

Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Funktionelle Analyse der
großen Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerasen
FKBP51, FKBP52 und Cyp40**

Franziska Pirkl

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 Glaser

Prüfer der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 09.05.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.07.2001 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS	I-IV
1. Einleitung	1
1.1. Einführung	1
1.2. Proteinfaltung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	1
1.3. Faltungskatalysatoren	3
1.3.1. Protein-Disulfid-Isomerasen	3
1.3.2. Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerasen	4
1.4. Molekulare Chaperone	9
1.5. Hsp90 und der Multichaperonkomplex	11
1.6. Die großen Immunophiline	16
1.6.1. FKBP52	16
1.6.2. FKBP51	18
1.6.3. Cyp40	18
1.6.4. Rolle im Hsp90-Multichaperonkomplex	19
1.7. Problemstellung	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Verwendete Materialien	23
2.1.1. Chemikalien	23
2.1.2. Proteine	24
2.1.3. Peptide	24
2.1.4. Bakterienstämme	25
2.1.5. Plasmide	25
2.1.6. PCR-Primer	26
2.1.7. Molekularbiologische Standards und Kits	27
2.1.8. Antibiotika und Medien	27
2.1.9. Puffer und Lösungen	27
2.1.9.1. Lösungen für gentechnische Methoden	27
2.1.9.2. Puffer für präparative und proteinchemische Methoden	28
2.1.10. Standard-Chromatographiematerialien und -Säulen	28
2.1.11. Sonstiges Material	28
2.1.12. Geräte	29
2.1.13. Computerprogramme	30

2.2.	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1.	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> Stämmen (Sambrook et al., 1989)	31
2.2.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.2.3	PCR-Amplifikation (Mullis und Faloona, 1987)	31
2.2.4.	Enzymatische Modifikation von DNA	32
2.2.4.1.	Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	32
2.2.4.2.	Dephosphorylierung von DNA-Enden	33
2.2.4.3.	Ligation von DNA-Enden	33
2.2.5.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA (Sambrook et al., 1989)	33
2.2.6.	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.3.	Präparative Methoden	34
2.3.1.	Proteinexpression und Ernte	34
2.3.2.	Proteinreinigung	34
2.3.2.1.	Ionenaustauscherchromatographie	35
2.3.2.2.	Affinitätschromatographie	35
2.3.2.3.	Präparative Gelfiltration	35
2.3.3.	Aufkonzentrierung und Dialyse	36
2.4.	Proteinchemische Methoden	36
2.4.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.4.2.	Färbemethoden	36
2.4.3.	Immunoblotting	37
2.4.4.	Protein-Sequenzblot	37
2.4.5.	Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	38
2.5.	Spektroskopische Methoden	38
2.5.1.	UV-Vis-Spektroskopie	38
2.5.2.	Fluoreszenzspektroskopie	39
2.5.3.	Circulardichroismus	40
2.6.	Stabilitätsmessungen	41
2.6.1.	Chemische Denaturierung und Renaturierung	41
2.6.2.	Thermische Denaturierung	42
2.7.	Messungen zum Oligomerisierungszustand	43
2.7.1.	Analytische Gelfiltration	43
2.7.2.	Analytische Ultrazentrifugation	43
2.8.	Protein-Protein-Interaktionsstudien	43
2.8.1.	BIAcore: Plasmon-Resonanz-Spektroskopie	43
2.8.2.	Isothermische Titrationskalorimetrie	44
2.9.	Bestimmung der PPIase-Aktivität	45
2.9.1.	Protease-gekoppelter Peptidassay	45
2.9.2.	Protease-freier Peptidassay	45
2.9.3.	RCM-T1 Rückfaltungsassay	45

2.10.	Chaperon-Assays	46
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Vergleich der großen Immunophilinen FKBP51, FKBP52 und Cyp40	47
3.1.1.	Allgemeiner Vergleich von FKBP51, FKBP52 und Cyp40	47
3.1.2.	Reinigung von FKBP51, FKBP52 und Cyp40	49
3.1.3.	Struktur und Stabilität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40	52
3.1.3.1.	Struktur von FKBP51, FKBP52 und Cyp40	52
3.1.3.2.	Stabilität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40	59
3.1.4.	Interaktion von FKBP51, FKBP52 und Cyp40 mit Hsp90	64
3.1.4.1.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Plasmon-Resonanz-Spektroskopie	64
3.1.4.2.	Isothermische Titrationskalorimetrie	66
3.1.5.	Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerase-Aktivität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40	69
3.1.5.1.	PPIase-Aktivität im Peptidassay	69
3.1.5.2.	PPIase-Aktivität im RCM-T1 Rückfaltungsassay	72
3.1.6.	Aktivität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40 als molekulare Chaperone	74
3.2.	Lokalisation von funktionellen Einheiten der großen Immunophilinen anhand von Fragmenten von FKBP52	77
3.2.1.	Planung und Reinigung der einzelnen Fragmente	77
3.2.2.	Struktur und Stabilität der FKBP52-Fragmente	79
3.2.3.	Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerase-Aktivität der FKBP52-Fragmente	83
3.2.3.1.	PPIase-Aktivität im Peptidassay	83
3.2.3.2.	PPIase-Aktivität im RCM-T1 Rückfaltungsassay	85
3.2.4.	Aktivität der FKBP52-Fragmente als molekulare Chaperone	87
3.2.5.	Interaktion von FKBP52 mit dem C-terminalen Hsp90-Peptid Hsp90C17	89
3.2.6.	Kompetitionsmessungen mit FKBP52 und Hsp90C17 im CS-Assay	90

4.	Diskussion	92
4.1.	Funktionelle Analyse der großen Immunophilinen FKBP51, FKBP52 und Cyp40	92
4.1.1.	Struktur und Stabilität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40	92
4.1.2.	PPIase-Aktivität der großen Immunophilinen	94
4.1.3.	Bindung der großen Immunophilinen an Hsp90	95
4.1.4.	Interaktion mit nicht-nativen Proteinen und Rolle im Rezeptorkomplex	97
4.2.	Lokalisation der funktionellen Elemente von FKBP52	98
4.2.1	Struktur und Stabilität der FKBP52-Fragmente	98
4.2.2.	Lokalisation der PPIase-Aktivität von FKBP52 in Domäne 1	99
4.2.3.	Lokalisation der Chaperon-Aktivität von FKBP52	99
4.2.4.	Bindung an Hsp90 und nicht-native Proteine	100
5.	Zusammenfassung	103
6.	Literaturverzeichnis	106
7.	Abkürzungen	120
8.	Publikationen	122

1. Einleitung

1.1. Einführung

Die Sequenzdaten des humanen Genoms (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) lassen auf die Existenz von etwa 30 000 Genen schließen. Schätzungen gehen davon aus, dass aufgrund alternativen Spleißens circa 2-3 Proteintranskripte aus jedem Gen abgelesen werden, was beim Menschen zu einer Anzahl von etwa 60-90 000 verschiedenen Proteinen führt. Dabei sind weitere Varianten, die durch proteolytische Prozessierung oder posttranslationelle Modifizierung verursacht werden, noch nicht berücksichtigt (Galas, 2001).

Neben Wasser (70%) sind Proteine mit 15-18% noch vor Nukleinsäuren und Polysacchariden der zweithäufigste Baustein von Zellen (Alberts, 1994). Sie machen mehr als die Hälfte der Zelltrockenmasse aus und spielen in den meisten biologischen Prozessen eine tragende Rolle. So sind sie zum Beispiel wichtig als Strukturproteine, bei Transport und Speicherung oder als Enzyme in der Katalyse von Reaktionen. Zudem deuten neueste Untersuchungen darauf hin, dass Evolution nicht nur auf Gen-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene abläuft (Rutherford und Lindquist, 1998).

Die zentrale Rolle der Proteinstruktur wird dabei durch die Existenz einer Reihe von Krankheiten wie der Alzheimerschen Krankheit, Chorea Huntington oder den Prion-Krankheiten untermauert, deren Ursachen in der Aggregation falsch gefalteter Proteinstrukturen und der damit einhergehenden Bildung von Fibrillen oder Amyloidplaques liegen (Carrell und Lomas, 1997).

1.2. Proteinfaltung *in vitro* und *in vivo*

Anfinsens klassische Experimente haben gezeigt, dass die dreidimensionale Struktur eines Proteins nur durch die Aminosäuresequenz der zugrundeliegenden Peptidkette bestimmt wird (Anfinsen, 1973). Proteinfaltung erfolgt spontan und benötigt in wässriger Lösung weder zusätzliche Information noch Energie von außen (Jaenicke, 1993).

Jedoch wäre Proteinfaltung in biologisch relevanten Zeiträumen nicht möglich, wenn sie in Form einer statistischen Suche nach der nativen Konformation ablaufen würde, da dann bereits ein kleines Protein von nur 100 Aminosäureresten ein Vielfaches der Zeitspanne bräuchte, die das Universum bereits existiert, um seinen nativen Zustand zu finden (Levinthal, 1968). Deshalb wurde postuliert, Proteinfaltung müsse entlang bestimmter Pfade über definierte Intermediate verlaufen (Kim und Baldwin, 1990). Diese Hypothese wurde durch die Existenz von Gleichgewichtsintermediaten auf den Faltungswegen von beispielsweise α -Lactalbumin und Apomyoglobin untermauert (Baldwin, 1995).

Davon ausgehend entstanden mehrere Modelle, um die Mechanismen der Proteinfaltung zu erklären (Radford, 2000). Das „Nucleation Growth Model“ schlug vor, dass Reste, die in der Sequenz nebeneinander liegen, einen Faltungsnukleus bilden, von dem aus sich dann die native Struktur in sequentieller Art und Weise weiter entwickelt. Demgegenüber behaupteten die Verfechter des „Framework Models“, dass sich zuerst lokal begrenzte Sekundärstrukturelemente bilden und dass diese dann aneinander andocken, um die native Tertiärstruktur des Proteins zu bilden. Im Modell des hydrophoben Kollapses begräbt ein Protein früh im Faltungsprozess seine hydrophoben Seitenketten und bildet ein kollabiertes Intermediat oder „Molten Globule“, von dem ausgehend sich die native Struktur durch eine Suche innerhalb dieses begrenzten Zustandes ausbildet. Das von Harrison und Durbin (1985) vorgeschlagene „Jigsaw-Puzzle-Model“ schließlich postuliert, dass Proteinfaltung analog des Zusammenbaus eines Puzzles von jeder beliebigen Stelle einer Polypeptidkette, auch von mehreren Stellen gleichzeitig, aus zur nativen Konformation führt und dass somit jedes Proteinmolekül in einem verschiedenen Faltungsweg falten kann (Radford, 2000).

Der „New View of Protein Folding“ (Baldwin, 1995, 1997; Dill und Chan, 1997) sieht die Lösung nicht mehr in den von Levinthal vorgeschlagenen festvorgegebenen Faltungswegen. Hier wird die Proteinfaltung vielmehr durch eine zu einem Faltungstrichter geformte multidimensionale Energielandschaft, einen sogenannten „Folding Funnel“, beschrieben. Dabei führt die Faltung zu einem globalen Energieminimum und bestätigt somit Anfinsens Experimente (Anfinsen, 1973). Zudem ermöglicht diese Theorie aber auch Faltung in biologisch relevanten Zeiträumen, weil auf einem derartigen Funnel viele parallele Faltungsrouten angenommen werden können (Dill und Chan, 1997; Chan und Dill, 1998). Somit veranschaulicht der „New View“, dass es sich bei den makroskopisch beobachtbaren Faltungsvorgängen nur um eine Überlagerung von einer Vielzahl verschiedener mikroskopischer Vorgänge handeln kann. Eine Limitation dieses Modells ist allerdings, dass oft Faltungsintermediate, die als vorübergehend postuliert sind, als missgefaltete Strukturen interpretiert werden. Dass solche metastabilen Intermediate aber auch in Proteinen, die apparent nach dem Zweizustandsmodell falten, als aufeinander folgende obligatorische Stufen im Faltungsprozess auftreten, konnte experimentell für Tendamiostat gezeigt werden (Bachmann und Kiefhaber, 2001).

Antrieb für die Faltung ist die energetische Differenz zwischen dem nativen und dem denaturierten Zustand, die etwa 5-15 kcal/mol beträgt (Tanford, 1970; Jaenicke, 1987; Pace et al., 1996). Dabei stabilisieren den nativen Zustand Wechselwirkungen zwischen Resten, die sehr nahe beieinander liegen („Nextneighbour Interactions“) und als Wasserstoffbrücken, hydrophobe und Coulomb-Wechselwirkungen und van der Waals -Kräfte für die Bildung von Sekundärstruktur verantwortlich sind. Darüber hinaus versucht das Molekül optimale Packungsdichte mit einem Minimum an zugänglicher hydrophober Oberfläche zu erreichen. Dazu kommen entropische Effekte durch das Entlassen von Wasser im Prozess des hydrophoben Kollapses (Dill, 1990; Jaenicke und Buchner, 1993).

Nachdem Proteine in *in vitro* Systemen spontan zurückfalten, glaubte man anfangs, dass auch *in vivo* die Proteinfaltung automatisch auf die Proteinsynthese folgen würde. Allerdings zeigten schon frühe *in vitro* Faltungsexperimente mit großen Multidomänen- oder oligomeren Proteinen, dass nur ein gewisser Anteil den nativen Zustand erreichte (Jaenicke, 1987). *In vivo* laufen zudem Proteinfaltung und Proteinbiosynthese eng aneinander gekoppelt ab, so dass die neue Polypeptidkette schon falten kann, bevor die Synthese überhaupt beendet ist. Die Faltungsgeschwindigkeit eines typischen Proteins hat in etwa eine Halbwertszeit von weniger als einer Sekunde, während die Proteinbiosynthese nur mit einer Geschwindigkeit von 4-20 Aminosäuren pro Sekunde voranschreitet (Radford, 2000). Diese Faltung während der Synthese resultiert bei längeren oder Multidomänenproteinen unweigerlich in unkorrekter Tertiärstruktur mit exponierten hydrophoben Oberflächen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führen Bedingungen, die die Oberflächenexposition von hydrophoben Flächen begünstigen, zur Akkumulierung von nicht-nativen Proteinen und zu Aggregation. Diese Situation ist *in vivo* noch ungünstiger als *in vitro*, da die Gesamtproteinkonzentration wesentlich höher ist (bis zu 300 mg/ml; Morimoto et al., 1994) und überdies auch andere Bedingungen wie pH oder Temperatur nicht für die Anforderungen eines bestimmten Proteins optimiert werden können, wie das bei *in vitro* Experimenten oft der Fall ist (Jaenicke und Rudolph, 1989; Rudolph et al., 1997).

Der Mechanismus, dessen sich die Zelle bedient, um trotz dieser Bedingungen eine möglichst hohe Ausbeute an nativ gefalteten Proteinen zu garantieren, beruht auf dem Einsatz von molekularen Chaperonen (siehe 1.4.) und Faltungskatalysatoren wie Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) und Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerasen (PPIasen) (siehe 1.3.).

1.3. Faltungskatalysatoren

1.3.1. Protein-Disulfid-Isomerasen

Neben den Chaperonen (siehe 1.4.) hat die Natur zwei Klassen von Enzymen entwickelt, die verantwortlich sind für die Katalyse von langsamen Faltungsschritten. Während PPIasen die Isomerisierung von cis/trans Peptidyl-Prolyl-Bindungen beschleunigen (1.3.2.), katalysieren PDI und sein prokaryontisches Analogon DsbA Thiol/Disulfidaustauschreaktionen (Freedman, 1989; Hawkins und Freedman, 1991; Bardwell, 1994). Dadurch wird die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken eines Proteins erleichtert. Im Endoplasmatischen Retikulum katalysieren PDIs sowohl die Bildung, als auch die Umgestaltung von Disulfidbrücken in sekretorischen Proteinen. Die oxidierte Form von PDI katalysiert dabei die Bildung von Disulfidbrücken, während die reduzierte Form falsch verknüpfte Brücken wieder auflösen kann (Bulleid und Freedman, 1988; Bardwell, 1997; Darby et al., 1998). Dabei ist das aktive Zentrum das bei allen Oxido-Reduktasen vorkommende -CXXC- Sequenzmotiv (Bardwell et al., 1991). Eines der Cysteine weist einen stark herabgesetzten pK-Wert auf (Hawkins et al., 1991; Hawkins und Freedman, 1991). Die katalytische Reaktion besteht in

der Bildung eines gemischten Disulfids zwischen der Oxido-Reduktase und dem Substratprotein.

Bei PPIasen ist die Anzahl der katalytischen Zyklen in Anwesenheit von Peptidyl-Prolyl-Bindungs- cis/trans-Gleichgewichten nicht limitiert. PDIs hingegen sind für die katalytische Disulfidbildung abhängig von der Verfügbarkeit von Oxidationsäquivalenten. Neueste Forschungen haben gezeigt, dass diese bei Prokaryonten ihren Ursprung in den zellulären Elektronentransportketten haben. Die Reoxidation von DsbA durch DsbB wird durch Ubiquinon angetrieben. Dieses wird wiederum durch Cytochromoxidasen unter Verwendung von Sauerstoff als finalem Elektronenakzeptor reoxidiert (Bader et al., 1999).

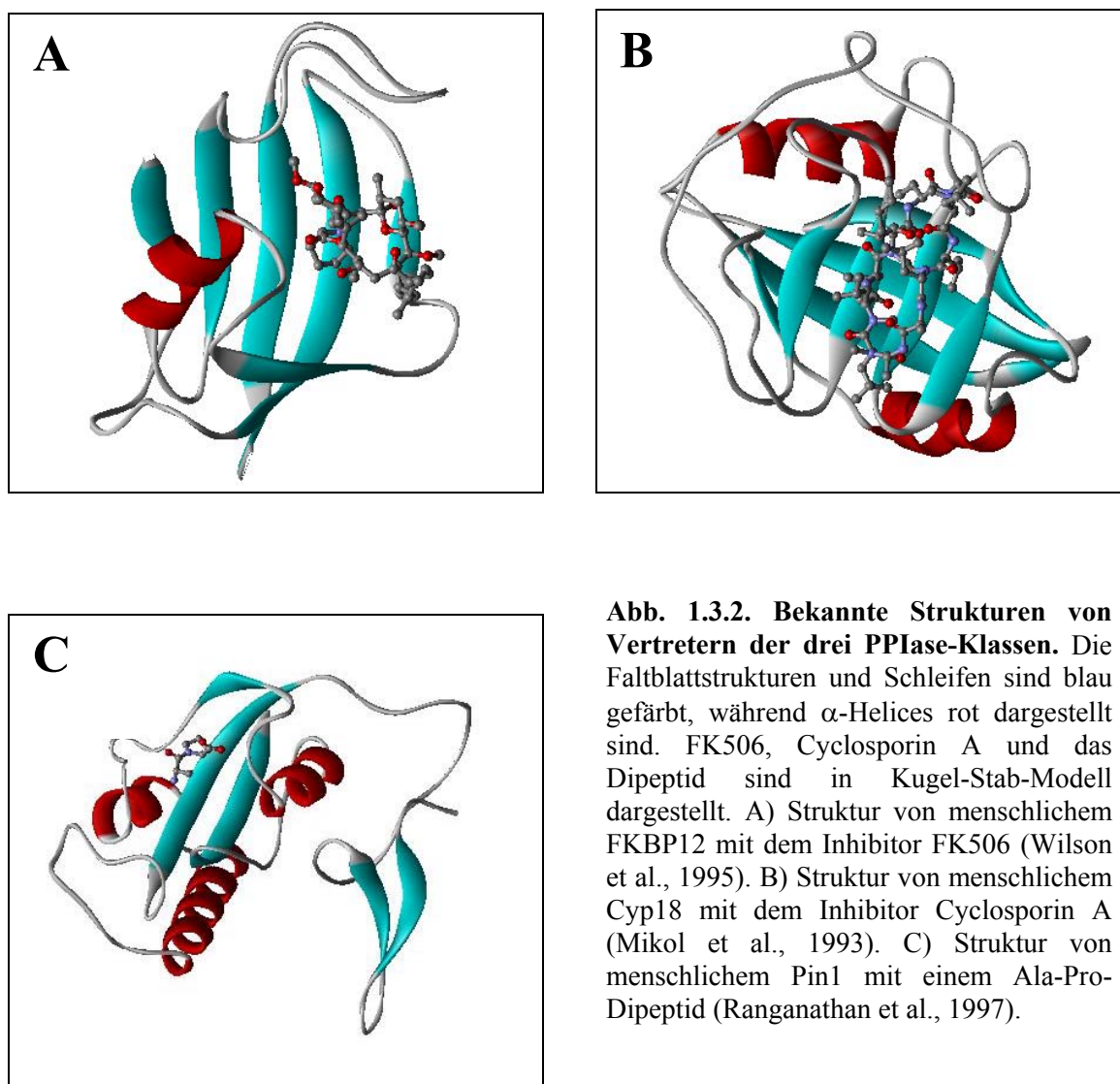
1.3.2. Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerasen

Trans/cis Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen ist oft der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Proteinfaltung (Brandts et al., 1975; Kim und Baldwin, 1982; Schmid, 1993). Von allen Peptidyl-Prolyl-Bindungen liegen 7% in der cis-Konformation (Stewart et al., 1990) vor, wohingegen die cis-Konformation bei nicht-Prolin Peptidbindungen aufgrund sterischer Behinderung durch deren Seitenketten extrem selten zu finden ist (Odefey et al., 1995; Vanhove et al., 1998). Die für die Isomerisierung benötigte Aktivierungsenergie ist mit 85 kJ/mol recht hoch (Brandts et al., 1975), so dass die Isomerisierung eine langsame Reaktion darstellt. Es wird angenommen, dass am Ribosom stereospezifisch nur trans-Konformationen synthetisiert werden (Lim und Spirin, 1986) und cis-Peptidyl-Prolyl-Bindungen erst später entstehen.

Enzyme, die diesen Isomerisierungsschritt katalysieren können, werden Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerasen (PPIasen) genannt. Erstmals wurde 1984 ein solches Enzym beschrieben (Fischer et al., 1984). Im Gegensatz zu Chaperonen agieren PPIs als echte Katalysatoren, indem sie die Prolyl-Isomerisierung beschleunigen, ohne das Gleichgewicht zwischen nativem und denaturiertem Protein zu beeinflussen (Lilie et al., 1993; Schmid, 1993). Als katalytischer Mechanismus der Isomerisierung wurde „Catalysis by Distortion“ bestätigt, in der Bindungsenergie selektiv dazu benutzt wird, einen verdrehten hoch-energetischen Übergangszustand zu stabilisieren oder die Grundzustände zu destabilisieren (Harrison und Stein, 1990a; Rosen et al., 1990; Park et al., 1992; Fischer et al., 1993).

Es wurden bislang drei Unterfamilien dieser Enzymklasse identifiziert: FKBP (FK506 Binding Proteins), Cyclophiline (Cyps) und Parvuline (Heitman et al., 1992; Schmid et al., 1993; Fischer, 1994; Rahfeld et al., 1994; Dolinski und Heitman, 1997; Göthel und Marahiel, 1999).

FKBPs und Cyclophiline ähneln einander insofern als sie beide immunsuppressive Drogen (FK506 und Rapamycin beziehungsweise CyclosporinA) binden und von ihnen in ihren katalytischen Eigenschaften beeinflusst werden. Folglich werden sie im Gegensatz zu den Parvulinen (Rahfeld et al., 1994; Rudd et al. 1995), die weder CsA noch FK506 binden, auch als Immunophiline bezeichnet. Die Enzymaktivität von einigen Parvulinen kann aber durch den braunen Farbstoff der Walnuss, Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphtoquinon), gehemmt werden (Henning et al., 1998). Bisher wurden im Menschen durch Genomanalyse und Proteinisolation 14 Cyps, 12 FKBPs und 2 Parvuline gefunden (Schiene und Fischer, 2000). Die wichtigsten sind in Tabelle 1.3.2. näher beschrieben.



Von Cyp18, FKBP12 und den Parvulinen Pin1 und hPar14 ist die Struktur bereits bekannt (Abb.1.3.2.). Cyp18 besteht aus 8 antiparallelen β -Strängen, die ein β -Barrel bilden, und zwei kurzen Helices (Ke et al., 1991; Mikol et al., 1993), während FKBP12 aus einem fünfsträngigem antiparallelem β -Faltblatt mit einer linkshändigen Drehung und einer kurzen Helix aufgebaut ist, und einen hohen Gehalt an aperiodischer Struktur besitzt (Michnick et al., 1991; Moore et al., 1991; Wilson et al., 1995). Weder die Struktur von Cyp18 noch die von FKBP12 wird durch die Bindung des jeweiligen Liganden deutlich verändert. Die PPIase-Domäne der Parvuline ist ähnlich aufgebaut wie die der FKBP's (Sekerina et al., 2000) und besteht aus 4 antiparallelen β -Faltblättern, die von 4 α -Helices umgeben sind (Ranganathan et al., 1997, Sekerina et al., 2000). N-terminal von dieser PPIase-Domäne besitzen die meisten eukaryontischen Parvuline eine zusätzliche WW-Domäne, die als Proteininteraktionsmodul dient (Sekerina et al., 2000).

Humanes Cyp18 ist ein sehr effizientes Enzym, dessen Substratspezifität breit angelegt ist mit einer leichten Präferenz für Alanin in der Position vor dem Prolin (Harrison und Stein, 1990b). FKBP hingegen weist eine geringere katalytische Effizienz bei deutlich höherer Substratspezifität auf, wobei hydrophobe Reste vor dem Prolin bevorzugt werden (Albers et al., 1990; Harrison und Stein, 1990b). Die PPIase-Aktivität der Parvuline ist ähnlich der von Cyp18 (Rahfeld et al., 1994; Rudd et al., 1995). Allerdings weisen verschiedene Parvuline deutlich unterschiedliche Substratspezifitäten auf. *E. coli* Parvulin bevorzugt -genau wie die FKBP's- in Tetrapeptiden hydrophobe Reste vor dem Prolinrest (Rahfeld et al., 1994), wohingegen hPar14 eine deutliche Präferenz für positiv geladene Aminosäuren, vor allem Arginin, in dieser Position aufweist (Uchida et al., 1999).

Das humane Pin1 katalysiert die Isomerisierung von Peptiden, in denen Phosphoserin und Phosphothreonin dem Prolinrest vorangehen, wesentlich besser als ihre nicht phosphorylierten Varianten (Ranganathan et al., 1997; Yaffe et al., 1997). Dieses Verhalten scheint die Grundlage für einen neuartigen mitotischen Regulationsmechanismus zu bilden (Yaffe et al., 1997; Winkler et al., 2000; Zhou et al., 2000).

Für die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A und FK506 sind die Komplexe der beiden Moleküle mit dem jeweiligen Immunophilin (CyclosporinA•Cyclophilin bzw. FK506•FKBP) verantwortlich. Sie wechselwirken mit Calcineurin, das durch diese Bindung seine Fähigkeit, den IL-2 spezifischen Transkriptionsfaktor NF-AT zu dephosphorylieren, verliert. Das führt dazu, dass NF-AT nicht in den Zellkern einwandern kann und die Transkription von IL-2 nicht angeschaltet werden kann (Fischer, 1994). Die immunsuppressive Wirkung der Rapamycin•FKBP Komplexe hingegen beruht auf ihrer Wechselwirkung mit der Protein-Lipid-Kinase FRAP/RAFT (Hamilton und Steiner, 1998).

Gene	MW	Lokalisation	Charakteristika/ mutante Phänotypen	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)	Literatur
Cyclophiline					
CypA/Cyp18	18	Zytoplasma	Rezeptor für CsA Interaktion mit HIVgag, Hsp90 und YY1	$5 \cdot 10^6$	Handschumacher et al., 1984; Schönbrunner et al., 1990; Liu et al., 1991; Nadeau et al., 1993; Luban et al., 1993; Yang et al., 1995
CypB	23	ER	Komplex mit Hsp47 und Prokollagen, Interaktion mit CAML und mit HIVgag	$6,3 \cdot 10^6$	Bergsma et al., 1991; Hasel et al., 1991; Price et al., 1991; Bram und Crabtree, 1994; Smith et al., 1995
CypC	23	ER	Interaktion mit 70 kDa Glykoprotein (CAP)	-	Friedman und Weissman, 1991; Friedman et al., 1993
CypD	20	Mitochondrien	Regulation der mitochondriellen Permeabilitäts- Transitions-pore	$0,9 \cdot 10^6$	Connern und Halestrap, 1992; Nicolli et al., 1996;
Cyp40	40	Zytoplasma	Hsp90-Bindung in SHR- Komplex, Calmodulinbindung	$1,9 \cdot 10^6$	Kieffer et al., 1992, 1993; Ratajczak et al., 1993, 1995; Hoffman und Handschumacher, 1995
FKBPs					
FKBP12	12	Zytoplasma	Rezeptor von FK506 und Rapamycin; Bestandteil von Ryanodin und IP3 Rezeptor- Komplexen, Interaktion mit YY1	$2,2 \cdot 10^6$	Albers et al., 1990; Liu et al., 1991; Jayarman et al., 1992; Wiederrecht et al., 1992; Timerman et al., 1993; Cameron et al., 1995
FKBP12.6	12.6	Zytoplasma	In Calcium-Kanälen im Herzmuskel	$0.62 \cdot 10^6$	Timerman et al., 1996
FKBP13	13	ER	Induziert durch Tunicamycin	-	Jin et al., 1991; Bush et al., 1994
FKBP25	25	Zellkern, Zytoplasma	Interaktion mit Nucleolin und Kasein Kinase II	$0,8 \cdot 10^6$	Galat et al., 1992; Riviere et al., 1993
FKBP51 (FKBP54)	51	Zytoplasma	Hsp90-Bindung im SHR- Komplex	-	Smith et al., 1993; Baughman et al., 1995
FKBP52 (Hsp56; HBI; FKBP59)	52	Zellkern Zytoplasma	Hsp90-Bindung im SHR- Komplex Bindung an Calmodulin	$1,4 \cdot 10^6$	Tai et al., 1992; Chambrud et al., 1993
Parvuline					
Pin1 (hPar18)	19	Zellkern	Mitotischer Regulator Interaktion mit NIMA Kinase	$20,2 \cdot 10^6$	Lu et al., 1996; Yaffe et al., 1997; Winkler et al., 2000; Zhou et al., 2000
hPar14	14	Zellkern	N-terminal ungefaltet, mögliche Interaktion mit DNA	$0,04 \cdot 10^6$	Uchida et al., 1999, Sekerina et al., 2000

Tabelle 1.3.2. Übersicht über einige wichtige Säugetier – PPIasen. Die angegebenen k_{cat}/K_m -Werte beziehen sich jeweils auf das Tetrapeptid-Substrat, für das bislang die größte Spezifität gezeigt ist. (verändert nach Dolinski und Heitman, 1997).

In HIV-1 infizierten Zellen assoziiert menschliches CyclophilinA (CypA) bei der Virusreifung stabil mit dem Virusprotein p55^{gag} (Luban et al., 1993). Die Tatsache, dass diese Assoziation mit der Infektiosität des Viruspartikels korreliert, weist darauf hin, dass die Wechselwirkung zwischen CypA und p55^{gag} für frühe Stufen der HIV-1-Replikation von Bedeutung ist (Thali et al., 1994). Für die Bindung an CypA ist eine prolinreiche Region zuständig, die in allen HIV-1 gag Polyproteinen konserviert ist (Franke et al., 1994). Im Gegensatz zu anderen CypA-Substrat-Komplexen ist in der Kristallstruktur von CypA im Komplex mit einem Peptid des HIV-1 p55^{gag} Capsidproteins der Prolinrest in trans-Konformation gebunden (Zhao et al., 1979). Das führte zu der Vermutung, dass CypA hier eher als molekulares Chaperon im Coating/Uncoating -Prozess des Virus arbeitet denn als PPIase (Göthel und Marahiel, 1999).

Weil PPIasen so hoch konserviert sind und *in vitro* Proteinfaltung katalysieren können, nahm man lange Zeit an, sie würden auch in der *in vivo* Faltung von Proteinen eine tragende Rolle spielen. Ein bisher beschriebenes Beispiel für eine PPIase mit generellen Aufgaben ist das Parvulin-Homolog ppiD aus *E. coli* (Dartigolongue und Raina, 1998), dessen Deletion zu einer allgemeinen Reduktion des Proteinlevels und der Faltung in der äußeren Membran des Periplasmas führt. An mitochondrialen Cyclophilinen aus *Neurospora crassa* (Rassow et al., 1995) und Hefe (Matouschek et al., 1995) konnte gezeigt werden, dass diese Proteine Teil der Proteinfaltungsmaschinerie der Zelle sind. Der Trigger Faktor ist ein mit dem Ribosom assoziiertes Protein, das mit neusynthetisierten Proteinen interagiert (Stoller et al., 1995; Bukau et al., 2000). Seine PPIase-Aktivität im Bezug auf Proteinsubstrate ist wesentlich höher als die von Cyclophilinen und FKBP, und er wirkt zusätzlich als Chaperon. Er besitzt eine zentrale FKBP-ähnliche Domäne, aber seine hochaffine Bindestelle für Substratproteine erstreckt sich darüber hinaus auch auf Domänen C- und N-terminal davon (Scholz et al., 1997c; Zarnt et al., 1997).

Die Bedeutung von PPIasen in höheren Eukaryonten wird durch die schweren, teilweise lethalen Herzmuskeldefekte, die eine Deletion von FKBP12 in Maus auslöst, gezeigt (Shou et al., 1998). Hauptursache dieser Defekt sind wohl morphologische Veränderungen in dem mit FKBP12 assoziierten Ca²⁺-Kanal RyR2. Auch in Pflanzen führten Mutationen in PPIase-kodierenden Genen, wie zum Beispiel PAS1 in *Arabidopsis thaliana*, zu schweren Entwicklungsdefekten, deren Hauptmerkmal unkontrolliertes Zellwachstum war (Vittorioso et al., 1998). Überexpression der PPIase-Domäne von Weizen FKBP73 führte zu sterilen männlichen Pflanzen mit veränderter Morphologie (Aviezer et al., 1998).

Allerdings lassen sich in Hefe alle Cyclophiline und FKBP, ohne dass eine Effekt auf das Überleben der Zellen deutlich wird (Dolinski et al., 1997). Das einzige Mitglied der PPIase Familie, das in Hefe essentiell ist, ist das Parvulin Ess1. Auch das Gen des periplasmatischen Cyclophilins von *E. coli* kann ohne Probleme deletiert werden (Kleerebezem et al., 1995). Insgesamt gibt es mit Ausnahme einiger Pflanzen nur wenige mutante Phänotypen, die sich aus Mutationen in spezifischen PPIasen ableiten lassen. Davon

ausgehend hat man den Schluss gezogen, dass Immunophiline keine generelle Rolle bei der Proteinfaltung spielen, sondern eher spezielle Funktionen erfüllen (Göthel und Marahiel, 1999) oder nur mit bestimmten Partnerproteinen interagieren können. Ein Beispiel dafür wäre FKBP12 in Hefe, von dem die Aktivitätsregulation der Aspartokinase abhängt (Alarcón und Heitman, 1997). Zudem sind für FKBP12 weitere funktionelle Interaktionen mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel dem Rhyonodin Rezeptor im sarkoplasmatischen Retikulum (Collins, 1991; Jaymaran et al., 1992), dem Inositol-Triphosphat Rezeptor im ER (Cameron et al., 1995) oder dem TypII TGF-Rezeptor in der Plasmamembran (Wang et al., 1994) beschrieben. Des Weiteren scheinen FKBP's eine wichtige Funktion im Nervensystem beim Wachstum und der Regeneration von Nerven zu spielen (Hamilton und Steiner, 1998; Gold, 1999).

PPIasen mit speziellen Funktionen sind auch NinA und Pin 1. NinA spielt eine zentrale Rolle bei der Reifung und Lokalisation von Rhodopsin. Seine Deletion führt zu Akkumulation von Rhodopsin und löst Erblindung aus (Schneuwly et al., 1989; Stammes et al., 1991). Die spezielle Funktion von Pin1 liegt in der Regulierung des Zellzyklus (Lu et al., 1996; Winkler et al., 2000). Insgesamt ist jedoch die genaue physiologische Rolle der PPIasen noch ungeklärt.

1.4. Molekulare Chaperone

Unter physiologischen Bedingungen und Stress-Situationen erkennen und binden molekulare Chaperone selektiv nicht-native Proteine. Damit verhindern sie irreversible Aggregationen und sorgen dafür, dass Proteine auf dem richtigen Faltungsweg bleiben (Buchner, 1996). Chaperone beeinflussen nur die kinetisch kontrollierte Konkurrenz zwischen Proteinfaltung und deren Nebenreaktionen wie Aggregation, stellen jedoch keine sterische Information für die Faltung bereit (Jaenicke und Buchner, 1993).

Ursprünglich wurde der Ausdruck „Molekulares Chaperon“ für die GroE- und Hsp70-Familie geprägt (Ellis und van der Vies, 1991), um ihre unterstützende und überwachende Funktion bei der Aufrechterhaltung von Struktur und Ausbildung von legitimen Wechselwirkungen zu erläutern. Ihre Unterteilung erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien und nach ihrer apparenten Masse und Funktion. Die Hauptklassen sind dabei die Hsp100/Clp-Familie (Parsell et al., 1994; Schirmer et al., 1996), die Hsp90-Familie (Pratt und Toft, 1997; Buchner, 1999), die Hsp70-Familie (Gething et al., 1994; Rüdiger et al., 1997; Mayer und Bukau, 1998), die Hsp60-Familie (Goloubinoff et al., 1989; Reißinger und Buchner, 1998) und die kleinen Hitzeschockproteine (Arrigo und Landry, 1994; Ehrnsperger et al., 1998) (siehe Tabelle 1.4.).

Die meisten Chaperone weisen eine erhöhte Syntheserate bei nicht-permissiven Temperaturen auf und gehören somit zu den klassischen Hitzeschockproteinen (Georgopoulos und Welch,

1993). Ihre Expression kann aber auch durch andere Stressfaktoren, zum Beispiel gewisse Chemikalien, ausgelöst werden (Gething und Sambrook, 1992). Zwischen ihrer Expression und dem Auftreten von Thermotoleranz existiert eine klare Korrelation (Lindquist und Craig, 1988). Aber auch unter permissiven Bedingungen werden viele Hitzeschockproteine konstitutiv exprimiert und für bestimmte zelluläre Prozesse benötigt (Becker und Craig, 1994; Hartl, 1996).

Klasse und Beispiele	Funktion
Hsp100-Familie Hsp104 – <i>S. cerevisiae</i> Clp - <i>E. coli</i>	Toleranz gegen Hitze und Ethanol Auflösung von Aggregaten
Hsp90-Familie HtpG - <i>E. coli</i> Hsp83 - <i>D. melanogaster</i> Hsc/Hsp82 - <i>S. cerevisiae</i>	siehe Kapitel 1.5.
Hsp70-Familie Grp78/BIP- ER von Säugern Dna K – <i>E. coli</i> Ssa1-4p, Ssb1 und 2 - <i>S. cerevisiae</i> Hsp70/Hsc70 - Säuger	Proteinimport ins ER und Faltung von ER-Proteinen Interaktion mit HSF-Transkriptionsfaktor trennt Clathrin und Clathrin-Coats
Hsp60 – Familie GroEL/ES - <i>E. coli</i> Cpn60/10 - <i>S. cerevisiae</i>	Faltung vieler Proteine, ATP-abhängig Faltungshelfer in Mitochondrien
kleine Hsps IbpA und B - <i>E. coli</i> Hsp26 - <i>S. cerevisiae</i> Hsp25/27 – Maus/Mensch	Bestandteil von „Inclusion bodies“ nicht bekannt

Tabelle 1.4. Überblick über die wichtigsten Vertreter der verschiedenen Chaperon-Familien

In der Zelle scheinen Chaperone weniger als einzelne Proteine, sondern vielmehr als ineinander übergreifende und zu einem komplexen Netzwerk zusammengeschlossene Systeme zu agieren (Buchner, 1996; Hartl, 1998).

Die jeweiligen ATP-Bindungseigenschaften bilden einen Unterschied zwischen den verschiedenen Chaperon-Familien. Während die Aktivität der kleinen Hitzeschockproteine unabhängig von ATP ist (Ehrnsperger et al., 1998), ist Bindung von ATP für die Funktionalität von GroEL und Hsp70 von großer Bedeutung. Sie bewirkt eine Konformationsänderung, durch die die beiden Chaperone von einem für Substratproteine hoch-affinen in einen niedrig-affinen Zustand überführt werden (Beißinger und Buchner, 1998; Mayer und Bukau, 1998). Die nachfolgende Hydrolyse, die für die Wiedererlangung des hoch-affinen Zustands verantwortlich zu sein scheint, wird oft von dem jeweiligen Partner-Protein beeinflusst (Beißinger und Buchner, 1998; Mayer und Bukau, 1998). Auch Vertreter der Hsp100-Familie binden ATP (Schirmer et al., 1996). Dabei ist aber über ihren ATPase-Zyklus und den Mechanismus der Substratbindung noch wenig bekannt. Sie besitzen jedoch die einzigartige Fähigkeit, Aggregate wieder aufzulösen (Parsell et al., 1994; Goloubinoff et al., 1999).

Einen weiteren Unterschied bildet die Substratspezifität der einzelnen Chaperone. Das GroE-System besitzt ein sehr breites Substratspektrum, das von ungefalteten bis zu nativ-ähnlichen Proteinen reicht (Beißinger und Buchner, 1998). Seine Limitation ist aber die Größe des Hohlraums, in dem die Faltung stattfindet, die *in vivo* bei etwa 55 kDa liegt (Ewalt et al., 1997). Für die Substratspezifität des Hsp70-Systems dagegen ist die Bindung an kurze lineare Sequenzen in entfalteten Proteinen oder Peptiden, die hydrophobe Reste enthalten, charakteristisch (Gething et al., 1994; Rüdiger et al., 1997). Ähnlich wie Hsp70 kann auch Hsp90 antigene Peptide binden und sie den MHC Klasse I Molekülen präsentieren (Srivastava et al., 1994; Blachere et al., 1997). Als effizienteste Chaperone im Bezug auf die Bindekapazität können wohl die kleinen Hitzeschockproteine gelten. Sie bilden große Oligomere, die pro Untereinheit jeweils eine Polypeptidkette binden können (Ehrnsperger et al., 1998).

1.5. Hsp90 und der Multichaperonkomplex

Hsp90 ist eines der häufigsten Proteine in eukaryontischen Zellen. Sogar unter stressfreien Bedingungen macht es 1-2% des gesamten zellulären Proteins aus (Welch und Feramisco, 1982). Dieser Level erhöht sich infolge von Stressfaktoren noch weiter (Welch und Feramisco, 1982), was auf seine schützende Funktion unter diesen Bedingungen hinweist. *In vitro* wurde gezeigt, dass Hsp90 spezifisch mit nicht-nativen Proteinen interagiert und so ihre Stress-induzierte Aggregation verhindert (Wiech et al., 1992; Freeman et al., 1996).

Vor kurzem wurde Hsp90 zudem eine bedeutende Rolle in der Evolution zugeschrieben (Rutherford und Lindquist, 1998). An *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass Hsp90 eine große Zahl von kryptischen genetischen Variationen puffern kann, indem es den mutierten Proteinen hilft, ihre „Wildtyp“-Struktur und -Funktion aufrecht zu erhalten. Wird die Funktion von Hsp90 gestört, dann manifestieren sich die bis dahin kryptischen

Phänotypen der mutierten Substratproteine, und ein neuer „Pool“ an Varianten steht der natürlichen Selektion zu Verfügung.

Hsp90 ist hochkonserviert und besitzt Homologe in so verschiedenen Spezies wie Bakterien, Hefe, *Drosophila* und Mensch (Pratt und Toft, 1997). Nur in Archaeen wurde bisher noch kein Homologes gefunden. Im Zytosol von Säugetierzellen gibt es zwei Isoformen von Hsp90 - z.B. das vorwiegend induzierbare Hsp90 α und das konstitutiv exprimierte Hsp90 β beim Menschen (Hickey et al., 1989). Eine dritte Form, Grp94, ist spezifisch für das Endoplasmatische Retikulum (Little et al., 1994; Wearsch und Nicchita, 1996). Von einem weiteren, verkürzten Vertreter, Hsp75 oder TRAP1 in Mitochondrien, wurde berichtet (Song et al., 1995; Chen et al., 1996).

Hsp90 ist zwar vorwiegend ein zytoplasmatisches Protein, kann sich aber als Folge verschiedener Stressoren sehr schnell im Zellkern ansammeln (Gasc et al., 1990; Akner et al., 1992).

Humanes Hsp90 α



Humanes TRAP1



Abb. 1.5.1. Domänen-Struktur von humanem Hsp90 und TRAP1. Die hochkonservierten Regionen sind schwarz und gestreift dargestellt. Dabei ist die schwarze Region die ATP-bindende. Die geladene Region ist weiss. Sie fehlt in TRAP1 und *E.coli* HtpG.

Sowohl die N- als auch die C-terminalen Domänen von Hsp90 sind hochkonserviert. Beide sind durch einen geladenen Linker miteinander verbunden, der in TRAP-1 und *E. coli* HtpG fehlt (Abb. 1.5.1.). Natives Hsp90 liegt als Dimer vor, wobei sich die Dimerisierungsstelle in der C-terminalen Domäne des Proteins befindet. Sowohl die isolierte N-terminale als auch die C-terminale Domäne besitzen *in vitro* Chaperon-Aktivität (Young et al., 1997; Scheibel et al., 1998; Scheibel et al., 1999).

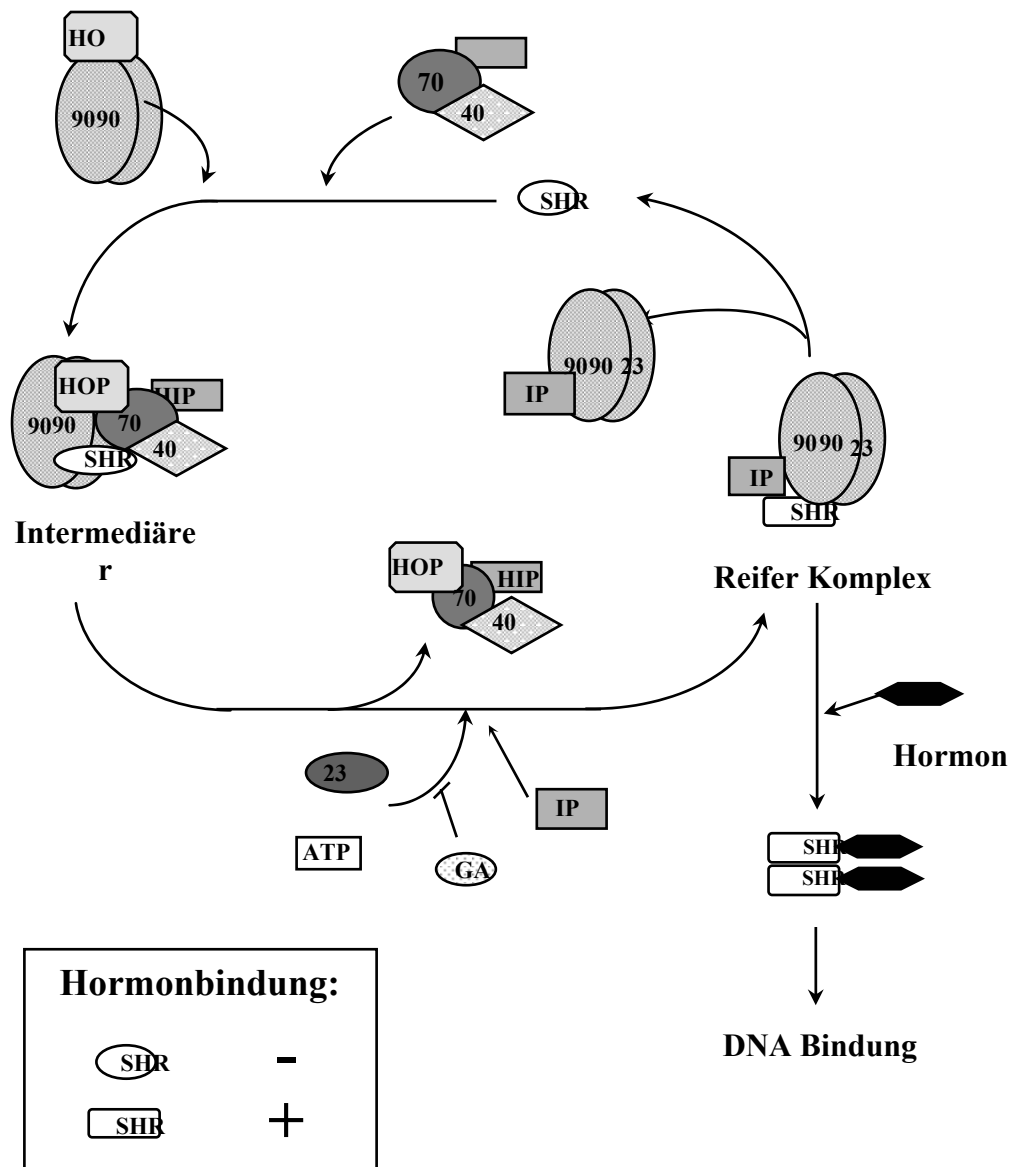


Abbildung 1.5.2. Einfluss des Hsp90-Multichaperonekomplexes auf die Reifung von Steroidhormonrezeptoren (SHR). Ob ein oder zwei Immunophilin-Monomere an ein Hsp90-Dimer binden ist noch kontrovers. In dieser Darstellung wird vor allem durch chemische Quervernetzungsdaten gestützte Sichtweise, dass nur ein Immunophilin-Monomer an ein Hsp90-Dimer bindet, illustriert. Verändert nach Smith et al. (1995).

In vivo bindet Hsp90 eine Vielzahl von Substratproteinen, die diese Interaktion brauchen, um ihre aktive Konformation zu erlangen. Substratproteine sind neben den Steroid-Hormonrezeptoren (SHR) (Pratt und Toft, 1997) auch der Aryl Hydrocarbon Rezeptor (Perdew, 1988; Whitelaw et al., 1993; Fukunaga et al., 1995), die mutante Konformation von p53 (Blagosklonny et al., 1996; Sephehrnia et al., 1996), der Heat Shock Transkriptionsfaktor HSF-1 (Nadeau et al., 1993; Nair et al., 1996), Tyrosinkinasen wie p60v-src (Brugge et al.,

1981, Oppermann et al., 1981), Serin/Threonin Kinasen wie Raf-1 (Stancato et al., 1993; Wartman und Davis, 1994) und die Reverse Transkriptase des Hepatitis B Virus (Hu und Seeger, 1997).

Der gemeinsame Nenner dieser vielfältigen Interaktionen ist die Tatsache, dass Hsp90 durch seine Bindung einen teilgefalteten Zustand des betreffenden Proteins stabilisiert. Dieser wird erst dann einer weiteren konformationellen Umgestaltung unterworfen, wenn ein bestimmtes externes Signal eintritt, wie zum Beispiel die Bindung des Steroidhormons im Falle des SHRs.

Hier erfüllt Hsp90 seine Funktion in Zusammenarbeit mit einer definierten Anzahl an sogenannten Co-Chaperonen, die in den Komplexen teilweise in Abhängigkeit von den verschiedenen Substraten vorkommen (Tabelle 1.5.).

Allgemeiner Name	Name in Wirbeltieren	Name in Hefe	Funktion	TPR-Motiv
Hsp70	Hsp70	Ssa1p	Chaperon	-
Hsp40	Hsp40, Hdj1	Ydj1	Hsp70-Kofaktor	-
Hip	Hip, p48	-	Hsp70-Kofaktor	-
Hop	Hop, p60	Sti1	Assemblierungsfaktor für Hsp70 und Hsp90	+
CDC37	p50	Cdc37p	Kinase-spezifischer Kofaktor	?
FKBP51	FKBP51, p54, FKBP54	-	?	+
FKBP52	FKBP52, p59, p56, HBI, Hsp56	-	Prolylisomerase, Chaperon	+
Cyp40	Cyp40	Cpr6p, Cpr7p	Prolylisomerase, Chaperon	+
PP5	PP5	PPT1	Protein-Serine Phosphatase	+
Cns1	-	Cns1	?	+

Tabelle 1.5. Übersicht über die Hsp90-Partnerproteine (verändert nach Buchner, 1999).

