoziation und Assoziation im Gleichgewicht. Bei Temperaturen unterhalb 37°C ist das Gleichgewicht auf Seiten des Oligomers (Assoziation) verschoben, bei Temperaturen oberhalb 37°C auf Seiten des Dimers (Dissoziation).

Die benötigte Aktivierungsenergie (E_A) wurde durch die graphische Auftragung des natürlichen Logarithmus der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten ($\ln k$) gegen den reziproken Wert der Temperatur in Kelvin ($1/T$) ermittelt (Abbildung 3.18 B). Durch lineare

Extrapolation von k im Temperaturbereich von 32°C und 50°C ergibt sich aus der Steigung der Geraden eine Aktivierungsenergie für die Dissoziation ($E_{A\text{diss}}$) von $103,6\text{ kJ/mol}$.

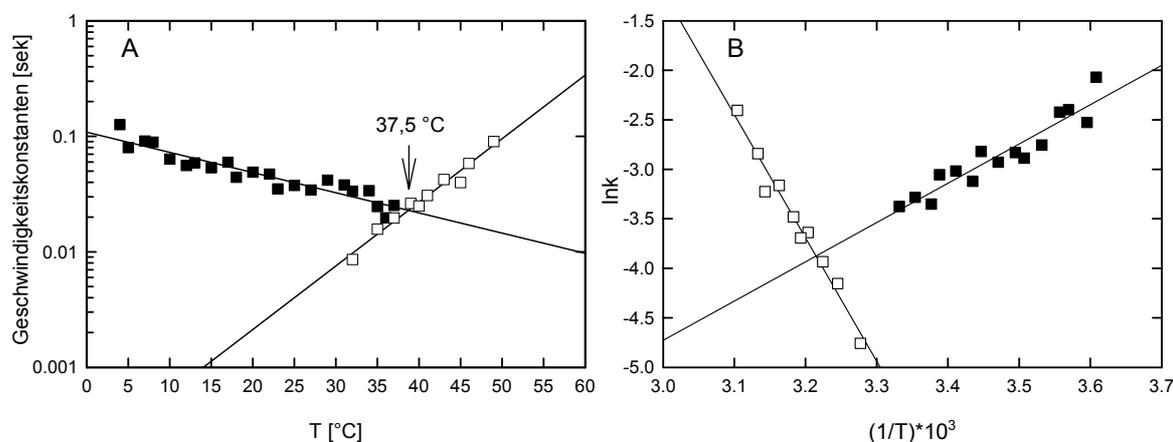


Abbildung 3.18 Chevron und Arrhenius Plot für die temperaturinduzierte Dissoziation und Reassoziierung von Hsp26. **A:** Chevron Plot: Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation (\square) und Assoziation (\blacksquare) gegen die Temperatur. Der Pfeil gibt den Schnittpunkt der beiden linearen Regressionen an. **B:** Arrhenius Plot: Auftragung des natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation (\square) und Assoziation (\blacksquare) gegen die reziproke Temperatur (in Kelvin). Anhand der Steigung (a) kann die Aktivierungsenergie berechnet werden. Die Geradengleichung liefert für die Dissoziation einen Steigungs-Wert von $a_{\text{diss}} = -12,465$ für die Steigung der Geradengleichung der Assoziation einen Wert von $a_{\text{ass}} = 3,9685$.

Die Assoziation wurde im Temperaturbereich von 5°C bis 37°C verfolgt. Ausgewertet wurden nur die Werte zwischen 5 und 25°C , da in diesem Temperaturbereich eine Linearität zu beobachten war, d.h. das Gleichgewicht ist eindeutig auf Seiten des Oligomers verschoben. Im Bereich von 26°C bis 37°C ist eine deutliche Krümmung zu erkennen (vgl. Abbildung 3.18 A), was eine Überlagerung mehrerer Effekte bedeutet, d.h. eine Änderung des Reaktionsmechanismus bei höheren Temperaturen. Die berechnete Aktivierungsenergie für die Assoziation ($E_{A\text{ass}}$) der dimeren Spezies zum Oligomer beträgt $-32,99\text{ kJ/mol}$.

Scheinbar negative Aktivierungsenergien deuten daraufhin, dass eine apparente Geschwindigkeitskonstante gemessen wurde, die eine Gleichgewichtskonstante eines Vorgleichgewichtes einschließt (Kiefhaber, 2003). Von zwei potentiell geschwindigkeitsbestimmenden Schritten bei der Assoziation könnte einer „blockiert“ sein und nicht zum Signal beitragen. Möglicherweise wird nur die Assoziation zu einem Intermediat detektiert.

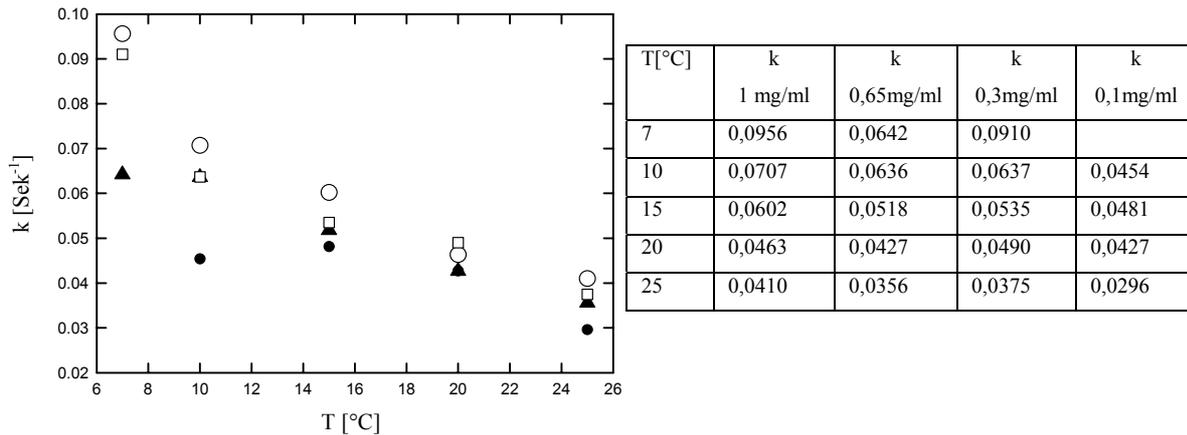


Abbildung 3.19 Konzentrationsabhängigkeit der Hsp26 Reassoziation. Fern-UV-CD-Kinetiken. Geschwindigkeitskonstanten der Reassoziation in Abhängigkeit von der Hsp26 Konzentration: 1 mg/ml (○), 0,65 mg/ml (▲), 0,3 mg/ml (□) und 0,1 mg/ml (●).

Eine konzentrationsabhängige Untersuchung der Assoziation liefert möglicherweise Aufschluss über das vorgeschaltete Gleichgewicht. Die Messung mit 0,1 mg/ml Hsp26 lieferte einen ähnlichen Wert von -31,1 kJ/mol. In Abbildung 3.19 wird deutlich, dass der Energiebedarf für die Aktivierung der Assoziation konzentrationsunabhängig ist, d.h. das gemessene Signal resultiert nicht von der Assoziation zum Oligomer. Eine mögliche Aussage über die Natur des Vorgleichgewichtes ist dadurch nicht möglich.

3.3 Charakterisierung des reassozierten Hsp26 Komplexes (rHsp26)

Die reassozierte Hsp26 Spezies (rHsp26) der CD-Kinetiken wurde mittels Gelfiltration untersucht. Abbildung 3.20 zeigt, dass die reassozierte Hsp26 Spezies eindeutig oligomerer Natur ist. Die verschobene Retentionszeit weist allerdings auf Unterschiede zum ursprünglichen, nativen Hsp26 Komplex (nHsp26) hin.

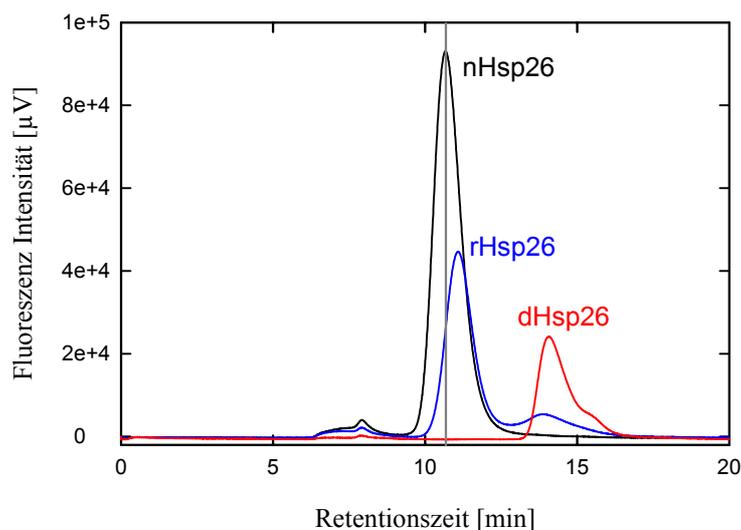


Abbildung 3.20 Reassoziierter Hsp26 Komplex nach temperaturinduzierter Dissoziation. Die reassozierte Hsp26 Spezies (0,3 mg/ml) wurde nach Aufzeichnung der CD-Assoziationskinetik mittels Gelfiltration überprüft. Natives Hsp26 (nHsp26, schwarz), Hsp26 Dimer, 15 min bei 43°C (dHsp26, rot), reassoziierter Komplex (rHsp26, blau), nach CD-Kinetik, 5 min bei 25°C. Probenvolumen 20 μl, gain 10, Anregung 280 nm, Emission 323 nm, Laufgeschwindigkeit 0,75 ml/min, TSK4000PW Gelfiltrationssäule, Laufpuffer: 0,1 M HEPES-KOH, 150 mM KCl, pH 7,5.

Die Messungen zur Reassoziierung (negative Aktivierungsenergien) deuten auf ein vorgeschaltetes Gleichgewicht bei der Assoziation zum Oligomer hin. Die Tatsache, dass rHsp26 auf der Gelfiltration ein verändertes Laufverhalten zu nHsp26 zeigt, legt die Vermutung nahe, dass dieser Komplex dem vorgelagerten Gleichgewicht entspricht.

Um Aussagen darüber treffen zu können, wurde rHsp26 hinsichtlich struktureller Änderungen im Vergleich zu nativem Hsp26 (nHsp26) genauer untersucht.

Negativ kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen von rHsp26 deuten auf eine oligomere Spezies hin, die in ihrer Quartärstruktur weniger regelmäßig erscheint als nHsp26.

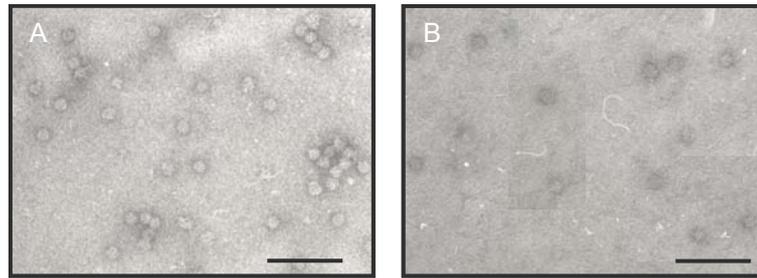


Abbildung 3.21 Negativ-kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen von nHsp26 und rHsp26. nHsp26 (A) und rHsp26 (B). Nominale Vergrößerung 33 000fach. Die Länge des Skalierungsbalkens beträgt 100 nm.

Es stellte sich die Frage, ob der reassozierte Komplex dieses vorgelagerte Gleichgewicht bestimmt und es einer weiteren Reaktion bedarf, um zum nativen Hsp26 zu gelangen. Determiniert rHsp26 das vorgeschaltete Gleichgewicht, dann sollte der Komplex durch Verdünnung in Intermediate zerfallen. Wäre rHsp26 weniger stabil als nHsp26, impliziere das ein Gleichgewicht zwischen rHsp26 mit Intermediaten.

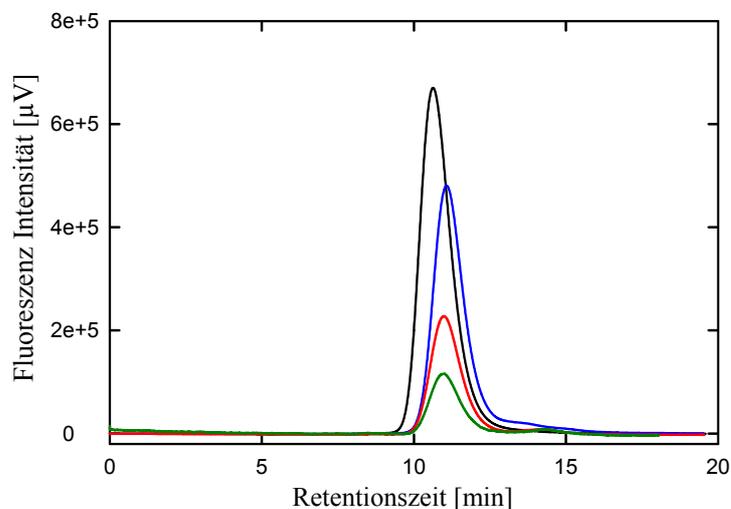


Abbildung 3.22 Untersuchung des konzentrationsabhängigen Gleichgewichtes von rHsp26 mittels analytischer Gelfiltration. Der reassozierte Hsp26 Komplex, rHsp26 (—) (15 min bei 43°C und 30 min bei 25°C) wurde auf die Gelfiltrationsäule aufgetragen, die Peakspitze aufgesammelt und rechromatographiert (—). Die Peakspitze wurde erneut aufgesammelt und rechromatographiert (—). Als Ausgangsprodukt diente 0,3 mg/ml nHsp26 (—) bei 25°C. Das Probenvolumen betrug 100 µl. Signalverstärkung: gain 10 bei nHsp26 und rHsp26, gain 100 und gain 1000 bei den rechromatographierten Peakspitzen.

Um herauszufinden, ob rHsp26 im Gleichgewicht mit einer oligomeren Subspezies oder dem Dimeren liegt, wurden Gelfiltrationsversuche durchgeführt. Dazu wurde der reassozierte

Hsp26 Komplex mehrfach rechromatographiert (Abbildung 3.22). Der oligomeren Peak war stets detektierbar, lediglich eine Konzentrationsabnahme bis zum kompletten Verschwinden konnte beobachtet werden.

Eine Dissoziation des reassozierten Komplexes durch Verdünnung wurde nicht beobachtet, d.h. rHsp26 liegt wohl nicht im Gleichgewicht mit intermediären Spezies vor.

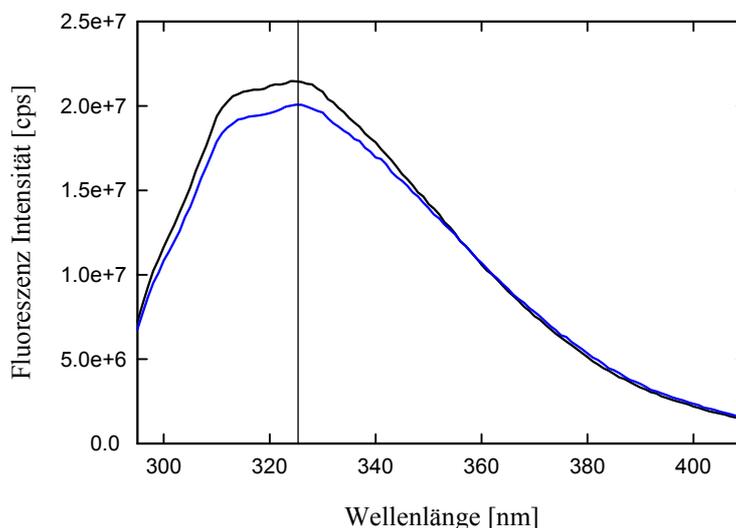


Abbildung 3.23 Fluoreszenzspektren von nHsp26 im Vergleich zu rHsp26. Die Spektren von 0,3 mg/ml nHsp26 (—) und rHsp26 (—) in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 wurden bei 25°C bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen. Spaltbreite für Anregung und Emission: je 5 nm.

Die Fluoreszenzspektren von nHsp26 und rHsp26 zeigten beide ein Maximum bei 326 nm (Abbildung 3.23). Die Fluoreszenzspektren sowie Fern-UV-CD Spektren (vgl. Abbildung 3.11) implizieren, dass die Sekundärstruktur von nHsp26 und rHsp26 unverändert ist.

Untersuchungen mittels Nah-UV-CD lieferten deutliche Hinweise darauf, dass auch die Tertiärstruktur des reassozierten Komplexes mit der von nHs26 identisch ist (Abbildung 3.24 A). Nah-UV-CD Spektroskopie dient als „Fingerabdruck“ des Proteins. Das Nah-UV-CD Spektrum des Hsp26 Dimers (dHsp26) weist signifikante Änderungen auf, was auf eine Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit der aromatischen Aminosäuren durch Dissoziation hindeutet. Die Tatsache, dass bei 25°C die Nah-UV-CD Spektren von rHsp26 und nHsp26 identisch sind (keine Unterschiede größer als 10%), reflektiert die unveränderte Umgebung der aromatischen Aminosäuren.

Eine weitere Möglichkeit Unterschiede in der Tertiärstruktur zu untersuchen, ist die Bindung von ANS an hydrophobe Oberflächen (Abbildung 3.24 B). Die Fluoreszenzspektren der ANS Bindung sind für rHsp26 sowie für nHsp26 identisch, d.h. in beiden Komplexen werden gleich viele hydrophobe Oberflächen exponiert.

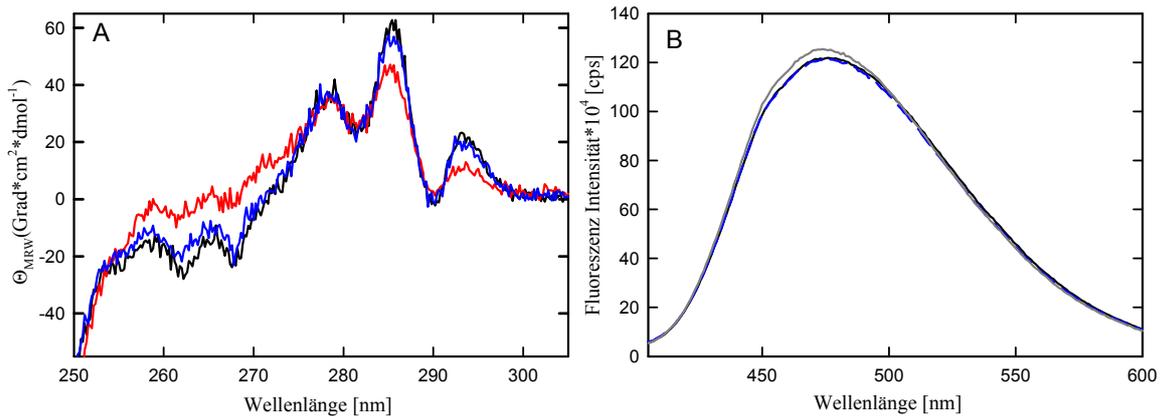


Abbildung 3.24 Untersuchung zur Tertiärstruktur von rHsp26. **A:** Nah-UV-CD-Spektroskopie von 1 mg/ml nHsp26 (—) und rHsp26 (—) bei 25°C sowie dHsp26 (—) bei 43°C. Probenvolumen: 1100 μ l, Schichtdicke der Küvette: 0,5 cm. Die Spektren wurden 20 x akkumuliert. **B:** Bindung von ANS an nHsp26 (—) und rHsp26 (---) bei 25°C. ANS wurde von Anfang an zur Proteinlösung zugegeben und für 15 min bei 43°C und 30 min bei 25°C inkubiert (—).

Die Ergebnisse implizieren, dass die Sekundärstruktur und Tertiärstruktur von rHsp26 identisch mit der von nHsp26 ist. Unterschiede sind nur in der Quartärstruktur zu beobachten.

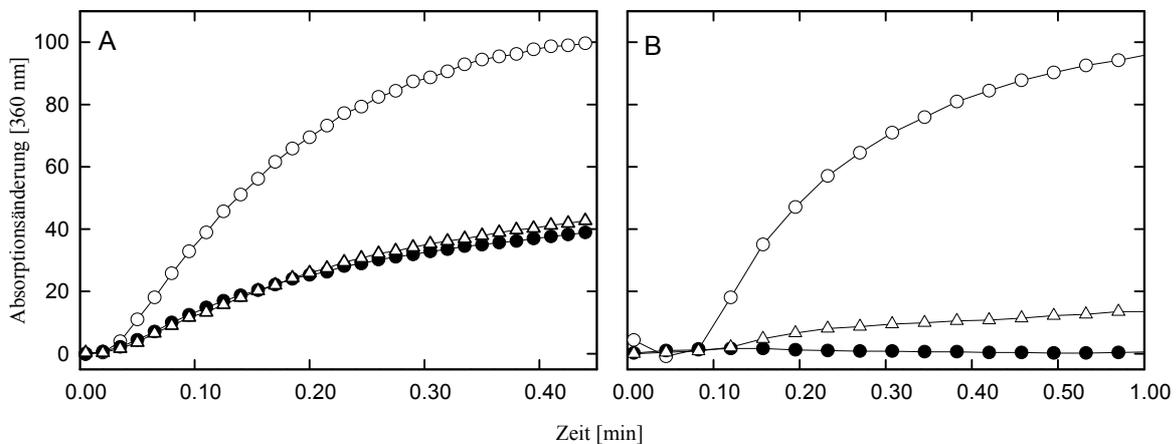


Abbildung 3.25 Einfluss von rHsp26 auf die Aggregation von Modellsubstraten. Die Aggregationskinetiken wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 durch Zunahme der Absorption bei 360 nm verfolgt. **A:** Thermische Aggregation von CS bei 43°C. CS (1,5 μ M) wurde in eine temperierte Lösung in Abwesenheit (\circ) oder in Anwesenheit von 1,5 μ M nHsp26 (\bullet) und 1,5 μ M rHsp26 (Δ) verdünnt. **B:** Chemisch induzierte Aggregation von Insulin bei 25°C. Die Aggregation von 45 μ M Insulin wurde alleine (\circ) oder in Gegenwart von 4,5 μ M nHsp26 (\bullet) und 4,5 μ M rHsp26 (Δ) verfolgt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von DTE (20 mM).

Um die Auswirkungen dieser Änderungen der Quartärstruktur auf die Chaperonaktivität zu untersuchen, wurde der Einfluss von rHsp26 auf die Aggregation von CS und Insulin untersucht. Abbildung 3.25 zeigt, dass es keine Unterschiede in der Chaperonaktivität von

rHsp26 im Vergleich zu nHsp26 gibt. Gleiche Konzentrationen an rHsp26 konnten die thermische Aggregation von CS im gleichen Maße wie nHsp26 unterdrücken. Ebenso ist rHsp26 im Insulin Assay bei 25°C genauso aktiv wie nHsp26.

Nachdem festgestellt wurde, dass rHsp26 die Aggregation von Substratproteinen zu unterdrücken vermag, sollte untersucht werden, ob rHsp26 auch in der Lage ist, mit CS zu interagieren und stabile Komplexe auszubilden.

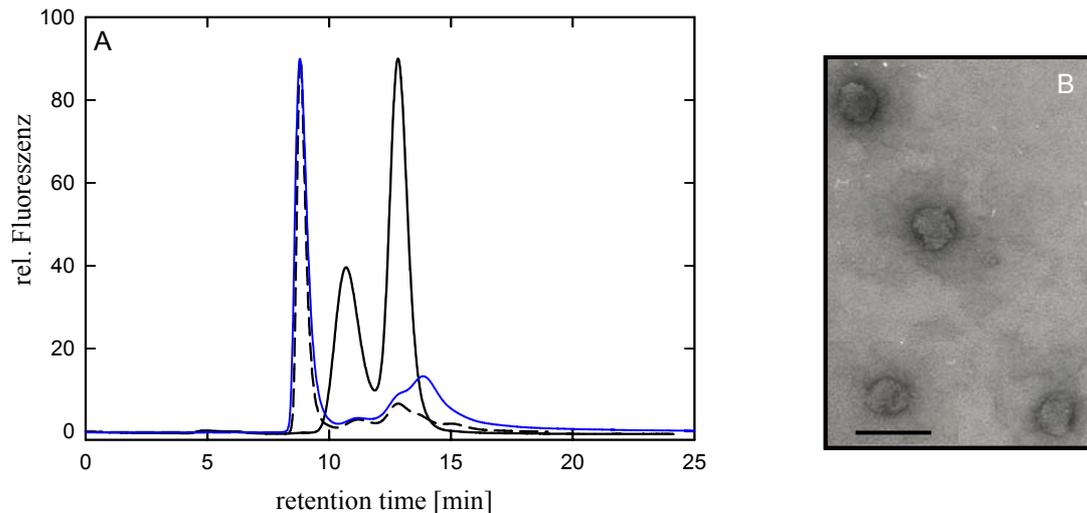


Abbildung 3.26 Komplexbildung von rHsp26 mit Substrat. **A:** Gelfiltrationschromatographie zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen rHsp26 (3 μ M) und CS (1,5 μ M) in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5. Hsp26 und CS bei 25°C (—), nach 15 min bei 43°C (---). rHsp26 (15 min 43°C + 30 min 25°C) und CS nach 15 min bei 43°C (—). **B:** Negativ-kontrastierte Elektronenmikroskopische Aufnahme von rHsp26-CS Komplexen. Nominale Vergrößerung: 33000. Die Länge des Skalierungsbalkens beträgt 100 nm.

In Abbildung 3.26 ist zu erkennen, dass rHsp26 unter Hitzeschockbedingungen entfaltende CS bindet und wie nHsp26 große rHsp26-Substratkomplexe ausbildet, die im Ausschlussvolumen der Säule eluieren (vgl. Abbildung 3.32). Die Spitze des Komplexpeaks wurde aufgesammelt und auf ein Kupfernetzchen aufgebracht. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt, dass rHsp26-CS Komplexe mit einem Durchmesser von \sim 50 nm, homogene Komplexe mit gleicher Größe und gleicher Morphologie wie Hsp26-CS Komplexe sind (vgl. Abbildung 3.32).

rHsp26 unterscheidet sich von nHsp26 lediglich in der Quartärstruktur. Sekundär- und Tertiärstruktur sowie die funktionellen Eigenschaften sind vergleichbar.

Ob die Unterschiede der Quartärstruktur auch mit unterschiedlichen Stabilitäten korrelieren, wurde durch den Einfluss chaotroper Agenzien auf das Protein untersucht.

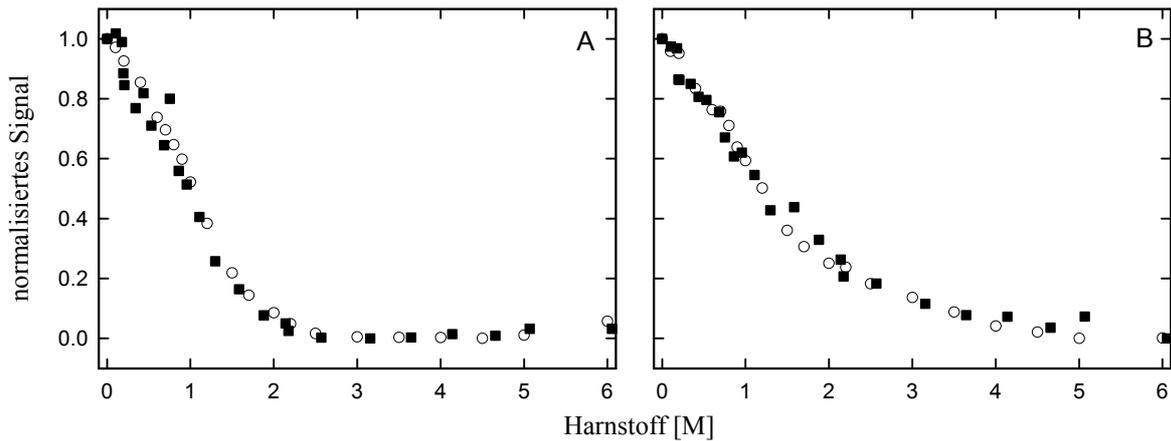


Abbildung 3.27 Harnstoffübergang von rHsp26 im Vergleich zu nHsp26. A: Fluoreszenzspektren bei 315 nm ausgewertet B: Fern-UV-CD Übergang (Änderung der Elliptizität des Mittelwertes von 220-225 nm verfolgt). Je 0,3 mg/ml nHsp26 (○) oder rHsp26 (■) wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 mit steigenden Harnstoffkonzentrationen für 20 h bei 25°C inkubiert. Die 350 µl Proben wurden zuerst im CD und anschließend im Fluorimeter untersucht.

Eine detektierbare Änderung der Stabilität von rHsp26 gegenüber Harnstoff im Vergleich zu nHsp26 konnte durch die Inkubation in Gegenwart von Harnstoff nicht beobachtet werden (Abbildung 3.27). Beide Harnstoffübergänge waren identisch.

Temperaturinduzierte dynamische Änderungen des Oligomerisierungsgrades sind eine Voraussetzung für die Chaperonaktivität von nHsp26. Unterschiede in der Chaperonaktivität von rHsp26 im Vergleich zu nHsp26 konnten nicht festgestellt werden. Es stellte sich die Frage, ob rHsp26 wie auch nHsp26 unter erhöhten Temperaturen in eine aktive, dimere Spezies dissoziiert.

Um die Temperaturabhängigkeit der Komplexstabilität von rHsp26 und nHsp26 zu untersuchen, wurden je 3 µM nHsp26 und rHsp26 direkt auf die unterschiedlich temperierte Gelfiltrationssäule aufgetragen. In Abbildung 3.28 ist zu erkennen, dass der reassozierte Komplex schneller dissoziiert als nHsp26. Während die Dissoziation von nHsp26 erst bei 32°C beginnt (sehr langsam), kann die Dissoziation von rHsp26 bereits bei 30°C deutlich verfolgt werden (nicht gezeigt). Bei 35°C ist der oligomere rHsp26 Komplex vollständig in die dimere Spezies übergegangen. nHsp26 hingegen liegt noch als Oligomer vor. Selbst bei 38°C ist nHsp26 unter diesen Versuchsbedingungen noch nicht vollständig dissoziiert.

Die Tatsache, dass rHsp26 viel schneller dissoziiert als nHsp26 deutet daraufhin, dass rHsp26 eine Art aktivierte Vorstufe ist, die nach einem ersten Stressimpuls auf den nächsten Stressauslöser wartet, um dann schneller als Chaperon aktiv zu werden.

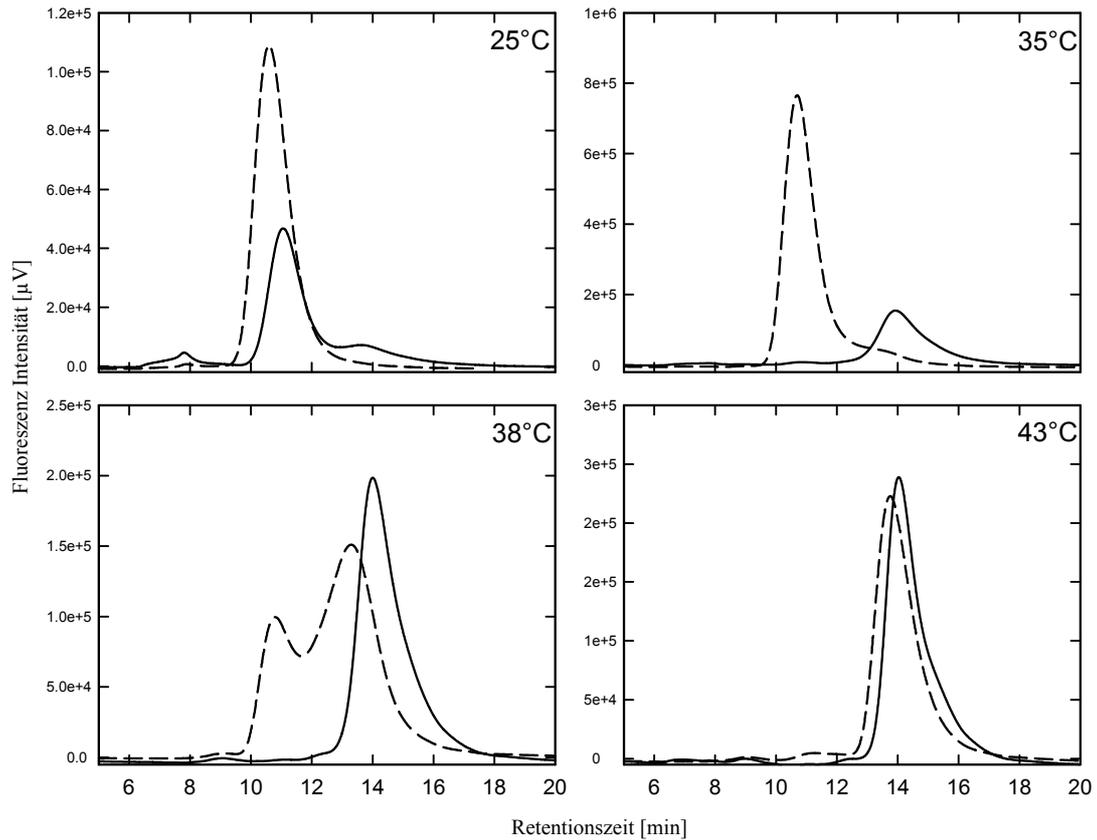


Abbildung 3.28 Dissoziation von rHsp26 erfolgt schneller als die von nHsp26. Jeweils $3\ \mu\text{M}$ nHsp26 (---) oder rHsp26 (—) wurden in $40\ \text{mM}$ Hepes-KOH, pH 7,5 auf die bei der angegebenen Temperatur temperierte Gelfiltrationssäule aufgetragen. Probenvolumen: $20\ \mu\text{l}$, gain 100, Anregung $280\ \text{nm}$, Emission $323\ \text{nm}$, Laufgeschwindigkeit $0,75\ \text{ml/min}$.

