

Biochemie und Protein-Protein Wechselwirkungen des humanen FK506-bindenden Proteins 36

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematischen-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Franziska Jarczowski
geb. am 04. April 1979 in Lutherstadt Eisleben

Halle / Saale, Juni 2008

Gutachter: 1: Prof. Dr. G. Fischer
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle

2: Prof. Dr. J. Balbach
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

3: Prof. Dr. J. Buchner
Technische Universität München

Verteidigungsdatum: 05.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014383

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014383>]

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	IV
<u>1 Einleitung</u>	1
<u>1.1. Das Multidomänen-FK506-bindende Protein 36</u>	1
1.1.1. FK506-bindendes Protein 36	1
1.1.2. Meiose	2
1.1.3. Die Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase Familie der FK506-bindenden Proteine	3
1.1.4. TPR-Motive und TPR-Domänen	5
<u>1.2. Interaktionspartner des FKBP36</u>	10
1.2.1. Hsp90	10
1.2.2. Hsp72	11
1.2.3. Die schwere Kette von Clathrin	13
1.2.4. GAPDH	14
<u>1.9. Ziele der Arbeit</u>	16
<u>2. Material und Methoden</u>	17
<u>2.1. Verwendete Materialien</u>	17
<u>2.2. Methoden</u>	22
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	22
2.2.1.1. Kultivierung von E.coli	22
2.2.1.2. Herstellen kompetenter Zellen für die Transformation	22
2.2.1.3. Transformation von E.coli	22
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	23
2.2.2.1. Minipräparation von Plasmid-DNA	23
2.2.2.2. Maxipräparation von Plasmid-DNA	23
2.2.2.3. Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung	23
2.2.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.2.5. PCR-Reinigung	24
2.2.2.6. Elution von DNA aus Agarosegel	24
2.2.2.7. Enzymatische Modifikation von DNA	24
2.2.3. Präparative Methoden	25
2.2.3.1. E.coli Zellaufschluss für die Proteinreinigung	25
2.2.3.2. Proteinreinigung	25
2.2.3.3. Dialyse und Proteinkonzentrierung	26
2.2.3.4. Herstellung und Fraktionierung von Zell und Gewebeextrakten	26
2.2.3.5. Präparation von Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie	28
2.2.4. Analytische Methoden	29
2.2.4.1. SDS-PAGE	29
2.2.4.2. 2D-Gelelektrophorese	29
2.2.4.3. Western-Blot	30
2.2.4.4. Agarosegelelektrophorese	30
2.2.4.5. Proteinbestimmung	30
2.2.4.6. Quantifizierung von DNA	30
2.2.4.7. Präzipitationsexperimente mit GSH-Sepharose und GST-Fusionen	31
2.2.4.8. CD-Spektroskopie	31
2.2.4.9. Fluoreszenzspektroskopie	31
2.2.4.10. PPIase-Aktivitätstests	32
2.2.4.11. GAPDH-Aktivitätstest	32
2.2.4.12. Massenspektrometrische Analyse	33

<u>3. Ergebnisse</u>	34
<u>3.1 Sequenzanalyse von FKBP36</u>	34
<u>3.2. FKBP36 homologe Proteine</u>	37
<u>3.3. Klonierung und Reinigung von FKBP36 und FKBP36-Varianten</u>	40
3.3.1. Klonierung	40
3.3.2. Expression und Reinigung	40
<u>3.4. Sekundärstruktur und Stabilität von FKBP36</u>	45
<u>3.5. PPIase Aktivität von FKBP36</u>	47
<u>3.6. Expression von FKBP36 in Geweben und Zelllinien</u>	49
3.6.1. Endogene Expression	49
3.6.2. Rekombinante Expression in COS-7	51
<u>3.7. Subzelluläre Lokalisation von FKBP36</u>	52
3.7.1. Subzelluläre Verteilung von FKBP36 in Hodenzellen	52
3.7.2. Subzelluläre Lokalisation von FKBP36 in COS-7-Zellen	55
<u>3.8. Identifizierung von Interaktionspartnern</u>	57
<u>3.9. Wechselwirkung zwischen FKBP36 und Hsp90</u>	60
3.9.1. Expression und Reinigung von Hsp90 ⁶²⁷⁻⁷³¹	60
3.9.2. Subzelluläre Verteilung von Hsp90	61
3.9.3. Hsp90-Binderegion in FKBP36	62
3.9.4. FKBP36 Binderegion in Hsp90	63
3.9.5. Einfluss von Peptiden auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion	64
3.9.6. Einfluss niedermolekularer Verbindungen auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion	65
3.9.7. Direkte Interaktion zwischen FKBP36 und Hsp90 ⁶²⁷⁻⁷³¹	66
3.9.8. Spektroskopische Charakterisierung des FKBP36/Hsp90 ⁶²⁷⁻⁷³¹ -Komplexes	67
<u>3.10. Wechselwirkung zwischen FKBP36 und Hsp72</u>	69
3.10.1. Reinigung von Hsp72	69
3.10.1.1. Hsp72 Reinigung aus Gewebe	69
3.10.1.2. Hsp72 Expression und Reinigung aus E.coli	72
3.10.2. Expression und Reinigung der C-terminalen Domänen verschiedener Hsp70	73
3.10.3. Subzelluläre Verteilung von Hsp72	73
3.10.4. Hsp72-Binderegion in FKBP36	74
3.10.6. Direkte Interaktion zwischen FKBP36 und Hsp72 ⁵⁴⁵⁻⁶³⁹	75
3.10.5. Konkurrenz von Hsp72 und Hsp90 um FKBP36	76
3.10.7. Bindestudien mit FKBP36 und C-terminalen Domänen von Hsp72-Homologen	77
3.10.8. Einfluss von Peptiden auf die FKBP36/Hsp72-Interaktion	79
<u>3.11. Wechselwirkung zwischen FKBP36 und GAPDH</u>	81
3.11.1. Binderegion von GAPDH in FKBP36	81
3.11.2. Einfluss von Hsp90 und Hsp72 auf die FKBP36/GAPDH-Interaktion	82
3.11.3. Bindestudien mit gereinigter GAPDH und FKBP36	83
3.11.4. Einfluss von GAPDH-Substraten auf die Interaktion mit FKBP36	84
3.11.5. Einfluß des FKBP36 auf die GAPDH-Aktivität	85
3.11.6. Regulation GAPDH-Aktivität in COS-7-Zellen durch FKBP36	87
<u>3.12. Wechselwirkung zwischen FKBP36 und CLH</u>	89
3.12.1. Reinigung von CLH beschichteten Vesikeln	89
3.12.2. Reinigung von CLH	90
3.12.3. FKBP36 interagiert direkt mit CLH	92

3.12.4. CLH Binderegion in FKBP36	94
<u>4. Diskussion</u>	96
<u>4.1. FKBP36 – eine humane PPIase</u>	96
4.1.1. Charakterisierung der Proteineigenschaften	96
4.1.2. Interaktion der PPIase-Domäne von FKBP36	101
<u>4.2. Interaktionen der TPR-Domäne des FKBP36</u>	101
4.2.1. Allgemeine Einordnung der TPR-Domäne	101
4.2.2. Bindung an Hsp90 und Hsp72	102
4.2.3. Bindung an GAPDH	104
4.2.4. Multiproteinkomplexe von FKBP36	106
<u>4.3. Multiproteinkomplexe des FKBP36 in der Spermatogenese</u>	109
<u>5. Zusammenfassung</u>	112
<u>Literaturverzeichnis</u>	116

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
APC	engl. <i>anaphase promoting complex</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>At</i> FKBP42	<i>Arabidopsis thaliana</i> FK506-bindendes Protein 42
APS	Ammoniumperoxidisulfat
βAPP	engl. <i>β-Amyloid precursor protein</i>
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CCT	engl. <i>chaperonin containing TCP1</i>
CD	Cirkular Dichroismus
CDK	engl.: <i>cyclin dependent kinase</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> , Nematode
CHIP	engl. <i>carboxyl terminus Hsp70 interacting protein</i>
CLH	Clathrin schwere Kette
Cpr	große Immunophiline der Hefen
C-terminal	carboxyterminal
Cyp	Cyclophilin
Da	Dalton (Molekulargewicht in g mol ⁻¹)
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	engl. Desoxyribonucleic Acid
DnaJ	bakterielles Hsp40 Chaperon
DnaK	bakterielles Hsp70 Chaperon
dNTP	Didesoxynucleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	engl.: <i>Electrospray Ionisation</i>
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszein-iso-thiocyanat
FKBP	FK506-bindendes Protein
FKBP12	falls nicht anders vermerkt, humanes FK506-bindendes Protein 12
FKBP25	falls nicht anders vermerkt, humanes FK506-bindendes Protein 25
FKBP36	falls nicht anders vermerkt, humanes FK506-bindendes Protein 36
FKBP38	falls nicht anders vermerkt, humanes FK506-bindendes Protein 38
FKBP37.7	falls nicht anders vermerkt, humanes FK506-bindendes Protein 37.7
FKBP52	falls nicht anders vermerkt, humanes FK506-bindendes Protein 52
g	Erdbeschleunigung
GA	Geldanamycin
GA3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAK	engl.: <i>cyclin G-associated kinase</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR	Glucocorticoid Rezeptor

GSH	Glutathion, reduziert (γ -Glutamylcysteinylglycin)
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
His ₆	sechsfach Histidin
His ₆ -FKBP36	sechsfach Histidin fusioniertes FKBP36
Hip	engl. <i>Hsc70 interacting protein</i>
Hop	engl. <i>Hsp70-Hsp90 organizing protein</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hsc	engl.: <i>heat shock cognate</i>
Hsp	engl.: <i>heat shock protein</i> , Hitzeschockprotein
Hsp 40, 72, 90,...	falls nicht anders vermerkt humane Hitzeschockproteine mit der molekularen Masse von 40, 72, 90 ... kDa
HtpG	bakterielles Hsp90 Chaperon
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
K _i	Inhibitionskonstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria Bertani
mg	Milligramm
min	Minute
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
μ M	mikromolar
MonoQ	Anionenaustauscherharz mit quartären Aminfunktionen
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NiNTA	Nickel-nitrilo-tri-acetic-acid
NP-40	Nonidet P40
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
ÖR	Östrogen-Rezeptor
OcFKBP52	<i>Oryctolagus cuniculus</i> FK506-bindendes Protein 52
PA	Polyacrylamid
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	engl. <i>Protein Data Bank</i>
PEX	Peroxisomaler Import Faktor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	-4-Nitro-Anilid
PP5	Protein-Ser/Thr-Phosphatase 5
PPIase	Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerase
PR	Progesteron-Rezeptor
Q-TOF	engl. <i>quadrupole-time of flight</i>
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RnHsp72	<i>Rattus norvegicus</i> Hsp72

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SC	synaptonemaler Komplex
<i>S. cerevisiae</i>	Saccharomyces cerevisiae, Bäckerhefe
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHR	Steroidhormon-Rezeptor
Suc	Succinyl
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TPR	engl. <i>tetratricopeptide repeat</i>
Tris	Trishydroxyethylaminoethan
tRNA	engl. <i>transfer RNA</i>
TTC(1-4)	engl. <i>tetratricopeptide containing protein</i>
[Θ]MRW	molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure
U-Box	Charakteristisches Sequenzmotiv von Ubiquitin Ligasen
UV	Ultraviolett
U	Unit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
Xaa-Position	randomisierte Position

1 Einleitung

1.1. Das Multidomänen-FK506-bindende Protein 36

1.1.1. FK506-bindendes Protein 36

Bei Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Ursache des Williams Beuren Syndrom (WBS) wurde das Chromosom 7 erstmals näher untersucht [Ewart, *et al.*, 1993; Clahsen & Almazan, 1998]. Durch Men *et al.*, [1998] wurde dabei im Locus 7q11.23 dieses Chromosoms das *FKBP6* Gen, das für das FK506-bindende Protein 36 (FKBP36) kodiert, identifiziert. Eine Analyse der Proteinsequenz ergab, dass FKBP36 Homologie zu FKBP51 und FKBP52 besitzt und damit einer Proteinfamilie angehört, deren Mitglieder neben einer Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase Domäne vom FKBP-Typ auch sogenannten *tetratricopeptid repeat* (TPR)-Motive besitzen. WBS ist ein dominant autosomaler Gendefekt, bei dem neben *FKBP6* noch mindesten 16 weitere Gene auf Chromosom 7 deletiert sein können. Die Symptome des WBS können individuell sehr unterschiedlich sein. Viele Patienten zeigen jedoch eine supraavalvuläre Aortenstenose, faziale Dysmorphien (sog. Elfengesicht), Hyperkalzämie, mentale Retardierung und Entwicklungsverzögerung [Morris, *et al.*, 1988]. Um die physiologische Funktion von FKBP36 näher zu charakterisieren, wurde von Crackower *et al.* [2003] eine FKBP36-defiziente Maus erzeugt. Die Deletion des *FKBP6* Gens führte zu keiner Symptomatik die für Patienten mit WBS charakteristisch ist. Weibliche FKBP36-defiziente Mäuse entsprechen vollkommen dem Wildtyp. Bei männlichen FKBP36-defizienten Mäusen wird eine Verkleinerung der Hoden und Infertilität beobachtet. Eine Untersuchung der Ursache ergab ein Defizit an Spermatozyten nach dem Pachytän. Eine detaillierte Analyse zeigte, dass FKBP36 Bestandteil des synaptonemalen Komplexes (SC) ist und in den Spermatozyten von FKBP36 defizienten Mäusen eine erhöhte Anzahl von Chromosomenstrangbrüchen und Fehlern bei der Homologenpaarung beobachtet werden. Crackower *et al.* [2003] postulierten deshalb eine Funktion von FKBP36 bei der Paarung homologer Chromosomen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass FKBP36 bei der korrekten Ausbildung des X-Y Bivalent mitwirkt, weshalb eine spezifische Funktion bei der Paarung des X-Y Bivalent während der Meiose männlichen Nager wahrscheinlich ist [Koalas *et al.*, 2005].

1.1.2. Meiose

Die Grundlage der Gametogenese und damit der geschlechtlichen Fortpflanzung wird durch eine spezielle Form der Zellteilung gebildet: die Meiose [Kleckner, 1996; Svetlanov & Cohen, 2004]. Hierbei erfüllt die Meiose eine doppelte Funktion, da während des Prozesses die Chromosomenzahl halbiert und durch inter- und intrachromosonale Rekombination eine erhöhte genetische Variabilität erzeugt wird. Die entstandene Vielzahl neuer Genkombinationen in den Nachkommen wird als evolutionärer Vorteil angesehen.

Der Verlauf der Meiose kann in zwei Teilschritte unterteilt werden. Zunächst werden während der Reduktionsteilung die homologen Chromosomen separiert und anschließend in der Äquationsteilung die Chromatiden getrennt. Die Äquationsteilung gleicht einer Mitose, während die Reduktionsteilung durch komplexe cytologische Ereignisse bestimmt wird, die spezifisch für meiotische Zellen sind [Castro & Lorca, 2005].

Für die Bildung lebensfähiger Gameten ist eine numerische Halbierung der Chromosomenzahl während der Reduktionsteilung nicht ausreichend, vielmehr ist die Entstehung genetisch vollständiger Genome erforderlich. In der Evolution hat sich ein Prinzip entwickelt, bei dem sich zunächst die homologen Chromosomen paaren (Synapsis), später paarweise in die Metaphaseebene anordnen und zu entgegengesetzten Polen wandern. Der wesentliche Schritt zur Einleitung dieses Vorgangs ist in allen Eukaryonten die Paarung und homologe Rekombination der Chromosomen während der Prophase I der Meiose [Cobb & Handel, 1998]. Die dabei ablaufenden Vorgänge sind nur wenig verstanden. Sie können dennoch aufgrund mikroskopischer Beobachtungen in die Stadien Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakenese, unterteilt werden (Abbildung 1). Charakteristisch für die einzelnen Stadien der Prophase I ist die Aus- und Rückbildung einer für die Meiose spezifischen Struktur, dem SC. Der SC ist eine vorwiegend aus Proteinen aufgebaute Struktur, die sich zwischen zwei homologen Chromosomen in allen eukaryontischen Spezies ausbildet. Die Bildung des SC ist direkt mit dem Auftreten meiotischer Rekombination verbunden, jedoch nicht essentiell für Homologenpaarung und die Ausbildung von Doppelstrangbrüchen [Burgess, 2002; McKee, 1996; Page & Hawley, 2003].

Mit Hilfe der Charakterisierung von Organismen die eine Störung der Fertilität aufzeigen gelang nicht nur die Identifizierung zahlreicher Bestandteile des SC und des meiotischen Rekombinationsapparats sondern auch weiterer Meiose bzw. Gametogenese-spezifischer Proteine [Ashley, 2004; Eppig *et al.*, 2005;]. Mittlerweile sind in der Literatur über 100 verschiedene Gendefekte in Mäusen beschrieben und teilweise funktionell charakterisiert [Eppig *et al.*, 2005]. Beispielsweise bilden Mäuse mit einem Defekt im *Scp1* Gen, das für das *synaptonemal complex protein 1* kodiert, einen

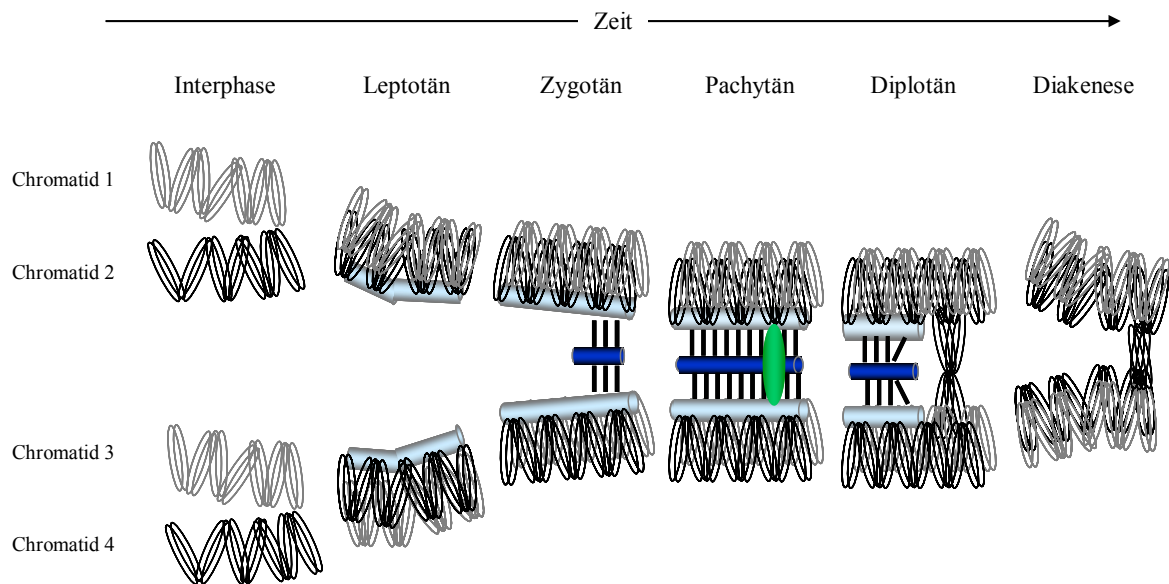


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Chromosomenpaarung während der meiotischen Prophase I. Charakteristisch für das Pachytän ist der vollausgebildete synaptonemale Komplex bestehend aus lateral Element (dunkel blau) und zentral Element (hell blau) sowie Rekombinationsknoten (grün).

fehlerhaften SC aus [DeVries *et al.*, 2005]. Dieser Defekt resultiert in einem Abbruch der Meiose in der frühen Prophase. Interessanterweise gibt es einige Gene, die für die Meiose relevant sind und deren Defekt nur in einem der beiden Geschlechter negative Auswirkungen auf die Fertilität besitzt [Handel & Eppig 1998; Hunt & Hassold, 2002; Morelli & Cohen, 2005]. Diese Gendefekte führen in dem jeweiligen anderen Geschlecht nur zu geringfügigen Änderungen der Fertilität. Diese Tatsache wird als Hinweis auf geschlechtspezifische Vorgänge während der Meiose angesehen. Man glaubt, dass einige dieser geschlechtspezifischen Phänotypen auf Abweichungen in der Regulation der Meiose bei weiblichen und männlichen Tieren zurückgehen [Hunt & Hassold, 2002]. Eine weitere Ursache könnte die Funktion eines Proteins bei der geschlechtspezifischen Paarung des X-Y Chromosomenpaares sein [Handel, 2004; Kolas *et al.*, 2005; Morelli & Cohen, 2005]. So wurde gezeigt, dass Defekte in Genen wie z.B. *FKBP6*, *BRCA1* oder *H2AX* zu einer fehlerhaften Ausbildung des X-Y Bivalentes führen und in einem Abbruch der Meiose und Infertilität bei männlichen Mäusen resultieren [Kolas *et al.*, 2005]. Weibliche Tiere mit einem Defekt dieser Gene sind jedoch fertil.