Von all diesen Substratproteinen ist die Interaktion mit dem Steroidhormonrezeptor (SHR) die am besten charakterisierte. In seinen inaktiven Zustand - d. h. in Abwesenheit eines geeigneten Liganden - liegt er in höheren Eukaryonten mit Hsp90 und seinen Co-Chaperonen assoziiert vor (Smith et al., 1990; Pratt und Toft, 1997). Mehrere Hsp90-Komplexe verschiedener Zusammensetzung sind für die Rezeptoraktivierung notwendig (siehe Abb.1.5.2.). In einem frühen Stadium im Chaperonzyklus interagiert der Rezeptor mit Hsp70 und Hip. Die Bindung von Hsp90 via Hop führt zur Bildung eines intermediären Komplexes,

der sowohl Hsp70 als auch Hsp90 beinhaltet. Daraus entwickelt sich der reife Hsp90-Multichaperon-Komplex, der aus Hsp90, einem kleinen sauren Protein namens p23 und einem der drei großen Immunophilinen (FKBP51, FKBP52 oder Cyp40, siehe Abschnitt 1.6.) besteht (Pratt und Toft, 1998; Smith, 1998). Dieser reife Komplex ist unter normalen Assemblierungsbedingungen inhärent instabil und zerfällt mit einer Halbwertszeit von etwa 5 Minuten wieder. Hat der Rezeptor dann noch keine Hormone gebunden, beginnt für ihn der Chaperonzyklus von neuem (Smith, 1998). Ist Hormonbindung erfolgt, so wird er nicht mehr von Hsp70 erkannt, sondern wird stattdessen einer Reihe von Modifikationen unterzogen und wandert in den Kern, um dort als Transkriptionsfaktor zu agieren.

Für Mitglieder anderer Chaperonklassen (z.B. Hsp60 und Hsp70) ist ATP-Bindung und Hydrolyse notwendig für Konformationsänderungen (Bukau und Horwich, 1998). Neuere Befunde zeigen, dass auch Hsp90 spezifisch ATP bindet, wenngleich mit einem schwachen K_D im hochmikromolaren Bereich (Prodromou et al., 1997a; Scheibel et al., 1997). Zudem besitzt es ATPase-Aktivität mit einer geringen Umsatzgeschwindigkeit (Obermann et al., 1998; Panaretou et al., 1998; Scheibel et al., 1998). Diese Aktivität ist essentiell für seine Funktion in Hefe (Obermann et al., 1998; Panaretou et al., 1998) und wird von den Anti-Tumordrogen Geldanamycin (GA) und Radicol inhibiert (Neckers et al., 1999; Roe et al., 1999). Die Bindestelle für ATP in der N-terminalen Domäne von Hsp90 wurde durch Röntgen-Kristallographie in Kokristallen mit ATP eindeutig identifiziert (Prodromou et al., 1997b). GA bindet an die ATP-Bindestelle (Stebbins et al., 1997). Diese Domäne besteht aus einem 8-strängigen β -Faltblatt und 9 α -Helices, die ein α/β Sandwich bilden.

Die Bindestelle befindet sich in einer 15 Ångström tiefen Tasche mit β -Sheets am Grund und Loops und Helices, die den Liganden umgeben. Im Gegensatz zu GroE oder Hsp70, von denen das Nukleotid in einer ausgestreckten Konformation gebunden wird, liegt ATP in der Hsp90-Struktur geknickt vor (Prodromou et al., 1997a). Kürzlich wurde für weitere Proteine – unter anderem DNA Gyrase und MutL – gezeigt, dass sie ein ähnliches Nukleotid-Bindemuster haben wie Hsp90 (Dutta und Inouye, 2000). Für MutL wurde nachgewiesen, dass seine N-terminalen Fragmente in Anwesenheit von ATP dimerisieren und gesteigerte ATPase Aktivität zeigen (Ban et al., 1999). Die Kristallstruktur von MutL zeigte, dass auch Aminosäurereste, die außerhalb der ATP-Bindedomäne liegen, wichtig für die Dimerisierung und somit für die ATPase-Aktivität sind (Ban et al., 1999). Studien an Hefe Hsp90 sprechen für einen ähnlichen Mechanismus (Prodromou et al., 2000). Der Reaktionszyklus der Hsp90-ATPase konnte mittels neuartiger fluoreszierender ATP-Analoga aufgeklärt werden (Weikl et al., 2000). Ein wichtiger Schritt dabei ist eine Konformationsänderung von Hsp90, die das gebundene Nukleotid einschließt, das erst nach seiner Hydrolyse wieder freigesetzt werden kann. Sowohl für diese Reaktion als auch für ihre maximale Umsatzgeschwindigkeit sind C-terminale Regionen von Hsp90 von Bedeutung (Weikl et al., 2000). Die ATP-bindende Domäne alleine weist nur eine niedrige Hydrolyserate auf. ATP-Bindung und –Hydrolyse verursachen Konformationsänderungen, die das ganze Molekül betreffen.

Den TPR-enhaltenden Co-Chaperonen (Tabelle 1.5.) wurde eine Rolle in der Regulation der ATPase-Aktivität von Hsp90 zugesprochen, nachdem gezeigt werden konnte, dass das Hefe

Hop-Homologe Sti1 die ATPase von Hefe Hsp90 komplett inhibieren kann (Prodromou et al., 1999). Das Cyp40-Homologe Cpr6 kann die ATPase wieder reaktivieren, indem es Sti1 von Hsp90 verdrängt (Prodromou et al., 1999).

1.6. Die großen Immunophiline

Immunophiline mit höherer relativer molekularer Masse (40-54 kDa im Gegensatz zu 12-18 kDa bei den kleinen Immunophilinen) werden große Immunophiline genannt. Zusätzlich zu ihrer N-terminalen PPIase-Aktivität besitzen sie noch weitere C-terminale Domänen, die Tetratricopeptid-Repeats (TPRs) und eine Calmodulin-Bindestelle (Abb. 1.6.1.). In Säugtieren sind das FKBP51, FKBP52 und Cyp40.



Abb. 1.6.1. Struktur der großen Immunophiline Cyp 40 und FKBP52. FKBP51 ist analog zu FKBP52. Die PPIase Domäne ist in weiß dargestellt, die Tetratricopeptid-Repeats (TPRs) sind dunkelgrau und die Calmodulin-Bindestelle (Cambd) ist gestreift.

1.6.1. FKBP52

Das große Immunophilin, das als erstes im Komplex mit Hsp90 identifiziert wurde, war FKBP52 (Tai et al., 1986, Renoir et al., 1990). Es wurde von verschiedenen Gruppen mit verschiedenen Namen (Hsp56, p59, HBI, FKBP59) bezeichnet. FKBP52 ist in der Zelle sowohl im Zytosol als auch im Zellkern lokalisiert (Perrot-Appianat et al., 1995). Zudem wurde Assoziation mit den Mikrotubuli und Dynein nachgewiesen (Czar et al., 1994; Perrot-Appianat et al., 1995; Silverstein et al., 1999). Sequenz- und „Hydrophobic Cluster Analysis“ zeigte, dass es aus vier verschiedenen Domänen besteht, die durch kurze hydrophile Linker-Regionen voneinander getrennt sind (Chambraud et al., 1993). Zwei dieser Domänen sind mit

FKBP12 verwandt. Die N-terminale Domäne von FKBP52 weist 55% Aminosäurehomologie (Lebeau et al., 1992) und 49% Sequenzidentität zu FKBP12 auf (Callebaut et al., 1992). Dort ist auch die PPIase-Aktivität lokalisiert (Chambraud et al., 1993).

Die darauffolgende Domäne 2 besitzt immerhin noch 28% Sequenzidentität mit FKBP12. Für sie wurde nur marginale PPIase-Aktivität festgestellt (Chambraud et al., 1993). Domäne 3 besteht aus Tetratricopeptid-Repeats (TPRs) (Radanyi et al., 1994; Owens-Grillo et al., 1995; Ratajczak und Carello, 1996; Barent et al., 1998) und Domäne 4 weist eine Calmodulin-Bindestelle auf (Lebeau et al., 1992; Massol et al., 1992). Calmodulin ist ein intrazellulärer Rezeptor für Ca^{2+} , der die Aktivität einer Vielzahl von Enzymen und Strukturproteinen moduliert. Dass diese Domäne wirklich mit Calmodulin interagieren kann, wurde anhand der spezifischen Bindung von FKBP52 an Calmodulin-Sepharose gezeigt (Massol et al., 1992). Ob FKBP52 allerdings *in vivo* Wechselwirkungen mit Calmodulin eingeht, ist noch nicht geklärt. Sowohl FKBP52 selbst (Wiederrecht et al., 1992) als auch Domäne 1 (Yem et al., 1993) alleine verhalten sich wie ein Dimer.

Ob FKBP52 ähnlich wie FKBP12 und Cyp18 an der Inhibierung von Calcineurin beteiligt, ist kontrovers (Yem et al., 1993; Lebeau et al., 1994). Von schwacher Inhibitoraktivität für die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin wurde berichtet (Lam et al., 1995; Abraham und Wiederrecht, 1996). Bei Hitzestress (43°C für 4h) oder chemischen Stress (Zugabe von Natriumarsenit) wird FKBP52 von der Zelle vermehrt exprimiert und kann somit als Hitzeschockprotein gelten (Sanchez, 1990).

Die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von großen Immunophilinen wurde vor allem an FKBP52 mit Hilfe von Two-Hybrid Screens unternommen. Dabei wurden bisher zwei Proteine identifiziert. Ein 48 kDa großes Protein, für das sich keine Homologie in der GenBank fand, und das als FAP48 (FKBP-associated Protein of 48 kDa) bezeichnet wurde. Es interagiert mit der PPIase-Domäne sowohl von FKBP52 als auch von FKBP12 und, weil diese Bindung durch die Anwesenheit von FK506 wieder gelöst wird, wurde vermutet, dass FAP48 ein zelleigener Ligand für FKBP sein und die Funktionen von FK506 nachahmen könnte (Chambraud et al., 1996). Das zweite interagierende Protein war das 38 kDa große P2, dessen Bindung an die PPIase-Domäne von FKBP52 die Bindung von FK506 im Gegensatz zu FAP48 verstärkt. Zudem bindet es nicht an FKBP12. Spätere GenBank-Recherchen zeigten, dass P2 mit der menschlichen Phytanoyl-CoA α -Hydroxylase, PAHX genannt, identisch ist (Chambraud et al., 1999).

Welche Rolle FKBP52 im Hsp90 SHR-Komplex spielt, ist unklar. Einer Hypothese zufolge gibt es eine direkte Bindung zwischen FKBP52 und dem Glukokortikoid-Rezeptor (Owens-Grillo et al., 1996). Diese basiert auf einem Sequenzvergleich von Rezeptor und FKBP52, wo in den Aminosäuren 139-146 der Sequenz von FKBP52 aus Kaninchen eine Abfolge gefunden wurde (EDLTDDDED), die elektrostatisch zur NL1-Sequenz von GR (RKTCKKIK) komplementär ist. Diese Sequenz existiert mit konservativen Austauschen auch in FKBP52 aus Maus und Mensch. FKBP51 besitzt diese Region jedoch nicht (Baughman et al., 1995). Experimentelle Evidenz für eine tatsächliche Bindung lieferten chemische Querver-

netzungsstudien zwischen FKBP52 und dem Glukokortikoidrezeptor (Silverstein et al., 1999). Dieselbe Studie postuliert auch eine Interaktion von FKBP52 mit dem Zytoskelett-Element Dynein. Im Gegensatz zur Interaktion mit dem Glukokortikoidrezeptor, wo die Interaktionsstelle weder durch die PPIase-Domäne noch durch die TPR-Domäne von PP5 inhibiert wurde, konnte die Interaktion mit Dynein von der PPIase-Domäne inhibiert werden. Das legt nahe, dass Dynein mit den ersten 148 Aminosäuren von FKBP52 interagiert (Silverstein et al., 1999), wohingegen die Lokalisation der Interaktionsstelle von FKBP52 für Glukokortikoidrezeptor nicht weiter eingeengt werden konnte.

1.6.2. FKBP51

FKBP51, das mit FKBP52 circa 60% Sequenzidentität aufweist, wurde erstmals in Hühner Progesteronrezeptor (PR)-Komplexen identifiziert (Smith et al., 1990). Genau wie FKBP52 besitzt es PPIase-Aktivität und bindet FK506 und Rapamycin. Im Komplex mit einem FK506-Analogon konnte es die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin schwach hemmen (Baugham et al., 1995). Je nach Zelltyp scheint die Expression von FKBP51 empfindlich für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu sein (Baugham et al., 1995). Für eine erhöhte Expression infolge von Hitzestress, wie sie für FKBP52 beschrieben ist (Sanchez, 1990), gibt es bei FKBP51 keine Evidenz.

Genau wie FKBP52 kann auch FKBP51 über seine C-terminalen Regionen an Hsp90 binden. Allerdings konnte FKBP51 durch Zugabe von Hormon vom Rezeptorkomplex gelöst werden, während die anderen Komponenten wie Hsp90, p23 und FKBP52 auch unter diesen Bedingungen gebunden blieben (Smith et al., 1990, 1993). Dies weist auf eine zusätzliche Bindung zwischen Rezeptor und FKBP51 hinweist hin. Die Interaktion von FKBP51 mit Hsp90 beinhaltet zusätzliche Regionen C-terminal von der TPR-Domäne (Barent et al., 1998).

Darüber hinaus wird FKBP51 in PR und GR Komplexen bevorzugt inkorporiert (Barent et al., 1998). Untersuchungen an Lymphozyten aus dem Totenkopffäffchen (*Saimiri boliviensis boliviensis*) haben zudem gezeigt, dass die Bindungsaffinität des Glukokortikoidrezeptors um das 11fache abnimmt, wenn FKBP51 statt FKBP52 Teil des Glukokortikoidrezeptor-Komplexes ist (Reynolds et al., 1999).

1.6.3. Cyp40

Cyp40 wurde 1990 bei der Reinigung von Östrogen-Rezeptor aus dem Zytosol von Kälberuterus entdeckt (Ratajczak et al., 1990). Es ist schwächer als FKBP52 an GR-Komplexe gebunden und kann durch Nidrigsalzpuffer abgewaschen werden, wird aber auch durch Molybdat im Heterokomplex stabilisiert (Owens-Grillo et al., 1995). Der N-terminale Teil von Cyp40 besitzt 61% Sequenzidentität zu Cyp18 (Kieffer et al., 1993) und weist PPIase-Aktivität auf (Kieffer et al., 1992). Allerdings bindet Cyp40 CyclosporinA schlechter als andere Cyclophiline. Der Grund für diese geringere Affinität ist wahrscheinlich ein Histidin

an Position 141, an der sich in der Cyclophilin-Konsensussequenz ein Tryptophan befindet (Hoffman et al., 1995). Der C-terminale Teil weist etwa 30% Identität mit Domäne 3 von FKBP52 auf (Ratajczak et al., 1993). Bei dieser homologen Region in der C-terminalen Hälfte von FKBP52 und Cyp40 handelt es sich um drei TPRs (Ratajczak et al., 1993). Wie FKBP52 hat auch Cyp40 eine potentielle Calmodulin-Bindestelle in der C-terminalen Domäne.

Cyp40 besitzt ein „Heat Shock Element“ in seinem ersten Intron, was auf Hitzeinduzierbarkeit hindeuten könnte (Yokoi et al., 1996). Experimentell wurde aber bisher noch keine verstärkte Expression von Cyp40 unter Hitzestress nachgewiesen.

Anders als bei FKBP51 und FKBP52 gibt es zu Cyp40 in Hefe zwei homologe Proteine, Cpr6 und Cpr7. Beide Proteine sind zu 38% identisch miteinander und Cpr6 weist 44% Identität mit Cyp40 auf (Duina et al., 1996b). In Bäckerhefe löst die Deletion von Cpr6 keinen nachweisbaren Phänotyp aus, wohingegen Cpr7 Deletionsmutanten das normale Wachstum der Hefezellen (Duina et al., 1996a) und die normale Aktivität von Hsp90 beeinträchtigen (Duina et al., 1996b; Marsh et al. 1998). Ein Vergleich der Eigenschaften von Cpr6 und Cpr7 *in vitro* zeigte, dass beide zwar mit vergleichbarer Affinität an Hsp90 binden, aber deutliche strukturelle und funktionelle Unterschiede aufweisen. Beide Proteine sind Monomere mit einem beträchtlichen α -Helix Anteil. Cpr6 ist stabiler gegenüber thermischer Denaturierung als Cpr7, was mit der Tatsache übereinstimmt, dass es in Hefe im Gegensatz zu Cpr7 bei erhöhten Temperaturen überexprimiert wird (Warth et al., 1997; Dolinski et al., 1998). Auch besitzt es eine etwa hundertfach höhere PPIase-Aktivität, wohingegen seine Chaperon-Aktivität wesentlich geringer ist als die von Cpr7 (Mayr et al., 2000). Dies ist ein Indiz dafür, dass zumindest in Hefe die beteiligten Immunophilinen verschiedene Aufgaben innerhalb des Hsp90-Chaperon-Komplexes übernehmen.

1.6.4. Rolle im Hsp90-Multichaperonkomplex

Der C-terminale Bereich ist bei allen drei großen Immunophilinen ähnlich aufgebaut und besteht aus einer Calmodulin-Bindedomäne und drei Tetratricopeptid-Repeat (TPR) Sequenzen (Chambraud et al., 1993). TPRs sind degenerierte Sequenzen von 34 Aminosäuren Länge, die an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind (Sikorski et al. 1990; Lamb et al., 1995; Das et al., 1998; Scheufler et al., 2000). Neben den großen Immunophilinen gehören auch Hop und die Phosphatase PP5 zu den Hsp90-assoziierten Co-Faktoren, die TPRs enthalten (siehe auch Tabelle 1.5.).

Über diese TPRs erfolgt die Bindung an Hsp90 (Radanyi et al., 1994; Hoffman und Handschumacher., 1995; Scheufler et al., 2000). Die strukturelle Basis dieser Bindung wurde durch die Kristallstruktur der TPR2A-Domäne von Hop in Interaktion mit C-terminalen Hsp90-Peptiden aufgeklärt (Scheufler et al., 2000). Ähnlich zu der bereits vorhandenen Struktur der TPR-Region der Phosphatase PP5 ohne Bindepartner (Das et al., 1998) besteht auch hier die TPR-Struktur aus 7 mäanderartig angeordneten α -Helices, die eine wiegenförmige Grube bilden. Diese Grube beherbergt das Peptid in einer gestreckten Konformation. Das Peptid bildet nur Kontakte zu den 3 A-Helices der TPR-Domäne aus, mit denen die innere Oberfläche der Grube ausgekleidet ist, und hat keine Kontakte zu den restlichen 4 Helices (Scheufler et al., 2000 und Abb. 1.6.2.).

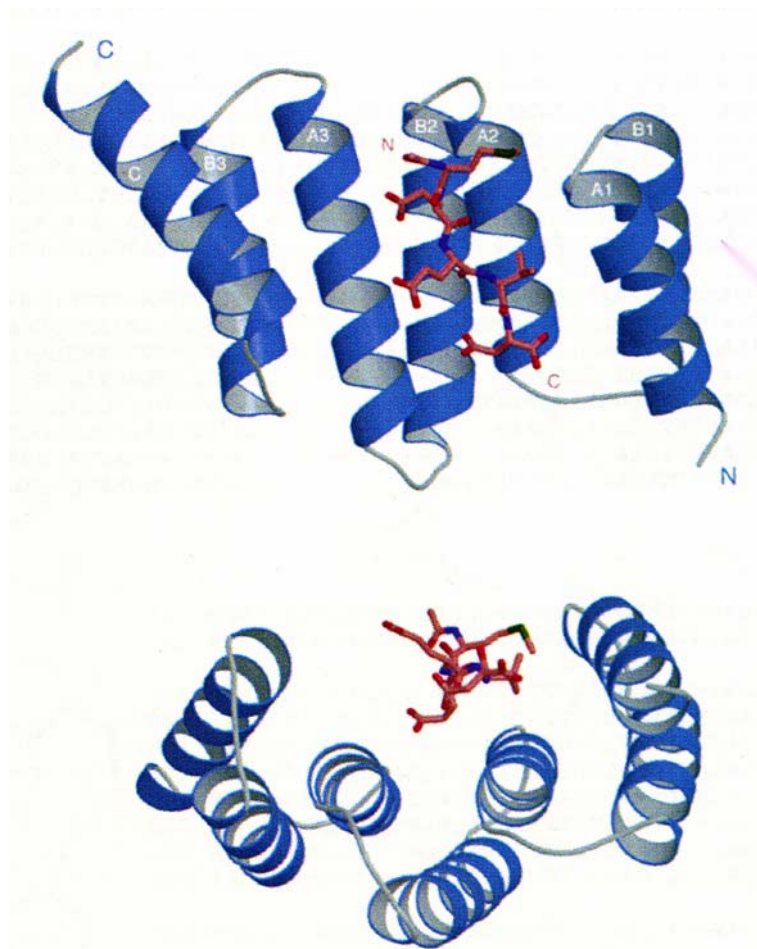


Abb. 1.6.2. Bänder-Darstellung der Bindung eines Hsp90-Peptids an die TPR2A-Domäne von Hop/p60. Entnommen aus Scheufler et al., (2000). Das Peptid ist in rot dargestellt und die TPR2A-Domäne ist blau. Ansicht von oben (obere Bildhälfte) und von der Seite (unterer Bildteil).

Offensichtlich konkurrieren alle drei großen Immunophiline um eine einzige Bindestelle an Hsp90 (Ratajczak und Carello, 1996), die sich in den C-terminalen 12 kDa befindet (Young et al., 1998). Ob die Stöchiometrie der Interaktion ein Immunophilin-Monomer pro Hsp90-Monomer oder Dimer ist, ist noch kontrovers (Rehberger et al., 1992; Segnitz und Gehring, 1995; Prodromou et al., 1999; Silverstein et al., 1999). Während vorwiegend auf chemischer Quervernetzung basierende Untersuchungen eher von der Interaktion eines Immunophilin-Monomers mit einem Hsp90-Dimer ausgehen (Rehberger et al., 1992; Segnitz und Gehring, 1995; Silverstein et al., 1999), deuten Untersuchungen mittels Isothermischer Titrationskalorimetrie an Hefe Hop und Cpr6 darauf hin, dass ein Hop oder Cpr6-Dimer pro Hsp90-Dimer bindet (Prodromou et al., 1999).

Die Wahl des Immunophilins, das im Hsp90 Komplex anwesend ist, hängt offenbar auch vom gebundenen Substratprotein. So wird FKBP51 zum Beispiel im reifen Progesteronrezeptor (PR)-Komplex und mehr noch im reifen Glukokortikoidrezeptor (GR)-Komplex sowohl Cyp40 als auch FKBP52 vorgezogen (Nair et al., 1997; Barent et al., 1998), nicht aber im Östrogen-Rezeptorkomplex (Barent et al., 1998). Der Glukokortikoidrezeptor (GR) bevorzugt außerdem FKBP52 gegenüber Cyp40 (Owens-Grillo et al., 1995).

Eine mögliche Rolle der Immunophiline als TPR-enthaltenden Co-Faktoren bei der Regulierung der Hsp90 ATPase wird außerdem diskutiert (Prodromou et al., 1999; siehe Abschnitt 1.5.).

Ob die PPIase-Aktivität oder die Bindungseigenschaften für Immunsuppressiva einen Einfluss auf den Steroidrezeptor-Multichaperon-Komplex ausüben, ist noch ungeklärt (Tai et al., 1992; Hutchison et al., 1993; Renoir et al., 1994; Tai et al., 1994; Renoir et al., 1995). Einerseits konnte gezeigt werden, dass sowohl CyclosporinA, als auch FK506 GR- und PR-vermittelte Genexpression in intakten Zellen steigert (Tai et al., 1994; Renoir et al., 1995). Andererseits weisen *in vitro* Untersuchungen daraufhin, dass weder CyclosporinA, noch FK506 die Hsp90-Assoziation mit den Rezeptoren beeinflussen (Hutchison et al., 1993).

Ähnlich wie Hsp90 selbst (Wiech et al., 1992) zeigen große Immunophiline *in vitro* Chaperon-Aktivität. Zusammen mit Trigger Faktor sind sie das erste Beispiel dafür, dass ein Protein sowohl PPIase-, als auch Chaperon-Aktivität besitzen kann. Kaninchen FKBP52 verhindert die thermische Aggregation des Modellsubstrates Citratsynthase (CS) *in vitro* (Bose et al., 1996), und humanes Cyp40 hält chemisch denaturierte β -Galactosidase in einem faltungskompetenten Zustand (Freeman et al., 1996). Auch für die beiden Hefe Homologe von Cyp40, Cpr6 und Cpr7, wurde im CS-Assay Chaperon-Aktivität nachgewiesen (Mayr et al., 2000). Das legt die Vermutung nahe, dass die Immunophiline im Hsp90-Komplex auch Kontakt zum nicht-nativen Protein haben.

Sowohl die Struktur der großen Immunophiline, als auch ihre Interaktion scheint in höheren Eukaryonten konserviert zu sein. So besitzen FKBP73 und FKBP77 aus Weizen auch PPIase-Aktivität und TPR-Regionen und Calmodulin-Bindedomänen (Blecher et al., 1996; Kurek et al., 1999). Außerdem interagieren sie mit Hsp90 und sind Teil eines Multi-Chaperon-Komplexes, der Glukokortikoidrezeptor assemblieren kann (Reddy et al., 1998).

1.7. Problemstellung

Trotz zahlreicher Studien ist bislang die Funktionsweise der Hsp90-Chaperonemaschinerie und insbesondere die Rolle, die den verschiedenen Partnerproteinen dabei zukommt, nicht geklärt.

Der Multichaperonkomplex ist sowohl in niederen (Hefe) als auch in höheren Eukaryonten (Tiere und Pflanzen) strukturell und funktionell konserviert. In allen Systemen beinhaltet der reife Komplex mehrere unterschiedliche Proteine aus der Klasse der großen Immunophilinen. In der Hefe sind das die Cyp40-Homologe Cpr6 und Cpr7 und in den meisten anderen Organismen FKBP51, FKBP52 und Cyp40. Es existieren also verschiedene reife Komplexe, die sich in dem gebundenen Immunophilin unterscheiden. Bei allen anderen bekannten Partnerproteinen findet sich nur ein Vertreter. Im Fall der Immunophilinen scheint die Inkorporation eines spezifischen Immunophilins zudem von der Art des gebundenen Substrats abzuhängen. Aufgrund dieser Situation stellt sich die Frage, welche Funktionen die verschiedenen Immunophilinen jeweils erfüllen.

Um Hinweise auf den Beitrag der Immunophilinen zur Funktion des Hsp90-Komplexes zu erhalten, sollten in der vorliegenden Arbeit die drei großen Immunophilinen aus Mensch bezüglich ihrer Struktur und Stabilität, insbesondere aber im Bezug auf ihre PPIase- und Chaperon-Aktivität und ihre Bindung an Hsp90 miteinander verglichen werden.

Da große Immunophilinen sowohl PPIase-, als auch Chaperon-Aktivität aufweisen, sollte des Weiteren der Struktur-Funktions-Zusammenhang innerhalb eines großen Immunophilins untersucht und die Bereiche im Protein identifiziert werden, die für die PPIase- und für die Chaperon-Aktivität verantwortlich sind. Dies geschah am Beispiel des am bisher besten untersuchten großen Immunophilins, FKBP52. Dazu wurden basierend auf „Hydrophobic Cluster Analysen“ Domänen von FKBP52 hergestellt. Nach ihrer Charakterisierung im Bezug auf Struktur und Stabilität, sollte sowohl ihre Aktivität als PPIase gegenüber Peptid- und Proteinsubstraten, als auch ihre Aktivität als Chaperon untersucht werden, um die Regionen von FKBP52 identifizieren zu können, die für die jeweiligen Funktionen verantwortlich sind.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

2.1.1. Chemikalien

Acrylamidlösung (38%, mit Bisacrylamid, 2%)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Agarose, ultra pure	Biozym (Oldendorf)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Sigma (St. Louis, USA)
Bacto Agar	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto Trypton	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bromphenolblau S	Serva (Heidelberg)
Complete Proteaseinhibitortabletten	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Coomassie-Brillant-Blue (R-250)	Serva (Heidelberg)
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce (Rockford, USA)
Cyclosporin A	Sigma (St. Louis, USA)
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
1,4- Dithiotreit (DTT)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
ECL-Westernblot-Detektionssystem	Amersham Buchler (Braunschweig)
Glutaraldehyd, pure (25% in Wasser)	Serva (Heidelberg)
L-Glutathion (oxidiert)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Glyzerin	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
Guanidiniumhydrochlorid, ultra pure	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol (Hamburg)
Kanamycin	Sigma (St. Louis, USA)
2-Mercaptoethanol, reinst	Serva (Heidelberg)
Nujol	Perkin Elmer (Überlingen)
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (TWEEN20)	Sigma (St. Louis, USA)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
Rapamycin	Sigma (St. Louis, USA)
Silbernitrat	Sigma (St. Louis, USA)

N,N,N',N'- Tetramethylendiamin (TEMED), reinst	Sigma (St. Louis, USA)
2, 2, 2- Trifluorethanol	Sigma (St. Louis, USA)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN (Meckenheim)

Weitere verwendete Chemikalien stammen von der Firma Merck (Darmstadt) und besitzen den Reinheitsgrad p.A., falls nicht anders vermerkt. Puffer und Lösungen wurden mit quartzbidestilliertem Wasser hergestellt, für Medien wurde Reinwasser verwendet. Der pH-Wert der Lösungen wurde unter Berücksichtigung des Temperaturkoeffizienten der entsprechenden Puffersubstanz bei der jeweiligen Temperatur eingestellt.

2.1.2. Proteine

Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Chymotrypsin aus Rinderpankreas	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Citratsynthase (CS), mitochondrial, aus Schweineherz	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Cyp40-Antikörper aus Kaninchen	Dr. J. Pineda-Antikörper-Service (Berlin)
FKBP51-Antikörper aus Maus	David Smith, Mayo Clinic (Arizona, USA)
FKBP52-Antikörper aus Maus	David Smith, Mayo Clinic (Arizona, USA)
HPLC-Eichproteine	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Molekulargewichtsstandard für SDS-Page (high Range und low Range)	Biorad Laboratories (Richmond, USA)
Pwo DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
T4-DNA Ligase	Promega (Madison, USA)
Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper-POD-Konjugat	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Ziegen-Anti-Maus-Antikörper-POD-Konjugat	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Gereinigtes humanes Cyp18 und FKBP12 wurden freundlicherweise von Gunter Fischer (Max-Planck Research Unit, Halle) zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Peptide

Succinyl- Ala- <u>Ala</u> -Pro-Phe- paranitroanilid	BACHEM Biochemica GmbH (Heidelberg)
Succinyl- Ala- <u>Leu</u> -Pro-Phe- paranitroanilid	BACHEM Biochemica GmbH (Heidelberg)

Das Peptid Hsp90C17 (IPPLEGDEDASRMEEVD) wurde von Prof. Dr. Susanne Modrow (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg) zur

Verfügung gestellt. Es war mit F_{moc}-geschützten Aminosäuren (Atherton et al., 1978) hergestellt und wie bereits beschrieben gereinigt worden (Knarr et al., 1995).

2.1.4. Bakterienstämme

BL21 [DE3] Codon plus	Stratagene (La Jolla, USA)
HB101	supE44 hsdS20(r _B ⁻ m _B ⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1
XL1-Blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1gyrA46 thi relA1 lac ⁻ F'[proAB ⁺ lacI ^q lacZ ΔM15 Tn10(tet ^r)]

2.1.5. Plasmide

pQE30	Qiagen (Hilden)
pGEX4T1	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
pU40H	T5-Expressionsvektor (Ampicillinresistenz) auf der Basis von pQE30 zur Expression von humanem Cyp40 (N-terminaler His-Tag)
ph51wt	T5-Expressionsvektor (Ampicillinresistenz) auf der Basis von pQE30 zur Expression von humanem FKBP51 (N-terminaler His-Tag)
pU52H	T5-Expressionsvektor (Ampicillinresistenz) auf der Basis von pQE30 zur Expression von humanem FKBP52 (N-terminaler His-Tag)
pHis59	T5-Expressionsvektor (Ampicillinresistenz) auf der Basis von pQE30 zur Expression von Kaninchen FKBP52 (N-terminaler His-Tag)
pH59-123	T5-Expressionsvektor (Ampicillinresistenz) auf der Basis von pQE30 zur Expression von Aminosäuren 1-400 von Kaninchen FKBP52 (N-terminaler His-Tag)
pH59-12	T5-Expressionsvektor (Ampicillinresistenz) auf der Basis von pQE30 zur Expression von Aminosäuren 1-264 von Kaninchen FKBP52 (N-terminaler His-Tag)
pH59-1	T5-Expressionsvektor (Ampicillinresistenz) auf der Basis von pQE30 zur Expression von Aminosäuren 1-148 von Kaninchen FKBP52 (N-terminaler His-Tag)
pGST-40	Expressionsvektor (Ampicillinresistenz) auf der Basis von pGEX4T1 zur Expression von humanem Cyp40 (N-terminaler GST-Tag)

2.1.6. PCR-Primer

Vektor	Primer	Sequenz
pQE30	5h40	5'-TCAT GGATCC ATGTCGCACCCGTCCC-3' <i>Bam HI</i>
pQE30	3h40	5'-ATGCA AAGCTT TTTACTAAGCAAACATTTTTGCATATACTG-3' <i>Hind III</i>
pQE30	5h51	5'-TCAT GGATCC ATGACTACTGATGAAGGTGCCAAGAACA <i>Bam HI</i> <u>ATGAAGAAAGCCCCAC</u> -3'
pQE30	3h51	5'-ATG CGTCGACTT ATCATACTGGCCCTCAGG-3' <i>Sal I</i>
pQE30	5h52	5'-AT CCGCATGC ATGACAGCCGAGGAGATGAA-3' <i>Sph I</i>
pQE30	3h52	5'-G TCGTCGACTT ACTATGCTTCTGTCTCCACCTGA-3' <i>Sal I</i>
pQE30	Hisoppi5	5'-CT CCGCATGC GGAATCATCCGCAGAATACG-3' <i>Sph I</i>
pQE30	Hisoppi3	5'-G TCGTCGACTT ACTATGCTTCTGTCTCCACCGT -3' <i>Sal I</i>
pQE30	Hisp59-5	5'-CT CCGCATGC ATGACCGCCGAGGAGATG -3' <i>Sph I</i>
pQE30	Hisp123-3	5'-G TCGTCGACTT ACTAGATCCGCTGCTGGCA -3' <i>Sal I</i>
pQE30	Hisp12-3	5'-G TCGTCGACTT ACTACTCCGAGCTCATCTCCA -3' <i>Sal I</i>
pQE30	Hisp591-3	5'-G TCGTCGACTT ACTAGCCGTCTTCGTCGTCTGTC -3' <i>Sal I</i>
pGEX4T1	40gst-5	5'-CTCCGA ATTC ATGTCGCACCCGTCCC-3' <i>Eco RI</i>
pGEX4T1	40gst-3	5'-CTCC GCGGCCGCTT ACTAAGCAAACATTTTTGCATATA <u>CTG</u> -3' <i>Not I</i>

Tabelle 2.1.6. Für die Klonierungen verwendete Primer. Die Basen, die mit der jeweiligen zu amplifizierenden Sequenz Basenpaarungen eingehen, sind unterstrichen. Die Schnittstelle für die jeweilige Restriktionsendonuklease ist fett gedruckt. Die dazugehörige Restriktionsendonuklease ist in kursiver Schrift angegeben.

TAE-Puffer (50x): Tris/Acetat 2M
EDTA 50mM
pH 8,0, mit Eisessig eingestellt

2.1.9.2. Puffer für präparative und proteinchemische Methoden

Aufbewahrungspuffer: 50 mM Tris, pH 7,5 oder 8,0
2 mM EDTA

Laemmli (5x) 5 % SDS
0,1 M Tris/HCl
0,001 % Bromphenolblau
pH 6,8

2.1.10. Standard-Chromatographiematerialien und –Säulen

Glutathion-Sepharose-Material	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Chelating-Sepharose-Material	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Ni-NTA-Superflow-Material	Qiagen (Hilden)
Hydroxyapatit-Säule CHT5-I	Biorad Laboratories (Richmond, USA)
Resource Q-Säule (6ml)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 75 pg -Säule	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 200 pg-Säule	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 75 HR-Säule	Pharmacia (Uppsala, Schweden)

2.1.11. Sonstiges Material

Amicon-Ultrafiltrationsmembranen	Amicon (Lexington, USA)
Centricon - Mikrokonzentratoren	Amicon (Lexington, USA)
Dialyseschläuche Spectra/Por (Ausschlussgröße 6-8 kDa)	Spectrum (Houston, USA)
Filterpapier	Whatmann (Maidstone, England)
Greiner- Röhrchen aus Polypropylen	Greiner & Söhne (Nürtingen)
Immobilon-P-Membran	Millipore (Bedford, USA)
Kulturröhrchen (17x 100mm)	Elkay Laboratory Products (UK)
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schüll (Dassel)

Petrischalen aus Polystyrol, 94 mm	Schleicher & Schüll (Dassel)
pH-Indikatorstreifen	Merck (Darmstadt)
Röntgenfilme X-OMAT™ AR	Eastman Kodak Company (Rochester, USA)
Sterilfilter 0,2 µm	Renner (Dannstadt)

2.1.12. Geräte

Absorptionsspektrophotometer:

NovaspecII	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Biochrom 4060 mit thermostatisierbarem Küvettenhalter	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
V-550 UV-Vis Spektrophotometer mit thermostatisierbarem Küvettenhalter	Jasco (Groß-Umstadt)

Circular Dichroismus-Spektropolarimeter

Jasco J-715 Spectropolarimeter mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit

Spektrofluorometer

MPF 44A mit thermostatisierbarem Küvettenhalter	Perkin Elmer (Überlingen)
FluoroMax1 mit thermostatisierbarem Küvettenhalter	Jobin Yvon (Edison, USA)
Spex FluoroMax2 mit thermostatisierbarem Küvettenhalter	Jobin Yvon (Edison, USA)

Chromatographieeinheiten

FPLC System, GradiFrac System, HiLoad System von Pharmacia (Uppsala, Schweden)

HPLC-System

Pumpe PU-1580, Fluoreszenzdetektor FP-1520, Degaser Gastorr 153 von Jasco (Groß-Umstadt)

Gelelektrophorese- und Blotapparaturen

LKB 2050 Midget-Gelelektrophoreseeinheit	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Fast Blot Apparat B44	Biometra (Göttingen)

Spannungsgeräte

Pharmacia EPS 301, 600, 1001 und 3500	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
LKB Spannungsgerät 2301 Macro Drive	Pharmacia (Uppsala, Schweden)

Waagen

Analysenwaage BP1215	Sartorius (Göttingen)
Halbmikronwaage L160 D	Sartorius (Göttingen)
Halbmikronwaage BL310	Sartorius (Göttingen)

Zentrifugen

Avanti J-25 mit JA-25.50 und JA-10 Rotoren	Beckmann (Palo Alto, USA)
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Köln)
Zentrifuge Universal 32R	Hettich (Tuttlingen)
Centricon T-42K Kühlzentrifuge	Kontron (Schlieren)

Sonstige Geräte

Amicon Ultrafiltrationszelle	Amicon (Danvers, USA)
Varioklav Dampfsterilisator 500 E	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
Beckmann 89 60 pH-Meter	Beckmann (Palo Alto, USA)
pH-Meter MultiCal ^R pH538	WTW (Weilheim)
Brutschrank	Memmert (Schwabach)
Biacore X Gerät mit CM-Chip	Biacore (Uppsala, Schweden)
Digitalthermometer mit Thermofühler	Keithly Instruments (Cleveland, USA)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Geldokumentationssystem BiodocII	Biometra (Göttingen)
Kryostaten: Haake F3/K und D8/GH	Haake (Karlsruhe)
Magnetrührer Heidolph MR2000	Heidolph (Kehlheim)
Metallblockthermostat ReactiTherm	Pierce (Rockford, USA)
Refraktometer	Leica (Solms)
Ultraschallgerät: Branson Sonifier B-12	Branson Sonic Power Co. (Danbury, USA)
Ultraschallgerät: Bandelin Sonopuls GM2200	Bandelin Electronics (Berlin)
Umluftinkubator	Mytron (Heiligenstadt)
VP-ITC-Mikrocalorimeter System	Microcal Inc. (MA,USA)

2.1.13. Computerprogramme

Borwin Chromatographie Software	Jasco (Groß-Umstadt)
PrimerDesign Version 1.02	Scientific & Educational Software, 1990
Sigma Plot 4.0	SPSS Inc. (Chicago, USA)

Expasy Tools	www.expasy.ch/tools
Origin Software (für ITC)	MicroCal. Inc. (MA, USA)
CDNN Spectra Deconvolution Software 2.1	http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung und Konservierung von *E. coli* Stämmen (Sambrook et al., 1989)

Zur Anzucht der *E. coli*-Stämme wurde eine LB_{amp}- oder LB_{amp/kana}-Platte mit Glycerinkulturen oder Einzelkulturen angeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für Flüssigkulturen wurde mit 100 µg/ml Ampicillin beziehungsweise mit 100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Kanamycin versetztes Medium mit einer Einzelkolonie oder aus einer Glycerinkultur angeimpft und im Erlenmeyerkolben bei 37°C in einem Kulturschüttler (220 U/min) bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert. Die Zelldichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht circa 10⁹ *E. coli* Zellen pro ml Kultur. Zur Konservierung von *E. coli* Kulturen über kürzere Zeiträume wurden diese auf LB-Agar-Platten bei 4°C aufbewahrt. Zur Aufbewahrung von Bakterienkulturen über längere Zeiträume wurden Glycerinkulturen folgendermaßen hergestellt: 2 ml steriles Glycerin (50%) wurden mit 1 ml Bakterienkultur gemischt (Endkonzentration: 15% Glycerin) und bei -70°C gelagert. Alternativ wurden Bakterienkulturen in 55% Glycerin bei -20°C gelagert.

2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der High PureTM Plasmid Isolation Kit von Roche Diagnostics GmbH verwendet.

2.2.3. PCR-Amplifikation (Mullis und Faloona, 1987)

Um schnell und gezielt bestimmte DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurde die Polymerase Chain Reaction (PCR) verwendet. Die dafür benötigten Primer (siehe Abschnitt 2.1.6) wurden so konstruiert, dass sie gleiche Schmelztemperaturen besaßen und keine komplementären Bereiche enthielten. Das Computerprogramm PrimerDesign (Version 1.02;

Scientific & Educational Software, 1990) wurde zur Berechnung der jeweiligen Schmelztemperatur benutzt.

Die PCR-Amplifikation selbst wurde in ultradünnen 0,5 ml PCR-Tubes (Biozym) mit folgendem Standardansatz durchgeführt:

Template-DNA	10-20 ng
Primer (100 pmol/μl)	jeweils 100 pmol
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,2 mM
Polymerase	2,5 Units
MgCl ₂	1,5 bzw. 2,5 mM
10x Reaktionspuffer und H ₂ O	ad 100μl

Die Amplifikationsreaktionen wurden mit einem *Hot Start* begonnen, indem der Ansatz schon vor Zugabe der Polymerase auf 95°C aufgeheizt wurde. Das verminderte die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten und führte zu einer höheren Ausbeute.

Die PCR-Amplifikationen wurden in der Regel wie folgt durchgeführt:

Denaturierung:	95°C	5 min
<i>Hot Start</i> :	Zugabe der Polymerase	
Denaturierung:	95°C	30 sec
Annealing:	60°C	45 sec
Synthese:	72°C	2 min

Dieser Zyklus wurde 35 mal durchlaufen. Daraufhin wurde der Ansatz noch 4 min bei 72°C belassen, damit die Polymerase bereits begonnene Stränge vollständig synthetisieren konnte.

2.2.4. Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.4.1. Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Für analytische und präparative Zwecke wurden in der Regel 2-3 Units der jeweiligen Restriktionsendonuklease pro 500 ng DNA eingesetzt und der Ansatz 1-2 Stunden lange bei einer Temperatur von 37°C verdaut. Hierbei wurden die entsprechenden von der Herstellerfirma mitgelieferten 10x Reaktionspuffer verwendet. Anschließend wurden die Ansätze auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation des bereits geschnittenen Vektors zu vermeiden, wurde der Restriktionsansatz nach erfolgter Restriktionshydrolyse mit alkalischer Phosphatase (Shrimp alkaline phosphatase, SAP) behandelt. Dieses Enzym spaltet die 5'-Phosphatgruppen ab. Dem Reaktionsansatz wurde pro μg Vektor-DNA 0,1 Einheit an alkalischer Phosphatase und 0,1 Ansatzvolumen 10x Phosphatase-Puffer zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde nochmals Phosphatase hinzugefügt und weitere 30 min dephosphoryliert. Durch Erhitzen auf 70°C und Auftragen auf ein Agarosegel wurde die Reaktion gestoppt. Der geschnittene Vektor wurde mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel extrahiert und gereinigt.

2.2.4.3. Ligation von DNA-Enden

3'-OH-Enden und 5'-Phosphatgruppen von DNA können mittels DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden werden.

Der Ansatz (Volumen 10-20 μl) für die Ligation enthielt in der Regel 300 ng Vektor-DNA, einen drei- bis fünffachen molaren Überschuß an geschnittenem DNA-Fragment und 1-2 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C oder bei 20°C innerhalb von 4 Stunden.

2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese von DNA (Sambrook et al., 1989)

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 1%igen Agarosegelen. Als Laufpuffer diente TAE (siehe 2.1.9.1.) und die Gele enthielten 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid. Die Proben wurden mit 1/10 ihres Volumens an DNA-Auftragspuffer (siehe 2.1.9.1.) versetzt und aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-100 V. Nach dem Lauf wurde die DNA mittels UV-Schirm sichtbar gemacht und das Ergebnis im Geldokumentationssystem fotografiert. Die Größe und Menge der aufgetragenen DNA wurde anhand des mit aufgetragenen λ/BstEII -Standards abgeschätzt.

2.2.6. Transformation von *E. coli*- Zellen

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen wurde die Methode nach Hanahan (1983, 1985) verwendet. Sie liefert in der Regel Ausbeuten in der Größenordnung von 10^7 - 10^8 Transformanden pro μg Plasmid-DNA. Ein Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass die kompetenten Zellen bei -70°C aufbewahrt werden können.

Die zu transformierende DNA wurde mit 100 µl kompetenten Zellen vermischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschritt (42°C) von einer Minute Dauer. Danach wurde die Mischung für fünf Minuten auf Eis inkubiert, bevor 1 ml LB₀-Medium zugegeben wurde. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C mit langsamen Schütteln wurde der Ansatz abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im verbleibenden Restmedium gelöst und auf die jeweiligen Selektionsplatten ausplattiert. Sodann wurden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.3. Präparative Methoden

2.3.1. Proteinexpression und Ernte

Die cDNAs für humanes FKBP51, FKBP52 und Cyp40 sowie für die Fragmente von Kaninchen FKBP52 wurden in das T5-Expressionsplasmid pQE30 subkloniert, das die Expression von Proteinen mit N-terminalem Histidin-Tag mit hohen Ausbeuten erlaubt. Eine im FKBP51-Original-Klon vorhandene Mutation wurde mittels QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) rückgängig gemacht. Zusätzlich wurde die cDNA von Cyp40 in das pGEX4T1-Plasmid subkloniert, um Expression mit N-terminalem GST-Tag zu erreichen. pQE30 Plasmide wurden zur Expression in den *E. coli* Stamm HB101/pUBS transformiert, wohingegen das pGEX4T1 Plasmid in den BL21 [DE3] Codon plus Stamm transformiert wurde. Zur Expression der pQE30 Konstrukte wurde LB Medium, das 100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Kanamycin enthielt, mit der jeweiligen stationären Übernachtskultur angeimpft. LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurde mit der Übernachtskultur von GST-Cyp40 angeimpft. Für beide Typen von Plasmiden wuchsen die Kulturen bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0.4. Dann wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und den Kulturen erlaubt, bei 26°C für 4-6 Stunden zu wachsen.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 g für 15 Minuten bei 4°C geerntet und durch halbstündige Inkubation mit 1 mg/ml Lysozym auf Eis und anschließende Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch erneute Zentrifugation bei 40000 g abgetrennt und der Überstand auf die erste Säule aufgetragen.

2.3.2. Proteinreinigung

Humanes Hsp90 wurden aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen gereinigt, die von Drs Dean Edwards und Kurt Christensen (Tissue Culture Core Facilities am Cancer Center der University of Colorado) zur Verfügung gestellt wurden. Das Protein wurde aus den Zellen nach bereits beschriebener Methode isoliert und gereinigt (Buchner et al., 1998a).

Das Plasmid für die Expression der S54G/P55N-Variante von RNase T₁ (RCM-T1) wurde freundlicherweise von F.X. Schmid (Universität Bayreuth) zur Verfügung gestellt. RCM-T1 wurde wie in der Literatur beschrieben gereinigt und modifiziert (Mayr und Schmid, 1993; Mücke und Schmid, 1995a, 1995b).

Für die Reinigung von Cyp40, FKBP51, FKBP52 und FKBP52-Fragmenten wurden folgende Arten von Chromatographie verwendet. Die Reinigungen sind anhand eines Flussdiagramms im Ergebnisteil näher ausgeführt.

2.3.2.1. Ionenaustauscherchromatographie

Bei der Ionenaustauscherchromatographie beruht die Trennung von Proteinen auf den Wechselwirkungen geladener Proteinseitenketten mit den entgegengesetzt geladenen Ketten des Säulenmaterials. Diese Wechselwirkungen können durch Erhöhung der Ionenkonzentration im Elutionspuffer aufgehoben werden. Als Ionenaustauschersäule wurde in der vorliegenden Arbeit die kommerzielle Anionenaustauschersäule Resource Q (Pharmacia) verwendet. Die Laufbedingungen sind im Ergebnisteil näher beschrieben.

2.3.2.2. Affinitätschromatographie

Das Trennprinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der reversiblen und selektiven Bindung von Proteinen an einen Liganden, der kovalent an die jeweilige Gelmatrix gebunden ist. Zugabe des betreffenden Liganden im Puffer erlaubt die Elution des Proteins. In der vorliegenden Arbeit wurden als Affinitätsmaterialien Ni-NTA-Superflow, mit Nickel beladene Chelating- Sepharose und GST-Sepharose verwendet. Die bei der Reinigung benutzten Puffer und Laufbedingungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

2.3.2.3. Präparative Gelfiltration

Die Gelfiltration trennt die Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dies wird dadurch erreicht, dass kleine Moleküle in die Poren des Gelmaterials eindiffundieren können und somit langsamer durch die Säule wandern als große Moleküle, die nicht in die Gelmatrix einwandern können. Standardmäßig wurde eine Superdex 75 oder 200 pg als letzter Reinigungsschritt verwendet. Die verwendeten Puffer und Bedingungen sind näher im Ergebnisteil aufgeführt.

2.3.3. Aufkonzentrierung und Dialyse

Zur Aufkonzentrierung der gereinigten Proteine wurden bei kleinen Mengen (bis zu 5 ml) Centricon Mikrokonzentratoren verwendet. Durch Zentrifugation bei 6000 U/min wurde die Proteinlösung gegen die Filtermembran gepresst, wobei Moleküle größer als die Ausschlussgröße (3, 10 oder 30 kDa) zurückgehalten wurden.

Für größere Mengen (bis zu 400 ml) wurde das Amiconsystem verwendet, das nach demselben Prinzip funktioniert, bei dem aber der Druck, mit dem die Proteinlösung gegen eine Membran gepresst wird, nicht durch Zentrifugation, sondern durch den Gasdruck mit Stickstoff erreicht wird.

Dialyse der Proteinlösungen erfolgte in der Regel gegen ein tausendfaches Volumen des gewünschten Puffers.