3.4 Charakterisierung der Interaktion von Hsp26 mit Substratproteinen

Wie viele andere kleine Hitzeschockproteine ist auch Hsp26 in der Lage unterschiedliche, aggregationsanfällige Modellsubstrate zu binden (Walke, 1996; Stromer, 1998). Dabei stellte sich die Frage, ob Art und Stabilität der Interaktion variieren. Lee et al. (1997) zeigten für pflanzliches Hsp18.1, dass verschiedene Substrate mit unterschiedlichen Stöchiometrien gebunden werden, was zur Ausbildung unterschiedlich großer sHsp-Substratkomplexe führte. Um diese Beobachtung auch mit Hefe Hsp26 zu überprüfen und näheren Einblick in die Art der Interaktion mit Substrat zu bekommen, wurden vier verschiedene, etablierte *in vitro* Substrate untersucht: Citratsynthase (CS), Rhodanase, α -Glukosidase (α -Gluk) und Insulin. Ein häufig verwendetes Testsubstrat ist CS. Sie bildet ein Homodimer (49 kDa pro Untereinheit), das bei Temperaturen ab 40°C, die dem zellulären Hitzeschock entsprechen, inaktiviert wird, wobei irreversible Aggregation auftritt (Srere, 1966; Buchner *et al.*, 1998b). Monomere Rhodanase (33 kDa) besteht aus zwei strukturellen Domänen, die bei Temperaturerhöhung (44°C), hydrophobe Oberflächen exponieren und aggregieren (Mendoza *et al.*, 1992; Bhattacharyya & Horowitz, 2001). Als weiteres Testsubstrat wurde die Interaktion von Hsp26 mit cytoplasmatischer, monomerer α -Glukosidase (68,5 kDa) aus *S. cerevisiae* untersucht (Kopetzki *et al.*, 1989). α -Glukosidase aggregiert bei Temperaturen um 46°C. Um ein breites Größenspektrum abzudecken, wurde noch Insulin (5,8 kDa) verwendet. Nach Reduktion der interchenaren Disulfidbrücken aggregiert die B-Kette schnell, die A-Kette hingegen bleibt in Lösung (Sanger, 1949; Horwitz *et al.*, 1998). Mit einer molekularen Masse von 3,3 kDa ist die B-Kette von Insulin um einen Faktor 10 bis 30 kleiner als Rhodanase oder CS. Da die reduktionsinduzierte Aggregation der Insulin B-Kette auch bei niedrigen Temperaturen erfolgt, kann die hitzeschockunabhängige Chaperonfunktion von sHsps dadurch näher charakterisiert werden. Damit wurde eine große Bandbreite an Substraten, mit unterschiedlichen molekularen Massen (4-100 kDa), abgedeckt.

3.4.1 Der Einfluss von Hsp26 auf die Aggregation von Modellsubstraten

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Hsp26 die thermische Aggregation von CS zu unterdrücken vermag (Walke, 1996; Stromer, 1998). Die Chaperonfunktion von Hsp26 ist

dabei nicht nur auf CS beschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass Hsp26 auch die chemisch induzierte Aggregation der Insulin B-Kette unterdrückt (Walke, 1996; Stromer, 1998) und die von α -Laktalbumin verlangsamt (Stromer, 1998).

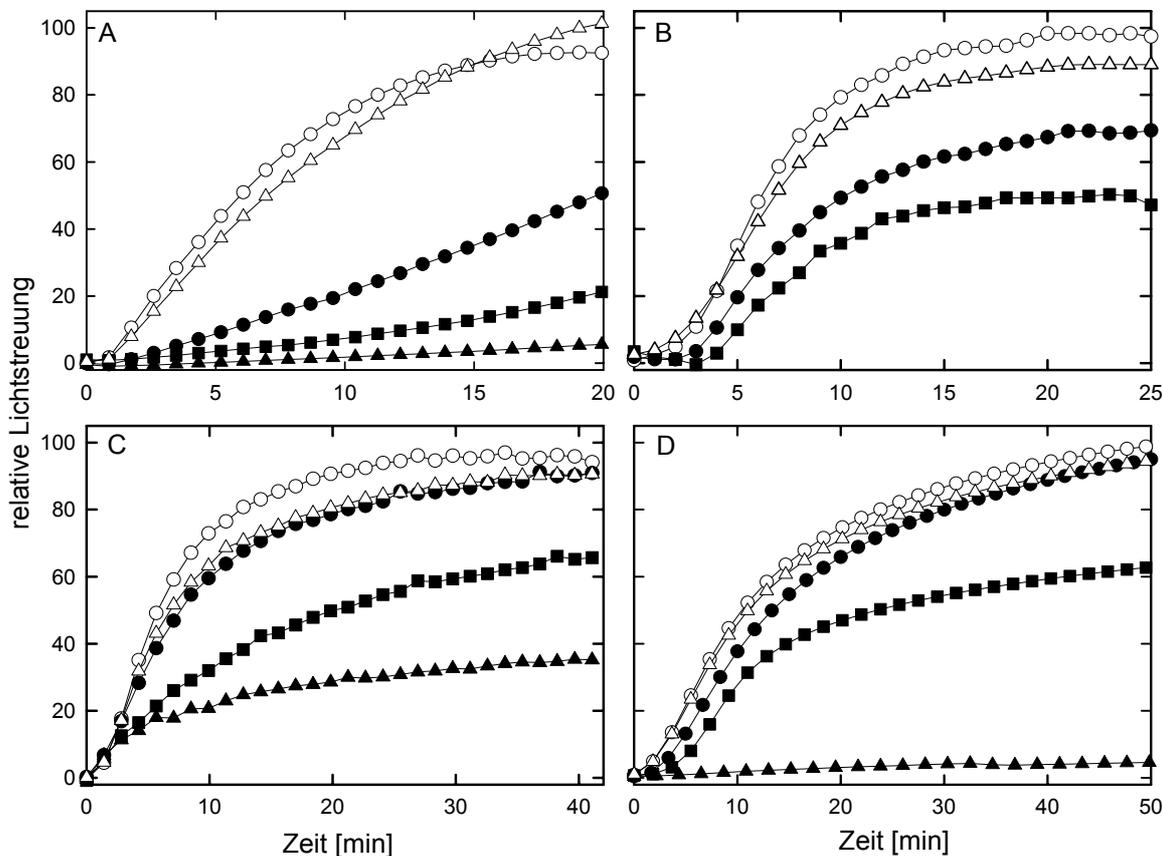


Abbildung 3.29 Einfluss von Hsp26 auf die Aggregation von Modellsubstraten. Die Aggregationskinetik wurde durch Messung der Lichtstreuung bei 360 nm aufgenommen. In allen Ansätzen diente IgG als Kontrolle für unspezifische Proteineffekte. **A:** *Thermische Aggregation von CS bei 43°C.* CS (150 nM) wurde in eine temperierte Lösung in Abwesenheit (\circ) oder Anwesenheit von 1 μ M (\bullet), 1,7 μ M (\blacksquare) und 3,4 μ M Hsp26 (\blacktriangle) oder 1 μ M IgG (\triangle) verdünnt. **B:** *Thermische Aggregation von Rhodanase bei 44°C.* 0,3 μ M Rhodanase wurde in Abwesenheit (\circ) und Anwesenheit von 3 mM (\bullet) und 6 μ M (\blacksquare) Hsp26 oder in Gegenwart von 3 μ M IgG (\triangle) inkubiert. **C:** *Thermische Aggregation von α -Glukosidase bei 46°C.* α -Gluk (0,25 μ M) wurde alleine (\circ) oder in Gegenwart von 1 μ M (\bullet), 2,5 μ M (\blacksquare), 4 μ M (\blacktriangle) Hsp26 oder 2,5 μ M IgG (\triangle) inkubiert. **D:** *Chemisch induzierte Aggregation von Insulin bei 43°C.* Insulin wurde zu einer Konzentration von 45 μ M in Inkubationspuffer verdünnt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von DTE (Endkonzentration: 20 mM). Die Zunahme der Absorption bei 360 nm wurde in Abwesenheit von 0,42 μ M (\bullet), 1 μ M (\blacksquare) und 10,4 μ M (\blacktriangle) Hsp26 oder 1,8 μ M IgG (\triangle) und in Abwesenheit zusätzlicher Proteinkomponenten (\circ) verfolgt.

Die Inkubation von CS bei 43°C führt innerhalb von 10 Minuten zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität (siehe Abbildung 3.35) (Ehrnsperger *et al.*, 1997b; Haslbeck *et al.*, 1999). Die damit einhergehende Aggregation des Enzyms kann durch Lichtstreuungsmessungen bestimmt werden (Abbildung 3.29 A). Die Zugabe eines 7-fachen

molaren Überschusses an IgG als unspezifisches Kontrollprotein beeinflusste die Kinetik der Aggregation nicht wesentlich. Steigende Konzentrationen an Hsp26 führten dagegen zu einer Verlangsamung und deutlichen Unterdrückung der CS Aggregation. Eine komplette Unterdrückung der Aggregation konnte selbst durch Zugabe eines 23-fachen molaren Überschusses an Hsp26 nicht erreicht werden. Dies deutet daraufhin, dass nicht alle aggregationsanfällige Intermediate von Hsp26 stabil gebunden werden können. Möglicherweise streuen auch die großen Hsp26-CS Komplexe Licht und sind für dieses geringe Restsignal verantwortlich.

Rhodanase aggregiert mit einer ähnlichen Kinetik wie CS (Abbildung 3.29 B). Substöchiometrische Mengen an Hsp25 sind bereits in der Lage, die Aggregation von Rhodanase deutlich zu unterdrücken (Ehrnsperger, 1998; Stromer *et al.*, 2003). Ein 10-facher Überschuss an Hsp26 ist notwendig, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen. Selbst ein 20-facher Überschuss führt nur zu einer halbmaximalen Unterdrückung des Signals. Eine komplette Unterdrückung der Aggregation konnte selbst durch weitere Hsp26 Zugabe nicht erreicht werden.

Auch bei der thermisch induzierten Präzipitation von α -Glukosidase (Abbildung 3.29 C) zeigte die Zugabe von IgG, als Kontrolle für unspezifische Proteineffekte, keinen Einfluss auf die Aggregation des Enzyms. Ein Überschuss an Hsp26 wurde benötigt, um das Lichtstreuungssignal signifikant zu unterdrücken. Eine komplette Unterdrückung der Aggregation konnte nicht beobachtet werden. Das restliche Signal deutet entweder auf das Vorhandensein von Entfaltungsintermediaten, die nicht stabil gebunden werden können, oder auf die Streuung des Lichtes durch große Hsp26-Substrat Komplexe hin.

Nach Zugabe von DTE, aggregiert die B-Kette von Insulin innerhalb von 60 min (Abbildung 3.29 D). Die „chemisch“ induzierte Aggregation von Insulin kann über einen weiten Temperaturbereich verfolgt werden. Bei 25°C konnte ein konzentrationsabhängiger Einfluss von Hsp26 auf die Unterdrückung der Aggregation von Insulin beobachtet werden (Stromer, 1998). Wird das Experiment mit den gleichen Mengen Hsp26 bei 43°C durchgeführt, ist der Effekt auf Insulin viel stärker. Ein Verhältnis von 4:1 (Insulin zu Hsp26 Monomer) wurde unter Hitzeschocktemperaturen benötigt, um die Aggregation von Insulin nahezu komplett zu unterdrücken. Das 24-mer, die vorherrschende Spezies von Hsp26 bei 25°C, scheint weniger aktiv zu sein als die Hitzeschockform, das Dimer. Die Dissoziation des Komplexes in Dimere ist eine Voraussetzung für die volle Chaperonaktivität von Hsp26.

In Gegenwart von Hsp25 erfolgte die komplette Unterdrückung der Aggregation bei 25°C bereits bei einem Verhältnis von 6:1 (Insulin:Hsp25 Monomer) (Ehrnsperger, 1998; Stromer *et al.*, 2003).

3.4.2 Untersuchung von Hsp26-Substrat Komplexen mittels Gelfiltration

Nachdem nachgewiesen war, dass Hsp26 mit allen untersuchten Substratmolekülen interagiert, sollte diese Komplexbildung mittels Gelfiltration näher untersucht werden.

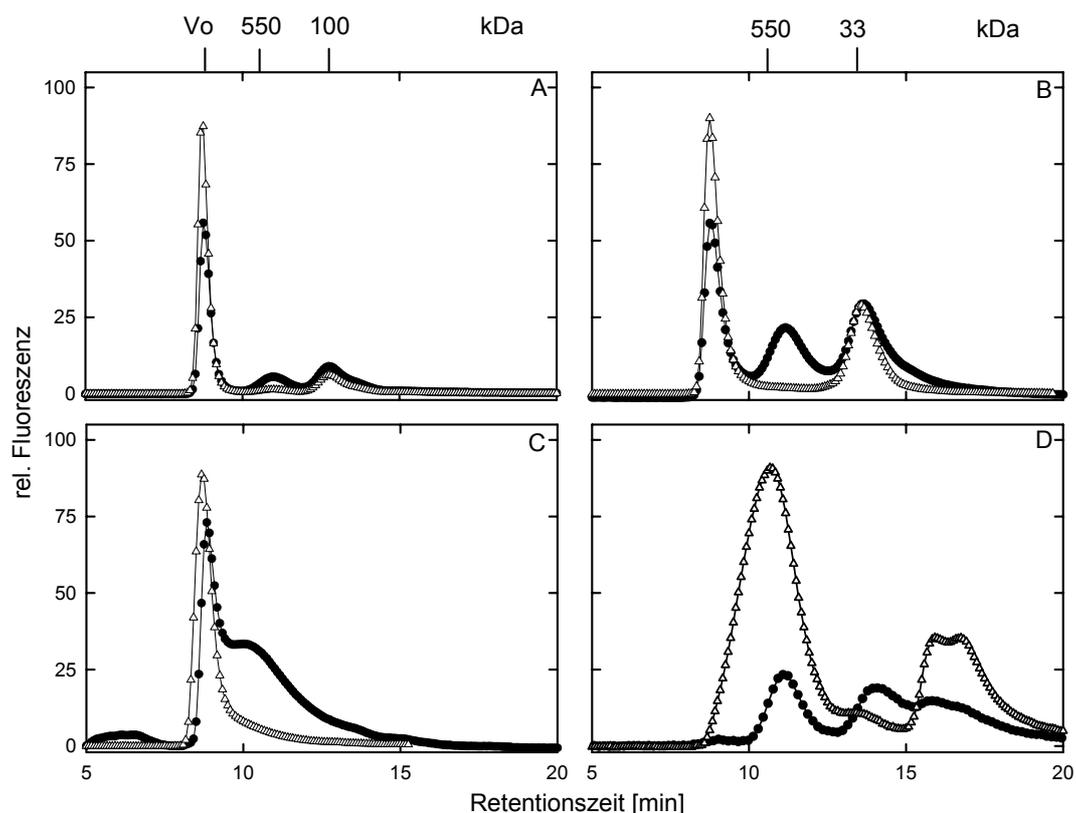


Abbildung 3.30 Analyse von Hsp26-Substrat Komplexen mittels Gelfiltration. Alle Proben wurden in 40 mM HEPES-KOH, pH 7,5 inkubiert und auf eine bei 25°C temperierte TSK4000PW Säule aufgetragen. Die Elution wurde in 0,1 M HEPES-KOH, 150 mM KCl, pH 7,5 mit einer Flussrate von 0,75 ml/min und einem Probenvolumen von 100 µl durchgeführt. Eluierendes Protein wurde mittels Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 323 nm detektiert. **A:** Komplexbildung mit CS 3 µM Hsp26 wurden in Gegenwart von 0,75 µM (●) oder 1,5 µM (Δ) CS für 15 min bei 43°C inkubiert **B:** Komplexbildung mit Rhodanase 3 µM Hsp26 wurden in Gegenwart von 1 µM (●) oder 6 µM (Δ) Rhodanase für 45 min bei 44°C inkubiert. **D:** Komplexbildung mit α-Glukosidase 3 µM Hsp26 wurden in Gegenwart von 3 µM (●) oder 6 µM (Δ) α-Gluk für 30 min bei 46°C inkubiert. **E:** Komplexbildung mit Insulin 3 µM Hsp26 wurden in Gegenwart von 10 µM (●) oder 45 µM (Δ) Insulin für 60 min bei 43°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM DTE gestartet.

Bei 25°C eluierte Hsp26 als ein distinkter Peak mit einem apparenten Molekulargewicht von 550 kDa, während bei 43°C Hsp26 nur noch als kleine, dimere Spezies eluierte. Wurde das Dimer auf eine bei 25°C temperierte Säule aufgetragen, reassozierte es zum Oligomer (vgl. Abbildung 3.20). Wurden Hsp26 und CS zusammen bei 25°C inkubiert und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, konnten zwei deutlich getrennte Signale (vgl. Abbildung 3.39), mit Retentionszeiten von 10,7 min für Hsp26 und 12,8 min für CS detektiert werden. Nach Inkubation der beiden Proteine unter Hitzeschockbedingungen verschwanden beide Peaks nahezu komplett und ein zusätzlicher Peak (Retentionszeit 8,8 min) im Ausschlussvolumen der Säule (1500 kDa) wurde detektiert (Abbildung 3.30 A). Im Falle von Rhodanase (Retentionszeit von 13,4 min) wurde die Ausbildung eines ähnlichen Komplexpeaks im Ausschlussvolumen der Säule beobachtet (Abbildung 3.30 B). In beiden Fällen konnte auch bei geringen Substratkonzentrationen kein Auftreten von Zwischenformen beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von Hsp26 mit α -Glukosidase oder Insulin zum Auftreten von Zwischenstufen (Abbildung 3.30 C, D).

α -Glukosidase eluiert mit einer Retentionszeit von 13,0 min. Insulin ist zu klein, um mit dieser Säule (TSK4000PW; Trennbereich von 10-1500 kDa) alleine aufgetrennt zu werden. Nach Hitzeschockinkubation wandert Hsp26 gemeinsam mit α -Glukosidase oder Insulin in einem hocholigomeren Komplex, der zunächst jedoch kleiner ist als das Assoziat mit CS. Während anhaltender Inkubation unter Stressbedingungen vergrößerten sich die Substratkomplexe bis, im Falle von α -Glukosidase, das gesamte Protein im Ausschlussvolumen eluierte (Abbildung 3.30 C). Bei Insulin war auch nach längerer Inkubation unter Reduktions- und Hitzeschockbedingungen, der Komplexpeak im Trennbereich der Säule. Komplexe in einer Größenordnung von 550 kDa bis 1 MDa wurden detektiert.

Die Untersuchung der Substratbindung an Hsp26 mittels Gelfiltration deutet auf eine unterschiedliche Kinetik der Komplexbildung hin. Für alle Komplexpeaks wurde mittels SDS-PAGE bestätigt, dass sowohl Hsp26 als auch Substratprotein enthalten waren.

3.4.3 Stöchiometrie der Substratbindung - Kooperativität der Komplexbildung

Um die Stöchiometrie der Substratbindung zu bestimmen, wurde Hsp26 mit steigenden Konzentrationen an Substratprotein inkubiert.

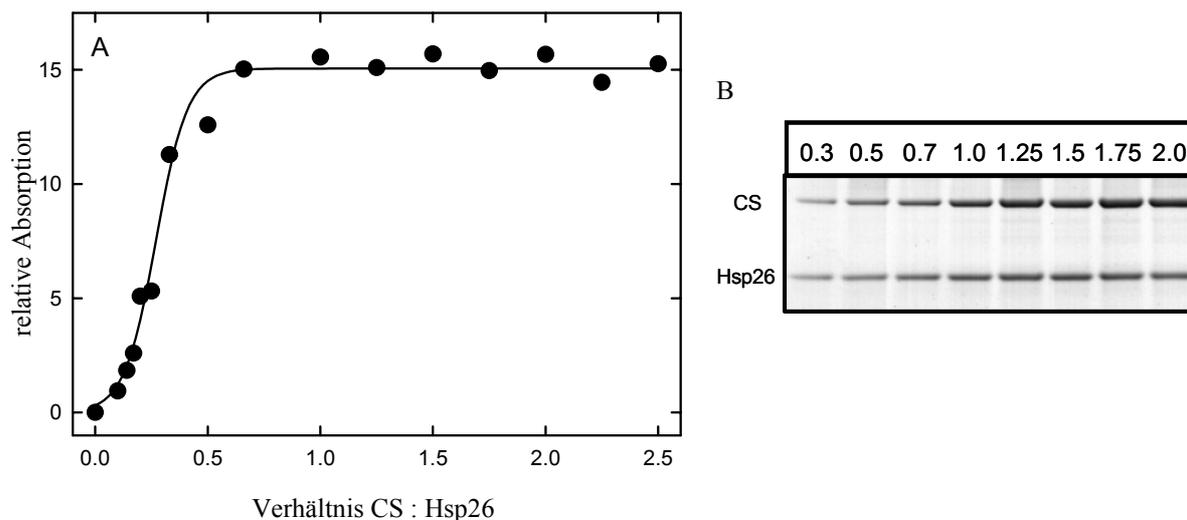


Abbildung 3.31 Stöchiometrie der Komplexbildung. **A:** Densitometrische Analyse von CS und Hsp26 in CS-Hsp26 Komplexen. Hsp26 ($3 \mu\text{M}$) wurde mit steigenden Konzentrationen an CS (von $0,3 \mu\text{M}$ bis $15 \mu\text{M}$) für 45 min bei 43°C inkubiert und auf eine TSK4000PW Säule aufgetragen. Die eluierenden Komplexe wurden aufgesammelt, präzipitiert und über SDS-PAGE untersucht. **B:** Repräsentativer Ausschnitt eines Coomassie gefärbten SDS-PAGEs, das in der Analyse verwendet wurde. Die CS und Hsp26-Banden wurden densitometrisch ausgewertet, um die molaren Verhältnisse von CS und Hsp26 im Komplex zu bestimmen. Die Verhältnisse beziehen sich auf molare monomere Konzentrationen.

Hsp26 ($3 \mu\text{M}$) und CS ($0,3 \mu\text{M}$ bis $15 \mu\text{M}$) wurden für 45 min bei 43°C inkubiert. Zur Komplexstabilisierung erfolgte eine anschließende 10minütige Inkubation bei 25°C . Die Proben wurden mittels Gelfiltration aufgetrennt, der Komplexpeak im Ausschlussvolumen der Säule aufgesammelt und nach Fällung mittels SDS-PAGE analysiert. Die Zusammensetzung der Proteinmengen im Komplexpeak wurde durch densitometrische Analyse bestimmt (Abbildung 3.31 A). Voll beladene Komplexe wurden von Anfang an gebildet. Das Auftreten von Zwischenstufen wurde nicht beobachtet (vgl. Abbildung 3.30 A und 3.4.2). Steigende molare Verhältnisse von CS zu Hsp26 führten zu einer sigmoiden Zunahme von gebundener CS im Hsp26-CS Komplex. Dies zeigt deutlich, dass die Ausbildung der großen Hsp26-CS Komplexe ein hoch kooperativer Prozess ist. Die maximale Bindekapazität ist bei einem Verhältnis von einem CS Monomer pro Hsp26 Dimer erreicht.

Für α -Glukosidase konnte keine Kooperativität in der Komplexbildung beobachtet werden (nicht gezeigt). Intermediäre Zustände treten bei der Substratbindung auf. Die Komplexgröße ist von der Substratkonzentration sowie von der Inkubationsdauer abhängig.

3.4.4 Elektronenmikroskopische Analyse von Hsp26-Substrat Komplexen

Die Substrat-abhängige Komplexbildung zwischen nicht nativem Protein und Hsp26 wurden in einem weiteren Analyseschritt durch Elektronenmikroskopie (EM) untersucht.

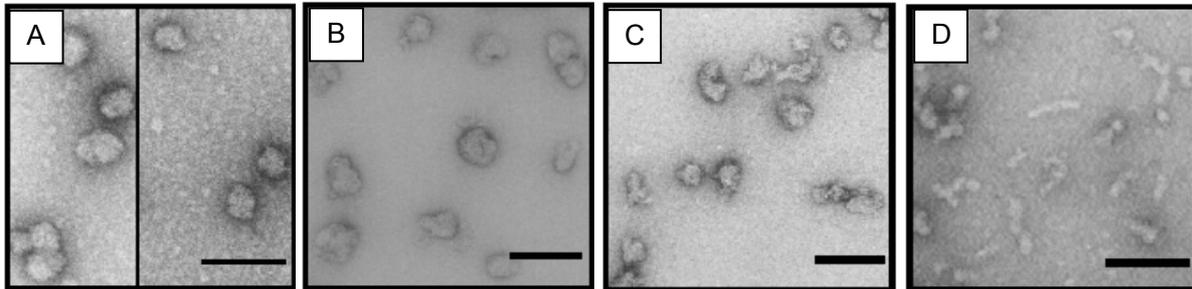


Abbildung 3.32 Elektronenmikroskopische Charakterisierung von Hsp26-Substrat Komplexen.

Die nominale Vergrößerung betrug 33 000. Die Länge des Skalierungsbalkens entspricht 100 nm. **A:** *Hsp26-CS-Komplexe*. 3 μM Hsp26 wurden in Gegenwart von 1,5 μM CS für 30 min bei 43°C inkubiert. **B:** *Hsp26-Rhodanase-Komplexe*. 1 μM Rhodanase wurden in Gegenwart von 3 μM Hsp26 für 30 min bei 44°C inkubiert. **C:** *Hsp26- α -Glukosidase-Komplexe*. 6 μM α -Glukosidase wurden für 40 min bei 46°C in Gegenwart von 3 μM Hsp26 inkubiert. **D:** *Hsp26-Insulin-Komplexe*. 10,8 μM Insulin wurden nach Zugabe von 20 mM DTE in Gegenwart von 3,4 μM Hsp26 bei 43°C für 60 min inkubiert.

Die Hsp26-Substrat Komplexe wurden unter ähnlichen Bedingungen wie bei den Gelfiltrationsexperimenten gebildet (siehe 3.4.2). Nach Auftrennung der Proben mittels Gelfiltration wurden die eluierenden Komplexe aufgesammelt und unmittelbar auf die Kupfernetzchen aufgetragen. Die Präparation erfolgte wie in Material und Methoden (2.7.2) beschrieben. Zum Vergleich wurden die Substrate auch in Abwesenheit von Hsp26 bei den jeweiligen Inaktivierungsbedingungen inkubiert und analysiert. Alle Substratproteine präzipitierten als große amorphe Netzwerke (nicht gezeigt) (Stromer *et al.*, 2003). In Anwesenheit von Hsp26 bildeten sich dagegen definierte hocholigomere Strukturen aus (Abbildung 3.32). Die Komplexe zwischen Hsp26 und Testsubstraten unterscheiden sich deutlich in ihrer Struktur. Die Interaktion mit CS und Rhodanase führte zur Bildung von globulären Partikeln, wobei die Hsp26-CS Assoziate (Abbildung 3.32 A) mit einem mittleren Durchmesser von ~ 50 nm regelmäßiger erscheinen als die Assoziate mit Rhodanase, deren mittlerer Durchmesser ~ 45 nm beträgt (Abbildung 3.32 B). Im Falle von α -Glukosidase sind die Partikel weniger regelmäßig, aber immer noch globulär bis oval, mit einem mittleren Durchmesser von ~ 30 nm (Abbildung 3.32 C). Im Gegensatz dazu, resultierte die Bindung von Insulin an Hsp26 in der Ausbildung länglicher Strukturen, deren Durchmesser etwa

einem Hsp26 Partikel von 15 nm entsprach. Die Assoziation dieser Strukturen führte zu fibrillären Netzwerken.

3.4.5 Ausbildung gemischter Hsp26-Substrat Komplexe

Nachdem die Komplexe von Hsp26 mit CS oder α -Glukosidase unterschiedliche Morphologien zeigten, wurde untersucht, ob gemischte Komplexe zwischen Hsp26 und verschiedenen Substraten ausgebildet werden können. Dazu wurden die beiden Substrate entweder nacheinander oder zusammen mit Hsp26 inkubiert. Die resultierenden Komplexe wurden mittels Gelfiltration und Elektronenmikroskopie untersucht.

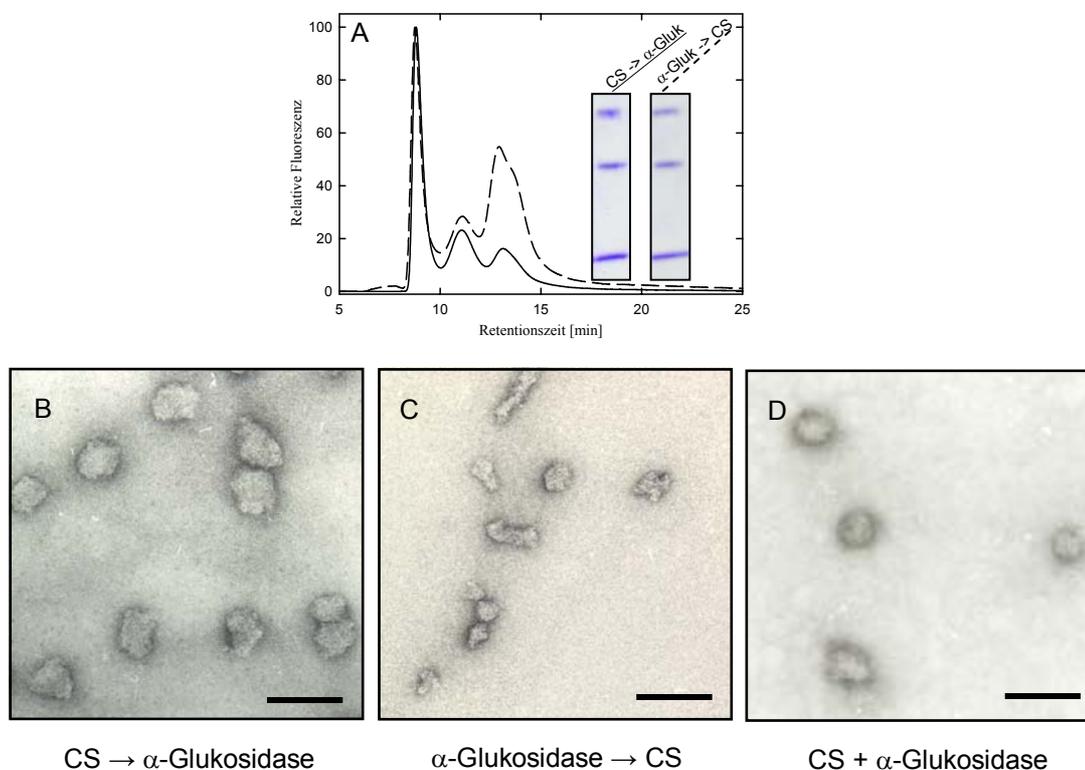


Abbildung 3.33 Bildung gemischter Komplexe zwischen CS, α -Glukosidase und Hsp26. A: 3 μ M Hsp26 wurden in Gegenwart von 1,5 μ M α -Gluk für 15 min bei 44°C inkubiert, anschließend wurden 1,5 μ M CS zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Der resultierende Komplexpeak wurde mittels SEC (---) analysiert. In einem weiteren Experiment wurde die Reihenfolge der Substratzugabe umgedreht, Hsp26 und CS wurden zuerst inkubiert (—). Die jeweiligen Komplexe wurden aufgefangen, präzipitiert und auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Die Komplexproben wurden im Anschluss direkt auf ein Kupfernnetzchen aufgebracht und im EM untersucht. *Elektronenmikroskopische Aufnahmen der gemischten Komplexe:* B: Hsp26 und CS wurden zuerst inkubiert bevor α -Gluk zugegeben wurde. C: Hsp26 und α -Gluk wurden vor Zugabe von CS inkubiert. D: CS und α -Gluk wurden zusammen mit Hsp26 für 30 min bei 44°C inkubiert. Die Länge des Skalierungsbalkens entspricht 100 nm.

Die Profile der Gelfiltrationsläufe der gemischten Komplexe waren mit denen der getrennten Untersuchung der Komplexbildung vergleichbar. Freie CS und α -Glukosidase waren in beiden Fällen noch festzustellen, es war also nicht alles Protein gebunden worden. Die Untersuchung mittels SDS-PAGE zeigte, dass im Substratkomplex alle drei Proteine enthalten waren, Hsp26 sowie CS und α -Glukosidase (Abbildung 3.33 A). Die Untersuchung dieser Komplexe mittels Elektronenmikroskopie zeigte, dass die Komplexe, die unter gleicher Bedingung hergestellt wurden, homogene Größen und Formen aufweisen (Abbildung 3.33 B, C).

Wurde Hsp26 vor der α -Glukosidase Zugabe mit CS inkubiert, zeigten die Komplexe deutliche Ähnlichkeiten zu den Strukturen die bei der alleinigen Inkubation von CS und Hsp26 beobachtet wurden (siehe Abbildung 3.32 A und Abbildung 3.33 B). Die Vorinkubation von Hsp26 mit α -Glukosidase führte zur Ausbildung von typischen α -Glukosidase-Hsp26 Komplexen (siehe Abbildung 3.32 C und Abbildung 3.33 C). Das erste Substrat, mit dem Hsp26 vorinkubiert wurde, scheint die Morphologie der Hsp26-Substrat Komplexe zu bestimmen. Auch wenn alle drei Proteine gleichzeitig inkubiert wurden, wurden gleichmäßige Partikel gebildet. Die meisten dieser Assoziate zeigten Formen ähnlich zu den Hsp26-CS Komplexen, zu denen α -Glukosidase nachträglich zugegeben wurde (vgl. Abbildung 3.32 A und Abbildung 3.33 D). Die Komplexe waren jedoch, mit Durchmessern um 35-40 nm deutlich kleiner als Hsp26-CS Komplexe. Diese Größe liegt zwischen den Durchmessern der gemischten Komplexe, die in Abbildung 3.33 B und C beobachtet wurden. Da bei gleichzeitiger Zugabe von CS und α -Glukosidase CS-Hsp26 ähnliche Komplexe ausgebildet werden, wird postuliert, dass CS eine höhere Bindungsaffinität zu Hsp26 aufweist als α -Glukosidase.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mehrere unterschiedliche Substrate gleichzeitig an Hsp26 binden können. Die Bindung resultiert in der Ausbildung großer, individueller Komplexe. Die Morphologie wird vom ersten gebundenen Substrat bestimmt.