1.1.3. Die Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase Familie der FK506-bindenden Proteine

Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerasen (PPIasen; EC: 5.2.1.8) katalysieren die Umwandlung zwischen *cis*- und *trans*-Konformationen der Peptidbindung N-terminal zur Aminosäure Prolin in Polypeptidketten [Fischer *et al.*, 1984b; Schmid, 1993]. Derzeit sind drei Familien von PPIasen

identifiziert: Cyclophiline (Cyp), FK506-bindende Proteine (FKBP) und Parvuline (Par) [Fischer *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1989; Rahfeld *et al.*, 1994].

Für FKBP Namens gebend ist die Interaktion vieler Vertreter dieser PPIase-Familie mit dem Peptidmakrolid FK506. Diese immunsuppressive Substanz inhibiert hochspezifisch die katalytische Aktivität ihrer Bindepartner. Weiterhin wird durch die gemeinsame Oberfläche des FK506/FKBP-Komplexes eine Interaktion mit der Proteinphosphatase Calcineurin und somit die immunsuppressive Wirkung vermittelt [Liu *et al.*, 1991].

Homologe Enzyme des prototypischen FKBP12 sind ubiquitär verbreitet und evolutionär hoch konserviert, was in vielen spezieübergreifenden Analysen der Genfamilien belegt wird [Bell *et al.*, 2006; Galat, 2003; Luan, 1998; Maruyama *et al.*, 2004; Romano *et al.*, 2005;]. Durch zahlreiche Strukturanalysen verschiedener Vertreter dieser PPIase-Familie wurde ein Aufbau der FKBP-Domäne aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt mit einer linkshändigen Drehung und einer kurzen Helix sowie einen hohen Gehalt an aperiodischer Struktur gezeigt [Craescu *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1996; Maestre-Martinez *et al.*, 2006; Michnick *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1995].

Einige Vertreter der FKBP bestehen aus mehreren Domänen. So ist das Auftreten mehrerer nicht identischer FKBP-Domänen (z.B. FKBP52, FKBP65) im gleichen Protein beschrieben [Callbaut *et al.*, 1992; Coss *et al.*, 1995]. Für diese Vertreter wurde gezeigt, dass die katalytische Aktivität hauptsächlich durch eine einzige PPIase-Domäne vermittelt wird [Chambraud *et al.*, 1993; Pirkl *et al.*, 2001]. Weiterhin sind Vertreter bekannt, die eine TPR-Domäne, bestehend aus drei TPR Motiven, als C-terminale Erweiterung der ein oder zwei PPIase-Domänen aufweisen (z.B. FKBP52, FKBP37.7). Stets enthalten FKBP mit TPR-Domäne eine putative Calmodulinbindestelle, wobei bisher für einige Vertreter nur eine Bindung *in vitro* an Calmodulin-Sepharose gezeigt wurde [Massol *et al.*, 1992; Kurek *et al.*, 2002b]. Die Wechselwirkung *in vivo* mit Calmodulin wurde erstmals für FKBP38 nachgewiesen und ferner die Beeinflussung der PPIase-Aktivität von FKBP38 durch dieses Signalmolekül *in vitro* gezeigt [Edlich *et al.*, 2005]. Andere FKBP die z.B. über eine EF-Hand oder DNA-Erkennungsmotiv verfügen, binden Ca^{2+} (FKBP23) bzw. DNA (*Dm*FKBP46) [Alnemri *et al.*, 1994; Mi *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998]. Eine mögliche Auswirkung dieser Interaktionen auf die PPIase-Aktivität ist bisher nicht bekannt.

Die Vielgestaltigkeit der FKBP-Proteinfamilie impliziert Funktionsvielfalt. Die ubiquitäre Verbreitung dieser PPIase-Familie und die hohe Konzentration einiger Vertreter in Zellen weisen auf essentielle Funktionen hin. Untersuchungen in *S. cerevisiae* haben jedoch gezeigt, dass unter stressfreien Bedingungen FKBP für die grundlegenden zellulären Funktionen der Hefe nicht wesentlich sind. In *S. cerevisiae* konnten alle vier FKBP deletiert werden, ohne dass ein Effekt auf

das Überleben der Zellen deutlich wird [Dolinski *et al.*, 1997]. In höheren Eukaryonten wurden sehr spezifische zelluläre Funktionen für einige FKBP nachgewiesen. Beispielsweise löst eine Deletion von FKBP12 in Mäusen schwere, teilweise letale Herzmuskeldefekte aus [Shou *et al.*, 1998]. Als Hauptursache dieses Defektes werden morphologische Veränderungen im Ca^{2+} -Kanal RyR2, mit dem FKBP12 assoziiert ist, angesehen.

Für FKBP52 wurde eine essentielle Funktion für die Fertilität männlicher und weibliche Mäuse gezeigt [Cheung-Flynn *et al.*, 2005; Tranguch *et al.*, 2005]. Die Sterilität FKBP52 defizienter Mäuse, beiderlei Geschlechts, kann auf Störungen der durch FKBP52 regulierten Androgen- bzw. Progesteronrezeptor vermittelten Genexpression und daraus resultierenden Missbildungen an Penis bzw. Gebärmutter zurückgeführt werden. Weiterhin konnte für FKBP44 eine Funktion bei der Entwicklung des Pigmentepithels der Netzhaut nachgewiesen werden [Sohocki *et al.*, 2000]. Der molekulare Prozess, an dem FKBP44 essentiell beteiligt ist, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Ausgehend von diesen Beobachtungen ist eine Funktion der Vertreter dieser PPIase-Familie in distinkten Signaltransduktionsprozessen wahrscheinlicher als eine generelle Beteiligung an der Proteinfaltung [Göthel & Marahiel, 1999].

1.1.4. TPR-Motive und TPR-Domänen

Das *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Motiv besteht aus einer wenig konservierten, 34 Aminosäuren umfassenden Konsensussequenz [Blatch & Lassar, 1999; D'Andrea & Regan 2003; Lamb *et al.*, 1995]. Die Konservierung beschränkt sich auf Größe und Hydrophobizität einzelner Aminosäuren, deren Position innerhalb des Motivs streng festgelegt ist, dabei sind Aminosäurereste in Positionen 4,7,8,11,20,24,27,32 gegenüber Aminosäureresten in anderen Positionen der Konsensussequenz relativ hoch konserviert. Kristallstrukturanalysen verschiedener TPR-Motive zeigen, dass TPR-Motive zwei antiparallel verlaufende α -Helices (A und B) bilden, die durch eine Loop-Struktur verbunden sind [Das *et al.*, 1998; Gatto *et al.*, 2000; Scheufler *et al.*, 2000]. Die Anordnung der beiden Helices wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den konservierten Aminosäureresten des TPR-Konsensusmotivs bestimmt. In Abbildung 2 sind der Aufbau eines TPR-Motivs und die Lage seiner konservierten Aminosäurereste schematisch dargestellt.

In Proteinen sind meist mehrere TPR-Motive aneinander gereiht, wobei in Abhängigkeit vom betrachteten Protein 3 bis 16 solcher Motive entweder in direkter Abfolge oder von kurzen Sequenzeinschüben unterbrochen vorliegen können [Lamb *et al.*, 1995; Blatch & Lassar, 1999; Groves & Barford, 1999]. In allen bisher beschriebenen Kristallstrukturen von eukaryontischen Proteinen mit TPR-Motiven bilden 3 TPR-Motive eine Einheit [Cliff *et al.*, 2006; Stanley *et al.*, 2007]. Dabei sind die einzelnen Motive so angeordnet, dass eine regelmäßige Abfolge von anti-

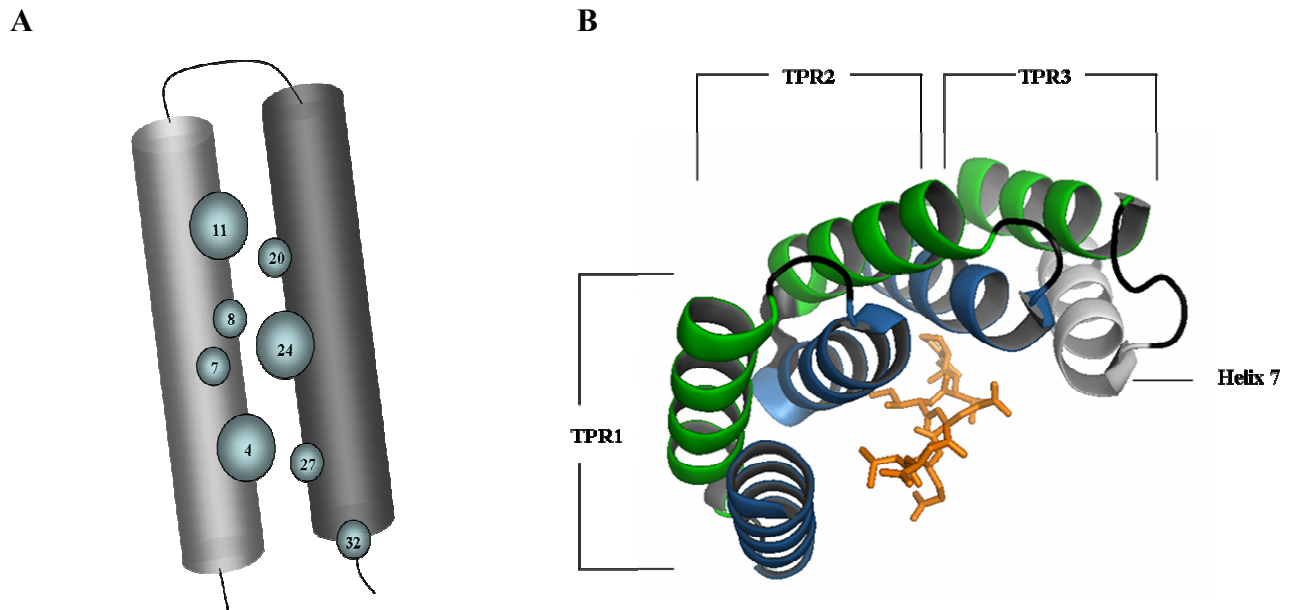


Abbildung 2: TPR-Motiv und TPR-Domäne: **A:** schematische Darstellung eines TPR-Motivs. Die beiden antiparallel verlaufender α -Helices sind als Zylinder, unstrukturierte Bereiche als schwarze Linie dargestellt. Durch Kugeln ist die Lage der konservierten Aminosäurereste der Konsensussequenz in Position 4 (Trp, Leu, Phe); 7 (Leu, Ile, Met); 8 (Gly, Ala, Ser); 11 (Tyr, Leu, Phe); 20 (Ala, Ser, Glu); 24 (Phe, Tyr, Leu); 27 (Ala, Ser, Leu) und Position 32 (Pro, Lys, Glu) angedeutet. **B:** Kristallstruktur (RCSB-Datenbank: 1ELW) der aus 3 TPR-Motiven aufgebauten N-terminalen TPR-Domäne des Hop. Die A-Helices der einzelnen TPR-Motive sind in blau, die B-Helices in grün dargestellt. Für viele TPR-Domänen konnte die Ausbildung einer siebenten Helix nach dem dritten TPR-Motiv gezeigt werden, die hier grau dargestellt ist. In orange ist ein Peptidligand (mit der Sequenz GPTIEEVD) dargestellt.

parallel orientierten Helices resultiert. Durch Drehung der Helix-Achsen um einen Winkel von ca. 24° zueinander wird eine rechtsgewundene Superhelix ausgebildet, deren konkave Innenseite von den A Helices der Motive gebildet wird. Die Innenseite der Superhelix bildet eine Bindetasche für Interaktionspartner, wie z.B. Hsp90, Hsp70 oder Proteine mit Peroxisomenimportsequenz (Abbildung 2) [Scheufler *et al.*, 2000; Gatto *et al.*, 2003].

Die von TPR-Motiven gebildeten Domänen vermitteln Protein-Protein-Wechselwirkungen in Multiproteinkomplexen mit unterschiedlicher Funktion. Proteine mit TPR-Domäne wurden zuerst als Komponenten des *anaphase promoting complex* (APC) [Hirano *et al.*, 1990; Sikorski *et al.*, 1991] und des RNA-Syntheseapparates identifiziert [Sikorski *et al.*, 1990]. Seitdem konnten Proteine mit TPR-Domäne auch in zahlreichen weiteren zellulären Kontexten nachgewiesen werden. Hierzu gehören unter anderem der peroxisomale und mitochondriale Proteinimport [Gatto *et al.*, 2000; Pfanner *et al.*, 2001], der NADPH-Oxidase Multiproteinkomplex [Lapouge, *et al.*, 2000] und Hsp70-Hsp90-Multiproteinkomplexe [Buchner, 1999; Pratt *et al.*, 2004; Smith, 2004].

Am besten charakterisiert und verstanden sind die Proteine mit TPR-Domäne, die in Komplexen mit den molekularen Chaperonen Hsp90 und Hsp70 gefunden werden. Der C-Terminus beider Chaperone wird durch die geladene Aminosäuresequenz EEVD gebildet und in der konkaven Bindetasche der TPR-Domäne fixiert [Scheufler *et al.*, 2000]. Die Interaktion zwischen Chaperon und TPR-Domäne stabilisieren elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Peptidrückgrat,

Seitenketten sowie dem C-terminalen Carboxylat des EEVD-Motivs. In zahlreichen Binde- und Kristallstudien konnten die Aminosäurereste der TPR-Domäne, die an der Bindung an das EEVD-Motiv der Chaperone beteiligt sind, identifiziert und bestätigt werden [Brinker *et al.*, 2002; Cliff *et al.*, 2006; Russel *et al.*, 1999; Scheufler *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004]. Sie sind über alle 3 TPR-Motive verteilt und stark konserviert. Im ersten TPR-Motiv sind Aminosäuren in Position 5 (Lys) und 9 (Asn); im zweiten Motiv Aminosäuren 6 (Asn) und im letzten TPR Motiv Aminosäuren 2 (Lys) und 6 (Arg) an der Bindung beteiligt. Des Weiteren existieren hydrophobe Wechselwirkungen der TPR-Domäne mit Aminosäureresten, die sich N-terminal des EEVD-Motivs befinden [Scheufler *et al.*, 2000]. Diese tragen zur Stabilität und Spezifität der Interaktion bei, sind jedoch nicht in allen Chaperon/TPR-Komplexen identisch, wodurch eine Selektivität zwischen den Bindepartnern entsteht. Für TPR1, eine TPR-Domäne des *Hsp organizing proteins* (Hop) ist eine Interaktion ausschließlich mit Hsp70 beschrieben [Brinker *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1996a; Demand *et al.*, 1998; Odunuga *et al.*, 2003]. Für eine weitere TPR-Domäne dieses Proteins (TPR2A) wird nur eine Bindung an Hsp90 gefunden [Brinker *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 1999a; Lassle *et al.*, 1997]. Die TPR-Domänen anderer Proteine sind nicht strikt selektiv, so ist für Cyclophilin 40 und PP5 eine Interaktion mit beiden Chaperonen beschrieben [Carello *et al.*, 2004; Cliff *et al.*, 2006; Hoffmann & Handschumacher, 1995].

Alle mit Hsp90 oder Hsp70 interagierenden Proteine mit TPR-Domäne sind Multidomänenproteine, die entweder aus weiteren Proteininteraktionsdomänen (TPR-Domänen, J-Domänen) oder Domänen mit katalytischer Funktion (Phosphatase, PPIase oder Ubiquitin-ligase) aufgebaut sind [Pratt & Toft, 1997; Smith, 2004;]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über den Aufbau einige Vertreter.

Im Komplex mit Chaperonen übernehmen die Proteine mit TPR-Domäne zahlreiche, nicht immer vollständig verstandene Funktionen. Sie vermitteln Interaktionen mit neuen Bindepartnern oder beeinflussen bestehende Interaktionen innerhalb eines Multiproteinkomplexes. Dabei sind die Funktionen von Proteinen mit TPR-Domäne, die in Steroidhormonrezeptorkomplexen vorkommen am besten untersucht und verstanden [Pratt & Toft 1997]. In Säugern gibt es mehrere wirksame Steroidhormone und korrespondierende, spezifische Rezeptoren [Baulieu *et al.*, 1975]. Neben dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) sind die Steroidhormon-Rezeptoren (SHR) der Sexualhormone Östrogen (Östrogen-Rezeptor = ÖR) und Progesteron (Progesteron-Rezeptor = PR) näher untersucht. Diese Rezeptoren sind allein nicht in der Lage, ihren Hormonliganden zu binden. Für die Bindung eines Hormonliganden durchlaufen die Rezeptoren einen Aktivierungs- und Zerfallszyklus, an dem je nach Reifungszustand Hsp90 oder Hsp70 enthaltende Multiproteinkomplexe verschiedener Zusammensetzung beteiligt sind [Buchner, 1999; Ratajczak *et al.*, 2003; Smith, 2004].







Name	Domänenaufbau	weitere Interaktionspartner im Chaperonkomplex	Funktion im Komplex
Hop ^a			Mittler zwischen Hsp70/Hsp90
PP5 ^b		SHR	Dephosphorylierung des Rezeptors
Cyp40 ^c		SHR	
FKBP51 ^d		SHR	Einfluss auf Transport und Aktivität des Rezeptors
FKBP52 ^e		Dynamitin SHR	Einfluss auf Transport und Aktivität des Rezeptors
FKBP37.7 ^f		AHR	Einfluss auf Transport und Stabilität des Rezeptors

Tabelle 1: Überblick über den Domänenaufbau, Funktionen und Interaktionspartner einiger Proteine mit TPR-Domäne die in Proteinkomplexen mit Hsp90 bzw. Hsp70 gefunden werden. TPR: TPR-Domäne, PP: Phosphatase-Domäne, Cyp: Cyclophilin-Domäne, FKBP: FKBP-Domäne, SHR: Steroidhormon-Rezeptor; AHR: Arylhydrocarbon-Rezeptor. ^a [Chen *et al.*, 1996a]; ^b [Chen *et al.*, 1996b; Silverstein *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007]; ^c [Kieffer *et al.*, 1993]; ^d [Silverstein *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1993; Wochnik *et al.*, 2005]; ^e [Tai *et al.*, 1993; Wochnik *et al.*, 2005]; ^f [Meyer *et al.*, 1998; Meyer & Perdew, 1999;]

Ein frühes Stadium des Zyklus ist durch die Interaktion des Rezeptors mit Hsp70 und Hop, einem TPR-Domänen Protein, gekennzeichnet. Die Bindung eines anderen TPR-Domänen Proteins Hop führt zur Bildung eines intermediären Komplexes, der sowohl Hsp70 als auch Hsp90 beinhaltet. Die Funktion von Hop besteht vermutlich darin, Hsp90 und Hsp70 zu verbinden, um so den Transfer des Substrates zwischen den beiden Chaperonsystemen zu ermöglichen. Weiterhin konnte eine Inhibition der ATPase Aktivität von Hsp90 durch Bindung an Hop gezeigt werden [Prodromou *et al.*, 1999; McLaughlin *et al.*, 2002].

Nach Diffusion von Hop aus dem Komplex, wird dieses durch ein Immunophilin mit TPR-Domäne (FKBP51, FKBP52, Cyp40) oder PP5 ersetzt. In dieser Phase des Zyklus ist weiterhin p23 und Hsp90 an den Rezeptor gebunden. Man spricht nun vom „reifen Komplex“ [Buchner, 1999; Pratt & Toft, 1997; Smith, 2004]. Der „reife Komplex“ ist unter physiologischen Bedingungen inhärent instabil und zerfällt mit einer Halbwertszeit von etwa 5 Minuten, falls keine Hormonbindung erfolgt [Smith, 1998]. Nach der cytosolischen Bindung an ein Hormon wird der Rezeptor-Komplex einer Reihe von Modifikationen unterzogen und migriert in den Kern, um dort einen Transkriptionsfaktor zu bilden.

Die Aufgaben der einzelnen Immunophilinen in dieser Phase des Zyklus sind vielfältig, aber nur teilweise verstanden. Verschiedene Studien belegen, dass präferentielle Bindungen zwischen einigen Immunophilinen und Rezeptoren bestehen. Beispielsweise wird FKBP51 im reifen PR-Komplex und im reifen GR-Komplex bevorzugt gegenüber Cyp40 und FKBP52 gebunden [Nair *et al.*, 1997; Barent *et al.*, 1998]. Außerdem besitzt der GR-Komplex eine höhere Affinität zu FKBP52

als zu Cyp40 [Owens-Grillo *et al.*, 1995]. Im ÖR-Komplex wurde fast ausschließlich FKBP52 und Cyp40 und kaum FKBP51 nachgewiesen [Barent *et al.*, 1998].