2.4. Proteinchemische Methoden

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

Im SDS-PAGE wandern Proteine entsprechend des Logarithmus ihres Molekulargewichts unterschiedlich schnell. Das im Auftragspuffer zugegebene SDS, das im Verhältnis 1:1.4 (SDS:Aminosäure) gebunden wird, verleiht dem Protein eine negative Überschussladung. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern die Proteine in Richtung Anode. Sie können dann anhand verschiedener Färbemethoden (siehe 2.4.2.) sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 10, 12,5 und 15%ige Polyacrylamidgele mit Trenngel und Sammelgel (1.5%ig) verwendet (modifizierte Methode nach Fling und Gregerson, 1986). Zur Auftrennung wurde ein elektrisches Feld mit der Stromstärke von 25 mA pro Gel angelegt. Anwendung fanden die SDS-Gele vor allem zur Kontrolle des Reinigungserfolges.

Die Lösung der Proteine erfolgt im 5 x Auftragspuffer (5 x [5% SDS; 0,1 M Tris/HCl; pH 6,8; 0,001% Bromphenolblau) (Laemmli, 1970). Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde 5% β -Mercaptoethanol zugegeben. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Ansätze für fünf Minuten bei 95°C inkubiert, um vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen.

2.4.2 Färbemethoden

Färbung nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in den drei Färbelösungen (A-C) nacheinander jeweils 5 min auf 100°C erhitzt. Die unspezifische Färbung der Gelmatrix wurde daraufhin durch Entfärben in 10% Essigsäure wieder rückgängig gemacht. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 0,03-0,05 μ g des betreffenden Proteins.

Lösung A	25% v/v Isopropanol; 10% v/v Essigsäure, 0,05% w/v Coomassie Blau R
Lösung B	10% v/v Isopropanol; 10% v/v Essigsäure, 0,005% w/v Coomassie Blau R
Lösung C	10% v/v Essigsäure, 0,002% w/v Coomassie Blau R

Silberfärbung (Heukeshofen und Dernick, 1988)

Die Silberfärbung erfolgte mit der Methode von Heukeshofen und Dernick (1988), deren Nachweisgrenze bei 0,01-0,02 µg der betreffenden Proteinmenge liegt.

2.4.3. Immunoblotting

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, die negativ geladen sind, werden beim Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie später immunospezifisch nachgewiesen werden (Towbin et al., 1979). Das Blotting erfolgte in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Khyse-Anderson, 1984) bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 90 Minuten. Die mit Protein beladene Membran wurde daraufhin bei Raumtemperatur wie folgt behandelt:

Nicht-spezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mit 5% Magermilchpulver in PBS-Tween (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, 1% [v/v] Tween 20) für drei mal zehn Minuten abgesättigt. Danach wurde die Membran für 90 Minuten mit dem primären Antikörper inkubiert und drei mal zehn Minuten mit PBS (0,1% Tween) gewaschen. Sodann erfolgte Inkubation mit dem 1:1000 in PBS-Tween verdünntem IgG-POD-Konjugat für 45 Minuten. Schließlich wurde zur Entfernung von nicht gebundenem POD-Konjugat wieder drei Mal zehn Minuten in PBS-Tween (0,1%) und anschließend zehn Minuten in PBS gewaschen.

Der Nachweis der Proteinbanden auf der Membran wurde mittels des ECL-Systems (Amersham Buchler, Braunschweig) entsprechend der Vorschriften des Herstellers geführt.

2.4.4. Protein-Sequenzblot

Das vorgereinigte Protein wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Die Immobilon-P-Membran wurde über Nacht in 100% Methanol und anschließend in Boratpuffer inkubiert. Die Blotbedingungen sind analog denen für Immunoblotting (siehe 2.4.3.). Die geblottete Membran wurde etwa 10 min in der Färbelösung geschwenkt und danach entfärbt. Dann wurde der Blot getrocknet und die jeweilige Proteinbande ausgeschnitten und bei -20°C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte im Labor von PD Dr.

Deutzmann nach der Methode des Edman-Abbaus (Edman und Berg, 1967). Für den Sequenzblot wurden nur Reagenzien des Reinheitsgrades p.A. benutzt.

Boratpuffer: 50 mM Natriumborat, 10% Methanol, pH 9,0

Färbelösung: 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% Methanol

Entfärber: 30% Methanol, 10% Essigsäure

2.4.5. Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde die Färbelösung Coomassie Brillant Blue G250 verwendet. Die Methode beruht auf einer Farbstoffbindung an die Proteine, was zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (rot-violett) nach 595 nm (blau) führt, die mittels Photometer quantifiziert werden kann. Als Standard wurde eine Eichgerade mit verschiedenen BSA- Konzentrationen benutzt. Vor der Verwendung wurde die Färbelösung (Coomassie Protein Assay Reagent) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Diese Methode wurde für ungenauere Konzentrationabschätzungen verwendet.

2.5. Spektroskopische Methoden

2.5.1. UV-Vis-Spektroskopie

Bei der UV-Vis-Spektroskopie wird die Absorption sowohl durch Seitenketten von Aminosäuren und prosthetische Gruppen als auch durch die Peptidbindung selbst verursacht. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin absorbieren besonders im Bereich von 230 bis 300 nm sehr intensiv, wobei Tryptophan und Tyrosin den weitaus größten Beitrag liefern. Das Absorptionsmaximum vom Tryptophan liegt bei 280 nm, während Tyrosin bei 274 nm maximal absorbiert (Schmid, 1989).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden UV-Vis-Spektren im Wellenlängenbereich von 240 nm bis 350 nm aufgenommen. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten konnte durch das Lambert- Beersche Gesetz die Konzentration ermittelt werden:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A: Absorption bei 280 nm

ε : Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{280 \text{ nm}, 0.1\%}$ ($\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)

c: Proteinkonzentration (M)

d: Schichtdicke der Küvette (cm)

Die hierzu für die jeweiligen Proteine benutzten Extinktionskoeffizienten für eine 1 mg/ml Lösung in einer Küvette mit der Schichtdicke 1 cm bei 280 nm sind nach Gill und von Hippel (1989) bestimmt und in Tabelle 2.5.1. aufgeführt.

Protein	Extinktionskoeffizient
Cyp40	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.659$
GST-Cyp40	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.992$
FKBP51	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.723$
FKBP52	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.824$
FKBP52-1	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.860$
FKBP52-12	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.925$
FKBP52-123	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.903$
FKBP52-234	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.758$
Hsp90	$\epsilon_{280 \text{ nm}; 0.1\%} = 0.643$

Tabelle 2.5.1. Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine. Die Werte wurden anhand des ProtParam Tools (siehe Abschnitt 2.1.13) basierend auf der Methode von Gill und von Hippel (1989) ermittelt.

2.5.2. Fluoreszenzspektroskopie

Durch Absorption von Lichtquanten (Anregungsenergie) werden Elektronen auf ein energetisch höheres Orbital übertragen. Bei ihrer spontanen Rückkehr aus diesem höheren Orbital in den energieärmeren Zustand kommt es zur Emission von Lichtquanten. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Dabei ist die Wellenlänge des emittierten Lichts aufgrund der Stoke'schen Verschiebung größer als die des Anregungslichts.

Wegen ihres delokalisierten p-Elektronensystems besitzen aromatische Aminosäuren in Proteinen eine „intrinsische Fluoreszenz“. Dabei betragen die relativen Empfindlichkeiten von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin 1100: 200: 8 (Schmid, 1989).

Da Tryptophan Lichtquanten am stärksten absorbiert und zusätzlich durch von Tyrosinen kommende Energieübertragung angeregt werden kann (Schmid, 1989; Cantor und Schimmel, 1980), zeigt Tryptophan die größte Fluoreszenz. Denaturierung oder andere Änderungen der Proteinkonformation resultieren oft in einer starken Emissionsänderung. Bei Tyrosinen ändert sich dabei lediglich die Signalintensität, wohingegen sich bei Tryptophanen auch das Intensitätsmaximum meist in den langwelligeren Bereich um 350 nm herum verschiebt.

Fluoreszenzspektren wurden in einem Spex FluoroMax2 Spektrofluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml

aufgenommen und von 295 nm bis 400 nm gemessen. Die Spaltenbreiten betragen 2 nm für die Anregung und 7 nm für die Emission.

2.5.3. Circulardichroismus

Zur Messung der optischen Aktivität von Molekülen mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen (optisch aktive Moleküle) in Lösung bedient man sich der Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie. Chromophore eines Proteins, die Teil einer asymmetrischen Struktur sind, absorbieren und verzögern die beiden circular polarisierten Komponenten des Lichtes beim Durchtritt durch die Lösung unterschiedlich stark. Die verschiedenen Intensitäten der daraus resultierenden Lichtwellen können mit Hilfe eines Photomultipliers gemessen werden. Je nach Wellenlänge des eingestellten Lichts unterscheidet man zwei spektrale Bereiche: Fern- und Nah-UV-CD.

Sowohl bei Fern- als auch bei Nah-UV-CD werden die gemessenen Signale als Elliptizität $[\Theta]$ registriert. Hieraus errechnet sich die molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure des jeweiligen Proteins mittels folgender Formel (Schmid, 1989):

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A}$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$	Molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)
Θ	gemessene Elliptizität (deg)
M_r	Molekulargewicht
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
d	Schichtdicke (cm)
N_A	Anzahl der Aminosäuren

Der Faktor 100 im Zähler entspringt der Umwandlung der molaren Konzentration in dmol/cm^3 -Einheiten.

Fern-UV-CD

Im Fern-UV-CD von 170 bis 250 nm (Amid-Region) verursacht vor allem die Konformation der Polypeptidkette, also α -Helices und β -Faltblätter, ein charakteristisches Spektrum. So erzeugen α -Helices ein Doppelminimum bei 208 nm und 222 nm, wohingegen für β -Faltblätter nur ein definiertes Minimum bei 218 nm typisch ist. Rückschlüsse auf die Zusammensetzung

der Proteine bezüglich der einzelnen Sekundärstrukturelemente lassen sich aus der Größe der einzelnen Signale ziehen.

Fern-UV-CD-Messungen wurden in einen J-715 Spektropolarimeter mit einer PTC343 Peltiereinheit (Jasco, Tokyo, Japan) aufgenommen. Nach Dialyse des jeweiligen Proteins über Nacht in 40 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, wurden Spektren von 250 nm bis 197 nm bei einer konstanten Temperatur von 20°C in 0,1 cm Quartzküvetten aufgenommen. Alle Spektren waren Basislinien korrigiert und die Elliptizitäten wurden für einen mittlere Restmasse von 112 berechnet.

Der α -Helix Gehalt der jeweiligen Immunophilinspektren wurde für grobe Abschätzungen gemäß folgender Gleichung berechnet (Forood et al., 1993):

$$\text{Gehalt}(\alpha - \text{helix}) = \frac{\Theta_{MRW222}}{-40000 \cdot \left[1 - \left(\frac{2,5}{n} \right) \right]}$$

wobei Θ_{MRW222} die Elliptizität bei 222 nm und n die Anzahl der Aminosäuren des jeweiligen Proteins ist.

Eine genauere Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts erfolgte mittels der CDNN Spektra Dekonvolutionssoftware 2.1 (siehe 2.1.13).

Nah-UV-CD

Im Nah-UV-CD-Bereich von 250 bis 350 nm erzeugen die aromatischen Aminosäuren ein Signal. Damit können Änderungen in der Tertiärstruktur beobachtet werden. Bei denaturierten Proteinen tritt in dieser Region kein Signal auf, da dann die Umgebung der Aromaten nicht mehr asymmetrisch ist.

Im Nah-UV-Bereich (350 nm bis 250 nm) wurde das Spektrum des nativen Proteins im Lagerungspuffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,5) in einer Küvette mit der Schichtdicke 0,5 cm aufgenommen und anschließend pufferkorrigiert. Dabei betrug die Proteinkonzentration 0,6 mg/ml.

2.6. Stabilitätsmessungen

2.6.1. Chemische Denaturierung und Renaturierung

Zur chemischen Denaturierung der großen Immunophiline wurde Guanidinhydrochlorid (GdmCl) verwendet. Diese chaotrope Substanz bewirkt, je nach Stabilität des Proteins und

Konzentration des denaturierenden Agens, die Entfaltung des Proteins. Eine Proteinstammlösung wurde in verschiedene Konzentrationen von GdmCl (in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) verdünnt (Proteinendkonzentration: 5 µg/ml). Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 20°C wurde die Denaturierung fluoreszenzspektroskopisch (siehe Abschnitt 2.5.2.) untersucht. Die genaue Guanidiniumkonzentration in den jeweiligen Ansätzen wurde später anhand refraktometrisch ermittelter Daten nach folgender Formel berechnet (Schmid, 1989).

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot (\Delta N) + 38,68 \cdot (\Delta N)^2 - 91,6 \cdot (\Delta N)^3$$

ΔN : Differenz der Brechungsindizes mit und ohne Guanidin

Für die Renaturierungsmessungen wurde das Protein bei Raumtemperatur für 4 Stunden in 4 M GdmCl denaturiert, um dann in die verschiedenen GdmCl-Konzentrationen der einzelnen Renaturierungsansätze verdünnt zu werden. Puffer und Endkonzentration an Immunophilin waren dieselbe wie bei den Denaturierungsübergängen.

Da die Übergänge der chemischen Denaturierung reversibel waren, konnten sie mithilfe folgender Formel auf Stabilität und Kooperativität ausgewertet werden:

$$f = y_{0N} + mN \cdot x - \frac{y_{0N} + mN \cdot x - y_{0U} - mU \cdot x}{1 + e^{\frac{\Delta G_{0\text{stab}} + m \cdot x}{RT}}}$$

x	Konzentration des Denaturierungsmittels
m	Lineare Abhängigkeit (Kooperativität) von ΔG_{stab} von der GdmCl-Konzentration
mN, mU	Lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz des denaturierten und des nativen Proteins von der GdmCl-Konzentration
f	Fluoreszenzintensität
y_{0N} , y_{0U}	Spezifische Fluoreszenz des denaturierten und des nativen Proteins bei 0 M GdmCl
$\Delta G_{0\text{stab}}$	Freie Stabilisierungsenergie bei 0 M GdmCl

2.6.2. Thermische Denaturierung

Zur Analyse der thermischen Stabilität wurde das CD Signal von Cyp18, FKBP51, FKBP52, Cyp40 und den FKBP52-Fragmenten FKBP52-234 und FKBP52-123 bei 222 nm, das Signal von FKBP12 bei 206 nm und das Signal von FKBP52-1 und FKBP52-12 bei 215 nm über den Temperaturbereich von 20°C bis 80°C verfolgt. Die Heizrate betrug 1°C/Minute und die Proteinkonzentration war 0,25 mg/ml.

2.7. Messungen zum Oligomerisationszustand

2.7.1. Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltration wurde benutzt, um die Quartärstruktur der drei großen Immunophilinen zu bestimmen. Die Messungen wurden bei 20°C in 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 durchgeführt. Es wurden jeweils 100 µl einer 2 µM Proteinlösung auf eine Superdex 75 HR Säule aufgebracht. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und die Peaks wurden mittels Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 330 nm aufgezeichnet. Für die Ermittlung des Molekulargewichts anhand der jeweiligen Retentionszeiten wurde eine Eichgerade aus folgenden Proteinen benutzt (Tabelle 2.7.1.)

Eichprotein	Molekulargewicht
Aldolase	158 kDa
Rinder Serumalbumin	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Chymotrypsinogen A	25 kDa
RNase A	13.7 kDa

Tabelle 2.7.1. Eichproteine für die Oligomerisierungsstudien mittels HPLC. Die benutzten Proteine und ihr jeweiliges Molekulargewicht sind aufgelistet.

2.7.2. Analytische Ultrazentrifugation

Zusätzlich wurde der Isomerisationszustand der großen Immunophilinen mittels analytischer Ultrazentrifugation ermittelt. Dazu wurde ein Gleichgewichtslauf mit 16000 U/min in einer Beckman XL-A Zentrifuge mit Ti60-Rotor durchgeführt. Die Experimentdauer war 24 Stunden bei einer Temperatur von 10°C und die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg/ml. Die Detektion erfolgte sowohl über Interferenz als auch über UV-Detektion bei 280 nm. Die Auswertung erfolgte mittels eines Fits für eine Spezies.

2.8. Protein-Protein-Interaktionsstudien

2.8.1. BiAcore: Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

Um die Interaktion zwischen den großen humanen Immunophilinen und humanem Hsp90 zu untersuchen, wurde Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (Surface plasmon

resonance) in einem BIAcore X Gerät gemessen (BIAcore, Uppsala, Sweden). Alle Messungen wurden in 40 mM Hepes, pH 8,0 bei einer Temperatur von 20°C und einer Flussrate von 20 µl/min durchgeführt.

Hsp90 wurde über Amide an einen CM5 Sensorchip gekoppelt. Dazu wurde der Chip mit 100 mM NHS (N-hydroxysuccinimid) und 400 mM EDC (1-Ethyl-3-(dimethyl-amino-propyl) carbodiimid-HCl) aktiviert. Hsp90 wurde auf 50 µg/ml in Kaliumphosphatpuffer, pH 3,0 verdünnt und auf dem Chip immobilisiert bis 1000 Resonanzeinheiten (response units = RU) erreicht waren, was einer Proteinmenge von 1 ng Protein per mm² entspricht. Daraufhin wurde der Chip mit Ethanolamin deaktiviert.

Zur Bestimmung der Bindekonstanten wurden Komplexe zwischen variierenden Konzentrationen von Hsp90 und einer festgesetzten Konzentration des jeweiligen Immunophilins (25 µM Cyp40, 106 µM FKBP51 und 28 µM FKBP52) vorgeformt, bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf den Chip aufgebracht. Die daraus erhaltenen Gleichgewichts-Resonanzeinheiten wurden gegen die Hsp90-Konzentration aufgetragen und mit folgender Gleichung gefittet, um die Bindekonstante zu erhalten (Mayr et al., 2000).

$$RU = RU_0 - (RU_0 - RU_{\min}) \cdot \frac{(c + L_0 + K_d) - \sqrt{(c + L_0 + K_d)^2 - 4 \cdot c \cdot L_0}}{2 \cdot L_0}$$

RU_0 repräsentiert den Anfangswert für das Resonanzsignal in der Abwesenheit von Hsp90, R_{\min} ist der Wert für die Sättigung von Immunophilin mit löslichem Hsp90. Die Hsp90-Konzentration wird als c bezeichnet, während L_0 die Konzentration an Immunophilin, die bei der Titration konstant gehalten wird, repräsentiert.

2.8.2. Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Methode, die die zuverlässigsten quantitativen Aussagen bezüglich Protein-Protein Interaktionen zulässt, ist die isothermische Titrationskalorimetrie (ITC). Sie misst die Bindung direkt anhand der Wärme, die bei der Assoziation eines Liganden mit seinen Bindepartner frei wird (Pierce et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde ITC sowohl zur Untersuchung der Interaktion zwischen Hsp90 und den großen Immunophilinen, als auch zur Messung der Bindung zwischen FKBP52-Fragmenten und einem Hsp90-Peptid, Hsp90C17, verwendet. Die Titrationsexperimente wurden in einem VP-ITC Mikrokalimetersystem (Microcal Inc., MA) durchgeführt. Das Proteinvolumen in der Messzelle betrug 1,4 ml, das Volumen der jeweiligen Injektionen war 5-8 µl. Die Puffer- und Konzentrationsbedingungen der einzelnen Experimente sind im jeweiligen Ergebnisteil aufgeführt.

Um die Werte für ΔH , ΔS , die Stöchiometrie der Bindung sowie die Bindekonstante zu erhalten, wurden die Titrationsdaten mittels der Originsoftware (MicroCal Inc., MA.) gefittet.

2.9. Bestimmung der PPIase –Aktivität

2.9.1. Protease-gekoppelter Peptidassay

PPIase-Aktivität gegenüber Peptidsubstraten wurde mittels eines Protease-gekoppelten Assays gemessen (Fischer et al., 1984). Es wurde das synthetische Peptid Succinyl-Ala-X-Pro-Phe-p-Nitroanilid (pNA) benutzt, wobei X entweder Ala oder Leu war. p-Nitroanilid kann durch die Protease Chymotrypsin nur dann von dem restlichen Peptid abgespalten werden, wenn sich die X-Pro Peptidbindung in der *trans*- Konfiguration befindet. Die Freisetzung von p-Nitroanilid resultiert in einem Absorptionsanstieg bei 390 nm. Die Messungen wurden in einem Jasco V-550 UV/Vis Spektrophotometer mit thermostatisierbarem Küvettenhalter bei einer konstanten Temperatur von 10°C durchgeführt. Um die Geschwindigkeitskonstanten zu erhalten, wurden die Reaktionskinetiken mit dem Programm Sigma Plot 4.0 (SPSS Inc., USA) gefittet.

2.9.2. Protease-freier Peptidassay

Die in dem Protease-gekoppelten Assay zugesetzte Hilfsprotease Chymotrypsin hat den Nachteil, dass nachweislich einige PPIasen von ihr gespalten und inaktiviert werden (Scholz et al., 1997b). Um auszuschließen, dass solche Effekte die gemessene Aktivität der großen Immunophilinen beeinflussen, wurde parallel ein Protease-freier Peptidassay durchgeführt. Dieser Assay beruht auf den unterschiedlichen UV/Vis Absorptionsspektren der *cis/trans* Isomere des Assaypeptides nach einem Solvenswechsel von 0.47 M LiCl/Trifluorethanol in wässrige Pufferlösung (Janowski et al., 1997). Somit kann die *cis/trans* Isomerisierung photometrisch durch die Absorptionsabnahme bei 330 nm verfolgt werden. Problematisch ist hierbei allerdings die geringe Signaländerung, die sich nur in der zweiten Nachkommastelle abspielt und die Auswertung erschwert. Konzentrationen und Bedingungen wurden wie in Abschnitt 2.9.1. beschrieben beibehalten.

2.9.3. RCM-T1 Rückfaltungsassay

Zur Messung der PPIase-Aktivität gegenüber Proteinen wurden Rückfaltungsexperimente mit einer reduzierten und S-carboxymethylierten S54G/P55N-Variante von RNase T₁ (RCM-T1) verwendet. RCM-T1 liegt in 100 mM Tris, pH 8,0 in entfaltetem Zustand vor, faltet aber spontan zurück, wenn man sie in denselben Puffer mit 2 M NaCl verdünnt.

In dieser Mutante ist die Rückfaltungskinetik durch die *cis/trans*- Isomerisierung der Tyr 38-Pro 39 Peptidbindung bestimmt (Mücke und Schmid, 1994a, 1994b) und Zugabe von PPIasen führt zu einer Beschleunigung der Reaktion. Der Assay wurde wie beschrieben

(Scholz et al., 1997a, 1997c) bei 15°C in einem Spex FluoroMax-2 Fluoreszenzspektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 268 nm und einer Emissionswellenlänge von 320 nm ausgeführt. Die Spalten waren 1,5 nm (Anregung) und 3,5 nm (Emission). Unter diesen Bedingungen war die Rückfaltung von RCM-T1 monoexponential. Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion wurden mit dem Programm Sigma Plot 4.0 (SPSS Inc., USA) berechnet.

2.10. Chaperon-Assays

Thermische Denaturierung von 3 μM Citratsynthase (CS, Monomer) wurde durch einstündige Inkubation bei 40°C in 40 mM Hepes, pH 7,5 erreicht. Die Aggregation von CS wurde mittels des Anstiegs der Trübung der Lösung bei 360 nm in einem JascoV-550 UV/Vis Spektrophotometer mit einem thermostatisierbarem Küvettenhalter mit Mikroküvetten (120 μl) mit einem Durchmesser von 1 cm gemessen.

Alternativ wurde die Aggregation von CS (0,15 μM) anhand von Lichtstreuung bei 360 nm in einem Spex FluoroMax-1 Fluoreszenzspektrometer mit thermostatisierbarem Küvettenhalter bei 43°C gemessen (Buchner et al., 1998b).

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der großen menschlichen Immunophiline FKBP51, FKBP52 und Cyp40

3.1.1. Allgemeiner Vergleich von FKBP51, FKBP52 und Cyp40

FKBP51	1	MTTDEGAKNN	EESPTATVAE	QGEDITSKKD	RGVL----KI	VKRVGNGEET
FKBP52	1	MTAEEMKATE	SGAQSAPLPM	EGVDISPKQD	EGVL----KV	IKREGTGTGM
Cyp40	1	MSHPSPQAKP	SNPSNPRVFF	DVDIGGERVG	RIVLELFADI	VPKTAENFRA
FKBP51	47	PMIGDKVYVH	YK GKLSNGKK	FDSSHDRNEP	FVFSLGKGQV	IKAWDIGVAT
FKBP52	47	PMIGDRV FVH	YTGWLLDGTK	FDSSLDRKDK	FSFDLGKGEV	IKAWDIAIAT
Cyp40	51	LCTGEGKIGH	TTGKPLHFK-	-GCPFHR---	-----I	LKKFMIQGG-
FKBP51	97	MKKGEICHLL	CKPEYAYGSA	GSLPKIPSNA	TLFFEIEILLD	FKGEDLF--E
FKBP52	97	MKVGEVCHIT	CKPEYAYGSA	GSPPKIPPNA	TLVFEVELFE	FKGEDLTEEE
Cyp40	86	-----	---DFSNQNG	TGGESIYG EK	---FEDENFH	YK-----HD
FKBP51	145	DGGIIRRTKR	KGEGYSNPNE	GATVEIHLEG	RCGGRMFDCR	DVAFTVGEGE
FKBP52	147	DGGIIRRIQT	RGEGYAKPNE	GAIVEVALEG	YYKDKLFDQR	ELRFEIGEGE
Cyp40	114	REGLL-----	---SMANAGR	NTNGSQFFIT	TVPTPHLDGK	HVVF-----G
FKBP51	195	DHDIPIGIDK	ALEKMQREEQ	CILYLGPRYG	FGEAGKPKFG	IEPNAELIYE
FKBP52	197	NLDLPYGLER	AIQRMEKGEH	SIVYLKPSYA	FGSVGKEKFKQ	IPPNAELKYE
Cyp40	151	QVIKGIQVAR	ILENVEVKGE	KPAKL---CV	IAECGELKEG	-DDGGIFPKD
FKBP51	245	VTLKSFEKAK	ESWEMDTKE-	--KLEQAAIV	KEKGTVYFKG	GKYMQA VIQY
FKBP52	247	LHLKSFEKAK	ESWEMNSEE-	--KLEQSTIV	KERGTVYFKE	GKYKQALLQY
Cyp40	197	GSGDSHPDFP	EDADIDLKDV	DKILLITEDL	KNIGNTFFKS	QNWEMA IKKY
					
FKBP51	292	GKIVSWLEME	YGLSEKESKA	S-ESFLLA AF	LNLAMCYLKL	REYTKAVECC
FKBP52	294	KKIVSWLEYE	SSFSNEEAQK	A-QALRLASH	LNLAMCHLKL	QAFSAAIESC
Cyp40	247	AEVLRVYDSS	KAVIETADRA	KLQPIALSCV	LNIGACKLKM	SNWQGAIDSC
					
FKBP51	341	DKALGLDSAN	EKGLYRRGEA	QLLMNEFESA	KGD FEKVLEV	NPQNKAARLQ
FKBP52	343	NKALELDSNN	EKGLFRRGEA	HLAVNDFELA	RADFQKVLQL	YPNNKAAKTQ
Cyp40	297	LEALELDPSN	TKALYRRAQG	WQGLKEYDQA	LADLKKQAQGI	APEDKAIQAE
					
FKBP51	391	ISMCQKKAKE	HNERDRRIYA	NMFKKFAEQD	AKEEANKAMG	KKTSEGV TNE
FKBP52	393	LAVCQQRIRR	QLAREKKLYA	NMFERLAEEE	NKAKAEASSG	DHPTDTEMKE
Cyp40	347	LLKVKQKIKI	QKDKEKAVYA	KMFA-----	-----	-----

FKBP51	441	KGTDSQAMEE	EKPEGHV			
FKBP52	443	EQKSNTAGSQ	SQVETEA			
Cyp40	-	-----	-----			

Abb. 3.1.1.1. Aminosäuresequenzvergleich der drei großen menschlichen Immunophiline. Die hellgrau unterlegten Aminosäuren sind in FKBP51 und FKBP52 identisch. Die dunkelgrau unterlegten Aminosäuren sind in Cyp40 identisch mit beiden FKBP. Aminosäuren, die zum TPR-Konsensus-Motiv gehören, sind fett gedruckt. Die TPR-Regionen sind durch eine gepunktete Linie und die Calmodulin-Bindestelle ist durch Sterne

gekennzeichnet (verändert nach Nair et al., 1997, Barent et al., 1998 und Scheufler et al., 2000).

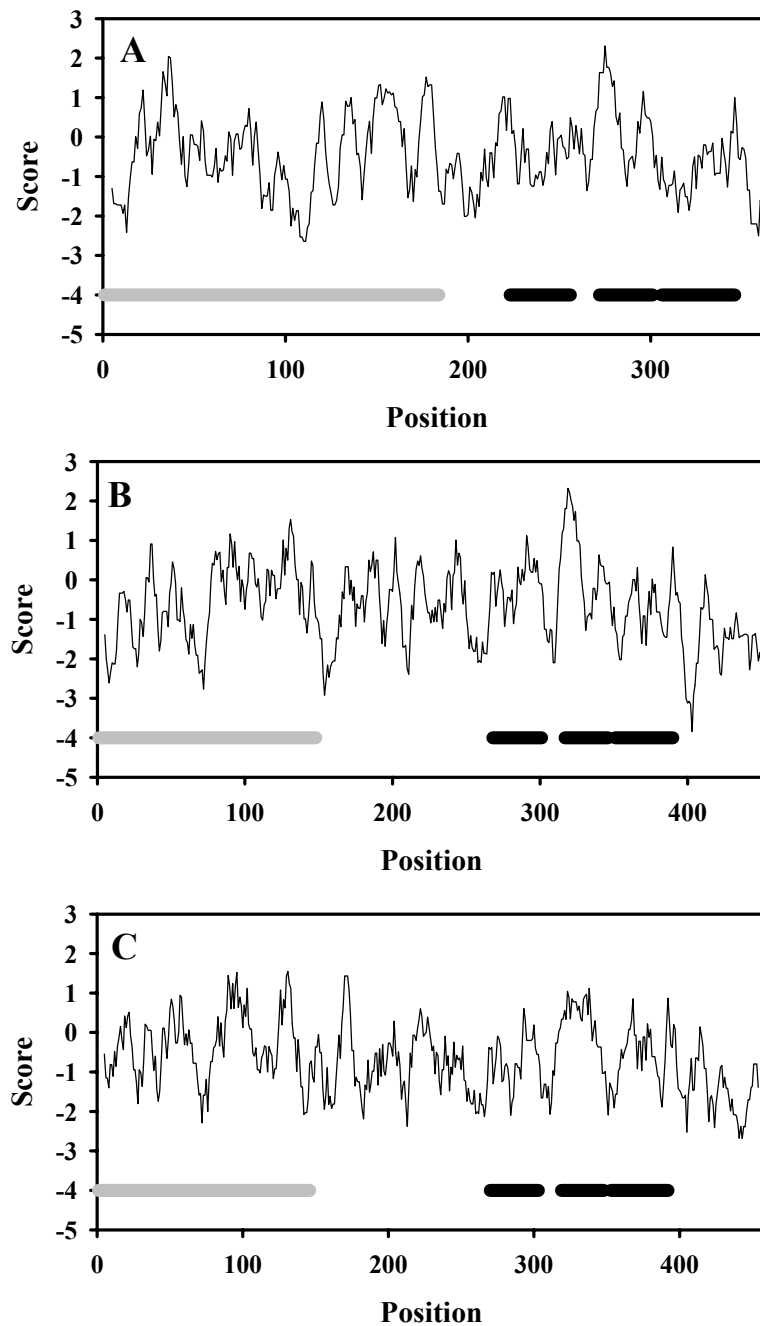


Abb. 3.1.1.2. Hydropathieplots von Cyp40 (A), FKBP51 (B) und FKBP52 (C). Ermittelt gemäß Kyte und Doolittle (1982) mit dem ProtScale Tool (<http://www.expasy.ch>). Der graue Balken bezeichnet die PPIase-Domäne, während die schwarzen Balken die TPR-Module kennzeichnen.

Im Menschen gibt es drei Hsp90-assoziierte große Immunophiline, Cyp40, FKBP51 und FKBP52. FKBP51 und FKBP52 gehören zur selben Unterklasse von PPIasen und sind sehr eng miteinander verwandt. Dies kommt deutlich in einem Sequenzvergleich zum Ausdruck (Abb. 3.1.1.1), in dem sie 60% Sequenzidentität aufweisen.

Deutlich geringer ist die Ähnlichkeit, die Cyp40 mit den beiden FKBP5s aufweist. Sie beschränkt sich vor allem auf die TPR-Domänen und das Calmodulin-Bindemotiv in C-terminalen Bereich der Proteine (Abb. 3.1.1.1.). Die potentielle Calmodulin-Bindestelle liegt bei Cyp40 am C-terminalen Ende des Proteins, wohingegen sie bei den FKBP5s etwa 30 Aminosäuren davon entfernt ist. Die Sequenzidentität von Cyp40 zu FKBP52 beträgt 30%. Während in Cyp40 die TPRs direkt auf die PPIase-Domäne folgen, sind sie in beiden FKBP5s durch etwa 110 Aminosäuren davon getrennt (Abb. 3.1.1.2.). Vergleiche der Hydrophathie-Blots (Abb. 3.1.1.2.) zeigen ebenfalls eine größeren Ähnlichkeit zwischen den beiden FKBP5s, vor allem bezüglich der PPIase-Domänen. Die TPR-Domänen hingegen liefern bei jedem Protein ein anders Bild, wobei jedoch immer die Unterteilung in drei Module aus je zwei Helices zu erkennen ist (Abb. 3.1.1.2.). Auch im Bezug auf den theoretischen isoelektrischen Punkt und den Anteil an bestimmten Aminosäuren sind FKBP51 und FKBP52 einander ähnlicher als Cyp40 (Tabelle 3.1.1.).

Parameter	Cyp40	FKBP51	FKBP52
Theoretische molekulare Masse (kDa)	40, 763	51, 212	51, 804
Aminosäureanzahl	370	457	459
Tryptophane	3 (0, 8%)	3 (0, 7%)	4 (0, 9%)
Tyrosine	7 (1, 9%)	16 (3, 5%)	16 (3, 5%)
Phenylalanine	18 (4, 9%)	19 (3, 5%)	19 (4, 1%)
Cysteine	7 (1, 9%)	9 (2%)	5 (1, 1%)
Theoretischer isoelektrischer Punkt	6, 77	5, 71	5, 35

Tabelle 3.1.1. Vergleich der drei großen menschlichen Immunophiline bezüglich einiger physikochemischer Parameter. Die Parameter wurde aus der Aminosäuresequenz mittels des ProtParam Tools errechnet (<http://www.expasy.ch>).

3.1.2. Reinigung von FKBP51, FKBP52 und Cyp40

Alle drei großen menschlichen Immunophiline konnten mittels der gleichen Abfolge von Säulen gereinigt werden. Das Reinigungsschema ist in einem Flussdiagramm (Abbildung 3.1.2.1.) erläutert. Ein exemplarisches Reinigungsgel für Cyp40, das die Wirksamkeit der einzelnen Stufen dokumentiert, ist in Abbildung 3.1.2.2. gezeigt.

Die cDNA für humanes FKBP51, FKBP52 und Cyp40 wurde in einen pQE30-Vektor kloniert, der die Expression von Proteinen mit N-terminalem sechsfachen Histidin-Tag erlaubt. Zur Expression wurde das jeweilige Plasmid in einen *E. coli* HB101 Stamm transformiert. Anzucht, Induktion, Zellernte und -lyse erfolgten, wie in Material und Methoden unter Abschnitt 2.3.1. beschrieben.

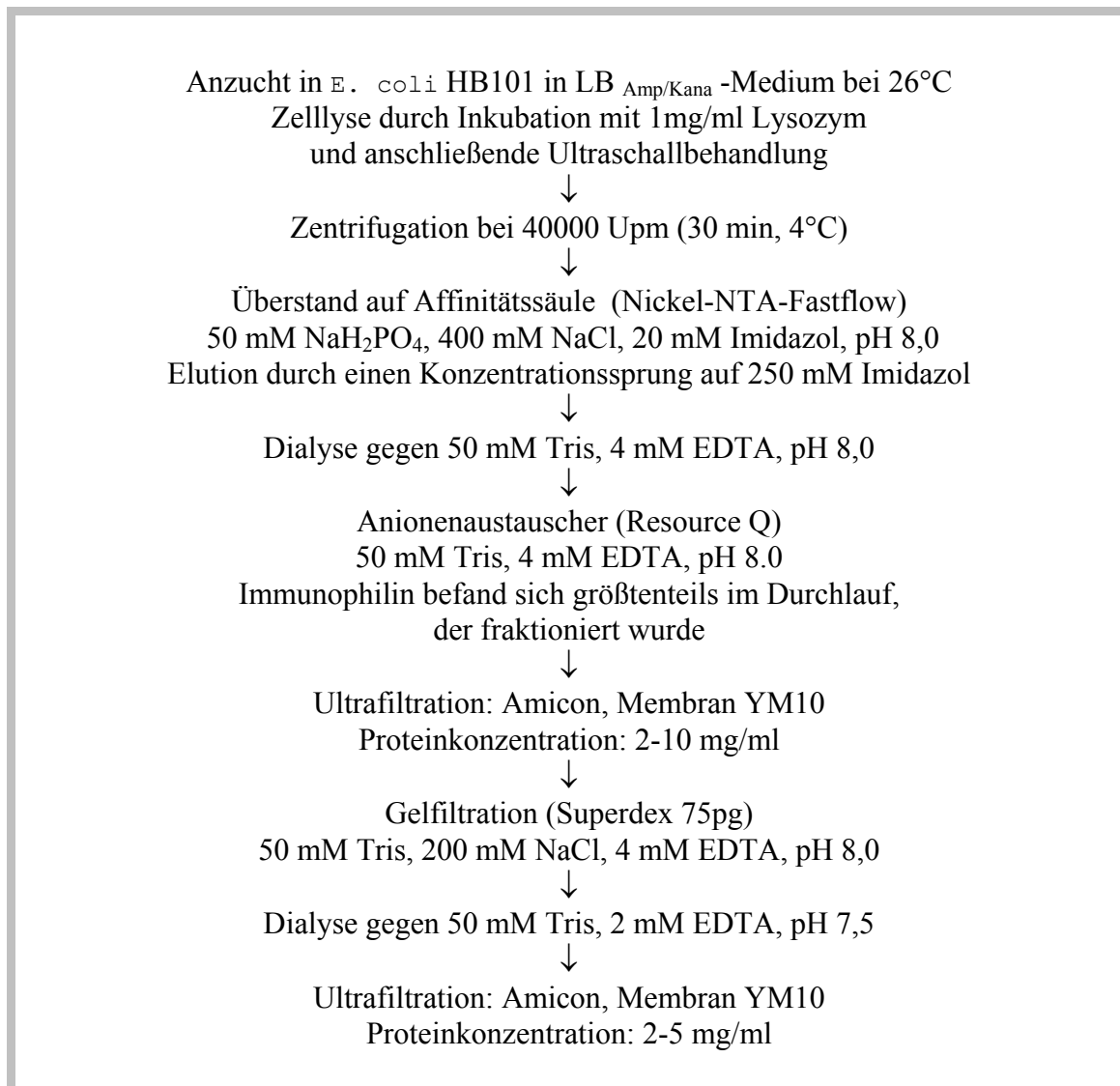


Abb. 3.1.2.1. Flussdiagramm der Reinigung von Cyp40. Der dargestellte Ablauf der Reinigung gilt analog auch für FKBP51 und FKBP52.

Der N-terminale Histidin-Tag erlaubt die Verwendung einer Affinitätssäule als ersten Reinigungsschritt. Hier wurde eine Ni-NTA-Fastflow benutzt, womit etwa 70-80% der kontaminierenden Proteine entfernt werden konnten.

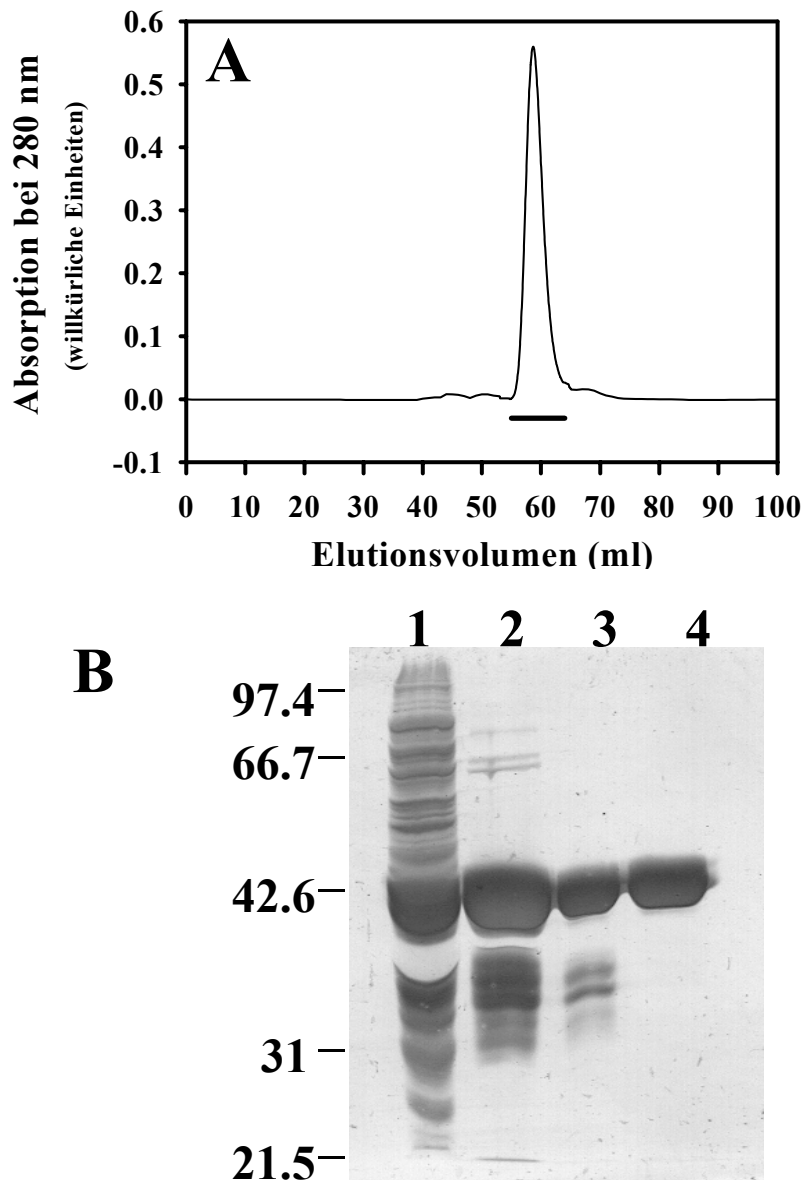


Abb. 3.1.2.2. Stufen der Reinigung von Cyp40. A) Elutionsprofil der Superdex 75 pg-Gelfiltrationsläufe. Der Balken kennzeichnet die als sauber gepoolten Fraktionen. B) SDS-PAGE des Verlaufs der Reinigung von Cyp40. Die Molekulargewichtsmarker sind links außen zu sehen. Die Spuren enthalten dem Ablauf der Reinigung gemäß folgende Proben: 1) Überstand nach Zellaufschluss. 2) gepoolte Fraktionen nach der Ni-NTA-fastflow-Säule. 3) Durchlauf durch die Resource Q. 4) Sauberer Cyp40-Pool nach der Superdex 75 pg-Säule.

Die Anwesenheit von 400 mM NaCl und 20 mM Imidazol in Auftrags- und Waschpuffer erlaubten es, unspezifische Wechselwirkungen anderer Proteine mit der Nickel-NTA-Säulenmatrix auf ein Minimum zu reduzieren. Ein ausreichend langer Waschschrift nach dem Auftrag (circa 20 Säulenvolumina) trug ein weiteres zur Reinigung bei. Eluiert wurde das

jeweilige Immunophilin durch einen Konzentrationssprung von 20 mM auf 250 mM Imidazol, wodurch das Eluatvolumen recht gering gehalten werden konnte.

Da große Immunophiline mit Histidin-Tag in Anwesenheit von zweiwertigen Ionen zur Aggregation neigen (Mayr, 2000), wurde der Eluatpool über Nacht in 50 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 8,0 umdialysiert, wobei die Anwesenheit von EDTA die Aggregation verhinderte. Als zweite Säule wurde ein Anionenaustauscher (Resource Q -Säule) benutzt. Bei dieser Säule befanden sich die Immunophiline im Durchlauf. Da jedoch ein großer Teil der *E. coli*-eigenen Proteine unter diesen Bedingungen an den Anionenaustauscher bindet, konnte diese Eigenheit der großen Immunophiline zur weiteren Reinigung genutzt werden.

Weil durch diesen Schritt die Proteinlösung aber verdünnt wurde, musste sie zunächst mittels Ultrafiltration wieder aufkonzentriert werden, bevor sie auf die Gelfiltrationssäule (Superdex 75 pg) geladen werden konnte. Diese Säule entfernte alle restlichen Verunreinigungen und stellte sicher, dass das Protein nicht aggregiert oder teilaggregiert vorlag.

Durch dieses Expressions- und Reinigungsschema wurden für die FKBP's Proteinausbeuten von 5-8 mg und für Cyp40 sogar 12 mg Protein pro g Zellnassgewicht erreicht.

Bei der Reinigung von GST-Cyp40 war die erste Säule eine Glutathion-Sepharose (equilibriert in 150 mM NaCl, 16 mM Na₂POH₄, 4 mM NaH₂POH₄, pH 7,3, eluiert mit 50 mM Tris, 10 mM GSH, pH 8,0). Die Resource Q- und Gelfiltrationsschritte wurden, wie für die Histidin-getagten Konstrukte beschrieben, durchgeführt. Für GST-Cyp40 konnte eine Reinigungsausbeute von circa 3 mg pro g Zellnassgewicht erreicht werden.

Die Identifikation der Proteine erfolgte durch Western Blot mit den jeweiligen Antikörpern und N-terminale Sequenzierung mittels Edman-Abbau (Edman und Berg, 1967; siehe Material und Methoden Abschnitt 2.4.3. und 2.4.4.). Die sauberen Proteine wurden in 50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,5 beziehungsweise pH 8,0 bei -80°C gelagert.

3.1.3. Struktur und Stabilität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40

3.1.3.1. Struktur von FKBP51, FKBP52 und Cyp40

Um Informationen zu ihrer Struktur zu erhalten, wurden die drei Immunophiline zunächst spektroskopisch charakterisiert.

Die Fluoreszenzspektren aller drei Immunophiline werden vor allem vom Beitrag der Tryptophane (Cyp40 und FKBP51 haben jeweils 3 und FKBP52 besitzt 4 Tryptophane, vgl. Abschnitt 3.1.1.) dominiert. So liegen die Emissionsmaxima im nativen Zustand bei der Anregungswellenlänge von 280 nm bei 334 nm, 336 nm bzw. 341 nm für Cyp40, FKBP51 bzw. FKBP52, was darauf hindeutet, dass zumindest bei dem Letzteren die Tryptophane teilweise lösungsmittlexponiert vorliegen.

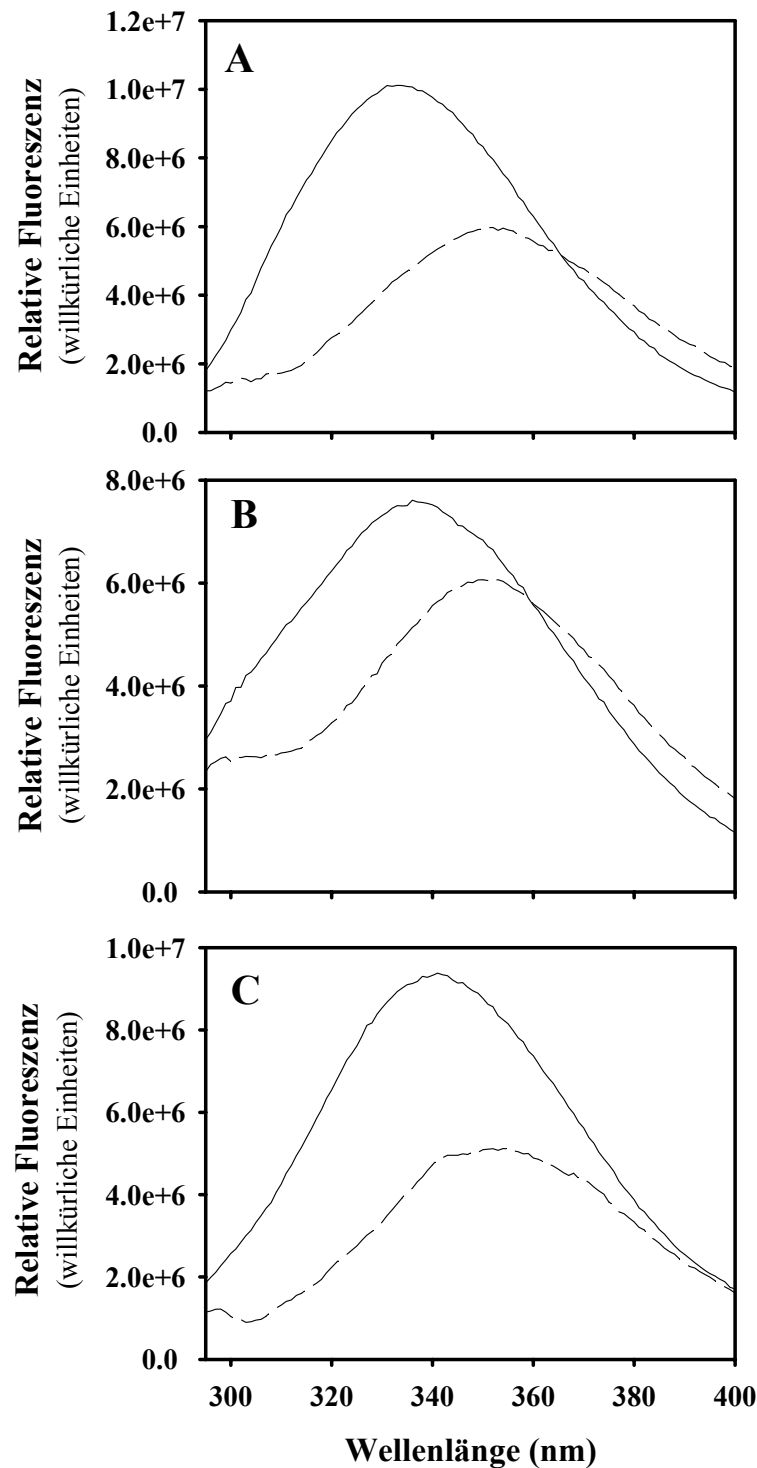


Abb. 3.1.3.1.1. Fluoreszenzspektren der drei großen Immunophiline. A) Cyp40, B) FKBP51 und C) FKBP52 im nativen (—) und denaturierten (- -) Zustand. Die Proteinkonzentration betrug 5 µg/ml. Die Messung erfolgt in 50 mM Tris, pH 7,5 für natives Protein und in 50 mM Tris, 6 M GdmCl, pH 7,5 für denaturiertes Protein. Alle Spektren sind pufferkorrigiert.

Die Unterschiede in den Signalintensitäten sind nur geringfügig, wobei FKBP51 eine etwas geringere Intensität aufweist als Cyp40 und FKBP52 (Abb. 3.1.3.1.1.).

Im denaturierten Zustand verschiebt sich das Intensitätsmaximum bei allen drei Immunophilinen zu höheren Wellenlängen hin. Für Cyp40 und FKBP52 liegt es dann bei 352 nm und für FKBP51 bei 350 nm. Das entspricht in etwa dem vollkommen lösungsmittlexponierten Zustand von Tryptophan (Schmid, 1989). Zusätzlich verringert sich bei Cyp40 und FKBP52 die Signalintensität auf die Hälfte und bei FKBP51 etwa auf zwei Drittel des Wertes des nativen Zustands. In allen denaturierten Spektren ist ein angedeutetes zweites Maximum bei circa 300 nm zu beobachten. Dabei handelt es sich um das Fluoreszenzmaximum von Tyrosin, da alle drei Immunophiline einen sehr hohen Anteil an Tyrosinen besitzen (vgl. Abschnitt 3.1.1.).