Die gleichzeitige Inkubation von Hsp26, CS und Rhodanase führt ebenfalls zur Ausbildung gleichmäßiger globulärer Komplexe mit Durchmessern zwischen 45 und 50 nm (Abbildung 3.34 A und D), wie bereits für Hsp26-CS und Hsp26-Rhodanase Komplexe beobachtet (vgl. Abbildung 3.32 A und B). Hsp26 ist nicht nur in der Lage, zwei verschiedene Substrate gleichzeitig zu binden. Werden Hsp26, CS, α -Glukosidase und Rhodanase miteinander unter Hitzeschockbedingungen inkubiert, ist noch freies Substrat detektierbar (Abbildung 3.34 B),

aber es kommt auch zur Ausbildung großer Komplexe, die im Ausschlussvolumen der Säule eluieren. Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Komplexpeaks zeigt, dass inhomogene Partikel mit Durchmessern von 25 bis 50 nm ausgebildet wurden (Abbildung 3.34 B und D). Die Komplexe ähneln einer Mischung der in Abbildung 3.32 A-C dargestellten Substratkomplexen.

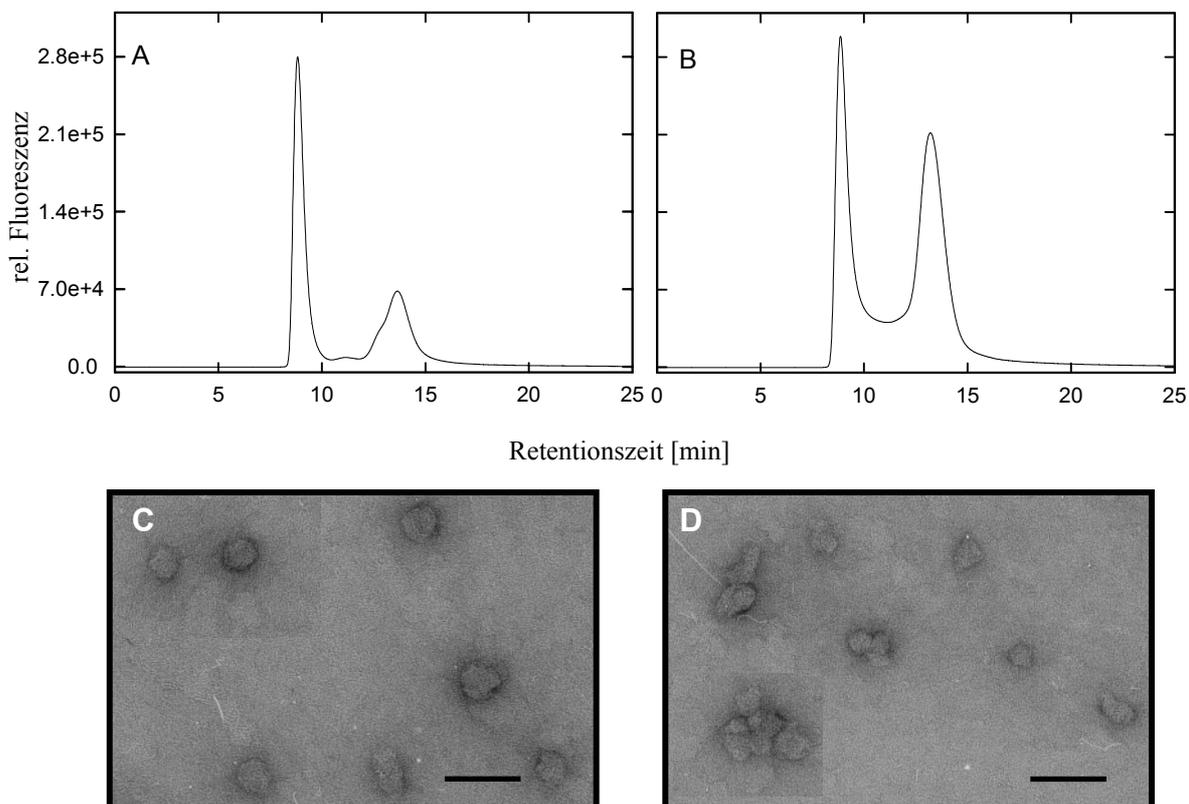


Abbildung 3.34 Bildung gemischter Komplexe mit Hsp26, CS, Rhodanase und α -Glukosidase. **A** und **C**: Gelfiltrationslauf und Elektronenmikroskopische Aufnahme nach Inkubation von 3 μ M Hsp26 mit 1,5 μ M CS und 1,5 μ M Rhodanase für 30 min bei 44°C. Die Spitze des Komplexpeaks wurde aufgesammelt und auf ein Kupfernetzchen aufgebracht. **B** und **D**: Gelfiltrationslauf und Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hsp26 (3 μ M), CS (1,5 μ M), α -Glukosidase (1,5 μ M) und Rhodanase (1,5 μ M) nach 30 min bei 44°C. Die Spitze des Komplexpeaks wurde auf ein Kupfernetzchen aufgebracht. Der Skalierungsbalken entspricht 100 nm.

Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass das primär gebundene Substrat die Morphologie der resultierenden Substratkomplexe bestimmt. Weiterhin wird die Promiskuität der Substratbindung kleiner Hsps bestätigt.

3.4.6 Der Einfluss von Hsp26 auf die thermische Entfaltung von Modellsubstraten

Der Verlust der enzymatischen Aktivität ist im Vergleich zur Aggregation ein früher Schritt im Entfaltungsprozess von Substratproteinen (Buchner *et al.*, 1998a).

Thermisch entfaltete CS verliert unter den hier verwendeten Bedingungen (43°C) sehr schnell ihre Aktivität (Abbildung 3.35). Äquimolare Verhältnisse von Hsp26 zu CS führen noch zu keiner Beeinflussung der Inaktivierung von CS. Mit höheren Hsp26 Konzentrationen lässt sich aber eine signifikante Verlangsamung der thermischen Inaktivierung von CS beobachten. Bei einem Verhältnis von 10:1 (Hsp26:CS, Monomere) konnte eine deutliche Verlangsamung der Inaktivierung erzielt werden. Ab einem 20fachen Überschuss an Hsp26 konnten nur noch geringe Änderungen der Inaktivierung beobachtet werden. Der kinetische Verlauf der Inaktivierung lässt sich mit einer einfachen Exponentialfunktion, mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k = 0,7 \text{ min}^{-1}$ beschreiben.

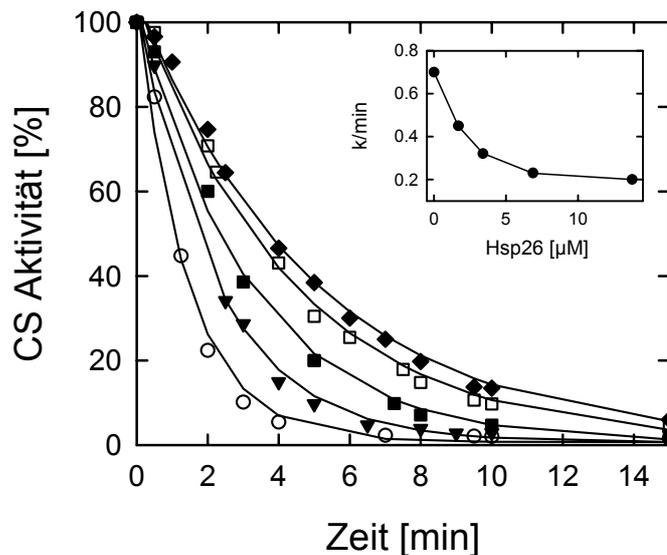


Abbildung 3.35 Einfluss von Hsp26 auf die thermische Inaktivierung von Citratsynthase. Inaktivierung von CS (150 nM) bei 43°C in Abwesenheit (○) und in Anwesenheit von zunehmenden Hsp26 Konzentrationen, 1,7 µM (▼), 3,4 µM (■), 6,8 µM (□) und 13,7 µM (◆). Die Inaktivierung wurde in 40 mM HEPES-KOH, pH 7,5 durchgeführt. Zu den aufgetragenen Zeitpunkten wurde die Aktivität der CS wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, bestimmt. Die durchgezogenen Linien zeigen einen einfach exponentiellen Fit zu den entsprechenden Daten. Einsatz, Einfluss der Hsp26 Konzentrationen auf die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der thermischen Inaktivierung von CS bei 43°C.

Steigende Konzentrationen an Hsp26 führen zur Verlangsamung der Inaktivierung mit Geschwindigkeitskonstanten von $0,49 \text{ min}^{-1}$ bis $0,2 \text{ min}^{-1}$. Diese Beobachtung lässt auf eine

transiente Bindung von frühen CS Intermediaten an Hsp26 schließen, die zu einer Stabilisierung von CS führt.

Ein anderes Bild ergibt sich bei der Inaktivierung von α -Glukosidase. α -Glukosidase inaktiviert bei Hitzestress sehr schnell. Im Gegensatz zur Inaktivierung von CS kann durch eine Erhöhung der Hsp26 Konzentration keine Verlangsamung der α -Glukosidase Inaktivierung beobachtet werden. Vorausgegangene Untersuchungen mittels Gelfiltration und SDS-PAGE sowie Elektronenmikroskopie bestätigen jedoch die Bindung von Hsp26 an α -Glukosidase. Hsp26 scheint entweder keine frühen Entfaltungsintermediate von α -Glukosidase binden zu können oder die Bindung ist nicht transient, so dass das Enzym nicht rückfalten kann.

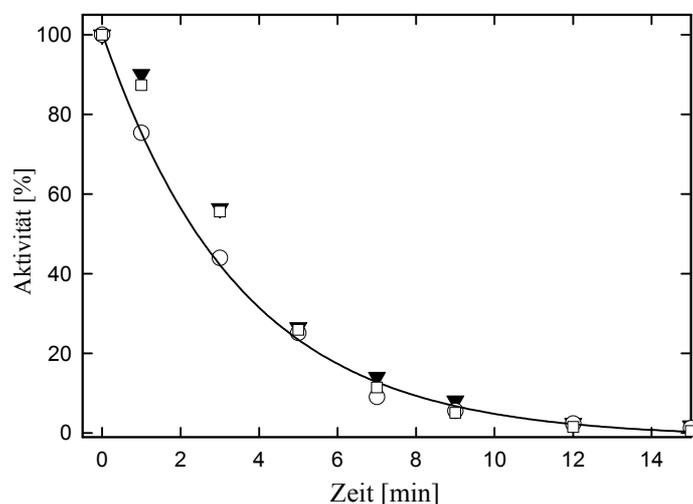


Abbildung 3.36 Einfluss von Hsp26 auf die thermische Inaktivierung von α -Glukosidase. Inaktivierung von α -Glukosidase (0,3 μ M) bei 46°C in Abwesenheit (\circ) und in Anwesenheit von 1 μ M (\blacktriangledown) und 3 μ M (\square) Hsp26. Die Inaktivierung erfolgte in 40 mM HEPES-KOH, pH 7,5. Zu den aufgetragenen Zeitpunkten wurde die Aktivität der α -Glukosidase, wie unter 2.8.2 beschrieben, bestimmt. Die Inaktivierung von α -Glukosidase kann mit einer einfach exponentiellen Gleichung beschrieben werden ($k=0,284\text{min}^{-1}$).

3.4.7 Rückfaltung von an Hsp26 gebundenen Substraten

Kleine Hitzeschockproteine sind effiziente „molekulare Schwämme“, die ungefaltete Proteine abfangen und sie in einem rückfaltbaren Zustand halten (Haslbeck, 2002; Haslbeck & Buchner, 2002). Eine spontane Loslösung und Rückfaltung von an Hsp26 gebundener CS oder α -Glukosidase konnte unter physiologischen Bedingungen noch nicht beobachtet

werden. Möglicherweise bedarf es zur korrekten Zurückfaltung nach Hitzeschock eines weiteren Chaperonsystems.

Einfluss des GroE Systems auf die Rückfaltung von CS

Bei einer transienten Bindung von CS an Hsp26, sollte ein ständiges Binden und Loslösen erfolgen. CS besitzt eine hohe Affinität zu GroEL (Grallert *et al.*, 1998). Eine mögliche Übertragung losgelöster CS von Hsp26 auf GroEL sollte mittels Gelfiltration, SDS-PAGE und CS Aktivitätstests untersucht werden. Dazu wurden Komplexe mit CS und Hsp26 bei 43°C gebildet, GroEL zugegeben und bei unterschiedlichen Temperaturen weiter inkubiert. Selbst nach 22-stündiger Inkubation bei 25, 37, oder 43°C war der Hsp26-CS Komplex stabil und eluierte im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Eine Übertragung losgelöster CS auf GroEL, durch Zunahme der Intensität des GroEL Peaks, wurde nicht beobachtet (nicht gezeigt). Reaktivierungsversuche in Gegenwart von GroEL, GroES und ATP zeigten keine Reaktivierung der CS aus Hsp26-CS Komplexen.

Dieses Ergebnis deutet einerseits auf einen sehr stabilen Substrat-Hsp26 Komplex hin. Zum anderen wird deutlich, dass wohl weitere Faktoren für die Loslösung des Substrates vom Komplex notwendig sind.

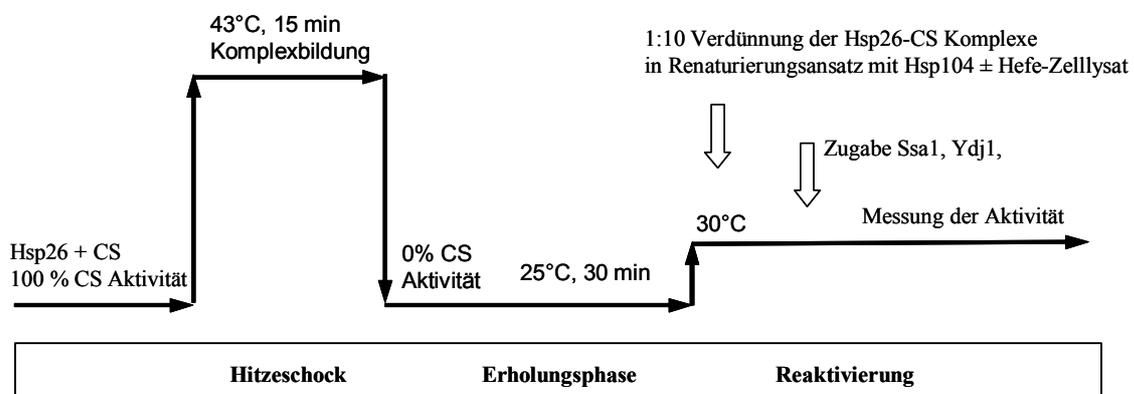


Abbildung 3.37 Schematische Darstellung der Reaktivierungsversuche. Bei 43°C, in Gegenwart verschiedener Verhältnisse von Hsp26:CS (1:5; 5:1; 2:1), vorgeformte Hsp26-CS Komplexe wurden in einen bei 30°C vortemperierten Reaktivierungsansatz mit ATP-regenerierendem System verdünnt. Nach definierten Zeitpunkten wurde die CS Aktivität gemessen. Im Reaktivierungsansatz (40 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂) war ein 20facher Überschuss an Chaperonen vorhanden.

Reaktivierung in Gegenwart von Hefe Chaperonen, Hsp104, Ssa1, Ydj1

Weitere Reaktivierungsversuche wurden mit verschiedenen Chaperonsystemen der Bäckerhefe in Gegenwart von Oxalacetat (OAA) bei 30°C durchgeführt. OAA induziert in

CS eine Umlagerung, so dass die Thermostabilität des Enzyms stark erhöht wird (Srere, 1966; Zhi *et al.*, 1991), dadurch können Rückfaltungsexperimente auch bei 30°C durchgeführt werden.

Das Gleichgewicht ist stark zur aktiven CS verschoben und die Aggregation wird somit stark verlangsamt. Die Dynamik der Substratkomplexe ist bei 30°C erhöht, dadurch sollte eine Loslösung des Substrates von Hsp26 leichter möglich sein. Abbildung 3.37 zeigt die schematische Darstellung der Reaktivierungsversuche in Gegenwart von Hefe Chaperonsystemen.

Eine Reaktivierung von CS aus Hsp26-CS Komplexen konnte durch die alleinige Zugabe von Hsp104, Ssa1 und Ydj1 nicht beobachtet werden. Es wurde angenommen, dass ein zellulärer Faktor fehlt. Allerdings konnte die Reaktivierungsausbeute auch durch die Verwendung von Hefe-Zelllysaten nicht gesteigert werden. Eventuell war die Chaperonkonzentration im Lysat zu gering. Deshalb wurden zusätzlich zum Hefe Zelllysate Hsp104, Ssa1 und Ydj1 zugegeben. Es wird postuliert, dass Hsp104 in der Lage ist Proteinaggregate aufzulösen und Hsp70 mit seinem Kochaperon Hsp40 für die Rückfaltung des Substrates verantwortlich sind (Glover & Lindquist, 1998). Ein ATP-regenerierendes System war notwendig, da Hsp104 bei 30°C einen k_{cat} von 40 min^{-1} zeigt (pers. Mitteilung, S. Walter).

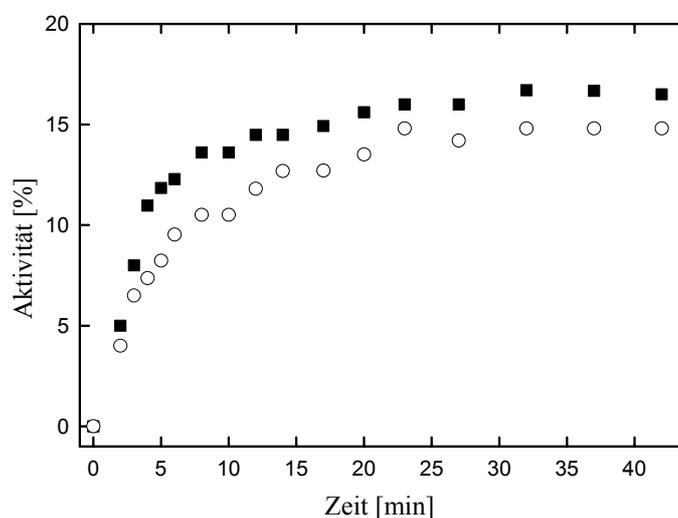


Abbildung 3.38 Reaktivierung von CS in Gegenwart von Hefe-Zelllysate und exogen hinzugefügter Chaperone, Hsp104, Ssa1 und Ydj1. Die Reaktivierung gebundener CS aus den Hsp26-CS Komplexen (○) (1,2 μM Hsp26 und 0,6 μM CS) wurden in Gegenwart von Zelllysate mit 1 μM Hsp104, 6 μM Ssa1, 18 μM Ydj1, 10 mM ATP, 3 mM PEP, 4 U PK und 1mM OAA durchgeführt. Zur Kontrolle wurde der Versuch mit CS alleine durchgeführt (■).

Unter den gewählten Bedingungen konnte CS nicht reaktiviert werden Abbildung 3.38. Da die Ausbeute an CS alleine gleich der an Hsp26 gebundener CS ist wurde wohl keine CS aus

dem Komplex losgelöst und reaktiviert. Es konnten wohl nur die noch in Lösung befindlichen CS-Intermediate zurückgefaltet werden. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 7 h, führt nicht zu einer Steigerung der Ausbeute an nativer CS.

Auch mit thermisch inaktivierter α -Glukosidase konnte keine Reaktivierung des Substrates beobachtet werden (nicht gezeigt).

Hsp104 ist in der Lage Proteinaggregate aufzulösen (Glover & Lindquist, 1998). Eine Auflösung der Hsp26-Substratkomplexe durch Hsp104 konnte allerdings auch mittels Gelfiltration nicht bestätigt werden (nicht gezeigt).

3.5 Stabilität der Hsp26-Substrat Komplexe

Hsp26 dissoziiert bei Hitzeschock zu Dimeren (siehe 3.2.1, Abbildung 3.8), die sich nach Bindung von Substrat zu definierten Substrat-Hsp26 Komplexen formieren. Es stellt sich die Frage, wie stabil diese Assoziation von Hsp26-Dimeren mit gebundener CS ist. Dazu wurden Komplexe, wie in Abbildung 3.39 schematisch zusammengefasst, hergestellt. Referenzwerte wurden vor der Hitzeschockbehandlung (Abbildung 3.39 A) und nach der Komplexstabilisierung aufgenommen (nicht gezeigt). Nach der Langzeitinkubation wurden die Proben auf eine bei 25°C temperierte Gelfiltrationssäule aufgetragen und die resultierenden Komplexpeaks rechromatographiert. Dadurch konnte einerseits eine Aussage über die Komplexstabilität bei verschiedenen Temperaturen, andererseits über die Stabilität der Substratbindung getroffen werden.

Abbildung 3.39 zeigt eine Auswahl von Gelfiltrationsläufen nach Langzeitinkubation bei unterschiedlichen Temperaturen. Bei allen untersuchten Temperaturen war der Komplexpeak stabil und entsprach dem Komplexpeak vor der Langzeitinkubation. Es konnte kein Unterschied zwischen einer Inkubation der Komplexe bei 0°C und bei 37°C beobachtet werden. Geringe Verluste waren nach Inkubation bei 43°C zu beobachten. Auch das Ergebnis der Rechromatographie der Komplexpeaks deutet auf eine hohe Stabilität der Hsp26-CS Komplexe hin. Ein Zerfall des Komplexes konnte auch durch Verdünnung nicht beobachtet werden (Abbildung 3.37 Einsatz). Selbst nach 89 h bei 25°C war der Komplex noch stabil. Ein Abdissoziieren von CS wurde nicht beobachtet (nicht gezeigt).

Auch die Komplexe aus Hsp26 und Rhodanase weisen eine hohe Stabilität auf. Mehrfaches Rechromatographieren führte nicht zum Zerfall des Komplexes. Auch ein Abdissoziieren des Substrates wurde nicht beobachtet (nicht gezeigt).

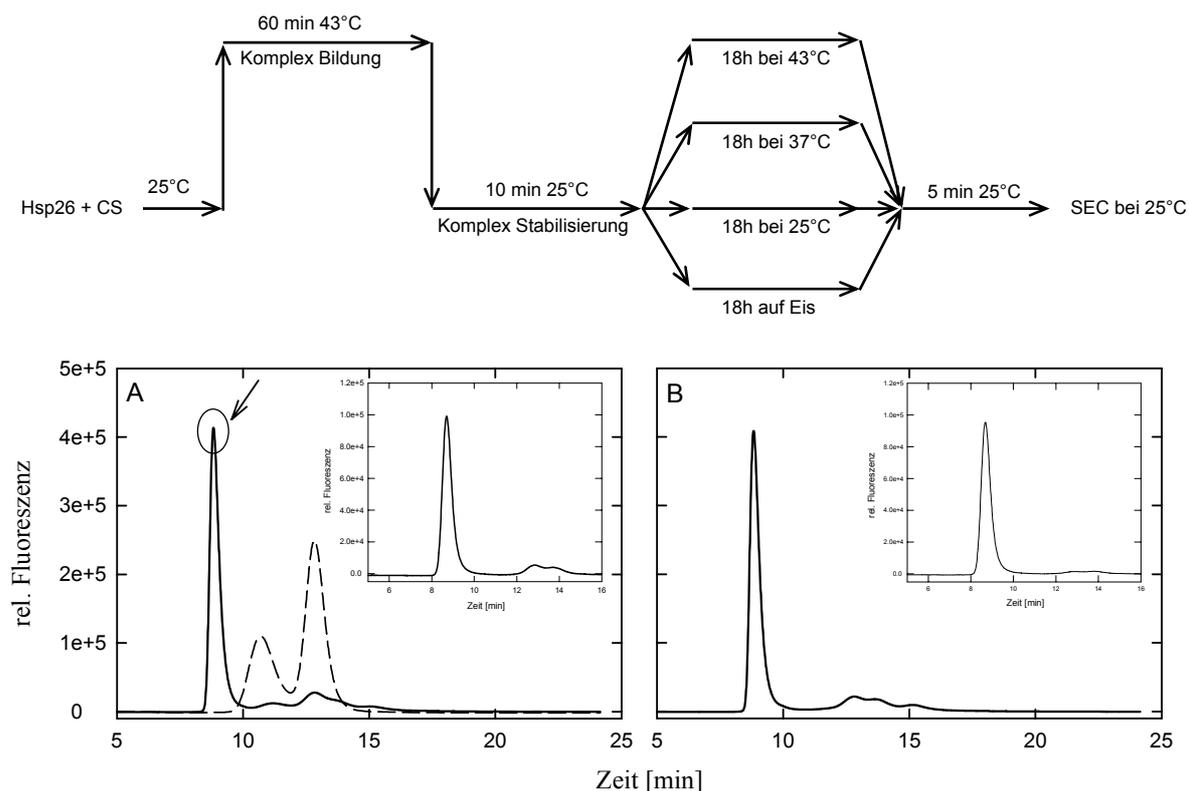


Abbildung 3.39 Untersuchung zur Stabilität der Hsp26-CS Komplexe nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen. Schema: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. 3 μM Hsp26, 1,5 μM CS und 1 mM DTE wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 für 60 min bei 43°C inkubiert. Die Hsp26-CS Komplexe wurden für 10 min bei 25°C stabilisiert, bevor sie in 150 μl Aliquots für 18 h bei Temperaturen von 0°C bis 43°C inkubiert wurden. **A:** Gelfiltrationslauf von Hsp26 und CS vor Komplexbildung (---) und nach Komplexbildung mit Inkubation bei 25°C (-). Der Pfeil deutet auf die Komplex-Peakspitze, die aufgesammelt und rechromatographiert wurde. Einsatz: Rechromatographierter Komplexpeak. **B:** Komplexpeak nach Inkubation für 18 h bei 37°C. Einsatz: Rechromatographierte Peakspitze. 100 μl Probenvolumina wurden auf eine TSK4000PW Gelfiltrationssäule aufgetragen, bei 25°C mit einer Flussrate von 0,75 ml/min, einer Anregungswellenlänge von 280 nm, Emissionswellenlänge von 323 nm in 0,1 M Hepes-KOH, 150 mM KCl, pH 7,5 eluiert. Signalverstärkung: gain 10 (gain 100 bei rechromatographierten Proben).

Als weitere Möglichkeit, die Stabilität der Hsp26-CS Komplexe zu untersuchen, wurde die chemisch induzierte Komplexdissoziation mit Hilfe chaotroper Agenzien eingesetzt.

Die Hsp26-CS Komplexe wurden in verschiedenen konzentrierte Harnstofflösungen (von 0 M bis 8 M) verdünnt und für 20 h bei 20°C inkubiert. Die Elutionsprofile der Gelfiltrationsläufe in Abbildung 3.40 A zeigen, dass der Komplex sehr schnell verschwindet. Bei 0,5 M Harnstoff sind noch ca. 20 % des ursprünglichen Signals detektierbar, bei 1 M hingegen ist der Komplex nahezu komplett verschwunden. Der Hsp26 Komplex hingegen ist bei 0,4 M Harnstoff nahezu komplett verschwunden und bei 0,5 M Harnstoff nicht mehr detektierbar (Abbildung 3.40 B).

Mittels Fluoreszenz gemessene Harnstoffübergänge der Hsp26-CS Komplexe konnten nicht ausgewertet werden, da der Komplex Übergang gleich dem CS Übergang war. Die Dissoziation des Komplexes erfolgt vor den strukturellen Änderungen und kann durch Änderung der Fluoreszenz nicht verfolgt werden. Das geringe Fluoreszenzsignal von Hsp26 wird von dem hohen CS Signal überlagert.

Harnstoffübergänge von Hsp26 und CS zeigen, dass CS wesentlich stabiler ist als Hsp26. Während der Hsp26 Übergang einen Übergangsmittelpunkt bei 0,8 M Harnstoff zeigt, liegt der Übergangsmittelpunkt von CS bei 4 M Harnstoff (nicht gezeigt).

Die Hsp26-CS Komplexe sind gegen Harnstoff stabiler als Hsp26 alleine und weniger stabil als CS.

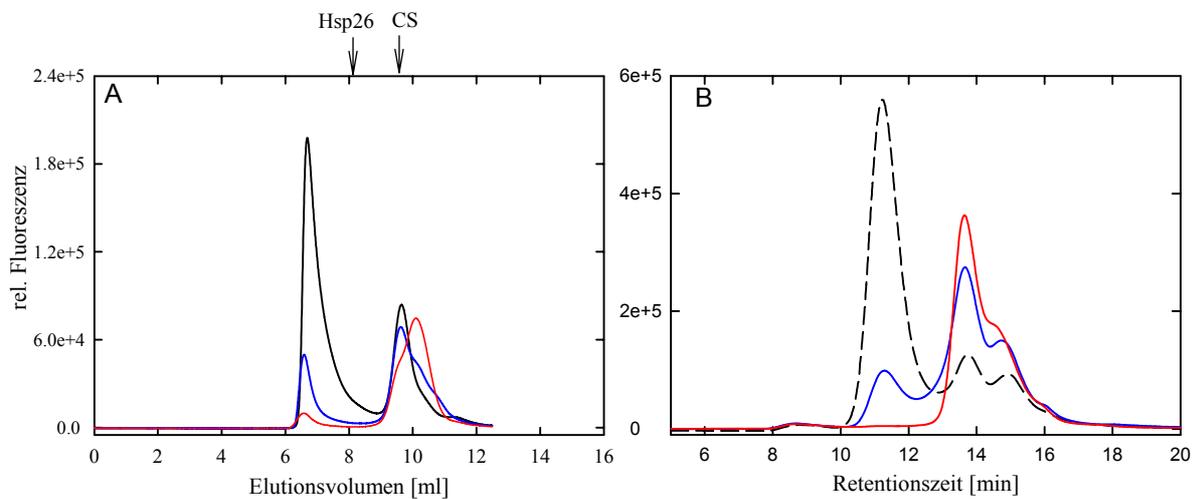


Abbildung 3.40 Einfluss steigender Harnstoffkonzentrationen auf die Stabilität der Hsp26-CS Komplexe im Vergleich zum Hsp26 Oligomer. **A:** *Hsp26-CS-Komplexe:* Die Bildung der Komplexe erfolgte durch Inkubation von 3 μ M Hsp26, 1,5 μ M CS und 1 mM DTT für 45 min bei 43°C und Inkubation für 10 min bei 25°C diente der Stabilisierung. Die Komplexe wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Harnstoff versetzt und für weitere 20 h bei 20°C inkubiert. 0 M Harnstoff (—), 0,5 M (—) und 1 M Harnstoff (—). **B:** *Hsp26 Oligomer:* 3 μ M Hsp26 wurden in 40 mM HEPES-KOH, pH 7,5 in Abwesenheit von Harnstoff (---) oder in Anwesenheit von 0,2 M (—) und 0,5 M (—) Harnstoff für 20 h bei 25°C inkubiert. Nach Gleichgewichtseinstellung wurden die Proben (100 μ l) auf die bei der jeweiligen Harnstoffkonzentration äquilibrierten Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Elution erfolgte in 0,1 M HEPES-KOH, 150 mM KCl, pH 7,5 mit der entsprechenden Harnstoffkonzentration, mit einer Flussrate von 0,75 ml/min. Die Detektion erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm, einer Emissionswellenlänge von 323 nm und gain 10 (bei A) und gain 100 (bei B).

3.6 Charakterisierung der C-terminalen (Hsp26 Δ N) und N-terminalen (Hsp26 Δ C) Domänen von Hsp26

Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine weist relativ geringe Konservierung in Bezug auf die Primärstruktur auf. Untersuchungen zur strukturellen Organisation zeigten, dass die dreidimensionale Struktur kleiner Hsps höher konserviert ist, als ihre Sequenz (Farnsworth *et al.*, 1998). Welche strukturellen Domänen für die Oligomerisierung, die Substratbindung und die Chaperonaktivität verantwortlich sind, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden.

Um die strukturellen und funktionellen Beziehungen der N- und C-terminalen Domäne von Hsp26 zu analysieren, wurde Hsp26 von M. Haslbeck in zwei Fragmente geteilt, die variable N-terminale Domäne, Hsp26 Δ C (AS 1-94) und die konservierte C-terminale Domäne, Hsp26 Δ N (AS 95-213) inklusive der C-terminalen Extension (Abbildung 3.41).

Tabelle 3.2 zeigt eine Zusammenstellung der wichtigsten strukturellen Daten der beiden Fragmente im Vergleich zu Vollängen Hsp26.