Diese Selektivität kann auf direkte Wechselwirkungen zwischen Immunophilin und Rezeptor zurückgeführt werden. So wurde eine direkte Interaktion zwischen dem GR und FKBP51 bzw. FKBP52 nachgewiesen [Owens-Grillo *et al.*, 1996, Silverstein *et al.*, 1999]. Die Lokalisation dieser Interaktionsstellen konnte bisher nicht weiter eingegrenzt werden. Einer Hypothese zufolge basiert sie auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen einem Motiv (EDLTDDDED) in der FKBP52 Sequenz und der NL1-Sequenz des GR [Baughman *et al.*, 1995]. FKBP51 dagegen besitzt keine entsprechende Region.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die beiden FKBP die Aktivität des GR unterschiedlich beeinflussen [Reynolds *et al.*, 1999; Rigges *et al.*, 2003]. So führt die Überexpression in Zellen bzw. die Bindung von FKBP51 in den GR-Rezeptorkomplex zu einer Verringerung der GR-Affinität zu seinem Liganden und zur Verringerung der transkriptionalen Aktivität des Rezeptors [Reynolds *et al.*, 1999; Scammell *et al.*, 2001]. Die Zugabe von Hormonen kann das Ablösen von FKBP51 aus dem Rezeptorkomplex bewirken, während andere Komponenten wie Hsp90, p23 und FKBP52 auch unter diesen Bedingungen Bestandteile des Komplexes bleiben [Davies *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1990]. Der Einfluss von FKBP52 auf die Aktivität des GR wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Einige Studien zeigen keinen Einfluss von FKBP52 auf die Rezeptoraktivität, andere Gruppen belegen einen durch FKBP52 ausgelösten Anstieg der Rezeptoraktivität [Reynold *et al.*, 1999; Rigges *et al.*, 2003]. Neben der gegensätzlichen Beeinflussung der Aktivität des GR durch FKBP51 und FKBP52 wird auch eine Regulation des intrazellulären Transports des GR durch diese FKBP diskutiert [Wochnik *et al.*, 2005]. Eine Bindung der ersten FKBP-Domäne von FKBP52 an Dynamitin vernetzt den SHR-Komplex mit dem Dyneingerüst der Zelle und scheint den Transport in den Zellkern zu vermitteln [Galigniana *et al.*, 2004; Silverstein *et al.*, 1999]. Im Gegensatz dazu kann bei Überexpression von FKBP51 kein Transport des Komplexes beobachtet werden [Wochnik *et al.*, 2005]. Eine mögliche Ursache dafür ist eine geringe Affinität der FKBP-Domäne des FKBP51 zum Dyneingerüst der Zelle.

Die Regulation der Aktivität und des Transports von Rezeptoren durch Immunophiline mit TPR-Domäne kann nicht nur in Komplexen mit SHR beobachtet werden. Ähnliche Effekte sind auch für FKBP37.7 und den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR) im Komplex mit Hsp90 beschrieben [Galigniana *et al.*, 2002; Kazlauskas *et al.*, 2002], weshalb eine allgemeinen Funktion der Immunophiline mit TPR-Motiv bei der Regulation des Transports, der Stabilität und der Aktivität von Rezeptoren in Multiproteinkomplexen postuliert wird [Owens-Grillo *et al.*, 1995; Pratt *et al.*, 2004, Smith 2004].

1.2. Interaktionspartner des FKBP36

1.2.1. Hsp90

Die Familie der Hsp90 Proteine gehört zu den molekularen Chaperonen. Molekulare Chaperone interagieren selektiv mit aggregationsanfälligen Proteinen und treten dadurch direkt in Konkurrenz zu Aggregationsreaktionen [Buchner, 1996; Walter & Buchner, 2002]. Chaperone beeinflussen nur die kinetisch kontrollierte Konkurrenz zwischen Proteinfaltung und deren Nebenreaktionen wie Aggregation, stellen jedoch keine sterische Information für die Faltung bereit [Jaenicke, 1993].

Die Chaperone der Hsp90 Familie sind hochkonserviert und besitzen Homologe in Eu- und Prokaryonten [Buchner, 1999; Pratt und Toft, 1997]. Anhand von Sequenzvergleichen und limitierter Proteolyse konnte gezeigt werden, dass Proteine der Hsp90-Familie aus drei Domänen aufgebaut sind [Itoh & Tashima, 1993; Nemoto *et al.*, 1997]. Dabei enthält die N-terminale Domäne eine ATP-Bindetasche, die große Ähnlichkeiten mit der ATP-bindenden Domänen der GyraseB besitzt, aber keine Verwandtschaft mit der ATPase-Domäne der Hsp70 Chaperone aufweist [Prodromou *et al.*, 1997]. Die Bindung und Hydrolyse von ATP führt zu Änderungen in der Struktur des gesamten Hsp90 Moleküls und ist essentiell für die Faltungsunterstützung der Substrate [Csermley *et al.*, 1993; Grenert *et al.*, 1997; Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998]. Für die Chaperon-Funktion von Hsp90 ist ferner eine durch die C-terminale Domäne des Proteins vermittelte Dimerisierung notwendig [Nemoto *et al.*, 1995]. Weiterhin vermittelt in cytosolischen Hsp90-Vertretern aus Eukaryonten dieser Domäne eine Interaktion mit TPR-Domänen [Young *et al.*, 1993; Carrello *et al.*, 1999]. Die mittlere Domäne wird durch ein 24 kDa umfassenden Sequenzbereich zwischen N- und C-terminaler Domäne gebildet. In einigen Mutagenesestudien und Strukturanalysen konnte ein Zusammenhang dieser Domäne mit der Substratbindung hergestellt werden [Basso *et al.*, 2002; Fontana *et al.*, 2002; Meyet *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2006].

Am besten in ihrer Funktion charakterisiert sind cytosolische Hsp90-Vertreter aus Eukaryonten, die ca. 1-2 % des Zellproteins ausmachen. Hsp90 gehört auch in Abwesenheit von Stressbedingungen zu den am stärksten vertretenen Proteinen im Cytosol [Welch & Feramisco, 1982]. In Eukaryonten sind zwei cytosolische Isoformen beschrieben, die redundante Funktionen besitzen und sich als Folge verschiedener Stressoren sehr schnell im Zellkern ansammeln [Akner *et al.*, 1992]. Im Menschen handelt es sich um das konstitutiv exprimierte Hsp90 β und das vorwiegend induzierbare Hsp90 α [Hickey *et al.*, 1989, Zhang *et al.*, 1999].

Neben der generellen Stabilisierung nicht nativ-gefalteter Proteine durch Chaperone ist Hsp90 an der strukturellen Reifung unterschiedlicher regulatorischer Proteine wie z.B. SHR, AHR, Hitze-

Schock-Faktor-1 (HSF-1), oder Tyrosinkinase beteiligt. [Nair *et al.*, 1996; Pratt & Toft, 2003; Meier *et al.*, 1998; Silverstein *et al.*, 1998; Miyata *et al.*, 2001]. Diese Proteine werden in der Literatur als Hsp90-Substrate bezeichnet [Buchner, 1999; Pratt & Toft, 2003; Smith, 2004]. Für eine Aktivierung der Hsp90-Substrate ist die ATPase-Aktivität von Hsp90 unerlässlich [Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998]. Das Ansamycinantibiotikum Geldanamycin verdrängt ATP aus seiner Hsp90-Bindetasche und hemmt die ATPase-Aktivität des Hitzeschockproteins [Dehner *et al.*, 2003; Panaretou *et al.*, 1998]. Eine solche Inhibition der ATPase-Aktivität von Hsp90 bewirkt die Dissoziation von Hsp90/Multiproteinkomplexen und den Abbau von Hsp90-Substraten durch das Proteasom. [Citri *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1995; Thulasiraman & Matts, 1996]. Da für viele der Hsp90-Substrate eine onkogene Funktion nachgewiesen wurde, wird eine therapeutische Wirkung des Geldanamycin gegenwärtig erprobt [Miyata, 2005].

Für die Aktivierung der Hsp90-Substrate sind weiterhin zahlreiche Kofaktoren notwendig. Diese Kofaktoren können aufgrund ihrer verschiedenen Funktionen in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Einige Kofaktoren beeinflussen die Bindung oder die Freisetzung der Hsp90-Substrate z.B. durch Regulation der ATPase-Aktivität des Chaperons [Prodromou, *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 1997; Grenert *et al.*, 1999]. Hierzu gehören z.B. p23, Hop und CDC37. Für Hop und CDC37 wurde die Inhibition der ATPase-Aktivität von Hsp90 und damit eine Hemmung der Substratfreisetzung gezeigt [Prodromou *et al.*, 1999, Siligardi *et al.*, 2002]. p23 hingegen fördert die durch ATP-Hydrolyse ausgelöste Substratfreisetzung von Hsp90, ohne die ATPase Aktivität von Hsp90 zu stimulieren [Young & Hartl, 2000].

Eine weitere Gruppe von Hsp90-Kofaktoren übt Einfluss auf die Hsp90-gebundenen Substrate aus. Hierzu gehören Proteine mit TPR-Domäne, die eine weitere katalytische Domäne besitzen wie beispielsweise CHIP, FKBP52 oder PP5. Für die PP5 wurde die Dephosphorylierung und Inaktivierung des Hsp90-Substrates GR gezeigt [Wang *et al.*, 2007].

Einer dritten Gruppe von Hsp90-Kofaktoren können Proteine zugeordnet werden, die aus mehreren TPR-Domänen oder einer Kombination aus TPR und J-Domänen aufgebaut sind. Proteine wie z.B. Hop, TPR2 oder TOM34 besitzen das Potential, gleichzeitig an Hsp70 und Hsp90 zu binden und einen Substrataustausch zwischen beiden Chaperonen zu vermitteln [Chang *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1998].

1.2.2. Hsp72

Hsp72 gehört zu den Chaperonen der Hsp70-Protein Familie. Diese Familie ist die umfangreichste Familie unter den Chaperonen, mit homologen Proteinen in allen Eukaryonten und vielen Prokaryonten. Im menschlichen Genom wurden bisher mindestens dreizehn Gene identifiziert, die

für ein Hsp70-Protein kodieren [Mues *et al.*, 1986; Pongrac *et al.*, 2004; Scherer *et al.*, 2003; Strausberg *et al.*, 2002; Tavaría *et al.*, 1996]. Zwei dieser Gene (HSPA2 und HSPA1L) werden spezifisch im Hoden exprimiert und kodieren Hsp72 und Hsp70L [Eddy, 1999; Son *et al.*, 1999; Zackeri & Wohlgemuth, 1987]. Die Expression beider Proteine erfolgt konstitutiv und ist wesentlich für die männliche Fertilität. Andere Mitglieder der Hsp70 Proteinfamilie wie z.B. Hsc70 und Hsp71 werden ubiquitär in allen Geweben und Zelllinien exprimiert [Christians *et al.*, 2003; Daugaard, *et al.*, 2007; Krone *et al.*, 2004]. Dabei können konstitutiv exprimierte Proteine wie Hsc70, von Hsp70 Vertretern, deren Expression durch Stress induziert wird, wie z.B. Hsp71, unterschieden werden.

Alle Mitglieder der Hsp70-Proteinfamilie sind aus einer nukleotidbindenden Domäne (44kDa) und einem proteinbindenden Bereich (25 kDa) aufgebaut [Mayer & Bukau, 2005]. Durch Sequenzvergleich und Proteolyse konnte gezeigt werden, dass der proteinbindende Bereich in eine stark konservierte, substratbindende Domäne (15 kDa) und eine variabelere C-terminale Domäne (10 kDa) aufgeteilt werden kann. Das Bindemotiv der substratbindenden Domäne scheint ein kurzer linearer Abschnitt mit hydrophoben Aminosäuren im Substratprotein zu sein [Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Rüdiger *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1996]. Die C-terminale Domäne cytosolischer eukaryontischer Hsp70-Proteine interagiert mit TPR-Domänen [Liu *et al.*, 1999; Van der Spy *et al.*, 2000]. Die Bindung von Hsp70 an TPR-Domänen wird durch ein geladenes EEVD Sequenzmotiv, analog zur Wechselwirkung zwischen TPR-Domänen und Hsp90, vermittelt [Scheufler *et al.*, 2000].

Die nukleotid- und substratbindende Domäne von Hsp70-Proteinen beeinflussen sich kooperativ in ihren Aktivitäten [Buchberger *et al.*, 1994; Mayer & Bukau, 2005]. ATP-Bindung und -Hydrolyse in der nukleotidbindenden Domäne verursachen strukturelle Veränderungen im ganzen Protein, die auch Änderungen in der Affinität zum Substrat zur Folge haben [Mayer & Bukau, 2005]. Im ATP-gebundenen Zustand liegen Hsp70-Proteine in der so genannten „offenen“ Konformation vor. In diesem Zustand erfolgt nur eine temporäre instabile Bindung an Substrate [Mayer *et al.*, 2000]. Durch ATP-Hydrolyse wird Hsp70 in die „geschlossene“ Konformation überführt, in der die Substrate nur langsam gebunden und entlassen werden. Analog zum Hsp90 wird auch der Reaktionszyklus von Hsp70 durch eine Reihe von Kofaktoren, die die ATPase-Aktivität oder den Nukleotidaustausch stimulieren, reguliert. Für den prokaryontischen Hsp70-Vertreter DnaK ist neben der ATPase-Aktivität auch die Beschleunigung der cis/trans Isomerisierung von sekundären Amidpeptidbindungen beschrieben [Schiene-Fischer *et al.*, 2002].

Für alle Proteine der Hsp70-Familie wird eine Funktion bei der Vermeidung von Proteinaggregationen in der Zelle vermutet [Hartl & Hayer-Hartl, 2002]. Für einige Hsp70-Proteine

wurden zusätzliche spezielle Funktionen während einer Vielzahl von zellulären Prozessen gezeigt. Das konstitutiv exprimierte Hsc70 ist z.B. an der Translokation von Proteinen durch Membranen, der strukturellen Reifung von Rezeptoren und an der Dissemblierung von Clathrin-bedeckten Vesikeln beteiligt [Pratt & Toft, 2003; Sousa & Lafer, 2006]. Hsp72 wird im Hoden exprimiert und besitzt dort spezifische Funktionen während der Prophase I der Spermatogenese [Dix *et al.*, 1997]. Für Hsp72 wurde eine Beteiligung an der Dissemblierung des synaptonemalen Komplexes und der Aktivierung der Kinaseaktivität des CDK1 unter Ausbildung des CDK1/CyclinB1-Komplexes nachgewiesen [Zhu *et al.*, 1999].

1.2.3. Die schwere Kette von Clathrin

Clathrin ist ein heterohexamerer Komplex, der durch die Zusammenlagerung von drei Molekülen der schweren Clathrin-Kette (kurz CLH) mit jeweils einem gebundenen Molekül der leichten Clathrin-Kette (CLL), gebildet wird [Kirchhausen & Harrison, 1981].

Die CLC umfasst 1094 Aminosäuren und ist aus drei Domänen aufgebaut [Kirchhausen & Harrison, 1984; Nathke *et al.*, 2002]. Die globuläre Domäne am N-Terminus (N-terminale Domäne) ist die Bindungsstelle für Proteine mit dem aus polaren (p) und hydrophoben (ϕ) Aminosäuren aufgebauten Clathrin-Box-Motiv: pL ϕ p ϕ p [te Haar *et al.*, 1998; Lafer, 2002; Owenet *et al.*, 2004]. Beispielsweise wurde für β -Arrestin, Adaptin, Auxilin oder Epsin eine direkte Interaktion mit CLH gezeigt [Drake *et al.*, 2000; Goodman *et al.*, 1997; Lindner & Ungewickel, 1991]. Weiterhin vermitteln diese Proteine Interaktionen zu weiteren Bindepartnern und beeinflussen den strukturellen Status des gesamten Clathrin Hexamers [Lafer, 2002]. Der mittlere Bereich der CLH wird durch die distale und proximale Domäne gebildet. Diese Domänen sind aus 35 Clathrin-spezifischen Helix-loop-Helix Motiven, die eine Superhelix formen, aufgebaut und haben vorwiegend Struktur-vermittelnde Aufgaben [Smith & Pearse, 1999]. Die Funktion dieses Bereiches wird durch die Bindung der CLL an der proximalen Domäne negativ beeinflusst [Ybe *et al.*, 1998]. Am C-Terminus der CLH befindet sich der Bereich, der die Trimerisierung der CLH vermittelt [Liu *et al.*, 1995].

Das Heterohexamer Clathrin in seiner monomeren Form wird auch als Triskelion bezeichnet und ist *in vitro*, bei sauren pH-Wert in der Lage durch einen „Selbstattributionsprozess“ ein polyedrisches Gerüst, den „Clathrin-Käfig“, zu bilden [Keen *et al.*, 1979]. *In vivo* sind an der Ausbildung dieser Strukturen Adaptinkomplexe beteiligt [Maldonado-Baez & Wendland, 2006]. Adaptine verbinden Clathrin mit membrangebundenen Rezeptoren und induzieren die Assemblierung der Triskelion zu einer Käfigstruktur, die ein Membranvesikel umschließt. Nach

Verlassen der Membran wird die Clathrin-Hülle in einem ATP und Hsc70 abhängigen Disassemblierungsprozess vom Vesikel entfernt [Prasad *et al.*, 1994].

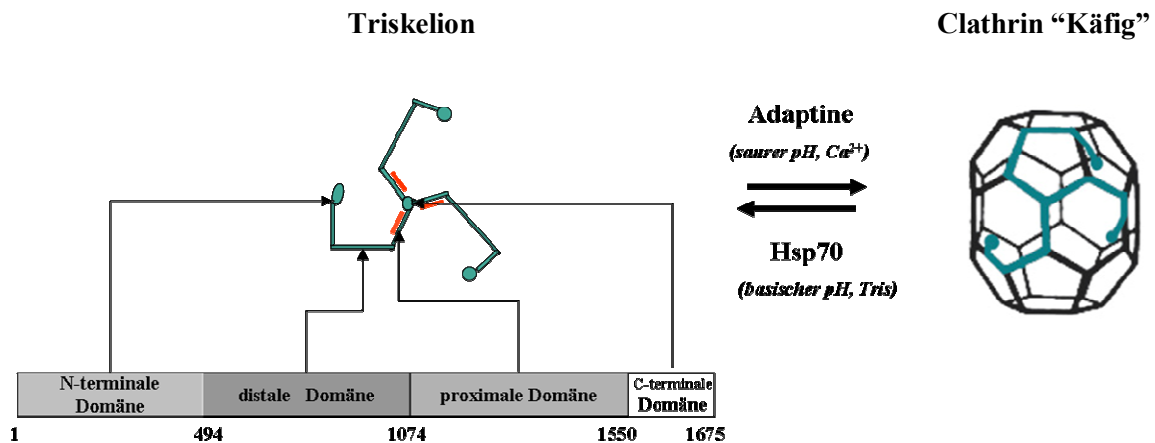


Abbildung 3 : Schematische Darstellung von Clathrin als Triskelion und der daraus gebildeten Clathrin Käfigstruktur. Der strukturelle Status von Clathrin (Triskelion oder Käfig) wird *in vivo* durch Adaptine bzw. Hsp70 reguliert (*In vitro* kann dies durch pH-Wert Änderung und Zugabe von Ca²⁺ und Tris simuliert werden). Clathrin wird aus 3 leichten Clathrin-Ketten (rot) und 3 schweren Clathrin-Kette (schwarz/türkis) gebildet. Der Domänenaufbau der schweren Clathrin-Kette ist unter der Triskelion-Form des Clathrin dargestellt. Die Nummerierung entspricht den Aminosäuren, die die Motive begrenzen.

Die Clathrin-vermittelte Vesikelbildung ist an mehreren intrazellulären Transportwegen mit unterschiedlichen Donor- und Akzeptormembranen beteiligt [Royle, 2006]. Sie wurde insbesondere bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose, sowie der Abschnürung von Transportvesikeln vom trans Golgi-Netzwerk zu lysosomalen und endosomalen Kompartimenten nachgewiesen.

Neuere Untersuchungen zeigen das CLH neben seiner Funktion beim intrazellulären Transport auch eine Rolle bei der mitotischen Zellteilung besitzt [Royle *et al.*, 2005; Tahara *et al.*, 2007]. In der Mitose ist der Clathrin-vermittelte Transport herabgesetzt [Warren *et al.*, 1993] und CLH kann als Bestandteil der Mitosespindel nachgewiesen werden [Mack & Comton, 2001; Okamoto *et al.*, 2000]. Clathrin scheint wesentlich für die korrekte Zusammenlagerung und Trennung der Chromosomen zu sein [Royle *et al.*, 2005].

1.2.4. GAPDH

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12) ist ein ubiquitär verbreitetes Enzym der Glykolyse [Sirover, 1997]. Das Homotetramer der GAPDH katalysiert die oxidative Phosphorylierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Dabei kommt es zur Hydridübertragung auf das Coenzym NAD⁺. Ein GAPDH-Monomer besteht aus zwei Domänen mit unterschiedlichen spezifischen Funktionen: Die Aminosäuren von Position 1 bis Position 149 sind hauptsächlich an der Nukleotidbindung beteiligt, während die Aminosäuren ab Position 150 bis Position 334 die Substratbindung und die Katalyse vermitteln [Nagradova, 2001].