Die N-terminalen Domänen der großen Immunophiline besitzen hohe Homologie mit den jeweiligen kleinen Immunophilinen (siehe 1.6.). So weist zum Beispiel die N-terminale Domäne von FKBP52 55% Aminosäurehomologie (Lebeau et al., 1992) und 49% Sequenzidentität mit FKBP12 auf (Callebaut et al., 1992). Humanes Cyp18 und die N-terminale Domäne von humanem Cyp40 haben 61% Identität (Kieffer et al., 1993).

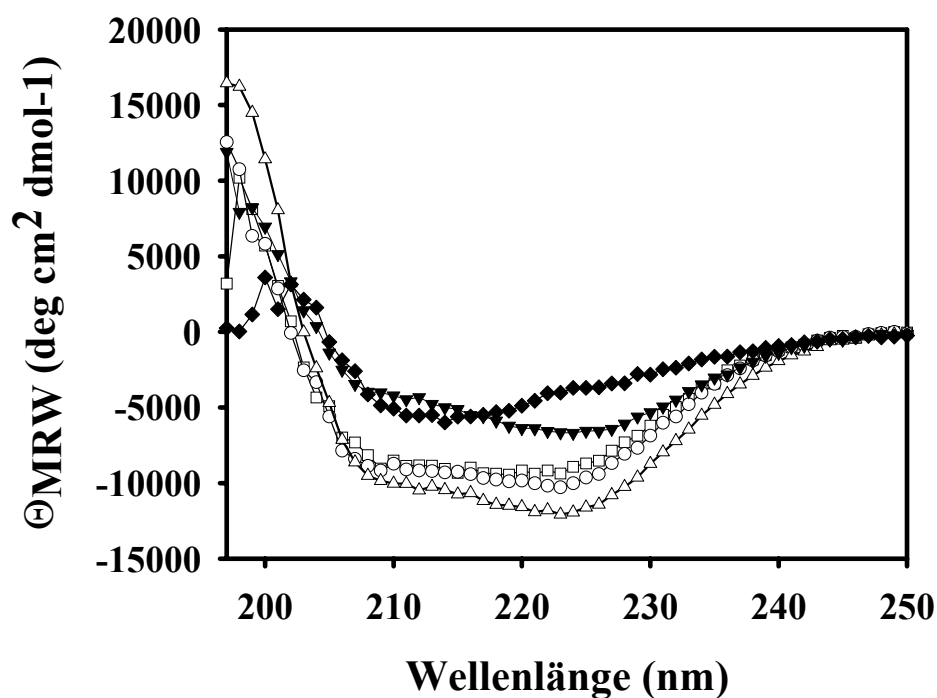


Abb. 3.1.3.1.2 Fern-UV-CD-Spektren der großen und kleinen Immunophiline im Vergleich. Gezeigt sind die Spektren von Cyp18 (▼), FKBP12 (◆), Cyp40 (Δ), FKBP51 (□) und FKBP52 (○). Sie wurden in 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 aufgenommen. Die Proteinkonzentration war 0,2 mg/ml für Cyp18 und FKBP12 und 0,4 mg/ml für Cyp40, FKBP51 und FKBP52. Alle Spektren sind pufferkorrigiert.

Cyp18 besteht aus einer 8 strängigen antiparallelen β -Barrel Struktur mit zwei kurzen Helices (Ke et al., 1991; Mikol et al., 1993) und FKBP12 besteht aus einem fünf strängigen antiparallelen β -Faltblatt mit einem rechtshändigen Twist, einer kurzen α -Helix und hat einen hohen Gehalt an aperiodischer Struktur (Michnick et al., 1991; Moore et al., 1991; Wilson et al., 1995). Die isolierte PPIase Domäne von Kaninchen FKBP52 (Aminosäure 1-149) zeigt eine ähnliche Struktur (Craescu et al., 1996). Das legt nahe, dass die Struktur der PPIase-Domäne der großen und der jeweiligen kleinen Immunophilinen konserviert ist.

Um weitere Informationen über die Sekundärstruktur der großen Immunophilinen zu erhalten, wurden Fern-UV-Circular-Dichroismus-(CD)-Spektren der großen Immunophilinen aufgenommen und mit denen des korrespondierenden kleinen Immunophilins FKBP12 oder Cyp18 verglichen (Abb. 3.1.3.1.2). Das Fern-UV-CD Spektrum von Cyp18 zeigte zwei Minima – bei 208 und 222 nm - ein Merkmal, das charakteristisch für α -Helices ist. Allerdings war die Intensität des Signals mit nur $-6000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ sehr gering, was auf einen hohen Anteil an β -Faltblattstruktur schließen lässt. Das Spektrum von FKBP12 zeigte ein deutliches Minimum bei einer Wellenlänge von 212 nm mit einer molaren Elliptizität von $-5000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. Das weist darauf hin, dass das Protein vorwiegend aus β -Struktur besteht.

Die Spektren der drei großen Immunophilinen waren von der Form her sehr ähnlich, wobei die Signalintensitäten von FKBP51 (Elliptizität von $-9700 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) und FKBP52 (Elliptizität von $-10000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) fast gleich waren und das Spektrum von Cyp40 eine etwas höhere Elliptizität ($-12000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) aufwies. Die Signalminima befanden sich bei 208 nm und 222 nm und das Maximum unter 200 nm. Die Form und die Elliptizitätswerte dieser Spektren deuteten auf einen höheren Anteil an α -helikaler Struktur als bei den jeweiligen kleinen Immunophilinen hin.

Der Anteil an α -Helix wurde, wie in Abschnitt 2.5.3. beschrieben, aus den betreffenden Spektren ermittelt und ist in Tabelle 3.1.3.1.1. zusammengefasst. Dabei ergab sich gemäß dem CDNN Programm für FKBP12 und Cyp18 ein α -Helix Gehalt von 16% beziehungsweise 19%, wohingegen die großen Immunophilinen höhere Anteile an α -Helix hatten. Der Helix-Anteil war 35% beziehungsweise 28% und 30 % für Cyp40, FKBP51 und FKBP52. Bei einer Auswertung nach Forood et al. (1993) war der α -Helix Anteil jeweils um etwa 5% niedriger (vgl. Tabelle 3.1.3.1.1.). Verglichen mit den Sekundärstrukturvorhersagen ist der α -Helix Anteil beider Auswertungsmethoden deutlich niedriger.

Nachdem der jeweilige N-terminale Bereich der großen und der betreffenden kleinen Immunophilinen strukturell ähnlich ist, scheinen die Unterschiede in den Fern-UV-CD-Spektren vorwiegend auf der Sekundärstruktur der zusätzlichen C-terminalen Domänen zu basieren, die die TPR-Regionen, die Chaperon-Aktivität und die Calmodulin-Bindestelle enthalten. Folglich besitzen diese Domänen einen beträchtlichen Anteil an α -helikaler Struktur.

Immunophilin	α -Helix-Anteil Forood et al., 1993	α -Helix-Anteil nach CDNN	α -Helix-Anteil nach SOPM-Vorhersage
FKBP12	10%	16%	16, 8%
Cyp18	15,5%	18%	25%
Cyp40	30%	35%	41%
FKBP51	25%	28%	36%
FKBP52	35%	30%	44%

Tabelle 3.1.3.1.1. Zusammenfassung des Gehalts an Sekundärstruktur. Gezeigt ist der Anteil an α -Helix berechnet nach der Formel von Forood et al., (1993) und mittels des CDNN-Programms (wie in Material und Methoden beschrieben) im Vergleich mit dem α -Helix Anteil vorhergesagt nach der Methode von Geourjou und Deleage (1994).

Nah-UV-CD-Spektren sind für jedes Protein spezifisch und können somit als Fingerabdruck des korrekten Faltungszustandes und der Tertiärstruktur benutzt werden. Für die großen humanen Immunophiline sind die jeweiligen Nah-UV-CD-Spektren in Abb. 3.1.3.1.3. dargestellt. Auch hier zeigen die beiden großen FKBP's größere Ähnlichkeit zueinander als zu Cyp40. Alle drei Immunophiline weisen bei circa 280 nm ein Signalminimum auf. Dessen Intensität ist aber bei den beiden FKBP's ($-110 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ bei FKBP51 und $-80 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ bei FKBP52) deutlich stärker als bei Cyp40 mit $-10 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. In der Gesamtform hat das Cyp40-Spektrum zudem eine Sonderstellung verglichen mit den beiden FKBP's, da hier das Minimum bei 280 nm durch zwei Maxima (bei 264 nm und 292 nm) eingerahmt wird.

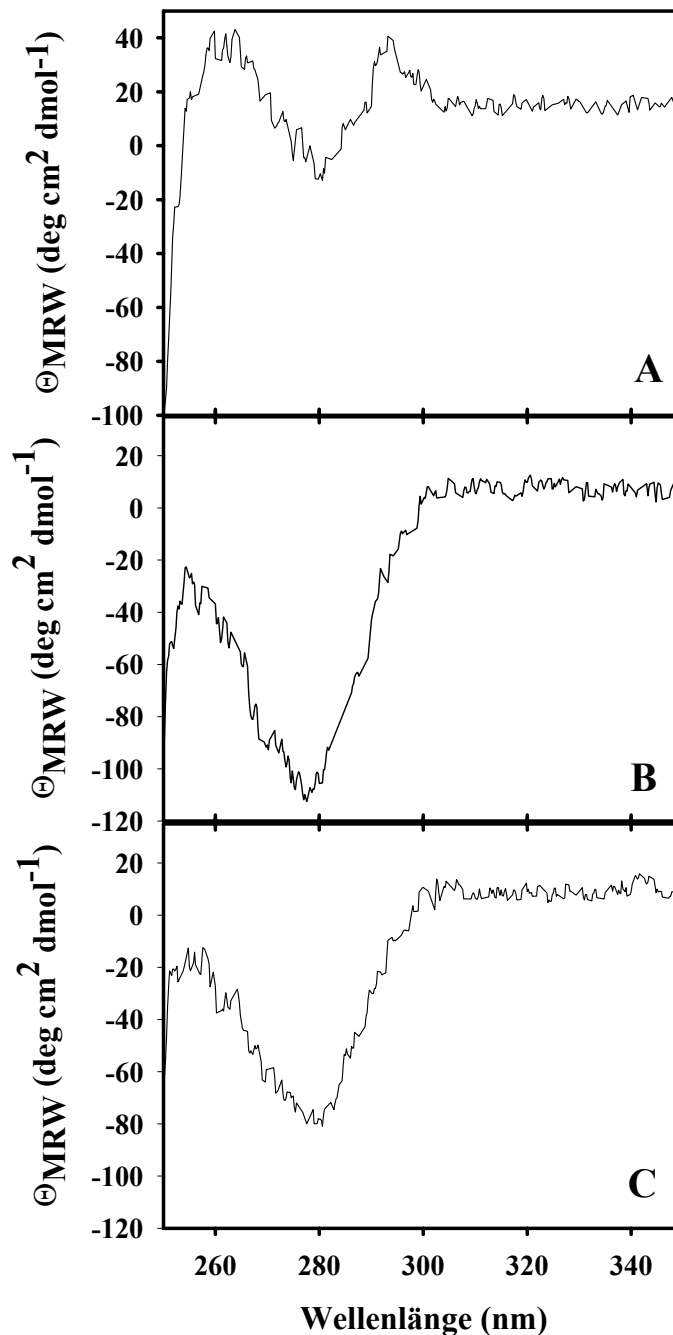


Abb. 3.1.3.1.3. Nah-UV-CD Spektren von Cyp40 (A) , FKBP51 (B) und FKBP52 (C). Proteinkonzentration: jeweils 600 $\mu\text{g/ml}$. Die Spektren wurden in Lagerungspuffer aufgenommen und gegen das jeweilige Pufferspektrum korrigiert.

Der Oligomerisierungszustand der drei großen Immunophiline wurde mittels analytischer Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Analytische Gelfiltrationsexperimente wurden auf einer Superdex 75 HR durchgeführt und das jeweilige Molekulargewicht anhand einer Eichgerade, wie in Material und Methoden (Abschnitt 2.7.)

beschrieben, bestimmt. Für Cyp40, FKBP51 bzw. FKBP52 ergaben sich dabei Retentionszeiten von 19,572 min, 18,378 min und 18,046 min, was jeweils einer Molekularem Masse von 54,18, 61,86 bzw. 63,99 kDa entspricht (Abb. 3.1.3.1.4. und Tabelle 3.1.3.1.2.).

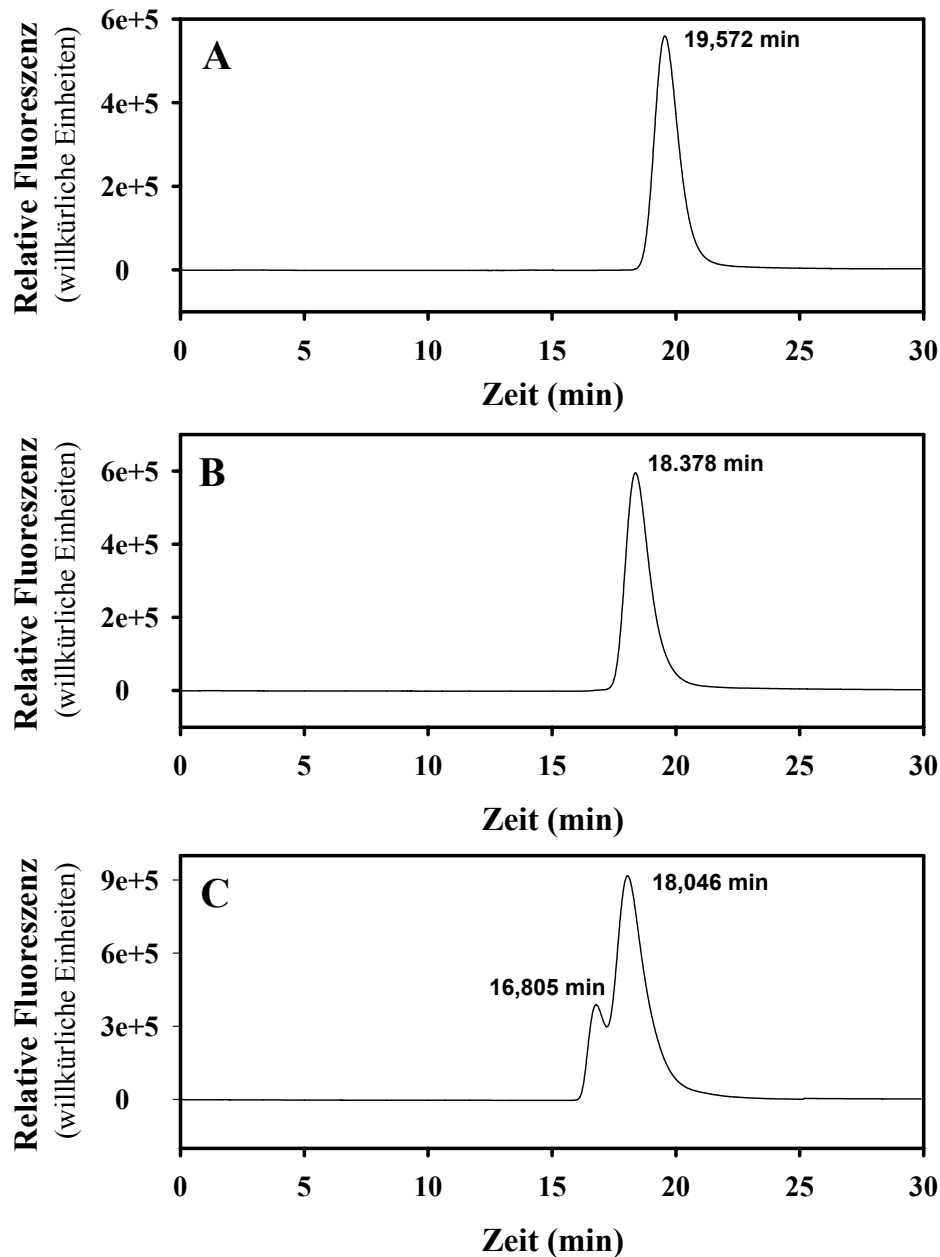


Abb. 3.1.3.1.4. Analytische Gelfiltrationsläufe der großen Immunophiline. Die Läufe wurden durchgeführt in 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 auf einer Superdex 75 HR-Säule bei 20°C mit 0,5 ml/min Flussrate. Die Proteinkonzentration war 2 μ M. Die Elution wurde mittels Fluoreszenz verfolgt, wobei $\lambda_{\text{Ex}} = 280$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 330$ nm war. A) Cyp40. B) FKBP51. C) FKBP52.

Das liegt bei allen drei Proteinen etwa 10 kDa über der tatsächlichen Masse eines Monomers, entspricht aber, wenn man die Möglichkeit einer atypischen gestreckten Molekülform miteinbezieht, einem Monomer. In den Gelfiltrationsexperimenten war bei FKBP52 eine zweite zusätzliche Laufform des Moleküls zu beobachten (Abb. 3.1.3.1.4. und Tabelle 3.1.3.1.2.), die bei 16,805 min läuft, was einer Masse von 71,9 kDa entspricht. Für FKBP52 ist in der Literatur beschrieben, dass es sich wie ein Dimer verhält (Wiederrecht et al., 1992; Yem et al., 1993). Somit könnte diese zweite Laufform dimere Anteile widerspiegeln.

Zusätzlich wurde der Oligomerisierungszustand der großen Immunophilinen, wie in Abschnitt 2.7.2. beschrieben, auch mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Sie lieferte mit Molekulargewichten von 47,354 kDa für Cyp40, 61,959 kDa für FKBP51 und 69,168 kDa für FKBP52 ähnliche Ergebnisse wie die analytischen Gelfiltrationsläufe (Tabelle 3.1.3.1.2.).

Methode	Molekulare Masse (kDa)			
	Cyp40	FKBP51	FKBP52	
analytischer Gelfiltration	54,180	61,860	63,990	71,900
Analytischer Ultrazentrifugation	47,354	61,959	69,168	

Tabelle 3.1.3.1.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der analytischen Gelfiltration und der analytischen Ultrazentrifugation.

3.1.3.2. Stabilität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40

Als nächstes wurde die Stabilität der drei großen Immunophilinen gegenüber verschiedenen Denaturierungsagentien untersucht und verglichen.

Die Stabilität gegenüber chemischer Entfaltung wurde, wie in 2.6.1. beschrieben, anhand von GdmCl-induzierten Gleichgewichtsentfaltungsübergängen ermittelt (Abb. 3.1.3.2.1). Hier weist Cyp40 einen deutlich niedrigeren Entfaltungsmittelpunkt (0,8 M GdmCl) auf als FKBP51 (1,6 M GdmCl) und FKBP52 (1,5 M GdmCl). Außerdem ist der Übergang von Cyp40 kooperativer als der der FKBP5.

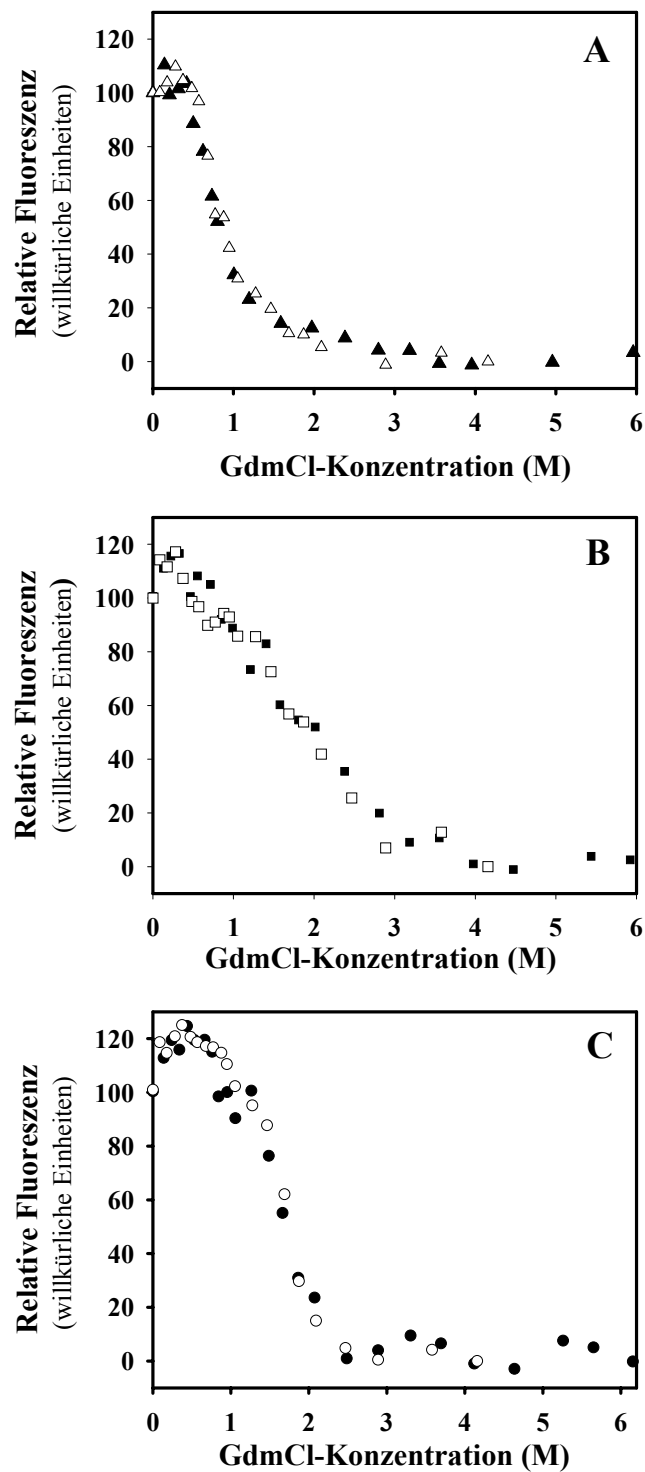


Abb. 3.1.3.2.1. Chemische Denaturierung der großen Immunophiline. Denaturierungsübergänge (ausgefüllte Symbole) und Renaturierungsübergänge (leere Symbole) in 50 mM Tris, pH 7,5 mit verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. Die Proteinkonzentration betrug 5 µg/ml. Die Übergänge zeigen jeweils die Fluoreszenzintensität am Maximum des Differenzspektrums von nativen und denaturierten Protein. A) Cyp40, B) FKBP51 und C) FKBP52. Die Übergänge wurden jeweils auf den Wert bei 0 M GdmCl normiert.

Das Fluoreszenzsignal von Cyp40 bleibt bis etwa 0,4 M GdmCl konstant und fällt dann schnell ab, so dass das Protein bei 2,0 M GdmCl vollständig denaturiert vorliegt, wohingegen beide FKBP's bis etwa 0,8 M GdmCl ein stabiles Signal zeigen und nach langsamen Intensitätsabfall erst bei 2,5 bis 3,0 M GdmCl als vollständig denaturiert gelten können. Das mag darauf hindeuten, dass in den FKBP's die Domänen in einer Weise entfalten, die voneinander unabhängiger ist als in Cyp40.

Für die Renaturierungsübergänge wurden die Proteine bei Raumtemperatur für 4 Stunden in 4 M GdmCl denaturiert, um dann in die unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen der einzelnen Renaturierungsansätze verdünnt zu werden. Die niedrigste dabei erreichbare Konzentration war 0,04 M GdmCl. Die Fluoreszenzspektren für die Renaturierungsübergänge wurde bei denselben Bedingungen wie die der Denaturierungsübergänge gemessen. Die erhaltenen Übergänge waren identisch.

Sowohl die Denaturierungs- als auch die Renaturierungsübergänge zeigen einen monophasischen Übergang. Da der Übergang reversibel ist, wurde er mit der in Abschnitt 2.6.1. angegebenen Fitgleichung gefittet. Die Ergebnisse dieses Fits sind in Tabelle 3.1.3.2.1. zusammengefasst.

Parameter	Cyp40	FKBP51	FKBP52
Übergangsmittelpunkt	0,8 M GdmCl	1,6 M GdmCl	1,5 M GdmCl
Stabilisierungsenergie (KJ/mol)	7, 4	14, 2	14, 3
Kooperativität (KJ/(mol* M GdmCl))	-12, 1	-6, 9	-8, 8

Tabelle 3.1.3.2.1. Zusammenfassung der Fit-Ergebnisse für die Stabilität gegenüber chemischer Denaturierung.

Für FKBP51 und FKBP52 liegen sowohl die Werte für den Übergangsmittelpunkt als auch für die Stabilität und die Kooperativität in einem ähnlichen Bereich. Cyp40 erwies sich als deutlich instabiler als die beiden FKBP's.

Zudem wurde die Stabilität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40 mittels eines temperaturinduzierten Entfaltungsübergangs im Fern-UV-CD (wie in Sektion 2.6.2. beschrieben) gemessen (Abbildung 3.1.3.2.2. und Tabelle 3.1.3.2.2.).

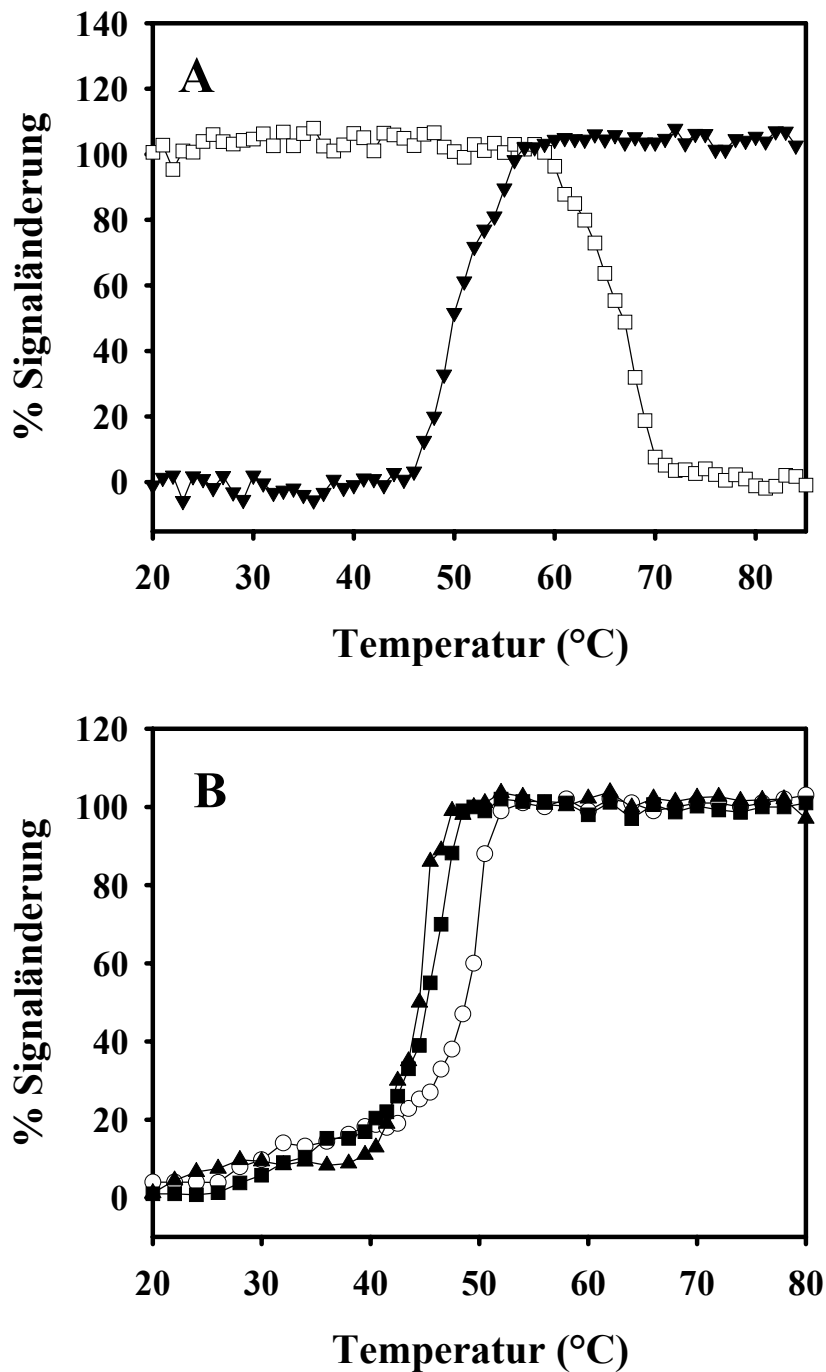


Abb. 3.1.3.2.2. Temperatur-induzierte Denaturierung der Immunophiline. Das Fern-UV-CD-Signal einer 250 µg/ml Proteinlösung von 40 mM Kaliumphosphat, pH 7,5 wurde für Cyp18, Cyp40, FKBP51, FKBP52 bei 222nm und für FKBP12 bei 215 nm von 20°C bis 80°C verfolgt. Die Heizrate betrug 1°C/Minute. A) Temperaturübergänge der kleinen Immunophiline Cyp18 (□) und FKBP12 (▼). B) Temperaturübergänge der großen Immunophiline Cyp40 (▲), FKBP51 (■) und FKBP52 (○). Die Übergänge waren irreversibel.

Von allen drei Immunophilinen war FKBP52 am stabilsten mit einen Übergangsmittelpunkt von 49°C verglichen mit 45°C für Cyp40 und 46°C für FKBP51.

Im Vergleich mit den jeweiligen kleinen Immunophilinen zeigten alle drei großen Immunophiline deutlich reduzierte thermische Stabilität. So war FKBP12 bis 60°C stabil und das Signal fiel dann bis 70°C stetig ab. Der Denaturierungsmittelpunkt liegt bei 65,5°C und ist somit 16,5°C höher als der von FKBP52 und fast 20°C höher als der von FKBP51. In ähnlicher Weise ist auch Cyp18 mit einen Übergangsmittelpunkt von 51°C immer noch 6 °C stabiler als Cyp40. Offensichtlich destabilisieren die zusätzlichen Domänen die drei großen Immunophiline.

Die Mittelpunkte der Thermoübergänge von Cyp40 auf der einen Seite und von FKBP51 und GST-Cyp40 auf der anderen Seite unterscheiden sich nur um ein bis zwei Grad, und dennoch aggregiert Cyp40 unter den Bedingungen des Citratsynthase-Assays, wohingegen die anderen beiden Proteine stabil sind. Ein Grund hierfür mag sein, dass der Temperaturübergang von Cyp40 eine höhere Kooperativität aufweist als die Übergänge von FKBP51, FKBP52 und GST-Cyp40. Eine weitere Erklärung für die Aggregation von Cyp40 bei den im CS-Assay verwendeten Bedingungen sind möglicherweise unterschiedliche Stabilitäten in verschiedenen Puffern, wobei Hepespuffer die Aggregation von Cyp40 noch beschleunigen könnte.

Immunophilin	Thermische Stabilität T_m
FKBP12	65,5 ± 0,5 °C
Cyp18	51 ± 1°C
Cyp40	45 ± 0,5°C
GST-Cyp40	46,5 ± 0,5°C
FKBP51	46 ± 0,1°C
FKBP52	49 ± 0,5°C

Tabelle 3.1.3.2.2. Zusammenfassung der thermischen Stabilitätsdaten der großen Immunophilinen im Vergleich mit den jeweiligen kleinen Immunophilinen.

3.1.4. Interaktion von FKBP51, FKBP52 und Cyp40 mit Hsp90

Bisher wurde die Interaktion zwischen Hsp90 und den großen Immunophilinen zumeist mittels chemischer Quervernetzung untersucht (Rehberger et al., 1992; Segnitz und Gehring, 1995; Silverstein et al., 1999). Die so erhaltenen Ergebnisse erlaubten es aber nicht, Rückschlüsse auf die jeweiligen Affinitäten der drei Immunophiline zu Hsp90 zu ziehen. Darüber hinaus war die Frage, ob ein oder zwei Immunophiline an ein Hsp90 Dimer binden, Gegenstand von Kontroversen.

Die Frage der Affinitäten wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von Plasmon-Resonanz-Spektroskopie und Isothermischer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Darüber hinaus konnten mittels der ITC-Messung auch auf die Frage nach der Stöchiometrie der Komplexe eingegangen werden.

3.1.4.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

Bei der Plasmon-Resonanz-Spektroskopie wird eines der zu untersuchenden Proteine kovalent an die Oberfläche eines Sensorchips gekoppelt. Die Bindung eines Liganden kann daraufhin optisch über die Zunahme der Masse an der Sensoroberfläche gemessen werden, da diese zu einer Veränderung des Brechungsindex an der Oberfläche führt (Canziani et al., 1999).

Für die hier aufgeführten Plasmon-Resonanz-Spektroskopie-Experimente wurden die jeweiligen Immunophiline mit steigenden Mengen an Hsp90 vorinkubiert und dann auf den Sensorchip, an dem zuvor Hsp90 gekoppelt worden war, aufgebracht (siehe Abschnitt 2.8.1.). In diesem Assay reflektiert die detektierte Bindung an den Chip die Menge an Immunophilin, die immer noch frei in Lösung und somit bei einer bestimmten Hsp90-Konzentration nicht an Hsp90 gebunden vorliegt. Steigende Hsp90-Konzentrationen führen zu verringerten Mengen an Immunophilin in Lösung und somit zu geringeren Resonanzsignalen. Diese Signale wurden gegen die Hsp90-Konzentration aufgetragen und, wie in Abschnitt 2.8.1. beschrieben, gefittet (Abb. 3.1.4.1. und Tabelle 3.1.4.). Die Bindekonstanten, die daraus erhalten wurden, sind 71 nM für Cyp40, 23 nM für FKBP51 und 5,5 nM für FKBP52.

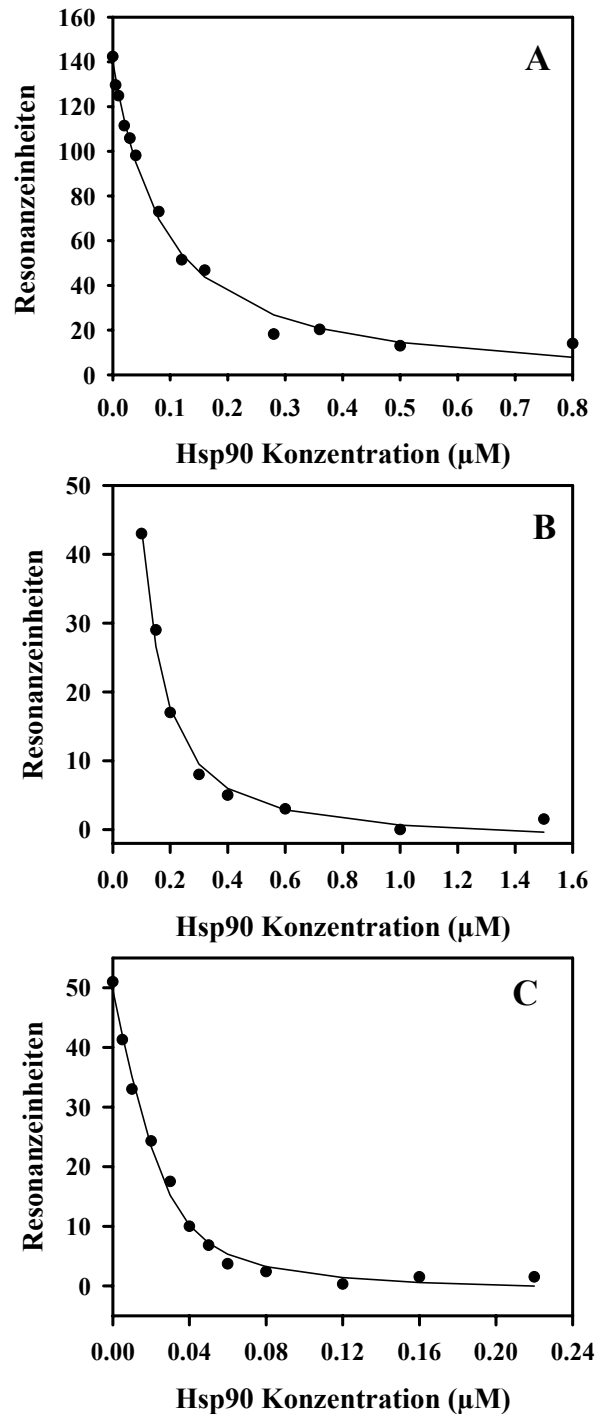


Abb. 3.1.4.1. Plasmon-Resonanz-Spektroskopie-Messungen der Bindung von Cyp40, FKBP51 und FKBP52 an Hsp90. Die Messungen wurden in 40 mM HEPES, pH 8,0 durchgeführt. Hsp90 war mittels Amidkopplung kovalent an den Chip gebunden worden. Komplexe zwischen einer variierenden Konzentration von Hsp90 und einer festen Konzentration an dem jeweiligen Immunophilin wurden bei Raumtemperatur vorinkubiert und dann auf den Chip aufgebracht. Gezeigt ist das jeweilige Bindungssignal in Resonanzeinheiten in Abhängigkeit von der Hsp90-Konzentration (●). Die durchgezogene Linie repräsentiert den jeweiligen Fit. A) Konkurrenztitration von 25 nM Cyp40 mit bis zu 800 nM Hsp90. B) Konkurrenztitration von 106 nM FKBP51 mit bis zu 150 nM Hsp90. C) Konkurrenztitration von 28 nM FKBP52 mit bis zu 220 nM Hsp90.

3.1.4.2. Isothermische Titrationskalorimetrie

Als weitere Methode, die Bindung der großen Immunophilinen an Hsp90 zu untersuchen, wurde Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) verwendet.

ITC ist die Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die die zuverlässigsten quantitativen Aussagen bietet. Sie misst die Bindung direkt anhand der Wärme, die bei der Assoziation eines Liganden mit seinem Bindungspartner frei wird. So können in einem einzigen Experiment die Werte für die Bindekonstante, die Bindungsstöchiometrie, und die Bindungsenthalpie bestimmt werden. Die Entropie der Bindung kann aus der Bindekonstante rechnerisch ermittelt werden (Pierce et al., 1999).

Die ITC-Messungen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben (Abschnitt 2.8.2.), durchgeführt. Für alle drei Immunophilinen waren die erhaltenen Bindungskurven sigmoid (Abb. 3.1.4.2.). Diese Form stimmt mit einer einfachen Zwei-Zustands-Assoziationsreaktion überein. Die Bindekonstanten, die diese Messungen ergaben, waren 226 nM für Cyp40, 174 nM für FKBP51 und 55 nM für FKBP52 (Abbildung 3.1.4.2. und Tabelle 3.1.4.). Die Bindungsreaktion beinhaltet verschiedene Beiträge von Enthalpie und Entropie, wobei die FKBP51-Bindung die günstigste Bindungsenthalpie ($\Delta H = -12$ kcal/mol), aber auch den ungünstigsten entropischen Bindungsanteil zeigte ($T\Delta S = -3$ kcal/mol). Im Gegensatz dazu weisen Cyp40 und FKBP52 zwar geringere Bindungsenthalpien auf, aber besonders für die Bindung von FKBP52 an Hsp90 ist der Beitrag der Entropie äußerst günstig ($T\Delta S = 1,7$ kcal/mol).

Die molare Stöchiometrie der Interaktion zwischen den großen Immunophilinen und Hsp90 wurde aus dem Mittelpunkt der Assoziationsreaktion ermittelt (Abb. 3.1.4.2.). Für die Bindung von einem Immunophilin pro Hsp90-Dimer würde man ein molares Verhältnis von 0,5 erwarten. Aus den ITC-Messungen ist jedoch für alle drei großen Immunophilinen ein molares Verhältnis von etwa 1 ersichtlich (Abb. 3.1.4.2. und Tabelle 3.1.4.), was stark darauf hinweist, dass ein Immunophilin Monomer pro Hsp90 Monomer bindet.

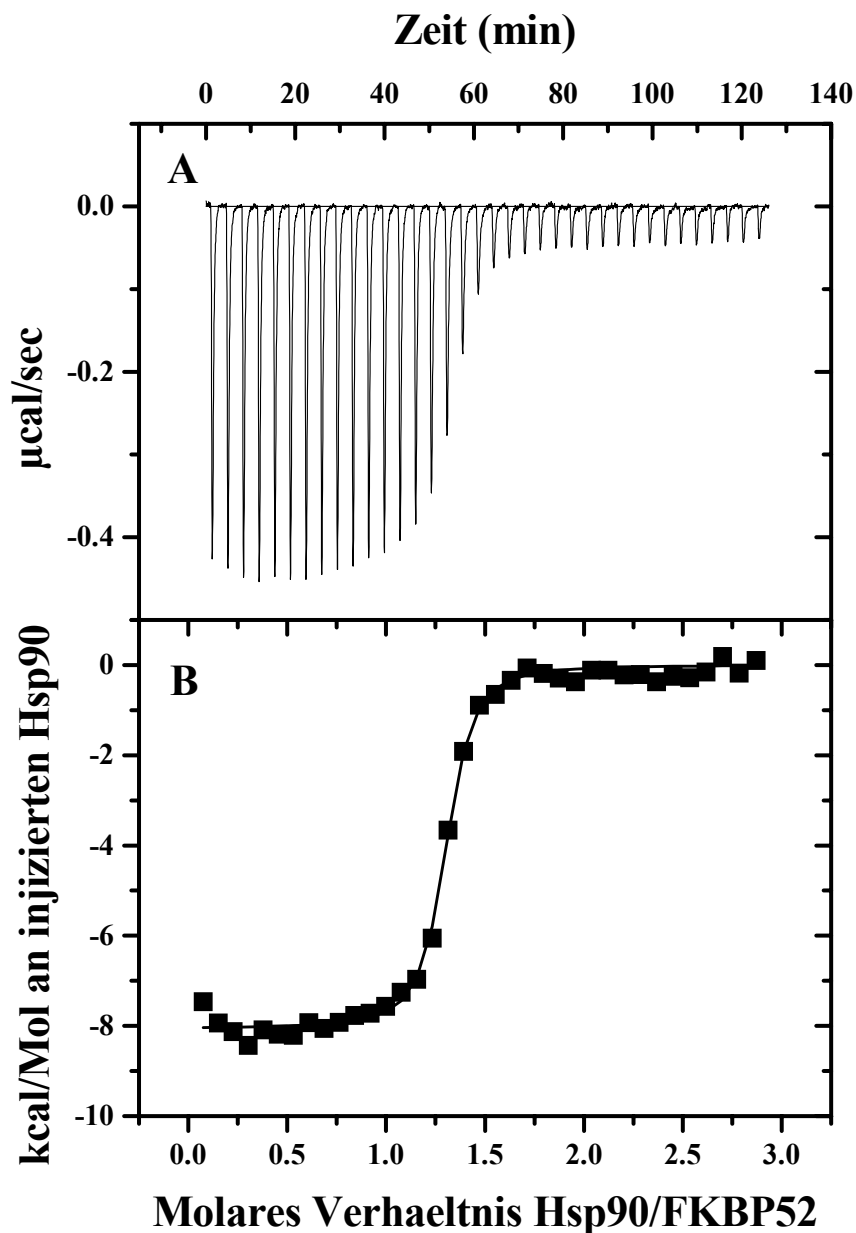


Abb. 3.1.4.2. A und B. ITC-Messungen der Interaktion von Cyp40, FKBP51 und FKBP52 mit Hsp90. Kalorimetrische Titration der großen Immunophiline mit Hsp90 in 40 mM Hepes, pH 8,0 bei einer Temperatur von 20°C. Das Experiment bestand aus bis zu 38 Injektionen von je 5 µl einer 320 µM Hsp90-Lösung. Hsp90 wurde in eine Probenzelle injiziert, die 15 µM des jeweiligen großen Immunophilins enthielt. Die Messungen wurden gemäß dem Modell einer Bindestelle mit der Origin Software gefittet. A) Messdaten, die den Unterschied zwischen der Proben- und der Referenz-Zelle während der 36 Injektionen von Hsp90 in die mit 15 µM FKBP52 gefüllte Probenzelle zeigen. B) Enthalpie pro Mol an injiziertem Hsp90 aufgetragen gegen das molare Verhältnis von injiziertem Hsp90 und FKBP52 in der Probenzelle.

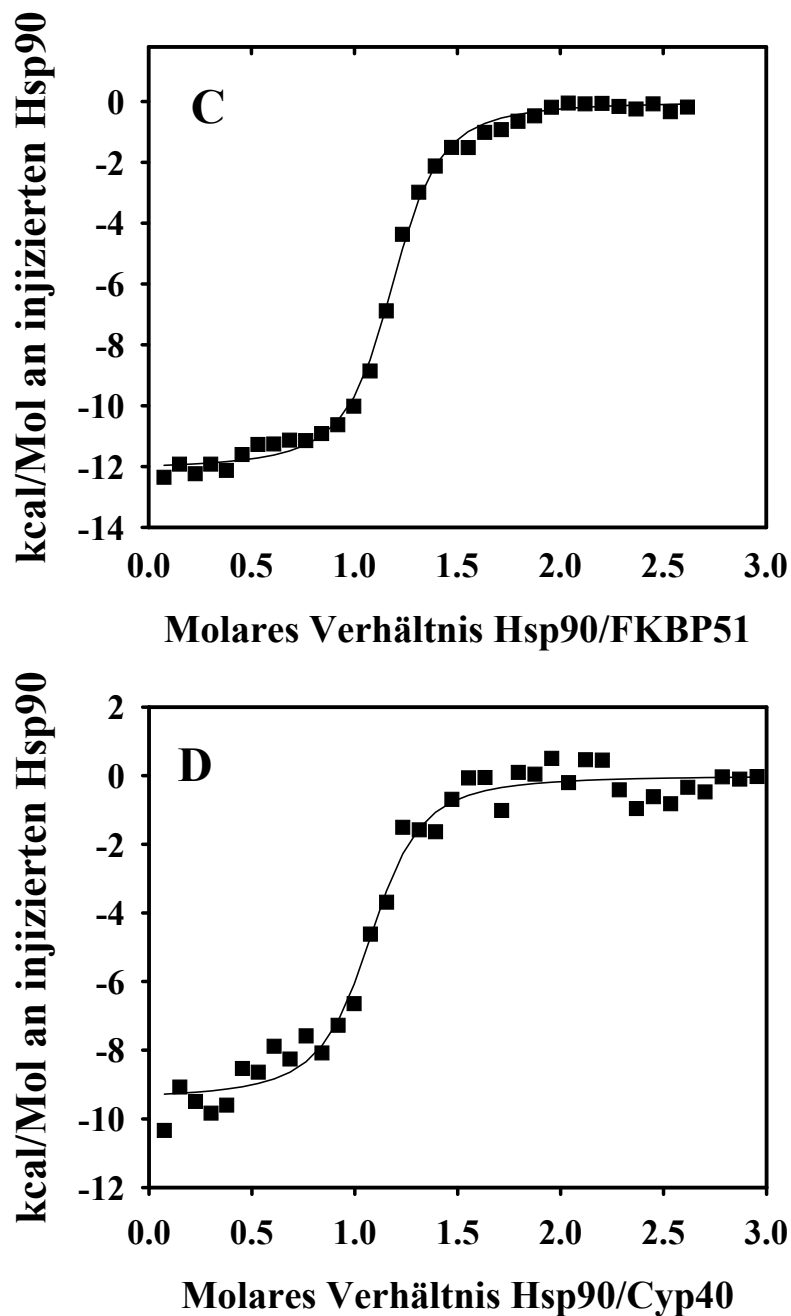


Abb. 3.1.4.2. C und D. ITC-Messungen der Interaktion von Cyp40, FKBP51 und FKBP52 mit Hsp90. Kalorimetrische Titration der großen Immunophilinen mit Hsp90 in 40 mM HEPES, pH 8,0 bei einer Temperatur von 20°C. C) Enthalpie pro Mol an injiziertem Hsp90 aufgetragen gegen das molare Verhältnis von injiziertem Hsp90 und FKBP51 in der Probenzelle. D) Enthalpie pro Mol an injiziertem Hsp90 aufgetragen gegen das molare Verhältnis von injiziertem Hsp90 und Cyp40 in der Probenzelle.

	Cyp40	FKBP51	FKBP52
BIAcore			
K_d	71 ± 8.7 nM	23 ± 5 nM	$5,5 \pm 1.1$ nM
ITC			
K_d	226 ± 61 nM	174 ± 28 nM	55 ± 7 nM
Anzahl der Bindestellen	$1,054 \pm 0.018$	$1,16 \pm 0,01$	$1,27 \pm 0,005$
ΔH	$-9,42 \pm 0,3$ kcal/mol	$-12 \pm 0,2$ kcal/mol	$-8,06 \pm 0,08$ kcal/mol
T ΔS	$-0,51$ kcal/mol	-3 kcal/mol	$1,7$ kcal/mol

Tabelle 3.1.4. Interaktion der großen Immunophilinen mit Hsp90. Zusammenfassung der aus den Fits der Oberflächen-Plasmonresonanz und ITC-Daten erhaltenen Bindekonstanten und Bindungsstöchiometrie.

3.1.5. Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerase Aktivität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40

3.1.5.1. PPIase-Aktivität im Peptidassay

Um die PPIase-Aktivität der großen menschlichen Immunophilinen zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Assays benutzt: 1) ein Peptidassay, der die Isomerisierung der Prolinpeptidbindung in einem Tetrapeptid untersucht, das an ein Paranitroanilid gebunden ist (dieser Assay wurde sowohl in seiner Protease-gekoppelten als auch in seiner Protease-freien Version durchgeführt), und, 2) der RCM-T1 Rückfaltungsassay, der die Prolinisomerisierung in einem Proteinsubstrat sichtbar macht. Die Messungen wurden, wie in Abschnitt 2.9. beschrieben, durchgeführt.

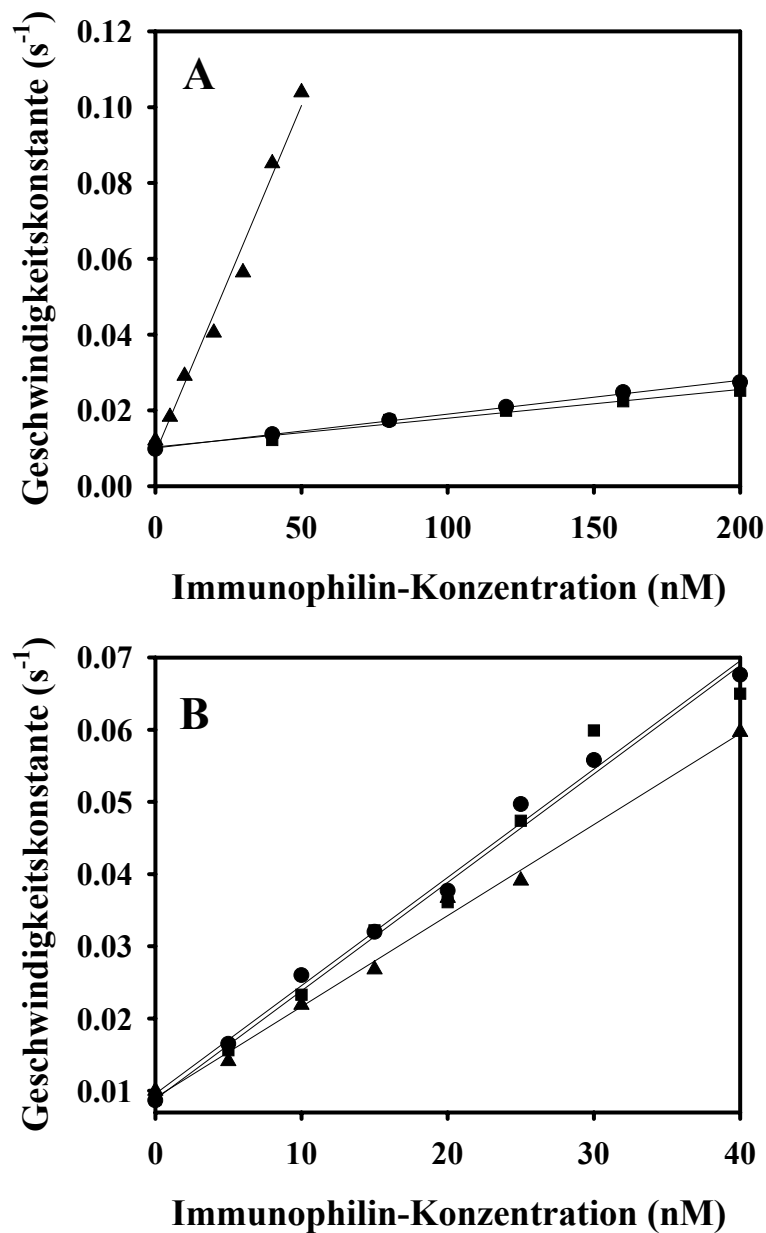


Abb. 3.1.5.1. PPIase-Aktivität der großen Immunophiline im Protease-gekoppelten Peptidassay. Geschwindigkeitskonstanten der Isomerisierung von synthetischen Peptiden als Funktion der PPIase-Konzentration. Die Messungen wurden in 40 mM HEPES, pH 7,5 bei 10°C ausgeführt. Die Isomerisierung wurde bei 390 nm verfolgt. Die Steigung der jeweiligen Geraden ist äquivalent zum in Tabelle 3.1.5. gezeigten k_{cat}/K_m -Wert. Einfluss von Cyp40 (▲), FKBP51 (■) und FKBP52 (●) auf die Isomerisierung des jeweiligen Tetrapeptids. A) Isomerisierung von Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. B) Isomerisierung von Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA.