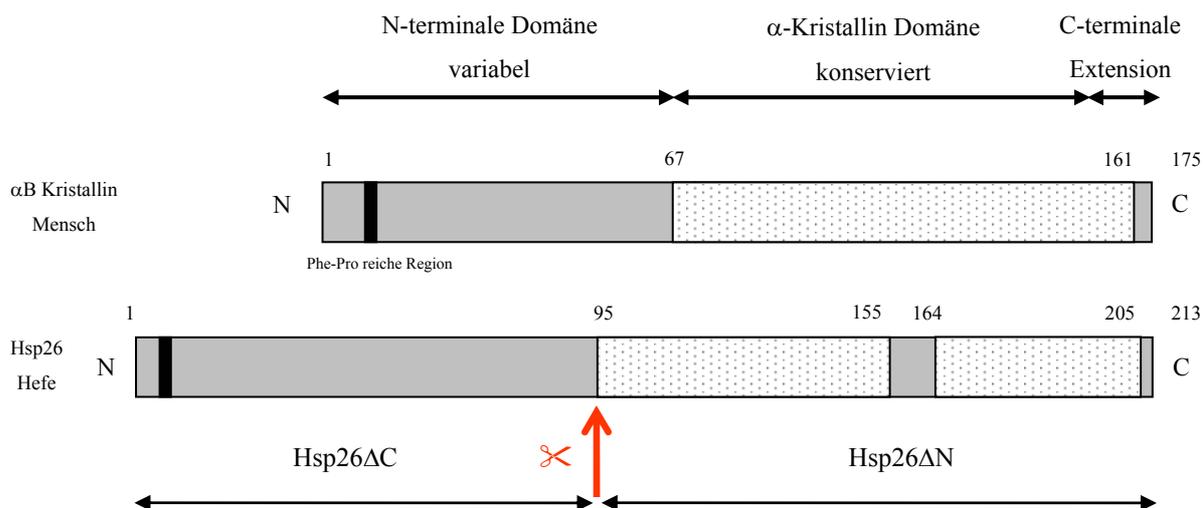


Abbildung 3.41 Schematische Darstellung der strukturellen Organisation kleiner Hitzeschockproteine. Die Zahlen geben die Aminosäureposition der α -Kristallindomäne in Hsp26 an. Weiß: zur α -Kristallindomäne homologe Bereiche. Grau: nicht homologe, variable Bereiche. Postuliert wurde, dass die N-terminale Domäne für die individuelle strukturelle Organisation, der Oligomerisierung, notwendig ist. Die C-terminale Domäne für die Dimerisierung und Substratbindung. Die Schere zeigt den Schnittpunkt der beiden Fragmente an.

Die Proteine sollten rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden. Die kodierenden Regionen der beiden Fragmente wurden in einen von M. Haslbeck zur Verfügung gestellten pET28(mod) Vektor mit Kanamycin Resistenz kloniert. In pET28(mod) stehen die Fragmente unter der Kontrolle eines durch IPTG induzierbaren T7-Promotors. Die

N-terminale Enden wurden jeweils mit einem His-Tag versehen. *E. coli* BL21DE3 codon+ (Stratagene) wurde mit dem Plasmid transformiert.

Hsp26 Δ N ist unter den gewählten Bedingungen in der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses zu finden. Hsp26 Δ C dagegen konnte auch nach mehreren Versuchen nicht exprimiert werden. Berechnungen zur Stabilität dieses Fragmentes mit Hilfe des ExPASy ProtParam Tools klassifizierten die N-terminale Region von Hsp26, mit einer geschätzten Halbwertszeit von ca. 10 Stunden in *E. coli* als instabil, weshalb eine Expression des gewählten N-terminalen Fragmentes in *E. coli* nicht möglich ist.

3.6.1 Strukturelle Charakterisierung von Hsp26 Δ N, der α -Kristallindomäne

Die Reinigung von Hsp26 Δ N erfolgte wie unter Material und Methoden (siehe 2.3.3) beschrieben. Anhand der Aminosäuresequenz von Hsp26 erhält man folgende berechnete Daten für Hsp26 und die Fragmente Hsp26 Δ N und Hsp26 Δ C (Expasy ProtParam, <http://us.expasy.org/tools/protparam.html>):

Tabelle 3.2 Zusammenstellung wichtiger physikochemischer Eigenschaften von Hsp26 Δ C und Hsp26 Δ N im Vergleich zu Hsp26. Das einzige Tryptophan in Hsp26 Δ N befindet sich an Aminosäureposition 211, in der C-terminalen Extension.

	N-terminales Fragment (Hsp26ΔC)	C-terminales Fragment (Hsp26ΔN)	Hsp26
Anzahl der Aminosäuren	94 + 6His	119 + 6 His	213
Molekulargewicht (kDa)	11,1	13,9	23,7
Theoretischer pI	4,44 (ohne His-tag)	7,03 (ohne His-tag)	5,31
Extinktionskoeffizient	0,909	0,814	0,873
Anzahl der Tyrosine	3	4	7
Anzahl der Tryptophane	1 (AS 72)	1 (AS 211)	2
Anzahl der Phenylalanine	10	1	11
Anzahl der Proline	8	6	14
Anzahl der Cysteine	0	0	0

Der hohe Anteil von Phenylalaninen und Prolinen in der N-terminalen Domäne von Hsp26 ist ein charakteristisches Merkmal kleiner Hitzeschockproteine (Ehrnsperger *et al.*, 1997a).

Zur Analyse der strukturellen Eigenschaften von Hsp26 Δ N wurden zunächst die spektroskopischen Eigenschaften untersucht und Sekundärstrukturanalysen durchgeführt.

Die Fluoreszenzeigenschaften von Proteinen werden durch ihre aromatischen Aminosäuren und deren Umgebung bestimmt. Hsp26 weist bei 25°C mit einem Emissionsmaximum bei 327 nm ein normales Fluoreszenzspektrum auf (Abbildung 3.42). Die aromatischen Aminosäuren sind im hydrophoben Kern des Proteins verborgen. Bei Hsp26 Δ N hingegen tritt eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu 355 nm auf. Dies deutet daraufhin, dass das einzige Tryptophan dem Lösungsmittel zugewandt ist. Das kleine Nebenmaximum bei 305 nm resultiert von den Tyrosinen. Chemisch denaturiertes Hsp26 (Maximum bei 354 nm) sowie Hsp26 Dimere (Maximum bei 353 nm) zeigen ähnliche Emissionsspektren wie Hsp26 Δ N. In beiden Fällen sind die Tryptophane und Tyrosine lösungsmittlexponiert.

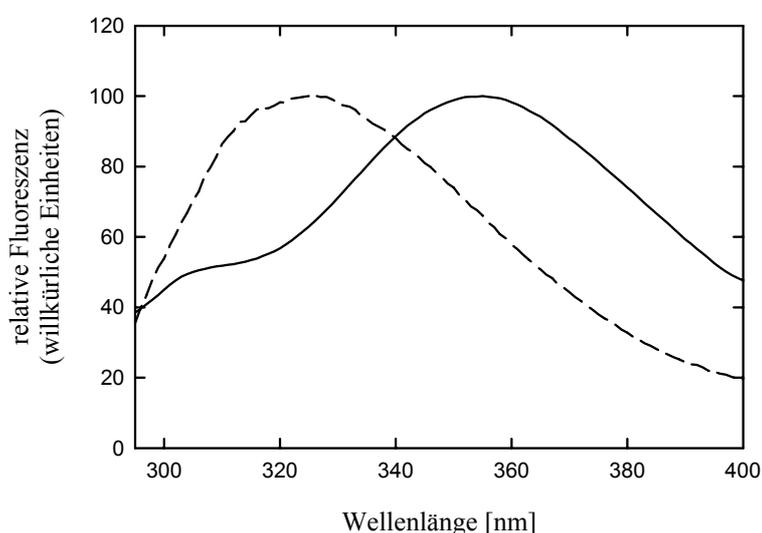


Abbildung 3.42 Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften von Hsp26 Δ N im Vergleich zu Hsp26. Fluoreszenz-Emissionsspektren von 0,75 μ M Hsp26 Δ N (—) wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA bei 25°C und einer Anregungswellenlänge von 280 nm in einer 1 cm Quarzglasküvette aufgenommen. Die Spaltbreiten betragen 3 (Anregung) und 5 nm (Emission). 0,75 μ M Hsp26 (---) wurde in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 untersucht. Die Spektren wurden jeweils gegen Puffer korrigiert.

Die β -Sandwich Faltung ist ein charakteristisches Merkmal der α -Kristallin Domäne und ist in allen bisher daraufhin untersuchten sHsps konserviert. Das Fern-UV-CD Spektrum von Hsp26 Δ N bei 20°C unterscheidet sich von dem von Hsp26 und anderen sHsps (Kokke *et al.*, 1998), zeigt jedoch ein für β -Faltblattstruktur typisches Elliptizitätsminimum bei etwa 216 nm (Abbildung 3.43 A). Der kontinuierliche Abfall ab 216 nm spricht für entfaltete Anteile im Protein.

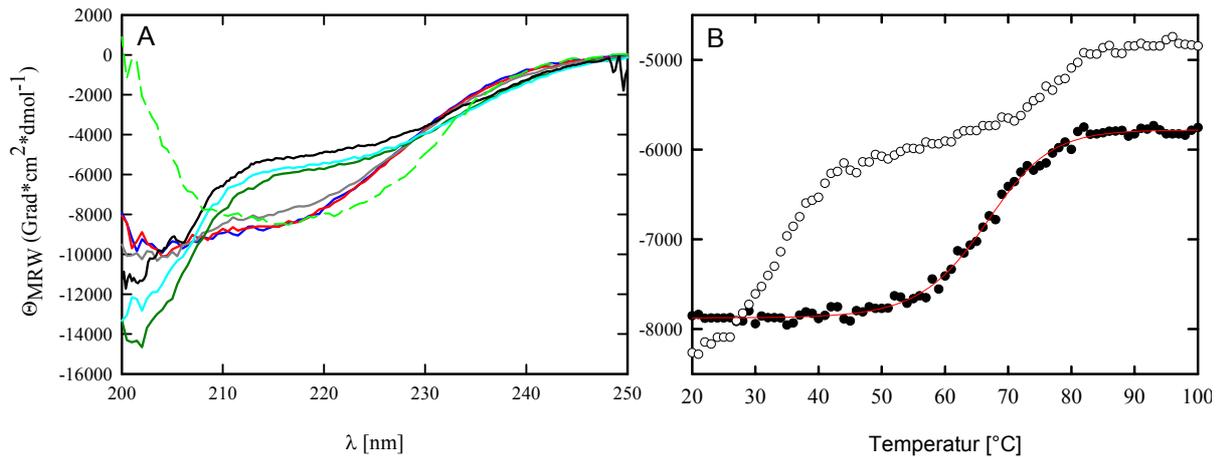


Abbildung 3.43 Sekundärstruktur und thermische Stabilität von Hsp26ΔN. A: Auswahl an Fern-UV-CD Spektren von Hsp26ΔN bei 20°C (blau), 43°C (rot), 60°C (grau), 80°C (dunkelgrün) und 100°C (türkis), sowie nach Abkühlung auf 20°C (schwarz) und von Hsp26 bei 20°C (---). Spektren wurden jeweils 10x akkumuliert und gegen Puffer korrigiert. B: Thermischer Fern-UV-CD Übergang von 0,3 mg/ml Hsp26ΔN (●) im Vergleich zu 0,3 mg/ml Hsp26 (○). Puffer: 10 mM NaP, pH 8 für Hsp26ΔN und 10 mM NaP, pH 7,5 für Hsp26; Heizrate: 30°C/h; 0,1 cm Quarzküvette; Elliptizität wurde bei 220 nm verfolgt. (—) Fit des Hsp26ΔN Übergangs.

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität von Hsp26ΔN wurde die Änderung der Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Temperatur im Fern-UV-CD verfolgt. Abbildung 3.43 B zeigt eine deutliche Abnahme der Elliptizität in Abhängigkeit von der Temperatur. Ab 80°C sind beide Proteine vollständig denaturiert. Die Temperaturübergänge sind nicht reversibel (nicht gezeigt; vgl. Abbildung 3.9 B). Hsp26 weist zwei Übergänge auf mit Mittelpunkten bei 35°C und 77°C. Die thermische Stabilität von Hsp26ΔN ist mit einem Übergangsmittelpunkt von 68,1°C gegenüber Hsp26 (77°C) deutlich erniedrigt (Abbildung 3.43 B).

Die Fern-UV-CD Spektren von Hsp26ΔN (Abbildung 3.43 A) bestätigen ab 55°C einen Strukturverlust. Ab 80°C werden typische Spektren für ungefaltete Proteine mit einem Minimum bei etwa 200 nm (ca. -13 000 Grad*cm²*dmol⁻¹) beobachtet. Nach Abkühlung konnte sich die ursprüngliche Struktur von Hsp26ΔN nicht zurückbilden. Auch bei Hsp26 konnte nach Aufheizen auf 100°C die ursprüngliche Struktur nicht zurückgebildet werden (vgl. Abbildung 3.9 A).

Ein charakteristisches Merkmal kleiner Hsps ist die Assoziation zu hoch oligomeren Komplexen. Postuliert wird, dass die N-terminale Domäne für die Oligomerisierung verantwortlich ist (van Montfort *et al.*, 2001). Um den Assoziationsgrad von Hsp26ΔN zu bestimmen, wurden Gelfiltrationsläufe bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (Abbildung 3.44).

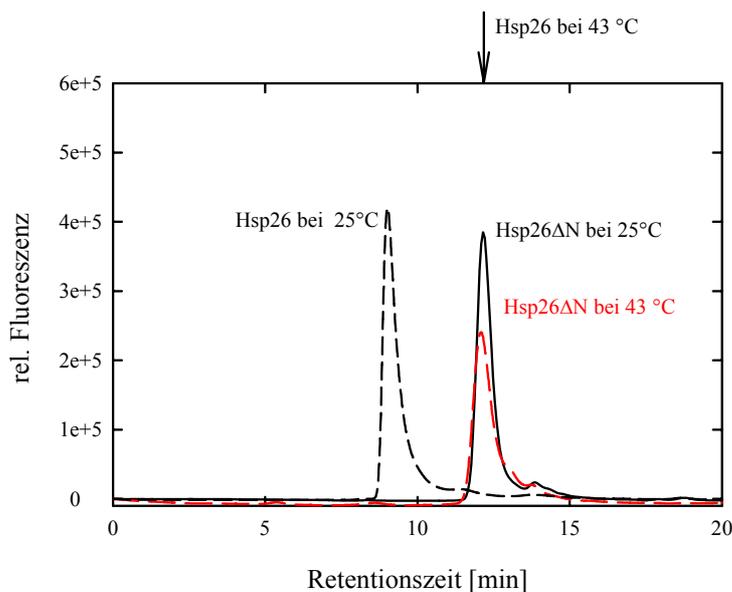


Abbildung 3.44 Oligomerisierungszustand von Hsp26ΔN im Vergleich zu Hsp26. 5 μ M Hsp26ΔN wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA für 10 min bei 25°C (-) oder für 30 min bei 43°C (---) inkubiert und auf die jeweils bei der Inkubationstemperatur temperierte TSK3000PW Säule aufgetragen. 0,5 μ M Hsp26 wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 für 10 min bei 25°C (---) inkubiert und auf die bei 25°C temperierte TSK3000PW Säule aufgetragen. Der Pfeil gibt die Retentionszeit für dimeres Hsp26 bei 43°C an. Laufgeschwindigkeit: 0,75 ml/min. Anregung bei 280 nm, Emission bei 323 nm, gain 100, Auftragsvolumen 100 μ l, Laufpuffer; 0,1 M Hepes-KOH, 150 mM KCl, pH 8.

Während Hsp26 unter Hitzeschockbedingungen in eine dimere Spezies von etwa 45 kDa dissoziiert, erfolgt bei Hsp26ΔN keine Änderung der Quartärstruktur (Abbildung 3.44). Hsp26ΔN eluiert mit der gleichen Retentionszeit wie dimeres Hsp26. Mit einer molekularen Masse von 13,9 kDa für Hsp26ΔN entspricht dies einem Tetramer. Die Tatsache, dass unstrukturierte Anteile im Protein vorhanden sind, könnte ein verändertes Laufverhalten hervorrufen.

Um die Stabilität des C-terminalen Fragmentes mit der von Hsp26 vergleichen zu können, wurden kalorimetrische Messungen durchgeführt.

Zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter wurde Hsp26ΔN zunächst auf 90°C erhitzt, abgekühlt und erneut aufgeheizt. Abbildung 3.45 zeigt den ersten Aufheizvorgang von Hsp26ΔN. Zwei Übergänge werden beobachtet. Der erste liegt bei 39°C, der Mittelpunkt des zweiten Übergangs liegt bei 68,7°C und stimmt mit den CD-Daten überein (Abbildung 3.43 B). Dieser zweite Übergang war zu einem geringen Teil reversibel (nicht gezeigt). Der Übergang selbst ist durch eine deutliche Asymmetrie gekennzeichnet, was darauf hinweist,

dass es sich nicht um ein „Zwei-Zustands-Modell“ eines monomeren Proteins handelt (Freire, 1989). Eine Auswertung im Hinblick auf mehrere Subübergänge, die eventuell der Faltung und der Dissoziation des Tetramers zu Dimeren und zu Monomeren entsprechen, war nicht möglich.

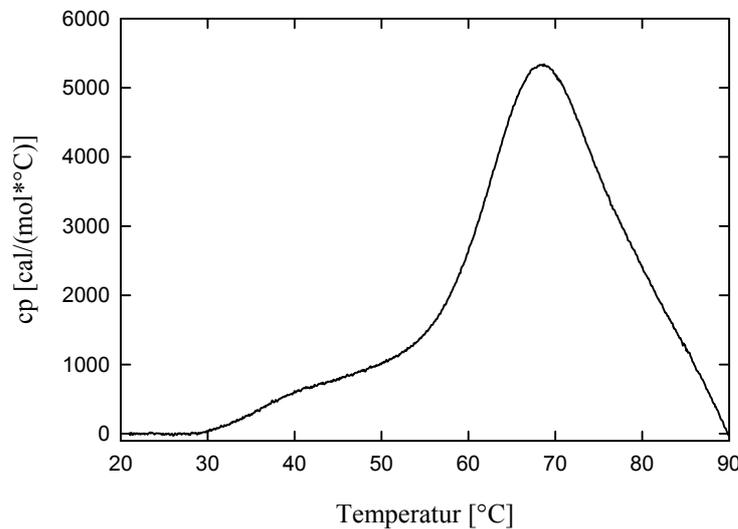


Abbildung 3.45 Kalorimetrische Untersuchung zur Stabilität von Hsp26ΔN gegenüber Temperaturerhöhung. 5,2 mg/ml Hsp26ΔN wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA mit einer Heizrate von 15°C/h vermessen.

Die anhand der gemessenen partiellen molaren Wärmekapazität berechnete Enthalpie ΔH des kompletten Aufheizvorgangs beträgt 121 kcal/mol.

3.6.2 Analyse der Chaperoneigenschaften von Hsp26ΔN

wtHsp26 besitzt die Fähigkeit, die Aggregation von nicht nativen Proteinen zu unterdrücken. Die α -Kristallindomäne soll in sHsps nicht nur für die Dimerisierung, sondern auch für die Substratbindung verantwortlich sein. Ob Hsp26ΔN in der Lage ist, als Chaperon zu fungieren, wurde mit Hilfe des Modellssubstrates Citratsynthase (CS) untersucht. Die Inkubation von CS bei 43°C führt innerhalb von 10 Minuten zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität (Ehrnsperger *et al.*, 1997b). Die damit einhergehende Aggregation des Enzyms konnte mit Lichtstreuungsmessungen verfolgt werden.

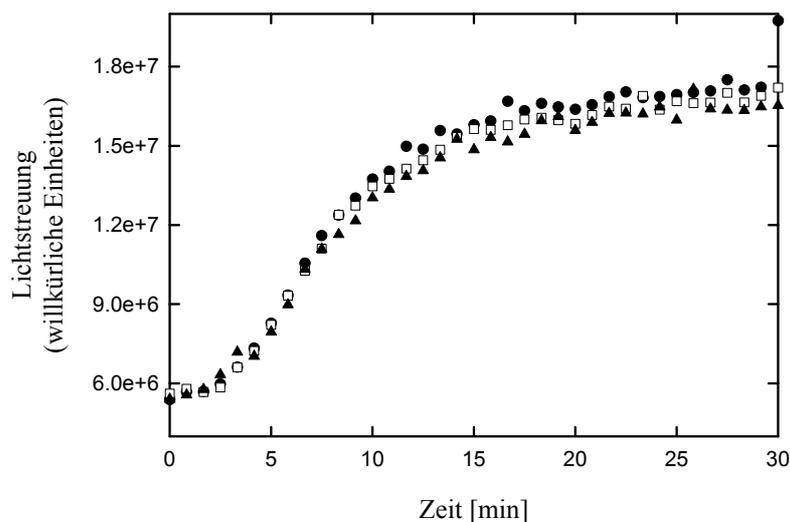


Abbildung 3.46 Einfluss von Hsp26 Δ N auf die thermische Aggregation von Citratsynthase. CS wurde bei 43°C 1:200 in Inkubationspuffer (40 mM Hepes-KOH, pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit 1 mM DTE verdünnt (Endkonzentration: 0,15 μ M). Die Zunahme der relativen Lichtstreuung wurde in Anwesenheit von 0,15 μ M (□) und 5 μ M Hsp26 Δ N (▲) und in Abwesenheit zusätzlicher Proteinkomponenten (●) verfolgt. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge betragen jeweils 360 nm, die Spaltenbreiten je 1 nm.

Bereits 3 Minuten nach Beginn der Inkubation von CS bei 43°C, konnten lichtstreuende Aggregate festgestellt werden (Abbildung 3.46). Die Zugabe eines 30-fachen Überschusses an Hsp26 Δ N beeinflusste die Kinetik der CS Aggregation nicht. Auch mit chemisch inaktiviertem Insulin konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Mittels Gelfiltration wurde eine mögliche Komplexbildung zwischen Hsp26 Δ N und CS untersucht. Hsp26 und CS bilden stabile Komplexe aus, die im Ausschlussvolumen der Säule eluieren (siehe Abbildung 3.30 A und Abbildung 3.51 B). Ein solcher Komplexpeak konnte im Falle von Hsp26 Δ N und CS nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Eine Interaktion konnte auch durch den Pelleting-Assay nicht bestätigt werden. Während CS aggregierte und pelletierte, konnte die C-terminale Domäne in löslicher Form im Überstand nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.7 Analyse von Hsp26 Δ N30

Die isolierte C-terminale Domäne von Hsp26 ist also nicht in der Lage, hoch-oligomere Komplexe auszubilden und ist nicht als Chaperon aktiv. Teile der aminoterminalen Domäne scheinen für die Funktionalität notwendig zu sein. Es stellt sich die Frage, welche und

wieviele Aminosäuren der N-terminalen Domäne für die Oligomerisierung und die Chaperonaktivität nötig sind.

Anhand von Strukturanalysen wurde postuliert, dass für die Assoziation des Hsp26 Oligomers die aminoterminalen Domänen von wesentlicher Bedeutung sind. 3D Rekonstruktionen von Kryo-EM Aufnahmen lassen vermuten, dass Teile dieser Domänen in „die Schale“ eingefügt sind, andere sind an der Ausbildung von stabilisierenden Knoten beteiligt (persönliche Mitteilung, H. Saibil). Je drei aminoterminalen Domänen von drei Dimeren sind vermutlich an der Ausbildung der „Knoten“, die für den Zusammenhalt des 24mers verantwortlich sind, beteiligt. Mit Hilfe von Deletionen im N-terminalen Bereich von Hsp26 sollten Einblicke in die Funktion der N-terminalen Hsp26 Domäne geschaffen und Informationen über strukturell essentielle Bereiche für den Zusammenhalt des 24mers gesammelt werden.

Von M. Haslbeck wurde dazu das Fragment Hsp26 Δ N30 zur Verfügung gestellt, in dem die ersten 30 aminoterminalen Aminosäuren deletiert sind. Der C-Terminus ist mit einem His-tag (6His) versehen.

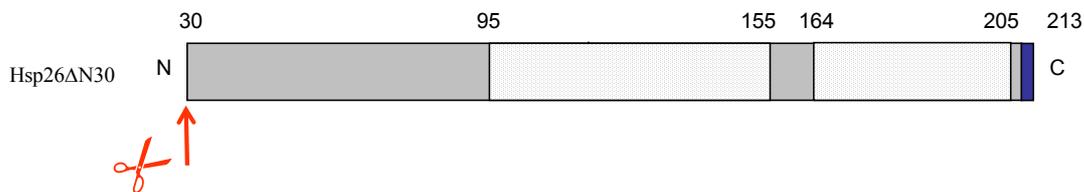


Abbildung 3.47 Schematische Darstellung von Hsp26 Δ N30. Die Schere gibt die Deletion der ersten 30 Aminosäuren an. Weiß, zur α -Kristallindomäne homologe Bereiche. Grau, nicht homologe, variable Bereiche. Blau, C-terminaler His-tag.

Die Untersuchung der Quartärstruktur und Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Hsp26 Δ N30 erfolgte zunächst mit Hilfe von analytischer Gelfiltration.

Hsp26 Δ N30 eluierte mit einer ähnlichen Retentionszeit (10,70 min) wie Hsp26 (10,67 min), deshalb wird ein Oligomerisierungsgrad von 24 Untereinheiten angenommen. Die fehlenden 30 Aminosäuren zeigten keinen Einfluss auf die oligomere Struktur von Hsp26 Δ N30. Diese Beobachtung wurde mittels Elektronenmikroskopie bestätigt (siehe Abbildung 3.48). Der Hsp26 Δ N30 Komplex bildet analog zu wtHsp26 runde sphärische Komplexe mit einem Durchmesser von 15 nm aus.

Für Hsp26 ist bekannt, dass unter Hitzeschockbedingungen eine temperaturinduzierte Änderung der Quartärstruktur erfolgt. Abbildung 3.49 B zeigt, dass Hsp26 Δ N30 wie Hsp26 unter Hitzeschockbedingungen in eine kleinere Spezies dissoziiert. Retentionszeiten von 14,04 min für Hsp26 Δ N30 und 14,07 min für Hsp26 (vgl. Abbildung 3.20) sprechen bei beiden Proteinen für die Dissoziation des Oligomers in eine dimere Spezies. Unter physiologischen Bedingungen reassoziert die kleine Spezies zurück zum Oligomer. Die Reassoziations erfolgt, wie schon für Hsp26 beschrieben, konzentrationsabhängig (nicht gezeigt).

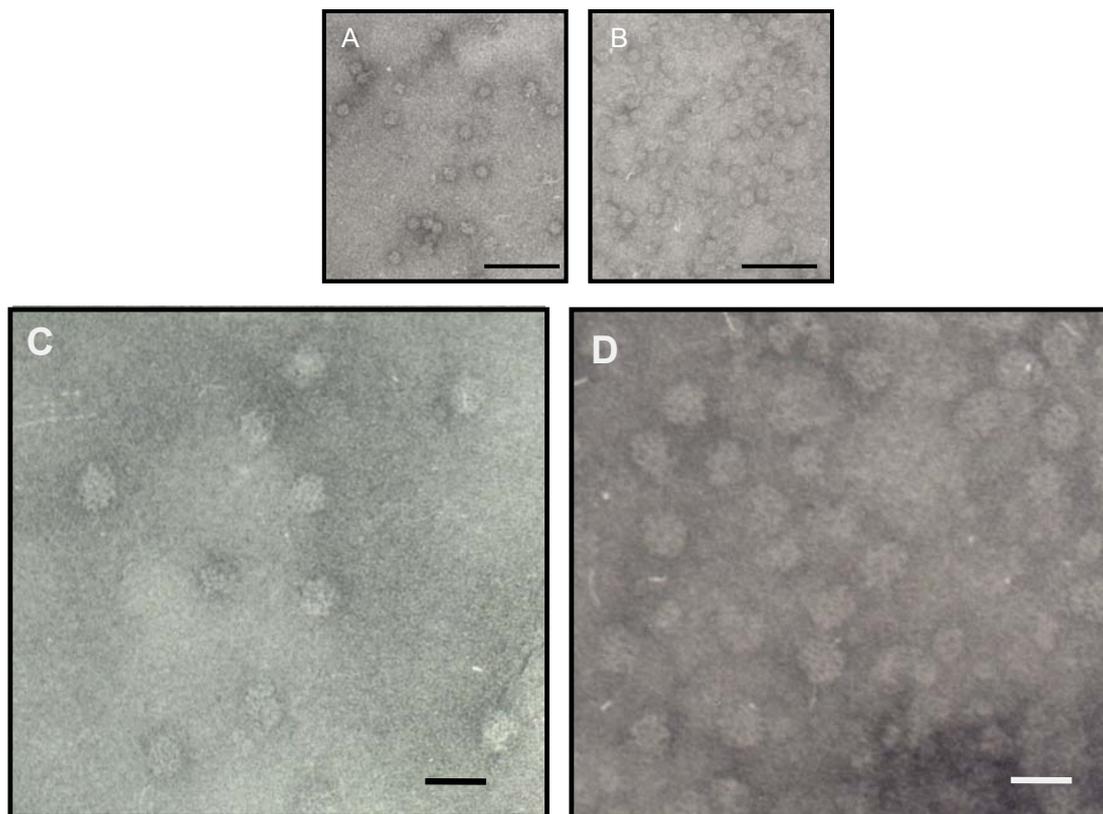


Abbildung 3.48 Elektronenmikroskopische Charakterisierung. Negativ kontrastierte Aufnahmen von Hsp26 (A, C) und Hsp26 Δ N30 Komplexen (B, D). 150 μ g/ml Protein wurden bei 25°C inkubiert. Die nominale Vergrößerung betrug 33 000 bei A, B und 66 000 bei C,D. Die Länge des Skalierungsbalkens in A und B entspricht 100 nm in C und D 20 nm.

Ob bei Hsp26 Δ N30, ähnlich wie bei Hsp26, ein Rearrangement des Oligomers nach Reassoziations auftritt, ist noch unklar. Die leicht verschobene Retentionszeit um nur 0,1 Minuten, im Falle von reassoziertem Hsp26 Δ N30 (rHsp26 Δ N30) spricht, im Vergleich zu der Verschiebung um plus 0,5 min bei rHsp26, aber gegen eine stark veränderte Quartärstruktur von rHsp26 Δ N30.

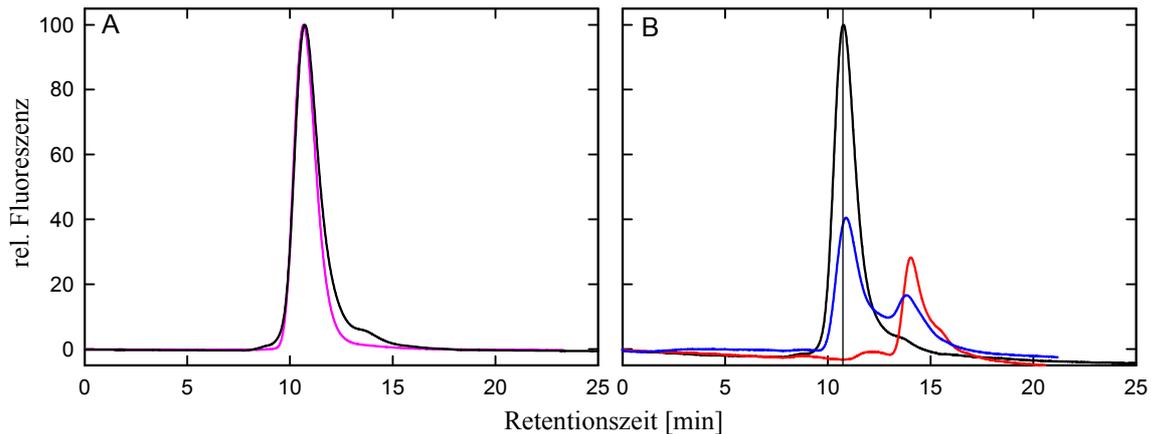


Abbildung 3.49 Gelfiltrationschromatographie zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Hsp26 Δ N30 im Vergleich zu Hsp26 bei unterschiedlichen Temperaturen. **A:** 3 μ M Hsp26 (—) in 40 mM HEPES-KOH, pH 7,5 oder 3 μ M Hsp26 Δ N30 (—) in 40 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTE wurden für 10 min bei 25°C inkubiert und auf eine TSK4000PW Gelfiltrationssäule bei 25°C aufgetragen. **B:** Hsp26 Δ N30 bei 25°C (—), nach 15 minütiger Inkubation bei 43°C auf die 43°C Säule aufgetragen (—), sowie nach Inkubation für 15 min bei 43°C, bei 25°C für 30 min, Auftrag auf die 25°C Säule (—). Laufpuffer: 0,1 M HEPES-KOH, pH 7,5, 150 mM KCl.

Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalysen mittels Fern-UV-CD Spektren, sowie Untersuchungen zur thermischen Stabilität von Hsp26 Δ N30 waren nahezu identisch zu jenen von Hsp26 (nicht gezeigt). Die Spektren zeigten typische Charakteristika für β -Faltblattstrukturen mit α -helikalen Anteilen. Es wurden kleine Veränderungen, die vermutlich auf geringere α -helikale Anteile zurückzuführen sind, beobachtet. Auch die thermische Entfaltung zeigte wie bei Hsp26 zwei Übergänge: Einer bei 37°C, der vermutlich der Dissoziation des Oligomers entspricht, und bei ca. 74°C, was der Aufschmelzung der α -Kristallin Domäne entsprechen könnte. Der Temperaturübergang ist nicht reversibel (nicht gezeigt).

Untersuchungen zu den Fluoreszenzeigenschaften zeigten, dass auch hier die Deletion von 30 aminoterminalen Aminosäuren keine Änderungen hervorruft (Abbildung 3.50). Bei 25°C befinden sich die Tryptophane in hydrophober Umgebung und weisen ein Fluoreszenzmaximum von 326 nm auf (vgl. Abbildung 3.42). Nach einer 15minütigen Inkubation bei 43°C kommt es zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums nach 351 nm, Hsp26 Δ N30 dissoziiert. Die aromatischen Aminosäuren sind dem Lösungsmittel zugewandt. Dafür sprechen die Wellenlängenmaxima von 351 nm, ebenso wie die Tatsache, dass Hsp26 Dimere ein Maximum bei 353 nm aufweisen.