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass GAPDH neben der generellen Funktion in der Glykolyse auch an vielen weiteren zellulären Prozessen beteiligt ist [Sirover, 1999; Chuang *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2006; Hara & Snyder, 2006]. Mit der Änderung der Funktion ist oft ein Wechsel der subzellulären Lokalisierung vom Cytoplasma in den Kern oder an die Zellmembran verbunden [Mazzola & Sirover, 2002]. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass membranassoziierte GAPDH die Fusion von Membranen vermittelt und eine Lokalisation von GAPDH im Zellkern mit sehr unterschiedlichsten Funktionen verbunden werden kann [Morero *et al.*, 1985; Sirover, 2005]. Beispielsweise wurde für diese Dehydrogenase eine Uracil-DNA-Glycosylase-Aktivität, die an der Reparatur von DNA beteiligt ist, nachgewiesen [Meyer-Siegler *et al.*, 2001; Vollberg *et al.*, 1989]. Weiterhin interagiert GAPDH mit spezifischen Ribonukleinsäuren und ist am Export von mRNA und tRNA aus dem Zellkern beteiligt [Schultz *et al.*, 1996; Singh & Green, 1993].

Im Fokus der aktuellen GAPDH Untersuchungen steht die Interaktion mit dem β -Amyloid precursor protein (β APP) bzw. dem Huntingtin-Protein und die Möglichkeit einer Funktion bei neurodegenerativen Erkrankungen [Schulze *et al.*, 1993; Burke *et al.*, 1996].

1.9. Ziele der Arbeit

FKBP36 ist eine von sieben humanen PPIasen mit TPR-Domäne, über die in der Literatur bisher nur genetische und immunhistochemische Untersuchungen beschrieben sind. Damit ist FKBP36 als einzige PPIase mit TPR-Domäne nicht näher proteinbiochemisch untersucht. Als erstes Ziel dieser Arbeit sollte die proteinchemische Charakterisierung dieses Proteins erfolgen. Grundlage hierfür sollte die Etablierung eines FKBP36-Expressionssystems und die Präparation von funktionellem Protein sein.

Mit Hilfe von FKBP36-defizienten Mäusen wurde eine Beteiligung des Proteins bei der Paarung homologer Chromosomen in der Meiose gezeigt [Crackower *et al.*, 2003]. Diese Funktion von FKBP36 bedingt eine Expression des Proteins in Hoden und eine Lokalisation im Zellkern. Um eine Expression des Proteins in weiteren Geweben von Säugern bzw. eine Lokalisation in anderen Kompartimenten von Hodenzellen zu untersuchen und damit Rückschlüsse auf weitere Funktionen des Proteins zu gewinnen, sollte ein Antiserum hergestellt werden, das die spezifische Detektion von FKBP36 ermöglicht.

Die physiologische Bedeutung von PPIasen mit TPR-Domäne ist häufig mit Proteininteraktionen in Hsp90-enthaltenden Multiproteinkomplexen verbunden. Obwohl sich die zellulären Funktionen der PPIasen mit TPR-Domänen deutlich unterscheiden, ist der Aufbau der gebildeten Multiproteinkomplexe sehr ähnlich. Deshalb sollten für FKBP36 Wechselwirkungspartner in Hodenzellen aus Nagern identifiziert werden. Durch Eingrenzen der an den Interaktionen beteiligten Proteinbereiche sollten erste Einblicke in den Aufbau der von FKBP36 gebildeten Komplexe gewonnen werden, und mit bisher erforschten Multiproteinkomplexen, an denen PPIasen mit TPR-Domäne beteiligt sind, verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

Alle Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad *pro analysis* und wurden, sofern nicht anders angegeben von den Firmen Sigma (München), Serva (Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller /Vertrieb
Agar	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Antibiotika	Roche Diagnostics (Mannheim)
ATP	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Complete [®] EDTA frei	Roche Diagnostics (Mannheim)
dNTP Mix	peqlab (Erlangen)
FK506	Fujisawa (München)
Hefeextrakt Select 150	Invitrogen (Karlsruhe)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
Milbona Milchpulver	Lidl UK (London, GB)
Nitrozellulosemembran	Pall Gelman (Dreieich)
Pepton Select 150	Invitrogen (Karlsruhe)
Sterilfilter 0,2 µM	Schleicher + Schüll (Dassel)
Sterilfilter 70 µM	Invitrogen (Karlsruhe)
VivaSpin (6 kDa Membran)	Sartorius (Göttingen)

Enzyme	Hersteller /Vertrieb
Chymotrypsin	Merck Eurolab (Darmstadt)
GAPDH aus Kaninchen	Sigma (München)
Pfu DNA Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Pfx DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt)
Tag DNA Polymerase	peqlab (Erlangen)
Thrombin	Sigma (München)
Trypsin	Invitrogen (Karlsruhe)

Antikörper	Hersteller /Vertrieb
Anti-AP2	Sigma (München)
Anti-CLH	BD Biosciences (San Jose, USA)
Anti-FKBP36	pab Productions (Hebertshausen)
Anti-GAPDH	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-GST	Sigma (München)
Anti-His ₆	Qiagen (Hilden)
Anti-Histon	New England Biolabs (Frankfurt)

Antikörper	Hersteller /Vertrieb
Anti-Hsp90	SANTA CRUZ Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Anti-IgG Kaninchen FITC Konjugat	Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, USA)
Anti-IgG Kaninchen HRP Konjugat	Sigma (München)
Anti-IgG Kaninchen Rhodamin Konjugat	Rockland Immunochemicals(Gilbertsville, USA)
Anti-IgG Maus FITC Konjugat	Rockland Immunochemicals(Gilbertsville, USA)
Anti-IgG Maus HRP Konjugat	Rockland Immunochemicals(Gilbertsville, USA)
Anti-IgG Maus Rhodamin Konjugat	Sigma (München)

Molekulargewichtsstandards	Hersteller /Vertrieb
100 bp DNA Standard	Qiagen (Hilden)
1 kb DNA Standard	New England Biolabs (Frankfurt)
Proteinstandard (10 kDa)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Proteinstandard (bunt)	peqlab (Erlangen)

Reagenzienzusammenstellungen (<i>Kits</i>)	Hersteller /Vertrieb
<i>QIAquick[®] Gel extraction kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAprep[®] spin miniprep kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAprep[®] spin maxiprep kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>ECL[®] Western blotting analysis system</i>	Amersham Pharmacia (Freiburg)
<i>Quick Change Site Directed Mutagenesis[®]</i>	Stratagene (La Jolla, CA)
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce (Rockford, USA)
<i>Perfectly Blunt cloning kit[®]</i>	Novagen (Madison, USA)
<i>High Pure[®] PCR product purification</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)

Plasmide	Bezugsquelle
pSTBlue-1	Novagen (Madison, USA)
pET28a	Novagen (Madison, USA)
pGEX-4T-1	Amersham Pharmacia (Freiburg)
pcDNA3.1+	Invitrogen (Karlsruhe)
pMS-Hsp72	Markus Liebscher (MPI, Halle)
pET-Hsp72	Markus Liebscher (MPI, Halle)

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
DH5 α	<i>supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi relA1</i>	Novagen (Madison, USA)
BL21 (DE3)	<i>hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	Stratagene (La Jolla, CA)
BL21 (DE3) Codon plus RIL	<i>F-ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^f gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>	Stratagene (La Jolla, CA)
BL21 (DE3) Codon plus RP	<i>F-ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^f gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r]</i>	Stratagene (La Jolla, CA)
Rosetta (DE3)	<i>F- ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR)</i>	Novagen (Madison, USA)
MC4100	<i>F- araD139Δ(argF-lac)U169 rspL150 relA1 flbB5301 fruA25 deoC1 ptsF25 ΔDnaK52::cat sidB1</i>	Markus Liebscher (MPI, Halle)

Primer	Sequenz
FKBP36 Bam3'	GATTGGATCCCAACTTTCTCCTGCTGTAGAACC
FKBP36 Eco 5'	GATCGAATTCGGCAGCTAGGACATGGG
FKBP36 Eco36 5'	GATCGAATTCCTCCGGAGTCCTCATGG
FKBP36M94W 5'	CATTGTGGGGCTGGGAGCTGGGCCTTCTG
FKBP36M94W 3'	CAGAAGGCCAGCTCCAGCCCCACAATG
FKBP36 R81F 5'	CTTTAGGAAAACCTCTTTCTAATGAACTTGGAG
FKBP36 R81F 3'	CTCCAAGTTTCATTAGGAAAGGAGTTTTCCTAAAG
FKBP36 R81L 5'	CTTTAGGAAAACCTCTGCTAATGAACTTGGAG
FKBP36 R81L 3'	CTCCAAGTTTCATTAGCAGAGGAGTTTTCCTAAAG
FKBP36strep Eco 5'	GTAGGAATTCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAA TGGGGGGAAGC
FKBP36 Xho 3'	GACTCTCGAGTCAACTTTCTCCTGCTGTAGAAC
FKBP36 Xho298Stop 3'	CAACCCTTCAATCATGACATCAATAATGAGCTG
FKBP36 Xho286Stop 3'	GAACGAATTCATGGCACCCCTGAAGAG
His Kpn 5'	GATCGGTACCATGGGCAGCAGCCATCA
Hsc70C10 Eco 5'	GATCGAATTCATGCTTGGAGTCCTATGCCTTC
Hsc70C10 Xho 3'	GATCCTCGAGTTAATCAACCTCTTCAATGGTG
Hsp70LC10 Eco 5'	GATCGAATTCATGCTGGAGTCCTATACCTAC
Hsp70LC10 Xho 3'	GAGCCTCGAGTTAATCTACTTCTTCAATTGTGG
Hsp71C10 Eco 5'	GATCGAATTCATGCTGGAGTCCTACGCC
Hsp71C10 Xho 3'	GATCCTCGAGCTAATCCACCTCCTCAATG
Hsp72C10 Eco 5'	GCTCGAATTCATGCTGGAGTCCTATAC
Hsp72C10 Xho 3'	CTAGCTCGAGTTAGTCCACTTCTTCGATGG
Hsp90C90 Eco 5'	GATCGAATTCATGGCAGCAAAGAAACACCTG
Hsp90C90 Xho 3'	CTAGCTCGAGTTAGTCTACTTCTTCCATGCG

Konstrukt	verwendete Primer	Vektor
FKBP36	FKBP36 Eco 5' FKBP36 Xho 3'	pET28a
His ₆ -FKBP36	FKBP36 Eco 5' FKBP36 Xho 3'	pET28a
His ₆ -FKBP36R81L	FKBP36 R81L 5' FKBP36 R81L 3'	pET28a
His ₆ -FKBP36 ¹⁻¹⁴⁵	FKBP36 Eco 5' FKBP36 Xho145Stop 3'	pET28a
His ₆ -FKBP36 ³⁶⁻³²⁷	FKBP36 Eco36 5' FKBP36 Xho 3'	pET28a
His ₆ -FKBP36 ¹⁴⁵⁻³²⁷	FKBP36 Eco145 5' FKBP36 Xho 3'	pET28a
Strep-FKBP36	FKBP36strep Eco 5' FKBP36 Xho 3'	pET28a
GST-FKBP36	FKBP36 Eco 5' FKBP36 Xho 3'	pGEX-4T-1
GST-FKBP36R81L	FKBP36 R81L 5' FKBP36 R81L 3'	pGEX-4T-1
GST-FKBP36 ¹⁻¹⁴⁵	FKBP36 Eco 5' FKBP36 Xho145Stop 3'	pGEX-4T-1

Konstrukt	verwendete Primer	Vektor
GST-FKBP36 ¹⁻²⁸⁶	FKBP36 Eco 5' FKBP36 Xho286Stop 3'	pGEX-4T-1
GST-FKBP36 ¹⁻²⁹⁸	FKBP36 Eco 5' FKBP36 Xho298Stop 3'	pGEX-4T-1
GST-FKBP36 ³⁶⁻³²⁷	FKBP36 Eco36 5' FKBP36 Xho 3'	pGEX-4T-1
GST-FKBP36 ¹⁴⁵⁻³²⁷	FKBP36 Eco145 5' FKBP36 Xho 3'	pGEX-4T-1
FKBP36pcDNA	His Kpn 5' FKBP36 Bam3'	pcDNA3.1
His ₆ -Hsp90 ⁶²⁷⁻⁷³¹	Hsp90C90 Eco 5' Hsp90C90 Xho 3'	pET28a
His ₆ -Hsp72 ⁵⁴⁵⁻⁶³⁹	Hsp72C10 Eco 5' Hsp72C10 Xho 3'	pET28a
His ₆ -Hsp70c ⁵⁴²⁻⁶⁴⁶	Hsc70C10 Eco 5' Hsc70C10 Xho 3'	pET28a
His ₆ -Hsp71 ⁵⁴²⁻⁶⁵⁰	Hsp71C10 Eco 5' Hsp71C10 Xho 3'	pET28a
His ₆ -Hsp70L ⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹	Hsp70LC10 Eco 5' Hsp70LC10 Xho 3'	pET28a
GST-Hsp90 ⁶²⁷⁻⁷³¹	Hsp90C90 Eco 5' Hsp90C90 Xho 3'	pGEX-4T-1
GST-Hsp72 ⁵⁴⁵⁻⁶³⁹	Hsp72C10 Eco 5' Hsp72C10 Xho 3'	pGEX-4T-1

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Ampicilin (Stammlsg.)	100 mg/ml Ampicilin in H ₂ O
Äquilibrierungspuffer A	6 M Harnstoff, 2 % SDS, 30 % Glycerin, 20 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH 8,8
Äquilibrierungspuffer B	6 M Harnstoff, 2 % SDS, 30 % Glycerin, 0,135 M Iodacetamid, 50 mM Tris-HCl pH 8,8
B-PBS	1% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Tween in PBS
Chloramphenicol (Stammlsg.)	34 mg/ml Chloramphenicol in EtOH
Coomassie-Entfärber	45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,2% (w/v) Coomassie R250, 0,05% (w/v) Coomassie G250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30%(v/v) Methanol, 17,5% (v/v) Ethanol
Homogenisationspuffer (HP)	100 mM Mes pH6,6, 1mM EGTA, 5 mM MgCl ₂ , 2 µg/ml Pepstatin, 2 µg/ml Leupetin, 1mM PMSF
IPTG (Stammlsg.)	1 M IPTG in H ₂ O
Kanamycin (Stammlsg.)	25 mg/ml Kanamycin in H ₂ O
LB-Agar	15 g/l Agar in LB
Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
Lysis-Puffer	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM Mg ₂ Cl, 1mM EDTA, 0,5 % (v/v) NP40, 2 µg/ml Pepstatin, 2 µg/ml Leupetin, 1mM PMSF
P1	10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris·Cl, pH 8.0;

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
P2	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)
P3	3.0 M $\text{KaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, pH 5.5
PBS	0,01 mM K_2HPO_4 , 1,84 mM KH_2PO_4 , 3,36 mM KCl, 170 mM NaCl pH7,5
Probenpuffer (PP)	1 mM SDS 4 % Glycerin, 0,01% Mercaptoethanol, 0,1 mM Bromphenolblau in Sammelgelpuffer
Rehydratisierungslösung	8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 0,5 % Pharmalyte, 10 mM DTT, 12 $\mu\text{l}/1\text{ ml}$ Puffer DeStreak-Reagent (GE-Healthcare), 0,03 % Bromphenolblau
Saccharose-Ficoll-Dichtemedium	12,5 % w/v Saccharose, 12,5 % w/v Ficoll 400 in Homogenisationspuffer
Sammelgelpuffer	1,25 M Tris pH 6,8
TBT	5 mM Tris, 15 mM NaCl, 0,02% Tween
Tetracyclin (Stammlsg.)	5 mg/ml in Tetracyclin EtOH
Transferpuffer	25 mM Tris, 150 Glycine pH 8,3
Trenngelpuffer	1,8 M Tris pH 8,8
Trypsin/EDTA	0,5g Trypsin , 0,2 g EDTA ad 1l PBS
Waschpuffer I	20 mM Tris pH 7,5, 0,5M NaCl, 50 mM Imidazol

Gerät/Zubehör	Bezugsquelle
Äkta FPLC	AmershamPharmacia (Freiburg)
CD-Spektrophotometer Jasco J710	Jasco (Gross-Umstadt)
Chromatographiesystem	AmershamPharmacia (Freiburg)
Diodenarray Spektrophotometer HP8453	Hewlett Packard (Böblingen)
Elektrophorese- und Blot-Apparatur	Biometra
FluoroMax-2	<i>ISA Instrument, S.A., Inc., München</i>
Fractogel EMD-DEAE-650(M)	Merck Eurolab (Darmstadt)
Fractogel EMD-SO ₃ ⁻ -650(M)	Merck Eurolab (Darmstadt)
Fractogel EMD-Propyl-650(M)	Merck Eurolab (Darmstadt)
French® Press SLM	Aminco (Rochester, USA)
GSH Sepharose	Sigma (München)
GSH Sepharose FF	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Heraeus Biofuge Stratos	Zentrifuge Kendro (Hanau)
HiLoad Superdex 75 HR 16/60	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Hydroxyapatit	Bio-Rad (München)
Mikroskop-System "ECLIPSE TE2000"	Nikon (Tokyo, Japan)
NiNTA His <i>Bind Resin</i>	Qiagen (Hilden)
Optima® LE-80 K	Ultrazentrifuge Beckman Coulter (Krefeld)
Sorvall M120GX	Ultrazentrifuge Kendro
Sorvall RC5B+	Zentrifuge Kendro
Trio-Thermocycler	Biometra
Ultra-Turrax	IKA Werke (Staufen)

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von *E.coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte, falls nicht anders vermerkt in LB-Medium bei 37°C im Inkubationsschüttler (220 rpm). Die benötigten Antibiotika wurden dem Medium in der gewünschten Konzentration zugegeben. Für die Selektion und kurzfristige Lagerung wurden LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen verwendet.

Glyzerinkulturen: Für die Langzeitlagerung wurden Bakterienstammkulturen in Form von Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 700 µl einer *E.coli* Übernachtskultur mit 300 µl Glycerin (50 % (v/v)) versetzt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Kultivierung für die rekombinante Expression: Zur Erzeugung rekombinanter Proteine in *E.coli* wurden je 1 Liter LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika mit 40 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD von 0,5-0,7 inkubiert. Nach Induktion mit 1mM IPTG wurde die Inkubation bei optimaler Expressions-Temperatur 4h fortgesetzt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (3.000 x g, 10 min., 4°C) und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2. Herstellen kompetenter Zellen für die Transformation

Um die Effizienz der DNA-Aufnahme von *E.coli* Zellen zu erhöhen wurden diese mit Calciumchlorid kompetent gemacht. Dies erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan [1983].

2.2.1.3. Transformation von *E.coli*

Ein 50 µl Aliquot chemisch kompetenter Zellen wurde mit 0,1 µg – 20 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl des Ligationsproduktes für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzschock (30 s bei 45°C) erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis (2min.). Der Transformationsansatz wurde mit 300µl LB-Medium 45 min. bei 37°C geschüttelt und auf selektiven Agarplatten ausplattiert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus 5ml *E.coli* Übernachtskulturen wurde das *QIAGEN Plasmid-Mini Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Für pET28a und pcDNA3.1 Konstrukte wurden 3 ml Übernachtskultur für alle anderen Plasmide die gesamte Übernachtskultur verwendet.

2.2.2.2. Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus 0,5 Liter *E.coli* Kulturen wurde das *QIAGEN Plasmid-Mini Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für die Reinigung von pcDNA3.1 Konstrukten im größeren Maßstab wurde das Pellet einer 0,5 L *E.coli*-Kultur in 50ml

Zur Reinigung der DNA wurde der Überstand entweder nach Hersteller Angaben auf eine Einweg-Anionenaustauschersäule(Qiagen-tip 500, Qiagen) gegeben, gewaschen und eluiert oder einer Phenol-Chloroform Extraktion unterzogen

2.2.2.3. Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung

Phenol-Chloroform-Extraktion wurde bei allen DNA-Präparationen außer der Plasmidisolation mit dem QIAfilter Plasmid Mini/Maxi Kit eingesetzt, um Proteine und andere organische Komponenten aus der Lösung zu entfernen. Die Extraktion erfolgte durch einmaliges Ausschütteln der DNA-Lösung mit dem gleichen Volumenanteil einer TE-gesättigten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 25:24:1. Nach Durchmischung und Zentrifugation (5 min., 11.000 x g) wurde die wässrige Phase abgenommen und durch alkoholische Fällung von Phenolresten befreit. Hierzu wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat pH 5,3 und 3 Vol 98 %-igem Ethanol mindestens 30 min bei -20° C gefällt und anschließend 30 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Ethanol bei 37° C kurz abgedampft. Die DNA wurde in sterilem bidestilliertem Wasser (50° C) resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

2.2.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, mit der schnell und gezielt ein DNA-Fragment (Template) über einen Bereich, der von zwei dem Template komplementären Oligonukleotiden

(*Primer*) eingegrenzt wird zu amplifizieren. Durch den Einsatz entsprechender Primer können Schnittstellen und Nukleotidaustausche in das PCR-Produkt eingeführt werden [Mullis & Faloona, 1987]. Die Reaktion wurde in sterilen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. In einer 50 µl-Reaktionen wurden 10-100 ng Plasmid-DNA oder 2 µl einer Reversen-Transkriptionsreaktion als Template, 50 pmol der entsprechenden Primer und 10 pmol eines dNTP-Mixes eingesetzt. Die Zugabe des mit der Polymerase gelieferten Puffers erfolgte nach Herstellerangaben. Je nach Länge und GC-Gehalt der zu amplifizierenden DNA wurde 1-2 U von *Taq*-, *Deep Vent*-, *Pfx*- oder *Phusion*-Polymerase verwendet.