Für den Peptidassay wurden in der Vergangenheit schon verschiedene Sequenzvarianten des Peptids Succinyl-Ala-X-Pro-Phe-pNA benutzt, um die Aktivität einer ganzen Reihe von PPIasen zu bestimmen. So wurde zum Beispiel bewiesen, dass Cyp18 in seiner katalytischen Aktivität sehr vielseitig ist und nur eine leichte Präferenz für Alanin in der X-Position aufweist. FKBP12, hingegen, scheint eine deutlich höhere Substratspezifität zu haben, wobei Leucin der bevorzugte Rest in der X-Position ist (Albers et al., 1990; Harrison und Stein, 1990b). Folglich wurden diese beiden Peptide verwendet, um die katalytische Effizienz von Cyp40, FKBP51 und FKBP52 zu vergleichen. Für alle drei großen Immunophilinen waren die resultierenden Kinetiken erster Ordnung und die Geschwindigkeitskonstanten stiegen linear mit der verwendeten Enzymkonzentration an. Die PPIase-Aktivität der beiden FKBP's konnte durch den spezifischen Inhibitor Rapamycin, aber nicht durch den Cyclophilininhibitor Cyclosporin A inhibiert werden, wohingegen Cyp40-Aktivität durch Cyclosporin A unterdrückt wurde, aber nicht durch Rapamycin (Daten nicht gezeigt).

In den Messungen mit dem Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA-Peptid (Abb. 3.1.5.1.A) hatte Cyp40 eine wesentlich höhere katalytische Aktivität ($k_{\text{cat}}/K_m = 1,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als FKBP51 und FKBP52, deren k_{cat}/K_m -Werte sehr ähnlich war ($7,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für FKBP51 und $8,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für FKBP52). Bei Verwendung des Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA-Peptids (Abb. 3.1.5.1.B) sank die katalytische Aktivität von Cyp40 auf einen k_{cat}/K_m -Wert von $1,24 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, wohingegen sich die Aktivität der beiden FKBP's deutlich erhöhte (k_{cat}/K_m von $1,45 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Somit katalysieren die FKBP's dieses Peptid fast 20 mal besser als das Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA-Peptid.

Die katalytische Aktivität, die hier für Cyp40 mit dem Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA - Peptid beobachtet wurde, ist vergleichbar mit dem in der Literatur für Cyp40 beschriebenen k_{cat}/K_m -Wert von $1,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Kieffer et al., 1992). Damit ist Cyp40 für beide Peptide viermal aktiver als sein Hefe Homologes Cpr6 und 26mal aktiver als Cpr7. Die katalytischen Aktivitäten der beiden FKBP's für das Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA-Peptid stimmen mit dem k_{cat}/K_m -Wert von $1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, der für Kaninchen FKBP52 schon beschrieben war (Chambraud et al., 1993), überein.

Zudem passen die katalytischen Aktivitäten gut zu denen, die für die jeweiligen Eindomänen-Immunophilinen FKBP12 und Cyp18 schon veröffentlicht sind (Albers et al., 1990; Harrison und Stein, 1990b; Schönbrunner et al., 1991) (Tabelle 3.1.5.).

Beim Protease-gekoppelten Test zur Bestimmung der PPIase-Aktivität ist es von Nachteil, dass Protease-sensitive Proteine als inaktiv oder nur schwach aktiv erscheinen können, weil sie durch die Hilfsprotease Chymotrypsin abgebaut werden (Scholz et al., 1997b). Das kann mit einer Protease-freien Variante des Peptidassays (Janowski et al., 1997) vermieden werden. Diese beruht auf unterschiedlichen UV/Vis Absorptionsspektren der cis/trans Isomere des Peptids nach einem Solvenswechsel von Trifluorethanol in wässrige Lösung und wurde, wie unter Abschnitt 2.9.2., beschrieben durchgeführt. Die k_{cat}/K_m -Werte beider Assays sind in Tabelle 3.1.5. aufgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die PPIase-Aktivität der drei großen Immunophilinen unabhängig von der Anwesenheit der Protease ist.

3.1.5.2. PPIase-Aktivität im RCM-T1 Rückfaltungsassay

Als Nächstes wurde der Einfluss der großen Immunophilinen auf die Prolinisierung in Peptidsubstraten getestet. Dazu wurde ein Assay verwendet, der die Rückfaltung einer reduzierten und S-carboxymethylierten S54G/P55N-Variante von RNase T₁ (RCM-T1) (Scholz et al., 1997a) untersucht. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der spontanen Rückfaltung von RCM-T1 ist die Isomerisierung der Tyr 38-Pro 39 Peptidbindung, die im nativen Zustand in der *cis*-Konformation vorliegt. Die Rückfaltungsreaktion folgt einer monoexponentiellen Kinetik.

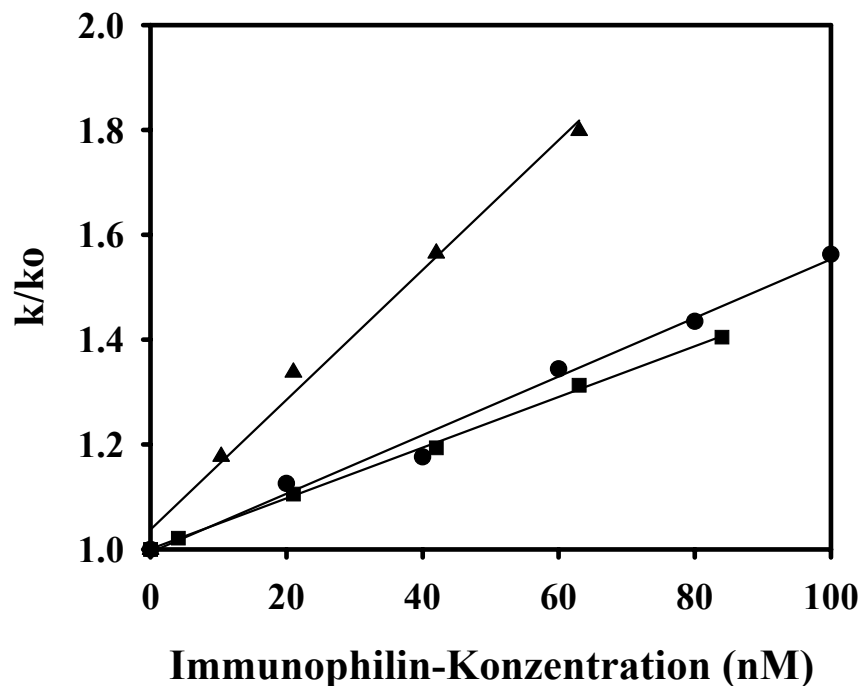


Abb. 3.1.5.2. Einfluss von Cyp40, FKBP51 und FKBP52 auf die Rückfaltung von RCM-T1. Das Verhältnis von beobachteter Geschwindigkeitskonstante der RCM-T1 Rückfaltung in Anwesenheit (k) und in Abwesenheit (k_0) von Cyp40 (▲), FKBP51 (■) und FKBP52 (●) ist gegen die jeweilige Immunophilin-Konzentration aufgetragen. Die k_{cat}/K_m -Werte, wie in Tabelle 3.1.5. zusammengefasst, wurde durch die Multiplikation der Steigung der Ausgleichsgeraden mit k_0 erhalten.

Ähnlich wie im Peptidassay kann die Rückfaltungsgeschwindigkeit von RCM-T1 durch die Zugabe von PPIasen beschleunigt werden. Mit diesem Assay wurden k_{cat}/K_m -Werte von $7,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Cyp18 und FKBP12 erhalten (Scholz et al., 1997b und Tabelle 3.1.5.). In Anwesenheit von Cyp40, FKBP51 und FKBP52 stieg die Rückfaltungsgeschwindigkeit von RCM-T1 linear mit steigenden Konzentrationen von Immunophilin (Abb.3.1.5.2.).

PPIase	k_{cat}/K_m im Peptidassay mit Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	k_{cat}/K_m im Peptidassay mit Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA	k_{cat}/K_m im RCM-T1 Rückfaltungsassay
hCyp40	$1,8 \pm 0,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,24 \pm 0,18 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$2,3 \pm 0,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
hFKBP51	$7,6 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,45 \pm 0,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$8,02 \pm 0,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
hFKBP52	$8,5 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,45 \pm 0,24 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$8,9 \pm 0,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
hCyp18	$5,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Schönbrunner et al., 1990)	-	$7,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Scholz et al., 1997a)
hFKBP12	$0,21 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Albers et al., 1990)	$2,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Albers et al., 1990)	$1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Scholz et al., 1997a)
hCyp40	$1,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Kieffer et al., 1992)	-	-
rFKBP52	-	$1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Chambraud et al., 1993)	-
yCpr6	$4,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mayr et al., 2000)	$3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mayr et al., 2000)	$3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mayr et al., 2000)
yCpr7	$0,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mayr et al., 2000)	$0,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mayr et al., 2000)	$0,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Mayr et al., 2000)

Tabelle 3.1.5. PPIase-Aktivität der großen Immunophiline. Die PPIase-Aktivität wurde wie in Material und Methoden beschrieben gemessen. Die k_{cat}/K_m -Werte wurden anhand der Steigungen der jeweiligen Ausgleichsgeraden ermittelt, wie in Abbildungen 3.1.5.1. und 3.1.5.2. gezeigt. Zum Vergleich sind Literaturwerte angegeben.

Auch hier war die katalytische Aktivität der beiden FKBP5s mit k_{cat}/K_m -Werten von $8,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beziehungsweise $8,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für FKBP52 beziehungsweise FKBP51 sehr ähnlich. Cyp40 zeigte einen k_{cat}/K_m -Wert von $2,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und war damit auch in diesem Assay ein besserer Faltungskatalysator als die beiden FKBP5s (Abb. 3.1.5.2. und Tabelle 3.1.5.). Im Vergleich mit seinen Hefe Homologen Cpr6 und Cpr7 (Mayr et al., 2000), zeigt Cyp40 eine etwas geringere katalytische Aktivität als Cpr6, ist dafür aber fast 6 mal aktiver als Cpr7.

Insgesamt sind die katalytischen Aktivitäten der großen humanen Immunophilinen etwa um den Faktor 2-3 geringer als die der jeweiligen kleinen Immunophilinen Cyp18 und FKBP12 (Tabelle 3.1.5.). Das weist im Allgemeinen auf vergleichbare Aktivitäten hin.

3.1.6. Aktivität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40 als molekulare Chaperone

Für Kaninchen FKBP52 konnte schon früher gezeigt werden, dass es die Aggregation von Citratsynthase (CS) *in vitro* hemmt (Bose et al., 1996) und eine GST-getagte Version von humanem Cyp40 hielt β -Galactosidase in einen rückfaltungskompetenten Zustand (Freeman et al., 1996). Zudem weisen auch die Hefe Cyp40-Homologe, Cpr6 und Cpr7, Chaperon-Aktivität auf (Mayr et al., 2000).

Im folgenden wurden die Chaperon-Eigenschaften der drei großen Immunophilinen erstmals im CS-Assay (siehe Abschnitt 2.10 und Buchner et al., 1998b) verglichen. CS aggregiert bei Temperaturen über 37°C innerhalb einer Stunde. Bei 40°C führte ein zweifacher Überschuss an FKBP52 zu einer deutlichen Reduzierung der CS-Aggregation. Halbmaximale Aggregation fand bei einem fünffachen Überschuss von FKBP52 statt und ein vierzehnfach molarer Überschuss von FKBP52 wurde benötigt, um die CS-Aggregation vollständig zu unterdrücken (Abb. 3.1.6.A).

Unter denselben Bedingungen hatte FKBP51 einen weitaus größeren Effekt auf die Aggregation von CS (Abb. 3.1.6.B). Hier reichten schon substöchiometrische Mengen des Chaperons (0,75 FKBP51 Moleküle zu 1 CS Monomer), um die Aggregation auf halbmaximale Werte zu reduzieren. Durch Zugabe eines fünffach molaren Überschusses wurde die Aggregation vollständig unterdrückt. IgG, das unter denselben Bedingungen als Kontrolle verwendet wurde, um nichtspezifischen Proteineffekte auszuschließen, hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die CS-Aggregation (Abb. 3.1.6.A).

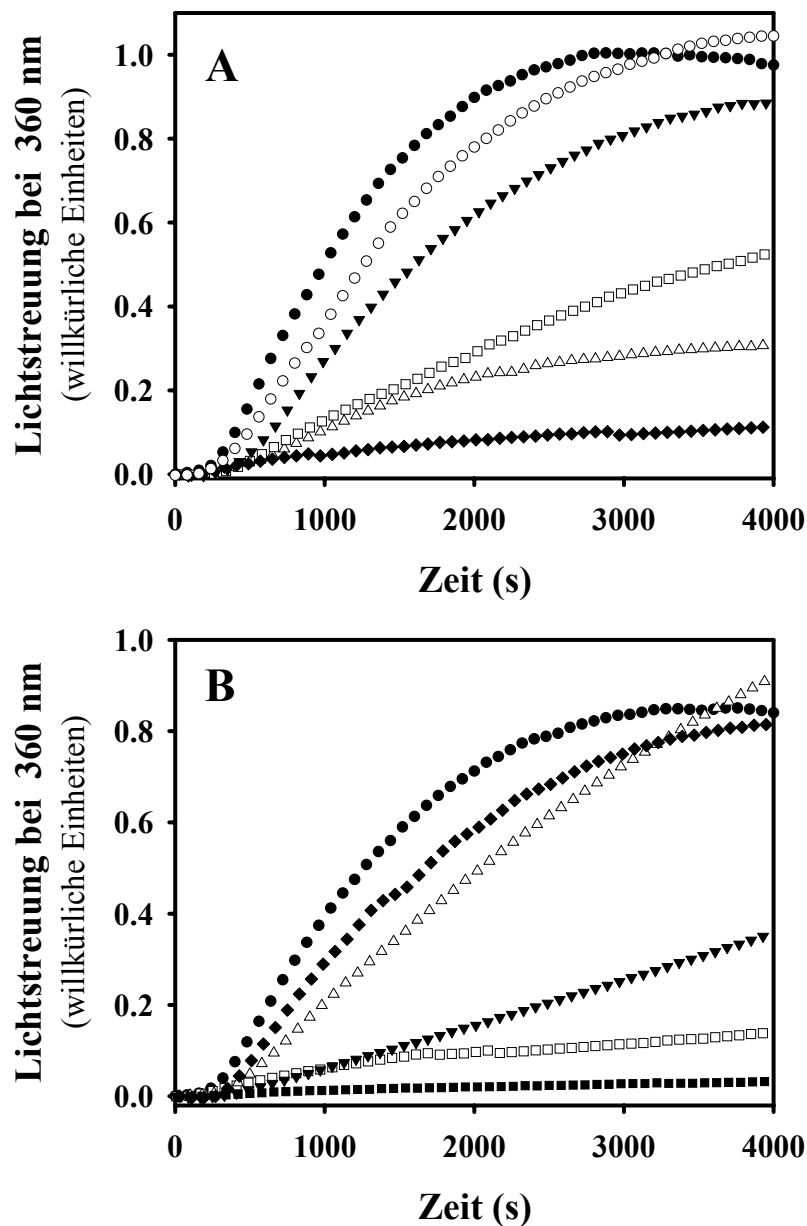


Abb. 3.1.6. A und B. Einfluss von FKBP51, FKBP52 und Cyp40 auf die thermische Aggregation von Citratsynthase (CS).

Eine 3 μM CS-Probe (Monomer) wurde bei 40°C in 40 mM Hepes, pH 7,5 eine Stunde lang inkubiert. Die Aggregation wurde über die Trübung bei 360 nm in Abwesenheit und Anwesenheit von zusätzlichen Komponenten wie in Material und Methoden beschrieben (Abschnitt 2.10.) verfolgt. A) Einfluss von FKBP52. CS-Aggregation wurde in Abwesenheit (\bullet) von zusätzlichen Komponenten und in Anwesenheit von 6 μM (\blacktriangledown), 15 μM (\square), 30 μM (\triangle) und 42 μM (\blacklozenge) FKBP52 gemessen. Zusatz von 1,7 mg/ml IgG (O) anstelle von FKBP52 wurde als Negativkontrolle verwendet. B) Einfluss von FKBP51. CS-Aggregation wurde verfolgt in Abwesenheit (\bullet) von zusätzlichen Komponenten und in Anwesenheit von 0,75 μM (\blacklozenge), 1,5 μM (\triangle), 2,25 μM (\blacktriangledown), 3 μM (\square) und 15 μM (\blacksquare) FKBP51.

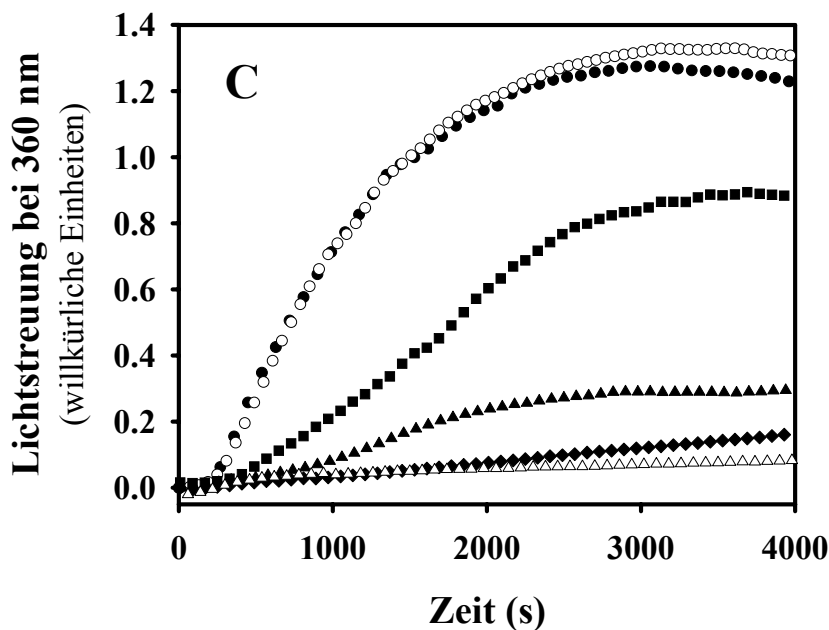


Abb. 3.1.6. C. Einfluss von FKBP51, FKBP52 und Cyp40 auf die thermische Aggregation von Citratsynthase (CS) .

Eine 3 μM CS-Probe (Monomer) wurde bei 40°C in 40 mM Hepes, pH 7,5 eine Stunde lang inkubiert. Die Aggregation wurde über die Trübung bei 360 nm in Abwesenheit und Anwesenheit von zusätzlichen Komponenten wie in Material und Methoden beschrieben (Abschnitt 2.10.) verfolgt.

C) Einfluss von Cyp40. CS-Aggregation wurde verfolgt in Abwesenheit (●) von zusätzlichen Komponenten und in Anwesenheit von 0,75 μM (■), 1,5 μM (▲), 3 μM (◆) und 15 μM (Δ) GST-Cyp40. Zugabe von 15 μM GST alleine (O) anstelle von GST-Cyp40 wurde als Negativkontrolle benutzt.

Da His-getagtes Cyp40 unter den Bedingungen, die für den CS-Assay benutzt wurden, nicht stabil war, wurde diese Messung mit der stabileren GST-getagten Variante von Cyp40, die auch von Freedman et al. (1996) benutzt wurde, durchgeführt. Im CS-Assay unterdrückte GST-Cyp40 die Aggregation in ähnlicher Weise wie FKBP51, so dass bei einem äquimolaren Verhältnis von CS zu GST-Cyp40 fast vollständige Unterdrückung der Aggregation beobachtet werden konnte (Abb. 3.1.6.C). Ein Überschuss an GST alleine, das als Negativkontrolle diente, hatte keinerlei Einfluss auf die thermisch induzierte Aggregation von CS (Abb. 3.1.6.C).

Folglich binden alle drei großen Immunophilinen spezifisch an nicht-native Proteine und agieren als Chaperon, wobei FKBP51 und Cyp40 höhere Aktivität zeigen als FKBP52.

3.2. Lokalisation von funktionellen Einheiten der großen Immunophiline anhand von Fragmenten von FKBP52

3.2.1. Planung und Reinigung der einzelnen Fragmente

Wie bereits in Abschnitt 3.1. gezeigt, besitzen große Immunophiline sowohl PPIase- als auch Chaperon-Aktivität. Um zu untersuchen, welche Regionen des großen Immunophilins für welche Aktivität verantwortlich sind, wurden Fragmente von FKBP52, dem bisher am besten charakterisierten der drei großen Immunophiline, hergestellt. Diese wurden in Anlehnung an eine „Hydrophobic Cluster Analysis“ (Callebaut et al., 1992) gewählt und sind in Abbildung 3.2.1.2. dargestellt. FKBP52 besteht aus vier Domänen, die jeweils durch kurze hydrophile Linkerregionen voneinander getrennt sind (Callebaut et al., 1992).

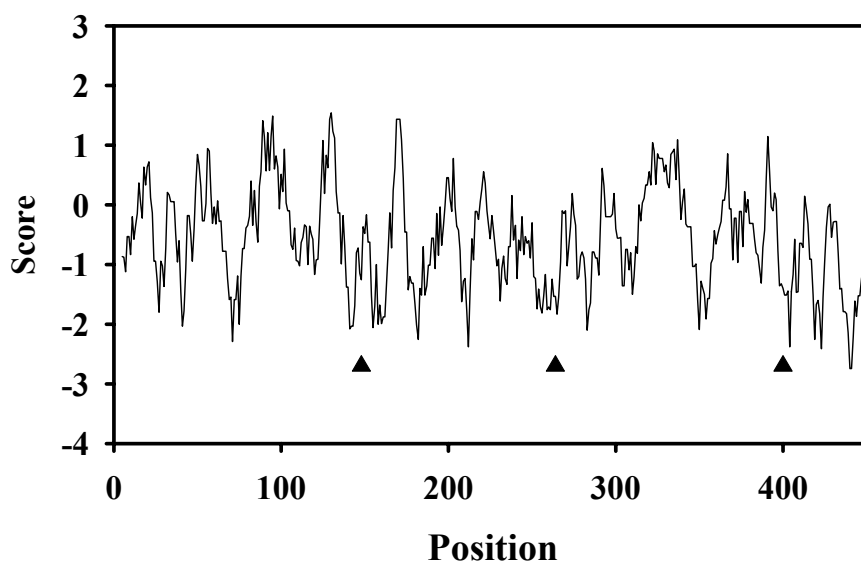


Abb. 3.2.1.1. Hydrophathieplot von Kaninchen FKBP52. Die Domänengrenzen zwischen den jeweiligen Fragmenten sind mit Pfeilspitzen eingezeichnet. Ermittelt gemäß Kyte und Doolittle (1982) mit dem ProtScale Tool (siehe 3.1.).

Experimente mit limitierter Proteolyse und Hydrophathieplots (Abb. 3.2.1.1.) (Kyte und Doolittle, 1982) bestätigten die so erhaltenen Domänengrenzen. Fragment FKBP52-1 (1-148) hat 55% Aminosäurehomologie (Lebeau et al., 1992) und 49% Aminosäureidentität (Callebaut et al., 1992) mit FKBP12 und beinhaltet die PPIase-Aktivität (Chambrud et al., 1993). FKBP52-234 (149-458) entspricht einem Fragment, dem nur die PPIase-Domäne fehlt.

FKBP52-12 (1-263) besteht aus den Domänen 1 und 2. Ihm fehlen die TPR Regionen, die für die Bindung an Hsp90 verantwortlich sind, und das Calmodulin-Bindemotiv. FKBP52-123 (1-400) fehlt nur das Calmodulin-Bindemotiv. Diese vier Fragmente und das Volllängenprotein wurden sowohl hinsichtlich ihrer Struktur und Stabilität als auch im Bezug auf PPIase- und Chaperon-Aktivität untersucht.

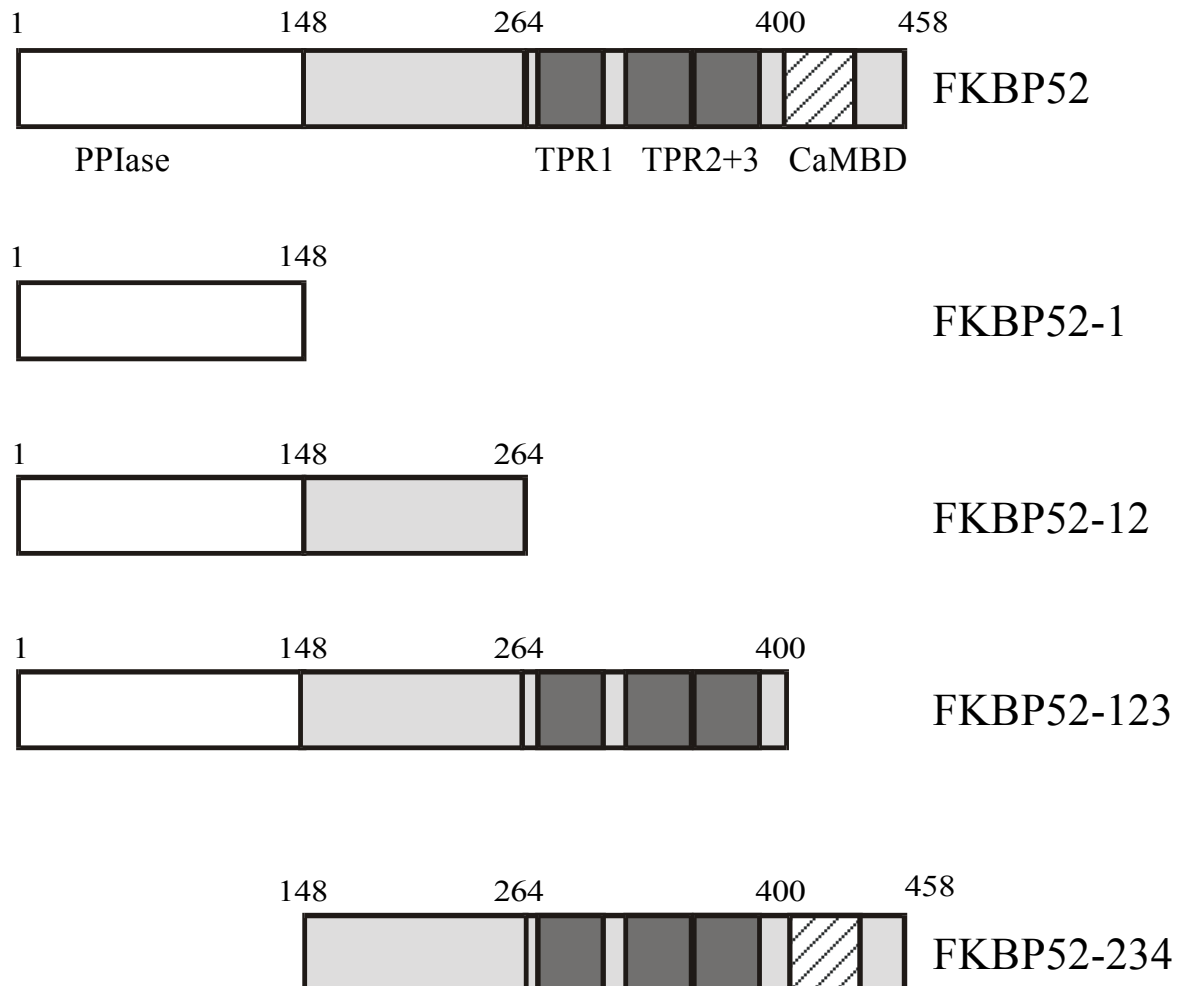


Abb. 3.2.1.2. Schematische Darstellung der verwendeten Fragmente von FKBP52. Die PPIase-Domäne ist in weiß dargestellt, die jeweiligen TPR-Regionen sind dunkelgrau und die Calmodulin-Bindestelle (CaMBD) ist gestreift. Die Domänengrenzen sind durch Aminosäurenummern gekennzeichnet. Für die in hellgrau dargestellten Domänen ist bisher keine bestimmte Funktion oder Homologie bekannt.

Die Expression und Reinigung von FKBP52 aus Kaninchen und seinen Fragmenten verlief analog zu der von humanem FKBP52, wie in Abschnitt 2.3. von Material und Methoden sowie in Abschnitt 3.1.2. der Ergebnis-Sektion erläutert. Alle Fragmente konnten löslich exprimiert und zur Homogenität gereinigt werden. Die Ausbeute betrug zwischen 5 und 11 mg Protein pro g Zellnassgewicht. Lediglich für FKBP52-234 wurde nur eine Ausbeute von unter 1 mg pro g Zellnassgewicht erreicht. Dieses Fragment zeigte eine starke Neigung

zur Aggregation. Auch nach Zusatz von 5% Glycerin konnte keine höhere Konzentration als 0,5 mg/ml erreicht werden, ohne Aggregation zu induzieren. Zudem aggregierte es bei Transfer in Hepespuffer.

Die Reinigung von Fragmenten, die nur die Domänen 2 oder 3 enthielten, erwies sich in Übereinstimmung mit den bereits geringen Ausbeuten bei Expression und Reinigung als GST-Fusionsproteine (Chambraud et al., 1993; eigene Daten nicht gezeigt) als nicht möglich.

3.2.2. Struktur und Stabilität der FKBP52-Fragmente

Um strukturelle Informationen zu den FKBP52-Fragmenten zu erhalten, wurden Fern-UV-CD-Spektren, wie in Material und Methoden (Abschnitt 2.5.3.) beschrieben, aufgenommen. Die dabei erhaltenen Spektren (Abb. 3.2.2.1.) können grob in zwei Klassen eingeteilt werden: eine mit einem hohen Anteil und eine mit einem niedrigen Anteil an α -helikaler Struktur. Die Spektren von FKBP52, FKBP52-123 und FKBP53-234 sind ähnlich. Sie besitzen zwei deutliche Minima bei 208 nm und bei 222 nm mit Signalintensitäten von -8000 bis -14000 $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, was typisch für α -helikale Struktur ist. Das Spektrum mit der höchsten Signalintensität bei 222 nm in dieser Gruppe ist das von FKBP52-234. Das Spektrum von FKBP52-123 hat hier die niedrigste Intensität. Die Spektren der zweiten Gruppe zeigen einen sehr geringen Anteil an helikaler Struktur. Im Fern-UV-CD-Spektrum von FKBP52-12 sind die Minima bei 208 nm und 222 nm nur noch schwach ausgebildet. Die Form des Spektrums von FKBP52-1 ist vollkommen anders, mit zwei Minima bei 205 nm und 225 nm und einem Maximum bei 220 nm. Ein solches Maximum deutet auf eine Region im Protein hin, in der sich aromatische Aminosäuren (besonders Phenylalanine) in starker räumlicher Nachbarschaft befinden und mit ihrem Signal der Sekundärstruktur überlagern (Chakrabartty et al., 1993).

Aus der Elliptizität der Spektren wurde, wie unter Abschnitt 2.5.3. beschrieben, der Gehalt an α -Helices für die jeweiligen Fragmente bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2.2. zusammengefasst. FKBP52 und FKBP52-123 haben gemäß CDNN-Software einen α -Helix-Anteil von 30% beziehungsweise 26%, wohingegen FKBP52-234 36% α -Helix aufweist. FKBP52-1 und FKBP52-12 haben einen sehr ähnlichen Anteil an α -Helix von 12% beziehungsweise 13%.

Bei Auswertung nach Forood et al. (1993) waren die α -Helix Anteile jeweils um circa 5% niedriger (vgl. Tabelle 3.2.2.).

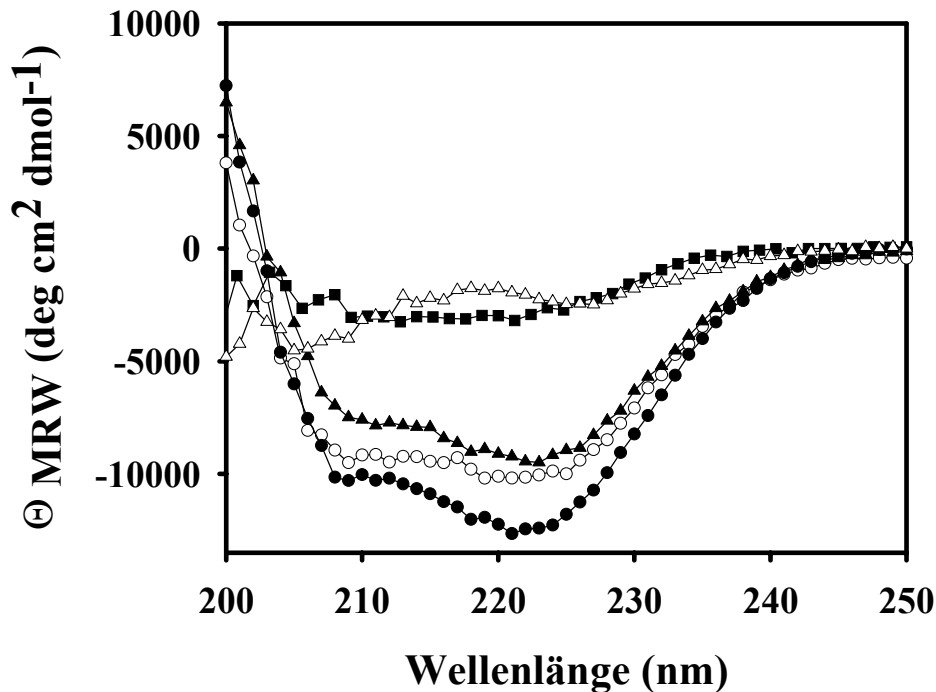


Abb. 3.2.2.1 Sekundärstruktur der FKBP52-Fragmente. Fern-UV-CD Spektren für FKBP52 (○), FKBP52-1 (△), FKBP52-12 (■), FKBP52-123 (▲) und FKBP52-234 (●) wurden bei 20°C in 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 aufgenommen. Alle Spektren sind pufferkorrigiert. Die Proteinkonzentration betrug 0,3 mg/ml.

Anzumerken ist dabei, dass es aufgrund des Maximums bei 220 nm für FKBP52-1 schwierig zu entscheiden ist, ob der errechnete α -Helix-Gehalt nicht etwas zu niedrig ist, da das Signal bei 222 nm vom dem Maximum überlagert werden könnte. Deutlich ist jedoch, dass sowohl FKBP52-1 als auch FKBP52-12 einen wesentlich niedrigeren α -Helix-Gehalt haben als die restlichen Fragmente. Das Fragment mit dem höchsten α -Helix-Gehalt ist FKBP52-234. Dies gibt Grund zur Annahme, dass der Hauptteil der α -helikalen Struktur auf die Domänen 3 und 4 und somit auf die C-terminalen 200 Aminosäuren zurückgeht, wohingegen Domänen 1 und 2 hauptsächlich aus β -Struktur bestehen. Sowohl die TPR-Regionen (Das et al., 1998; Scheufler et al., 2000) als auch die Calmodulinbindestelle (O'Neil und DeGrado, 1990) helikal sind, während die zu FKBP12 homologe Domäne 1 nur geringen Helixgehalt hat (Crăescu et al., 1996).

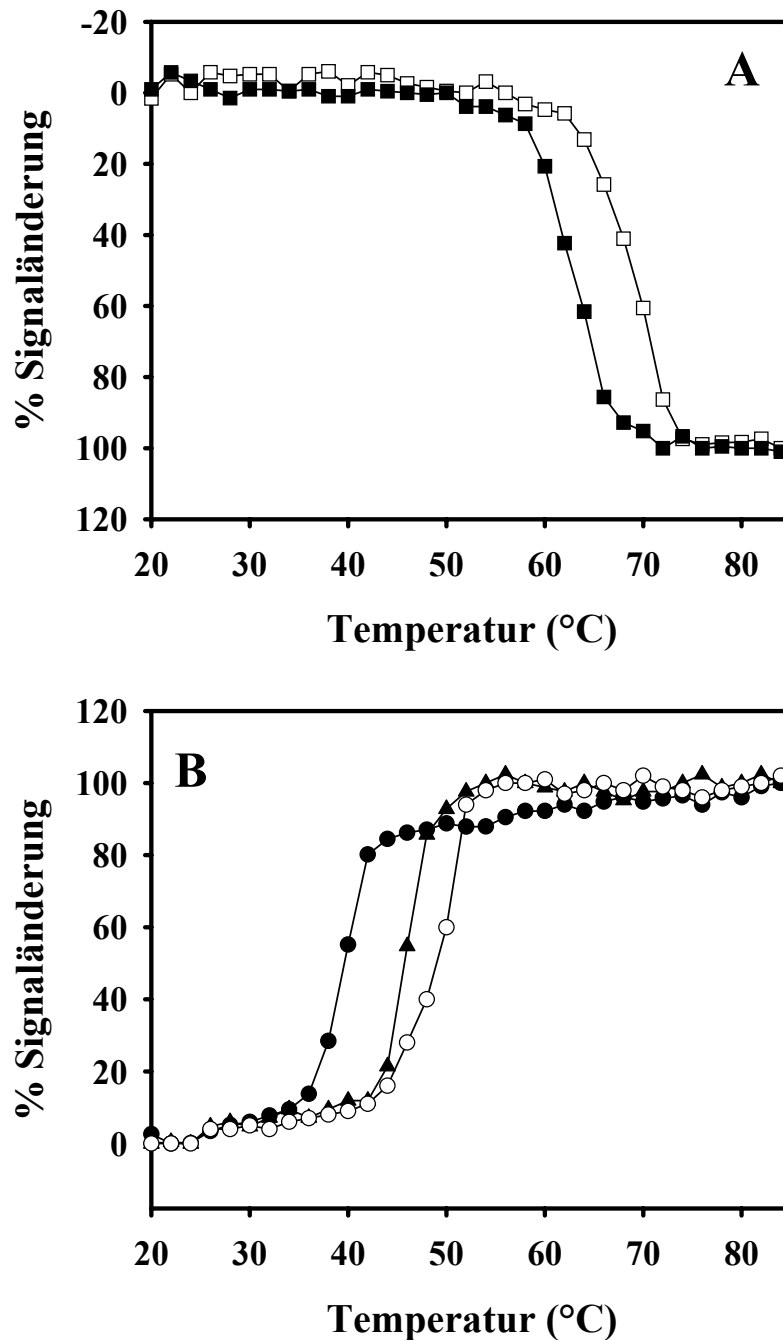


Abb. 3.2.2.2. Stabilität der FKBP52-Fragmenten gegenüber thermischer Denaturierung. Gezeigt ist die thermische Entfaltung in 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, bei einer Heizrate von 1°C/Minute. A) Thermoübergang von FKBP52-1 (□) und FKBP52-12 (■). Die Veränderung der Elliptizität wurde bei einer Wellenlänge von 215 nm gemessen. B) Thermoübergang von FKBP52 (○), FKBP52-123 (▲) und FKBP52-234 (●). Die Veränderung der Elliptizität wurde bei einer Wellenlänge von 222 nm gemessen.

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität wurden Fern-UV-CD-Temperaturübergänge gemessen (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.6.2.). Die erhaltenen Übergänge sind in Abbildung 3.2.2.2. gezeigt und in Tabelle 3.2.2. zusammengefasst. Die Übergänge für FKBP52, FKBP52-123 und FKBP53-234 wurden bei einer Wellenlänge von 222 nm gemessen. Die Signalintensität nahm bei der Entfaltung beziehungsweise Aggregation des Fragmentes deutlich ab. Die Übergänge von FKBP52-1 und FKBP52-12 wurden bei 215 nm aufgezeichnet, wo sich die Entfaltung in einer leichten Signalzunahme äußerte. Das Fragment mit der größten thermischen Stabilität ist FKBP52-1 mit einem Übergangsmittelpunkt bei 68°C. Es ist circa 3°C stabiler als FKBP12. Relativ ähnlich in seiner Stabilität war FKBP52-12 mit einem Mittelpunkt von 63°C. FKBP52 und FKBP52-123 waren mit T_{ms} von 49°C beziehungsweise 43°C schon deutlich instabiler und FKBP52-234 ist das instabilste Konstrukt. Es weist einen Übergangsmittelpunkt von 39°C auf und sein Übergang ist kooperativer als der der anderen Fragmente.

Fragment	α -Helix Gehalt nach CDNN	α -Helix Gehalt nach Forood et al., 1993	T_m
FKBP52	30%	25%	49°C
FKBP52-1	12%	5%	68°C
FKBP52-12	13%	8%	63°C
FKBP52-123	26%	26%	46°C
FKBP52-234	36%	36%	39°C

Tabelle 3.2.2. α -Helix Gehalt und Übergangsmittelpunkt T_m der jeweiligen FKBP52-Fragmente. Zusammenfassung der Auswertung der in den Abbildungen 3.2.2.1. und 3.2.2.2. gezeigten Daten.

Zusammengenommen lassen diese Daten darauf schließen, dass die letzten 200 Aminosäuren, die aus den TPR-Regionen und dem Calmodulin-Bindemotiv bestehen und den höchsten α -Helix-Gehalt besitzen, auch für die erhöhte Thermolabilität der jeweiligen Fragmente

verantwortlich sind. Domäne 1 dagegen ist selbst sehr stabil gegen thermische Denaturierung und verleiht dem Protein zusätzliche Stabilität.

3.2.3. Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerase-Aktivität der FKBP52-Fragmente

3.2.3.1. PPIase-Aktivität im Peptidassay

Die PPIase-Aktivität von mehreren Fragmenten von FKBP52, die als GST-Fusionen exprimiert und gereinigt worden waren, war schon 1993 anhand des Protease-gekoppelten Peptidassays untersucht worden (Chambraud et al., 1993). Die Ergebnisse der Studie wiesen darauf hin, dass Domäne 1 hauptsächlich für die PPIase-Aktivität von FKBP52 verantwortlich ist. Darüber hinaus berichteten die Autoren von sehr geringer PPIase-Aktivität bei FKBP52-2.

Um Effekte der Helferprotease Chymotrypsin auf die Aktivität von FKBP52 ausschließen zu können, wurde der Assay sowohl in seiner Protease-gekoppelten (Fischer et al., 1984) wie auch in seiner Protease-freien Variante (Janowski et al., 1997; Abb. 3.2.3.1.) durchgeführt. Als Tetrapeptidsubstrat wurde Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA benutzt, da seine Isomerisierung von FKBP52 am effizientesten katalysiert wird (Albers et al., 1990; Harrison und Stein, 1990b). Der Assay wurde, wie in Abschnitt 2.9.2. beschrieben, durchgeführt. Da FKBP52-234 in HEPES aggregationslabil ist, wurde stattdessen 50 mM Tris als Assaypuffer verwendet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.3.1. gezeigt und in Tabelle 3.2.3. zusammengefasst. Alle Fragmente, die Domäne 1 enthielten, zeigten k_{cat}/K_m -Werte von $1,25$ bis $1,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in beiden Assayvarianten. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Protease im Protease-gekoppelten Assay die Region inaktiviert, die für die PPIase-Aktivität verantwortlich ist. Die katalytische Aktivität für FKBP52 und alle Fragmente, die Domäne 1 enthalten, entspricht der der großen humanen FKBP52s ($1,45 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; siehe Abschnitt 3.1.5.1.) und der von FKBP12 ($2,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Albers et al., 1990). FKBP52-234 zeigte in keinem der Peptidassays PPIase-Aktivität (Abb. 3.2.3.1. und Tabelle 3.2.3.).

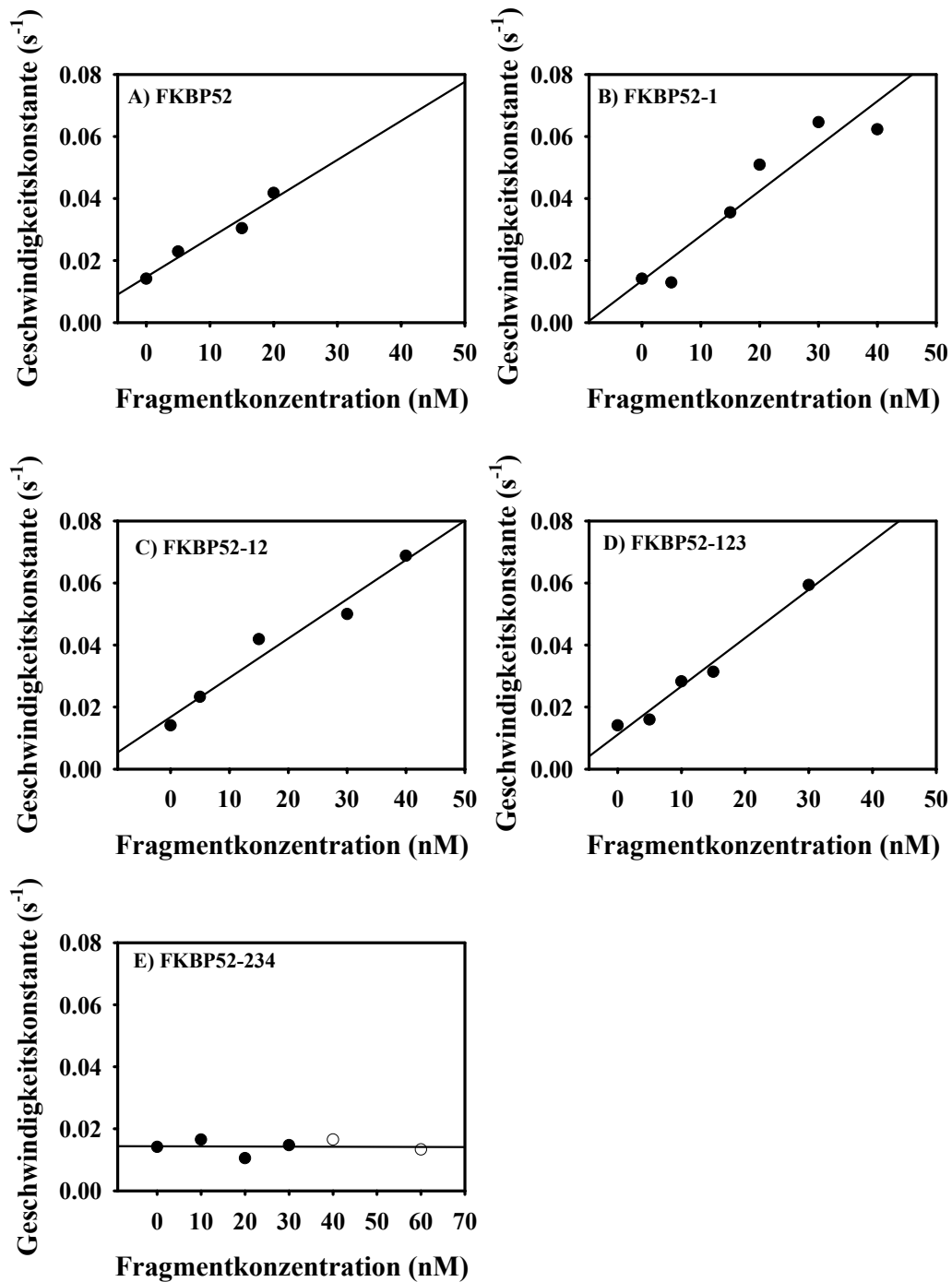


Abb. 3.2.3.1. PPIase-Aktivität im Protease-freien Peptidassay. Die Geschwindigkeitskonstanten der Isomerisierung des synthetischen Peptids Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA sind gegen die Fragmentkonzentration aufgetragen. Die Experimente wurden in 50 mM Tris, pH 7,5 durchgeführt. Die Isomerisierung wurde anhand der Absorptionsabnahme bei 330 nm verfolgt. Die Steigung der jeweiligen Gerade ist äquivalent zu dem $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert, der in Tabelle 3.2.3. angegeben ist. A) FKBP52. B) FKBP52-1. C) FKBP52-12. D) FKBP52-123. E) FKBP52-234.

3.2.3.2. PPIase-Aktivität im RCM-T1 Rückfaltungsassay

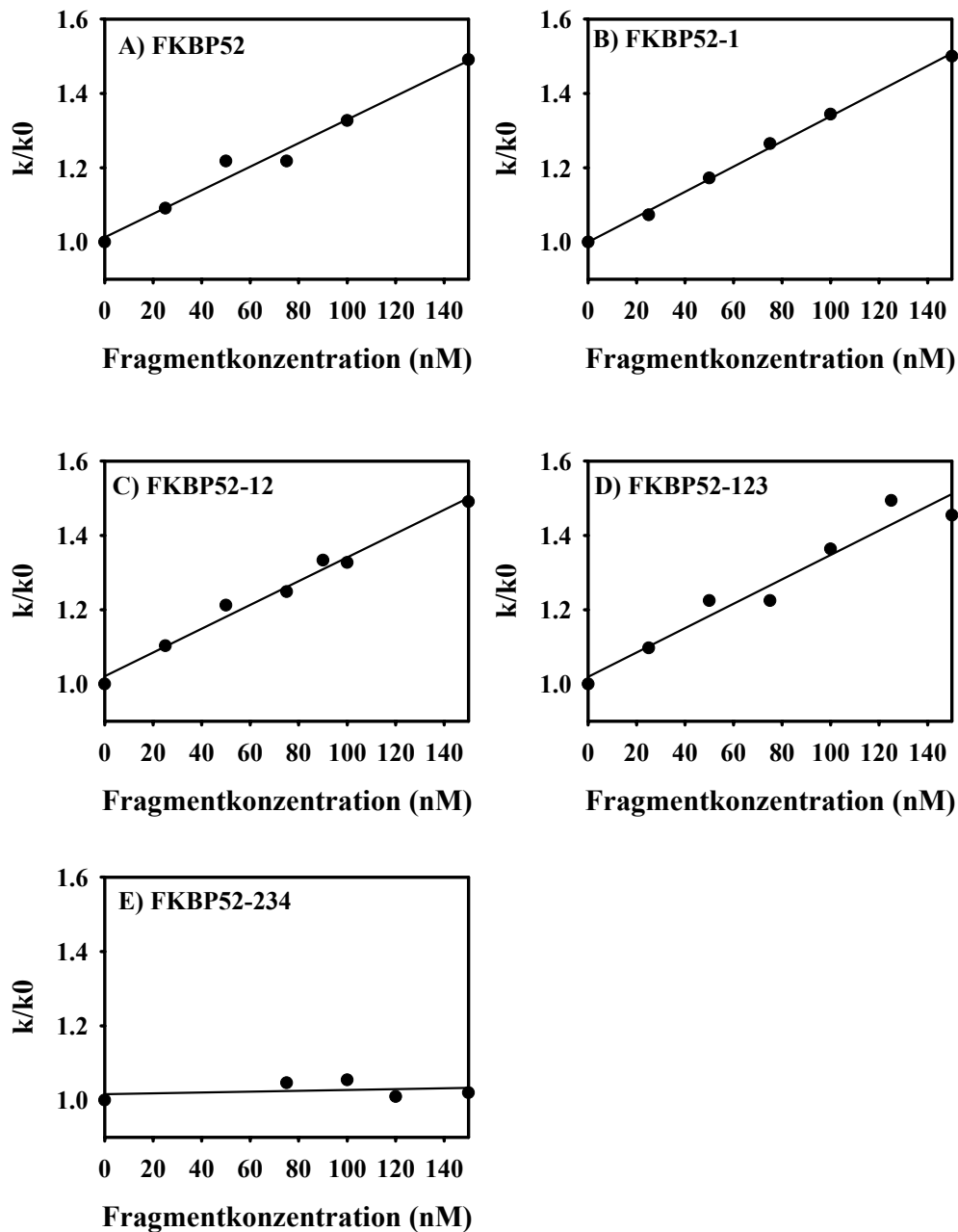


Abb. 3.2.3.2. PPIase-Aktivität der FKBP52-Fragmente in der Rückfaltung von RCM-T1. Die Graphen zeigen Messungen in Anwesenheit (k) und in Abwesenheit (k_0) von FKBP52-Fragmenten in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragmentkonzentration. Der k_{cat}/K_m -Wert wurde berechnet durch Multiplikation des Steigung der jeweiligen linearen Näherung mit k_0 . A) FKBP52. B) FKBP52-1. C) FKBP52-12. D) FKBP52-123. E) FKBP52-234.