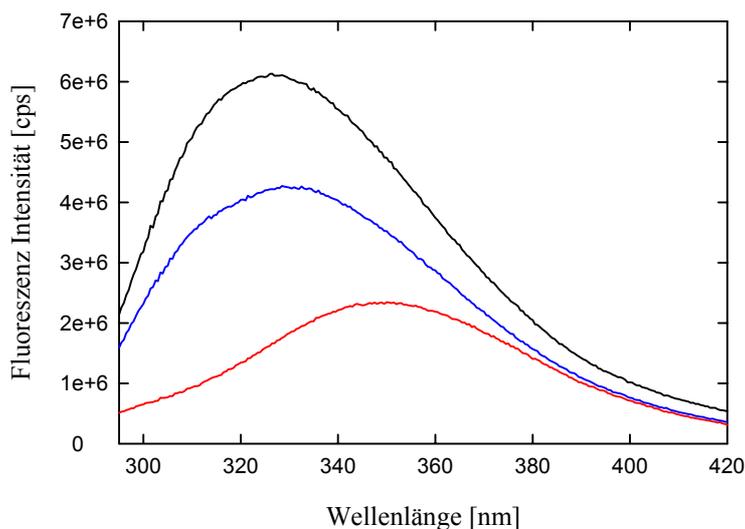


Abbildung 3.50 Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften von Hsp26 Δ N30 in Abhängigkeit von der Temperatur. 0,7 μ M Hsp26 Δ N35 wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EDTA bei 25°C (— schwarz), nach 15minütiger Inkubation bei 43°C (— rot) und nach Hitzeschock wieder bei 25°C (— blau) untersucht. Fluoreszenzemissionsspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm, in einer 0,3 cm Quarzglasküvette aufgenommen. Die Spaltbreite betrug 5 und 10 nm. Die Spektren wurden jeweils Puffer korrigiert.

Die Reversibilität der Dissoziation (vgl. Abbildung 3.49) wird auch durch das veränderte Fluoreszenzverhalten von Hsp26 Δ N30 bestätigt. Nach Hitzeschock und erneuter Inkubation für 30 min bei 25°C kommt es zur Assoziation und einer erneuten Verlagerung der Tryptophane in eine hydrophobere Umgebung (328,5 nm).

Die Deletion der gesamten aminoterminalen Domäne von Hsp26 führte zu einem Verlust der Chaperonaktivität. Im Folgenden wurde überprüft, ob die Deletion der 30 aminoterminalen Aminosäuren einen Einfluss auf die Chaperonaktivität zeigt. Hsp26 Δ N30 ist in der Lage, die thermische Aggregation von CS zu unterdrücken (Abbildung 3.51 A). Ein zweifacher Überschuss an Hsp26 Δ N30 zeigt bereits eine signifikante Unterdrückung des Lichtstreuungssignals, während die gleiche Menge an Hsp26 die thermische Aggregation von CS nahezu vollständig unterdrückt (vgl. Abbildung 3.29 A).

Nachdem nachgewiesen wurde, dass Hsp26 Δ N30 mit CS interagiert, sollte mittels Gelfiltration eine mögliche Komplexbildung untersucht werden. Dazu wurden Hsp26 Δ N30 und CS zusammen bei 43°C inkubiert und auf die bei 25°C temperierte Gelfiltrationssäule aufgetragen (Abbildung 3.51 B). Die charakteristischen Hsp26-CS-Komplexe, die im Ausschlussvolumen der Säule eluieren, konnten mit Hsp26 Δ N30 und CS nicht detektiert werden. Detektiert wurden freies Hsp26 Δ N30 und CS.

Diese Ergebnisse implizieren, dass Hsp26 Δ N30 mit CS interagiert, das Substrat aber nicht fest binden kann (Abbildung 3.51 B).

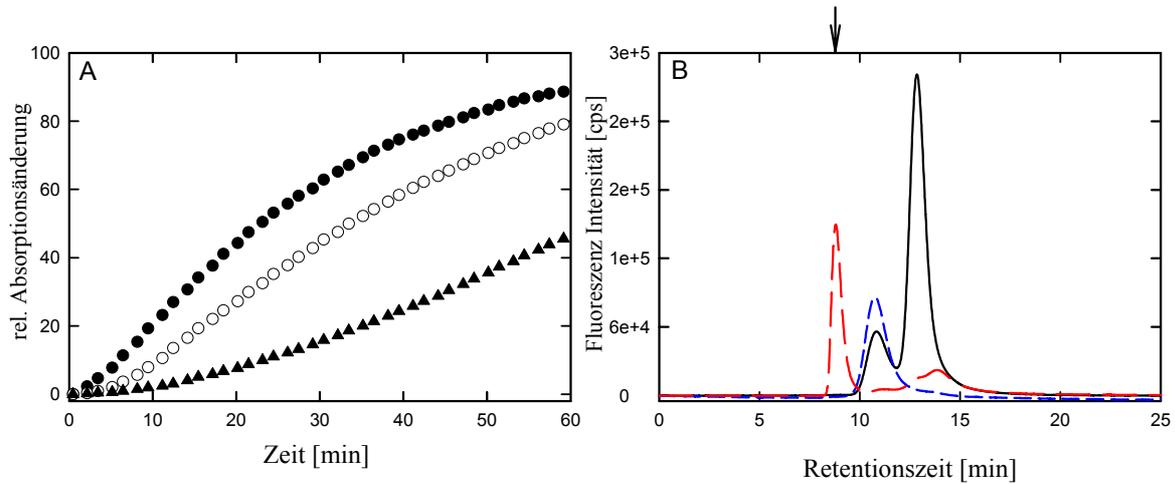


Abbildung 3.51 Überprüfung der Chaperoneigenschaften von Hsp26 Δ N30. **A:** Die thermische Aggregation von 3 μ M CS (●) wurde bei 43°C in 40 mM Hepes,-KOH, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTE, untersucht. Die Zunahme der relativen Lichtstreuung wurde in Gegenwart von 3 μ M (○) und 6 μ M (▲) Hsp26 Δ N30 verfolgt. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen betragen jeweils 360 nm. **B:** Analyse von Hsp26 Δ N30-CS Komplexe mittels Gelfiltration. 3 μ M Hsp26 Δ N30 und 1,5 μ M CS wurden 15 Minuten bei 43°C inkubiert und auf eine TSK4000PW Säule bei 25°C aufgetragen (—). Zum Vergleich 3 μ M Hsp26 Δ N30 alleine (---) und Hsp26-CS-Komplexe bestehend aus 3 μ M Hsp26 und 1,5 μ M CS (---). Die Läufe mit Hsp26 Δ N30 wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTE durchgeführt. Die Hsp26 Proben wurden in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5 inkubiert. Mit einem Probenvolumen von 20 μ l und einer Flussrate von 0,75 ml/min wurde eluierendes Protein mittels Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 323 nm detektiert.

Negativ-kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten die obige Annahme. Hsp26 Δ N30 ist nicht in der Lage stabile Komplexe mit Substrat auszubilden (nicht gezeigt, vgl. Abbildung 3.26 und Abbildung 3.32 A). Freies Protein, unterschiedlicher Morphologien sowie Aggregat-ähnliche Zusammenlagerungen konnten detektiert werden.

Hsp26 Δ N30 ist also in der Lage die Aggregation von CS zu unterdrücken, kann allerdings keine stabilen Substratkomplexe ausbilden und zeigt damit im Vergleich zu Hsp26 funktionelle Unterschiede, obwohl weder die Quartärstruktur noch die Dynamik des Proteins durch die Deletion der 30 N-terminalen Aminosäuren beeinflusst wurde.

4 Diskussion

4.1 Diskussion zur Struktur und Stabilität von Hsp26

Eine Gemeinsamkeit kleiner Hitzeschockproteine ist ihre Fähigkeit große oligomere Komplexe auszubilden, die, je nach Umweltbedingungen und Art des sHsps, unterschiedlich groß sein können (Andreas *et al.*, 1995). Da die Komplexbildung sowie Änderungen der Quartärstruktur bei Temperaturen, die physiologisch relevant sind, eine Voraussetzung für die Chaperonaktivität der sHsps zu sein scheinen (Haslbeck *et al.*, 1999; Van Boekel *et al.*, 1999; van Montfort *et al.*, 2001; Giese & Vierling, 2002; Bova *et al.*, 2002), wurde das Oligomerisierungsverhalten von Hsp26 näher untersucht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen negativ-kontrastierter Hsp26-Proben bei 25°C zeigten regelmäßige, sphärische Oligomere von einheitlicher Größe (Ø 15 nm) (Walke, 1996; Stromer, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999). Die anhand von Kryo-Elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestimmte dreidimensionale Struktur von Hsp26 (H. Saibil, persönliche Mitteilung) gleicht, wie auch die Struktur von α B-Kristallin und Hsp16.5, einer Hohlkugel (Abbildung 4.1) (Haley *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998a).

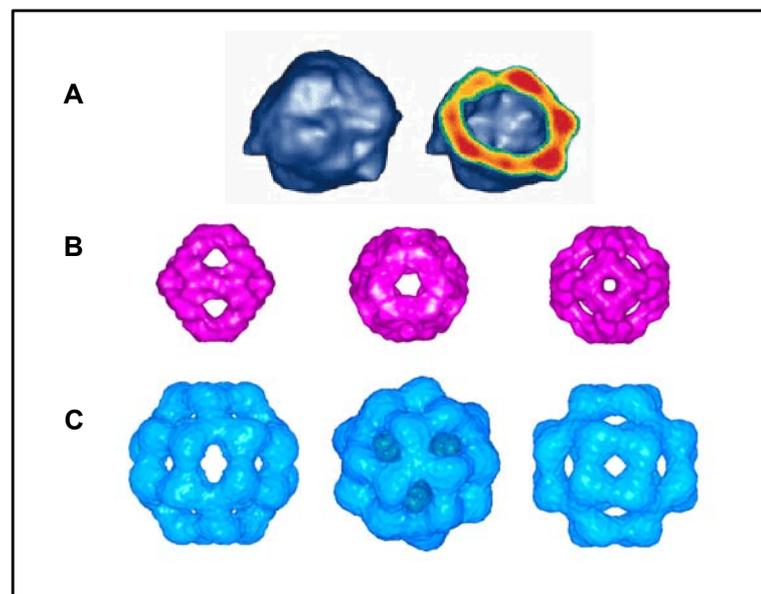


Abbildung 4.1 3D-Rekonstruktionen von sHsps. **A:** Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahme von α B-Kristallin (Haley *et al.*, 1998) **B:** Kristallstruktur von Hsp16.5 aus *M. janaschii* (Kim *et al.*, 1998a) **C:** Aus Kryo-EM Aufnahmen berechnete Struktur von Hsp26 aus *S. cerevisiae* (H. Saibil, pers. Mitteilung).

Die monodispersen Hsp26 Oligomere weisen einen Schalen-ähnlichen Aufbau aus 24 Untereinheiten auf (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.3).

Unter Hitzeschockbedingungen erfolgen strukturelle Änderungen, die zur Dissoziation des nur geringe Chaperonaktivität aufweisenden 24mers in eine aktive dimere Spezies führen (Walke, 1996; Stromer, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999). Das Dimer ist die kleinste Bildungseinheit des Oligomers (van Montfort *et al.*, 2001). Diese temperaturabhängige Dissoziation der oligomeren Speicherform in eine aktive, dimere Spezies ist reversibel. Nach Beendigung der Stresseinwirkung reassoziert dimeres Hsp26 zurück in die, unter physiologischen Bedingungen, oligomere, inaktive Speicherform.

Untersuchungen zur Stabilität von Hsp26 (Abbildung 3.5) zeigten, dass die Entfaltung des Proteins von der Komplexdissoziation unabhängig ist und über mehrere Schritte erfolgt. Zuerst kommt es in einem konzentrationsunabhängigen Schritt zur Dissoziation des Oligomers in Dimere. Intermediäre Zwischenstufen werden dabei nicht beobachtet. Die Dissoziation erfolgt sehr schnell und ist bei 0,5 M Harnstoff bereits abgeschlossen. Sie geht nicht mit einer Fluoreszenzänderung einher, was dafür spricht, dass keine Tryptophane in den Kontaktflächen vorhanden sind. Die anschließende Entfaltung verläuft biphasisch. Die Umgebung der Aromaten entfaltet relativ früh im Vergleich zum Restprotein, da das Fluoreszenzsignal schneller sinkt als das CD-Signal. Eine erste Phase kann zwischen 0,6 bis 1,2 M Harnstoff beobachtet werden. Diese ist konzentrationsabhängig. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration führte zur Zunahme der Hsp26 Stabilität. Diese Konzentrationsabhängigkeit deutet darauf hin, dass diese Signaländerung die Dissoziation der Dimere in Monomere reflektiert. Die zweite, langsame Phase (ab 1,2 M Harnstoff) ist nicht konzentrationsabhängig. Die Sekundärstruktur erweist sich als relativ stabil.

Die Harnstoffinduzierte Dissoziation und Entfaltung von Hsp26 ist zum Teil reversibel. Die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzsignaländerung deutet auch bei der Renaturierung auf einen Assoziationsschritt hin. Die Ausbildung der Hsp26-Oligomere dauert jedoch sehr lange. Nach Harnstoff-induzierter Entfaltung und anschließender Rückfaltung kommt es zur Ausbildung einer oligomeren Struktur die mit der gleichen Retentionszeit wie das ursprüngliche Hsp26 von der Gelfiltrationssäule eluiert. Ein Hinweis auf eine veränderte Quartärstruktur, wie nach temperaturinduzierter Dissoziation, ist nicht gegeben.

Die kinetische Untersuchung der Harnstoffinduzierten De- und Renaturierung (Abbildung 3.2), zeigt, dass die Dissoziation und anschließende Entfaltung mit

Geschwindigkeitskonstanten von $k = 0,015 \text{ s}^{-1}$ bei 0,5 M und $k = 0,15 \text{ s}^{-1}$ bei 1,0 M Harnstoff sehr schnell verlaufen. Ab 1,0 M Harnstoff ist eine Änderung des Entfaltungsweges zu beobachten. Dies deutet auf ein Auftreten von Entfaltungsintermediaten hin. Die Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierung sind konzentrationsabhängig, was auf Assoziation als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Renaturierung deutet. Die Geschwindigkeitskonstanten sind jedoch auch von der Harnstoffkonzentration abhängig. Dies impliziert, dass Prolin-*cis/trans* Isomerisierung an der Renaturierung nicht beteiligt ist. Ob eine Isomerisierung ausgeschlossen werden kann, gilt noch zu untersuchen.

Die Inkubation von Proteinen bei pH-Werten kleiner 3,0 führt in den meisten Fällen zur Denaturierung, wobei die enzymatische Aktivität in der Regel verloren geht. Der strukturelle Zustand Säure-denaturierter Proteine kann sich von dem nach chemischer Denaturierung unterscheiden (Jaenicke, 1987). Gegenüber Änderungen des pH-Wertes erweist sich Hsp26 zwischen pH 5 und pH 9 als stabil. Der pH-Übergang zeichnet sich durch eine hohe Kooperativität zwischen pH 4 und pH 5 aus. Sowohl im Sauren als auch im Basischen scheint Hsp26 entfaltet zu sein. Bei pH-Werten <5 und >9 deuten Fluoreszenzspektren auf eine Lösungsmittlexposition der Trp-Reste hin. Da sich die Aromaten nicht in den Kontaktflächen der Dimere zu befinden scheinen (siehe oben), beschränkt sich die Strukturänderung in diesen pH-Bereichen also nicht auf eine Dissoziation des Oligomers.

Gegenüber Hitzedenaturierung (3.2.1) erweist sich das Hsp26 Dimer bis zu einer Temperatur von ca. 50°C als „stabil“. Bei Temperaturen über 70°C kommt es zu irreversiblen strukturellen Veränderungen, Aggregation wurde jedoch nicht beobachtet. Die Mittelpunkte des Fern-UV-CD-Übergangs lagen bei 35°C und 77°C. Bei den kalorimetrischen Untersuchungen wurden vier Übergänge, bei 37, 47, 62 und 72,5°C nachgewiesen.

Der DSC Übergang von Hsp26 ist durch eine deutliche Asymmetrie gekennzeichnet. Das deutet daraufhin, dass er nicht durch das „Zwei-Zustands-Modell“ eines monomeren Proteins beschrieben werden kann (Freire, 1995). Nach Aussagen von Azuaga et al. (1995) sollte die van't Hoff Enthalpie im Falle eines Systems, das Dissoziation beinhaltet, also keinem „Zwei-Zustands-Prozess“ entspricht, größer sein als die kalorimetrisch errechnete Enthalpie. Das Verhältnis von $\Delta H^{\text{vH}} / \Delta H < 1$ deutet darauf hin, dass die Denaturierung von Hsp26 über Intermediate verläuft. Eine Auswertung im Hinblick auf mehrere Subübergänge, die eventuell der Faltung und Dissoziation entsprechen, war nicht möglich. Die benötigten

Umwandlungsenergien der einzelnen Subübergänge können nur in einem reversiblen System bestimmt werden. Die Integration der gesamten Umwandlung und die daraus hervorgehenden thermodynamischen Parameter liefern Anhaltspunkte zur Stabilität des Proteins.

Jüngste Untersuchungen zeigen, dass die hocholigomeren Komplexe kleiner Hitzeschockproteine in einem schnellen Dissoziation/Assoziation Gleichgewicht mit niederoligomeren Formen stehen (Sobott *et al.*, 2002). α B-Kristallin, Hsp25, Hsp27 und sHsps von *B. janponicum* sind dynamisch und tauschen Untereinheiten aus (Haley *et al.*, 1998; Ehrnsperger *et al.*, 1999; Studer & Narberhaus, 2000). Schnelle Umlagerungen von Untereinheiten erfolgen auch in sHsps mit definierten Quartärstrukturen. So konnte für *TaHsp16.9* gezeigt werden, dass unter Hitzeschockbedingungen strukturelle Änderungen erfolgen, wobei sich kleinere oligomere Spezies bilden (van Montfort *et al.*, 2001).

Hsp25 liegt in wässriger Lösung als Hexadekamer, Tetramer und Dimer vor (Ehrnsperger, 1998; Ehrnsperger *et al.*, 1999). Die Verteilung dieser oligomeren Spezies ist konzentrationsabhängig, wobei eine Abnahme der Proteinmenge zur verstärkten Dissoziation der Hexadekamere in Tetramere führte, während Tetramere nicht weiter zu Dimeren dissoziierten. Das Gleichgewicht zwischen Hexadekameren und Tetrameren scheint einer schnelleren Reaktionskonstanten zu folgen, als das zwischen Dimeren und Tetrameren.

Für Hsp26 konnte unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten analytischen Bedingungen kein Austausch von Untereinheiten beobachtet werden. Auch für α A-Kristallin konnte bei niedrigen Temperaturen nahezu kein Austausch beobachtet werden (Bova *et al.*, 1997). Erste Hinweise auf einen Austausch von Untereinheiten wurden erst nach sechs Stunden Inkubation bei 3°C beobachtet. Bei 37°C hingegen, wurden Untereinheiten mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $0,075 \text{ min}^{-1}$ ausgetauscht und eine Gleichgewichtseinstellung wurde nach 4 h erreicht (Bova *et al.*, 1997). Bei 42°C war die Geschwindigkeitsrate um den Faktor 4,2 höher als bei 37°C. Hsp27 weist einen ähnlichen temperaturabhängigen Austausch von Untereinheiten auf (Bova *et al.*, 2000).

Hsp26 könnte sich auch unter physiologischen Bedingungen (z.B. 25°C) im Gleichgewicht mit einer kleineren Subspezies befinden. Dissoziation und Reassoziaton sprechen für einen Austausch von Untereinheiten. Unter physiologischen Temperaturen liegt das Gleichgewicht von Hsp26 stark auf Seiten des Oligomers, während unter Hitzeschockbedingungen (>40°C) das Gleichgewicht stark zur Seite des Dimers verschoben ist und intermediäre Spezies kaum beobachtet wurden. Bei 37°C hingegen, konnten mehrere Spezies detektiert werden, selbst

nach ca. 25h Inkubation konnte keine „Gleichgewichtseinstellung“ der drei Spezies beobachtet werden, was auf eine hohe Dynamik der sHsps hindeutet. Für diese Untersuchungen wurde die Gelfiltrationschromatographie herangezogen. Eine quantitative Aussage über die Dynamik kann dadurch nicht getroffen werden, da Untereinheiten während des Laufes vom 24mer ab-dissoziieren wieder reassoziieren oder weiter zum Dimer dissoziieren können. Zeitauflösende FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-Messungen unter Verwendung von Hsp26 mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren könnten Aufschluss über die Dynamik und den Austausch von Hsp26 Untereinheiten liefern.

Der Austausch von Untereinheiten kann prinzipiell über zwei alternative Mechanismen erfolgen: Die Dissoziation in kleinere Subkomplexe gefolgt von der Reassoziierung zu Oligomeren, oder durch einen „Kollisions“-Mechanismus. Beim Kollisions-abhängigen Prozess wäre die Geschwindigkeitsrate des Austausches von Untereinheiten konzentrationsabhängig und er würde einer Reaktionskinetik zweiter Ordnung folgen. Im Dissoziations-Assoziationsmodell könnte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Austausches die Dissoziation kleinerer Spezies vom Oligomer beinhalten. Hsp26 zeigt eine konzentrationsunabhängige Dissoziation des 24mers in Dimere, was für einen geschwindigkeitsbestimmenden Dissoziationsschritt spricht.

Die experimentell bestimmte Geschwindigkeit der Dissoziation folgt einer Reaktion erster Ordnung. Das bekräftigt die Beobachtung, dass die Dissoziation des 24-mers geschwindigkeitsbestimmend ist. Untereinheiten dissoziieren langsam ab, reassoziieren im Vergleich dazu schnell. Dieses Gleichgewicht ist temperaturabhängig zugunsten des Oligomers verschoben, die geringen Mengen an Unterkomplexen limitieren die Rate des Gesamtaustausches.

Mehrere Arbeitsgruppen haben den Dissoziationsmechanismus für den Austausch von Untereinheiten bei anderen sHsps bestätigt. Für α A-Kristallin konnte ein Dissoziationsmechanismus gezeigt werden, bei dem ebenfalls der Dissoziationsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist (Bova *et al.*, 2000). Ebenso wurde für Hsp16.9 gezeigt, dass es in kleinere Spezies dissoziiert, die bei höheren Temperaturen im Gleichgewicht mit der oligomeren Form stehen (van Montfort *et al.*, 2001). Eine Geschwindigkeitskonstante für den Austausch von Untereinheiten von Fluoreszenz markiertem α A-Kristallin und unmarkiertem α A- oder α B-Kristallin von $3,8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ wurde ermittelt (Bova *et al.*, 2000). Für Hsp18.1 und Hsp16.9 wurden Dissoziationskonstanten bei 24°C von $0,24 \text{ min}^{-1}$, respektive $0,2 \text{ min}^{-1}$ bestimmt (Sobott *et al.*, 2002). Das ist etwa sechs mal schneller als die

Geschwindigkeitskonstante von α A-Kristallin ($0,075 \text{ min}^{-1}$). Mit Hilfe von FRET wurde auch gezeigt, dass in *Mj*Hsp16.5 bei Temperaturen oberhalb von 60°C ein Austausch von Untereinheiten mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $0,067 \text{ min}^{-1}$ erfolgt (Bova *et al.*, 2002). Für Hsp26 konnten mittels Aufnahme von Fluoreszenzspektren bei einer Konzentration von $0,01 \text{ mg/ml}$ Hsp26 Dissoziationskonstanten von $k = 0,1 \text{ min}^{-1}$ bei 35°C bestimmt werden. Bei 40°C erhöhte sich die Geschwindigkeitskonstante auf $k = 0,6 \text{ min}^{-1}$, während bei 43°C sich die Geschwindigkeitskonstante um den Faktor 4,6 auf $k = 2,8 \text{ min}^{-1}$ erhöht. Dies zeigt, dass Hsp26 im Vergleich zu anderen sHsps viel schneller dissoziiert.

Für α A-Kristallin wurde für den Austausch von Untereinheiten eine Aktivierungsenergie (E_A) von 60 kcal/mol ($247,8 \text{ kJ/mol}$) berechnet (Bova *et al.*, 1997), für Hsp16.5 von 84 kcal/mol ($346,9 \text{ kJ/mol}$) (Bova *et al.*, 2002). Die mittels Fluoreszenz ermittelte Aktivierungsenergie für die Dissoziation von Hsp26 liegt im Bereich der für α A-Kristallin und Hsp16.5 ermittelten Werte.

Für Hsp26 wurden für die Dissoziation und Reassoziaton folgende in Tabelle 4.1 zusammengefassten Aktivierungsenergien berechnet:

Tabelle 4.1 Zusammenstellung der ermittelten Aktivierungsenergien (E_A) für die Dissoziation und Assoziation von Hsp26.

Hsp26 [mg/ml]	Dissoziation [kJ/mol]	Assoziation [kJ/mol]	Methode
0,05	n.b.	26,1	HPLC
0,01	328,6 (79,5kcal/mol)	n.b.	Fluori
0,05	286,5 (69,2 kcal/mol)	n.b.	Fluori
0,1	n.b.	-31,1	CD
0,3	103,6 (25,1 kcal/mol)	-32,99	CD (Arrhenius Plot)
0,3	209,4 (50,7 kcal/mol)		CD (Temperaturübergang)

Ob die Gesamtenergie für die Entfaltung von Hsp26 mit jener für andere sHsps bestimmten Energien übereinstimmen, wurde mittels Kalorimetrie bestimmt. Nachdem diese Übergänge nicht reversibel waren, können diese Daten nur als Anhaltspunkte gesehen werden.

Für die komplette Entfaltung von Hsp26 werden 130 kcal/mol ($536,9 \text{ kJ/mol}$) benötigt (Abbildung 4.2). Wird dieser Wert mit der benötigten Umwandlungsenergie für die N-terminal verkürzte Form von Hsp26 ($\text{Hsp26}\Delta\text{N}$, $\Delta H_{\text{cal}} = 121 \text{ kcal/mol} = 499,7 \text{ kJ/mol}$)

verglichen, so ist eine Differenz von 9 kcal/mol (37,2 kJ/mol) zu beobachten. Hsp26 Δ N assoziiert nicht zu hocholigomeren Komplexen, sondern liegt als Dimer oder Tetramer vor. Die Differenz von lediglich 9 kcal/mol ist der Energiebedarf, der für die Dissoziation des 24mers notwendig sind. Eine Integration des ersten Umwandlungsprozesses von Hsp26 ergibt für die Dissoziation einen Energiebedarf von 4 kcal/mol (16,5 kJ/mol). Diese beiden Werte stimmen Größenordnungsmässig überein, weichen jedoch von den mittels CD, oder Fluoreszenzkinetiken bestimmten Energien ab (siehe oben).

Für Hsp27 und α B-Kristallin wurden für die Entfaltung kalorimetrisch bestimmte Enthalpien von 72,3 kcal/mol (289,6 kJ/mol) bzw. 41,7 kcal/mol (172,2 kJ/mol) gemessen. Hsp26 scheint mit 130 kcal/mol (536,9 kJ/mol) stabiler als die Säuger sHsps zu sein.

Für α -Kristallin wurden laut Literatur Enthalpieänderungen von $\Delta H=339\pm 9$ kJ/mol Untereinheiten berechnet. Die konformationelle Stabilität ist jedoch mit Werten von $\Delta G=24\pm 5$ kJ/mol (Gesierich & Pfeil, 1996), im Vergleich zu $\Delta G^*_d = 86,9$ kJ/mol von Hsp26 sehr gering.

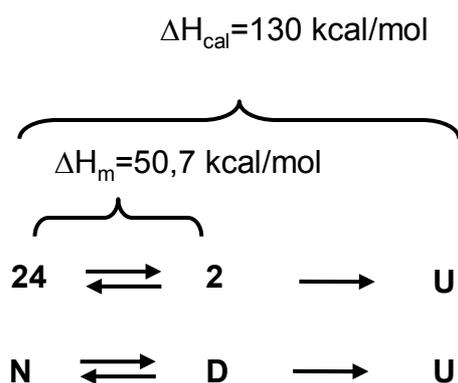


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der benötigten Energiebeiträge für die Dissoziation und Entfaltung von Hsp26. Hsp26 Oligomer: 24, Hsp26 Dimer: 2, U: entfaltetes Protein, N: natives Protein, D: Hsp26 Dimer

Mit Hilfe der Eyring Gleichung wurde die Enthalpie- und Entropieänderung ermittelt und daraus die freie Energie berechnet. Am Übergangsmittelpunkt, dem thermodynamischen Äquilibrium, ist die Änderung der freien Energie gleich Null. Für Hsp26 wurde ein Übergangsmittelpunkt von 38,5°C berechnet. Die Änderung der freien Energie bei 25°C beträgt $\Delta G^*_d = 86,9$ kJ/mol und $\Delta G^*_a = 80,9$ kJ/mol.

Aus der Temperaturabhängigkeit der Sekundärstrukturänderung (CD) im Bereich von 20°C bis 55°C ergab sich für Hsp26 eine Änderung der Enthalpie am Übergangsmittelpunkt von $\Delta H_m=209,4$ kJ/mol (50,7 kcal/mol) (Abbildung 4.2). Nachdem zwischen 0,05 mg/ml und

0,3 mg/ml keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet wurde, kann der gleiche Energiebedarf für geringere Konzentrationen angenommen werden.

Die Tatsache, dass die Dissoziation- und Assoziationsreaktion nicht vollständig reversibel sind, lässt keine exakte Ermittlung der jeweiligen Reaktionsenergien zu.

Der Austausch von Untereinheiten korreliert bei verschiedenen sHsps stark mit der Chaperonaktivität (Giese & Vierling, 2002; Sobott *et al.*, 2002; Bova *et al.*, 2002). Die Chaperonaktivität von Hsp26 nimmt bei Temperaturen bei denen das Oligomer dissoziiert ($> 32^{\circ}\text{C}$) zu (Walke, 1996; Stromer, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999). Durch die Dissoziation zu Dimeren werden potentielle Bindestellen für ungefaltete Proteine freigelegt. Die kürzliche Aufklärung der Kristallstruktur von Hsp16.9 aus Weizen unterstützt die Idee, dass Dimere die Austauschseinheiten der oligomeren Assemblierung repräsentieren. Für verschiedene sHsps konnte gezeigt werden, dass temperaturinduzierte dynamische Änderungen des Oligomerisierungsgrades reversible Prozesse darstellen (van Montfort *et al.*, 2001; Giese & Vierling, 2002). Auch Hsp26 Dimere reassoziieren unter physiologischen Bedingungen wieder zum Oligomer (Stromer, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999). Erste Hinweise, dass sich der reassozierte Komplex (rHsp26) vom ursprünglichen Oligomer (nHsp26) unterscheidet wurden durch Berechnung der für die Dissoziation bzw. Assoziation benötigten Aktivierungsenergien mittels Arrhenius Plot geliefert (Abbildung 3.18). Im Temperaturbereich von 26°C bis 37°C ist keine Linearität zu beobachten, sondern eine deutliche Krümmung, was bedeutet, dass sich mehrere Effekte überlagern. Bei höheren Temperaturen erfolgt eine Änderung des Reaktionsmechanismus, wobei die Reassoziierung hier in Konkurrenzreaktion mit der Dissoziation steht.

Für die Assoziation des Oligomers wurden negative Aktivierungsenergien beobachtet, was mit der Vorstellung einer Aktivierungsenergie schlecht vereinbar ist. Dies deutet daraufhin, dass eine apparente Geschwindigkeitskonstante gemessen wurde, die eine Gleichgewichtskonstante eines Vorgleichgewichtes einschließt. Das deutet auf zwei geschwindigkeitsbestimmende Schritte bei der Assoziation hin, wovon einer nicht zum Signal beiträgt.

Die Tatsache, dass der reassozierte Komplex (rHsp26) verglichen mit nHsp26 auf der Gelfiltration ein verändertes Laufverhalten aufweist, legt die Vermutung nahe, dass dies einer der Schritte des vorgeschalteten Gleichgewichtes ist (Abbildung 3.20). Die genaue Frage,

welche Strukturänderung das vorgeschaltete Gleichgewicht bestimmt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Untersuchungen zu rHsp26 und nHsp26 zeigten, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur der beiden Spezies gleich sind. Unterschiede konnten nur in der Quartärstruktur festgestellt werden.