Für die Reaktion wurde folgendes Programm verwendet:

- 1) 4 min 95°C Denaturierung der *Template*-DNA
- 2) 45 s 95°C Denaturierung der *Template*-DNA
- 3) 1 min 50°C - 58°C Binden der PCR-Primer an die *Template*-DNA (*Annealing*)
- 4) 0,5 – 4min 72°C Polymerasereaktion (*Elongation*)
- 5) 5 min 72°C Vervollständigung der letzten Reaktion

Die Programmschritte 2) – 4) wurden bei jeder PCR in 20-35 Zyklen durchlaufen. Das Binden der PCR-Primer an die *Template*-DNA ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Die Temperatur des *Annealings* und die *Elongationszeit* wurden für die einzelnen PCR-Reaktionen angepasst. Das Ergebnis der PCR-Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.2.5. PCR-Reinigung

Um DNA aus den Ansätzen von PCR-Reaktionen, Restriktionsspaltungen sowie Dephosphorylierungen zu reinigen, wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* angewendet.

2.2.2.6. Elution von DNA aus Agarosegel

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken wurde anhand des *QIAquick Minielute Gel Extraction Kits* nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.7. Enzymatische Modifikation von DNA

Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen: Für den Gebrauch der Restriktionsendonukleasen wurden die Empfehlungen des Herstellers beachtet. Der Entsprechende 1 × Reaktionspuffer und 0,5 – 10 µg DNA wurden mit 1 – 5 U Restriktionsendonuklease für zwei Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert und der Reaktionsansatz anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Ligation von DNA Fragmenten: Etwa 50 – 200 ng des zu verknüpfenden DNA Fragments wurden mit 5- bis 10-fachem Überschuss Vektor-DNA gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 × Ligationspuffer wurde der Ansatz mit 1U *T4* DNA-Ligase versetzt und 15 min bei 20°C inkubiert. Ein Teil dieses Reaktionsansatzes wurde für die folgende Transformation eingesetzt.

2.2.3. Präparative Methoden

2.2.3.1. *E.coli* Zellaufschluss für die Proteinreinigung

Das Zellpellet geernteter Überexpressionskulturen wurde in Puffer des ersten Chromatographieschrittes suspendiert. Durch dreimaliges Passieren einer French® Press mit 10.000 psi wurden die Zellen aufgeschlossen. Zelltrümmer und lösliche Fraktion wurden in einem Zentrifugationsschritt (100.000 × g, 45 min, 4°C) separiert. Die lösliche Fraktion (Überstand) wurde für die Chromatographie eingesetzt.

2.2.3.2. Proteinreinigung

Nach der Herstellung der löslichen Fraktion von *E. coli* Überexpressionskulturen wurde das rekombinant erzeugte Protein durch eine Kombination verschiedener Chromatographieprinzipien gereinigt.

Ionenaustauschchromatographie: Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der Wechselwirkung von geladenen Proteinseitenketten mit Gegenionen, die an das Chromatographiematerial gebunden sind. Für die Proteinreinigung wurden Fractogel EMD-DEAE-650(M) und Fractogel EMD-SO³⁻-650(M) genutzt. Die Elution erfolgte mit steigenden Salzkonzentrationen im Elutionspuffer.

Hydroxyapatitchromatographie: Die Hydroxyapatitchromatographie ist eine spezielle Form der Ionenaustauschchromatographie. Hierbei werden Wechselwirkungen zwischen positiven Ladungen der Proteinseitenketten mit Phosphationen des Säulenmaterials sowie die Komplexbildung von Carboxylgruppen des Proteins mit Calciumionen des Hydroxyapatites genutzt. Das Säulenmaterial wurde mit 20 mM Tris, 150mM NaCl pH 7,5, equilibriert. Nach Aufbringen der Probe wurde mit Equilibrierungspuffer und mit 20 mM Hepes 20 mM Na₂HPO₄ pH 7,5 gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem steigenden Phosphatgradienten.

Hydrophobe Interaktionschromatographie: Die hydrophobe Interaktionschromatographie beruht auf der Wechselwirkung hydrophober Proteinbereiche mit hydrophobem Chromatographiematerial. Für

die Reinigung wurde Fractogel EMD-Propyl Material eingesetzt. Der Proteinprobe wurden 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (maximaler Sättigung) zugesetzt und die Chromatographiesäule wurde vor der Chromatographie mit 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ equilibriert. Die Elution erfolgte mit einem fallenden (25% - 0%) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten.

Affinitätschromatographie: Die Affinitätschromatographie beinhaltet alle Trennprinzipien, die auf der spezifischen Bindung von Proteinen an kovalent fixierten Liganden beruhen. Für die Reinigung der verschiedenen Proteine wurde die Metallchelatchromatographie (*NiNTA His Bind Resin*) und Substrat-Affinitätschromatographie (GSH-Sepharose FF, ATP-Sepharose) genutzt. Die Elution erfolgte durch verschiedene Zusätze in Puffer. His₆-fusionierte Proteine wurden nach Waschen mit 5 Säulenvolumen WaschpufferI im steigenden Imidazolgradienten von NiNTA-Material eluiert. Die Säule für die GSH-Affinitätschromatographie wurde nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Elution von der GSH-Sepharose erfolgte mit 15 mM reduziertem GSH. Die Nutzung der ATP-Sepharose erfolgte nach Welch & Feramisco [1985].

Präparative Gelfiltration: Durch Gelfiltration werden Proteine aufgrund eines unterschiedlichen hydrodynamischen Volumens getrennt. Je kleiner das hydrodynamische Volumen eines Proteins ist, desto langsamer passiert es die Säule. Für die präparative Gelfiltration wurden Proteinproben (2 ml) auf einer HiLoad Superdex 75 HR 16/60 aufgetrennt.

2.2.3.3. Dialyse und Proteinkonzentrierung

Um Proteine in einen anderen Puffer zu überführen, wurden sie dialysiert. Die Dialyse zwischen zwei Reinigungsschritten erfolgte für $2 \times 3\text{h}$ gegen 5 l Puffer. Kleine Volumina homogener Proteine wurden in 1 ml Dialysezellen für $2 \times 3\text{h}$ gegen 500 ml Puffer dialysiert.

Um die Konzentration von Proteinlösungen zu erhöhen, wurden sie in *VivaSpin* Konzentratoren mit 6 kDa Ausschlussvolumen zentrifugiert ($6.000 \times g$, 10°C).

2.2.3.4. Herstellung und Fraktionierung von Zell und Gewebeextrakten

Die im Folgenden beschriebenen Präparationen wurden falls nicht anders vermerkt bei 4°C mit eiskalten Lösungen durchgeführt.

Herstellung von Gesamtllysaten aus Zellen: Mit einem Zellschaber oder mit Trypsin/EDTA (37°C) wurden die Zellen von den Kulturschalen gelöst und in Zellkulturmedium sedimentiert ($400 \times g$, 10 min.). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal in PBS gewaschen. Das Pelletvolumen wurde geschätzt und mit dem 3 bis 5-fachen Volumen an Lysispuffer versetzt. Nach zehn minütiger Inkubation wurden die Zellen mit einem *Dounce* Homogenisators für kleine Volumina mit 10-15 Stößen aufgeschlossen.

Herstellung von Gesamtzelllysaten aus Organen: Von Hoden wurden die *Tunica albuginea* und Venen entfernt. Die anderen Organe blieben vollständig. Das gefrorene Material wurde mit dem Skalpell in ca. 25 mm³ Stücke zerkleinert und gewogen. Je g Gewebe wurden 10 ml Lysispuffer zugegeben. (Sollten im Anschluss Clathrin-bedeckte Vesikel gewonnen werden, wurde Homogenisationspuffer verwendet.) Die Suspension wurde 30 Sekunden auf höchster Stufe gevortext und für 10 min. auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss. Für Volumina bis 20 ml erfolgte dieser mit Hilfe eines *Dounce* Homogenisators (mit 10-15 Stößen), bei größeren Volumina mit einem Ultra Turrax (5 x 30 sec). Der erste Zellaufschluss passierte einen 70 µM Filter und wurde anschließend unter dem Mikroskop kontrolliert. Falls notwendig erfolgte ein zweiter Aufschluss.

Präparation von Zellkernen nach Blobel und Potter [1966]: Ein Volumen Gesamtzellaufschluss wurde 10 min 800 x g sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde mit Hilfe eines *Dounce* Homogenisators (bei kleinen Volumina mit einer Pipette) in zwei Volumen NIM resuspendiert und 10 min bei 800 x g zentrifugiert. Die Resuspension und Zentrifugation wurden einmal wiederholt. Das erhaltene Pellet (Rohkernextrakt) wurde in 0,5 Ausgangsvolumen NIM resuspendiert und mit einem Volumen SDB versetzt und homogenisiert. In Ultrazentrifugationsröhrchen wurden auf 5 ml (bzw. 175 µl) SDB je 9 ml (bzw. 325 µl) des Rohkernextraktes geschichtet. Die Zellkerne wurden 1h bei 100.000 x g durch die Saccharosebarriere sedimentiert.

Präparation von Cytosol: Der Gesamtzellaufschluss wurde 1h bei 100 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Cytosol in Experimenten eingesetzt.

Präparation von Cytoplasma für Präzipitationsexperimente: Nach Zentrifugation (30 min, 17.000 x g) des Gesamtgewebelysats wurde die Proteinkonzentration des Überstands bestimmt und mit Lysispuffer auf 25 mg/ml eingestellt. In dest. Wasser gequollene GSH-Sepharose wurde 3 x mit 2 Volumen Lysispuffer gewaschen und mit Gewebelysat 30 min. schüttelnd inkubiert. 100 µl der Sepharose wurden verwendet um 4 ml des Gewebelysates affine vorzureinigen. Anschließend wurde die Sepharose 3 min. bei 1000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde filtriert (70 µM) und in Bindeexperimenten verwendet.

Präparation von Clathrin-bedeckter Vesikeln: Zur Stabilisierung der Clathrin-bedeckte Vesikel wurde Gewebe in Homogenisationspuffer aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (17.000 x g, 20 min) des Gesamtzelllysates wurde der Überstand erneut sedimentiert (76.000 x g, 60 min). Die Sedimente aus dieser Zentrifugation (Gesamtmembranen) wurden mit jeweils 5 ml Mes-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Glasstabes vom Boden der Zentrifugenröhrchen gelöst (ca. 20 ml Gesamtvolumen). Die gelösten Sedimente wurden in einem *Dounce*-Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde mit gleichem Volumen Saccharose-Ficoll-Dichtemedium

vermischt und 20 Minuten bei 40.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde äußerst vorsichtig abgenommen, mit vier Volumen Homogenisationspuffer verdünnt und sedimentiert (100.000 x g, 60 min.). Anschließend wurden die Sedimente mit jeweils einem ml Homogenisationspuffer vom Boden gelöst (ca. 6 ml Gesamtvolumen) und in einem Dounce-Glashomogenisator homogenisiert. Je 2 ml des Homogenats wurden auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradient. (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%) gelegt und sedimentiert (100.000 x g, 45 min.). Die Fraktionen des Saccharosegradienten wurden von 10 % bis 40% vereinigt und mit Homogenisationspuffer verdünnt und sedimentiert (100.000 x g). Das Präzipitat wurde in 1 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und wurde in folgenden Experimenten als gereinigte Clathrin-bedeckte Vesikel eingesetzt.

Extraktion von Proteinen aus der mikrosomalen Fraktion: Zur Entfernung von Zelltrümmern, Zellorganellen und Bestandteilen des Cytoskeletts wurden 40 ml (500 µl) Gesamtzellaufschluss zentrifugiert (30 min., 17.000 x g). Anschließend wurde der Überstand einen zweiten Zentrifugationsschritt (1h, 100.000 x g) sedimentiert und das Pellet in HP Puffer gewaschen.

Für die Tris-Extraktion wurde das pelletierte Material in 5 ml (100 µl) 0,5 M Tris pH 8,1 mit einem *Dounce* Homogenisators (Pipette) resuspendiert und für 1 h über Kopf geschüttelt. Anschließend wurde 1h bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt Bestandteile von Clathrin-bedeckten Vesikeln.

Für die Triton[®] X100-Extraktion wurde das pelletierte Material in 5 ml (100 µl) HP mit 2% Triton[®] X100 mit einem *Dounce* Homogenisators (Pipette) resuspendiert. 20 min. bei 25 °C geschüttelt. Durch Zentrifugation (1h, 100.000 x g) wurden die löslich Fraktion und Sediment voneinander getrennt. (1h, 100.000 x g)

2.2.3.5. Präparation von Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie dient als sensitive Methode zum indirekten Nachweis subzellulärer Bestandteile und der Analyse ihrer Lokalisation. Hierfür müssen Zellen auf mikroskopischen Deckgläschen kultiviert werden. Im ersten Schritt werden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Es folgt die Inkubation mit einem Primärantikörper, dessen Antigen ein Epitop des gewünschten Proteins ist. Speziesspezifische Regionen des Primärantikörpers sind Antigene des Sekundärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluorochrom, z.B. Rhodamin kovalent verbunden. Das Präparat kann mit der entsprechenden Filterkombination am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden.

Fixierung: Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und anschließend 20 min. mit 4 % Paraformaldehyd inkubiert, 3 x mit PBS gewaschen und mit 0.1% Triton X-100/PBS (20 min) permeabilisiert und nochmals mit PBS gewaschen.

Immunfärbung und Einbettung: Nach der Fixierung wurden die Zellen für 15 min in B-PBS inkubiert. Anschließend wurde die Primärantikörper-Lösung zugegeben und 1 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Zellen wurden 3 x 10 min. mit B-PBS gewaschen und mit der Sekundärantikörperlösung (DAPI) versetzt (30 min. ,37°C, in feuchter Kammer). Anschließend wurde 3 x 10 min mit B-PBS gewaschen. 5 µl Anti-Ausbleichmedium wurden auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Mit farblosem Nagellack wurde das Deckgläschen versiegelt.

2.2.4. Analytische Methoden

2.2.4.1. SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach der Methode von Laemmli [1970]. Die Proteine wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem gleichen Volumen 2 x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden mittels Coomassie- oder Silberfärbung nachgewiesen [Heukeshoven & Dernick, 1988].

2.2.4.2. 2D-Gelelektrophorese

Rehydratisierung und erste Dimension: Für die 2D-Gelelektrophorese wurden IPG Streifen mit einem pH-Gradienten von 3-10 bzw. von 4-7 (GE-Healthcare) verwendet. Die Streifen wurden ÜN bei RT in 200 µl Rehydratisierungslösung rehydratisiert. In der Rehydratisierungslösung wurde zuvor das Aceton-gefällte Proteingemisch (für Coomassie-Färbungen ca. 50 µg) aufgenommen. Die IPG Streifen wurden mit DryStrip Cover Fluid (GE-Healthcare) bei 20°C auf der MultiphorII (GE-Healthcare) mit folgendem Profil isoelektrisch fokussiert:

1. Gradient 300 V, 30 min;
2. konstant 300 V, 30 min;
3. Gradient 3500 V, 90 min;
4. konstant 3500 V, 90 min

Nach der Fokussierung wurden die Streifen bei -20°C gelagert oder für die SDS-PAGE weiterverwendet.

2. Dimension: Vor der SDS-PAGE wurden die IPG Streifen in 10 ml Äquilibrationpuffer A für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweite Äquilibration für 15 min bei RT in 10 ml Äquilibrationpuffer B. Die Streifen wurden dann auf 10%-ige PA-Gele gelegt und mit 0,5 %-iger Agarose überschichtet. Anschließend wurde eine SDS-PAGE (unter 2.2.4.1.) beschrieben durchgeführt.

2.2.4.3. Western-Blot

Für die Immundetektion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine mit dem *Semi-dry-blotting Verfahren* nach Kyhse-Anderson [1984] auf Nitrozellulose transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blotkammer (Biometra) mit Towbin-Puffer [Towbin *et al.*, 1979] transferiert. Es wurde eine Stromstärke von 2 mA/cm² Nitrozellulose bei variabler Spannung für 60 min angelegt.

2.2.4.4. Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA wurden 1%-ige (w/v) Agarosegele verwendet, denen bei der Herstellung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt, aufgetragen und die DNA mit einer angelegten Spannung von 5 – 10 V/cm getrennt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht und das erhaltene Bild fotografiert.

2.2.4.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung von Proteingemischen erfolgte nach der BCA-Methode [Walker, 1994] mit dem *BCA Protein Assay Kit* nach Hersteller Angaben.

Die Konzentration homogener Proteine wurde spektroskopisch ermittelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm entspricht nach dem Lambert-Beerschen Gesetz einer definierten Konzentration:

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

Formel 1: A_{280} = Absorption bei 280nm; ϵ_{280} = Extinktionskoeffizient bei 280 nm (cm² mol⁻¹); c = Proteinkonzentration (M); d = Schichtdicke der Küvette (cm).

Der Extinktionskoeffizient wurde nach Gill und von Hippel [1989] berechnet.

2.2.4.6. Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit einem GeneQuant II-Spektrophotometer in 10 mm Quarzglasküvetten bestimmt. Eine OD₂₆₀ = 1,0 entspricht 50 µg/ml Doppelstrang-DNA.

2.2.4.7. Präzipitationsexperimente mit GSH-Sepharose und GST-Fusionen

In Experimenten zur Identifizierung von Interaktionspartnern wurden 50 µl GSH Sepharose mit GST-fusioniertem FKBP36 bzw. GST gesättigt (4°C, 1 h). Anschließend wurde die Sepharose 3 x mit PBS gewaschen.

Je 50 µl der beladenen GSH-Sepharose wurden mit 5 ml des vorgereinigten Lysates (2.2.) 4h bei 4°C inkubiert. Nach Sedimentation des Präzipitationsansatz (10 min. auf Eis) wurde der Überstand mit einer Kanüle entfernt und das Sepharose Material 2 x mit 3 Volumen Lysispuffer und 3 x mit PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 µl SDS-Probenpuffer, 5 min bei 95°C. Für die Identifizierung potentieller Interaktionspartner wurden 15 µl der Elution mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Anschließend wurden.

Für Bindestudien mit anschließender SDS-PAGE und Analyse durch Coomassiefärbung bzw. Western-Blot wurden 30 µl GSH-Sepharose mit der gewünschten Menge GST-Fusionsprotein bzw. GST schüttelnd (4°C, 1h) verwendet.

2.2.4.8. CD-Spektroskopie

Zur Messung der optischen Aktivität von Proteinen wurde die Circular dichroismus- (CD) Spektroskopie eingesetzt. Mit einem temperierbaren Jasco J-710 CD Spektrometer wurden Fern-UV CD-Spektren in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) von 195 nm bis 250 nm aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Proteinkonzentration von 0,2 - 0,3 mg/ml in einer 0,1 cm Quarzglasküvette bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Die Proteinspektren wurden pufferkorrigiert und die molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure des jeweiligen Proteins mittels folgender Formel berechnet:

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

Formel 2: $[\Theta]_{MRW}$ = Molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure (deg·cm²·dmol⁻¹), Θ = gemessene Elliptizität (deg), M_w = 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/cm³-Einheiten.

Zur Analyse der thermischen Stabilität wurde die Änderung des CD-Signals über einem Temperaturbereich von 20°C bis 80°C verfolgt bei festgelegten Wellenlängen über die Zeit aufgenommen. Die Heizrate betrug 1°C/Minute und die Proteinkonzentration war 0,25 mg/ml.

2.2.4.9. Fluoreszenzspektroskopie

Aromatische Aminosäuren in Proteinen besitzen aufgrund ihres delokalisierten π -Elektronensystems eine intrinsische Fluoreszenz. Dabei betragen die relativen Empfindlichkeiten von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin 1100:200:8 [Schmid, 1989]. Denaturierung oder andere

Änderungen der Proteinkonformation resultieren oft in einer Veränderung der Hydrophobizität in der unmittelbaren Umgebung der aromatischen Aminosäure, was sich in veränderten Fluoreszenzeigenschaften dieser Aminosäuren äußert [Eftink, 1997]. Bei Tyrosin ändert sich dabei lediglich die Signalintensität, wohingegen sich bei Tryptophan auch das Intensitätsmaximum meist in den langwelligeren Bereich um 350 nm herum verschiebt.