Wie für den Vergleich der PPIase-Aktivität der großen Immunophilinen FKBP51, FKBP52 und Cyp40 wurde auch für die Bestimmung der PPIase-Aktivität der FKBP52-Fragmente der RCM-T1 Rückfaltungsassay verwendet. Die einzelnen Messungen hierfür sind in Abbildung 3.2.3.2. gezeigt. Eine Zusammenfassung bietet Tabelle 3.2.3. Alle Fragmente, die Domäne 1 enthielten, zeigten in etwa die gleiche katalytische Aktivität mit k_{cat}/K_m -Werten von $5,23$ bis $5,39 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. FKBP52-234 zeigte auch in diesem Assay keine PPIase-Aktivität, was darauf hindeutet, dass die Domäne 1 (Aminosäuren 1-148) für die PPIase-Aktivität sowohl notwendig als auch ausreichend ist. Die katalytische Aktivität von FKBP52 und seinen Fragmenten ist ein wenig niedriger als die seiner humanen Pendanten, FKBP51 und FKBP52 ($8,02$ beziehungsweise $8,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Abschnitt 3.1.5.1.) und nur etwa halb so hoch wie die von FKBP12 ($1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Scholz et al., 1997b).

FKBP52-Fragment	k_{cat}/K_m im Protease-gekoppelten Peptidassay	k_{cat}/K_m im Protease-freien Peptidassay	k_{cat}/K_m in der Rückfaltung von RCM-T1
FKBP52	$1,45 \pm 0,21 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,25 \pm 0,21 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,23 \pm 0,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
FKBP52-123	$1,6 \pm 0,24 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,42 \pm 0,20 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,28 \pm 0,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
FKBP52-12	$1,33 \pm 0,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,25 \pm 0,26 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,39 \pm 0,09 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
FKBP52-1	$1,5 \pm 0,22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1,55 \pm 0,31 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,35 \pm 0,08 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
FKBP52-234	Keine PPIase-Aktivität	Keine PPIase-Aktivität	Keine PPIase-Aktivität

Tabelle 3.2.3. Zusammenfassung der PPIase-Aktivität von FKBP52 und seinen Fragmenten. Gezeigt sind k_{cat}/K_m -Werte, berechnet aus den Steigungen der Geraden in Abb. 3.2.3.1. und 3.2.3.2.

Eine Steigerung der Aktivität durch die zusätzliche Anwesenheit der anderen Domänen, wie sie etwa beim Trigger Faktor der Fall ist (Scholz et al., 1997a, 1997c; Zarnt et al., 1997), konnte für FKBP52 nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend gilt, dass Domäne 1 für eine Wildtyp ähnliche PPIase-Aktivität gegenüber Peptid- und Proteinsubstraten sowohl notwendig als auch ausreichend ist.

3.2.4. Aktivität der FKBP52-Fragmente als molekulare Chaperone

Zur Untersuchung der Chaperon-Aktivität von FKBP52 und seinen Fragmenten wurde ebenfalls der Citratsynthase-Assay benutzt (Abschnitt 2.10. und Buchner et al., 1998b). Die Aggregation von CS bei 40°C wurde anhand von Lichtstreuung verfolgt. Der Einfluss von FKBP52, FKBP52-123 und FKBP52-12 auf die CS-Aggregation ist in Abbildung 3.2.4. dargestellt. In diesem Assay konnte FKBP52-234 nicht untersucht werden, da es bei den verwendeten Temperaturen bereits selbst aggregierte.

Wie bereits gezeigt (Bose et al., 1996; Abschnitt 3.1.6.), unterdrückt FKBP52 die Aggregation von CS (Abb.3.2.4.A.). Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit FKBP52-123 erzielt werden (Abb.3.2.4.B.). Allerdings, scheint FKBP52-123 ein nicht ganz so effizientes Chaperon wie FKBP52 zu sein, da die Aggregation von CS durch dieses Fragment nicht vollständig unterdrückt werden konnte. Die Zugabe von FKBP52-12 hatte keinerlei Einfluss auf die Aggregation von CS, auch wenn es in einem hohen Überschuss vorlag (Abb. 3.2.4.C.). Somit scheint Domäne 3 hauptsächlich für die Chaperon-Aktivität von FKBP52 verantwortlich zu sein, wenngleich auch weiter C-terminale Regionen einen leichten zusätzlichen Effekt zeigen.

Interessanterweise zeigte auch Domäne 1 alleine wieder einen leichten Chaperoneffekt, wenngleich dieser im Vergleich mit der Effizienz von FKBP52 und FKBP52-123 um deutlich geringer war (Daten nicht gezeigt).

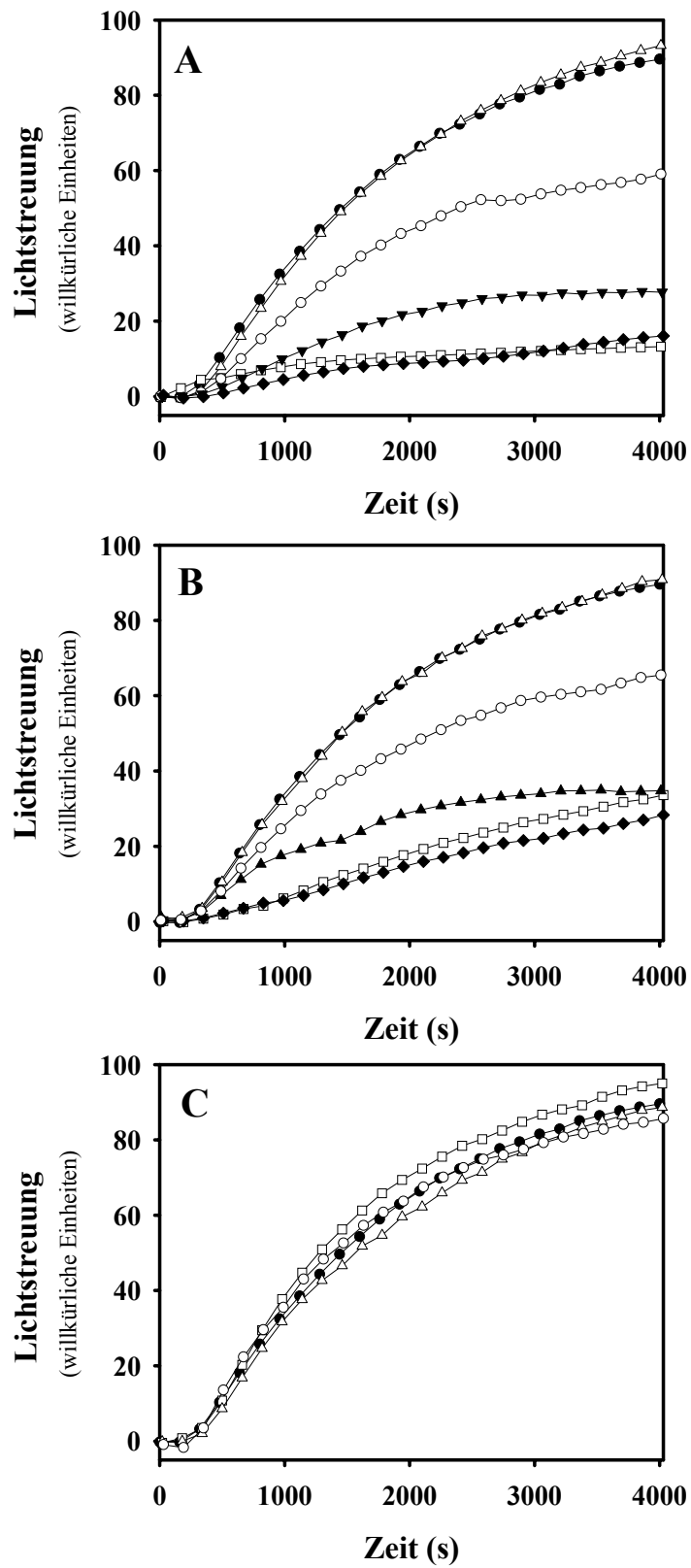


Abb. 3.2.4. Einfluss der FKBP52-Fragmente auf die thermische Aggregation von CS. (Legende siehe nächste Seite).

Abb. 3.2.4. Einfluss der FKBP52-Fragmente auf die thermische Aggregation von CS.

(siehe vorhergehende Seite)

Eine 3 μM CS-Probe (Monomer) wurde bei 40°C in 40 mM Hepes, pH 7,5 inkubiert. Die Aggregation wurde anhand der Trübung der Lösung bei 360 nm verfolgt. A) Aggregation von CS in Abwesenheit von zusätzlichen Komponenten (●) und in Anwesenheit von 3 μM (Δ), 6 μM (\circ), 12 μM (\blacktriangledown), 24 μM (\blacklozenge) und 33 μM () an FKBP52. B) Aggregation von CS in Abwesenheit von zusätzlichen Komponenten (●) und in Anwesenheit von 3 μM (Δ), 6 μM (\circ), 9 μM (\blacktriangle), 24 μM (\blacklozenge) und 30 μM () FKBP52-123. C) Aggregation von CS in Abwesenheit von zusätzlichen Komponenten (●) und in Anwesenheit von 15 μM (\circ), 30 μM () und 42 μM (Δ) FKBP52-12.

3.2.5. Interaktion von FKBP52 mit dem C-terminalen Hsp90-Peptid Hsp90C17

Frühere Studien (Radanyi et al., 1994; Owens-Grillo et al., 1995; Ratajczak and Carrello, 1996; Barent et al., 1998) zeigten, dass die TPR-Regionen von großen Immunophilinen in Domäne 3 lokalisiert sind. Diese Regionen sind an der Bindung an Hsp90 beteiligt (Radanyi et al., 1994; Hoffman et al., 1995; Scheufler et al., 2000).

Um die Bindung dieser C-terminalen Hsp90-Region an FKBP52 direkt zu zeigen, wurde ein Peptid, Hsp90C17 (IPPLEGDEDASRMEEVD) synthetisiert, das dem C-Terminus von Hsp90 entspricht. Hsp90C17 enthielt das MEEVD-Motiv, das für eine Bindung an die TPR-Domänen unbedingt nötig ist (Scheufler et al., 2000) und zusätzlich 12 weitere Aminosäuren, um die Bindung zu verstärken und ihr Spezifität zu geben.

Die Bindung von Hsp90C17 an FKBP52 wurde, wie in Abschnitt 2.8.2. beschrieben, anhand von Isothermischen Titrationskalorimetrie-Messungen untersucht (Abb. 3.2.5.). Die so erhaltene Bindekurve war sigmoid, was einer einfachen Zwei-Zustands Assoziationsreaktion entspricht. Die Bindekonstante für die Bindung von Hsp90C17 an FKBP52, die aus diesem Experiment erhalten wurde, war etwa 3 μM . Das entspricht in etwa den Werten, die auch für die Bindung von Hsp90-Peptiden an die TPR-Domäne von Hop erhalten wurden (Scheufler et al., 2000). Die Bindung von FKBP52 an Hsp90C17 hat sowohl einen günstigen entropischen ($T\Delta S = 5,5 \text{ kcal/Mol}$) als auch einen günstigen enthalpischen Anteil ($\Delta H = -2,1 \text{ kcal/Mol}$). Die Stöchiometrie betrug 0,8. Im Gegensatz zu FKBP52 bindet das Peptid nicht an FKBP52-12 (Abb. 3.2.5.).

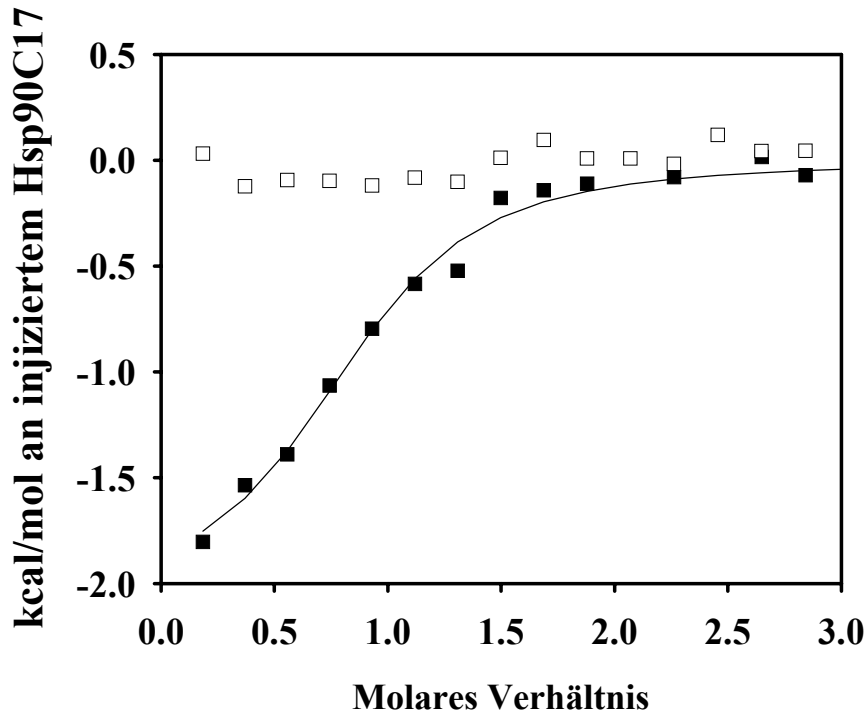


Abb. 3.2.5. Bindung von Hsp90C17 an FKBP52. Isothermische Titrationskalorimetrie wurde in 40 mM HEPES, pH 7,5 bei 25°C durchgeführt. Die FKBP52-Konzentration in der Zelle betrug 20 μM und die Konzentration von Hsp90C17 in der Spritze war 1.05 mM. Das Experiment bestand aus 26 Injektionen zu je 5 μl . Die erhaltenen Daten wurden anhand der Origin Software mit dem Modell für eine Bindestelle gefittet. Die Abbildung zeigt die Enthalpie pro Mol an Hsp90C17, das injiziert wurde, aufgetragen gegen das molare Verhältnis von FKBP52 (■) und FKBP52-12 (□) in der Probenzelle zu injiziertem Hsp90C17.

3.2.6. Kompetitionsmessungen mit FKBP52 und Hsp90C17 im CS-Assay

Es sollte ermittelt werden, ob die Bindung von FKBP52 an das Hsp90C17-Peptid und das nicht-native Protein sich gegenseitig ausschließen. Dazu wurde ein Kompetitionsassay entwickelt, um zu testen, ob Hsp90C17 die Bindung von FKBP52 an CS inhibierte. FKBP52 und Hsp90C17 wurden miteinander für 2 Minuten im Assaypuffer bei 43°C vorinkubiert. Die Messung wurde durch Zugabe von CS gestartet. Hsp90C17 (30 μM) war in einem zehnfachen Überschuss über FKBP52 (3 μM) und einem 200fachen Überschuss über CS vorhanden. Unter Berücksichtigung der im ITC-Experiment ermittelten Bindekonstante, war FKBP52

somit mit Peptid gesättigt. Im Fall einer Konkurrenz von CS und Hsp90C17 um dieselbe Bindestelle an FKBP52, war eine Abnahme der Chaperon-Aktivität von FKBP52 zu erwarten. Im Gegensatz dazu hatte in der Messung die Zugabe von zehnfachem Überschuss an Hsp90C17 keinen Einfluss auf die Chaperon-Aktivität von FKBP52 (Abb. 3.2.6.). FKBP52 unterdrückte die CS-Aggregation sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von 30 μM Hsp90C17 gleichermaßen erfolgreich. Die Zugabe von 30 μM Hsp90C17 alleine als negative Kontrolle hatte keinen nennenswerten Einfluss auf das Aggregationsverhalten von CS.

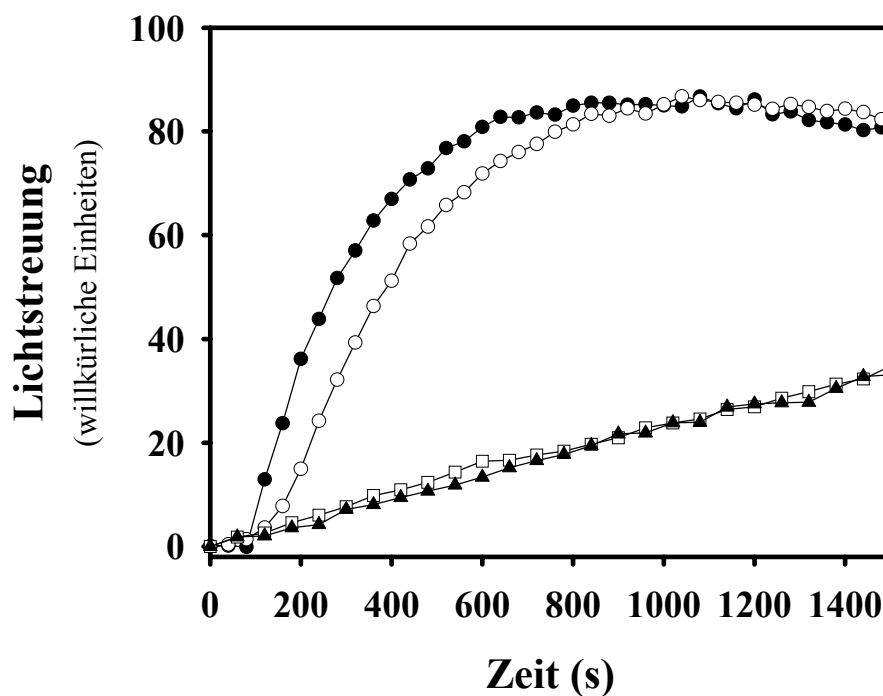


Abb. 3.2.6. Chaperonassay in Gegenwart von FKBP52 und Hsp90C17-Peptid. Der Zeitverlauf der Aggregation von 0,15 μM CS bei 43°C wurde anhand der Lichtstreuung in einem Spektrofluorometer bei 360 nm verfolgt. CS-Aggregation in Abwesenheit zusätzlicher Komponenten (●) und in Anwesenheit von 3 μM FKBP52 alleine (□), in Anwesenheit von 3 μM FKBP52 und 30 μM Hsp90C17 (▲). Zugabe von 30 μM Hsp90C17 alleine (○) als Negativkontrolle hatte keinen Einfluss auf die CS-Aggregation.

4. Diskussion

4.1. Funktionelle Analyse der großen Immunophiline FKBP51, FKBP52 und Cyp40

4.1.1. Struktur und Stabilität von FKBP51, FKBP52 und Cyp40

Säuger besitzen drei große Immunophiline als Co-Faktoren des Hsp90-Chaperon-Systems. Im Rezeptorzyklus sind sie Teil des sogenannten reifen Steroidhormonrezeptor (SHR)-Komplexes (Ratajczak et al., 1993; Smith et al., 1993). Es existieren verschiedene reife Komplexe, die sich in dem gebundenen Immunophilin unterscheiden. Im Gegensatz zu den Immunophilinen findet sich bei allen anderen bekannten Partnerproteinen nur ein Vertreter. Zudem scheint es von der Art des gebundenen Substrats abzuhängen, welches Immunophilin in dem SHR-Komplex inkorporiert wird (Barent et al., 1998).

Die Inkorporation von verschiedenen Immunophilinen in den Hsp90-Multichaperon-Komplex ist auch in höheren und niederen Eukaryonten konserviert. So sind zum Beispiel in Hefe die Cyclophiline Cpr6 und Cpr7 Teil des Hsp90-Multichaperon-Komplexes. In Säugern ist die Situation noch komplexer, da es sich nicht nur um zwei, sondern um drei verschiedene Immunophiline handelt und diese außerdem zu zwei unterschiedlichen Immunophilin-Familien gehören, während beide Hefe-Immunophiline der Cyclophilin-Familie angehören.

Eine Teilaufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die drei großen menschlichen Immunophiline Cyp40, FKBP51 und FKBP52 hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Besonderheiten zu vergleichen.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei großen Immunophiline deutet vor allem auf Unterschiede zwischen den FKBP5s und Cyp40 hin, zeigt aber nur geringe Unterschiede zwischen FKBP51 und FKBP52 auf. Ähnlich verhält es sich auch bei der spektroskopischen Charakterisierung.

Im Fern-UV-CD weisen zwar alle drei Immunophiline dieselbe Spektrenform auf, jedoch zeigt Cyp40 eine höhere Signalintensität als die beiden FKBP5s. Alle drei großen Immunophiline wiederum besitzen einen deutlich höheren α -Helixgehalt als das jeweilige kleine Immunophilin, FKBP12 oder Cyp18. Da die N-terminalen Domänen der großen und kleinen Immunophiline eine hohe Homologie aufweisen (Callebaut et al., 1992; Lebeau et al., 1992; Kieffer et al., 1993) und FKBP12 und Cyp18 vorwiegend β -Faltblattstruktur besitzen, scheinen die zusätzlichen C-terminalen Domänen von FKBP51, FKBP52 und Cyp40 zum Großteil α -helikal zu sein. Für zwei Hauptbestandteile des C-terminalen Teiles, die TPR-Regionen (Das et al., 1998; Scheufler et al., 2000) und das Calmodulin-Bindemotiv (O'Neil und DeGrado, 1990), ist die Struktur bereits bekannt. Beide bestehen größtenteils aus amphipatischen α -Helices, so dass der hohe Helixanteil vorwiegend von den TPR-Regionen und dem Calmodulin-Bindemotiv herrührt.

Ein Vergleich mit Sekundärstrukturvorhersagen für die Hefe Cyp40-Homologen, Cpr6 (40% α -Helices) und Cpr7 (35% α -Helices) (Mayr, 2000), entspricht sowohl den Strukturvorhersagen für Cyp40, als auch den experimentell aus den Fern-UV-CD-Spektren ermittelten Werten.

Auch im Nah-UV-CD, das sozusagen einen Fingerabdruck der Protein-Quartärstruktur liefert, ähneln sich die beiden FKBP52 mehr als die Ähnlichkeit mit Cyp40 besitzen. Im Vergleich mit den Hefe-Cyclophilinen (Mayr, 2000) ist das Nah-UV-CD-Spektrum von Cyp40 dem von Cpr7 ähnlicher als dem von Cpr6.

Alle drei großen Immunophilinen scheinen zum Großteil als Monomere vorzuliegen. Das stimmt mit Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad der beiden Hefe Cyclophilinen Cpr6 und Cpr7 überein, die beide Monomere sind (Mayr, 2000). Ein geringer Anteil der Präparation von FKBP52 weist sowohl in Gelfiltrations- als auch in Ultrazentrifugations-Experimenten eine höhere molekulare Masse auf, als man theoretisch für ein Monomer erwarten würde. Dies deutet auf einen gewissen Anteil an Dimer hin. Das passt zu Angaben in der Literatur (Wiederrecht et al., 1992; Yem et al., 1993), wonach FKBP52 auch als Dimer vorliegt.

Auch beim Vergleich der Stabilität gegenüber chemischer Denaturierung weisen die beiden FKBP52 große Ähnlichkeit auf und sind deutlich stabiler als Cyp40. Der Übergang von Cyp40 ist wesentlich kooperativer als der der FKBP52. Das weist darauf hin, dass die Domänen bei den FKBP52 im Gegensatz zu Cyp40 in voneinander unabhängiger Weise denaturieren. Die Stabilität von Cyp40 entspricht in etwa derjenigen seiner Hefe Homologe Cpr6 und Cpr7 (Mayr, 2000). Im Gegensatz dazu ist bei allen drei Säuger-Immunophilinen der Übergang vollständig reversibel, während bei Cpr6 und Cpr7 partielle Reversibilität nur durch Zugabe von EDTA erreicht werden konnte (Mayr, 2000).

Bei thermischer Denaturierung ist FKBP52 deutlich stabiler als FKBP51 und Cyp40. Die Mittelpunkte der Denaturierungsübergänge von FKBP51 und Cyp40 hingegen unterscheiden sich nur um etwa ein Grad Celsius. Von den drei großen Säuger-Immunophilinen ist FKBP52 auch das einzige, für das anhand von *in vivo* Untersuchungen belegt ist, dass es bei Hitzeschock vermehrt exprimiert wird. Diese Situation findet sich in ähnlicher Weise auch im Hefe-System. Dort ist Cpr6 das Immunophilin, das *in vitro* stabiler gegen thermische Denaturierung ist (Mayr, 2000). Im Gegensatz zu Cpr7 wird es auch *in vivo* bei Hitzestress hochreguliert (Warth et al., 1997; Dolinski et al., 1998).

Verglichen mit den jeweiligen kleinen Immunophilinen FKBP12 und Cyp18 sind FKBP51, FKBP52 und Cyp40 durchweg weniger stabil gegen thermische Denaturierung. Das führt zu dem Schluss, dass die zusätzlichen vorwiegend α -helikalen Domänen, die die TPR-Regionen und das Calmodulin-Bindemotiv enthalten, für die geringe Thermostabilität verantwortlich sind.

Der Mittelpunkt der thermischen Denaturierung ist für Cyp40 nur ein bis zwei Grad niedriger als der T_m von FKBP51 und GST-Cyp40. Dennoch aggregiert Cyp40 unter den Bedingungen des Citratsynthase-Assays, wohingegen sowohl GST-Cyp40 als auch FKBP51 stabil sind. Ein

Grund hierfür könnte die deutlich höhere Kooperativität des Temperaturübergangs von Cyp40 im Vergleich zu den Übergängen von FKBP51, FKBP52 und GST-Cyp40 sein.

4.1.2. PPIase-Aktivität der großen Immunophiline

Die PPIase-Aktivität der großen Immunophiline ist etwa um den Faktor zwei bis drei geringer als die der jeweiligen kleinen Immunophiline Cyp18 und FKBP12 (Schönbrunner et al., 1990; Albers et al., 1990). Die Aktivität der großen FKBP's beträgt etwa zwei Drittel der Aktivität von FKBP12, wohingegen die Aktivität von Cyp40 nur circa ein Drittel der katalytischen Aktivität von Cyp18 aufweist. Im Peptidassay wird die für FKBP12 beschriebene Bevorzugung von hydrophoben Resten vor Prolin (Albers et al., 1990; Harrison und Stein, 1990b) auch für beide große FKBP's deutlich. Ihre katalytische Aktivität gegenüber dem Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA-Peptid ist um das circa zwanzigfache höher als gegenüber dem Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA-Peptid, wohingegen die katalytische Aktivität von Cyp40 nur einen sehr geringen Unterschied zwischen den beiden Peptiden aufweist. Die katalytische Aktivität gegenüber Peptidsubstraten ist bei allen drei großen PPIasen etwa um den Faktor 50 bis 100 höher als gegenüber dem Proteinsubstrat RCM-T1. Somit entspricht die PPIase-Aktivität der großen Immunophiline sowohl im Peptidassay als auch in der Rückfaltung von RCM-T1 der der kleinen Immunophiline FKBP12 und Cyp18. Das stellt einen deutlichen Unterschied zum Hefe-System dar, wo sich eines der beiden Cyclophiline, Cpr6, ähnlich verhält wie Cyp18, das andere Cyclophilin, Cpr7, jedoch eher eine PPIase-Aktivität aufweist, wie sie für ein FKBP zu erwarten wäre (Mayr et al., 2001).

Die Ähnlichkeit ihrer katalytischen Aktivität mit der der kleinen Immunophiline unterscheidet Cyp40, FKBP51 und FKBP52 deutlich vom Trigger Faktor, der ebenfalls eine große PPIase darstellt und sowohl PPIase-, als auch Chaperon-Aktivität besitzt. Er besteht aus einer FKBP-ähnlichen Domäne und zusätzlichen N- und C-terminalen Domänen. Seine katalytische Aktivität gegenüber Peptidsubstraten und dem Protein-Substrat RCM-T1 ist ähnlich (Scholz et al., 1997c; Zarnt et al., 1997) und er besitzt eine etwa hundertfach höhere katalytische Aktivität für die Rückfaltung der RCM-T1 als die drei Hsp90-assoziierten PPIasen, Cyp40, FKBP51 und FKBP52 (Scholz et al., 1997c). Die isolierte katalytische Domäne von Trigger Faktor behält zwar gegenüber Peptidsubstraten ihre Aktivität, aber die Effizienz in der Rückfaltung von RCM-T1 ist bis um das achthundertfache reduziert. Das zeigt, dass beim Trigger Faktor auch die zusätzliche Domänen an der Bindung des Substrates Anteil haben. Im Gegensatz dazu ist bei den großen Immunophilinen nur die PPIase-Domäne an der Rückfaltung von RCM-T1 beteiligt ist.

Die katalytische Aktivität von Cyp40 im Peptidassay ist um das vierfache höher als die von Cpr6 und circa um das fünfundzwanzigfache höher als die von Cpr7 (Mayr et al., 2000). Dennoch zeigen Cyp40 und Cpr6 im Rückfaltungsassay von RCM-T1 ähnliche katalytische Aktivitäten. Ein Grund dafür könnte sein, dass die C-terminalen Domänen von Cpr6 an dieser Rückfaltung zusätzlich beteiligt sind, bei Cyp40 hingegen nicht. Eine weitere

Erklärungsmöglichkeit findet sich in möglicherweise verschiedenen Substratspezifitäten der PPIase-Domänen der beiden Cyclophiline. Für die Rückfaltung von RCM-T1 ist eine Tyr-Pro-Bindung geschwindigkeitsbestimmend, wohingegen es im Peptidassay entweder eine Leu-Pro- oder eine Ala-Pro-Bindung ist. Derartige verschiedene Substratspezifitäten wurden wie bereits oben erwähnt bei den kleinen Immunophilinen schon eingehend beschrieben (Albers et al., 1990; Harrison und Stein, 1990b).

4.1.3. Bindung der großen Immunophiline an Hsp90

Große Immunophiline binden Hsp90 über ihre TPR-Domänen. Untersuchungen mit Hsp90-Mutanten hatte gezeigt, dass nicht alle TPR-enthaltenden Proteine in der gleichen Art und Weise mit Hsp90 interagieren (Barent et al., 1998; Chen et al., 1998; Ramsey et al., 2000). Mittels Plasmon-Resonanz-Spektroskopie und ITC konnten in dieser Arbeit die Bindekonstanten der drei großen Immunophiline und Hsp90 bestimmt werden. Dabei zeigte FKBP52 die stärkste Bindung und Cyp40 die schwächste. Die geringe Stärke der Bindung von Cyp40 an Hsp90 wird durch frühere Befunden, wonach Cyp40 mit Niedrigsalzpuffer leicht von Hsp90-Immupellets abgewaschen werden konnte (Owens-Grillo et al., 1995), bestätigt.

Die Absolutwerte der Bindekonstanten unterscheiden sich zwar zwischen den Plasmon-Resonanz-Spektroskopie- und den ITC-Messungen, qualitativ jedoch liefern beide Methoden den Befund, dass FKBP52 am stärksten und Cyp40 am schwächsten bindet und bestätigen sich somit gegenseitig. Aufgrund der Prinzipien, die der jeweiligen Messmethode zugrunde liegen, ist ITC offensichtlich als die verlässlichere Methode zu betrachten und die Absolutwerte für die Bindekonstante, die damit erhalten wurden, sind die genaueren. Dass die Bindungen zwischen den Immunophilinen und Hsp90 in der Plasmon-Resonanz-Spektroskopie stärker zu sein scheinen als im ITC, kann durch Artefakte erklärt werden, die durch zusätzliche Interaktionen der eingebrachten Immunophiline mit der Chip-Matrix entstanden sein könnten.

Die erhaltenen Dissoziationskonstanten liegen im nanomolaren Bereich und stimmen mit jenen überein, die für die Hefe Cyp40-Homologe, Cpr6 und Cpr7, (Prodromou et al., 1999; Mayr et al., 2000) und das Hop-Homologe Sti1 bereits beschrieben sind (Prodromou et al., 1999; Mayr et al., 2000). Allerdings sind im Säuger-System die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten der drei großen Immunophiline -vor allem aber zwischen FKBP52 und Cyp40- ausgeprägter als im Hefe-System (Mayr et al., 2000).

Die Bindekonstanten deuten darauf hin, dass *in vivo* alle großen PPIasen vorwiegend im Komplex mit Hsp90 vorliegen. Es sei darauf hingewiesen, dass Hsp90 im Überschuss über die großen Immunophiline vorhanden ist. Die Verhältnisse sind circa 1:10, 1:15 und 1:75 für Cyp40, FKBP52 beziehungsweise FKBP51 (Buchner, 1999). Folglich zeigt das Immunophilin, das in der höchsten relativen Konzentration vorhanden ist, die schwächste Bindungsaffinität. Zusätzlich wird vermutlich die Interaktion zwischen den großen

Immunophilinen und Hsp90 durch das im Hsp90-Komplex gebundene Substrat stabilisiert (Barent et al., 1998). Die verschiedenen Beiträge von Enthalpie und Entropie zu der jeweiligen Bindung der Immunophile an Hsp90 liefert zusätzliche Evidenz dafür, dass die Bindung der großen PPIasen an Hsp90 in unterschiedlicher Art und Weise ablaufen kann, obwohl die Bindestelle, nämlich die TPR- Domäne, bei allen dreien die gleiche ist.

Die Stöchiometrie der Hsp90-Immunophilin-Komplexe war bisher vorwiegend mittels chemischer Quervernetzung untersucht worden. Diese Untersuchungen legten nahe, dass ein Immunophilin-Monomer pro Hsp90-Dimer gebunden wird (Rehberger et al., 1992; Segnitz und Gehring; 1995; Silverstein et al., 1999). Die hier vorliegende Arbeit allerdings zeigt anhand einer sensibleren Methode (ITC), dass für die Bindung der drei großen Immunophile an Hsp90 die Stöchiometrie der Bindung zwei Immunophilin-Monomere pro Hsp90-Dimer ist. Ein Modell, wie diese Interaktion im Rezeptorkomplex aussehen könnte, ist in Abbildung 4.1. gezeigt. In Übereinstimmung damit wiesen auch ITC-Messungen, die mit dem Hefe Co-Chaperon Cpr6 durchgeführt wurden, darauf hin, dass zwei Cpr6-Monomere an ein Hefe Hsp90-Dimer binden, wobei jedes Hsp90-Monomer eine Bindestelle für ein TPR-Protein besitzt (Prodromou et al., 1999).

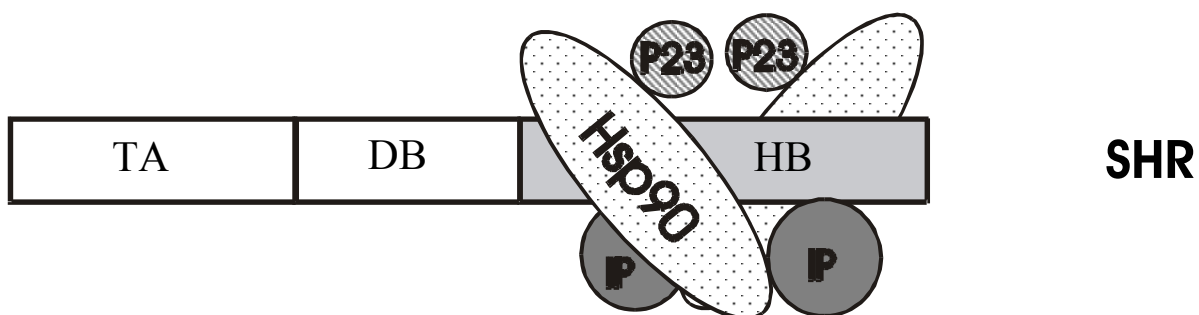


Abb. 4.1. Modell für die Zusammensetzung des reifen Steroid-Rezeptorkomplexes. Dabei binden jeweils zwei Immunophilin-Monomere an ein Hsp90-Dimer. Wie in Abschnitt 4.2.4. diskutiert, ist in diesem Modell angedeutet, dass im reifen Rezeptorkomplex sowohl Hsp90 als auch die Immunophile mit dem Steroid-Rezeptorprotein in Interaktion treten könnten. Transaktivierungsdomäne (TAD); DNA-Bindedomäne (DBD); Hormonbindedomäne (HBD); Immunophilin (IP). (nach Richter und Buchner, 2001).

Zusätzliche Evidenz für die Existenz von zwei funktionalen TPR- Bindestellen pro Hsp90-Dimer lieferte der Befund, dass Cns1, ein weiteres TPR-enthaltendes Co-Chaperon, selektiv zusammen mit Hsp90 und dem Hefe Immunophilin Cpr7 (Dolinski et al., 1998; Marsh et al., 1998) immunopräzipitiert wurde.

4.1.4. Interaktion mit nicht-nativen Proteinen und Rolle im Rezeptorkomplex

Für Kaninchen FKBP52 und humanes Cyp40 ist Chaperon-Aktivität bereits gezeigt worden (Bose et al., 1996; Freeman et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Befund auf menschliches FKBP52 und FKBP51 ausgedehnt werden. Zudem wurden alle drei menschlichen großen Immunophilinen bezüglich ihrer Chaperon-Aktivität verglichen. Obwohl FKBP51 und FKBP52 im Bezug auf Struktur und PPIase-Aktivität sehr ähnlich sind, zeigen sie deutliche Unterschiede bei der Chaperon-Aktivität, wobei FKBP51 ein besseres Chaperon ist als FKBP52. Diesbezüglich ähneln sich FKBP51 und Cyp40 stark. Die Analyse der Funktionen der beiden Hefe Cyp40-Homologen, Cpr6 and Cpr7, zeigte, dass auch diese beiden Immunophilinen sich in ihrer Chaperon-Aktivität unterscheiden, wobei Cpr7 das deutlich bessere Chaperon ist (Mayr et al., 2000). Somit ist menschliches Cyp40, im Gegensatz zu seinen Hefe-Homologen, die entweder eine gute PPIase (Cpr6) oder ein effizientes Chaperon sind (Cpr7), sowohl eine effiziente PPIase als auch ein potentes Chaperon.

Offenbar sind die Unterschiede in der Chaperon-Aktivität der Hsp90-assoziierten Immunophilinen ein konserviertes Merkmal, das für die verschiedenen Funktionen des Hsp90-Chaperonkomplexes von Bedeutung sein könnte. *In vivo* weisen die drei großen Immunophilinen verschiedene Muster der Inkorporation in Steroidrezeptorkomplexe mit unterschiedlichen Substraten auf. Trotz seiner niedrigeren Konzentration in der Zelle -20 nM in Kaninchen Retikulozytenlysat im Vergleich zu 100 nM für FKBP52 und 200 nM für Cyp40 (vgl. Buchner, 1999)- wird beispielsweise FKBP51 bevorzugt in Progesteron-Rezeptor- und Glukokortikoid-Rezeptor-Komplexe eingebaut (Nair et al., 1997; Barent et al., 1998).

Basierend auf den hier präsentierten Daten kann dieser Befund jetzt durch verschiedene Bindungsaffinitäten für Hsp90 und das Vorhandensein von unterschiedlichen Interaktionen der Immunophilinen mit den Substratproteinen, zum Beispiel den SHRs, erklärt werden. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese steht der Befund, dass FKBP51 nach Zugabe von Hormon vom Rezeptor-Komplex dissoziiert, wohingegen FKBP52 und die anderen Komponenten wie Hsp90 und p23 gebunden bleiben (Smith et al., 1990; 1993). Das weist darauf hin, dass FKBP51 im Rezeptorkomplex mehr mit den Rezeptor interagiert als FKBP52. Befunde der vorliegenden Arbeit, wonach FKBP51 ein besseres Chaperon als FKBP52 ist und deshalb stärker mit nicht-nativen Proteinen interagieren kann, stimmen damit überein.

Ein Beispiel für die funktionellen Konsequenzen einer solchen Auswahl von Immunophilinen im Rezeptorkomplex wurde in Lymphozyten aus dem Totenkopffäffchen (*Saimiri boliviensis boliviensis*) gefunden, wo die Inkorporation von FKBP51 anstelle von FKBP52 in Glukokortikoid-Rezeptor-Komplexe die Bindungsaffinität des Rezeptors für seine Liganden um ein elfaches reduzierte (Reynolds et al., 1999).

Zusammenfassend weisen alle drei großen menschlichen Immunophiline trotz ihrer Ähnlichkeit in Struktur und PPIase-Aktivität wesentliche Unterschiede auf. Sie zeigen verschiedene Bindungsaffinitäten zu Hsp90 und besitzen unterschiedliche Chaperon-Aktivitäten. Diese Unterschiede in den Aktivitäten könnten die Basis für verschiedene Funktionen gegenüber den Substratmolekülen im Hsp90-Komplex sein.

4.2. Lokalisation der funktionellen Elemente von FKBP52

Mit Ausnahme der zusätzlichen 110 Aminosäuren bei den FKBP52s bestehen alle mit Hsp90 assoziierten großen Immunophiline im Prinzip aus denselben Domänen (PPIase-Domäne, TPR-Regionen und Calmodulin-Bindemotiv) und weisen sowohl PPIase-, als auch Chaperon-Aktivität auf. Eine weitere Teilaufgabe der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, diese beiden Aktivitäten bestimmten Regionen der großen Immunophiline zuzuordnen. Als Modell dafür wurde FKBP52 verwendet, da es sich dabei um das am besten untersuchte große Immunophilin handelt. Es wurde eine Anzahl von Fragmenten von FKBP52 erstellt, die dann jeweils bezüglich Struktur, Stabilität und PPIase- und Chaperon-Aktivität miteinander verglichen wurden.

4.2.1. Struktur und Stabilität der FKBP52-Fragmente

FKBP52 besteht aus vier Domänen, die durch hydrophile Regionen voneinander getrennt sind (Chambraud et al., 1993). Diese Domänen weisen verschiedene Anteile von α -Helices auf. Domänen 3 und 4 bestehen zum Großteil aus α -Helices, wohingegen Domänen 1 und 2 nur eine begrenzte Menge an α -helikaler Struktur (circa 12%) besitzen. Sie zeigen hohe Sequenzhomologie mit FKBP12 (Callebaut et al., 1992), das selbst auch nur circa 10% α -helikale Struktur besitzt. Der hohe Anteil an α -Helices in den Domänen 3 und 4 spiegelt die helikalen Strukturen der Calmodulin-Bindedomäne (O'Neil und DeGrado, 1990) und der TPRs (Das et al., 1998; Scheufler et al., 2000) wider. Diesbezüglich führen die Ergebnisse des Fragmentvergleichs zu denselben Schlussfolgerungen wie der Vergleich der Struktur der großen und kleinen Immunophiline (siehe 3.1.3.1. und 4.1.1.).

Die Untersuchung der Stabilität der FKBP52-Fragmente gegenüber thermischer Denaturierung zeigte, dass das Fehlen von Domäne 1 das Protein extrem destabilisiert. Der Unterschied im Denaturierungsmittelpunkt zwischen Domäne 1 allein und FKBP52-234, dem Domäne 1 fehlt, beträgt nahezu 30°C. Dass FKBP52-234 die geringste Stabilität aufweist, erklärt auch die niedrigen Reinigungsausbeuten für dieses Fragment und seine Neigung zur Aggregation. Diese Daten bestätigen die bereits aus dem Vergleich der großen und kleinen

Immunophiline gezogene Schlussfolgerung, dass die zusätzliche α -helikalen Domänen die großen Immunophiline eher destabilisieren, während Domäne 1 ihnen Stabilität verleiht (siehe 3.1.3.1. und 4.1.1.).

4.2.2. Lokalisation der PPIase-Aktivität von FKBP52 in Domäne 1

Die PPIase-Aktivität der FKBP52-Fragmente wurde analog zum Vergleich der großen Immunophiline sowohl im Peptidassay als auch mittels der Rückfaltung von RCM-T1 untersucht. Im Peptidassay wurde dabei nur das Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA-Peptid verwendet, da dafür die Spezifität von FKBP52 höher ist.

Ein Vergleich der katalytischen Aktivitäten im Protease-gekoppelten Assay und im Protease-freien Assay zeigte keinen Unterschied, was den Schluss nahe legt, dass die Hilfsprotease Chymotrypsin die Domäne, die für die PPIase-Aktivität von FKBP52 verantwortlich ist, nicht inaktiviert. Die PPIase-Aktivität von FKBP52 und den Fragmenten, die Domäne 1 enthalten, stimmt mit den katalytischen Aktivitäten, die sich für die großen menschlichen Immunophiline ergaben (siehe Abschnitt 3.1.) und mit der Aktivität des kleinen Immunophilins FKBP12 (Albers et al., 1990) überein. In der Katalyse der Rückfaltung des Proteinsubstrates RCM-T1 beträgt die Aktivität von FKBP52 etwa die Hälfte der katalytischen Aktivität von FKBP12 (Scholz et al., 1997a). In beiden Assays zeigten nur die Fragmente, die Domäne 1 enthielten, PPIase-Aktivität. Das belegt, dass Aminosäuren 1-148 sowohl notwendig als auch hinreichend für Wildtyp-ähnliche PPIase-Aktivität gegenüber Peptid- und Proteinsubstraten sind. Im Gegensatz zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Chambraud et al., 1993) konnte für Domäne 2 keine PPIase-Aktivität entdeckt werden.

Die zusätzliche Anwesenheit der weiteren C-terminalen Domänen von FKBP52 hat weder im Peptidassay noch in der Rückfaltung von RCM-T1 Einfluss auf die Effizienz als PPIase. Das untermauert die bereits in Abschnitt 4.1.2. erläuterte Schlussfolgerung, dass bei den großen Hsp90-assoziierten PPIasen im Gegensatz zum Trigger Faktor (Scholz et al., 1997c; Zarnt et al., 1997) die Katalyse der Isomerisierung durch die zusätzlichen Domänen nicht beeinflusst wird.

4.2.3. Lokalisation der Chaperon-Aktivität von FKBP52

Zusätzlich zu seiner PPIase-Aktivität besitzt FKBP52 auch Chaperon-Aktivität, von der angenommen wird, dass sie ihren Sitz in einer Region außerhalb der PPIase-Domäne hat (Bose et al., 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Aktivität dem C-terminalen Teil des Proteins zugeordnet werden. Der Großteil der Chaperon-Aktivität scheint zwischen den Aminosäuren 264 und 400 lokalisiert zu sein. Allerdings sind wohl auch die C-

terminalen 58 Aminosäuren beteiligt, da Fragment FKBP52-123 die Aggregation der CS nicht vollständig zu unterdrücken vermag.

In dieser äußersten C-terminalen Region befindet sich das Calmodulin-Bindemotiv, dessen prinzipielle Funktionalität durch spezifische Bindung an Calmodulin-Sepharose bestätigt wurde (Massol et al., 1992). Ob FKBP52 aber auch *in vivo* mit Calmodulin interagiert, ist nicht geklärt. Dem Calmodulin-Bindemotiv liegt eine amphiphile Helix mit positiv geladenen Aminosäuren auf der einen und hydrophoben Aminosäuren auf der anderen Seite zugrunde (O'Neil und DeGrado, 1990). Dieser hydrophobe Teil könnte möglicherweise an der Interaktion mit nicht-nativen Proteinen beteiligt sein.

Interessanterweise zeigt auch Domäne 1 alleine eine gewisse Aktivität im Chaperon-Assay, was bei der gegebenen Inaktivität des FKBP52-12 Fragment ungewöhnlich ist. Allerdings ist die Aktivität von Domäne 1 deutlich geringer als die von FKBP52 und FKBP52-123. Bezieht man die Tatsache, dass Domäne 2 alleine nicht gereinigt werden kann, sondern bereits bei der Expression irreversibel aggregiert, mit in die Diskussion ein, ergibt sich eine Erklärung für das Verhalten von Domäne 1. Es ist anzunehmen, dass Domäne 2 aggregiert, weil sie im ganzen Protein mit einer bestimmte Region in Domäne 1 interagiert. Diese Region könnte hydrophobe Oberflächen aufweisen, an die in Abwesenheit von Domäne 2 das nicht-native Protein binden könnte und so teilweise vor Aggregation geschützt wäre.

4.2.4. Bindung an Hsp90 und nicht-native Proteine

Die hauptsächliche Bindestelle für nicht-native Proteine befindet sich bei FKBP52 in Domäne 3 (Aminosäuren 264-400), die auch die TPRs enthält. Diese TPR-Regionen sind in FKBP52 an der Bindung an Hsp90 beteiligt (Radanyi et al., 1994; Hoffman et al., 1995). Daraus ergibt sich die Frage, ob die Bindestelle für nicht-native Proteine und Hsp90 dieselbe ist.

Dazu wurden CS-Aggregationsmessungen in Anwesenheit eines Peptides durchgeführt, das die C-terminalen 17 Aminosäurereste von Hsp90 enthält. Isothermische Titrationskalorimetrie-Experimente mit diesem Peptid und FKBP52 ergaben eine Bindekonstante von 3 μM . Diese Affinität entspricht in etwa der, die für die Bindung von C-terminalen Hsp90-Peptiden an die zu FKBP52 homologe TPR2A-Region von Hop (Scheufler et al., 2000) bestimmt wurde.

Allerdings bindet die Hop TPR2A-Region mit ähnlicher Affinität, mit der sie an die ganze C-terminale Domäne (Aminosäuren 625-732) von Hsp90 bindet, auch an C-terminale Hsp90-Peptide, die länger als 10 Aminosäuren sind. Dagegen ist die Bindungsaffinität des 17 Aminosäuren langen Hsp90-Peptids zu FKBP52 deutlich geringer als die, die für die Bindung zwischen Hsp90 und FKBP52 bestimmt wurde ($K_D = 55 \text{ nM}$; siehe 3.1.4.2.). Das spricht für die Beteiligung von mehr als 17 C-terminalen Aminosäuren von Hsp90 und den TPR-Domänen von FKBP52 in der Bindung von FKBP52 und Hsp90, wie bereits vorgeschlagen wurde (Barent et al., 1998).

Die Anwesenheit des Hsp90-Peptids unter Sättigungsbedingungen im Chaperon-Assay hatte keinen Effekt auf die Unterdrückung der CS-Aggregation durch FKBP52. Das zeigte, dass beide Proteine gleichzeitig an Domäne 3 von FKBP52 binden können und dass sich beide Bindungen nicht gegenseitig ausschließen.

TPR-Motive vermitteln spezifische Protein-Protein Bindungen über eine definierte Anzahl von Interaktionen von acht schwach konservierten Resten (Goebl et al., 1991; Lamb et al., 1995). Eine weiter gefasste Spezifität von TPR-Regionen wurde für das mitochondriale Importrezeptorprotein Tom70 im Bezug auf Präsequenz-Peptide vorgeschlagen (Brix et al., 2000). Auch in der Präprotein-Bindestelle von Tom20 findet sich eine TPR-Region, aber hier bildet nicht das TPR-Motiv selbst die Bindestelle (Abe et al., 2000). Stattdessen ist die Basis für die Bindung eine Region von hydrophoben Interaktionen, von denen nur ein Teil in den TPR-Helices lokalisiert ist. Es ist denkbar, dass eine derartige hydrophobe Region auch allgemein die Bindung von nicht-nativen Proteinen vermitteln könnte.

Hop	225	-----ALKEK	ELGNDAYKKK	DFDTALKHYD	KAKELDPTN-
FKBP52	264	EKLEQSAIVK	ERGTVYFKEG	KYKQALLQYK	KIVSWLEYES
		-----*	*-*-----*	-----**--*	*-----
Hop	259	-----	----MTYITN	QAAVYFEKGD	YNKCRELCEK
FKBP52	304	SFSSEEVQKA	QALRLASHLN	LAMCHLKLQA	FSAAVESCNK
		-----	-----*	-*-----	-----*-*
Hop	285	AIEVGRENRE	DYRQIAKAYA	RIGNSYFKEE	KYKDAIHFYN
FKBP52	344	ALEL---DSN	N----EKGLF	RRGEAHLAVN	DFDLARADFQ
		-----	-----	*-*-----	-----*
Hop	325	KSLAEHRTP	DVLKKCQQA EK	ILKEQERLA	
FKBP52	377	KVLQLYPSN	KAAKAQLAVCQ	QRIR-----	
		---*-----	---*-----	-----	

Abb. 4.2. Sequenzvergleich der TPR2A-Domäne von Hop (Aminosäuren 225-353) mit der TPR-enthaltenden Domäne 3 von FKBP52 (Aminosäuren 264-400). Die hellgrau unterlegten Reste sind für elektrostatische Interaktionen mit dem EEVD-Motiv am Hsp90 C-Terminus von Bedeutung, während die dunkelgrau unterlegten Reste hauptsächlich für van der Waals Kontakte mit dem Hsp90 C-Terminus zuständig sind. Die fettgedruckten Reste sind Teil des TPR-Konsensus. (nach Scheufler et al., 2000). Sterne zeigen Reste, die zwischen beiden Sequenzen identisch sind.