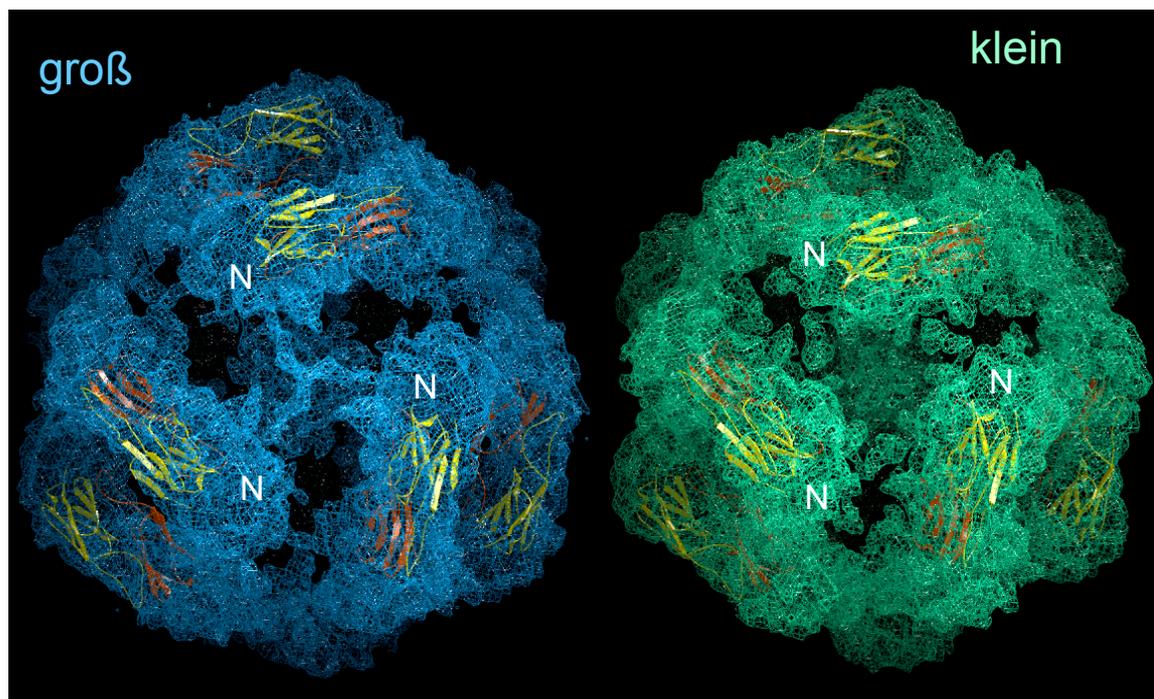


Abbildung 4.3 3D-Rekonstruktion von Hsp26 Partikeln. Durch Kryoelektronenmikroskopische Untersuchung und Einzelpartikelanalysen wurden verschiedene Hsp26 Spezies in drei Klassen zusammengefasst: Eine große, eine kleine und eine intermediäre Klasse. (H. Saibil, pers. Mitteilung)

Interessanterweise konnte Helen Saibil (Birckbeck College London) durch die Kryoelektronenmikroskopische Untersuchung von Einzelpartikeln drei unterschiedliche Hsp26 Spezies detektieren (Abbildung 4.3). Von 15352 untersuchten Partikeln, wurden 60% in die Klasse der „großen“ Partikel gestuft, 20% in die als „klein“ bezeichnete Klasse, sowie 20% in eine gemischte, intermediäre Klasse. Die große Klasse beinhaltet Partikel mit einem Durchmesser von 19 nm, während die Partikel der kleinen Klasse, einen Durchmesser von 18 nm aufweisen. Trotz der regelmäßigen Anzahl von Untereinheiten scheinen die Hsp26 Oligomere leicht unterschiedlich in ihrer Größe zu sein. Diese Beobachtung erklärt auch die Schwierigkeit streuende Kristalle zu bekommen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Unterschiede mittels Gelfiltration (SEC) nicht beobachtet werden. SEC-Experimente von Hsp26 (bei 25°C), ohne weitere Inkubationsschritte, zeigten stets einen singulären Peak. Ebenso konnten dynamische

Lichtstreuungsmessungen in einer Flusszelle der Firma Wyatt Technology das Auftreten von zwei Populationen nicht bestätigen. Die Messung erfolgte jedoch nach chromatographischer Auftrennung.

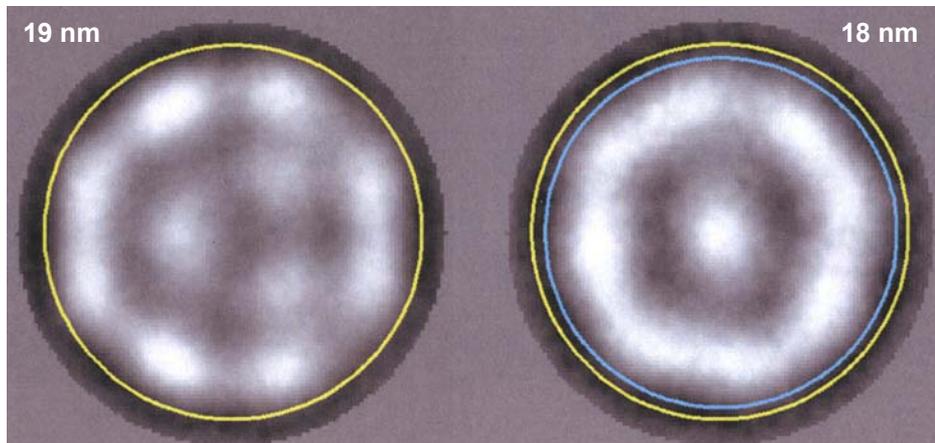


Abbildung 4.4 Durchschnitt der alignierten Hsp26 Klassen. Die unterschiedliche Verteilung von Massendichte deutet auf unterschiedliche Zusammenhalte der Oligomere. (H. Saibil, pers. Mitteilung)

Eine genauere Betrachtung der Peakflächen nach Chromatographie zeigte, dass der Peak von rHsp26 (stets mit einem geringeren Fluoreszenzsignal) in den Peak von nHsp26 integriert werden kann, ohne dass eine Schulter im Peak beobachtet wird. Möglicherweise sind immer beide Spezies vorhanden. Nach Hitzeschock wird zumindest ein Großteil in die „kleinere“ Spezies umgewandelt. Die Tatsache, dass der reassozierte Hsp26 Komplex schneller dissoziiert als nHsp26 spricht für eine teilaktivierte Vorstufe, die auf den nächsten Stressauslöser wartet, um dann schneller als Chaperon aktiv zu sein. Eine statistische Auswertung von Kryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen von nHsp26 im Vergleich zu rHsp26 könnte die obige Hypothese unterstützen.

Die ermittelten Reaktionswege für die Dissoziations- und Assoziationsreaktion können nur als Anhaltspunkte gewertet werden (Abbildung 4.5). Die Tatsache, dass die ermittelten Werte stark differieren und Produkt (N_{24}^*) und Edukt (N_{24}) sich unterscheiden, spricht aber dafür, dass Dissoziation und Assoziation über unterschiedliche Zwischenstufen verlaufen. Die Anzahl der auftretenden Intermediate (I_1 - I_n) bleibt unbekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass sowohl bei der Dissoziation als auch bei der Assoziation mindestens eine Zwischenstufe auftritt. Die Tatsache, dass rHsp26 über Wochen bei 25°C stabil ist, spricht nicht für eine direkte Umwandlung von N_{24}^* zu N_{24} . Vielmehr wird eine Rückreaktion über das Dimer vermutet.

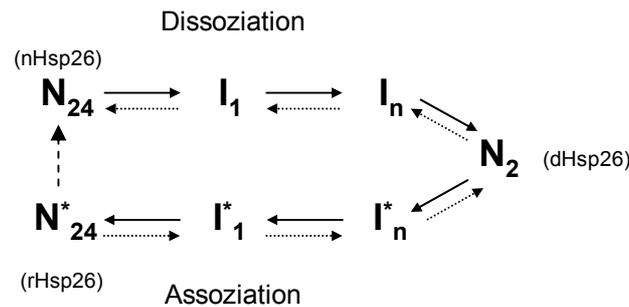


Abbildung 4.5 Modell zur Dissoziation und Assoziation von Hsp26. N_{24} : natives Hsp26 (nHsp26), I_1, I_n : Dissoziations-Intermediate; I_1^*, I_n^* : Assoziations-Intermediate (I_n , da die Anzahl der auftretenden Intermediate unbekannt ist). N_{24}^* : reassoziiertes Hsp26 (rHsp26).

Die Beobachtung von großen, kleinen und intermediären Hsp26 Partikeln durch Kryoelektronenmikroskopie spricht jedoch für eine direkte Umwandlung von N_{24}^* zu N_{24} .

Die Unterschiede zwischen N_{24}^* und N_{24} müssen noch genauer untersucht werden, ebenso muss der postulierte Weg der Dissoziation und Assoziation verifiziert werden. Das vorgeschlagene Modell soll als Ausgangspunkt für weitere Experimente betrachtet werden.

4.2 Hsp26 und Substratproteine

Im Hitzeschock-Temperaturbereich treten im Hsp26 Oligomer signifikante strukturelle Umlagerungen auf, die die Chaperoneigenschaft des Proteins beeinflussen (Stromer, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999). Die Änderung der Quartärstruktur geht mit einer Konformationsänderung, die zur Exposition von hydrophoben Oberflächen führt, einher (Walke, 1996). Diese hydrophoben Oberflächen könnten die Bindestellen für entfaltete Proteine sein. Die Beobachtung, dass das bei 43°C gebildete Hsp26 Dimer deutlich aktiver ist, als das bei 25°C vorliegende 24mer, stützt diese Vermutung.

Die Hypothese, dass dynamische Änderungen der Oligomerisierung eine Voraussetzung für die Chaperonaktivität *in vitro* sind, wurde kürzlich bekräftigt und auch für die sHsp Funktion *in vivo* bestätigt (Lee & Vierling, 2000; Giese & Vierling, 2002).

Ob diese Aktivierung der Chaperonaktivität durch Dissoziation für die *in vivo* Funktion von Hsp26 von Bedeutung ist, wurde in Hefe-Zelllysaten untersucht (Haslbeck *et al.*, 1999). Dabei wurde gezeigt, dass Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten gebunden werden. Rückschlüsse auf die Identität der gebundenen Proteine konnten bisher nicht getroffen werden. Unter Hitzeschockbedingungen zeigte sich, dass die temperaturinduzierten strukturellen Änderungen für die funktionelle Aktivierung von Hsp26 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* notwendig sind (Haslbeck, 2001). Hsp26 wäre somit ein intrazellulärer Sensor

für Temperaturerhöhungen. Auch für α B-Kristallin wurde postuliert, dass seine Chaperonfunktion mit zunehmender Temperatur steigt (Raman *et al.*, 1995) für Hsp25 hingegen konnte keine temperaturabhängige Zunahme der Chaperonfunktion beobachtet werden (Stromer *et al.*, 2003). Hsp26 zeigt, wie auch α B-Kristallin, aber im Gegensatz zu Hsp25, eine Temperaturabhängigkeit seiner Chaperonaktivität.

Das in Abbildung 4.6 dargestellte Modell fasst die Chaperonfunktion von Hsp26 zusammen. Hitzeschock führt in der Zelle zu unterschiedlichen Prozessen. Einerseits führt Hitzeschock zur Entfaltung mit nachfolgender Aggregation von zellulären Proteinen. Andererseits kommt es zur temperaturinduzierten Dissoziation von Hsp26, eine Voraussetzung für seine Chaperonfunktion, wobei das Hsp26 Dimer die primäre Substrat-Bindungspezies bildet.

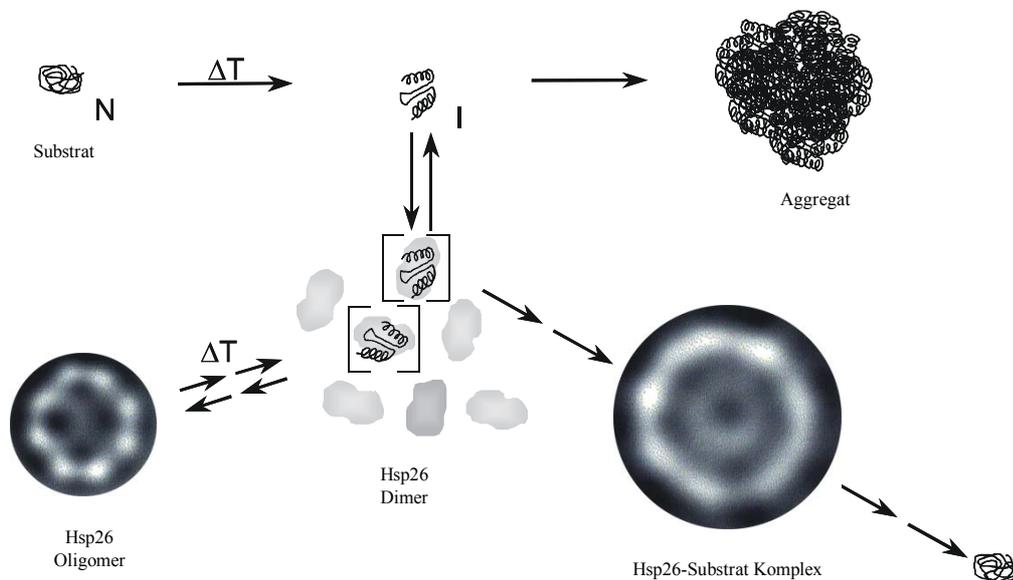


Abbildung 4.6 Modell zur Chaperonfunktion von Hsp26. Unter physiologischen Bedingungen liegt Hsp26 als inaktive, oligomere Speicherform vor. Unter Hitzeschock dissoziiert Hsp26 in Dimere, welche entfaltetes Protein binden können. Somit wird die irreversible Aggregation zellulärer Proteine unterbunden. Die Substratbeladenen Dimere assoziieren in einem kooperativen Prozess in große definierte Hsp26-Substratkomplexe. Nach der Loslösung des Substrates reassoziiert Hsp26 unter physiologischen Bedingungen wieder in seine inaktive Speicherform. Die Substratbeladenen Dimere sind in Klammer gesetzt, da diese Form bisher nicht direkt nachgewiesen werden konnte. N, nativ; I, Intermediat und inaktiv.

In einem weiteren Prozess kommt es zu einer kooperativen Assoziation substratbeladener Dimere und zur Ausbildung großer Chaperon-Substrat Komplexe (Stromer, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999).

Das ungefaltete Protein kann entweder mit Hilfe anderer Chaperone, wie Hsp70, in seinen nativen Zustand zurückfalten (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997b) und Hsp26 reassoziert unter physiologischen Bedingungen wieder zu inaktiven Oligomeren, oder der Komplex wird eventuell nach Ubiquitinierung dem Degradationsapparat der Zelle zugeführt. Ein ähnlicher Dissoziations-Aktivierungsmechanismus wurde auch für BiP, einem im ER lokalisierten Chaperon der Hsp70 Familie beschrieben. BiP bildet normalerweise inaktive Dimere und dissoziiert bei Kontakt mit denaturierten Substraten in aktive Monomere (Blond-Elguindi *et al.*, 1993). Dieser Mechanismus kann als Variante des vorgeschlagenen Modells gesehen werden, wobei hier das denaturierte Substrat selbst und nicht die erhöhte Temperatur zur Aktivierung des Chaperons führt. Für Hsp33, ein zytosolisches Chaperon aus *E. coli*, wurde die Regulierung der Chaperonaktivität durch den Redox-Zustand der Zelle beschrieben (Jakob *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus stellt den ersten Verteidigungsmechanismus der Zelle gegen den toxischen Effekt von oxidativem Stress dar. Im allgemeinen schließt dieser Aktivierungsmechanismus eine zeitliche Lücke bis zum Anlaufen der generellen Stressantwort (Ruddock & Klappa, 1999). Es könnte also sein, dass die direkte Aktivierung von Chaperonen durch die Stresssituation ein weiter verbreiteter Mechanismus ist, als bisher angenommen. Die durch Hitze induzierte Dissoziation und Aktivierung von sHsps stellte möglicherweise einen frühen und einfachen Regulationsmechanismus dar, der im Laufe der Evolution in höheren Eukaryoten durch einen eleganteren Regulationsmechanismus ersetzt wurde. Anstelle eines direkten Temperaturerkennungssystems, können zusätzliche Signale, wie z.B. Phosphorylierung, getreten sein. Die durch Phosphorylierung induzierte Aktivierung von α B-Kristallin führt zu einer verstärkten Bindung von Substrat und damit zu einer erhöhten Chaperonaktivität (Koteiche & Mchaourab, 2003).

Unterschiede gibt es nicht nur im Aktivierungsmechanismus. Einzelne sHsps scheinen sich auch bezüglich der Wechselwirkung mit nicht nativen Proteinen zu unterscheiden. Hsp26 verlangsamt die Inaktivierungskinetik von CS, während Hsp25 aus Maus diese nicht verlangsamt (Ehrnsperger *et al.*, 1997b; Haslbeck *et al.*, 1999). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass Hsp25 CS fester bindet als Hsp26. Zwei pflanzliche sHsps (Hsp17.7 und Hsp18.1) verhalten sich ähnlich wie Hsp26 (Lee *et al.*, 1995). Während generelle Chaperonfunktionen von sHsps konserviert zu sein scheinen, existieren Unterschiede in der Art der Substratbindung. Diese Unterschiede scheinen jedoch auch Substratabhängig zu sein. Während Hsp26 die Entfaltungsintermediate von CS nur transient bindet, werden die von

α -Glukosidase fester gebunden und die Inaktivierungskinetik wird nicht verlangsamt. CS ist im Gegensatz zu α -Glukosidase ein monomeres Protein. Möglicherweise gibt es Unterschiede im Entfaltungsmechanismus. Für CS ist bekannt, dass es frühe, dimere Faltungsintermediate und späte, monomere Faltungsintermediate gibt (Jakob *et al.*, 1995; Grallert *et al.*, 1998). Hsp26 bindet die frühen Entfaltungsintermediate transient, während die späten Entfaltungsintermediate, die zur Aggregation neigen, sehr stabil gebunden werden.

In vitro agieren sHsps als molekulare Chaperone, indem sie entfaltende Proteine vor irreversibler Aggregation schützen und sie in einer rückfaltbaren Form halten. Aufgrund ihrer hohen Bindekapazität von bis zu einem Substratmolekül pro sHsp Untereinheit, sind sie in dieser Beziehung deutlich effizienter als andere Chaperone (Haslbeck & Buchner, 2002). Die Bandbreite an Substraten, die von sHsps erkannt wird, umspannt sowohl Peptide als auch oligomere Proteine (Ehrnsperger *et al.*, 1998b). Eine Substratspezifität wurde bisher noch nicht beobachtet, auch ist wenig über die Struktur der sHsp-Substrat Komplexe bekannt. Desweiteren ist eine genauere Betrachtung der Komplexbildung sowie Untersuchungen zur Art und Stabilität der Interaktionen noch nicht durchgeführt worden.

Um Einblick in die Art der Interaktion mit nicht nativen Proteinen zu bekommen, wurden vier verschiedene Modellsubstrate, mit molekularen Massen zwischen 3-100 kDa herangezogen (vgl. 3.4). Mit jedem verwendeten Substrat bildeten sich in Gegenwart von Hsp26 morphologisch charakteristische und definierte Komplexe (Abbildung 3.32). Die Bestimmung der Partikelgrößen mittels Elektronenmikroskopie nach Negativ Kontrastierung zeigte für Hsp26 einen Durchmesser von ca. 15 nm. Nach Bindung von CS wurden globuläre Partikel mit Durchmessern von ~50 nm beobachtet. Die Bindung von Rhodanase an Hsp26 führte zur Ausbildung von ähnlichen, aber etwas kleineren Komplexen, mit Durchmessern von ~45 nm. Interessanterweise, bildete murines Hsp25 (\emptyset 20 nm) mit CS größere Komplexe aus. Durchmesser von 70 nm wurden beobachtet, d.h. die Hsp25-CS Komplexe sind um den Faktor 1,4 größer als die CS-Hsp26 Komplexe, allerdings ist Hsp25 an sich um einen Faktor von 1,3 größer als Hsp26. Die unterschiedlichen Komplexgrößen zwischen Hsp26 und Hsp25 mit CS resultieren vermutlich aus unterschiedlichen Bindestöchiometrien (siehe unten).

Die Komplexe von Hsp25 und Rhodanase, mit einem Durchmesser von etwa 45 nm sind gleich groß wie die Hsp26-Rhodanase Komplexe. Die α -Gluk-Hsp26 Komplexe, mit einem Durchmesser von ~30 nm, sind kleiner und weniger regelmäßig als die mit Rhodanase oder CS gebildeten Assoziate. Netzartige Strukturen, die etwa die Breite von Hsp26 aufweisen,

wurden in Gegenwart von Insulin gebildet. Werden die Substratkomplexe von Hsp26 mit denen von Hsp25 verglichen, konnten ähnliche Morphologien und ähnliche Größen beobachtet werden. Unterschiede in der Komplexgröße wurden nur im Falle von CS und Hsp25 beobachtet (Stromer *et al.*, 2003).

Zusammenfassend deuten diese Daten daraufhin, dass die Bildung von großen, definierten Substrat-sHsp Komplexen eine generelle Eigenschaft von sHsps ist, die über einen langen Evolutionszeitraum konserviert wurde. Die Morphologie dieser Komplexe ist substratabhängig aber nahezu unabhängig vom verwendeten sHsp.

Wie Untersuchungen mittels Gelfiltration zeigten, wird der Prozess der Substratbindung an Hsp26 durch das verwendete Substrat beeinflusst. Nach der Inkubation von Hsp26 mit CS oder Rhodanase konnten sofort voll beladene Hsp26-Substrat Komplexe detektiert werden. Verlängerte Inkubationen führten zu keiner Vergrößerung der Komplexe, aber zu einer Zunahme der Komplex-Anzahl. Im Falle von α -Glukosidase und Insulin wurden nach Inkubation von substöchiometrischen Mengen von Substrat und sHsp, intermediäre Partikelgrößen beobachtet.

Die großen Komplexe, die mittels Gelfiltration und Elektronenmikroskopie detektiert wurden, deuten auf die Bindung mehrerer Substrate an Hsp26 Oligomere hin. Eine maximale Bindekapazität von einem Protein pro sHsp Untereinheit wurde mehrfach postuliert (Wang & Spector, 1995; Farahbakhsh *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997). Für Hsp26 wurden Bindestöchiometrien von einem CS Monomer oder α -Gluk pro Hsp26 Dimer berechnet (Haslbeck *et al.*, 1999). Unterschiede gibt es in der Stöchiometrie von Hsp25. Während pro Hsp25 Monomer ein CS Monomer bindet, sind es im Falle für α -Glukosidase ein Monomer pro Hsp25 Tetramer (Stromer *et al.*, 2003).

Besonders im Falle von CS und Rhodanase zeigen die Partikel wenig Varianz in Größe und Form. Nur regelmäßige Partikel wurden gebildet. Zum Teil beladene und damit auch kleinere Partikel konnten nicht beobachtet werden. Die Bildung von sHsp-Substrat Komplexen scheint zumindest bei manchen Substraten, wie CS hoch kooperativ zu sein (Haslbeck *et al.*, 1999). Im Falle von Hsp26 resultiert die Kooperativität in der Zusammenlagerung der mit Substrat beladenen Dimere zu großen, regelmäßigen Komplexen. Mit Hsp25 wurde auch eine Kooperativität in der Komplexbildung beobachtet. Hier erfolgt jedoch keine vorherige Dissoziation, d.h. die Substratbindung ist der kooperative Prozess (Stromer *et al.*, 2003).

Die Kooperativität der α -Gluk Bindung an Hsps (Hsp25 und Hsp26) ist weniger ausgeprägt als die der CS-Bindung. Auch der Grad an Kooperativität scheint ähnlich wie die Komplexmorphologie substratabhängig zu sein.

Die simultane Bindung von nicht nativen Proteinen scheint für eine effiziente und stabile Komplexbildung notwendig zu sein. Für alle untersuchten Proteine, mit Ausnahme von Insulin, konnte die Bindung bei einem bestimmten Verhältnis von Substrat zu sHsps gesättigt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte jedoch noch nicht im Detail geklärt werden.

Die Ausbildung gemischter Hsp26-Substrat Komplexe mit unterschiedlichen Substratproteinen (3.4.5) scheint im Kontext der hohen Proteinkonzentrationen in der Hefezelle wahrscheinlich. Nach Stresseinwirkung entfalten viele verschiedene Polypeptide und müssen gleichzeitig gebunden und stabilisiert werden. Interessanterweise können mindestens zwei unterschiedliche Substrate an Hsp26 komplexiert werden. Dies führt zur Ausbildung von morphologisch einheitlichen, gemischten Komplexen. Die Untersuchung der Komplexe mittels EM zeigte jedoch abhängig von der Substratzugabe markante Unterschiede in der Morphologie. Das erste gebundene Substrat scheint die Morphologie der Komplexe zu bestimmen.

Gemischte Komplexe von Hsp26 mit CS, α -Glukosidase und Rhodanase zeigten inhomogene Assoziate. CS/Rhodanase-ähnliche Komplexe, sowie α -Glukosidase ähnliche Komplexe wurden detektiert. Diese Inhomogenität deutet darauf, dass das erste gebundene Substrat den Weg für die Morphologie des resultierenden Komplexes determiniert.

Promiskuität in der Substratbindung scheint eine hochkonservierte Eigenschaft von sHsps zu sein. Hsp25 aus Maus zeigt ein ähnlich breites Substratmuster, wie Hsp26, obwohl das Säuger Hsp einen anderen Aktivierungsmechanismus aufweist (Ehrensperger *et al.*, 1998b). Auch führten die Interaktionen von Hsp25 und Hsp26 mit verschiedenen Substraten zu sehr ähnlichen Komplexmorphologien (Stromer *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Hsp25, muss Hsp26, um Substrate binden zu können, durch Dissoziation des Oligomers in Dimere aktiviert werden. Bei Hsp25 erfolgt die Dissoziation nach Phosphorylierung (Rogalla *et al.*, 1999). Phosphoryliertes Hsp25 zeigt keine Chaperonaktivität, ist aber in Signaltransduktionsprozesse involviert. Der Vergleich von Hsp25 aus Maus und Hefe Hsp26 verdeutlicht, dass Säuger sHsps zwar zusätzliche Funktionen angenommen haben, die Chaperonaktivität sowie der Mechanismus der Substratkomplexierung aber von Hefe bis zu Säugern konserviert blieb.

Die Größe der Substratkomplexe legt die Hypothese nahe, dass Substratproteine an der Oberfläche von sHsp Partikeln binden (Farahbakhsh *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1998b). Eine Bindung in einem zentralen Hohlraum, wie sie von Boyle *et al.* (1993) vorgeschlagen wurde, scheint unmöglich. Die Aneinanderlagerung von Komplexen beruht außerdem wohl auf der Interaktion oberflächengebundener Substratmoleküle, wie für Insulin postuliert. Die Substratbindung an die Oberfläche der sHsps wurde für pflanzliches Hsp18.1 gezeigt (Lee *et al.*, 1997). Auch die Bindung von Peptiden und Proteinen an Hsp25 (Ehrnsperger *et al.*, 1998b) spricht für die Zugänglichkeit von gebundenem Protein.

Aufgrund der Ähnlichkeiten in der Komplexbildung sowie in der Morphologie ist es nahe liegend anzunehmen, dass im Allgemeinen für sHsps große Umlagerungen im Komplex, aufgrund der Bindung von nicht nativem Protein, hervorgerufen werden.

Kryo-EM Aufnahmen (Abbildung 4.7) zeigen, dass die Hsp26-CS Komplexe eine definierte Struktur haben, die sich deutlich von der Struktur des Hsp26 Komplexes unterscheidet (Haslbeck *et al.*, 1999). Der Hsp26-CS Komplex scheint eine komplett neue Zusammenlagerung zu sein, in der die ursprüngliche Hsp26 Schale durch eine neue größere und viel dickere äußere Schale ersetzt wurde. Zusätzlich bildete sich eine neue interne Schale. Der Komplex kann nicht durch eine zusätzliche Substratschale zur vorhandenen Hsp26 Schale erklärt werden. Keine dieser beiden Schalen gleicht der ursprünglichen Hsp26 Schale.

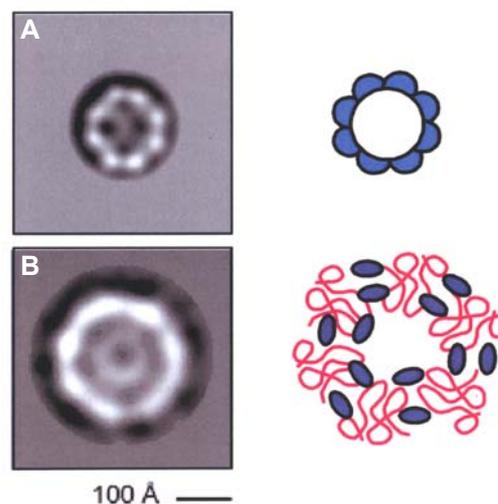


Abbildung 4.7 Vergleich der Hsp26 Komplexe mit Hsp26-CS Komplexen. **A:** Mittelwert aller alignierter Hsp26 Bilder. **B:** Mittelwert aller alignierter Hsp26-CS Aufnahmen. Schematische Darstellung der Substratbindung: Hsp26 (blau) und entfaltete CS (rot). Die Länge des Skalierungsbalkens beträgt 10 nm.

Durch die Assoziation der CS-gebundenen Hsp26 Dimere kommt es zur Ausbildung eines neuen Komplexes. Dieser Befund impliziert, dass das Substrat weder außen noch innen

gebunden ist. Die schematische Darstellung in Abbildung 4.7 liefert eine Vorstellung der Substratverteilung im Hsp26-CS Komplex (H. Saibil, pers. Mitteilung). Diese Substratverteilung wurde durch limitierte Proteolyse von Hsp26-CS Komplexen bestätigt (nicht gezeigt). Keines der beiden Proteine konnte vor Proteasen geschützt werden. Auch die Bindung von Gold markierten Hsp26 und CS Antikörpern an den Komplex bestätigt diese Hypothese (Stromer, 1998).

Die neue Zusammenlagerung der Hsp26-CS Komplexe spiegelt sich auch in deren Stabilität wider. Der Komplex ist über lange Zeiträume stabil. Auch weist er gegenüber chaotropen Agenzien eine geringfügig höhere Stabilität, im Vergleich zum Hsp26 Oligomer, auf. Die Tatsache, dass der Komplex in Gegenwart von Harnstoff zerfällt, spricht gegen ein festes „Zusammenkleben“ des Komplexes durch CS. Vielmehr scheint eine Polarisierung im Hsp26 Dimer vorhanden zu sein, die zwischen Substratbindung und Komplexzusammenlagerung differenziert. Diese Vermutung spricht auch für eine Substratbindestelle im Dimer.

Eine erhöhte Stabilität der Hsp26-Substrat Komplexe ist vor allem notwendig, wenn eine Langzeitspeicherung von entfaltenen Substraten erforderlich ist. Postuliert wird, dass Chaperone und Substrate über geladene Aminosäurereste interagieren (Van Montfort *et al.*, 2002). Ionenpaarungen sind zusätzlich zu hydrophoben Interaktionen für eine erhöhte Stabilität der Hsp26-Substratkomplexe verantwortlich.

Lange Zeit wurde angenommen, dass, anders als bei ATP-abhängigen Chaperonen wie GroEL oder Hsp70, Substratmoleküle, die an sHsps gebunden vorliegen, nicht reaktivierbar sind. Es wurde sogar vorgeschlagen, dass an pflanzliche sHsps gebundene Proteine dem Degradationsapparat der Zelle zugeführt werden (Lee *et al.*, 1995). Dies würde aber einen großen Proteinverlust für die Zelle bedeuten.

Erste Hinweise, dass sHsp-Substrat Komplexe keine Sackgasse darstellen, wurden mit an Hsp25 gebundener CS gezeigt (Ehrnsperger *et al.*, 1997b). CS konnte nach Zugabe des ATP-abhängigen Chaperons Hsp70 freigesetzt werden und zum nativen Zustand falten. Die Loslösung von an Hsp26 gebundenen Substraten durch verschiedene Chaperonsysteme ist in Hefe prinzipiell möglich. Versuche die an Hsp26 gebundenen Substrate *in vitro* mit Ssa1 und Ydj1 loszulösen, schlugen fehl. Möglicherweise war das Hefe Hsp70 (Ssa1) im Versuchsansatz nicht aktiv (S. Walter, pers. Mitteilung) oder in Hefe interagieren andere Faktoren mit Hsp26 um die Loslösung von Substraten zu initiieren. Alternativ könnte auch ein weiterer Faktor innerhalb des Hsp70 Chaperonsystems nötig sein. Hefe besitzt mehrere

cytosolische Vertreter der Hsp70-Familie (Ssa's und Sse's), sowie verschiedene Kochaperone der Hsp40-Gruppe (Ydj1 und Sis1). Weitere gezielte *in vitro* Experimente sind für eine genaue Aufklärung der funktionellen Interaktion der Hsp70-Familie mit den sHsps notwendig.

4.3 Charakterisierung von Hsp26 Δ N und Hsp26 Δ N30

Anhand von Genstrukturen und internen Symmetrien postulierte Wistow (1985), dass die α -Kristalline aus einer „hydrophilen“ C-terminalen Domäne, welche die Löslichkeit des Proteins vermittelt, und einer „hydrophoben“ N-terminalen Domäne, welche für die Assemblierung der Untereinheiten verantwortlich ist, bestehen. Diese beiden Domänen sind über ein kurzes Peptidstück miteinander verknüpft. Die Sekundärstruktur der aminoterminalen Domäne weist eine ungeordnete Struktur mit α -helikalen Bereichen auf, während die carboxyterminale Domäne vorwiegend aus β -Faltblattstrukturen aufgebaut ist (siehe Abbildung 4.8).

Ein wichtiger Aspekt kleiner Hitzeschockproteine ist die Ausbildung oligomerer Strukturen, die je nach Umweltbedingungen und Art der sHsps, von 150 kDa bis mehrere MDa groß sein können (Arrigo, 1998). Diese Komplexbildung sowie Umlagerungen im Komplex scheinen eine strukturelle Voraussetzung für die Chaperonfunktion kleiner Hitzeschockproteine zu sein. Weder natürlich vorkommende assemblierungs-inkompetente α -Kristalline, noch Proteine, die aufgrund von Mutationen die Fähigkeit verloren haben große Komplexe auszubilden, sind effiziente Chaperone (Leroux *et al.*, 1997a; Leroux *et al.*, 1997b; Kokke *et al.*, 1998).