Fluoreszenzspektren wurden in einem FluoroMax2-Spektrofluorometer in 20 mM Tris pH 7,5 aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde bei 280 nm angeregt und das Emissionsspektrums von 300 nm - 450 nm detektiert (Spaltöffnungen für Anregung und Emission: 3 nm, Integrationszeit 0,2 s).

2.2.4.10. PPIase-Aktivitätstests

Proteasegekoppelter Test: Der proteasegekoppelte Test wurde wie beschrieben durchgeführt [Fischer *et al.*, 1984b; Hani *et al.*, 1999]. Die Messungen erfolgten bei 10°C in 35 mM Hepes-Puffer (pH 7,8) mit einem Dioden-Array UV/VIS-Spektrophotometer. Die Stammlösungen der Peptidsubstrate Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA (20 mg/ml) wurden in DMSO hergestellt. Die isomerspezifische Protease Chymotrypsin [Fischer *et al.*, 1984a] wurden in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml eingesetzt.

Proteasefreier Test: Die Messung der PPIase-Aktivitäten im proteasefreien Test erfolgte nach Janowski *et al.* [1997]. Die Substrate Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA wurden in wasserfreien 0,5 M LiCl/Trifluorethanol Lösung gelöst. Die Messungen wurden bei 10°C in 35 mM Hepes-Puffer (pH 7,8) durchgeführt.

2.2.4.11. GAPDH-Aktivitätstest

Es wurde der Enzymtest nach Nakamura *et al.* [1984b] verwendet. Hierbei wird die GAPDH-Reaktion über die Reduktion von NAD^+ zu NADH photometrisch durch die Zunahme der optischen Dichte bei $\lambda = 340$ nm verfolgt. Als Substrate der Vorwärtsreaktion wurden Arsenat und GAP verwendet. Diese werden zu 1-Arseno-3-phosphoglycerat umgesetzt, welches instabil ist und damit zu einer gerichteten Reaktion führt. Die Messungen wurden in 50 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 20 mM Arsenat pH 7,8 bei 20°C durchgeführt. Unter Substratsättigungsbedingungen wurden 1mM NAD und 1mM GAP im Meßansatz verwendet. Die Volumenaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V_{\text{Test}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{Enzym}}}$$

Formel 3: A: Enzymaktivität (U/ml); $\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung bei $\lambda = 340$ nm pro Minute; ε : molarer Extinktions-koeffizient für NADH_2^+ bei 340 nm (ε_{340} : 6300 cm^2/mmol); V_{Test} : Volumen des Testansatzes (ml); V_{Enzym} : Volumen der Enzymlösung (ml); d: Schichtdicke der Küvette (cm)

2.2.4.12. Massenspektrometrische Analyse

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte nach ausschneiden von Proteinspezies aus Coomassiegefärbten SDS-Gelen. Die durch den anschließenden Trypsinverdau erhaltenen Peptide wurden mit einem Q-TOF 2-Massenspektrometer, wie in Gutensohn *et al.* (2004) beschrieben, identifiziert und die erhalten Daten mit dem Programm MASCOT (Matrix Science, London, UK) analysiert. .

3. Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse von FKBP36

Die Aminosäure-Sequenz von FKBP36 wurde mit Hilfe der Programme ScanProsite und SMART auf Domänen und Sequenzmerkmale untersucht. Es wurden jeweils eine FKBP-Domäne und eine TPR-Domäne, die 3 TPR-Motive enthält, identifiziert.

A:

FKBP12	1	----- GV QVETIS PGDGR TF	15
FKBP36	1	GG SAL NQ GV LE GD DAP GS LYERLSQRMLDIS GD R GV LKD VI RE GAG DLV	50
FKBP52	1	-----TAEEMKATESGAQ SAP LPME GV DIS PK QDE GV LK VI KRE GT GTEM	45
FKBP52	147	----- DGI IRRIQ TR GE GY AK	161
* * *			
FKBP12	16	PKR Q TC V VHY T GML ED GK K- FD SS RDRNK PF K FML G KQ E VI R GW EE GVA Q	65
FKBP36	51	AP-DAS VL V KY SG Y LE HMD RP FD SN Y FR KT P RL MK L G ED IT W G MEL GL LS	100
FKBP52	45	PM IGDR VF V VHY T GWL L DGT K- FD SS LDR KD K F S FD L GK GE VI KAW DIA IA I A T	95
FKBP52	162	P NEGA I VE V A L E G Y Y K D KL-- FD --Q RE LR F E I GE G EN L D L P Y G L E R A I Q R	209
* * *			
FKBP12	66	MS V G Q R A K L T I S PD Y A Y G A T G H P G I - IP PH A T L V F D V E L L K L E -----	107
FKBP36	101	M RR G E L A R F L F K P N Y A Y G T L G C P P L- IP P N T T V L F E I E L L D F L D C A E S D K F	150
FKBP52	96	M K V G E V C H I T C K P E Y A Y G S A G S P P K - IP P N A T L V E V E L F E F K G E D L T E E	145
FKBP52	209	M E K G E H S I V Y L K P S Y A F G S V G K E K F Q IP P N A E L K Y E L H L K S F E K A K E S W E M	260

B:

TPR1			
HOP	225	-----AL K E E L G N D A Y K K K D F D T A L K H Y D K A E L D P	256
FKBP36	151	CAL S A E Q Q D Q F L P L Q K V L K V A A T E R E F G N Y L F R Q N R F Y D A K V R Y K R A L L L L R	201
FKBP52	261	-----N S E E K L E Q S T I V K E R G I V F K E G K Y K Q A L L Q Y K K I V S W L E	300
TPR2			
HOP	257	T N -----M T Y I T N Q A A V Y F E K G D Y N K C R E L C E K A I E V G R E N	296
FKBP36	202	RR S A-P P E E Q H L V E A A K L P V L L N L S F T Y L K L D R P T I A L C Y G E Q A L I I D Q K N	251
FKBP52	303	Y E S S F S N E E A Q K A Q A L R L A S H L N L A M C H L K L Q A F S A I E S C N K A E L D S N N	351
TPR3			
HOP	297	A K A Y A R I G N S Y F K E E K Y K D A I H F Y N K S L A E H R T P D V L K K C Q Q A E K I L K E Q E	350
FKBP36	252	A K A L F R C G Q A C L L L L T E Y Q K A R D F L V R A Q K E Q P F N H D I N N E L K L L A S C Y R D Y	302
FKBP52	352	E K G L F R R G E A H L A V N D F E L A R A D F Q K V L Q L Y P N N K A A K T Q L A V C Q R I R R Q	402
HOP	351	RLA-----	353
FKBP36	302	VD K E K E M W H R M F A P C G D G S T A G E S-----	326
FKBP52	402	L A R E K K L Y A N M F E R L A E E E N K A K A E A S S G D H P T D T E M K E E Q S N T A G S Q S Q	453

Abbildung 4: Sequenzvergleich von FKBP12, FKBP52, FKBP36 und Hop A: Innerhalb der FKBP-Domäne sind die mit FKBP12 identischen Reste fett dargestellt. Grau unterlegt sind Aminosäuren die im Zusammenhang mit FK506-Bindung und Katalyse diskutiert werden [Kay, 1996; Van Duyne *et al.*, 1991, Park *et al.*, 1992]. Mit einem Stern sind Aminosäuren markiert, deren Austausch in FKBP12 (Y26F, Y82F; D37L; W59A; F99Y) zu einer Reduzierung (<10% Restaktivität) der Aktivität führt [DeCenzo *et al.*, 1996; Tradler *et al.*, 1997]. **B:** Die TPR-Motive sind eingerahmt. Blaue Aminosäurereste Kennzeichnen das TPR-Konsensus-Motiv. Aminosäuren die in Hop und FKBP52 an der Hsp90-Bindung beteiligt sind, wurden dunkelrau unterlegt [Scheufler *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004].

Die FKBP-Domäne umfasst die Aminosäuren Gly36-Leu142. Sie besitzt 35% Sequenzidentität mit dem prototypischen FKBP12 (61 % ähnliche Aminosäuren). Acht der 14 Aminosäurereste, die im Zusammenhang mit Katalyse und FK506-Binding diskutiert werden sind identisch, zwei weitere sind homolog ausgetauscht. [Kay, 1996]. Von fünf Resten (Tyr26, Asp37, Trp59, Tyr82, Phe99) deren Austausch in FKBP12 zu einer Reduktion der Restaktivität (<10%) führt [DeCenzo *et al.*, 1996; Tradler *et al.*, 1997], sind 4 identisch, nur die korrespondierende Aminosäure von Trp59 in FKBP12 ist in FKBP36 zu Methionin ausgetauscht.

Um einen Anhaltspunkt über die Auswirkungen der Aminosäureaustausche auf die Struktur insbesondere des aktiven Zentrums dieser FKBP-Domäne zu erhalten, wurde ein dreidimensionales Modell der FKBP-Domäne von FKBP36 erstellt. Die Modellierung erfolgte mit Hilfe des Programms 3D-PSSM [Kelly, *et al.*, 2000], unter der Annahme dass die Aminosäuren Gly36-Leu142 von FKBP36 eine zu FKBP12 homologe Struktur ausbilden. Als Grundlage dienten die Koordinaten der Röntgenkristallstruktur von FKBP12 komplexiert mit FK506 in einer 1,7 Å Auflösung (RCSB-Datenbank: 1FKJ). Die erhaltenen Strukturen sind in Abbildung 4 dargestellt. Das Strukturmodell von FKBP36 gleicht der Röntgenkristallstruktur von FKBP12 (Abbildung 5: A, B). Das für viele FKBP charakteristische β -Faltblatt wird durch eine α -Helix stabilisiert [Michnick *et al.*, 1991; Van Duyne *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1995]. Im Modell von FKBP36 ist die α -Helix um eine Windung verkürzt. Die fehlende Windung ist durch eine entsprechende Spiralförmigkeit eines unstrukturierten Bereichs angedeutet.

Eine Überlagerung des Strukturmodells der FKBP-Domäne von FKBP36 mit der FKBP12-Struktur (Abbildung 5C) stellt Aminosäuren dar, die an der Katalyse und Komplexierung von FK506 in FKBP12 beteiligt sind, sowie die entsprechenden Aminosäuren von FKBP36. Es besteht Übereinstimmung in der räumlichen Orientierung der Aminosäureseitenketten, die in FKBP12 und FKBP36 identisch sind. Weiterhin zeigt ein Vergleich der sich in FKBP12 und FKBP36 unterscheidenden Aminosäuren Glu54, Val55, Ile56, His87, Ile90 (bzw. Ile89, Thr90, Leu91, Cys122, Leu125 in FKBP36) keine Unterschiede in der Raumlage der Seitenketten. Deutliche Unterschiede zwischen den Eigenschaften der Bindetaschen von FKBP12 und FKBP36 könnte der Austausch des Phe46 mit aromatischer Seitenkette in FKBP12 zu einer Aminosäure mit geladener Seitenkette in der korrespondierenden Position des FKBP36 (Arg81) verursachen. Im Strukturmodell des FKBP36 ragt die Seitenkette des Arg81 deutlich in die Bindetasche hinein, damit könnte bei ähnlicher Lage in FKBP36 die Oberfläche der Bindetasche dieses FKBP deutlich polarer sein als die hydrophobe Bindetasche von FKBP12. Auffällig ist weiterhin, dass das Trp59 des FKBP12 in FKBP36 gegen eine Aminosäure mit kleinerem Seitenkettenvolumen (Met94) aus-

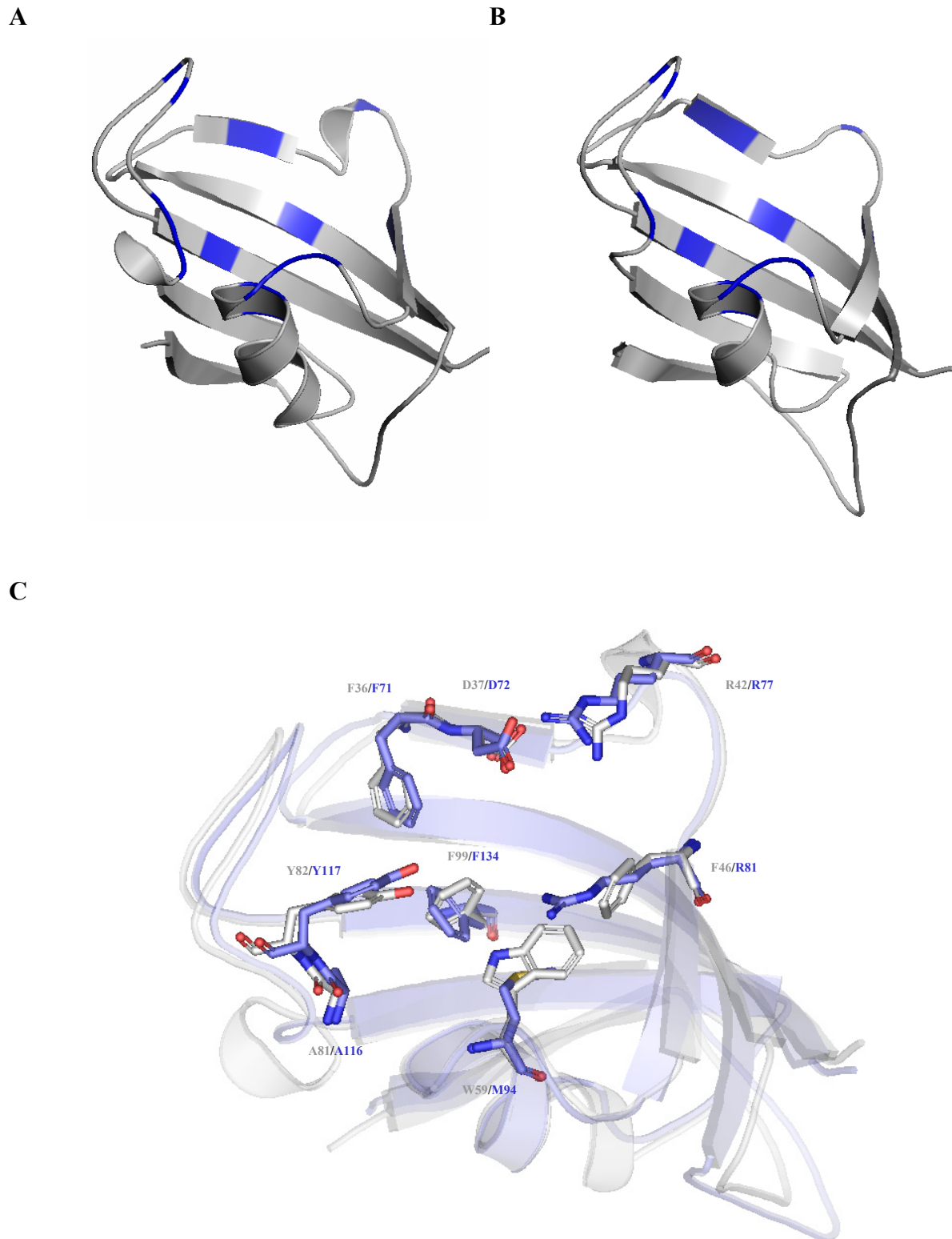


Abbildung 5: 3D-Darstellung der Sekundärstrukturelemente der Strukturen von FKBP12 (A) [Wilson *et al.*, 1995] und der modellierten FKBP-Domäne von FKBP36 (B). In blau sind Aminosäuren gekennzeichnet, die im Zusammenhang mit FK506-Bindung und Katalyse diskutiert werden [Kay, 1996]. C: Überlagerung der in A und B gezeigten Sekundärstrukturelemente. FKBP12 ist in grau und FKBP36 in blau dargestellt. Hervorgehoben sind einige Aminosäurereste, für die in FKBP12 eine Wechselwirkung mit FK506 gezeigt wurde [Wilson *et al.*, 1995].

getauscht ist. Auch diese Veränderung könnte die Hydrophobizität und das Volumen der Bindetasche beeinflussen.

Die Aminosäurereste Ala170 bis Asn285 von FKBP36 lassen drei TPR-Konsensus-Motive erkennen. Diese bilden eine häufig in Multidomänen FKBP beschriebene TPR-Domäne [D'Andrea & Regan 2003; Lamb *et al.*, 1995]. Das erste TPR-Motiv von FKBP36 beginnt mit Aminosäure 170 und endet mit Aminosäure 203. Das zweite Motiv beginnt mit Aminosäure 218 und geht in das dritte über, das mit Aminosäure 285 endet (Abbildung 4). Alle beschriebenen Reste die im Rahmen der Bindung des geladenen C-Terminus von Hsp90 diskutiert werden [Scheufler *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2002], sind in den korrespondierenden Positionen von FKBP36 identisch bzw. ähnlich ausgetauscht.

Sowohl die PPIase-Domäne als auch die TPR-Motive von FKBP36 werden N- bzw. C-terminal von Bereichen mit unbekannter Struktur und Funktion flankiert. Die Erweiterung N-terminal der FKBP-Domäne umfasst 35 Aminosäurereste und kann mit keinem bisher bekannten Funktions- oder Strukturmotiv in Verbindung gebracht werden. Programme zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen (GOR; PredictProtein) charakterisieren diesen Bereich als vorwiegend unstrukturiert mit kurzen α -helikalen Bereichen. C-terminal der TPR-Domäne schließen sich 41 Aminosäurereste an. Für anderen PPIasen mit TPR-Domäne ist in diesem Bereich eine charakteristische siebente α -Helix beschrieben [Wu *et al.*, 2004; Sinar *et al.*, 2003]. Diese wird in Zusammenhang mit Hsp90- oder Calmodulin-Bindung diskutiert [Cheung-Flynn *et al.*, 2003; Edlich *et al.*, 2007; Kurek *et al.*, 2002; Massol *et al.*, 1992].

Abbildung 6 zeigt schematisch die Domänenstruktur des FKBP36, die vergleichbar mit anderen FKBP mit TPR-Domäne ist.

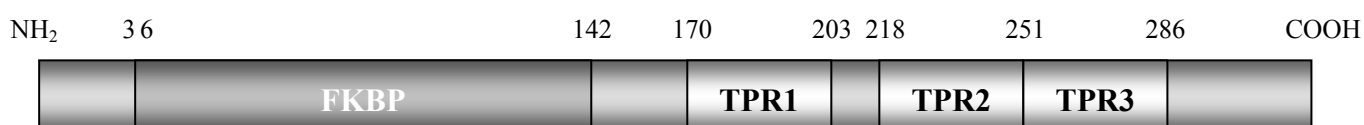


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Domänenaufbaus von FKBP36. Oberhalb der Darstellung sind die Aminosäurereste benannt, die charakteristische Sequenzbereiche begrenzen. FKBP = FKBP-Domäne, TPR = TPR-Motiv.

3.2. FKBP36 homologe Proteine

Im humanen Genom sind sechs Proteine kodiert, in deren Sequenz neben einer bzw. zwei FKBP-Domänen auch drei TPR-Motive identifiziert werden konnten. Ein Stammbaum dieser FKBP36 paralogen Proteine, der aufgrund von Sequenzvergleichen erstellt wurde, ist in Abbildung 7B dargestellt. FKBP51 und FKBP52 sind PPIasen, die neben drei TPR-Motiven zwei FKBP-Domänen

aufweisen und 23 % bzw. 22 % identische Sequenz mit FKBP36 besitzen. Dabei zeigte ein Vergleich der Sequenz der ersten FKBP-Domäne von FKBP52 bzw. FKBP51 mit der FKBP-Domäne von FKBP36, dass diese Domänen 38 % bzw. 41 % identischer Sequenz besitzen und damit die höchste Sequenzidentität aller FKBP-Domänen mit der FKBP-Domäne von FKBP36 aufweisen. FKBP38, FKBP37.7 und FKBP44 sind wie FKBP36 aus einer FKBP-Domäne und drei TPR-Motiven aufgebaut. Aus dieser Gruppe von Proteinen besitzt FKBP38 mit 23 % identischer Sequenz die größte Sequenzidentität mit FKBP36.