Die strukturelle Basis der Bindung zwischen den C-terminalen Peptiden von Hsp90 und der TPR-Domäne von Hop, die zu FKBP52 homolog ist, ist bereits bekannt (Scheufler et al., 2000). Ähnlich wie die TPR-Struktur der Phosphatase PP5 in Abwesenheit von bindenden Peptiden (Das et al., 1998), besteht sie aus sieben mäanderartig angeordneten α -Helices, die eine wiegenförmige Grube bilden. Diese Grube beherbergt das Peptid in einer gestreckten

Konformation. Das Peptid bildet nur Kontakte mit den Seitenketten der drei A-Helices der TPR-Domäne aus, die die innere Oberfläche der Grube auskleiden (Scheufler et al., 2000). In dieser Struktur ist ein beachtlicher Teil der Grube nicht durch das Hsp90-Peptid besetzt und könnte somit für andere Proteine erreichbar sein (vgl. Abb. 1.6.2.).

Ein Sequenzvergleich zwischen der TPR-Domäne von Hop, für die diese Struktur ermittelt wurde, und den TPR-Regionen von FKBP52 (Abb 4.2.) zeigt, dass sowohl die Reste, die zum TPR-Konsensus gehören, als auch die Reste, die für die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem C-terminalen EEVD-Peptid von Hsp90 verantwortlich sind, konserviert sind (Scheufler et al., 2000). Abgesehen davon aber ist die Homologie zwischen den jeweiligen TPR-Domänen der beiden Proteine nicht hoch (nur 14% Gesamt-Aminosäure-Identität in der TPR2A-Region). Darüber hinaus enthält der Loop zwischen Helix 1B und 2A bei FKBP52 15 zusätzliche Aminosäuren. Im Gegensatz zu FKBP52 bindet Hop zudem nicht an nicht-native Proteine (Bose et al., 1996; Freeman et al., 1996). Das liefert zusätzliche Evidenz für die Schlussfolgerung, dass nicht diejenigen Teile der TPR-Region, die mit Hsp90 interagieren, für die Bindung von nicht-nativen Proteinen verantwortlich sind. Folglich könnte die spezielle Architektur der TPR-Domäne von FKBP52 zusätzliche Bindestellen zur Verfügung stellen, die von nicht-nativen Proteinen besetzt werden könnten, ohne die Interaktion mit Hsp90 zu stören.

Davon ausgehend könnten die großen Immunophiline im Steroidhormonrezeptor-Komplex also gleichzeitig sowohl mit Hsp90 als auch mit dem jeweiligen Rezeptor als Substrat interagieren, wie das im Modell in Abb. 4.1. dargestellt ist.

5. Zusammenfassung

Um ihre vielseitigen Funktionen erfüllen zu können, ist für Proteine die korrekte Ausbildung von Struktur unabdingbar. *In vivo* wird die Proteinfaltung von zwei Klassen von Proteinen unterstützt. Faltungskatalysatoren wie PDI und PPIasen beschleunigen langsame Schritte in der Proteinfaltung wie die Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen (Fischer et al., 1984) und die Ausbildung von korrekten Disulfidbrücken (Bardwell, 1997; Darby, 1998). Chaperone beeinflussen die kinetisch kontrollierte Konkurrenz zwischen Proteinfaltung und deren Nebenreaktionen wie Aggregation, ohne dass sie Teil der Endstruktur des Substratproteins werden (Ellis und van der Vies, 1991; Beißinger und Buchner, 1998).

Das Hsp90-System ist eines dieser Chaperon-Systeme. Es interagiert *in vivo* mit einer Vielzahl von Substratproteinen, die diese Interaktion benötigen, um ihre aktive Konformation zu erlangen. Substrate sind dabei vor allem Proteine aus dem Bereich der Signaltransduktion, wie Kinasen oder Steroidhormonrezeptoren (SHRs) (Pratt und Toft, 1997). An der Interaktion mit SHRs sind Komplexe verschiedener Zusammensetzung beteiligt, die neben Hsp90 noch zusätzliche Partnerproteine enthalten. Die drei großen Immunophilinen FKBP51, FKBP52 und Cyp40 sind Teil des späten, so genannten reifen SHR-Komplexes. Es existieren verschiedene reife Komplexe, die sich in dem gebundenen Immunophilin unterscheiden. Im Fall der Immunophilinen scheint die Inkorporation von der Art des gebundenen Substrats abzuhängen (Barent et al., 1998).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die funktionelle Analyse der drei Immunophilinen aus dem Säuger-System. Sie gehören alle zur Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen), sind aber Mitglieder von verschiedenen Unterfamilien, den FKBP5s und den Cyclophilinen. Diese Unterfamilien unterscheiden sich generell sowohl in der Substratspezifität, als auch in der Bindung von immunsuppressiven Agentien voneinander.

Strukturelle Untersuchungen mittels Circular dichroismus belegen eine größere Ähnlichkeit der beiden FKBP5s zueinander als mit Cyp40 und auch im Bezug auf die Stabilität gegenüber chemischer Denaturierung verhalten sich FKBP51 und FKBP52 ähnlich. Cyp40 erweist sich hier als weit weniger stabil. Einzig in der Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung unterscheiden sich die beiden FKBP5s, indem FKBP51 eher Cyp40 ähnelt und um mehrere Grad Celsius instabiler ist als FKBP52. Diese höhere Thermostabilität von FKBP52 steht in Einklang mit seiner Eigenschaft als Hitzeschockprotein (Sanchez, 1990). Ein Vergleich der großen Immunophilinen mit den jeweiligen kleinen Immunophilinen FKBP12 und Cyp18 zeigte, dass bei allen drei großen Immunophilinen die zusätzlichen C-terminalen Domänen einen hohen α -Helix Anteil besitzen. Zudem scheinen diese Domänen für die im Vergleich mit FKBP12 und Cyp18 stark verringerte Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung verantwortlich zu sein.

In seiner PPIase-Aktivität unterscheidet sich Cyp40 von den beiden FKBP5s vor allem durch seine höhere katalytische Aktivität sowohl gegenüber Peptid- als auch Proteinsubstraten und

durch das Fehlen einer ausgeprägten Substratspezifität. Generell entspricht die PPIase-Aktivität aller drei Immunophilinen jedoch ihrem jeweiligen Pendant unter den kleinen Immunophilinen. Dabei ist die katalytische Aktivität gegenüber dem Proteinsubstrat RCM-T1 etwa um das 50 bis 100fache geringer als gegenüber Peptidsubstraten. Im Gegensatz dazu katalysiert der Trigger faktor aus *E. coli*, der sowohl PPIase- als auch Chaperon-Aktivität besitzt und auch zu den großen PPIasen gezählt werden kann, die Isomerisierung beider Substrate gleich gut. Das hängt damit zusammen, dass beim Trigger Faktor auch die zusätzlichen Domänen an der Isomerisierung beteiligt sind (Scholz et al., 1997c; Zarnt et al., 1997), was bei den großen Immunophilinen FKBP51, FKBP52 und Cyp40 nicht der Fall ist (siehe unten).

Die Interaktion der großen Immunophilinen mit Hsp90 wurde mit Plasmon-Resonanz-Spektroskopie und Isothermischer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Beide Methoden zeigten, dass FKBP52 am stärksten an Hsp90 bindet und Cyp40 die schwächste Bindung aufweist. Mittels ITC konnte auch die Stöchiometrie der Komplexe geklärt werden, die bisher noch kontrovers diskutiert wurde (Rehberger et al., 1992; Prodromou et al., 1999; Silverstein et al., 1999). Es zeigte sich, dass, entgegen früheren Annahmen, zwei Immunophilin-Monomere pro Hsp90-Dimer binden.

Deutliche Unterschiede in der Chaperon-Aktivität der drei Immunophilinen belegten Untersuchungen ihres Einflusses auf die thermische Aggregation von CS. Hier waren sowohl Cyp40 als auch FKBP51 deutlich potentere Chaperone als FKBP52.

Um die Struktur-Funktions-Beziehung innerhalb der Immunophilinen zu klären, wurden Fragmente von FKBP52 hergestellt und bezüglich ihrer Struktur und Stabilität, sowie im Bezug auf PPIase- und Chaperon-Aktivität untersucht. Die Fragmente teilen sich bezüglich ihres Sekundärstrukturgehalts in zwei Gruppen ein, wobei die Fragmente, die nur Domäne 1 oder die Domänen 1 und 2 enthalten, einen sehr geringen Anteil an α -Helices aufweisen, während die Fragmente, die vorwiegend aus den Domänen 3 und 4 bestehen, einen hohen Anteil an α -helikaler Struktur besitzen. Interessanterweise destabilisieren die hauptsächlich α -helikalen Domänen die betreffenden Fragmente gegenüber thermischer Denaturierung und Aggregation, wohingegen Domäne 1 dem Protein Stabilität verleiht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 1-148 (Domäne 1) für die Wildtyp PPIase-Aktivität gegenüber Peptid- und Proteinsubstraten sowohl notwendig als auch ausreichend ist. Anders als beim Trigger Faktor erhöht die Anwesenheit der zusätzlichen Domänen die katalytische Aktivität von FKBP52 in der Rückfaltung von RCM-T1 nicht. Offenbar ist bei den großen Immunophilinen sowohl für die Isomerisierung von Peptid-, als auch Proteinsubstraten nur die PPIase-Domäne verantwortlich.

Den Hauptbeitrag zur Chaperon-Aktivität liefern die Aminosäuren 264-400 (Domäne 3), aber auch Reste C-terminal von dieser Domäne scheinen daran beteiligt zu sein. Domäne 3 bildet auch die Region, die mit Hsp90 interagiert. Diese Interaktion konnte anhand eines Peptides, das die C-terminalen 17 Aminosäuren von Hsp90 umfasst, nachgewiesen werden. Ein Kompetitionsexperiment im CS-Assay unter Bedingungen, bei denen FKBP52 mit diesem

Peptid gesättigt vorlag, zeigte, dass die Bindung an Hsp90 die Interaktion zwischen FKBP52 und dem nicht-nativem Protein nicht inhibiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die drei Immunophiline sowohl verschiedene Affinitäten zu Hsp90 als auch zu nicht-nativen Proteinen aufweisen. Diese Unterschiede sind möglicherweise die Basis für die selektive Inkorporation der Immunophiline in den SHR-Komplex und könnten überdies die Funktion des Komplexes modulieren. Die PPIase-Aktivität befindet sich in der Domäne 1, während die Chaperon-Aktivität in Domäne 3 lokalisiert ist, wo sich auch die Bindestelle für Hsp90 befindet. Hier konnte gezeigt werden, dass ein Immunophilin gleichzeitig an ein Hsp90-Peptid und ein nicht-natives Protein binden kann.

Die Arbeit zeigt deutlich, dass die drei Immunophiline sich trotz Ähnlichkeiten in Sequenz und Struktur deutlich voneinander unterscheiden. Das liefert einen Erklärungsansatz für Effizienz-Unterschiede zwischen SHR-Komplexen mit verschiedenen FKBP, die bereits in *in vivo* Studien ermittelt wurden (Reynolds et al., 1999) und zeigt eine mögliche Rolle der Immunophiline als Modulatoren der Funktion des Rezeptorkomplexes auf. Da die hier aufgezeigten Unterschiede in PPIase- und Chaperon-Aktivität auch im Hefe-System konserviert sind (Mayr, 2000), könnten sie die Grundlage der Funktion der großen PPIasen im Hsp90-Multichaperon-Komplex bilden.

Literaturverzeichnis:

- Abraham, R.T. und Wiederrecht, G.J. (1996) *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 483-510
- Akner, G., Mossberg, K., Sundqvist, K.G., Gustafsson, J.A. und Wikstrom, A.C. (1992) *Eur. J. Cell Biol.* **58**, 356-364.
- Alarcón, C.M. und Heitman, J. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5968-5975
- Albers, M.W., Walsh, C.T. und Schreiber, S.L. (1990) *J. Org. Chem.* **55**, 4984-4986
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M. und Watson, J.D. (Hrsg.) (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York & London
- Anfinsen, C.B. (1973) *Science* **181**, 223-240
- Arrigo, A.-P. und Landry, J. (1994) in: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, Morimoto, R.I., Tissieres, A., und Georgopoulos, C., (Hrsg.) (Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 335-373
- Aviezer, K., Kurek, I., Erel, N., Blecher, O., Devos, K. und Breiman, A. (1998) *Plant Science* **139**, 149-158
- Atherton, E., Fox, H., Logan, C.J., Harkiss, D., Sheppard, R.C. und Williams, S.B.J. (1978) *Chem. Soc. Chem. Comm.* **13**, 537-539
- Bachmann, A. und Kiefhaber, T. (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 375-386
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D.P., Gassner, C. und Bardwell, J.C.A. (1999) *Cell* **98**, 217-227
- Baldwin, R.L. (1995) *J. Biomol. NMR* **5**, 103-109
- Baldwin, R.L. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 965-966
- Ban, C., Junop, M. und Yang, W. (1999) *Cell* **97**, 85-97
- Bardwell, J.C.A., McGovern, K. und Beckwith, J. (1991) *Cell* **67**, 581-589
- Bardwell, J.C.A. (1997) in: *Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts*, Gething, M.J. (Hrsg.), Oxford Press, Oxford, 311-314
- Bardwell, J.C.A. (1994) *Mol. Microbiol.* **14**, 199-205
- Barent, R.L., Nair, S.C., Carr, D.C., Ruan, Y., Rimerman, R. A., Fulton, J., Zhang, Y. und Smith, D.F. (1998) *Mol. Endocrinol.* **12**, 342-354
- Baughman, G., Wiederrecht, G.J., Campbell, N.F., Martin, M.M. und Bougois, S. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15**, 4395-4402

- Becker, J. und Craig, E.A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **219**, 11-23
- Beißinger, M. und Buchner, J. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 245-259
- Bergsma, D.J., Eder, C., Gross, M., Kersten, H., Sylvester, D., Appelbaum, E., Cusimano, D., Livi, G.P., McLaughlin, M.M., Kasyan, K. et al. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23204-23214.
- Blachere, N.E., Li, Z., Chandawarkar, R.Y., Suto, R., Jaikara, N.S., Basu, S., Udono, H. und Srivastawa, P.K. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 1315-1322
- Blagosklonny, M.V., Toretsky, J. und Neckers, L. (1995) *Oncogene* **11**, 933-939
- Blecher, O., Erel, N., Callebaut, I., Aviezer, K. und Breiman, A. (1996) *Plant Mol. Biol.* **32**, 493-504
- Bose, S., Weikl, T., Bügl, H. und Buchner, J. (1996) *Science* **274**, 1715-1717
- Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Bram, R.J. und Crabtree, G.R. (1994) *Nature* **371**, 355-358
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R. und Brennan, M. (1975) *Biochemistry* **14**, 4953-4963
- Brugge, J.S., Erikson, E. und Erikson, R.L. (1981) *Cell* **25**, 363-372
- Buchner, J. (1996) *FASEB J.* **10**, 10-19
- Buchner, J. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 136-141
- Buchner, J., Bose, S., Mayr, C. und Jakob, U. (1998a) *Methods Enzymol.* **290**, 409-418
- Buchner, J., Grallert, H. und Jakob, U. (1998b) *Methods Enzymol.* **290**, 323-338
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. und Craig, E. (2000) *Cell* **101**, 119-122
- Bukau, B. und Horwich, A.L. (1998) *Cell* **92**, 351-366
- Bulleid, N.J. und Freeman, R.B. (1988) *Nature* **335**, 649-651
- Bush, K.T., Hendrickson, B.A. und Nigam, S.K. (1994) *Biochem. J.* **303**, 705-708
- Callebaut, I., Renoir, J.-M., Lebeau, M.-C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E.-E., und Mornon, J.-P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6270-6274
- Cameron, A.M., Steiner, J.P., Sabatini, D.M., Kaplin, A.I., Walensky, L.D. und Snyder, S.H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1784-1788
- Cantor, C.R. und Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry 2*, W.H. Freeman & Co, San

Francisco, 374-451

Canziani, G., Zhang, W., Cines, D., Rux, A., Willis, S., Cohen, G., Eisenberg, R. und Chaiken, I. (1999) *Methods* **19**, 253-269

Carrel, R.W. und Lomas, D.A. (1997) *Lancet* **350**, 134-138

Chakrabarty, A., Kortemme, T., Padmanabhan, S. und Baldwin, R.L. (1993) *Biochemistry* **32**, 5560-5565

Chambraud, B., Radanyi, C., Camonis, J.H., Rajkowski, K., Schumacher, M. und Baulieu, E.-E. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2104-2109

Chambraud, B., Radanyi, C., Camonis, J.H., Shazand, K., Rajkowski, K. und Baulieu, E.-E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32923-32929

Chambraud, B., Rouviere-Fourmy, N., Radanyi, C., Hsiao, K., Peattie, D.A., Livingston, D.J. und Baulieu, E.-E. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 160-166

Chan, H.S. und Dill, K.A. (1998) *Proteins* **30**, 2-33

Chen, C.F., Chen, Y., Dai, K., Chen, P.L. Riley, D.J. und Lee, W.E. (1996a) *Mol. Cell Biol.* **16**, 4691-4699

Collins, J.H. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 1288-1290

Connern, C.P. und Hallestrap, A.P. (1992) *Biochem. J.* **284**, 381-385

Craescu, C.T., Rouvière, N., Popescu, A., Cerpolini, E., Lebeau, M.-C., Baulieu, E.-E. und Mispelter, J. (1996) *Biochemistry* **35**, 11045-11052

Czar, M.J., Owens-Grillo, J.K., Yem, A.W., Leach, K.L., Deibel, M.R., Jr., Welsh, M.J. und Pratt, W.B. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 1731-1741

Darby, N.J., Penka, E. und Raina, S. (1998) *J. Mol. Biol.* **276**, 239-247

Dartigalongue, C. und Raina, S. (1998) *EMBO J.* **17**, 1192-1199

Das, A.K., Cohen, P.T. und Barford, D. (1998) *EMBO J.* **17**, 1192-99

Dill, K.A. (1990) *Biochemistry* **29**, 7133-7155

Dill, K.A. und Chan, H.S. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 10-19

Dolinski, K.J., Cardenas, M.E. und Heitman, J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7344-7352

Dolinski, K.J. und Heitman, J. (1997) in: *Molecular Chaperones and Protein Folding*

- Catalysts, Gething, M.J. (Hrsg.), Oxford Press, Oxford, 359-369
- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M. und Heitman J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 13093-8.
- Duina, A.A., Chang, H.C., Marsh, J.A., Lindquist, S. und Gaber, R.F. (1996a) *Science* **274**, 1713-1715.
- Duina, A.A., Marsh, J.A. und Gaber, R.F. (1996b) *Yeast* **12**, 943-952.
- Dutta, R. und Inouye, M. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 24-28
- Edman, P., und Berg, G. (1967) *Eur. J. Biochemistry* **1**, 80-97
- Ehrnsperger, M., Buchner, J., und Gaestel, M. (1998) in: *Molecular chaperones in the life cycle of proteins*. A.L. Fink und Y. Goto, (Hrsg.) (New York: Marcel Dekker), 533-575
- Ellis, R.J. und van der Vies, S.M.(1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347
- Ewalt, K.L., Hendrik, J.P., Houry, W.A. und Hartl, F.U. (1997) *Cell* **90**, 491-500
- Fairbanks, G., Steck, T.L. und Wallach, D.F.H. (1971) *Biochemistry* **10**, 2606-2617
- Fischer, G. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1415-1436
- Fischer, G., Bang, H. und Mech, C. (1984) *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 1101- 1111
- Fischer, S., Michnick, S. und Karplus, M.A. (1993) *Biochemistry* **32**, 13830-13837
- Fling, S.P. und Gregerson, D.S. (1986) *Anal. Biochem.* **155**, 83-88
- Forood, B., Feliciano, E.J. und Nambiar, K.P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 838- 842
- Franke, E.K., Yuan, H.E.H. und Luban, J. (1994) *Nature* **372**, 359-362
- Freedman, R.B. (1989) *Cell* **57**,1069-1072
- Freeman, B.C., Toft, D.O. und Morimoto, R. (1996) *Science* **274**, 1718-1720
- Friedman, J. und Weissman, I. (1991) *Cell* **66**, 799-806
- Friedman, J., Trahey, M. und Weissman, I. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6815-6819
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz, P.S. und Hankinson, O. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29270-29278
- Galas, D.J. (2001) *Science* **291**, 1257-1260

- Galat, A., Lane, W.S., Standaert, R.F. und Schreiber, S.L. (1992) *Biochemistry* **31**, 2427-2434
- Gasc, J.M., Renoir, J.M., Faber, L.E., Delahaye, F. und Baulieu, E.-E. (1990) *Exp. Cell Res.* **186**, 362-367.
- Georgopoulos, C. und Welch, W.J. (1993) *Ann. Rev. Cell. Biol.* **9**, 601-634
- Geourjon, C. und Deleage, G. (1994) *Protein Engineering* **7**, 157-164
- Gething, M.J., Blond-Elguindi, S., Mori, K. und Sambrook, J.F. (1994) in: *The biology of heat shock proteins und molecular chaperones*, Morimoto, R.I., Tissieres, A., und Georgopoulos, C., eds. (Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 111-135
- Gething, M.J. und Sambrook, J. (1992) *Nature* **355**, 33-44
- Gill, S.C. und von Hippel, P.H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319-326
- Gold, B.G. (1999) *Drug Metabolism Reviews* **31**, 649-663
- Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A. und Lorimer, G.H. (1989) *Nature* **342**, 884-889
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T. und Bukau, B. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13732-13737
- Göthel, S.F. und Marahiel, M.A. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 423-36
- Hamilton, G.S. und Steiner, J.P. (1998) *J. Med. Chem.* **41**, 5119-5143.
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hanahan, D. (1985), in: *DNA cloning*, Hrsg.: Glover, D.M., IRL Press, Oxford, 109-135
- Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R. und Speicher, D.W. (1984) *Science* **226**, 544-546
- Harrison, S.C. und Durbin, R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4028-4030
- Harrison, R.K., und Stein, R.L. (1990a) *Biochemistry* **29**, 1684-1689
- Harrison, R.K., und Stein, R.L. (1990b) *Biochemistry* **29**, 3813-3816
- Hartl, F.U. (1996) *Nature* **381**, 571-580
- Hartl, F.U. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 235-237
- Hasel, K.W., Glass, J.R., Godbout, M. und Sutcliffe, J.G. (1991) *Mol. Cell Biol.* **11**, 3484-3491

- Hawkins, H.C. und Freedman, R.B. (1991) *Biochem. J.* **275**, 335-339
- Hawkins, H.C., de Nardi, M. und Freedman, R.B. (1991) *Biochem. J.* **275**, 341-348
- Heitman, J., Movva, N.R. und Hall, M.N. (1992) *New Biologist* **4**, 448-460
- Henning, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, K.P., Grabley, S., Küllertz, G. und Fischer, G. (1998) *Biochemistry* **37**, 5953-5960
- Heukeshofen, J. und Dernick, R. (1988) *Electrophoresis* **9**, 335-362
- Hickey, E., Brandon, S.E., Smale, G., Lloyd, D. und Weber, L.A. (1989) *Mol Cell Biol.* **9**, 2615-2626
- Hoffman, K. und Handschumacher, R.E. (1995) *Biochem. J.* **307**, 5-8
- Hoffmann, K., Kakalis, L.T., Anderson, K.S., Armitage, I.A. und Handschumacher, R.E. (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 188-193
- Hu, J. und Seeger, C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1060-1064
- Hutchison, K.A., Scherrer, L.C., Czar, M.J., Ning, Y., Sanchez, E.R., Leach, K.L., Deibel, M.R. und Pratt, W.B. (1993) *Biochemistry* **32**, 3953-3957
- Jaenicke, R. (1987) *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237
- Jaenicke, R. (1993) *Philos. Trans. R. Soc. (London). B* **326**, 535-553
- Jaenicke, R. und Buchner, J. (1993) *Chemtracts* **4**, 1-30
- Jaenicke, R. und Rudolph, R. (1989) in: *Protein Structure: A Practical Approach*. Creighton, (Hrsg.), IRL Press, Oxford, 191-223
- Janowski, B., Wollner, S., Schutkowski, M. und Fischer, G. (1997) *Anal. Biochem.* **252**, 299- 307
- Jaymaran, T., Brillantes, A.-M., Timerman, A.P., Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Marks, A.R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9474-9477
- Jin, Y.-J., Albers, M.W., Lane, W.S., Bierer, B.E., Schreiber, S.L. und Burakoff, S.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6677-6681
- Ke, H., Zydowsky, L.D., Liu, J. und Walsh, C.T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 9483-87
- Khyse-Anderson, J. (1984) *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209
- Kieffer, L., Seng, T.W., Wei Li, Osterman, D.G., Handschumacher, R.E. und Bayney, R.M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12303-12310

- Kieffer, L.J., Thalhammer, T., und Handschumacher, R.E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5503-5507
- Kim, P.S. und Baldwin, R.L. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459-489
- Kim P.S., und Baldwin, R.L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 631-660
- Kleerebezem, M., Heutink, M. und Tommassen, J. (1995) *Mol. Microbiol.* **18**, 313-320.
- Knarr, G., Gething, M.-J., Modrow, S. und Buchner, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27589-27594
- Kurek, I., Aviezer, K., Erel, N., Herman, E. und Breiman, A. (1999) *Plant Physiol.* **119**, 693- 704
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- Lam, E., Martin, M.M., Timerman, A.P., Sabers, C., Fleicher, S., Lukas, T., Abraham, R.T., O'Keefe, S.J., O'Neill, E.A. und Wiederrecht, G.J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26511-26522
- Lamb, J.R., Tugendreich, S., und Hieter, P. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 257-259
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al. (2001) *Nature* **409**, 860-921
- Lebeau, M.-C., Massol, N., Herrick, J., Faber, L., Renoir, J.-M., Radanyi, C. und Baulieu, E.-E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4281-4284
- Lebeau, M.C., Myagkikh, I., Rouviere-Fourmy, N., Baulieu, E.-E. und Klee, C.B. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 750-155.
- Levinthal, C.J. (1968) *J. Chem. Phys.* **65**, 44-45
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. und Buchner, J. (1993) *Protein Science* **2**, 1490-1496
- Lim, V.I. und Spirin, A.S. (1986) *J. Mol. Biol.* **188**, 565-574
- Lindquist, S., und Craig, E.A. (1988) *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677
- Little, E., Ramakrishnan, M., Roy, B., Gazit, G. und Lee, A.S. (1994) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **4**, 1-18
- Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. und Schreiber, S.L. (1991) *Cell* **66**, 807-815
- Lu, K.P., Hanes, S.D. und Hunter, T. (1996) *Nature* **380**, 544-547

- Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V. und Goff, S.P. (1993) *Cell* **73**, 1067-1078
- Marsh, J.A., Kalton, H.M. und Gaber, R.F. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7353-7359
- Massol, N., Lebeau, M.-C., Renoir, J.-M., Faber, L.E. und Baulieu, E.-E. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **187**, 1330-1335
- Matouschek, A., Rospert, S., Schmid, K., Glick, B.S. und Schatz, G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**, 6319-6323.
- Mayer, M.P. und Bukau, B. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 261-268
- Mayr, C. (2000) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der großen Immunophiline, Cpr6 und Cpr7, aus *S. cerevisiae*, Dissertation, Universität Regensburg.
- Mayr, C., Richter, K., Lilie, H. und Buchner, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34140-34146
- Mayr, L.M. und Schmid, F.X. (1993) *Protein Expr. Purif.* **4**, 52-58
- Michnick, S.W., Rosen, M.K., Wandless, T.J., Karplus, M. und Schreiber, S.L. (1991) *Science* **252**, 836-39
- Mikol, V., Kallen, J., Pflugl, G. und Walkinshaw, M.D. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 1119-30.
- Moore, J.M., Peattie, D.A., Fitzgibbon, M.J. und Thomson, J.A. (1991) *Nature* **351**, 248-250
- Morimoto, R.I., Tissieres, A. und Georgopoulos, C. (1994) in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Hrsg. Morimoto, R.I., Tissieres, A. und Georgopoulos, C.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: 1-30
- Mücke, M. und Schmid, F.X. (1994a) *Biochemistry* **33**, 14608-14619
- Mücke, M. und Schmid, F.X. (1994b) *J. Mol. Biol.* **239**, 713-725
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) *Methods Enzymol.* **155**, 335-350
- Nadeau, K., Das, A. und Walsh, C.T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1479-1487.
- Nair, S.C., Rimerman, R.A., Toran, E.J., Chen, S., Prapapanich, V., Butts, R. und Smith, D.F. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 594- 603
- Nair, S.C., Toran, E.J., Rimerman, R.A., Hjermstad, S., Smithgall, T.E. und Smith, D.F. (1996) *Cell Stress Chaperones* **1**, 237-250
- Neckers, L., Schulte, T.W. und Mimnaugh, E. (1999) *Invest. New Drugs.* **17**, 361-373.
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R.M. und Bernardi, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2185-2192.

- Obermann, W.M., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P. und Hartl, F.U. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 901-910.
- Odefey, C., Mayr, L.M. und Schmid, F.X. (1995) *J. Mol. Biol.* **245**, 69-78
- O'Neil, K.T. und DeGrado, W.F. (1990) *Trends in Biol. Sci.* **5**, 59-64
- Opperman, H., Levinson, W. und Bishop, J.M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1067-1070
- Owens-Grillo, J.K. Czar, M.J., Hutchison, K.A., Hoffmann, K., Perdew, G.H. und Pratt, W.B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13468- 13475
- Owens-Grillo, J. K., Hoffmann, K., Hutchinson, K.A., Yem, A. W., Deibel, M.R., Jr., Handschumacher, R. E. und Pratt, W.B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20479-20484
- Pace, C.N., Shirley, B.A., McNutt, M. und Gajiwala, K. (1996) *FASEB J.* **10**, 75-83
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1998) *EMBO J.* **17**, 4829-4836.
- Park, S.T., Aldape, R.A., Futer, O., DeCenzo, M.T. und Livingston, D.J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3316-3324
- Parsell, D.A. und Lindquist, S. (1994) in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, (Hrsg. Morimoto, R.I., Tissieres, A. und Georgopoulos, C.), Cold Spring Harbour Laboratory, New York: 457-494
- Perdew, G.H., Hord, N., Hollenback, C.E. und Welsh, M.J. (1993) *Exp. Cell Res.* **209**, 350- 356
- Perrot-Aplanat, M., Cibert, C., Geraud, G. und Renoir, J.M. (1995) *J. Cell Science* **108**, 2037-2051
- Pierce, M.M., Raman, C.S. und Nall, B. T. (1999) *Methods* **19**, 213-221
- Pratt, W.B. und Toft, D.O. (1997) *Endocrine Reviews* **18**, 306-360
- Price, E.R., Zydowsky, L.D., Jin, M.J., Baker, C.H., McKeon, F.D. und Walsh, C.T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 1903-1907.
- Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Roe, S.M., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (2000) *EMBO J.* **19**, 4383-4392.
- Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brian, R., Ladbury, J.E., Piper, W.P. und Pearl, L.H. (1997a) *Cell* **90**, 245-251
- Prodromou, C., Roe, S.M., Piper, W.P. und Pearl, L.H. (1997b) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 477-482

- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D., E., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.W., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1999) *EMBO J.* **18**, 754-762
- Radanyi, C., Chambraud, B. und Baulieu, E.-E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11197-1207
- Radford, S.E. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 611-617
- Rahfeld, J.-U., Rucknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K. und Fischer, G. (1994) *FEBS Lett.* **352**, 180-184
- Ramsey, A.J., Russel, L.C., Whitt, S.R. und Chinkers, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17857-17862
- Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T. und Noel, J.P. (1997) *Cell* **89**, 875-86
- Rassow, J., Mohrs, K., Koidl, S., Barthelmess, I.B., Pfanner, N. und Tropschug, M. (1995) *Mol. Cell Biol.* **15**, 2654-2662.
- Ratajczak, T. und Carrello, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2961-2965
- Ratajczak, T., Carrello, A., Mark, P.J., Warner, B.J., Simpson, R.J., Moritz, R.L., und House, A.K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13187-13192
- Ratajczak, T., Carrello, A. und Minchin, R.F. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 117-125.
- Ratajczak, T., Hlaing, J., Brockway, M.J. und Hahnel, R. (1990) *J. Steroid Biochem.* **35**, 543-553
- Reddy, R.K., Kurek, I., Silverstein, A.M., Chinkers, M., Breiman, A. und Krishna, P. (1998) *Plant Physiol.* **118**, 1395-1401
- Rehberger, P., Rexin, M. und Gehring, U., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8001-8005
- Renoir, J.-M., Le Bihan, S., Mercier-Bodard, C., Gold, A., Arjomandi, M., Radanyi, C. und Baulieu, E.-E. (1994) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **48**, 101-110
- Renoir, J.M., Mercier-Bodard, C., Hoffmann, K., Le Bihan, S., Ning, Y.M., Sanchez, E.R., Handschumacher, R.E. und Baulieu, E.-E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4977-4981
- Renoir, J.-M., Radanyi, C., Faber, L.E. und Baulieu, E.-E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10740-10745
- Reynolds, P.D., Ruan, Y., Smith, D.F. und Scammell, J.G. (1999) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 663-669

- Richter, K. und Buchner, J. (2001) *J. Cell Phys.*, eingereicht
- Riviere, S., Menez, A. und Galat, A. (1993) *FEBS Lett.* **315**, 247-251
- Roe, S.M., Prodromou, C., O'Brian, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1999) *J. Med. Chem.* **42**, 260-266
- Rosen, M.K., Standaert, R.F., Galat, A., Natatsuka, M. und Schreiber, S.L. (1990) *Science* **248**, 863-866
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. und Bukau, B. (1997) *EMBO J.* **16**, 1501-1507
- Rudd, K.E., Sofia, H.J., Koonin, E.V., Plunkett, G., Lazar, S. und Rouviere, P.R. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 12-14
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. und Jaenicke, R. (1997) in: *Protein Function: A Practical Approach*. (Hrsg. Creighton, T.E.) IRL Press, Oxford, 57-99
- Rutherford, S.L. und Lindquist, S. (1998) *Nature* **396**, 336-342
- Sambrook, J.F., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Sanchez, E.R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 22067-22070
- Scheibel, T., Neuhofen, S., Weikl, T., Mayr, C., Reinstein, J., Vogel, P.D. und Buchner, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **279**, 18608-18613
- Scheibel, T., Weikl, T. und Buchner, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1495-1499
- Scheibel, T., Weikl, T., Rimerman, R., Smith, D., Lindquist, S. und Buchner, J. (1999) *Mol. Microbiol.* **34**, 701-713.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. und Moarefi, I. (2000) *Cell* **101**, 199-210
- Schiene, C. und Fischer, G. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 40-5
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. und Lindquist, S. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 289-296
- Schmid, F.X. (1989) in: *Protein Structure: A Practical Approach* (Hrsg. Creighton, T.E.) IRL Press, Oxford: 251-285
- Schmid, F.X. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 123-143
- Schmid, F.X., Mayr, L.M., Mücke, M. und Schönbrunner, E.R. (1993) *Adv. Protein Chem.* **49**, 66.

- Schneuwly, S., Shortridge, R.D., Larrivee, D.C., Onto, T., Ozaki, M. und Pak, W.L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5390-5394
- Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G. und Schmid, F.X. (1997a) *J. Mol. Biol.* **273**, 752-762
- Scholz, C., Schindler, T., Dolinsky, K., Heitman, J. und Schmid, F.X. (1997b) *FEBS Lett.* **414**, 69-73
- Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G. und Schmid, F.X. (1997c) *EMBO J.* **16**, 54-58
- Schönbrunner, E. R., Mayer, S., Tropschug, M., Fischer, G., Takahashi, N. und Schmid, F.X. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3630-3635
- Segnitz, B. und Gehring, U. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2179-2183
- Sekerina, E., Rahfeld, J.-U., Müller, J., Fanghänel, J., Rascher, C., Fischer, G. und Bayer, P. (2000) *J. Mol. Biol.* **301**, 1003-1017
- Sepehrnia, B., Paz, I.B., Dasgupta, G. und Momand, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15084-15090
- Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D.L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M.J., Mathews, L.M., Schneider, M.D., Hamilton, S.L. und Matzuk, M.M. (1998) *Nature* **391**, 489-492
- Sikorski, R.S., Boguski, M.S., Goebel, M. und Hieter, P. (1990) *Cell* **60**, 307- 317
- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Kanelakis, K.C., Radanyi, C., Renoir, J-M. und Pratt, W. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36980-36986
- Smith, D.F. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 283-288
- Smith, D.F., Baggenstoss, B.A., Marion, T.N. und Rimerman R.A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18365-18371
- Smith, D.F., Faber, L.E. und Toft, D.O. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3996-4003
- Smith, T., Ferreira, L.R., Hebert, C., Norris, K. und Sauk, J.J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18323-18328
- Song, H.Y., Dunbar, J.D., Zhang, Y.X., Guo, D. und Donner, D.B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 3574-3581
- Srivatava, P.K., Udono, H., Blachere, N.E. und Li, Z. (1994) *Immunogenetics* **39**, 39-98
- Stammes, M.A., Shieh, B.H., Chuman, L., Harris, G.L. und Zucker, C.S. (1991) *Cell* **65**, 219- 227
- Stancato, L.F., Chow, Y.H., Hutchison, K.A., Perdew, G.H., Jove, R. und Pratt, W.B. (1993)

- J. Biol. Chem. **268**, 21711-21716
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U. und Pavletich, N.P. (1997) *Cell* **89**, 239-250
- Stewart, D.E., Sarkar, A. und Wampler, J.E. (1990) *J. Mol. Biol.* **214**, 253-260.
- Stoller, G., Rücknagel, K.P., Nierhaus, K.H., Schmid, F.X., Fischer, G. und Rahfeld, J.U. (1995) *EMBO J.* **14**, 4939-4948
- Tai, P.K., Albers, M.W., Chang, H., Faber, L.E. und Schreiber, S.L. (1992) *Science* **256**, 1315-1318
- Tai, P.K., Albers, M.W., Mc Donnel, D.P., Chang, H., Schreiber, S.L. und Faber, L.E. (1994) *Biochemistry* **33**, 10666-10671
- Tai, P.K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakin, N.G., Duhring, J.L. und Faber, L.E. (1986) *Biochemistry* **25**, 5269-75
- Tanford, C. (1970) *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C.T., Sodroski, J. und Gottlinger, H.G. (1994) *Nature* **372**, 363-365
- Timerman, A.P., Ogunbumni, E., Freund, E., Wiederrecht, G., Marks, A.R. und Fleischer, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22992-22999.
- Timerman, A.P., Onoue, H., Xin, H.B., Barg, S., Copello, J., Wiederrecht, G. und Fleischer, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20385-20391
- Towbin, H., Staehelin, T.M. und Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4368
- Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G. und Rahfeld, J.-U. (1999) *FEBS Lett.* **446**, 278-282
- Vanhove, M., Lejeune, A. und Pain, R.H. (1998) *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 372-377
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. et al. (2001) *Science* **291**, 1304-1351.
- Vittorioso, P., Cowling, R., Faure, J.D., Caboche, M. und Bellini, C. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3034-3043
- Wang, T.W., Donahoe, P.K. und Zervos, A.S. (1994) *Science* **265**, 674-676
- Warth, R., Briand, P.A. und Picard, D. (1997) *Biol. Chem.* **378**, 381-391.

- Wartmann, M. und Davis, R.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6695-6701
- Wearsch, P.A. und Nicchita, C.V. (1996) *Biochemistry* **35**, 16760-16769.
- Weickl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J. und Buchner, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **303**, 583-592
- Welch, W.J. und Feramisco, J.R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 14949-14959
- Whitelaw, M., Pongratz, I., Wilhelmsson, A., Gustafsson, J.A., und Poellinger, L. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2504-2514
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. und Jakob, U. (1992) *Nature* **358**, 169-170
- Wiederrecht, G., Hung, S., Chan, H.K., Marcy, A., Martin, M., Calaycay, J., Boulton, D., Sigal, N., Kincaid, R.L. und Siekierka, J.J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21753-21760
- Wilson, K. P., Yamashita, M. M., Sintchak, M. D., Rotstein, S. H., Murcko, M. A., Boger, J., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Black, J. R. und Navia, M. A. (1995) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **51**, 511-518
- Winkler, K.E., Swenson, K.I., Kronbluth, S. und Means, A.R. (2000) *Science* **287**, 1644-1647
- Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.-U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., Cantley, L.C. und Lu, K.P. (1997) *Science* **278**, 1957-1960
- Yang, W.M., Inouye, C.J. und Seto, E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15187-15193.
- Yem, A.W., Reardon, I.M., Leone, J.W., Henrikson, R.L. und Deibel, M.R. (1993) *Biochemistry* **32**, 12571-12576
- Yokoi, H., Shimizu, Y., Anazawa, H., Lefebvre, C.A., Korneluk, R.G., und Ikeda, J.E. (1996) *Genomics* **35**, 448-455
- Young, J.C., Obermann, W.M. und Hartl, F.U. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18007-18010
- Young, J.C., Schneider, C. und Hartl, F.U. (1997) *FEBS Lett.* **418**, 139-143.
- Zarnt, T., Tradler, T., Stoller, G., Scholz, C., Schmid, F.X. und Fischer, G. (1997) *J. Mol. Biol.* **271**, 827-237.
- Zhao, Y., Chen, Y., Schutkowski, M., Fischer, G. und Ke, H. (1979) *Structure* **5**, 139-146
- Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.-J., Shen, M., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G. und Lu, K.P. (2000) *Cell* **6**, 873-883

7. Abkürzungen

Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CD	Circulardichroismus
CS	Citratsynthase
Cyp	Cyclophilin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKBP	FK506 Bindeprotein
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GSH	Reduziertes Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
HCl	Salzsäure
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hsp	Hitzeshockprotein
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
ITC	Isothermische Titrationskalorimetrie
Kana	Kanamycin
Leu	Leucin
mA	Milliampere
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase

Phe	Phenylalanin
pNA	para-Nitroanilid
POD	Peroxidase
PPIase	Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase
PR	Progesteron-Rezeptor
Pro	Prolin
RCM-T1	reduzierte und S-carboxymethylierte S54G/P55N-Variante von RNase T ₁
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHR	Steroidhormon-Rezeptor
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin
TPR	Tetratricopeptid-Repeat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen (20) sorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8. Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

1. Buchner, J., Weigl, T., Bügl, H., Pirkl, F. und Bose, S. (1996) Purification of Hsp90 Partner Proteins Hop/p60, p23 and FKBP52. *Methods Enzymol.* **290**, 418-432
(in der vorliegenden Arbeit kein Abdruck enthalten)
2. Pirkl, F. (2000) Three-step purification of a fragment of the large immunophilin FKBP52. *Journal of Chromatography B*, **737**, 71-76
(in der vorliegenden Arbeit kein Abdruck enthalten)
3. Pirkl, F. und Buchner, J. (2001) Functional Analysis of the Hsp90-associated human Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J.Mol. Biol.*, im ~~Abdruck~~ Abdruck siehe folgende Seiten)
4. Pirkl, F., Modrow, S. und Buchner, J. (2001) Localization of the chaperone domain of FKBP52. eingereicht
(in der vorliegenden Arbeit kein Abdruck enthalten)

JMB

Functional Analysis of the Hsp90-associated Human Peptidyl Prolyl *Cis/Trans* Isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40

Franziska Pirkl and Johannes Buchner*

Institut für Organische Chemie
und Biochemie, Technische
Universität München
85747, Garching, Germany

Large peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (PPIases) are important components of the Hsp90 chaperone complex. In mammalian cells, either Cyp40, FKBP51 or FKBP52 is incorporated into these complexes. It has been suggested that members of this protein family exhibit both prolyl isomerase and chaperone activity. Here we define the structural and functional properties of the three mammalian large PPIases. We find that in all cases two PPIase monomers bind to an Hsp90 dimer. However, the affinities of the PPIases are different with FKBP52 exhibiting the strongest interaction and Cyp40 the weakest. Furthermore, in the mammalian system, in contrast to the yeast system, the catalytic activity of prolyl isomerization corresponds well to that of the respective small PPIases. Interestingly, Cyp40 and FKBP51 are the more potent chaperones. Thus, it seems that both the affinity for Hsp90 and the differences in their chaperone properties, which may reflect their interaction with the non-native protein in the Hsp90 complex, are critical for the selective incorporation of a specific large PPIase.

© 2001 Academic Press

*Corresponding author

Keywords: chaperone; prolyl isomerase; protein folding; protein association; heat shock proteins

Introduction

The *trans/cis* isomerization of proline-peptide bonds is often a rate-limiting step in protein folding.^{1–3} Enzymes that catalyze this step are called peptidyl-prolyl-*cis/trans* isomerases (PPIases). To date, three subfamilies of this enzyme class (EC 5.2.1.8) have been identified: FKBP (FK506 binding proteins), cyclophilins and parvulins.^{4,5} Both, FKBP and cyclophilins, are inhibited by immunosuppressive drugs.^{4–6} Thus, both are termed immunophilins.

PPIases of higher relative molecular mass (40–54 kDa), the so-called large PPIases (FKBP51, FKBP52, Cyp40 and its yeast homologues Cpr6

and Cpr7), were found in complexes with the heat shock protein Hsp90. These chaperone complexes are associated with inactive steroid hormone receptors (SHRs) in higher eukaryotes.^{7–9} Several Hsp90 complexes of different composition seem to be required for SHR activation. At an early stage during the chaperone cycle, the receptor interacts with Hsp70 and Hip. Recruitment of Hsp90 *via* Hop leads to the formation of the intermediate complex involving Hsp70 and Hsp90. In a last step, the mature Hsp90 complex is formed which contains a small acidic protein called p23 and any one of the large PPIases (FKBP51, FKBP52 or Cyp40).¹⁰ The binding of PPIases to Hsp90 occurs *via* tetratricopeptide repeats (TPRs).^{11–13} TPRs are degenerate sequences of 34 amino acid residues involved in protein-protein interactions.^{13–16} In large PPIases they are located in the C-terminal part of the protein whereas the N-terminal part consists of the respective PPIase domain.¹⁷ Whether their PPIase activity and immunosuppressant binding properties have any influence on the SHR multichaperone complex is unresolved.^{18–22}

Abbreviations used: CD, circular dichroism; CS, citrate synthase; Cyp, Cyclophilin; FKBP, FK506 binding protein; GST, glutathione *S*-transferase; Hsp, heat shock protein; ITC, isothermal titration calorimetry; pNA, paranitroanilide; PPIase, peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase; RCM-T1, reduced and *S*-carboxymethylated S54G/P55N-variant of RNase T₁; SHR, steroid hormone receptor; TPR, tetratricopeptide repeat.

E-mail address of the corresponding author: johannes.buchner@ch.tum.de

All three large PPIases apparently compete for a single binding site on Hsp90²³ which is located in the C-terminal 12 kDa domain.²⁴ Whether the stoichiometry of this interaction is one PPIase per Hsp90 monomer or dimer is still controversial.²⁵⁻²⁹

The selection of the PPIase present in the Hsp90 complex seems to depend on the substrate bound. FKBP51, for example, is clearly favored over Cyp40 and FKBP52 in mature progesterone receptor and even more in mature glucocorticoid receptor complexes assembled *in vitro*,^{30,31} but not in estrogen receptor complexes.³¹

Similar to Hsp90,³² large PPIases display chaperone activity *in vitro*. Rabbit FKBP52 was found to prevent the thermal aggregation of the model substrate protein citrate synthase (CS) *in vitro*³³ and human Cyp40 maintained chemically denatured β -galactosidase in a state competent for refolding.³⁴ This suggested that the PPIases may contact the non-native protein in the Hsp90 complex. In agreement with this hypothesis, FKBP52 was found to interact directly with the glucocorticoid receptor.²⁸

The two large PPIases in yeast, Cpr6 and Cpr7, have recently been compared concerning functional aspects.²⁹ They showed similar binding affinities to Hsp90, but differed strongly in their PPIase and chaperone activities. However, these results can not simply be transferred to the mammalian system, since here the situation is more complex than in yeast. First, three large PPIases are involved instead of two, and second, only one of these three PPIases belongs to the cyclophilin subfamily, whereas the other two are large FKBP which are not found in yeast Hsp90 complexes.

To better understand the role the three PPIases play in the mammalian Hsp90 multichaperone complex we compared them concerning binding to Hsp90, stability, PPIase and chaperone activity. Interestingly, the three PPIases differ both in their affinity for Hsp90 and their chaperone activity suggesting that they play distinct roles in the Hsp90 chaperone complex.

Results

Structure and stability of Cyp40, FKBP51 and FKBP52

The N-terminal domains of large PPIases share high homology with the respective small PPIases. For example, the N-terminal domain of FKBP52 exhibits 55% amino acid homology³⁵ and 49% sequence identity compared to FKBP12.³⁶ Human Cyp18 and the N-terminal domain of human Cyp40 share 61% identity.³⁷

Cyp18 is arranged in an eight stranded antiparallel β -barrel structure with two short helices³⁸ and FKBP12 is composed of a five stranded antiparallel β -sheet wrapped in a right-handed twist, a short α -helix and a high amount of aperiodic structure.³⁹⁻⁴⁰ The isolated PPIase domain of rabbit FKBP52 (amino acid residues 1-149) exhibits a

similar structure⁴¹ suggesting that the structures of the PPIase domain of the large PPIases and the respective small PPIases are conserved.

To gain insight into the secondary structure of the large human PPIases we recorded far UV-circular dichroism (CD) spectra of the small human PPIases FKBP12 and Cyp18, and compared them to the spectra obtained for FKBP51, FKBP52 and Cyp40 (Figure 1(a)). For Cyp18, the far UV-CD spectrum displayed two minima at 208 and 222 nm indicative of α -helices. However, due to the high content of β -strands the overall intensity of the signal was low ($-6000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). For FKBP12 we obtained only one distinct minimum at a wavelength of 212 nm with a mean residue ellipticity of about $-5000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. This is typical for a β -structured protein. The spectra for all three large PPIases were of a similar shape with FKBP51 and FKBP52 being almost identical and Cyp40 displaying a slightly higher ellipticity

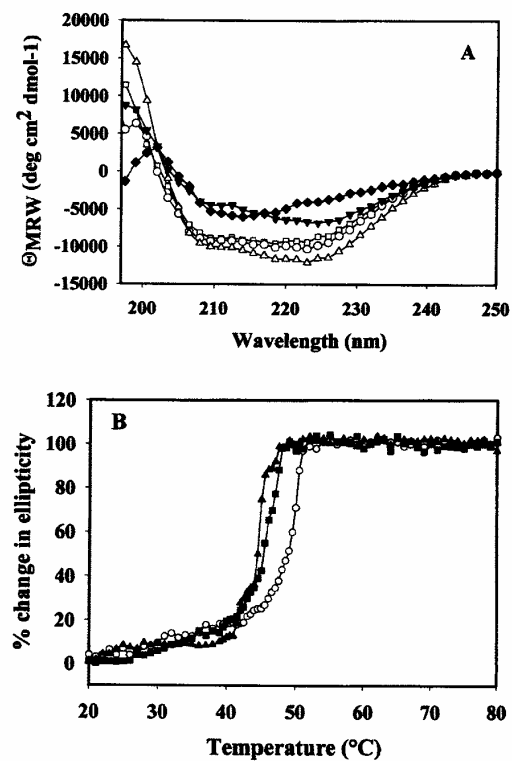


Figure 1. Secondary structure and stability of human PPIases. (a) Far-UV-CD spectra of Cyp18 (\blacktriangledown), FKBP12 (\blacklozenge), Cyp40 (\triangle), FKBP51 (\square) and FKBP52 (\circ). Spectra were recorded at 20 °C in 40 mM potassium phosphate (pH 7.5). (b) Thermal unfolding of Cyp40 (\blacktriangle), FKBP51 (\blacksquare) and FKBP52 (\circ). The mean residue molecular ellipticity was monitored at 222 nm. The heating rate was $1 \text{ }^\circ\text{C minute}^{-1}$.