Welche strukturelle Domäne der sHsps für die Oligomerisierung und Substratbindung verantwortlich ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Um näheren Einblick in die Organisation und Funktionalität der drei Regionen (N-terminale Domäne, α -Kristallindomäne und C-terminale Extension) zu bekommen, wurden zwei Fragmente von Hsp26 konstruiert, Hsp26 Δ N und Hsp26 Δ N30. Die Aminosäure Sequenz von Hsp26 (siehe Abbildung 4.8) verdeutlicht die Zusammensetzung der verwendeten Fragmente. Hsp26 Δ N, bestehend aus der α -Kristallindomäne (blau) und C-terminaler Extension (grün) und Hsp26 Δ N30, bestehend aus der um 30 Aminosäuren verkürzten aminoterminalen Domäne

(rot), der α -Kristallindomäne und der C-terminalen Extension. Die N-terminale Domäne, Hsp26 Δ C (rot und schwarz), ist instabil und konnte nicht exprimiert werden.

Frühere Untersuchungen postulierten, dass die N-terminale Domäne für die strukturelle Assemblierung zu Oligomeren notwendig ist, während die C-terminale Domäne, inklusive der Extension, für die Dimerisierung und Substratbindung verantwortlich ist. Mittlerweile ist bekannt, dass die α -Kristallindomäne alleine nicht für die Ausbildung höher geordneter Strukturen ausreichend ist (Feil *et al.*, 2001).

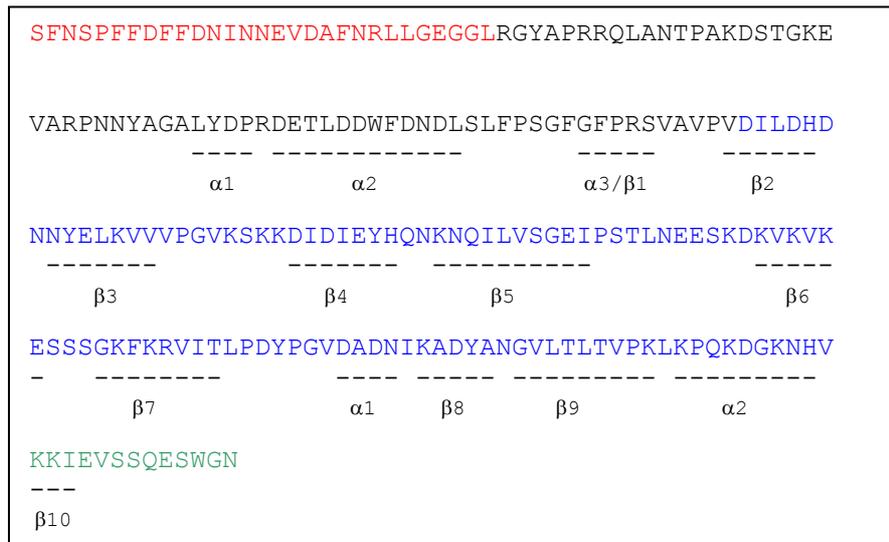


Abbildung 4.8 Aminosäuresequenz von Hsp26 aus *Saccharomyces cerevisiae* mit markierten charakteristischen strukturellen Eigenschaften. Die variable N-terminale Region ist rot und schwarz markiert. Die rote Markierung kennzeichnet die deletierten ersten 30 Aminosäuren im Fragment Hsp26 Δ N30. Die konservierte α -Kristallindomäne ist blau gekennzeichnet, die C-terminale Extension, grün. Das Fragment Hsp26 Δ N besteht aus den blau und grün gekennzeichneten Aminosäuren. Unterhalb der Aminosäuren sind die postulierten Sekundärstrukturelemente angegeben, α -Helices (α) und β -Stränge (β). [verändert nach (Van Montfort *et al.*, 2002)]

Die Hypothese, dass die C-terminale Extension für die Ausbildung von oligomeren Komplexen notwendig ist, wird von einer Reihe von Mutagenesestudien (Derham & Harding, 1999; Bova *et al.*, 2000) und der daraus resultierenden Ausbildung unterschiedlich großer, oligomerer Strukturen gestärkt. Säuger Hsp20, dem die C-terminale Extension fehlt, bildet in Lösung hauptsächlich Dimere aus, die nur schwache Chaperonaktivität zeigen (van de Klundert *et al.*, 1998). *CeHsp12.6* fehlt die C-terminale Extension völlig. Das Protein scheint als Monomer vorzuliegen (Leroux *et al.*, 1997a). Ein Isoleucin-Motiv, Ile-x-Ile sowie der kurze β -Strang (β 10) der C-terminalen Extension, scheinen eine wichtige funktionelle und strukturelle Rolle in sHsps auszuüben (Kim *et al.*, 1998a; van Montfort *et al.*, 2001; Narberhaus, 2002). C-terminal verkürzte Formen von *B. japonicum* sHsps, denen das konservierte Isoleucin Motiv (Ile-x-Ile) fehlt, bildeten lediglich Dimere aus. Bereits der

Austausch eines einzigen Isoleucins durch Alanin verhinderte die Multimerisierung und konsequenterweise auch die Chaperonaktivität (Narberhaus, 2002). Beide Isoleucine sind an hydrophoben Interaktionen mit benachbarten Untereinheiten beteiligt. Zusätzlich zu den intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, die zur Stabilisierung beitragen, bindet $\beta 10$ an $\beta 4$ eines benachbarten Monomers und die beiden Ile gehen hydrophobe Kontakte mit der hydrophoben Rinne eines anderen Monomers ein. Die hydrophobe Rinne in der α -Kristallindomäne wird von den β -Strängen $\beta 4$ und $\beta 8$ ausgebildet. Anhand der Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen der C-terminalen Extension in den unterschiedlichen Proteinen an sich gleich sind. Die unterschiedliche Orientierung der C-terminalen Extension relativ zur α -Kristallindomäne ermöglicht unterschiedliche Assemblierungen, wie Hohlkugelstrukturen und Doppelscheiben (Van Montfort *et al.*, 2002). In beiden Fragmenten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, war die C-terminale Extension noch vorhanden. Während Hsp26 Δ N30 Oligomere ausbildet und Chaperonaktivität aufweist, assemblierte Hsp26 Δ N nur zu Dimeren oder Tetrameren und zeigte keine Chaperonaktivität. Die C-terminale Extension kann also nicht alleine für die Oligomerisierung von Hsp26 verantwortlich sein.

Fluoreszenz-Emissionsspektren zeigten, dass das einzige Trp in Hsp26 Δ N, welches sich in der C-terminalen Extension an Position 211 befindet, Lösungsmittel-exponiert vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass hydrophobe Kontakte der C-terminalen Extension mit benachbarten Untereinheiten innerhalb der Dimere oder Tetramere fehlen. Die C-terminale Extension interagiert mit der N-terminalen Domäne. Hsp26 Dimere zeigten ein ähnliches Fluoreszenzverhalten. Teile der N-terminalen Domäne scheinen also für die Oligomerisierung und Chaperonaktivität notwendig zu sein.

Die isolierte N-terminale Domäne von Hsp26 konnte im Gegensatz zu anderen sHsps nicht exprimiert werden. Im Falle von α A-Kristallin bildeten sich bei der Expression der N-terminalen Domäne allerdings undefinierte Aggregate (Merck *et al.*, 1992). Für *Mj*Hsp16.5 wird eine ungeordnete Struktur der N-terminalen Domänen postuliert (Kim *et al.*, 1998a), was eine hohe Aggregationsneigung N-terminaler sHsp Fragmente erklären könnte.

Eine Gemeinsamkeit der sHsps in der N-terminalen Region ist die Ausbildung eines β -Stranges ($\beta 1$), der antiparallel an $\beta 7$ aus der α -Kristallindomäne ($\beta 2$ - $\beta 9$) bindet (vgl. Abbildung 4.8) (Kim *et al.*, 1998a). Diese Gemeinsamkeiten fehlen in Hsp26 Δ N. In

Hsp26 Δ N30 sind alle postulierten Sekundärstrukturelemente der N-terminalen Domäne vorhanden, allerdings fehlt die Phenylalanin-reiche Region.

Hsp16-2 mit einer N-terminalen Domäne aus 41 Resten bildet zwei Populationen aus 14 und 24 Untereinheiten und ist als Chaperon aktiv. Mutanten mit N-terminalen Verkürzungen von 15, 32 oder 44 Aminosäuren konnten nicht korrekt falten (Leroux *et al.*, 1997b). Verkürzte Versionen von *B. japonicum* HspH und HspF zeigten, dass das Entfernen einiger weniger aminoterminaler Aminosäuren toleriert wird. Es wurden, im Gegensatz zur Verkürzung um fünf bis zehn Aminosäurereste, keine deutlichen Oligomerisierungsdefekte oder Einflüsse auf die Chaperonaktivität beobachtet (Narberhaus, 2002). Auch die Deletion 13 N-terminaler Aminosäuren von *PsHsp18.1* beeinflusst nicht die Ausbildung des Dodekamers (Bova *et al.*, 2000). *CeHsp12.2* und *12.3* haben nahezu keine N-terminale Region und bilden Tetramere aus, obwohl ihnen die C-terminale Extension fehlt (Kokke *et al.*, 1998). Beide sind als Chaperone nicht aktiv. Dies deutet daraufhin, dass auch die N-terminale Domäne für die Multimerisierung verantwortlich ist und Oligomere für die Chaperonaktivität notwendig sind. Eine verkürzte Form von humanem α B-Kristallin (AS 57-157), das lediglich die isolierte α -Kristallindomäne repräsentiert, bildet Dimere mit signifikanter Chaperonaktivität aus (Feil *et al.*, 2001). Die C-terminale Region von α A-Kristallin bildet Dimere oder Tetramere aus, während die entsprechenden Regionen von α B-Kristallin und Hsp25 größere Aggregate ausbilden (Merck *et al.*, 1993).

Die Deletion der N-terminalen Domäne führt in Hsp26 zur Ausbildung von Dimeren oder Tetrameren, die keine Chaperonaktivität zeigen. Hsp26 Δ N30 bildet Oligomere aus und zeigt Chaperonaktivität. Dies bestätigt einerseits die Notwendigkeit oligomerer Assemblierungen für die Chaperonaktivität. Andererseits ist es ein Indiz für die Ausbildung der ungewöhnlichen Knotenstruktur im Oligomer. In *TaHsp16.9* bilden drei „Knoten“ über hydrophobe Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen der N-terminalen α 2-Helices den Zusammenhalt des Oligomers. Die α 2-Helix ist in Hsp26 Δ N30 noch vorhanden, in Hsp26 Δ N hingegen nicht.

Die Deletion der ersten 30 Aminosäuren von Hsp26 hat keinen Einfluss auf die Oligomerisierung. Es liegt als 24mer vor und unter Hitzeschockbedingungen dissoziiert es in eine dimere Spezies, die unter physiologischen Bedingungen wieder reassoziert. Die

Chaperonaktivität ist allerdings verringert. Hsp26 Δ N30 ist zwar in der Lage die Aggregation denaturierter Substrate zu unterdrücken, eine stabile Bindung mit dem Substratprotein kann jedoch nicht eingegangen werden. Möglicherweise ist für eine feste Bindung von Substratmolekülen die bei Hsp26 Δ N30 deletierte Phenylalanin-reiche Region am N-Terminus des Proteins verantwortlich.

Außerdem könnte im verkürzten Protein nach Substratbindung eine Reassoziaton zum Oligomer nicht mehr möglich sein.

Verkürzungen der C-terminalen Extension bei gleichzeitig unterschiedlich stark verkürzter N-terminalen Domäne könnte Aufschluss über die Mindestanzahl an N-terminalen Aminosäuren die für Struktur und Funktion essentiell sind, liefern. Ebenso wäre die Einführung einer Punktmutation im konservierten Isoleucin-Motiv der C-terminalen Extension (Aminosäure 203 in Hsp26) von Interesse (Narberhaus, 2002).

5 Zusammenfassung

Die verstärkte Expression von Hitzeschockproteinen (Hsps) als Antwort der Zelle auf Temperaturerhöhung und andere Stressfaktoren, stellt ein hochkonserviertes System dar, das das Überleben der Organismen unter widrigen Umweltbedingungen gewährleistet. Die Grundlage für diesen Schutzmechanismus liegt für viele Hitzeschockproteine in ihrer Fähigkeit nicht-native Proteine, die unter Stressbedingungen verstärkt auftreten, vor irreversiblen Nebenreaktionen der Faltung und Entfaltung, wie Aggregation, zu bewahren. Diese Funktion, als molekulare Chaperone das Proteom der Zelle zu schützen, ist vor allem für die ATP-abhängigen Hitzeschockproteine der Hsp60 und Hsp70 Familie gut charakterisiert. Die apparent energieunabhängigen kleinen Hitzeschockproteine aber, die die divergenteste und ubiquitärste der fünf wichtigsten Hsp Klassen darstellen, sind in ihrer strukturellen Organisation und ihrer Funktion noch weitgehend unverstanden. Zu ihnen gehört auch das Linsenprotein α -Kristallin, dessen Isoform α B-Kristallin im Rahmen der Stressantwort stark exprimiert wird. Für eine Vielzahl von sHsps aus unterschiedlichen Organismen konnte die Fähigkeit nachgewiesen werden, entfaltete Proteine zu binden und deren Aggregation zu unterdrücken. Diese Chaperonaktivität scheint mit der Fähigkeit der Proteine oligomere Komplexe variabler Größe auszubilden, zu korrelieren.

Die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur Struktur des kleinen Hitzeschockproteins aus Hefe zeigten, dass Hsp26 *in vitro* bei physiologischen Temperaturen 24mere ausbildet. Erst oberhalb von 37°C lässt sich ein schnelles Dissoziations/Assoziations Gleichgewicht mit kleineren oligomeren Spezies beobachten. Eine weitere Temperaturerhöhung führt zur ausschließlichen Population von Dimeren, die in der Lage sind ungefaltetes Protein zu binden und damit die als Chaperon aktive Spezies darstellen. Diese Dissoziation des Hsp26 Oligomers zu Dimeren folgt einer Kinetik erster Ordnung und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Entfaltung dar (Aktivierungsenergie 103,6 kJ/mol).

Der Prozess der hitzeinduzierten Dissoziation von Hsp26 ist bei Temperaturen bis 55°C reversibel. Nach Rückkehr zu physiologischen Bedingungen reassoziieren Hsp26 Dimere zu einer neuen oligomeren Spezies (rHsp26) mit identischer Sekundär- und Tertiärstruktur, aber leicht veränderter Quartärstruktur im Vergleich zum ursprünglichen Oligomer (nHsp26). Das

rHsp26 Oligomer ist bereits teilaktiviert und zerfällt schneller in die als Chaperon aktive dimere Form als nHsp26.

Der Großteil dieser Arbeit war der Chaperoneigenschaft von Hsp26 gewidmet. Im Vordergrund stand die Frage, welche Faktoren die Art und Stabilität der Interaktion mit nicht-nativen Proteinen beeinflussen. Hsp26 war in der Lage mit einem breiten Spektrum an denaturierten Substratproteinen (4-100 kDa) zu interagieren. Mit allen untersuchten Substraten wurden morphologisch charakteristische und definierte Komplexe ausgebildet, die von regelmäßig, globulär (CS, Rhodanase) bis netzartig (Insulin) reichten. Ähnlich wie bei anderen sHsps wurden maximale Bindestöchiometrien von einem Substrat Monomer pro Hsp26 Dimer bestimmt. Die Stabilität der Substratbindung scheint vom Entfaltungsgrad des Substrates abzuhängen; frühe Entfaltungsintermediate werden transient gebunden, während späte Intermediate einen stabilen Komplex mit Hsp26 ausbilden. Mit CS konnte ein hoher Grad an Kooperativität für die Ausbildung von Hsp26-Substrat Komplexen gezeigt werden. In der Hefezelle ist Hsp26 unter Stressbedingungen mit einer Vielzahl unterschiedlicher, nicht-nativer Proteine konfrontiert. Die gleichzeitige Inkubation von Hsp26 mit unterschiedlichen *in vitro* Substraten zeigte, dass Hsp26 unter diesen, die gestresste Zelle simulierenden, Bedingungen in der Lage ist unterschiedliche Substrate gleichzeitig in einen Substratkomplex einzubauen. Die Morphologie gemischter Komplexe wurde durch das zuerst gebundene Substrat bestimmt.

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten lässt sich ein Modell für die Chaperonaktivität von Hsp26 entwerfen: Unter physiologischen Bedingungen liegt Hsp26 als inaktive, oligomere Speicherform vor. Die temperaturinduzierte Dissoziation von Hsp26 zu Dimeren, der primären Substrat-Bindungspezies, ist eine Voraussetzung für seine Chaperonfunktion. Nach der Bindung entfalteter Proteine kommt es zu einer kooperativen Assoziation substrat-beladener Dimere und zur Ausbildung neuer, definierter Hsp26-Substrat Komplexe, die im Vergleich zum Hsp26 Oligomer stabilisiert sind.

Der Versuch Primärstrukturabschnitte von Hsp26 zu identifizieren, die für die Oligomerisierung des Proteins verantwortlich sind, zeigte, dass sowohl die N-terminale Domäne als auch die C-terminale α -Kristallindomäne am Zusammenhalt des Oligomers beteiligt sind. Die Deletion der ersten 30 Aminosäuren von Hsp26 zeigte zwar keinen Einfluss auf seine oligomere Struktur. Hsp26 Δ 30 wies jedoch verminderte Chaperonaktivität

auf und war nicht in der Lage Substrate stabil zu binden. Die ersten 30 Aminosäuren der N-terminalen Domäne scheinen, nach Assoziation Substrat-beladener Dimere, für den Zusammenhalt der gebildeten Hsp26-Substrat-Komplexe verantwortlich zu sein.

Die isolierte α -Kristallindomäne von Hsp26, assemblierte zu inaktiven Dimeren oder Tetrameren. Sie ist damit weder für die Oligomerisierung noch für die Chaperonfunktion von Hsp26 ausreichend, bestimmt aber die niederoligomeren Strukturen des Hsps. Die Aminosäuren 31-94 der N-terminalen Domäne sind am Zusammenhalt des Oligomers, wohl durch Ausbildung stabilisierender „Knoten“, beteiligt (vgl. Abbildung 4.2 und 4.3).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine, in seiner Art bisher einmalige, Funktionsbeziehung zwischen der komplexen und dynamischen Quartärstruktur des kleinen Hitzeschockproteins Hsp26 und seiner Chaperonaktivität hergestellt werden.

Literaturverzeichnis

- Andreasi, B. F., Arcovito, G., De Spirito, M., Mordente, A. & Martorana, G. E. (1995) Self-similarity properties of alpha-crystallin supramolecular aggregates. *Biophys. J.* **69**: 2720-7
- Anfinsen, C. B. (1973) *Science* **181**: 223-30
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sele, M. & White, F. H. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **47**: 1309-14
- Arrigo, A. P. (1998) Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol. Chem.* **379**: 19-26
- Arrigo, A. P. & Landry, J. (1994) Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones.*, Ed: Morimoto, R. I. & Georgopoulos, C., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview, NY
- Arrigo, A. P., Paul, C., Ducasse, C., Manero, F., Kretz-Remy, C., Viro, S., Javouhey, E., Mounier, N. & Diaz-Latoud, C. (2002) Small stress proteins: novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **28**: 185-204
- Arrigo, A. P., Suhan, J. P. & Welch, W. J. (1988) Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol* **8**: 5059-71
- Baldwin, R. L. (1995) The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view. *J. Biomol. NMR* **5**: 103-9
- Baldwin, R. L. (2002) Making a network of hydrophobic clusters. *Science* **295**: 1657-8
- Bardwell, J. C. (1994) Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol Microbiol* **14**: 199-205
- Becker, J. & Craig, E. A. (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* **219**: 11-23
- Behlke, J., Lutsch, G., Gaestel, M. & Bielka, H. (1991) Supramolecular structure of the recombinant murine small heat shock protein hsp25. *FEBS Lett.* **288**: 119-22
- Beissinger, M. & Buchner, J. (1998) How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* **379**: 245-59
- Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J. & Lutsch, G. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 20780-4

- Bentley, N. J., Fitch, I. T. & Tuite, M. F. (1992) The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast* **8**: 95-106
- Bhattacharyya, A. M. & Horowitz, P. M. (2001) The aggregation state of rhodanese during folding influences the ability of GroEL to assist reactivation. *J. Biol Chem.* **276**: 28739-43
- Bitter, G. A. & Egan, K. M. (1984) *Gene* **32**: 263-74
- Blond-Elguindi, S., Fourie, A. M., Sambrook, J. F. & Gething, M. J. (1993) Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J Biol Chem.* **268**: 12730-5
- Boelens, W. C., Croes, Y. & De Jong, W. W. (2001) Interaction between alphaB-crystallin and the human 20S proteasomal subunit C8/alpha7. *Biochim. Biophys. Acta* **1544**: 311-9
- Boelens, W. C., Croes, Y., de Ruwe, M., de Reu, L. & De Jong, W. W. (1998) Negative charges in the C-terminal domain stabilize the alphaB-crystallin complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 28085-90
- Bossier, P., Fitch, I. T., Boucherie, H. & Tuite, M. F. (1989) Structure and expression of a yeast gene encoding the small heat-shock protein Hsp26. *Gene* **78**: 323-30
- Bova, M. P., Ding, L. L., Horwitz, J. & Fung, B. K. (1997) Subunit exchange of alphaA-crystallin. *J. Biol Chem.* **272**: 29511-7
- Bova, M. P., Huang, Q., Ding, L. & Horwitz, J. (2002) Subunit exchange, conformational stability, and chaperone-like function of the small heat shock protein 16.5 from *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **277**: 38468-75
- Bova, M. P., Mchaourab, H. S., Han, Y. & Fung, B. K. (2000) Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of alphaA-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. *J. Biol. Chem.* **275**: 1035-42
- Boyle, D., Gopalakrishnan, S. & Takemoto, L. (1993) Localization of the chaperone binding site. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **192**: 1147-54
- Braakman, I., Hoover-Litty, H., Wagner, K. R. & Helenius, A. (1991) Folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol* **114**: 401-11
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-54
- Brady, J. P., Garland, D., Douglas-Tabor, Y., Robison, W. G., Jr., Groome, A. & Wawrousek, E. F. (1997) Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**: 884-9

- Bremer, A., Henn, C., Engel, A., Baumeister, W. & Aebi, U. (1992) Has negative staining still a place in biomacromolecular electron microscopy? *Ultramicroscopy* **46**: 85-111
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E. & Garrido, C. (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol* **2**: 645-52
- Buchner, J. (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* **10**: 10-9
- Buchner, J., Grallert, H. & Jakob, U. (1998a) Analysis of chaperone function using citrate synthase as a nonnative substrate protein. *Methods Enzymol.* **290**: 323-38
- Buchner, J., Grallert, H. & Jakob, U. (1998b) Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol.* **290**: 323-38
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. & Craig, E. A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**: 119-22
- Burgman, P. W. & Konings, A. W. (1992) Heat induced protein denaturation in the particulate fraction of HeLa S3 cells: effect of thermotolerance. *J. Cell Physiol.* **153**: 88-94
- Calaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. & Roser, B. (1992) Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology (N. Y.)* **10**: 1007-11
- Camacho, C. J. & Thirumalai, D. (1993) Kinetics and thermodynamics of folding in model proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 6369-72
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980b) *Biophysical Chemistry Vol II*. San Francisco
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980a) *Biophysical Chemistry Vol II*. San Francisco
- Carmelo, V. & Sa-Correia, I. (1997) HySP26 gene transcription is strongly induced during *Saccharomyces cerevisiae* growth at low pH. *FEMS Microbiol Lett.* **149**: 85-8
- Carver, J. A., Guerreiro, N., Nicholls, K. A. & Truscott, R. J. (1995) On the interaction of alpha-crystallin with unfolded proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**: 251-60
- Carver, J. A. & Lindner, R. A. (1998) NMR spectroscopy of alpha-crystallin. Insights into the structure, interactions and chaperone action of small heat-shock proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**: 197-209
- Caspers, G. J., Leunissen, J. A. & De Jong, W. W. (1995) The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J. Mol. Evol.* **40**: 238-48
- Chan, H. S. & Dill, K. A. (1996) A simple model of chaperonin-mediated protein folding. *Proteins* **24**: 345-51

- Chang, Z., Primm, T. P., Jakana, J., Lee, I. H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H. F. & Quiocho, F. A. (1996) Mycobacterium tuberculosis 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. *J. Biol. Chem.* **271**: 7218-23
- Clark, J. I. & Muchowski, P. J. (2000) Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 52-9
- Cobb, B. A. & Petrush, J. M. (2000) Characterization of α -crystallin-plasma membrane binding. *J. Biol. Chem.* **275**: 6664-72
- Coote, P. J., Cole, M. B. & Jones, M. V. (1991) Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J. Gen. Microbiol* **137** (Pt 7): 1701-8
- Cuesta, R., Laroia, G. & Schneider, R. J. (2000) Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* **14**: 1460-70
- Das, K. P., Petrush, J. M. & Surewicz, W. K. (1996) Conformational properties of substrate proteins bound to a molecular chaperone alpha-crystallin. *J. Biol Chem.* **271**: 10449-52
- Davidson, S. M., Loones, M. T., Duverger, O. & Morange, M. (2002) The developmental expression of small HSP. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **28**: 103-28
- Dawes, I. W. (1999) Stress Responses. In: *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*, Ed: Dickinson, J. R. & Schweizer, M., *Taylor & Francis Ltd., UK*,
- De Jong, W. W., Caspers, G. J. & Leunissen, J. A. (1998) Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**: 151-62
- De Jong, W. W., Leunissen, J. A. & Voorter, C. E. (1993) Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 103-26
- Dekker, P. J. & Pfanner, N. (1997) Role of mitochondrial GrpE and phosphate in the ATPase cycle of matrix Hsp70. *J. Mol Biol* **270**: 321-7
- Delmas, F., Pierre, F., Coucheney, F., Divies, C. & Guzzo, J. (2001) Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J. Mol Microbiol Biotechnol.* **3**: 601-10
- Derham, B. K. & Harding, J. J. (1999) Alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Prog. Retin. Eye Res.* **18**: 463-509
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-6
- Diamant, S., Ben Zvi, A. P., Bukau, B. & Goloubinoff, P. (2000) Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J. Biol Chem.* **275**: 21107-13

- Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D. & Chan, H. S. (1995) Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Sci.* **4**: 561-602
- Ding, L. & Candido, E. P. (2000) Association of several small heat-shock proteins with reproductive tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* **351**: 13-7
- Dudich, I. V., Zav'yalov, V. P., Pfeil, W., Gaestel, M., Zav'yalova, G. A., Denesyuk, A. I. & Korpela, T. (1995) Dimer structure as a minimum cooperative subunit of small heat-shock proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1253**: 163-8
- Ehrnsperger, M. (1998) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung kleiner Hitzeschockproteine aus höheren Eukaryonten. Dissertation,
- Ehrnsperger, M., Buchner, J. & Gaestel, M. (1997a) Structure and Function of Small Heat-Shock Proteins. In: *A.L. Fink and Y.Goto, eds*, Marcel Dekker, New York
- Ehrnsperger, M., Buchner, J. & Gaestel, M. (1998a) Structure and Function of Small Heat-Shock Proteins. In: *A.L. Fink and Y.Goto, eds*, Marcel Dekker, New York
- Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M. & Buchner, J. (1997b) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**: 221-9
- Ehrnsperger, M., Hergersberg, C., Wienhues, U., Nichtl, A. & Buchner, J. (1998b) Stabilization of proteins and peptides in diagnostic immunological assays by the molecular chaperone Hsp25. *Anal. Biochem.* **259**: 218-25
- Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M. & Buchner, J. (1999) The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species. *J. Biol. Chem.* **274**: 14867-74
- Ellis, R. J. & van der Vies, S. M. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 321-47
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-17
- Farahbakhsh, Z. T., Huang, Q. L., Ding, L. L., Altenbach, C., Steinhoff, H. J., Horwitz, J. & Hubbell, W. L. (1995) Interaction of alpha-crystallin with spin-labeled peptides. *Biochemistry* **34**: 509-16
- Farnsworth, P. N., Frauwirth, H., Groth-Vasselli, B. & Singh, K. (1998) Refinement of 3D structure of bovine lens alpha A-crystallin. *Int. J. Biol Macromol.* **22**: 175-85
- Farnsworth, P. N. & Singh, K. (2000) Self-complementary motifs (SCM) in alpha-crystallin small heat shock proteins. *FEBS Lett.* **482**: 175-9
- Feil, I. K., Malfois, M., Hendle, J., van Der, Z. H. & Svergun, D. I. (2001) A novel quaternary structure of the dimeric alpha-crystallin domain with chaperone-like activity. *J Biol Chem.* **276**: 12024-9

- Fernando, P., Abdulle, R., Mohindra, A., Guillemette, J. G. & Heikkila, J. J. (2002) Mutation or deletion of the C-terminal tail affects the function and structure of *Xenopus laevis* small heat shock protein, hsp30. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* **133**: 95-103
- Fersht, A. R. & Daggett, V. (2002) Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* **108**: 573-82
- Fink, S. L., Chang, L. K., Ho, D. Y. & Sapolsky, R. M. (1997) Defective herpes simplex virus vectors expressing the rat brain stress-inducible heat shock protein 72 protect cultured neurons from severe heat shock. *J. Neurochem.* **68**: 961-9
- Finley, D. & Chau, V. (1991) Ubiquitination. *Annu. Rev Cell Biol* **7**: 25-69
- Fischer, E. (2003) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Hsp12 aus *S. cerevisiae*. Dissertation
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**: 83-8
- Freire, E. (1995) Protein Stability and folding: Theory and Practice. In: Methods in Molecular Biology, Ed: Shirley, B. A., *Humana Press Inc, Totowa, NJ*,
- Freire, W. B. (1989) Hemoglobin as a predictor of response to iron therapy and its use in screening and prevalence estimates. *Am. J Clin. Nutr.* **50**: 1442-9
- Gaestel, M. (2002) sHsp-phosphorylation: enzymes, signaling pathways and functional implications. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **28**: 151-69
- Georgopoulos, C. & Welch, W. J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev Cell Biol* **9**: 601-34
- Gesierich, U. & Pfeil, W. (1996) The conformational stability of alpha-crystallin is rather low: calorimetric results. *FEBS Lett.* **393**: 151-4
- Gething, M. J. & Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45
- Giese, K. C. & Vierling, E. (2002) Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **277**: 46310-8
- Glover, J. R. & Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82
- Gottesman, S. & Maurizi, M. R. (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* **56**: 592-621
- Gottesman, S., Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1997) Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* **11**: 815-23

- Grallert, H., Rutkat, K. & Buchner, J. (1998) GroEL traps dimeric and monomeric unfolding intermediates of citrate synthase. *J Biol Chem.* **273**: 33305-10
- Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A. C. & Maurizi, M. R. (1998) Enzymatic and structural similarities between the Escherichia coli ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J. Biol. Chem.* **273**: 12476-81
- Gu, J., Emerman, M. & Sandmeyer, S. (1997) Small heat shock protein suppression of Vpr-induced cytoskeletal defects in budding yeast. *Mol. Cell Biol.* **17**: 4033-42
- Guo, Z. & Cooper, L. F. (2000) An N-terminal 33-amino-acid-deletion variant of hsp25 retains oligomerization and functional properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**: 183-9
- Hagihara, Y. & Goto, Y. (1997) Molecular Chaperones in Life Cycle of Proteins, Ed: Fink, A. L. & Goto, Y., *Marcel Dekker*, New York
- Haley, D. A., Bova, M. P., Huang, Q. L., Mchaourab, H. S. & Stewart, P. L. (2000) Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies. *J. Mol. Biol.* **298**: 261-72
- Haley, D. A., Horwitz, J. & Stewart, P. L. (1998) The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure. *J. Mol Biol* **277**: 27-35
- Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-9
- Haslbeck, M. (2001) Funktion kleiner Hitzeschockproteine der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Dissertation,
- Haslbeck, M. (2002) sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol. Life Sci.* **59**: 1649-57
- Haslbeck, M. & Buchner, J. (2002) Chaperone function of sHsps. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **28**: 37-59
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. & Buchner, J. (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* **18**: 6744-51
- Heidelbach, M., Skladny, H. & Schairer, H. U. (1993) Heat shock and development induce synthesis of a low-molecular-weight stress-responsive protein in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* **175**: 7479-82
- Helenius, A. (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**: 577-8
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988) Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* **9**: 60-1
- Hohfeld, J., Cyr, D. M. & Patterson, C. (2001) From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.* **2**: 885-90