Für FKBP36-Orthologe aus Maus und Ratte wurde eine essentielle Funktion in der Spermatogenese gezeigt, für das FKBP36 des Menschen wurde eine analoge Funktion aufgrund von 81 % bzw. 82 % identischer Sequenz postuliert [Crackower *et al.*, 2003]. Um weitere FKBP36-Orthologe in anderen Spezies zu identifizieren und diese von anderen FKBP mit TPR-Motiv zu unterscheiden, wurde ein umfangreicher Sequenzvergleich durchgeführt. Grundlage dieses Vergleichs bildeten die Aminosäuresequenzen der FKBP36-Orthologen aus Maus, Ratte und Mensch und die Aminosäuresequenzen der FKBP36 paralogen Proteine des Menschen. Diese Sequenzanalyse ergab einen für FKBP36 charakteristischen Sequenzbereich innerhalb der FKBP-Domäne (Phe76 bis Glu95), der in Abbildung 7C hervorgehoben ist. Ausgehend von dieser Sequenz wurden in zahlreichen Genomen höherer Säugetiere (Eutheria) FKBP36 orthologe Proteine identifiziert (Abbildung 7). Die Erweiterung des Sequenzvergleichs um Proteinsequenzen aus Beutel- und Kloakentieren sowie Vögeln, Reptilien und Fischen führte in allen betrachteten Vertebraten-Genomen zu einem FKBP mit TPR-Motiv und der Konsensussequenz bxPRhMKLGiphTL (dabei sind b: basische; h: hydrophobe; i: geladene; p: polare Aminosäurereste). Dies lässt auf eine evolutionäre Konservierung von FKBP36 unter den Vertebraten schließen und legt somit eine wichtige funktionelle Bedeutung des Proteins nahe. In Nichtvertebraten konnte keine Proteinsequenz identifiziert werden, die allen oben gemachten Bedingungen für ein FKBP36 paraloges Protein entspricht. Jedoch sind in der Literatur FKBP in *D. melanogaster*, *T. aestivum* und *S. cerevisiae* beschrieben, für die eine essentielle Funktion während der Gametogenese gezeigt wurde [Hochwagen *et al.*, 2005; Kurek *et al.*, 2002; Munn *et al.*, 2000]. Das Protein *shutdown* aus *Drosophila* ist wesentlich für die Oogenese und wie FKBP36 aus einer FKBP-Domäne und drei TPR-Motiven aufgebaut. Jedoch ist die Sequenzidentität, besonders im Bereich der FKBP-Domäne, mit 16 % sehr gering. FKBP73 aus *T. aestivum* besitzt drei FKBP-Domänen sowie 3 TPR-Motive und ist an der Ausbildung des Pollens beteiligt. Sequenzvergleiche zeigen, dass dieses Protein größere Ähnlichkeit zu FKBP52 und FKBP51 aufweist als zu FKBP36. Das *S. cerevisiae* FKBP *fpr3* ist ein Regulator der meiotischen-Prophase1. Die Sequenz von *fpr3* weist eine FKBP-Domäne aber keine TPR-Motive auf und besitzt mit 16 % nur eine geringe Sequenzidentität zu FKBP36.

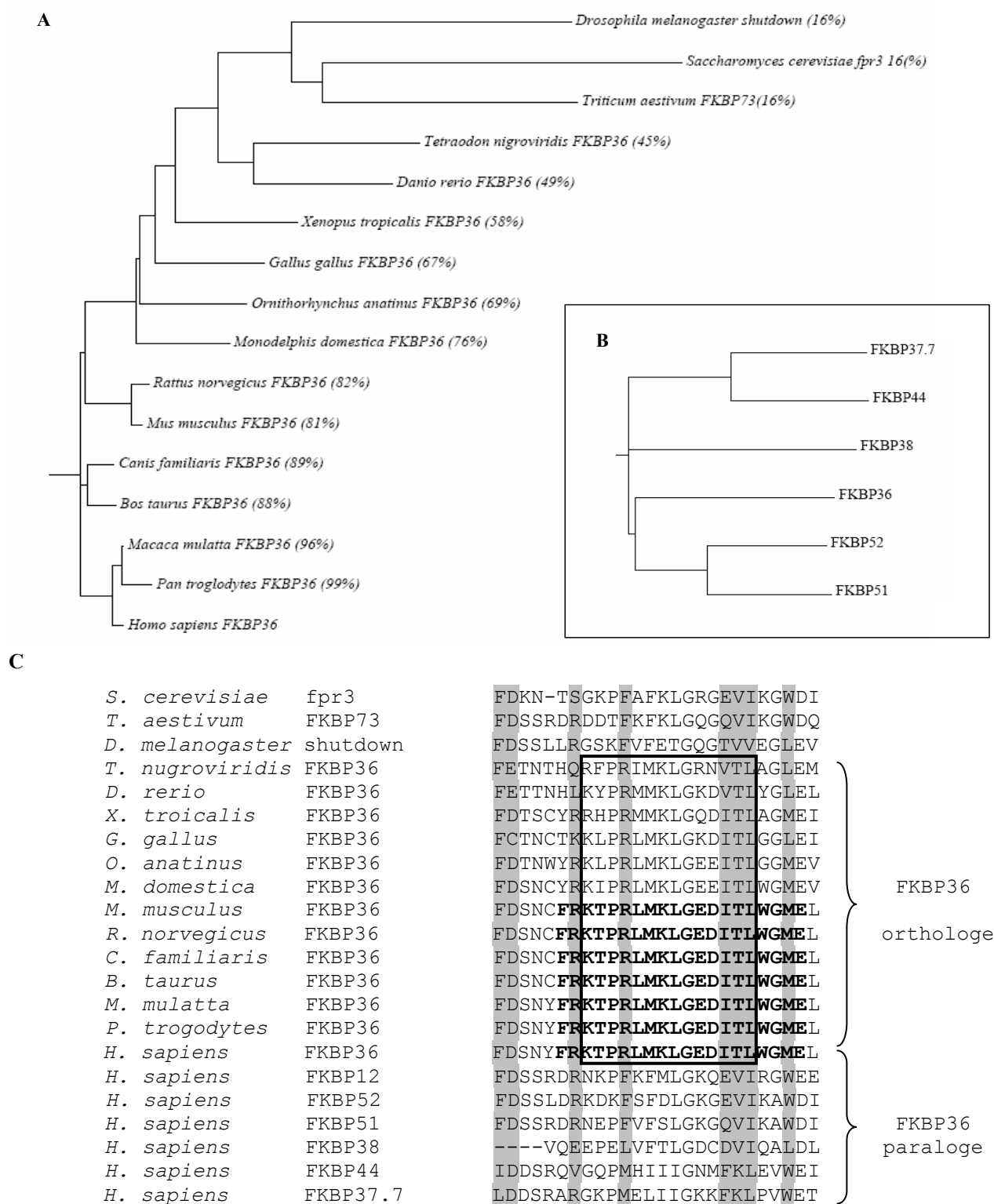


Abbildung 7: FKBP36 Homologe Proteine **A:** Dendrogramm FKBP36 orthologer Proteine aus Vertebraten sowie FKBP mit einer Funktion in der Gametogenese von nicht Vertebraten. In Klammern ist der Anteil zu FKBP36 identischer Aminosäurereste angegeben **B:** Dendrogramm FKBP36 paraloger Proteine des Menschen. **C:** Ausschnitt eines Aminosäuresequenzvergleichs von FKBP36 ortho- und paralogen Proteinen. Gezeigt ist ein Sequenzbereich innerhalb der FKBP-Domäne der typisch für FKBP36 orthologe Proteine ist. Fett dargestellt ist ein Bereich der in allen FKBP36 orthologen Proteinen höheren Säugetieren identisch ist. Die Konsensussequenz bxPRhMKLGiphTL (dabei sind b: basische; h: hydrophobe; i: geladene; p: polare Aminosäure-reste) aller FKBP36 orthologen aus Vertebraten ist eingerahmt. Grau unterlegt sind Aminosäuren die im Zusammenhang mit FK506-Bindung und Katalyse diskutiert werden [Kay, 1996]. Die verwendeten Aminosäuresequenzen wurden den Datenbanken von SwissProt und NCBI entnommen. Die phylogenetische Verwandtschaft der Proteine wurde mit dem Programm CLUSTALW/PHYLIP [Felsenstein, 1989] und die phylogentischen Dendrogramme mit dem Programm Phylodendron erstellt. Die Astlänge der Dendrogramme ist ein relatives Maß für die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der analysierten Proteine.

Die zellulären Funktionen aller eukaryontischen FKBP, für die eine Beteiligung an der Gametogenese gezeigt wurde, sind nur wenig untersucht, weshalb eine allgemeine Funktion eines FKBP an der Meiose nur vermutet werden kann.

3.3. Klonierung und Reinigung von FKBP36 und FKBP36-Varianten

3.3.1. Klonierung

Wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben, ist FKBP36 aus 2 Domänen und je einer N- und C-terminalen Erweiterung aufgebaut. Um die Eigenschaften und Funktionen dieser Regionen zu untersuchen, wurden neben dem Volllängenprotein (FKBP36) auch verschiedene FKBP36-Varianten hergestellt. Mit Hilfe der beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden folgende FKBP36-Konstrukte hergestellt: FKBP36, FKBP36¹⁻¹⁴⁵, FKBP36³⁶⁻³²⁷, FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷, FKBP36¹⁻²⁸⁶, FKBP36¹⁻²⁹⁸. Für die Expression in *E.coli* wurden die Fragmente in den pET28a- bzw. pGEX4T1-Vektor kloniert. Diese Vektoren erlauben die Expression der Proteine ohne Erweiterung, als N-terminale His₆-Fusion bzw. als N-terminale GST-Fusionsproteine. Weiterhin wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die Aminosäuresequenz WSHPQFEK (*StreptagII*) N-terminal an die FKBP36-Sequenz angefügt und in pET28a kloniert. Das entstandene Konstrukt Strep-FKBP36 kodiert für ein Fusionsprotein mit N-terminaler His₆-Fusion, gefolgt von einem *StreptagII* und der Sequenz für FKBP36.

Alle Klonierungen wurden durch vollständige Sequenzierung der insertierten Sequenzen überprüft.

3.3.2. Expression und Reinigung

Für die Expression in *E.coli* wurden alle FKBP36-Varianten in BL21 (DE3) Codon plus RIL-Zellen transformiert. Die Kultivierung der Expressionsklone für die Reinigung erfolgte über Nacht bei 20°C, da bei dieser Temperatur die höchste Konzentration an rekombinant hergestelltem Protein in der löslichen Fraktion des Lysats vorlag. Nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation konnten alle mit His₆-Fusion versehenen Konstrukte nach demselben Reinigungsschema bis zur Homogenität gereinigt werden (Abbildung 8). Ein exemplarisches Reinigungsgel, das am Beispiel von His₆-fusionierten FKBP36 die Wirksamkeit der einzelnen Reinigungsschritte dokumentiert, ist in Abbildung 99 gezeigt.

Im ersten Reinigungsschritt passierte *E.coli* Lysat eine EMD-DEAE-650(M)-Säule. Bei dem verwendeten pH-Wert von 7,8 binden alle FKBP36-Varianten an das Anionenaustauschmaterial.

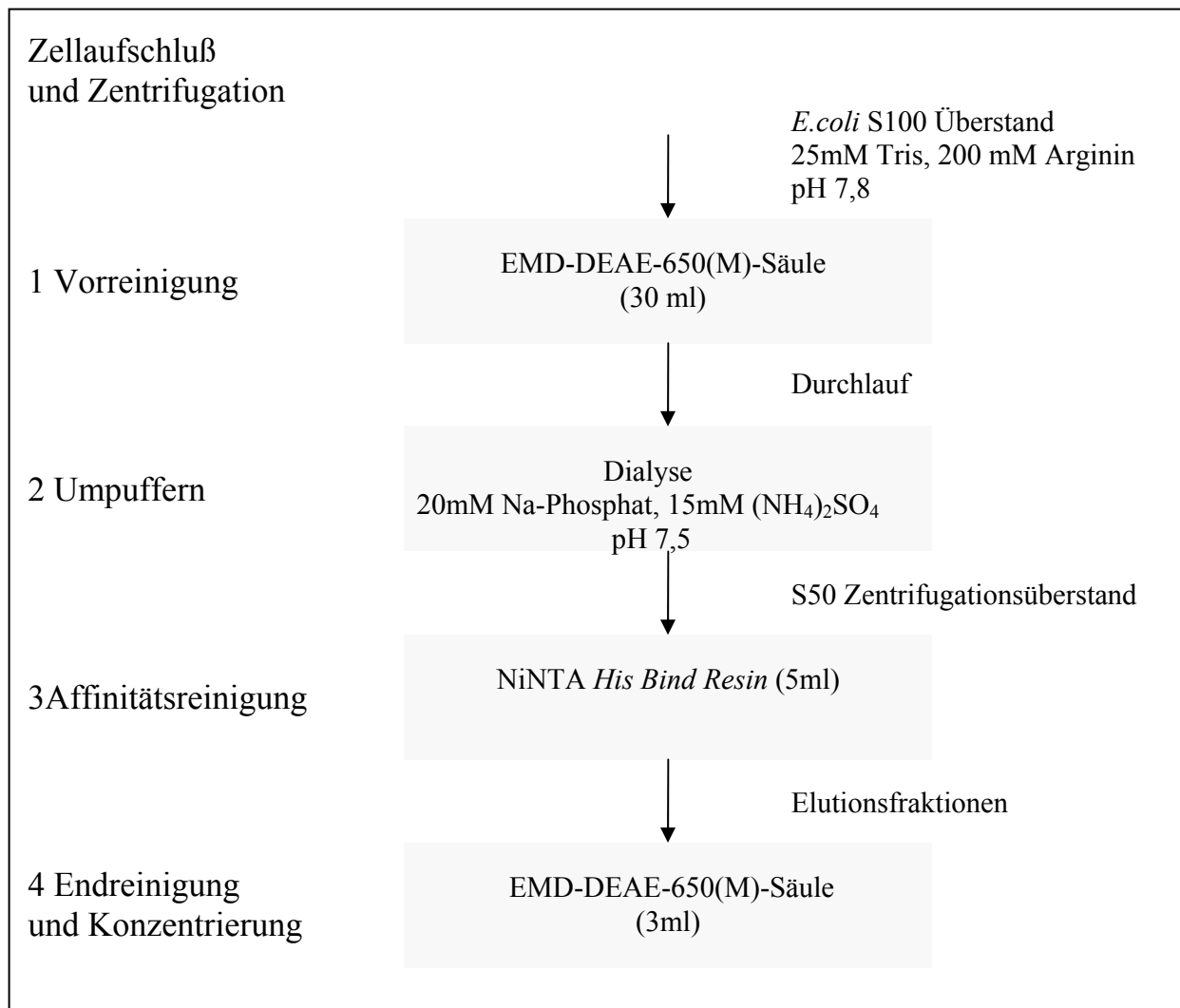


Abbildung 8: Schema für die Reinigung von His₆-fusionierten FKBP36-Varianten. Der dargestellte Reinigungsablauf gilt analog für alle mit His₆-Fusion versehenen FKBP36-Varianten.

Durch Zugabe von 200 mM Arginin zu Lysat und Auftragspuffer wurde die Bindung an das Säulenmaterial verhindert und das rekombinante His₆-FKBP36 stabilisiert. Im ersten Reinigungsschritt wurden nur wenige Proteine abgetrennt (<10%), diese stellen jedoch im weiteren Reinigungsverlauf nicht zu entfernende Verunreinigungen dar. Während der sich anschließenden Reinigungsschritte neigten alle His₆-fusionierten FKBP36-Varianten schon bei Proteinkonzentrationen unter 0,1 mg/ml zur Aggregation.

Durch Dialyse gegen 15 mM (NH₄)₂SO₄, in 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,5 und anschließende Zentrifugation wurden alle leicht aggregierenden Proteinspezies entfernt.

Die N-terminale His₆-Fusion erlaubte die Verwendung einer Nickel-NTA-Affinitätssäule als weiteren Reinigungsschritt. Durch die hohe Selektivität der Metallchelatchromatographie wurden 70 % - 80 % der kontaminierenden Proteine entfernt. Weitere Verunreinigungen wurden durch Waschen des Säulenmaterials mit unterschiedlichen Pufferzusätzen entfernt. Mit 500 mM NaCl und 50 mM Imidazol wurden unspezifisch an das Säulenmaterial gebundene Proteine abgetrennt.

Wechselwirkungen der Fusionsproteine mit *E.coli* Proteinen konnten durch 0,5 % NP40 und 20% Glycerin verhindert werden. Die Elution spezifisch gebundener Fusionsproteine erfolgte mit 250 mM Imidazol in hoher Reinheit.

Die Aufkonzentrierung und Umpufferung für die Lagerung erfolgte durch eine Anionenaustauschchromatographie bei pH 7,8. Die an die Säule gebundenen Fusionsproteine wurden mit einer Stufe (300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM Tris pH 7,8) eluiert. In den ersten Elutionsfraktionen wurden Proteinkonzentrationen von 0,3 mg/ml und höher erhalten. Bei diesen Protein-konzentrationen aggregierten die gereinigten Fusionsproteine. Die Zugabe von 500 mM Arginin und 20% Glycerin zum Elutionspuffer wirkte stabilisierend auf alle FKBP36-Varianten. Der Transfer in Puffer ohne Stabilisatoren führte zur erneuten Aggregation. Ohne Zugabe von 500 mM Arginin und 20% Glycerin waren alle His₆-fusionierten FKBP36-Varianten nur bis zu einer Proteinkonzentration von maximal 0,3 mg/ml stabil.

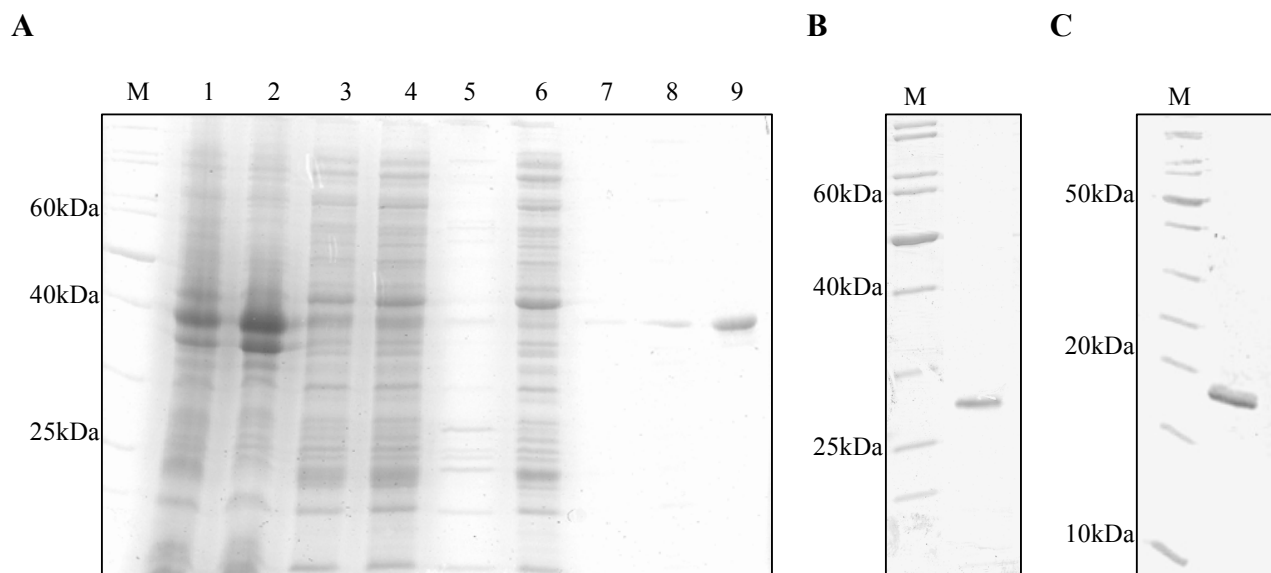


Abbildung 9: Analyse der Reinigung His₆-fusionierter FKBP36-Varianten. **A:** Analyse der Expression und Reinigung des rekombinanten His₆-FKBP36 aus *E.coli* Lysat. (12,5% SDS-PAGE, Coomassie-Färbung) M: Marker; 1: gesamt *E.coli* Aufschluss; 2: Pellet Ultrazentrifugation; 3: Überstand Ultrazentrifugation; 4: Durchlauf 1. DEAE; 5: Elution 1.DEAE; 6: Durchlauf NiNTA; 7: Waschschrift 1 NiNTA; 8: Elution NiNTA; 9: Elution 2.DEAE **B:** 5 µL gereinigtes His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ wurde mittels 12,5%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. **C:** Analyse von 15 µL gereinigtem His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ (15% SDS-PAGE, Coomassie-Färbung).

Die Reinigungsausbeute war für alle His₆-fusionierten Varianten sehr gering. Die höchsten Ausbeuten wurden mit ca. 7,5 mg Protein je 6 l Expressionskultur für His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ erreicht. His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ umfasst die N-terminale Erweiterung und FKBP-Domäne und zeigte die geringste lösliche Expression und die größte Aggregationsneigung, weshalb im Durchschnitt nicht mehr als 1,5 mg Protein je 6 l Expressionskultur erhalten wurden.

Die starke Neigung zur Aggregation und die geringen Ausbeuten limitieren die Einsatzmöglichkeiten der His₆-fusionierten Konstrukte. N-terminale GST-Fusionen können sich positiv auf die Löslichkeit von rekombinant hergestellten Proteinen auswirken [Waugh, 2005], weshalb alle FKBP36-Varianten auch als GST-Fusionsprotein hergestellt wurden. Die GST-fusionierten FKBP36-Varianten wurden in *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL bei 20°C exprimiert und gereinigt. Das Reinigungsschema für GST-fusionierte Konstrukte ist in Abbildung 10 gezeigt.