($-12,000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ as compared to $-9700 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ and $10,000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ for FKBP51 and FKBP52, respectively). The minima were at 208 nm and 222 nm and the maximum was below 200 nm. The overall shapes of the spectra and the ellipticities are indicative of a higher content of α -helical structure compared to the small PPIases.

The α -helical content was calculated from the respective spectra according to equation (1).⁴² For FKBP12 and Cyp18 it was 10% and 15.5%, respectively, whereas the large PPIases displayed higher α -helical contents. The helix content was 30% for Cyp40 and about 25% for both FKBP51 and FKBP52.

Since the N-terminal domains of the large and the respective small PPIases are structurally similar, the differences seen in the far UV-CD spectra are largely based on the secondary structure of the additional C-terminal domains of Cyp40, FKBP51 and FKBP52 comprising the TPR regions, the chaperone site and the calmodulin binding domain. Thus, these additional domains seem to have a considerable amount of helical structure.

To determine the thermal stability of the PPIases, we monitored temperature-induced unfolding transitions by CD (Table 1 and Figure 1(b)). Here, FKBP52 proved to be the most stable protein with a midpoint of denaturation of 49°C compared to 45°C for Cyp40 and 46°C for FKBP51.

Compared to the respective small PPIases all three proteins showed decreased thermal stability. FKBP12 was stable up to 60°C followed by a steady decrease of the signal up to 70°C (Table 1). The midpoint of denaturation was determined to be at 65.5°C, which is 16.5°C higher than that of FKBP52 and almost 20°C higher than FKBP51. Similarly, Cyp18, which had a midpoint of transition at 51°C, is still 6°C more stable than Cyp40. Thus, the additional domains seem to destabilize the large PPIases.

The midpoints of thermal denaturation between Cyp40 on the one hand and FKBP51 and GST-Cyp40 (Table 1) on the other differ only by one to two degrees, but still Cyp40 aggregates under the condition used for the CS assay (see below) whereas the other two proteins are stable. The reason for this may be that the thermal denaturation of Cyp40 is highly cooperative compared to that FKBP51 and FKBP52.

Table 1. Thermal stability of the large human PPIases

PPIase	T_m (°C)
FKBP12	65.5°C (± 0.5)
Cyp18	51°C (± 1)
FKBP51	46°C (± 0.1)
FKBP52	49°C (± 0.5)
Cyp40	45°C (± 0.5)
GST-Cyp40	46.5°C (± 0.5)

Thermal denaturation was performed and monitored as described in Materials and Methods. Examples for the unfolding transitions are shown in Figure 1(b). T_m represents the midpoint of thermal unfolding. The stated errors were calculated from three individual measurements.

Interaction of large PPIases with Hsp90

The interaction between Hsp90 and the large human PPIases has mostly been monitored by crosslinking.^{26,28} The results obtained so far did not allow us to draw conclusions about the respective affinities of the three PPIases for Hsp90. Furthermore it remained controversial whether one or two PPIases bind to a Hsp90 dimer. Here we determined the interaction between the large PPIases and Hsp90 by isothermal titration calorimetry (ITC) (Figure 2). To date, this is the most quantitative means available for determining the thermodynamic features of protein-protein interaction, since it measures directly the heat evolved upon association of a ligand with its binding partner.⁴³

For all the PPIases tested the binding curves obtained were sigmoidal which is consistent with a simple two-state association reaction. The binding constants derived from these measurements are 226 nM, 174 nM and 55 nM for Cyp40, FKBP51 and FKBP52, respectively (Table 2). The binding reactions showed different enthalpic and entropic contributions (Table 2). FKBP51 binding displayed the most favorable enthalpy of binding ($\Delta H = -12 \text{ kcal mole}^{-1}$), but it also exhibited the most unfavorable entropic contribution ($T\Delta S = -3 \text{ kcal mole}^{-1}$). In contrast to this, Cyp40 and FKBP52 showed lower binding enthalpies, but especially the entropic contribution of FKBP52 binding to Hsp90 is very favorable ($T\Delta S = 1.7 \text{ kcal mole}^{-1}$).

The molar stoichiometry of interaction between the PPIases and Hsp90 was determined from the midpoint of the association reaction (Figure 2). For

Table 2. Binding constants of the large human PPIases and Hsp90

	Cyp40	FKBP51	FKBP52
K_d (nM)	226(± 61)	174(± 28)	55(± 7)
Number of binding sites	1.054 \pm 0.018	1.16 \pm 0.01	1.27 \pm 0.005
ΔH (kcal mol ⁻¹)	-9.42(± 0.3)	-12(± 0.2)	-8.06(± 0.08)
$T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	-0.51	-3	1.7

Binding of the large PPIases and Hsp90 was monitored by ITC measurements as described in Materials and Methods and shown in Figure 2. The standard deviation is given for all measured values.

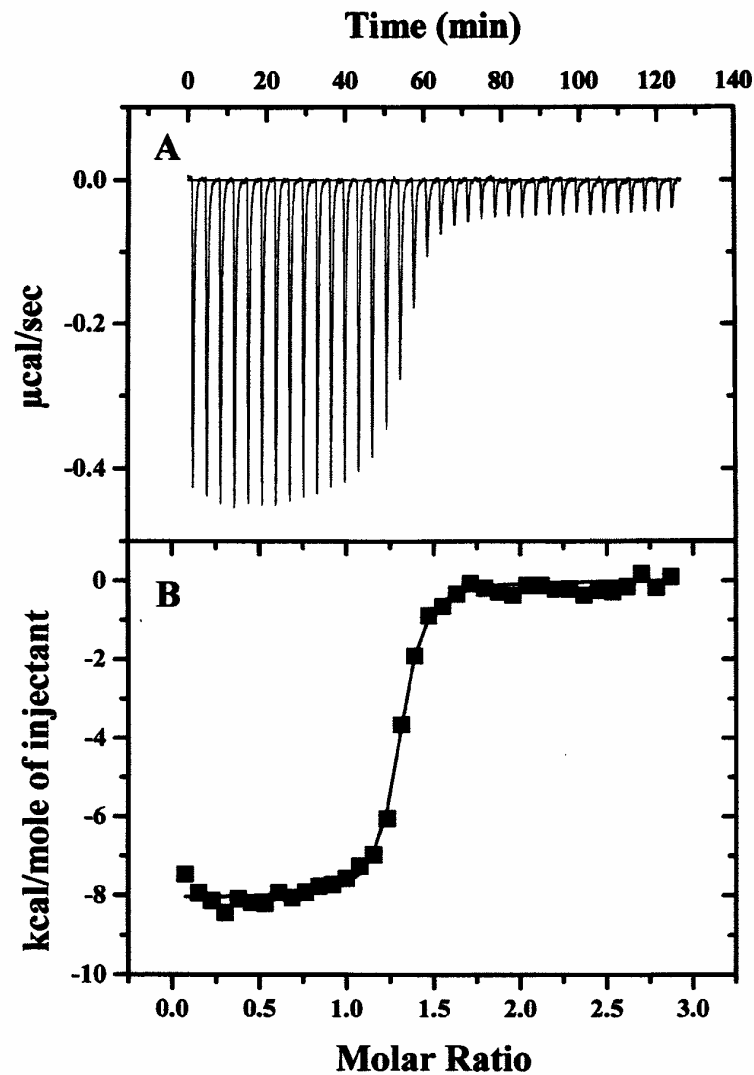


Figure 2 (legend opposite)

the binding of one PPIase monomer per Hsp90 dimer a molar ratio of 0.5 would have been expected. What we found for all three PPIases, however, was a molar ratio of approximately 1 (Table 2 and Figure 2) indicating that one PPIase monomer binds per Hsp90 monomer.

To avoid artefacts of injection, the run with Cyp40 and Hsp90 was also performed with Hsp90 in the cell and Cyp40 in the syringe and yielded similar results (data not shown).

Peptidyl-prolyl isomerization in peptides

To compare the PPIase activity of the large human PPIases two different assays were used: (i)

peptide assay, which monitors the isomerization of the proline peptide bond in a tetrapeptide linked to para-nitroanilide in both its protease-coupled⁴⁴ and its protease-free version,⁴⁵ and, (ii) the RCM-T1 refolding assay which monitors proline isomerization in a protein substrate.⁴⁶ The results of these experiments are summarized in Table 3.

Various sequence variants of the peptide succinyl-Ala-X-Pro-Phe-pNA have so far been used to determine the activity of a broad range of PPIases⁴⁷⁻⁴⁹ in the protease-coupled version of the peptide assay. Cyp18, for example, was found to be rather promiscuous with a slight preference for Ala in the X position.⁴⁷ FKBP12, however, seems to have a markedly higher substrate specificity with Leu being the preferred residue in the X pos-

t-
he
p-

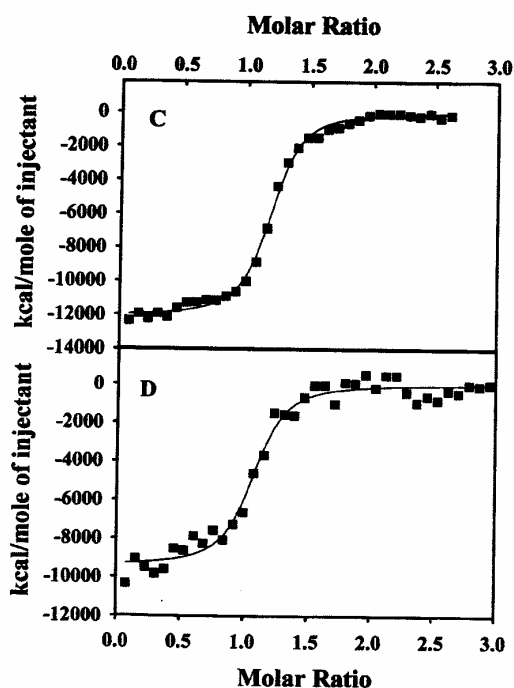


Figure 2. Isothermal titration calorimetry. Calorimetric titration of the large PPIases with Hsp90 in 40 mM Hepes (pH 8.0) at 20 °C. The experiment consisted of up 38 injections of 5 μ l each of a 320 μ M stock solution of Hsp90. Hsp90 was injected into a sample cell (volume 1.43 ml) containing 15 μ M of the respective large PPIase. The measurements were fit according to a model of one binding site in the Origin software. (a) Raw data showing the differences between the sample and the reference cell during the 36 injections of Hsp90 into the sample cell containing 15 μ M of FKBP52. (b) Enthalpy per mole of Hsp90 injected *versus* the molar ratio of FKBP52 in the sample cell and Hsp90 injected. (c) Enthalpy per mole of Hsp90 injected *versus* the molar ratio of FKBP51 in the sample cell and Hsp90 injected. (d) Enthalpy per mole of Hsp90 injected *versus* the molar ratio of Cyp40 in the sample cell and Hsp90 injected.

ition.^{47,49} Thus, we used these two peptides to compare the catalytic efficiencies of Cyp40, FKBP51 and FKBP52. The kinetics obtained from these experiments were first order for all three PPIases tested and the rate constants increased linearly with the enzyme concentration used. The PPIase activity of the two FKBP5s could be suppressed by the specific inhibitor Rapamycin but not by the cyclophilin inhibitor Cyclosporin A, whereas Cyp40 was suppressed by Cyclosporin A but not by Rapamycin.

We found that for the succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA peptide (Figure 3(a) and Table 3) Cyp40 had a much higher catalytic activity ($k_{cat}/K_M = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) than FKBP51 and FKBP52 whose k_{cat}/K_M were values quite similar ($7.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $8.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively). Using the succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA peptide (Figure 3(b) and Table 3), the catalytic activity of Cyp40 decreased slightly to a k_{cat}/K_M value of $1.24 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ whereas the activity of both FKBP5s was strongly enhanced (k_{cat}/K_M value of $1.45 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Table 3. PPIase activity of Cyp40, FKBP51 and FKBP52 ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

PPIase	k_{cat}/K_M in the peptide-assay with succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	k_{cat}/K_M in the peptide-assay with succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA	k_{cat}/K_M in RCM-T1 refolding
hCyp40	$1.8(\pm 0.1) \times 10^6$	$1.24(\pm 0.1) \times 10^6$	$2.3(\pm 0.1) \times 10^4$
hFKBP51	$7.6(\pm 0.5) \times 10^4$	$1.45(\pm 0.15) \times 10^6$	$8.02(\pm 0.3) \times 10^3$
hFKBP52	$8.5(\pm 0.5) \times 10^4$	$1.45(\pm 0.15) \times 10^6$	$8.9(\pm 0.3) \times 10^3$
hCyp18	5.1×10^6 (Schönbrunner <i>et al.</i>) ⁴⁸	-	7.3×10^4 (Scholz <i>et al.</i>) ⁵⁷
hFKBP12	0.21×10^6 (Albers <i>et al.</i>) ⁴⁹	2.2×10^6 (Albers <i>et al.</i>) ⁴⁹	1.3×10^4 (Scholz <i>et al.</i>) ⁵¹
hCyp40	1.9×10^6 (Kieffer <i>et al.</i>) ⁵⁰	-	-
rFKBP52	-	1.4×10^6 (Chambraud <i>et al.</i>) ¹⁷	-
yCpr6	4.8×10^5 (Mayr <i>et al.</i>) ²⁹	3×10^5 (Mayr <i>et al.</i>) ²⁹	3.6×10^4 (Mayr <i>et al.</i>) ²⁹
yCpr7	0.7×10^5 (Mayr <i>et al.</i>) ²⁹	0.5×10^5 (Mayr <i>et al.</i>) ²⁹	0.4×10^3 (Mayr <i>et al.</i>) ²⁹

The PPIase activities were measured as described in Materials and Methods. The k_{cat}/K_M values were determined from the slopes of the respective linear regression as shown in Figures 3 and 4 for all three PPIases.

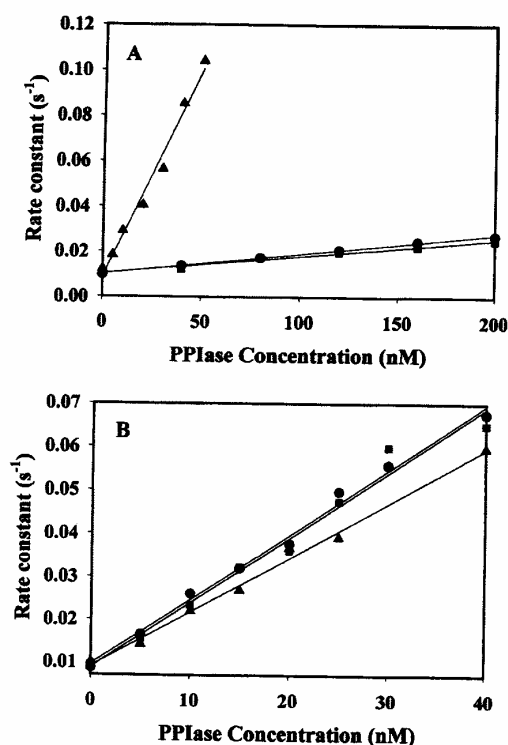


Figure 3. PPIase activity in the protease-coupled assay. Rate constants of the isomerization of 50 μM of synthetic peptides as a function of the concentration of Cyp40 (\blacktriangle), FKBP51 (\blacksquare) and FKBP52 (\bullet). Experiments were carried out in 40 mM Hepes (pH 7.5) at 10 °C. Isomerization was monitored by the increase in absorbance at 390 nm. The rate constants of the respective isomerization kinetics were plotted against the PPIase concentration. The slope of the linear regression is equivalent to $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ as summarized in Table 3. (a) Isomerization of the synthetic peptide succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. (b) Isomerization of the synthetic peptide succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA.

The catalytic activity observed for Cyp40 and the succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA peptide corresponds well with the values reported previously by Handschumacher and colleagues ($k_{\text{cat}}/k_{\text{M}} = 1.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁵⁰ Compared with the catalytic activity of its yeast homologues, Cpr6 and Cpr7,²⁹ Cyp40 is four times and 26 times more active, respectively, for both peptides. The catalytic activities of both FKBP5s and the succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA peptide matched the one reported for rabbit FKBP52 ($k_{\text{cat}}/k_{\text{M}} = 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹⁷

To be able to exclude effects of the helper protease chymotrypsin in this assay, we also performed a protease-free version of the peptide assay.⁴⁵ The catalytic efficiencies seen in this assay corresponded well with the ones derived from the

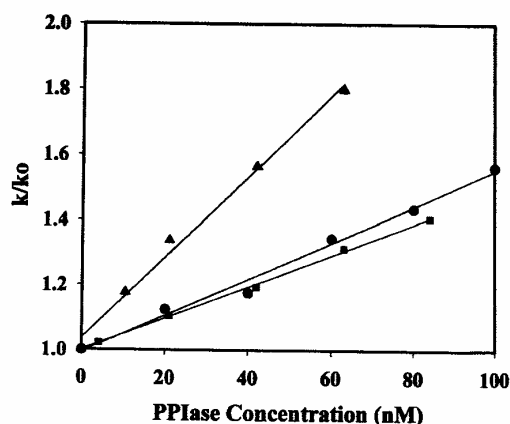


Figure 4. Influence of Cyp40, FKBP51 and FKBP52 on RCM-T1 refolding. Ratios of the observed rate constants for the refolding of RCM-T1 in the presence (k) and in absence (k_0) of Cyp40 (\blacktriangle), FKBP51 (\blacksquare) and FKBP52 (\bullet) depicted as a function of the respective PPIase concentration. The $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ values as summarized in Table 3 were calculated by multiplying the slope of the respective linear regression with k_0 .

protease-coupled assay (data not shown), suggesting that the part of the protein that is responsible for the PPIase activity is not cleaved by chymotrypsin.

Generally, the overall rates corresponded well to the ones displayed by the respective single domain PPIases (Table 3).⁴⁷⁻⁴⁹

Influence of Cyp40, FKBP51 and FKBP52 on the refolding of RCM-T1

Next, we tested the effect of the large human PPIases on the catalysis of refolding of a reduced and *S*-carboxymethylated S54G/P55N-variant of RNase T₁ (RCM-T1).⁴⁶ The rate-limiting step in the spontaneous refolding of RCM-T1 is the isomerization of the X-Pro39 peptide bond, which is in the *cis* conformation in the native state. Thus, the refolding reaction follows a single exponential kinetic. Similar to the peptide assay, the refolding rate of RCM-T1 can be enhanced by the addition of PPIases. Using this assay, $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ values of $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ have been determined for Cyp18 and FKBP12, respectively (Table 3).⁵¹ In the presence of Cyp40, FKBP51 and FKBP52 the refolding rates of RCM-T1 increased linearly with increasing concentrations of PPIases (Figure 4). Again, the catalytic efficiencies of the two large FKBP5s were very similar with $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ values of $8.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $8.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for FKBP52 and FKBP51, respectively. Cyp40 displayed a $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ value of $2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and proved to be a better catalyst than the two FKBP5s

in this reaction (Figure 4 and Table 3). Compared to its yeast homologue, Cpr6 and Cpr7,²⁹ Cyp40 showed a slightly lower catalytic activity than Cpr6, but an almost sixfold higher one than Cpr7.

Taken together, the catalytic activities of the large human PPIases seem to be about a factor 2 to 3 smaller than that of the respective small PPIases Cyp18 and FKBP12 (Table 3).

Chaperone activity

Rabbit FKBP52 was found to inhibit the aggregation of CS *in vitro*³³ and a GST-tagged version of human Cyp40 kept β -galactosidase in a state competent for refolding.³⁴ Here, we were interested in comparing the chaperone properties of the three large human PPIases by the well-established CS

aggregation assay.³² At temperatures above 37°C CS aggregates within one hour (Figure 5). At 40°C, a twofold excess of FKBP52 already lead to a marked reduction of CS aggregation. Half maximum aggregation occurred at a fivefold excess of FKBP52. A 14-fold molar excess of FKBP52 was required for complete suppression (Figure 5(a)).

Under the same conditions, FKBP51 had a more dramatic effect on the aggregation of CS (Figure 5(b)). Substoichiometric amounts of chaperone (at a ratio of 0.75 FKBP51 molecules to 1 CS monomer) reduced aggregation to half-maximal values. At a fivefold molar excess aggregation was suppressed completely. IgG added as a control for non-specific protein effects had only marginal effects on CS aggregation (Figure 5(a)).

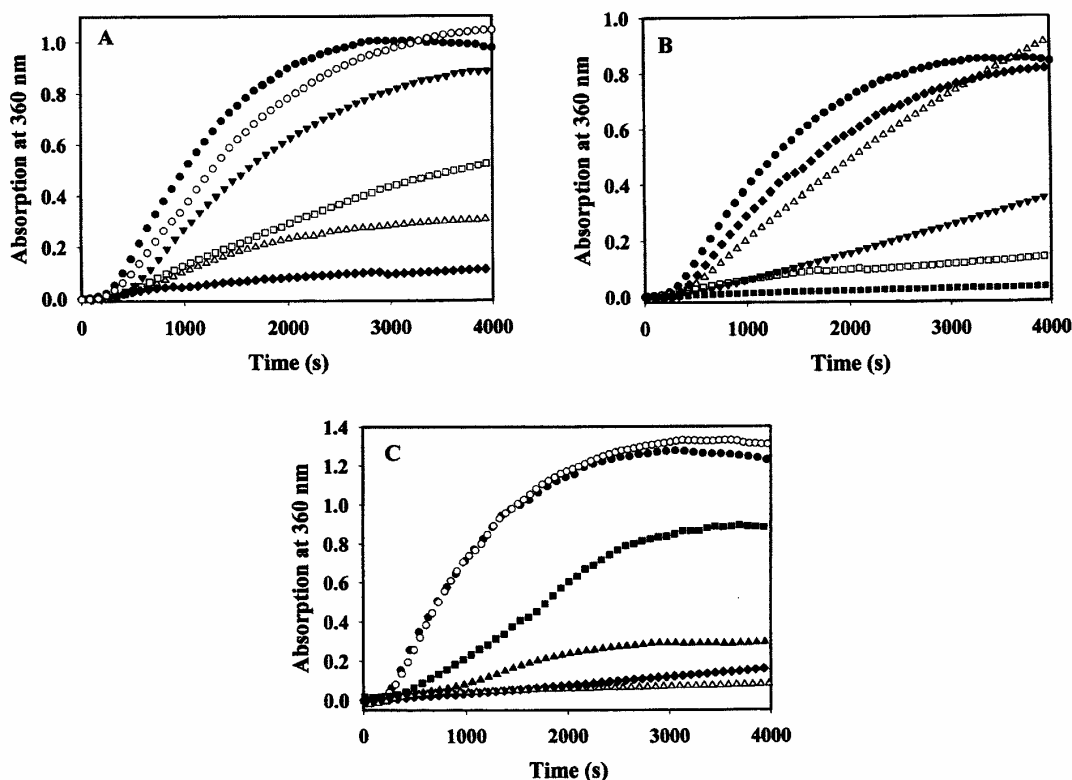


Figure 5. Influence of FKBP51, FKBP52 and Cyp40 on the thermal denaturation of CS. A 3 μ M CS sample (monomer) was incubated at 40°C in 40 mM Hepes (pH 7.5) over one hour. Aggregation was monitored by measuring the turbidity at 360 nm in the absence and the presence of additional components as described in Materials and Methods. (a) Influence of FKBP52 on the aggregation of thermally denatured CS. CS aggregation was monitored in the absence (●) of additional components or in the presence of 6 μ M (▼), 15 μ M (□), 30 μ M (△) and 42 μ M (◆) FKBP52. Addition of 1.7 mg ml⁻¹ IgG (○) instead of FKBP52 was used as a negative control. (b) Influence of FKBP51 on the aggregation of thermally denatured CS. CS aggregation was monitored in the absence (●) of additional components or the presence of 0.75 μ M (◆), 1.5 μ M (△), 2.25 μ M (▼), 3 μ M (□) and 15 μ M (■) FKBP51. (c) Influence of Cyp40 on the aggregation of thermally denatured CS. CS aggregation was monitored in the absence (●) of additional components or the presence of 0.75 μ M (■), 1.5 μ M (▲), 3 μ M (◆) and 15 μ M (△) GST-Cyp40. Addition of 15 μ M GST alone (○) instead of GST-Cyp40 was used as a negative control.

Control experiments in which FKBP51 and FKBP52 were subjected to the conditions of this assay without CS showed that neither FKBP aggregated (data not shown). However, Histidin-tagged Cyp40 was not stable under the conditions used. Thus, we performed this assay with the more stable GST-tagged Cyp40 (cf Table 1) according to Freedman *et al.*³⁴

In the CS assay, GST-Cyp40 suppressed CS aggregation in a manner quite similar to FKBP51, in that at an equimolar ratio of CS to GST-Cyp40 an almost complete suppression of aggregation was observed (Figure 5(c)). An excess of GST used as a negative control had no influence on the thermal aggregation of CS (Figure 5(c)).

Thus, all three large PPIases specifically bind non-native protein and act as chaperones, with FKBP51 and Cyp40 being more active in this respect than FKBP52.

Discussion

In mammals, three large PPIases act as cofactors of Hsp90 at least in the mature SHR complex.⁵³⁻⁵⁴ Recent findings suggest that there is a correlation between the PPIase selected and the substrate bound.³¹ Here, we compared the three human PPIases Cyp40, FKBP51 and FKBP52 concerning structural and functional features.

The large PPIases consist of an N-terminal PPIase domain which is highly homologous to the respective single domain PPIase and additional C-terminal domains. These C-terminal domains seem to be largely α -helical in structure. Interestingly, these domains decrease the thermal stability of the PPIases compared to the respective small PPIase.

The PPIase activities of the large PPIases are only by a factor of 2 to 3 smaller than the ones found for the respective small PPIases Cyp18 and FKBP12.⁴⁸⁻⁴⁹ The activity of the large FKBP amounts to about two-thirds of the activity of FKBP12, whereas the activity of Cyp40 is only about one-third of that of Cyp18. In the peptide assay, the preference of FKBP12 for hydrophobic residues such as leucine preceding proline⁴⁹ is also found in the two large FKBPs. Their catalytic activity towards the succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA is about 20-fold higher than towards succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, whereas there is only a slight difference in the catalytic activity of Cyp40 towards the two peptides. Thus, in the mammalian system the PPIase activity of the large PPIases corresponds well to that of the respective small PPIases, both in the peptide assay and in the RCM-T1 refolding assay. In this respect, the large PPIases differ significantly from trigger factor, another large PPIase. Trigger factor consists of an FKBP domain and additional N and C-terminal domains and has about a 100-fold higher catalytic activity for RCM-T1 compared to the large Hsp90-associated PPIases.⁴⁶ This suggests, that in

comparison to trigger factor, where the additional chaperone domains also contribute to the refolding of RCM-T1, in the case of the human large Hsp90-associated PPIases only the PPIase domain is involved.

When compared to its yeast homologues, Cpr6 and Cpr7,²⁹ Cyp40 shows a catalytic activity in the peptide assay that is about fourfold higher than that of Cpr6 and about 25-fold higher than that of Cpr7 (Table 3). However, in the RCM-T1 refolding Cyp40 and Cpr6 share similar catalytic activities. The reason for this could be that the additional C-terminal domains of Cpr6 are more involved in the refolding process of RCM-T1 than those of Cyp40. Another explanation may arise from different substrate specificities of the PPIase domains of the two cyclophilins. For the RNase T₁ folding a Tyr-Pro bond is rate-limiting, whereas in the peptide assay it is either a Leu-Pro bond or a Ala-Pro bond. For small PPIases it has long been known that their catalytic activity depends strongly on the residue preceding the proline.^{47,49}

PPIases bind Hsp90 *via* their TPR domains. Analysis of Hsp90 mutants had established that not all TPR-containing proteins interact with Hsp90 in an identical manner.^{31,55,56} Using ITC we determined the binding constants of the three large PPIases (Table 2). FKBP52 exhibited the strongest binding and Cyp40 the weakest. This is consistent with earlier findings that Cyp40 was easily washed off from Hsp90 immune pellets with low salt buffers.⁵⁷ The dissociation constants obtained are in the nanomolar range and correspond well with those for the yeast Cyp40 homologues, Cpr6 and Cpr7,^{27,29} and Sti1.²⁷ However, in the mammalian system the differences in the binding affinities of the three large PPIases to Hsp90, especially between FKBP52 and Cyp40, are more pronounced than in the yeast system.²⁹

The binding constants suggest that *in vivo* all these co-chaperones would be found predominantly in complex with Hsp90. It should be noted that Hsp90 is present in excess over any of the large PPIases with ratios of 1:10, 1:15 and 1:75 for Cyp40, FKBP52 and FKBP51, respectively (cf. Table 3).⁸ Thus, the PPIase that is present in the highest relative concentration displays the weakest binding affinity. Additionally, the interaction between the large PPIases and Hsp90 may be stabilized by the substrate bound. The different contribution of enthalpic and entropic terms to the binding of the respective PPIases to Hsp90 provides further evidence that the manner in which they interact with Hsp90 is different although the site of interaction, the TPR domains, is supposed to be the same for the three large PPIases.

The stoichiometry of the Hsp90-PPIase complexes has been investigated mainly by chemical crosslinking. These experiments suggested that an PPIase monomer binds per Hsp90 dimer.^{25,26,28} However, our experiments show that for all three human large PPIases the stoichiometry of binding is two PPIase monomers per Hsp90 dimer. In

agreement with this, ITC measurements carried out with the yeast co-chaperone Cpr6 indicated that two Cpr6 molecules bind to the yeast Hsp90 dimer with each Hsp90 monomer providing a binding site for one TPR protein.²⁷ Further support for the presence of two functional TPR binding sites per Hsp90 dimer comes from the finding that Cns1, another TPR-containing co-chaperone, was selectively immunoprecipitated together with Hsp90 and the yeast PPIase Cpr7.^{58,59}

For rabbit FKBP52 and human Cyp40 chaperone activity has been shown.^{33,34} Here, we were able to demonstrate chaperone activity for human FKBP52 and FKBP51 as well. Although FKBP51 and FKBP52 are very similar in terms of structure and PPIase activity, they differ markedly in their chaperone activity, with FKBP51 being a more potent chaperone than FKBP52. In this respect, FKBP51 seems to be similar to Cyp40. Functional analysis of the yeast Cyp40 homologues, Cpr6 and Cpr7, revealed that these two PPIases differed markedly in their chaperone activities as well, with Cpr7 being the more potent one and displaying activities similar to FKBP51 and Cyp40.²⁹ Thus, in contrast to its yeast homologues, which are either a strong PPIase (Cpr6) or a good chaperone (Cpr7), Cyp40 is both an efficient PPIase and a potent chaperone.

One may speculate that the differences in the chaperone activity of the Hsp90-associated PPIases may be a conserved feature important for distinct functions of the Hsp90 chaperone complex. *In vivo*, the three large mammalian PPIases show different patterns of incorporation in steroid receptor complexes with distinct substrates. Despite its lower concentration in the cell (20 nM in rabbit reticulocyte lysate as opposed to 100 nM for FKBP52 and 200 nM for Cyp40),⁹ FKBP51, for example, was found to be favored concerning the incorporation into progesterone receptor and glucocorticoid receptor complexes.³⁰⁻³¹ Based on the data presented here, this finding can now be explained by the different binding affinities for Hsp90 and the existence of differential interactions of the PPIases with the substrate proteins, e.g. SHRs. In agreement with this hypothesis, FKBP51 was found to dissociate from the receptor complex upon hormone addition, whereas FKBP52 and the other components like Hsp90 and p23 stayed bound.^{7,54} This is consistent with our findings that FKBP51 is a better chaperone than FKBP52 and therefore may interact more strongly with non-native proteins. An example for the functional consequences of this selection has been detected in squirrel monkey lymphocytes where the incorporation of FKBP51 instead of FKBP52 into glucocorticoid receptor complexes reduces their binding affinity by 11-fold.⁶⁰

Taken together, despite their structural similarity and their similar activity as PPIases, the three large human PPIases display different affinities for Hsp90 and different activities as chaperones, which may be the basis for the differential activities of the Hsp90 complex towards specific substrates.

Materials and Methods

Materials

All chemicals were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) or ICN (Meckenheim, Germany). Cyclosporin A and Rapamycin were from Sigma (St. Louis, USA).

Proteins: human FKBP51, FKBP52 and Cyp40 were purified as described below. Human Hsp90 was purified from baculovirus infected Sf9 cells which were obtained from Drs D. Edwards and K. Christensen (Tissue Culture Core Facilities at the University of Colorado Cancer Center, USA). The protein was isolated from infected cells as described.⁶¹ Purified human Cyp18 and FKBP12 were kind gifts of G. Fischer (Max-Planck Research Unit, Halle, Germany). Mitochondrial pig heart citrate synthase (CS) was from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) and stored in TE buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA (pH 8.0)). The plasmid carrying the S54G/P55N-variant of RNase T₁ (RCM-T1) was a kind gift from F.X. Schmid (University of Bayreuth, Germany). RNase-T₁ was purified and modified as described.⁶²

Protein purification

Plasmids for human FKBP51 and FKBP52 were kind gifts from D. Smith (Mayo Clinic, Arizona, USA) and the plasmid for human Cyp40 was a kind gift from R.E. Handschumacher (Yale University School of Medicine, New Haven, USA). The cDNAs for these proteins were subcloned into the T5-expression plasmid pQE30 (Qiagen, Hilden, Germany) which allows high-level expression of proteins with an N-terminal Histidine tag. Additionally, the cDNA for Cyp40 was subcloned into the pGEX4T1 plasmid (Pharmacia, Uppsala, Sweden) to achieve expression as a GST-fusion. The pQE30 plasmids were transformed into the *Escherichia coli* strain HB101, whereas the pGEX4T1 plasmid was transformed into the BL21 [DE3] Codon plus strain (Stratagene, La Jolla, USA). LB medium containing 100 µg ml⁻¹ of ampicillin was inoculated with a respective stationary overnight culture for GST-Cyp40 expression. For the expression of the pQE30 constructs LB medium containing 100 µg ml⁻¹ of ampicillin and 40 µg ml⁻¹ of kanamycin was inoculated with the respective stationary overnight culture. For both types of plasmids, these cultures were grown at 37°C to an A₆₀₀ of 0.4. Protein expression was induced by addition of 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Cultures were subsequently shifted to 26°C for four hours. Cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 15 minutes at 4°C. Pelleted cells were lysed by incubation with 1 mg ml⁻¹ of lysozyme for 30 minutes on ice and subsequent sonication.

Histidine-tagged proteins were purified *via* a succession of Ni-NTA-agarose (equilibrated in 50 mM NaH₂PO₄, 400 mM NaCl, 20 mM imidazole (pH 8.0), elution by a step gradient to 250 mM imidazole), Resource Q (50 mM Tris, 4 mM EDTA (pH 8.0)), where the protein was in the flow-through, and a Pharmacia Superdex 75 pg (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 4 mM EDTA (pH 8.0)). For the purification of GST-Cyp40 a glutathione Sepharose (equilibrated in 150 mM NaCl, 16 mM Na₂POH₄, 4 mM NaH₂POH₄ (pH 7.3), eluted with 50 mM Tris, 10 mM GSH (pH 8.0)) was the first step. The Resource Q and the gel filtration steps were carried out in the same way

as for the Histidine-tagged constructs. The purity of all proteins was verified on a silver-stained SDS-polyacrylamide gel. No contaminating bands were detected in the pooled fractions.

The pure proteins were stored in 50 mM Tris, 2 mM EDTA (pH 8.0). The concentrations of purified Cyp40, GST-Cyp40, FKBP51 and FKBP52 were determined using the extinction coefficients of 0.659, 0.992, 0.723 and 0.824, respectively, for a 1 mg ml⁻¹ solution in a 1 cm cuvette at 280 nm, calculated according to Gill & von Hippel.⁶³ For all calculations, the large FKBP5s were treated as monomers.

Circular dichroism measurements

Far-UV-circular dichroism (CD) measurements were performed in a J-715 spectropolarimeter with a PTC343 peltier unit (Jasco, Tokyo, Japan). After dialyzing the proteins over night against 40 mM potassium phosphate (pH 7.5), spectra were recorded from 250 nm to 197 nm at a constant temperature of 20 °C in 0.1 cm quartz cuvettes. All spectra were baseline-corrected and ellipticities were calculated for a mean residue weight of 112.

The α -helix content of the respective PPlase spectra was calculated according to the following equation:⁴²

$$\text{Content}(\alpha\text{-helix}) = \frac{\Theta_{MRW222}}{-40,000 \cdot \left[1 - \left(\frac{2.5}{n} \right) \right]} \quad (1)$$

with Θ_{MRW222} being the ellipticity at 222 nm and n being the number of amino acids of the respective PPlase.

To determine the thermal stability of FKBP12, Cyp18, FKBP51, FKBP52 and Cyp40, the CD signal of these proteins was monitored at 222 nm, for FKBP12 at 206 nm, from 20 °C to 80 °C at a protein concentration of 0.25 mg ml⁻¹ and a heating rate of 1 °C minute⁻¹.

Isothermal titration calorimetry

Titration experiments were performed using a VP-ITC microcalorimeter system (Microcal Inc., MA). In each experiment up to 38 aliquots of 5 μ l of Hsp90 were injected into 1.43 ml of the PPlase solution at 20 °C. Both proteins were in 40 mM Hepes (pH 8.0). The protein concentration of the injected component (Hsp90) was 320 μ M (monomer concentration). The PPlase concentration in the sample cell was 15 μ M. For Cyp40 the experiment was also performed with 233 μ M Cyp40 in the syringe and 15 μ M Hsp90 (monomer concentration) in the sample cell. The experiment consisted of 28 injections of 8 μ l of Cyp40.

To obtain values for ΔH , ΔS , the stoichiometry of binding and the binding constant, the titration data were fitted according to a model of one binding site using the Origin software (MicroCal Inc., MA., USA).⁴³

PPlase activity

Protease-coupled peptide assay

PPlase activity towards peptide substrates was measured by a coupled assay⁴⁴ using the synthetic peptide succinyl-Ala-X-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (pNA), with X being either Ala or Leu. *p*-Nitroanilide can only be cleaved off by chymotrypsin when the X-Pro bond is in the *trans* configuration. The release of *p*-nitroanilide results in the increase in absorbance at 390 nm. The

measurements were performed in a Jasco V-550 UV/Vis spectrophotometer with a thermostated cell holder at a constant temperature of 10 °C. To obtain the rate constants the reaction kinetics were fitted to mono-exponential functions using the program Sigma Plot 4.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). The activity was calculated from the observed rate constants.⁴⁴

Protease-free peptide assay

To be able to rule out effects of the helper protease chymotrypsin on the PPlases in the assay we also carried out a protease-free version of the peptide assay,⁴⁵ which is based on the different UV/Vis absorption of the *cis/trans* isomers of the peptide after diluting it from 0.47 M LiCl/TFE into buffer solution. This absorption change can be monitored at 330 nm. For this assay the buffer conditions and protein concentrations were the same as for the protease coupled version.

RCM-T1 refolding assay

To measure the PPlase activity towards protein substrates refolding experiments were performed with the reduced and *S*-carboxymethylated S54G/P55N-variant of RNase T₁ (RCM-T1), which is unfolded in 100 mM Tris (pH 8.0) but spontaneously refolds upon dilution into the same buffer containing 2 M NaCl. In this mutant, the kinetics of refolding are determined by the *cis/trans* isomerization of the X-Pro 39 bond⁶¹ and addition of PPlases leads to an acceleration of the reaction. The assay was performed as described⁴⁶ at 15 °C in a Spex FluoroMax-2 fluorescence spectrometer (Instruments S.A., Edison, USA) with the wavelengths being set to 268 nm and 320 nm for excitation and emission, respectively. The spectral band widths were set to 1.5 nm for excitation and 3.5 nm for emission. Under these conditions, the refolding of RCM-T1 was mono-exponential. The rate constants of the reactions were determined using the program Sigma Plot 4.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Chaperone assay

Thermal denaturation of CS (3 μ M) was achieved by incubation at 40 °C in 40 mM Hepes (pH 7.5) for one hour. Aggregation of CS was measured by monitoring the increase in turbidity at 360 nm in a JascoV-550 UV/Vis spectrophotometer equipped with a thermostated cell holder using microcuvettes (120 μ l) with a path length of 1 cm.

Acknowledgments

We thank D.F. Smith and R.E. Handschumacher for the gift of PPlase-carrying plasmids. Furthermore, we are grateful to Gunter Fischer for purified human Cyp18 and FBKP12. S9 cell growth, treatment and harvesting were conducted by Drs Dean Edwards and Kurt Christensen at the University of Colorado Cancer Center Tissue Culture Core. Additionally, we are grateful to Christian Mayr for helpful discussions and to Klaus Richter for advice with the ITC measurements. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), the Bundesministerium für

Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF), and the Fonds der chemischen Industrie.

References

- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to *cis/trans* isomerization of proline residues. *Biochemistry*, **14**, 4953-4963.
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1982). Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459-489.
- Schmid, F. X. (1993). Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 123-143.
- Fischer, G. (1994). Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerasen: prolinspezifische bindepoteine oder faltungskatalysatoren? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1415-1436.
- Göthel, S. F. & Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 423-436.
- Schmid, F. X., Mayr, L. M., Mucke, M. & Schonbrunner, E. R. (1993). Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv. Protein Chem.* **44**, 25-66.
- Smith, D. F., Faber, L. E. & Toft, D. O. (1990). Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 3996-4003.
- Pratt, W. B. & Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306-360.
- Buchner, J. (1999). Hsp90&Co. - a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 136-141.
- Smith, D. F. (1998). Sequence motifs shared between chaperone components participating in the assembly of progesterone receptor complexes. *Biol. Chem.* **379**, 283-288.
- Radanyi, C., Chambraud, B. & Baulieu, E. E. (1994). The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 11197-11207.
- Hoffman, K. & Handschumacher, R. E. (1995). Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochem. J.* **307**, 5-8.
- Scheuffler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. & Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, **101**, 199-210.
- Sikorski, R. S., Boguski, M. S., Goebel, M. & Hieter, P. (1990). A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell*, **60**, 307-317.
- Lamb, J. R., Tugendreich, S. & Hieter, P. (1995). Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 257-259.
- Das, A. K., Cohen, P. T. & Barford, D. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* **17**, 1192-1199.
- Chambraud, B., Rouviere-Fourmy, N., Radanyi, C., Hsiao, K., Peattie, D. A., Livingston, D. J. & Baulieu, E. E. (1993). Overexpression of p59-HBI (FKBP59), full length and domains, and characterization of PPlase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 160-166.
- Tai, P. K., Albers, M. W., Chang, H., Faber, L. E. & Schreiber, S. L. (1992). Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science*, **256**, 1315-1318.
- Hutchison, K. A., Scherrer, L. C., Czar, M. J., Ning, Y., Sanchez, E. R. & Leach, K. L., et al. (1993). FK506 binding to the 56- kDa immunophilin (Hsp56) in the glucocorticoid receptor heterocomplex has no effect on receptor folding or function. *Biochemistry*, **32**, 3953-3957.
- Renoir, J.-M., Le, Bihan S., Mercier-Bodard, C., Gold, A., Arjomandi, M., Radanyi, C. & Baulieu, E.-E. (1994). Effects of immunosuppressants FK506 and rapamycin on the heterooligomeric form of the progesterone receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **48**, 101-110.
- Tai, P. K., Albers, M. W., Mc Donnell, D. P., Chang, H., Schreiber, S. L. & Faber, L. E. (1994). Potentiation of progesterone receptor-mediated transcription by the immunosuppressant FK506. *Biochemistry*, **33**, 10666-10671.
- Renoir, J. M., Mercier-Bodard, C., Hoffmann, K., Le, Bihan S., Ning, Y. M. & Sanchez, E. R., et al. (1995). Cyclosporin A potentiates the dexamethasone-induced mouse mammary tumor virus-chloramphenicol acetyltransferase activity in LMCAT cells: a possible role for different heat shock protein-binding immunophilins in glucocorticosteroid receptor-mediated gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 4977-4981.
- Ratajczak, T. & Carrello, A. (1996). Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding. *J. Biol. Chem.* **271**, 2961-2965.
- Young, J. C., Obermann, W. M. & Hartl, F. U. (1998). Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J. Biol. Chem.* **273**, 18007-18010.
- Rehberger, P., Rexin, M. & Gehring, U. (1992). Heterotetrameric structure of the human progesterone receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 8001-8005.
- Segnitz, B. & Gehring, U. (1995). Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 2179-2183.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D. E., Regan, L. & Panaretou, B., et al. (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* **18**, 754-762.
- Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Kanelakis, K. C., Radanyi, C., Renoir, J.-M. & Pratt, W. B. (1999). Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem.* **274**, 36980-36986.
- Mayr, C., Richter, K., Lillie, H. & Buchner, J. (2000). Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90-associated immunophilins from *S. cerevisiae* differ in their functional properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 34140-34146.
- Nair, S. C., Rimerman, R. A., Toran, E. J., Chen, S., Prapapanich, V., Butts, R. & Smith, D. F. (1997). Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90

- and progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 594-603.
31. Barent, R. L., Nair, S. C., Carr, D. C., Ruan, Y., Rimerman, R. A. & Fulton, J. *et al.* (1998). Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. *Mol. Endocrinol.* **12**, 342-354.
 32. Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. & Jakob, U. (1992). Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature*, **358**, 169-170.
 33. Bose, S., Weigl, T., Bügl, H. & Buchner, J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science*, **274**, 1715-1717.
 34. Freeman, B. C., Toft, D. O. & Morimoto, R. (1996). Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science*, **274**, 1718-1720.
 35. Lebeau, M.-C., Massol, N., Herrick, J., Faber, L., Renoir, J.-M., Radanyi, C. & Baulieu, E.-E. (1992). P59, an hsp 90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a peptide-directed polyclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **267**, 4281-4284.
 36. Callebaut, I., Renoir, J.-M., Lebeau, M.-C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E.-E. & Moron, J.-P. (1992). An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 6270-6274.
 37. Kieffer, L., Seng, T. W., Wei Li, Osterman, D. G., Handschumacher, R. E. & Bayney, R. M. (1993). Cyclophilin-40, a protein with homology to the P59 component of the steroid receptor complex. Cloning of the cDNA and further characterization. *J. Biol. Chem.* **268**, 12303-12310.
 38. Ke, H., Zydowsky, L. D., Liu, J. & Walsh, C. T. (1991). Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 9483-9487.
 39. Michnick, S. W., Rosen, M. K., Wandless, T. J., Karplus, M. & Schreiber, S. L. (1991). Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin. *Science*, **252**, 836-39.
 40. Moore, J. M., Peattie, D. A., Fitzgibbon, M. J. & Thomson, J. A. (1991). Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506. *Nature*, **351**, 248-250.
 41. Craescu, C. T., Rouvière, N., Popescu, A., Cerpolini, E., Lebeau, M.-C., Baulieu, E.-E. & Mispelter, J. (1996). Three-dimensional structure of the PPIase-like domain of FKBP59 in solution. *Biochemistry*, **35**, 11045-11052.
 42. Forood, B., Feliciano, E. J. & Nambiar, K. P. (1993). Stabilization of alpha-helical structures in short peptides *via* end capping. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 838-842.
 43. Pierce, M. M., Raman, C. S. & Nall, B. T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*, **19**, 213-221.
 44. Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984). Determination of enzymatic catalysis for the *cis/trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta*, **43**, 1101-1111.
 45. Janowski, B., Wollner, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1997). A protease-free assay for peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases using standard peptide substrates. *Anal. Biochem.* **252**, 299-307.
 46. Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G. & Schmid, F. X. (1997a). Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. *EMBO J.* **16**, 54-58.
 47. Harrison, R. K. & Stein, R. L. (1990). Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*, **29**, 3813-3816.
 48. Schönbrunner, E. R., Mayer, S., Tropschug, M., Fischer, G., Takahashi, N. & Schmid, F. X. (1991). Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.* **266**, 3630-3635.
 49. Albers, M. W., Walsh, C. T. & Schreiber, S. L. (1990). Substrate specificity for the human rotamase FKBP: a view of FK506 and rapamycin as leucin-(twisted amide)-proline mimics. *J. Org. Chem.* **55**, 4984-4986.
 50. Kieffer, L. J., Thalhammer, T. & Handschumacher, R. E. (1992). Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 5503-5507.
 51. Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G. & Schmid, F. X. (1997b). Catalysis of protein folding by parvulin. *J. Mol. Biol.* **273**, 752-762.
 52. Buchner, J., Grallert, H. & Jakob, U. (1998b). Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol.* **290**, 323-338.
 53. Ratajczak, T., Carrello, A., Mark, P. J., Warner, B. J., Simpson, R. J., Moritz, R. L. & House, A. K. (1993). The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J. Biol. Chem.* **268**, 13187-13192.
 54. Smith, D. F., Baggenstoss, B. A., Marion, T. N. & Rimerman, R. A. (1993). Two FKBP-related proteins are associated with progesterone receptor complexes. *J. Biol. Chem.* **268**, 18365-18371.
 55. Chen, S., Sullivan, W. P., Toft, D. O. & Smith, D. F. (1998). Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress Chaper.* **3**, 118-129.
 56. Ramsey, A. J., Russel, L. C., Whitt, S. R. & Chinkers, M. (2000). Overlapping sites of tetratricopeptide repeat protein binding and chaperone activity in heat shock protein 90. *J. Biol. Chem.* **275**, 17857-17862.
 57. Owens-Grillo, J. K., Hoffmann, K., Hutchinson, K. A., Yem, A. W. & Deibel, M. R., Jr *et al.* (1995). The cyclosporin A-binding immunophilin Cyp-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 20479-20484.
 58. Dolinsky, K. J., Cardenas, M. E. & Heitman, J. (1998). Cns1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7344-7352.
 59. Marsh, J. A., Kaiton, H. M. & Gaber, R. F. (1998). Cns1 is an essential protein associated with the hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin 40-dependent functions in *cpr7*Delta cells. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7353-7359.
 60. Reynolds, P. D., Ruan, Y., Smith, D. F. & Scammell, J. G. (1999). Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the

- immunophilin FKBP51. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 663-669.
61. Buchner, J., Bose, S., Mayr, C. & Jakob, U. (1998a). Purification and characterization of prokaryotic and eukaryotic Hsp90. *Methods Enzymol.* **290**, 409-418.
62. Mücke, M. & Schmid, F. X. (1994). Intact disulfide bonds decelerate the folding of ribonuclease T1. *J. Mol. Biol.* **239**, 713-725.
63. Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.

Edited by R. Huber

(Received 7 December 2000; received in revised form 1 March 2001; accepted 1 March 2001)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie der Universität Regensburg sowie am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München angefertigt.

Herrn Professor Johannes Buchner danke ich für die interessante Themenstellung, die „unendlichen Weiten“ seines Ideenreichtums sowie seine ständige Bereitschaft, die entstandenen Daten und Probleme zu diskutieren.

Mein Dank geht weiterhin an Dr. Hauke Lilie (Universität Halle) für Rat und Hilfe mit den BLAcore-Messungen.

Chaos-Klausur danke ich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation und für seinen Beistand in so mancher Schlacht mit dem ITC.

Hasi sei für die molekularbiologischen Ratschläge gedankt.

Marcus danke ich für seinen beispiellosen Langmut, wenn ich wieder mal seinen MolBio-Arbeitsplatz belagert habe.

Meinem Hefe-Homolog Christian sei an dieser Stelle ganz herzlich für die vielen hilfreichen Diskussionen -und überhaupt - gedankt.

Mein Dank geht auch an Dr. Moni, Dr. Holgi und Thussi für die vielen großen und kleinen Ratschläge bezüglich Chaperon-Assays.

Stefan B. sei für das „kompetitive Zusammenschreiben“ gedankt.

Gedankt sei natürlich auch Elke. Nicht nur dafür, dass sie meine Klagen wegen schiefgegangener Experimente und die sich gegen Ende häufenden Zwiesgespräche mit dem Computer so geduldig ertragen hat.

Allen „übrigen Laborgenossen“ (sowohl den jetzigen als auch den ehemaligen) danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Außerdem sei auch meinen Eltern und Geschwistern für ihre beständige Unterstützung gedankt.

Last but not least, danke ich Hagn und Sanne.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

München, April 2001