- Höll-Neugebauer, B., Rudolph, R., Schmidt, M. & Buchner, J. (1991) Reconstitution of a heat shock effect in-vitro - influence of GroE on the thermal aggregation of alpha-glucosidase from yeast. *Biochemistry* **11**:609-14
- Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**: 10449-53
- Horwitz, J. (2003) Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.* **76**: 145-53
- Horwitz, J., Bova, M., Huang, Q. L., Ding, L., Yaron, O. & Lowman, S. (1998) Mutation of alpha B-crystallin: effects on chaperone-like activity. *Int. J. Biol Macromol.* **22**: 263-9
- Huot, J., Houle, F., Spitz, D. R. & Landry, J. (1996) HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* **56**: 273-9
- Huot, J., Lambert, H., Lavoie, J. N., Guimond, A., Houle, F. & Landry, J. (1995) Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27. *Eur. J. Biochem.* **227**: 416-27
- Hurtley, S. M. & Helenius, A. (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev Cell Biol* **5**: 277-307
- Ito, H., Kamei, K., Iwamoto, I., Inaguma, Y., Nohara, D. & Kato, K. (2001) Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *J. Biol. Chem.* **276**: 5346-52
- Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S. & Komatsu, Y. (1995) The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol (Noisy. -le-grand)* **41**: 763-9
- Iwaki, A., Iwaki, T., Goldman, J. E., Ogomori, K., Tateishi, J. & Sakaki, Y. (1992) Accumulation of alpha B-crystallin in brains of patients with Alexander's disease is not due to an abnormality of the 5'-flanking and coding sequence of the genomic DNA. *Neurosci. Lett.* **140**: 89-92
- Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R. K. & Goldman, J. E. (1989) Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* **57**: 71-8
- Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol Biol* **49**: 117-237
- Jaenicke, R. (1991) Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry* **30**: 3147-61
- Jaenicke, R. (1996) Protein folding and association: in vitro studies for self-organization and targeting in the cell. *Curr. Top. Cell Regul.* **34**: 209-314
- Jaenicke, R. (1997) Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins., Ed: Fink, A. L. & Goto, Y., *Marcel Dekker*, New York

- Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**: 155-241
- Jaenicke, R. & Creighton, T. E. (1993) *Curr. Biol.* **3**: 234-5
- Jaenicke, R. & Lilie, H. (2000) Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv. Protein Chem.* **53**: 329-401
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1989) Protein Structure: A Practical Approach, Ed: Creighton, T. E., *IRL Press*, Oxford
- Jaenicke, R. & Seckler, R. (1997) Protein misassembly *in vitro*. *Adv. Protein Chem.* **50**: 1-59
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. & Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1517-20
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. & Buchner, J. (1995) Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**: 7288-94
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M. & Bardwell, J. C. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341-52
- Jamieson, D. J., Rivers, S. L. & Stephen, D. W. (1994) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* **140 (Pt 12)**: 3277-83
- Jenkins, C. M., Genzor, C. G., Fillat, M. F., Waterman, M. R. & Gomez-Moreno, C. (1997) Negatively charged anabaena flavodoxin residues (Asp144 and Glu145) are important for reconstitution of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase activity. *J. Biol. Chem.* **272**: 22509-13
- Jentsch, S. (1992) The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 179-207
- Joanisse, D. R., Inaguma, Y. & Tanguay, R. M. (1998) Cloning and developmental expression of a nuclear ubiquitin-conjugating enzyme (DmUbc9) that interacts with small heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**: 102-9
- Jobling, A. I., Stevens, A. & Augusteyn, R. C. (2001) Binding of dexamethasone by alpha-crystallin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 1829-32
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J. & Levin, D. E. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* **9**: 1559-71
- Kappe, G., Leunissen, J. A. & De Jong, W. W. (2002) Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **28**: 1-17
- Kappe, G., Verschuure, P., Philipsen, R. L., Staalduinen, A. A., Van de, B. P., Boelens, W. C. & De Jong, W. W. (2001) Characterization of two novel human small heat shock

- proteins: protein kinase-related HspB8 and testis-specific HspB9. *Biochim. Biophys. Acta* **1520**: 1-6
- Kapteyn, J. C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den, E. H. & Klis, F. M. (2001) Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **39**: 469-79
- Kato, K., Ito, H. & Inaguma, Y. (2002) Expression and phosphorylation of mammalian small heat shock proteins. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **28**: 129-50
- Khundkar, L. R. & Zewail, A. H. (1990) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **41**: 15-60
- Kiefhaber, T. (2003) Einführung in die Biophysikalische Chemie. Teil 2: Kinetik. In: Biozentrum, Universität Basel, Schweiz
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H. & Buchner, J. (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N. Y.)* **9**: 825-9
- Kim, K. K., Kim, R. & Kim, S. H. (1998a) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**: 595-9
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev Biochem.* **59**: 631-60
- Kim, R., Kim, K. K., Yokota, H. & Kim, S. H. (1998b) Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 9129-33
- Kim, S. J., Jeong, D. G., Chi, S. W., Lee, J. S. & Ryu, S. E. (2001) Crystal structure of proteolytic fragments of the redox-sensitive Hsp33 with constitutive chaperone activity. *Nat. Struct. Biol* **8**: 459-66
- Knauf, U., Bielka, H. & Gaestel, M. (1992) Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett.* **309**: 297-302
- Kokke, B. P., Leroux, M. R., Candido, E. P., Boelens, W. C. & De Jong, W. W. (1998) *Caenorhabditis elegans* small heat-shock proteins Hsp12.2 and Hsp12.3 form tetramers and have no chaperone-like activity. *FEBS Lett.* **433**: 228-32
- Kopetzki, E., Buckel, P. & Schumacher, G. (1989) Cloning and characterization of baker's yeast alpha-glucosidase: over-expression in a yeast strain devoid of vacuolar proteinases. *Yeast* **5**: 11-24
- Koteiche, H. A. & Mchaourab, H. S. (2003) Mechanism of Chaperone Function in Small Heat-shock Proteins. PHOSPHORYLATION-INDUCED ACTIVATION OF TWO-MODE BINDING IN alpha B-CRYSTALLIN. *J Biol Chem.* **278**: 10361-7
- Kruuv, J., Glofcheski, D., Cheng, K. H., Campbell, S. D., Al Qysi, H. M., Nolan, W. T. & Lepock, J. R. (1983) Factors influencing survival and growth of mammalian cells

- exposed to hypothermia. I. Effects of temperature and membrane lipid perturbers. *J. Cell Physiol* **115**: 179-85
- Kuczynska-Wisnik, D., Kedzierska, S., Matuszewska, E., Lund, P., Taylor, A., Lipinska, B. & Laskowska, E. (2002) The Escherichia coli small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured in vivo during extreme heat shock. *Microbiology* **148**: 1757-65
- Kudva, Y. C., Hiddinga, H. J., Butler, P. C., Mueske, C. S. & Eberhardt, N. L. (1997) Small heat shock proteins inhibit in vitro A beta(1-42) amyloidogenesis. *FEBS Lett.* **416**: 117-21
- Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L. & Lindquist, S. (1986) An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* **231**: 1154-7
- Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* **6**: 87-103
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5
- Lambert, H., Charette, S. J., Bernier, A. F., Guimond, A. & Landry, J. (1999) HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J. Biol Chem.* **274**: 9378-85
- Landry, J., Chretien, P., Lambert, H., Hickey, E. & Weber, L. A. (1989) Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol* **109**: 7-15
- Laszlo, A. (1992) The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. *Cell Prolif.* **25**: 59-87
- Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A. & Landry, J. (1993) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol Chem.* **268**: 24210-4
- Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A. & Landry, J. (1995) Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* **15**: 505-16
- Lee, G. J., Pokala, N. & Vierling, E. (1995) Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**: 10432-8
- Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. R. & Vierling, E. (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**: 659-71
- Lee, G. J. & Vierling, E. (1998) Expression, purification, and molecular chaperone activity of plant recombinant small heat shock proteins. *Methods Enzymol.* **290**: 350-65

- Lee, G. J. & Vierling, E. (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol* **122**: 189-98
- Lee, S., Owen, H. A., Prochaska, D. J. & Barnum, S. R. (2000) HSP16.6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr. Microbiol.* **40**: 283-7
- Leroux, M. R., Ma, B. J., Batelier, G., Melki, R. & Candido, E. P. (1997a) Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J. Biol Chem.* **272**: 12847-53
- Leroux, M. R., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G. & Candido, E. P. (1997b) Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.* **272**: 24646-56
- Levinthal, C. (1968) *J. Chem. Phys.* **65**: 44-5
- Liang, P. & MacRae, T. H. (1997) Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 13)**: 1431-40
- Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R. & Buchner, J. (1994) Influence of protein disulfide isomerase (PDI) on antibody folding in vitro. *J. Biol Chem.* **269**: 14290-6
- Lindner, R. A., Carver, J. A., Ehrnsperger, M., Buchner, J., Esposito, G., Behlke, J., Lutsch, G., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (2000) Mouse Hsp25, a small shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1923-32
- Lindquist, S. (1986) The heat-shock response. *Annu. Rev Biochem.* **55**: 1151-91
- Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev Genet.* **22**: 631-77
- Liu, C. & Welsh, M. J. (1999) Identification of a site of Hsp27 binding with Hsp27 and alpha B-crystallin as indicated by the yeast two-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**: 256-61
- Llorca, O., McCormack, E. A., Hynes, G., Grantham, J., Cordell, J., Carrascosa, J. L., Willison, K. R., Fernandez, J. J. & Valpuesta, J. M. (1999) Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits. *Nature* **402**: 693-6
- Lorimer, G. H. (1996) A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo. *FASEB J.* **10**: 5-9
- Lottspeich, F. (1998) Bioanalytik. *Spektrum Verlag*,
- Low, D., Brandle, K., Nover, L. & Forreiter, C. (2000) Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta* **211**: 575-82
- Lowe, J., Errington, D. R., Lennox, G., Pike, I., Spendlove, I., Landon, M. & Mayer, R. J. (1992a) Ballooned neurons in several neurodegenerative diseases and stroke contain alpha B crystallin. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **18**: 341-50

- Lowe, J., McDermott, H., Pike, I., Spendlove, I., Landon, M. & Mayer, R. J. (1992b) alpha B crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. *J. Pathol.* **166**: 61-8
- Lund, A. A., Rhoads, D. M., Lund, A. L., Cerny, R. L. & Elthon, T. E. (2001) In vivo modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, HSP22. *J. Biol Chem.* **276**: 29924-9
- MacRae, T. H. (2000) Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci.* **57**: 899-913
- Mager, W. H. & Ferreira, P. M. (1993) Stress response of yeast. *Biochem. J.* **290 (Pt 1)**: 1-13
- Matthews, B. W. (1995) Studies on protein stability with T4 lysozyme. *Adv. Protein Chem.* **46**: 249-78
- Mehlen, P., Briolay, J., Smith, L., Diaz-Latoud, C., Fabre, N., Pauli, D. & Arrigo, A. P. (1993) Analysis of the resistance to heat and hydrogen peroxide stresses in COS cells transiently expressing wild type or deletion mutants of the Drosophila 27-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.* **215**: 277-84
- Mehlen, P., Kretz-Remy, C., Briolay, J., Fostan, P., Mirault, M. E. & Arrigo, A. P. (1995a) Intracellular reactive oxygen species as apparent modulators of heat-shock protein 27 (hsp27) structural organization and phosphorylation in basal and tumour necrosis factor alpha-treated T47D human carcinoma cells. *Biochem. J.* **312 (Pt 2)**: 367-75
- Mehlen, P., Mehlen, A., Guillet, D., Preville, X. & Arrigo, A. P. (1995b) Tumor necrosis factor-alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J. Cell Biochem.* **58**: 248-59
- Mendoza, J. A., Lorimer, G. H. & Horowitz, P. M. (1992) Chaperonin cpn60 from Escherichia coli protects the mitochondrial enzyme rhodanese against heat inactivation and supports folding at elevated temperatures. *J. Biol Chem.* **267**: 17631-4
- Merck, K. B., Haard-Hoekman, W. A., Oude Essink, B. B., Bloemendal, H. & De Jong, W. W. (1992) Expression and aggregation of recombinant alpha A-crystallin and its two domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**: 267-76
- Merck, K. B., Horwitz, J., Kersten, M., Overkamp, P., Gaestel, M., Bloemendal, H. & De Jong, W. W. (1993) Comparison of the homologous carboxy-terminal domain and tail of alpha-crystallin and small heat shock protein. *Mol. Biol. Rep.* **18**: 209-15
- Michellini, E. T. & Flynn, G. C. (1999) The unique chaperone operon of Thermotoga maritima: cloning and initial characterization of a functional Hsp70 and small heat shock protein. *J. Bacteriol.* **181**: 4237-44
- Morange, M. (1999) [Temporal regulation of gene expression]. *J. Soc. Biol* **193**: 395-400
- Morange, M., Favet, N., Loones, M. T., Manuel, M., Mezger, V., Michel, E., Rallu, M. & Sage, J. (1998) Heat-shock genes and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **851**: 117-22

- Muchowski, P. J. & Clark, J. I. (1998) ATP-enhanced molecular chaperone functions of the small heat shock protein human alphaB crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 1004-9
- Muchowski, P. J., Hays, L. G., Yates, J. R., III & Clark, J. I. (1999a) ATP and the core "alpha-Crystallin" domain of the small heat-shock protein alphaB-crystallin. *J. Biol. Chem.* **274**: 30190-5
- Muchowski, P. J., Valdez, M. M. & Clark, J. I. (1999b) AlphaB-crystallin selectively targets intermediate filament proteins during thermal stress. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**: 951-8
- Muchowski, P. J., Wu, G. J., Liang, J. J., Adman, E. T. & Clark, J. I. (1999c) Site-directed mutations within the core "alpha-crystallin" domain of the small heat-shock protein, human alphaB-crystallin, decrease molecular chaperone functions. *J. Mol. Biol.* **289**: 397-411
- Mumberg, D., Müller, R. & Funk, M. (1995) *Gene* **156**: 119-22
- Narberhaus, F. (2002) Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 64-93
- Nicholl, I. D. & Quinlan, R. A. (1994) Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO J.* **13**: 945-53
- Niwa, M., Kozawa, O., Matsuno, H., Kato, K. & Uematsu, T. (2000) Small molecular weight heat shock-related protein, HSP20, exhibits an anti-platelet activity by inhibiting receptor-mediated calcium influx. *Life Sci.* **66**: L7-12
- Nover, L. (1991) HSFs and HSPs--a stressful program on transcription factors and chaperones. Stress Proteins and the Heat Shock Response, sponsored by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY USA, April 29-May 2, 1991. *New Biol* **3**: 855-9
- Nover, L. & Scharf, K. D. (1984) Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur. J. Biochem.* **139**: 303-13
- Oesterreich, S., Weng, C. N., Qiu, M., Hilsenbeck, S. G., Osborne, C. K. & Fuqua, S. A. (1993) The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **53**: 4443-8
- Palmer, E., Wilhelm, J. M., Popolo, L. & Vai, M. (1979) Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* **277**: 148-50
- Palmisano, D. V., Groth-Vasselli, B., Farnsworth, P. N. & Reddy, M. C. (1995) Interaction of ATP and lens alpha crystallin characterized by equilibrium binding studies and intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1246**: 91-7
- Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. & Lindquist, S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-8

- Parsell, D. A. & Lindquist, S. (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev Genet.* **27**: 437-96
- Petko, L. & Lindquist, S. (1986) Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell* **45**: 885-94
- Piper, P. W. (1993) Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **11**: 339-55
- Piper, P. W. (1997) *Yeast Stress Responses*. Springer Verlag, Heidelberg
- Piper, P. W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P. & Cole, M. (1997) Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress. Chaperones.* **2**: 12-24
- Plesofsky-Vig, N. & Brambl, R. (1995) Disruption of the gene for hsp30, an alpha-crystallin-related heat shock protein of *Neurospora crassa*, causes defects in thermotolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**: 5032-6
- Praekelt, U. M. & Meacock, P. A. (1990) HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen. Genet.* **223**: 97-106
- Privalov, P. L. (1989) Thermodynamic problems of protein structure. *Annu. Rev Biophys. Biophys. Chem.* **18**: 47-69
- Quinlan, R. (2002) Cytoskeletal competence requires protein chaperones. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **28**: 219-33
- Rahman, D. R., Bentley, N. J. & Tuite, M. F. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* small heat shock protein Hsp26 inhibits actin polymerisation. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 77S
- Raman, B., Ramakrishna, T. & Rao, C. M. (1995) Temperature dependent chaperone-like activity of alpha-crystallin. *FEBS Lett.* **365**: 133-6
- Rao, P. V., Horwitz, J. & Zigler, J. S., Jr. (1993) Alpha-crystallin, a molecular chaperone, forms a stable complex with carbonic anhydrase upon heat denaturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**: 786-93
- Rauscher, K., Voigt, J., Wilke, I. & Wilke, K. T. (1982) *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*, Harry Deutsch, Frankfurt
- Rawat, U. & Rao, M. (1998) Interactions of chaperone alpha-crystallin with the molten globule state of xylose reductase. Implications for reconstitution of the active enzyme. *J. Biol Chem.* **273**: 9415-23
- Reddy, M. C., Palmisano, D. V., Groth-Vasselli, B. & Farnsworth, P. N. (1992) ³¹P NMR studies of the ATP/alpha-crystallin complex: functional implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 1578-84

-
- Renkawek, K., De Jong, W. W., Merck, K. B., Frenken, C. W., van Workum, F. P. & Bosman, G. J. (1992) alpha B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol. (Berl)* **83**: 324-7
- Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M. & Emr, S. D. (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol. Cell Biol.* **8**: 4936-48
- Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A. P., Buchner, J. & Gaestel, M. (1999) Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**: 18947-56
- Rossi, J. M. & Lindquist, S. (1989) The intracellular location of yeast heat-shock protein 26 varies with metabolism. *J. Cell Biol* **108**: 425-39
- Roy, S. K., Hiyama, T. & Nakamoto, H. (1999) Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an alpha-crystallin-related, small heat shock protein. *Eur. J. Biochem.* **262**: 406-16
- Ruddock, L. W. & Klappa, P. (1999) Oxidative stress: Protein folding with a novel redox switch. *Curr. Biol* **9**: R400-R402
- Rudolph, R., Siebendritt, R., Nessler, G., Sharma, A. K. & Jaenicke, R. (1990) Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 4625-9
- Saibil, H. R. & Ranson, N. A. (2002) The chaperonin folding machine. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 627-32
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Press, New York*
- Sanchez, I. E. & Kiefhaber, T. (2003) Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *J. Mol Biol* **325**: 367-76
- Sanger, F. (1949) *J. Biol. Chem.* **45**: 563-74
- Scharf, K. D., Siddique, M. & Vierling, E. (2001) The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress. Chaperones.* **6**: 225-37
- Schatz, G. & Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**: 1519-26
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. & Schmid, F. X. (1995) Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Biol* **2**: 663-73
- Schirmer, E. C., Lindquist, S. & Vierling, E. (1994) An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* **6**: 1899-909

- Schmid F.X. (1989) Protein Structure: A Practical Approach. *Protein Structure: A Practical Approach* 251-85
- Schmid, F. X. (1989) Protein Structure: A Practical Approach, Ed: Creighton, T. E., *IRL Press*, Oxford, New York, Tokyo
- Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P., Lorimer, G. & Buchner, J. (1994) Symmetric complexes of GroE chaperonins as part of the functional cycle. *Science* **265**: 656-9
- Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G. & Schmid, F. X. (1997) Catalysis of protein folding by parvulin. *J. Mol Biol* **273**: 752-62
- Schonbrunner, N., Pappenberger, G., Scharf, M., Engels, J. & Kiefhaber, T. (1997) Effect of preformed correct tertiary interactions on rapid two-state tendamistat folding: evidence for hairpins as initiation sites for beta-sheet formation. *Biochemistry* **36**: 9057-65
- Schumann, W. (1999) FtsH-s single-chain charonin? *FEMS Microbiol Rev* **23**: 1-11
- Sharma, K. K., Kaur, H., Kumar, G. S. & Kester, K. (1998a) Interaction of 1,1'-bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid with alpha-crystallin. *J. Biol Chem.* **273**: 8965-70
- Sharma, K. K., Kumar, G. S., Murphy, A. S. & Kester, K. (1998b) Identification of 1,1'-bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid binding sequences in alpha-crystallin. *J. Biol Chem.* **273**: 15474-8
- Smulders, R. H. & De Jong, W. W. (1997) The hydrophobic probe 4,4'-bis(1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid) is specifically photoincorporated into the N-terminal domain of alpha B-crystallin. *FEBS Lett.* **409**: 101-4
- Smykal, P., Masin, J., Hrady, I., Konopasek, I. & Zarsky, V. (2000) Chaperone activity of tobacco HSP18, a small heat-shock protein, is inhibited by ATP. *Plant J* **23**: 703-13
- Sobott, F., Benesch, J. L., Vierling, E. & Robinson, C. V. (2002) Subunit exchange of multimeric protein complexes. Real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **277**: 38921-9
- Somer, L., Shmulman, O., Dror, T., Hashmueli, S. & Kashi, Y. (2002) The eukaryote chaperonin CCT is a cold shock protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress. Chaperones.* **7**: 47-54
- Sosnick, T. R., Mayne, L., Hiller, R. & Englander, S. W. (1994) The barriers in protein folding. *Nat. Struct. Biol* **1**: 149-56
- Spector, A., Li, L.-K., Augusteyn, R. C., Schneider, A. & Freund, T. (1971) α -Crystallin. The isolation and characterization of distinct macromolecular fractions. *Biochem. J.* **124**: 337-43

- Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**: 339-47
- Srere, P. A. (1966) Citrate-condensing enzyme-oxalacetate binary complex. Studies on its physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* **241**: 2157-65
- Stege, G. J., Renkawek, K., Overkamp, P. S., Verschuure, P., van Rijk, A. F., Reijnen-Aalbers, A., Boelens, W. C., Bosman, G. J. & De Jong, W. W. (1999) The molecular chaperone alphaB-crystallin enhances amyloid beta neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**: 152-6
- Stevens, A. & Augusteyn, R. C. (1997) Binding of 1-anilino-naphthalene-8-sulfonic acid to alpha-crystallin. *Eur J Biochem* **243**: 792-7
- Stone, R. L., Matarese, V., Magee, B. B., Magee, P. T. & Bernlohr, D. A. (1990) Cloning, sequencing and chromosomal assignment of a gene from *Saccharomyces cerevisiae* which is negatively regulated by glucose and positively by lipids. *Gene* **96**: 171-6
- Stromer, T. (1998) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des kleinen Hitzeschockproteins Hsp26 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation,
- Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M. & Buchner, J. (2003) Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J Biol Chem.*
- Studer, S. & Narberhaus, F. (2000) Chaperone activity and homo- and hetero-oligomer formation of bacterial small heat shock proteins. *J. Biol Chem.* **275**: 37212-8
- Sugiyama, Y., Suzuki, A., Kishikawa, M., Akutsu, R., Hirose, T., Waye, M. M., Tsui, S. K., Yoshida, S. & Ohno, S. (2000) Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**: 1095-104
- Sun, W., Van Montagu, M. & Verbruggen, N. (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**: 1-9
- Susek, R. E. & Lindquist, S. L. (1989) hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the superfamily of small heat shock proteins but is without a demonstrable function. *Mol. Cell Biol.* **9**: 5265-71
- Suzuki, T. C., Krawitz, D. C. & Vierling, E. (1998) The chloroplast small heat-shock protein oligomer is not phosphorylated and does not dissociate during heat stress in vivo. *Plant Physiol* **116**: 1151-61
- Takemoto, L., Emmons, T. & Horwitz, J. (1993) The C-terminal region of alpha-crystallin: involvement in protection against heat-induced denaturation. *Biochem J* **294** (Pt 2): 435-8
- Todd, M. J., Lorimer, G. H. & Thirumalai, D. (1996) Chaperonin-facilitated protein folding: optimization of rate and yield by an iterative annealing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**: 4030-5

- Torok, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovszki, V., Los, D. A., Vierling, E., Crowe, J. H. & Vigh, L. (2001) Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**: 3098-103
- Tsvetkova, N. M., Horvath, I., Torok, Z., Wolkers, W. F., Balogi, Z., Shigapova, N., Crowe, L. M., Tablin, F., Vierling, E., Crowe, J. H. & Vigh, L. (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**: 13504-9
- Van Boekel, M. A., de Lange, F., de Grip, W. J. & De Jong, W. W. (1999) Eye lens alphaA- and alphaB-crystallin: complex stability versus chaperone-like activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1434**: 114-23
- van de Klundert, F. A., Smulders, R. H., Gijsen, M. L., Lindner, R. A., Jaenicke, R., Carver, J. A. & De Jong, W. W. (1998) The mammalian small heat-shock protein Hsp20 forms dimers and is a poor chaperone. *Eur. J. Biochem.* **258**: 1014-21
- van den IJssel, P. R., Overkamp, P., Knauf, U., Gaestel, M. & De Jong, W. W. (1994) Alpha A-crystallin confers cellular thermoresistance. *FEBS Lett.* **355**: 54-6
- van Dongen, G. & van Wijk, R. (1988) Evidence for a role of heat-shock proteins in proliferation after heat treatment of synchronized mouse neuroblastoma cells. *Radiat. Res.* **113**: 252-67
- Van Montfort, R., Slingsby, C. & Vierling, E. (2002) Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv. Protein Chem.* **59**: 105-56
- van Montfort, R. L., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C. & Vierling, E. (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1025-30
- Varela, J. C., Praekelt, U. M., Meacock, P. A., Planta, R. J. & Mager, W. H. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol* **15**: 6232-45
- Varela, J. C., van Beekvelt, C., Planta, R. J. & Mager, W. H. (1992) Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Mol Microbiol* **6**: 2183-90
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J. & Goloubinoff, P. (1998) The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J. Biol. Chem.* **273**: 11032-7
- Vigh, L., Maresca, B. & Harwood, J. L. (1998) Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci.* **23**: 369-74
- Viitanen, P. V., Gatenby, A. A. & Lorimer, G. H. (1992) Purified chaperonin 60 (groEL) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins. *Protein Sci.* **1**: 363-9

- Vijayalakshmi, J., Mukherjee, M. K., Graumann, J., Jakob, U. & Saper, M. A. (2001) The 2.2 Å crystal structure of Hsp33: a heat shock protein with redox-regulated chaperone activity. *Structure. (Camb.)* **9**: 367-75
- Walke, S. (1996) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von kleinen Hitzeschock-Proteinen aus *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation,
- Walker, G. M. (1999b) Yeast - Physiology and Biotechnology.
- Walker, G. M. (1999a) Yeast - Physiology and Biotechnology.
- Walter, S. & Buchner, J. (2002) Molecular chaperones-cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **41**: 1098-113
- Wang, K., Gawinowicz, M. A. & Spector, A. (2000) The effect of stress on the pattern of phosphorylation of alphaA and alphaB crystallin in the rat lens. *Exp. Eye Res.* **71**: 385-93
- Wang, K. & Spector, A. (1995) *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**: 311-21
- Wang, K. & Spector, A. (2001) ATP causes small heat shock proteins to release denatured protein. *Eur. J. Biochem.* **268**: 6335-45
- Waters, E. R. (1995) The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* **141**: 785-95
- Waters, E. R., Lee, G. J. & Vierling, E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**: 325-38
- Waters, E. R. & Vierling, E. (1999) Chloroplast small heat shock proteins: evidence for atypical evolution of an organelle-localized protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**: 14394-9
- Weissman, J. S. & Kim, P. S. (1993) Efficient catalysis of disulphide bond rearrangements by protein disulphide isomerase. *Nature* **365**: 185-8
- Welch, W. J. & Suhan, J. P. (1985) Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol* **101**: 1198-211
- Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1999) Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**: 8318-20
- Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**: 1888-93
- Wiemken, A. (1990) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**: 209-17
- Wildegger, G. & Kiefhaber, T. (1997) Three-state model for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate. *J. Mol Biol* **270**: 294-304

- Wolynes, P., Luthey-Schulten, Z. & Onuchic, J. (1996) Fast-folding experiments and the topography of protein folding energy landscapes. *Chem. Biol* **3**: 425-32
- Wotton, D., Freeman, K. & Shore, D. (1996) Multimerization of Hsp42p, a novel heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is dependent on a conserved carboxyl-terminal sequence. *J. Biol. Chem.* **271**: 2717-23
- Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1993) Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **2**: 717-26
- Xu, Z., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**: 741-50
- Yura, T., Nagai, H. & Mori, H. (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* **47**: 321-50
- Zav'yalov, V. P., Zav'yalova, G. A., Denesyuk, A. I., Gaestel, M. & Korpela, T. (1995) Structural and functional homology between periplasmic bacterial molecular chaperones and small heat shock proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **11**: 265-72
- Zhi, W., Srere, P. A. & Enans, C. T. (1991) *Biochemistry* **30**: 9281-6
- Zolkiewski, M., Kessel, M., Ginsburg, A. & Maurizi, M. R. (1999) Nucleotide-dependent oligomerization of ClpB from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **8**: 1899-903

Abkürzungen

A	Ampere
Å	Angström = 0,1 nm = 10^{-10} m
AA	Acrylamid
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-1-Naphtalensulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
a _{ass}	Steigung Assoziation
a _{diss}	Steigung Dissoziation
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CD	Circulardichroismus
CeHsp12	sHsp aus <i>Caenorhabditis elegans</i>
Cp	molare Wärmekapazität
cps	counts per second
CS	mitochondriale Citratsynthase
Da	Dalton
ΔH	Änderung der Reaktionsenthalpie
ΔS	Änderung der Reaktionsentropie
dHsp26	dimeres Hsp26
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	1,4-Dithiothreitol
Ø	Durchmesser
E _{A diss}	Aktivierungsenergie für die Dissoziation
E	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
G	Gibbs freie Enthalpie
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
H ₂ O bidest	Quarzbidestilliertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSE	Hitzeschockelement
HSF	Hitzeschockfaktor
Hsp(s)	Hitzeschockprotein(e)
Hsp25	kleines Hitzeschockprotein aus Maus
Hsp26	kleines Hitzeschockprotein aus Hefe
Hsp26 Δ C	N-terminale Domäne von Hsp26
Hsp26 Δ N	C-terminale Domäne von Hsp26
Hsp26 Δ N30	Deletion der ersten 30 aminoterminalen Aminosäuren
Hsp27	kleines Hitzeschockprotein aus Mensch
I	Intermediat
IgG	Immunglobulin G
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside
J	Joule
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Kelvin
Kana	Kanamycin
kcal	Kilokalorie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
kV	Kilovolt
λ	Wellenlänge
l	Liter
ln	natürlicher Logarithmus

Abkürzungen

E_A	Aktivierungsenergie
M	Molar
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Milliliter
<i>M. janaschii</i>	<i>Methanococcus janaschii</i>
MjHsp16.5	sHsp aus <i>Methanococcus janaschii</i>
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
ms	Millisekunde
MW	relative Molekularmasse
N	Natives Protein
NaCl	Natriumchlorid
NaDoc	Natrium Desoxycholat
nHsp26	natives/ursprüngliches Hsp26
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NaP	Natriumphosphat
OD	optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDI	Protein Disulfid Isomerase
Pg	prep grade
pH	pondus Hydrogenii
PNG	p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid
pO ₂	Sauerstoffdruck
Phe	Phenylalanin
pI	isoelektrischer Punkt
PPI	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
rHsp26	reassoziertes Hsp26
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScHsp26	Hsp26 aus Hefe, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

ScHsp42	Hsp42 aus Hefe, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEC	size exclusion chromatography
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
sHsp(s)	kleine(s) Hitzeschockprotein(e)
STRE	Stress responsive element
T	absolute Temperatur
TCA	Trichloracetat
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TaHsp16.9	Hsp16.9 aus Weizen, <i>Triticum aestivum</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	denaturierter/entfalteter Zustand
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
VIS	visuelles Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wtHsp26	Wildtyp Hsp26
XlHsp30	Hsp30 aus <i>Xenopus laevis</i>
z.A.	zur Analyse

Publikationsliste

1. Klappa, P., Stromer, T., Zimmermann, R., Ruddock, L.W. & Freedman, R.B. (1998) A pancreas-specific glycosylated protein disulphide-isomerase binds to misfolded proteins and peptides with an interaction inhibited by oestrogens. *Eur. J. Biochem.* **254**, 63-69
2. Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. & Buchner, J. (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* **18**, 6744-51
3. Stromer, T., Haslbeck, M. & Buchner, J. (2001) Hsp26 – A Temperature-regulated Small Heat Shock Protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nova Acta Leopoldina Supplementum* **16**, 163-165
4. Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M. & Buchner, J. (2003) Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J Biol Chem.* **278**, 18015-18021

Dank

Ich danke Herrn Prof. Johannes Buchner für die interessante Themenstellung und seine fortwährende Diskussionsbereitschaft und für den großen kreativen Freiraum, den ich in seiner Arbeitsgruppe genossen habe.

Ein dickes Dankeschön geht an „die kleinen geschockten Hitzefreunde“, Elke Fischer, Monika Ehrnsperger, Sabine Grünaug, Martin Haslbeck und dem ständig interessierten Außenstehenden, Holger Grallert für die vielen fachlichen und auch nicht-fachlichen Gespräche und die aufmunternden Worte in Zeiten der Frustration, die den Laboralltag erheiterten.

Ein besonderer Dank an unsere „SysAdmins“ Alexander Frenzel, Lin Müller, Stefan Bell und Michael Thieß für die intensive Computer-Betreuung und die zahlreichen „Erste Hilfe-Maßnahmen“. Was mach ich nur ohne Euch?

Für die kleinen Hilfen im Laboralltag danke ich besonders Ioana Schuster, Bettina Richter und Natascha Model. Natürlich möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Buchner für die Hilfsbereitschaft, dem angenehmen Arbeitsklima und der freundschaftlichen Atmosphäre danken, den Jetzigen, den Ehemaligen und allen anderen mehr temporären Mitgliedern.

Mein spezieller Dank gilt Frau Susanne Hilber, der guten Seele des Lehrstuhls. Sie sind eine enorme Bereicherung.

Dem Weinkauf Team danke ich für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis, auch wenn ich die dortige Zeit in „dunklen Räumen“ verbringen musste.

Danke auch an meine Schwester, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, mich unterstützt und ermutigt hat.

Für die zahlreichen Night-Out's und die vielen anderen Dinge, die die letzten Jahre zu einer so schönen Zeit gemacht haben, möchte ich ganz besonders Moni, Elke & Alex und Holgi danken.

Zuletzt möchte ich ganz besonders Jan danken. Dafür, dass Du mich unterstützt und mir Halt gegeben hast, wenn es mir mal nicht so gut ging.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

München, im April 2003