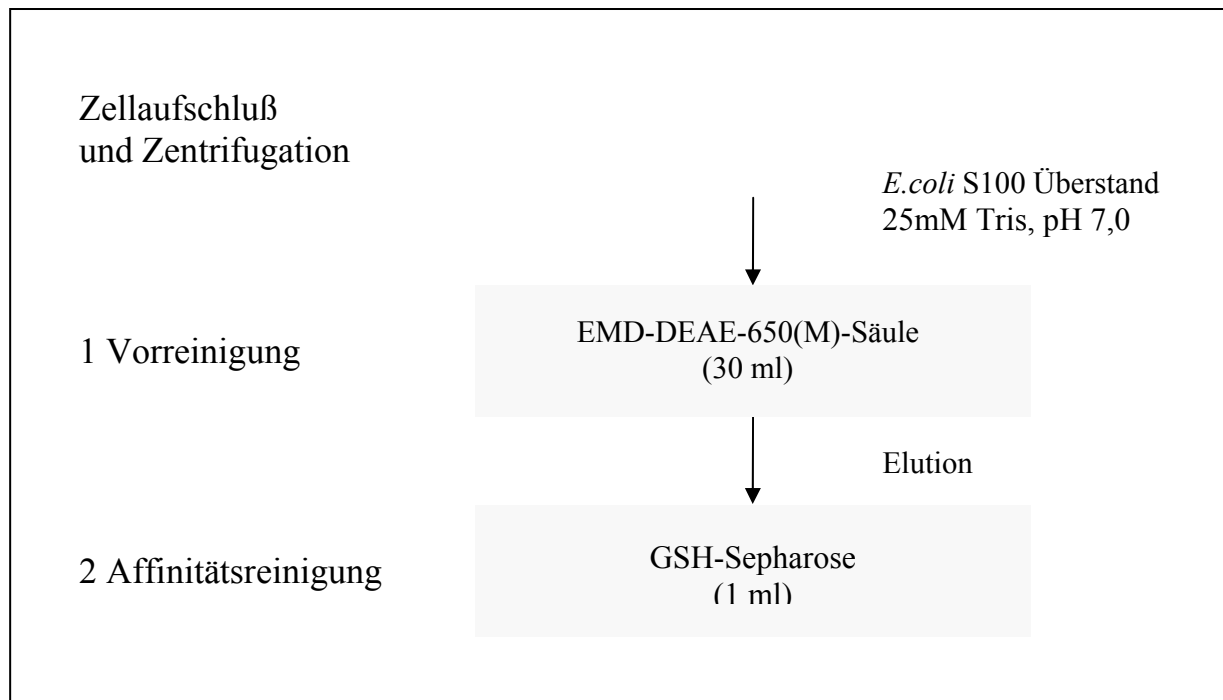


Abbildung 10: Schema für die Reinigung von GST-FKBP36. Der dargestellte Reinigungsablauf gilt analog für alle FKBP36-Varianten mit GST-Fusion.

Die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses wurde auf eine mit 25mM Tris pH 7,0 equilibrierte EMD-DEAE-650(M)-Säule aufgetragen und mit einem steigenden NaCl Gradienten in 25mM Tris pH7,4 eluiert. Die Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen passierten eine GSH-Sepharose. Nach diesem Reinigungsschritt lagen GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵, GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷, GST-FKBP36¹⁻²⁸⁶ und GST-FKBP36¹⁻²⁹⁸ zur Homogenität gereinigt vor. Im Coomassie-gefärbten PA-Gel wurden bei GST-FKBP36 und GST-FKBP36³²⁻³²⁷ Verunreinigungen, die um ca. 3 kDa bis 7 kDa kleiner migrierten als das Hauptprodukt, beobachtet. LC/ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie und Western-Blot-Analyse identifizierten diese Verunreinigungen als C-terminal verkürzte Produkte der GST-Fusionsproteine. Ein Abtrennen der verkürzten GST-Fusionsproteine war nicht möglich.

Alle GST-fusionierten FKBP36-Varianten wurden nach Dialyse gegen 20 mM Tris pH 7,8 für weitere Experimente verwendet. Aus 6 Litern Expressionskultur wurden im Durchschnitt 15 mg GST-FKBP36-Variante erhalten.

Die Identität alle gereinigten FKBP36-Varianten wurde mittels LC/ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie bestätigt (Tabelle 2).

Konstrukt	Sequenzanalyse
His ₆ -FKBP36	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFMGGSALNQGVLGDDAPGQS ^{LYERLSQRMLDISGDR} GVLDKDVIR <u>EGAGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFR</u> KTPRLMKLGEDITLWGMELGLLSMRGE LARFLFKPNYAYGTLGCPPLIPPNTTVLFEI ^{ELLD} DFLDCAESDKFCALS ^{AEQQDQF} PLQKVLKVAATEREFGNYLFRQNRFYDAKVRYKRALLLLRRRSAPPEEQHLVEAAKLPVLLNLSFTYLK ^{LD} RPTIALCYGEQALIIDQKNAKALFR <u>CGQACLLLTEYQ</u> KARDFLVRAQKEQPFNHDINNELKKLASCYRDYVDKEKEMWHRMFAPCGDGSTAGES
His ₆ -FKBP36 ¹⁻¹⁴⁵	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFMGGSALNQGVLGDDAPGQS ^{LYERLSQRMLDISGDR} GVLDKDVIR <u>EGAGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFR</u> KTPRLMKLGEDITLWGMELGLLSMRGE LARFLFKPNYAYGTLGCPPLIPPNTTVLFEI ^{ELLD} DFLDCA
His ₆ -FKBP36 ¹⁴⁵⁻³²⁷	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFAESDKFCALS ^{AEQQDQF} PLQKVLKVAATEREFGNYLFRQNRFYDAKVRYKRALLLLRRRSAPPEEQHLVEAAKLPVLLNLSFTYLK ^{LD} RPTIALCYGEQALIIDQKNAKALFR <u>CGQACLLLTEYQ</u> KARDFLVRAQKEQPFNHDINNELKKLASCYRDYVDKEKEMWHRMFAPCGDGSTAGES
GST-FKBP36	<u>MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV</u> KLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR ^{IAYSKDFETLKVDFLSKLP} EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQAF ^{TGGG} DHPPKSDLVPRGSP ^{EFMGG} SALNQGVLGDDAPGQS ^{LYERLSQRMLDISGDR} GVLDKDVIR <u>EGAGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFR</u> KTPRLMKLGEDITLWGMELGLLSMRGE LARFLFKPNYAYGTLGCPPLIPPNTTVLFEI ^{ELLD} DFLDCAESDKFCALS ^{AEQQDQF} PLQKVLKVAATEREFGNYLFRQNRFYDAKVRYKRALLLLRRRSAPPEEQHLVEAAKLPVLLNLSFTYLK ^{LD} RPTIALCYGEQALIIDQKNAKALFR <u>CGQACLLLTEYQ</u> KARDFLVRAQKEQPFNHDINNELKKLASCYRDYVDKEKEMWHRMFAPCGDGSTAGES
GST-FKBP36 ¹⁻¹⁴⁵	<u>MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV</u> KLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR ^{IAYSKDFETLKVDFLSKLP} EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQAF ^{TGGG} DHPPKSDLVPRGSP ^{EFMGG} SALNQGVLGDDAPGQS ^{LYERLSQRMLDISGDR} GVLDKDVIR <u>EGAGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFR</u> KTPRLMKLGEDITLWGMELGLLSMRGE LARFLFKPNYAYGTLGCPPLIPPNTTVLFEI ^{ELLD} DFLDCA
GST-FKBP36 ¹⁴⁵⁻³²⁷	<u>MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV</u> KLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR ^{IAYSKDFETLKVDFLSKLP} EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQAF ^{TGGG} DHPPKSDLVPRGSP ^{EFMGG} SALNQGVLGDDAPGQS ^{LYERLSQRMLDISGDR} GVLDKDVIR <u>EGAGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFR</u> KTPRLMKLGEDITLWGMELGLLSMRGE LARFLFKPNYAYGTLGCPPLIPPNTTVLFEI ^{ELLD} DFLDCAESDKFCALS ^{AEQQDQF} PLQKVLKVAATEREFGNYLFRQNRFYDAKVRYKRALLLLRRRSAPPEEQHLVEAAKLPVLLNLSFTYLK ^{LD} RPTIALCYGEQALIIDQKNAKALFR <u>CGQACLLLTEYQ</u> KARDFLVRAQKEQPFNHDINNELKKLASCYRDYVDKEKEMWHRMFAPCGDGSTAGES
GST-FKBP36 ³⁶⁻³²⁷	<u>MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV</u> KLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR ^{IAYSKDFETLKVDFLSKLP} EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQAF ^{TGGG} DHPPKSDLVPRGSP ^{EFMGG} SALNQGVLGDDAPGQS ^{LYERLSQRMLDISGDR} GVLDKDVIR <u>EGAGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFR</u> KTPRLMKLGEDITLWGMELGLLSMRGE LARFLFKPNYAYGTLGCPPLIPPNTTVLFEI ^{ELLD} DFLDCAESDKFCALS ^{AEQQDQF} PLQKVLKVAATEREFGNYLFRQNRFYDAKVRYKRALLLLRRRSAPPEEQHLVEAAKLPVLLNLSFTYLK ^{LD} RPTIALCYGEQALIIDQKNAKALFR <u>CGQACLLLTEYQ</u> KARDFLVRAQKEQPFNHDINNELKKLASCYRDYVDKEKEMWHRMFAPCGDGSTAGES
GST-FKBP36 ¹⁻²⁹⁸	<u>MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV</u> KLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR ^{IAYSKDFETLKVDFLSKLP} EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQAF ^{TGGG} DHPPKSDLVPRGSP ^{EFMGG} SALNQGVLGDDAPGQS ^{LYERLSQRMLDISGDR} GVLDKDVIR <u>EGAGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFR</u> KTPRLMKLGEDITLWGMELGLLSMRGE LARFLFKPNYAYGTLGCPPLIPPNTTVLFEI ^{ELLD} DFLDCAESDKFCALS ^{AEQQDQF} PLQKVLKVAATEREFGNYLFRQNRFYDAKVRYKRALLLLRRRSAPPEEQHLVEAAKLPVLLNLSFTYLK ^{LD} RPTIALCYGEQALIIDQKNAKALFR <u>CGQACLLLTEYQ</u> KARDFLVRAQKEQPFNHDINNELKKLASC
GST-FKBP36 ¹⁻²⁸⁶	<u>MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV</u> KLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR ^{IAYSKDFETLKVDFLSKLP} EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQAF ^{TGGG} DHPPKSDLVPRGSP ^{EFMGG} SALNQGVLGDDAPGQS ^{LYERLSQRMLDISGDR} GVLDKDVIR <u>EGAGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFR</u> KTPRLMKLGEDITLWGMELGLLSMRGE LARFLFKPNYAYGTLGCPPLIPPNTTVLFEI ^{ELLD} DFLDCAESDKFCALS ^{AEQQDQF} PLQKVLKVAATEREFGNYLFRQNRFYDAKVRYKRALLLLRRRSAPPEEQHLVEAAKLPVLLNLSFTYLK ^{LD} RPTIALCYGEQALIIDQKNAKALFR <u>CGQACLLLTEYQ</u> KARDFLVRAQKEQPFN

Tabelle 2: Mit LC/ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie identifizierte Peptide der hergestellten FKBP36-Varianten. In den dargestellten Aminosäuresequenzen der FKBP36-Varianten sind die Sequenzanteile der Proteinfusionen unterstrichen und die mittels Massenspektrometrie identifizierte Peptide blau hervorgehoben.

3.4. Sekundärstruktur und Stabilität von FKBP36

Die rekombinant hergestellten Proteine His₆-FKBP36, His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ wurden nach der Reinigung auf die Ausbildung von Sekundärstrukturmerkmalen untersucht. Die Fern-UV CD-Spektren wurden unter nativen Bedingungen bei 20°C, wie unter 2.2.4.8. beschrieben, aufgenommen und sind in Abbildung 11 A dargestellt.

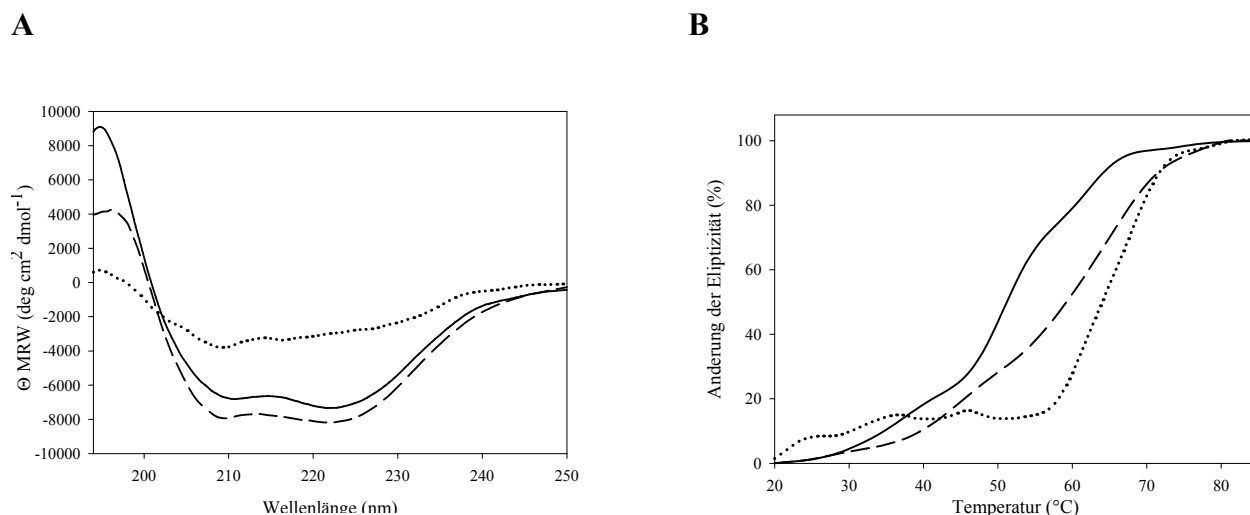


Abbildung 11: Fern-UV CD-spektroskopische Charakterisierung von FKBP36, FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷
A: Fern-UV CD-Spektrum von 0,2 mg/ml His₆-FKBP36 (---), 0,24 mg/ml His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ (.....), 0,27 mg/ml His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ (—) in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5, bei 20°C (Schichtdicke 0,1 cm, 7 Akkumulationen, Integrationszeit 1s). Alle Spektren sind pufferkorrigiert. **B:** Thermische Stabilität von FKBP36, FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷. Die Entfaltung wurde für His₆-FKBP36 (---), His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ (—) bei 222 nm und für His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ (.....) bei 217 nm verfolgt. Alle Entfaltungsübergänge waren irreversibel.

His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ umfasst die FKBP-Domäne dieses Proteins weshalb ein CD-Spektrum ähnlich dem des FKBP12 erwartet werden kann. Die Struktur von FKBP12 enthält fünf antiparallele β -Faltblätter, eine kurze α -Helix und unstrukturierte Bereiche [Michnick *et al.*, 1991]. Die klassischen β -Faltblattmerkmale, die mit einem Minimum bei 217 nm und einem positiven Signal bei 195 nm verbunden werden [Manning & Woody, 1987], sind bei dem CD-Spektrum von His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ nicht sehr stark ausgeprägt. Aufgrund der beiden Minima des CD-Spektrums kann nicht von einem vorwiegend aus β -Faltblatt aufgebauten Protein ausgegangen werden. Die Lage der beiden Minima bei 208 nm und bei 217 nm sind ebenfalls untypisch für ein α -helikales Protein. Das Maximum bei 195 nm ist positiv, aber gering ausgebildet. Das CD-Spektrum von His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ besitzt damit Merkmale von β -Faltblättern und unstrukturierten Bereichen. Die äquivalenten Bereiche in FKBP52 (*OcFKBP52*¹⁻¹⁴⁸) und *AtFKBP42* (*AtFKBP42*¹⁻¹⁵⁹) besitzen vergleichbare CD-Spektren [Pirkel, 2001; Kamphausen, 2002]. Die Kristallstrukturanalysen dieser Proteine zeigen die Ausbildung einer typischen FKBP-Domäne, wobei die Bereiche N-terminal der FKBP-Domänen von FKBP52

(Aminosäure Glu1-Asn21) und AtFKBP42 (Aminosäure Asp1-Val45) als unstrukturiert beschrieben sind [Granzin *et al.*, 2006; Sinar *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004].

Ein Vergleich des CD-Spektrums von His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ mit dem Spektrum von His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ zeigt deutliche Unterschiede zwischen beiden Spektren. Das detektierte CD-Spektrum von His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ besitzt 2 Minima bei 211 nm und 222 nm. Die Signalintensität des absoluten Maximums des Spektrums von His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ bei 195 nm ist mit 9000 deg cm² dmol⁻¹ deutlich höher als die von His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷. Die Lage der Minima und des Maximums sowie die Elliptizitätswerte deuten auf einen erhöhten α -helikalen Anteil hin. Diese Variante umfasst die TPR-Domäne von FKBP36. TPR-Domänen sind aus kurzen α -Helices und unstrukturierten Bereichen aufgebaut. Das aufgenommene CD-Spektrum ist in Form und Signalintensität mit den CD-Spektren der korrespondierenden Sequenzbereiche in Hop und OcFKBP52 vergleichbar [Pirkl, 2001; Carrigan *et al.*, 2006].

Das Volllängenprotein enthält die Sequenzbereiche beider Domänen, dies sollte sich im CD-Spektrum widerspiegeln. Das CD-Spektrum von FKBP36 weist zwei deutliche Minima bei 222 nm und bei 209 nm mit Signalintensitäten von ca. -8000 deg cm² dmol⁻¹ auf. Weiterhin liegt ein Maximum bei 196 nm mit einer Intensität von 9000 deg cm² dmol⁻¹ vor. Wie bei FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ kann von einem erhöhten α -helikalen Strukturanteil ausgegangen werden. In ihrer Form und Signalintensität sind die CD-Spektren verwandter FKBP mit TPR-Domäne wie z.B. FKBP52 und FKBP44 sehr ähnlich [Pirkl, 2001; Gallon *et al.*, 2004].

Weiterhin wurde die thermische Stabilität von His₆-FKBP36, His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ mit Hilfe von Fern-UV CD-Spektroskopie untersucht. In Abbildung 11B ist das Verhalten der Varianten bei thermischer Denaturierung gezeigt. Eine Änderung der Form und Signalintensität des CD-Spektrums von His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ wurde nach Erhöhung der Temperatur auf 85°C beobachtet. Die größte Differenz in den Signalintensitäten zeigte sich für diese Variante bei 217 nm, weshalb bei dieser Wellenlänge der Signalabfall verfolgt wurde. Der Übergangsmittelpunkt der Signaländerung liegt bei ca. 64°C. Deutliche Änderungen im Messsignal wurden nach Aufheizen von His₆-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ auf 85°C beobachtet. Bei 222 nm war der Signalabfall am deutlichsten, weshalb der thermisch induzierte Entfaltungsvorgang bei dieser Wellenlänge aufgezeichnet wurde. Der irreversible Entfaltungsvorgang hatte seinen Übergangsmittelpunkt bei 51°C und war bei 66°C abgeschlossen. Damit war die thermische Denaturierung der TPR-Domäne bei Temperaturen abgeschlossen, bei denen die Denaturierung der FKBP-Domäne ihren Übergangsmittelpunkt aufwies. Die thermische Denaturierung des Volllängenproteins war, wie bei beiden Domänen nicht reversibel und wurde bei 222 nm

aufgezeichnet. Die Übergangskurve ließ einen Mittelpunkt bei ca. 59°C erkennen. Die thermische Stabilität des Volllängenproteins liegt damit zwischen der thermischen Stabilität beider Domänen.

3.5. PPIase Aktivität von FKBP36

Eine katalytische Aktivität einer PPIase kann durch proteasegekoppelte und proteasefreie Messung bestimmt werden. Im proteasegekoppelten Test wird die Konformerspezifität einiger Proteasen gegenüber prolinhaltigen Peptidsubstraten ausgenutzt. Der proteasefreie Test nutzt die Neueinstellung des *cis/trans* Gleichgewichts von prolinhaltigen Peptid-Substraten nach einem Lösemittelsprung. His₆-FKBP36 und His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ wurden in beiden Testsystemen bis zur maximal löslichen Konzentration getestet (His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ ohne Arginin bis 13,5 µM, mit 0,5 M Arginin bis 33 µM). Es konnte keine PPIase-Aktivität nachgewiesen werden.

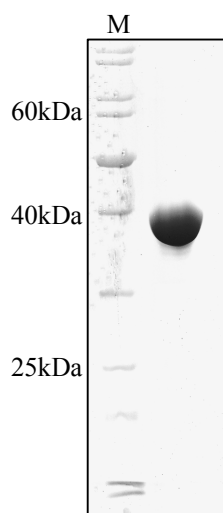
Für PPIasen ist eine Substratspezifität gegenüber der Aminosäure N-terminal des Prolins beschrieben [Harrison & Stein, 1990]. Es wurden verschiedenen Substrate des Typs Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA im proteasefreien und -gekoppelten Test untersucht, um den Einfluss großer und kleiner hydrophober bzw. hydrophiler Aminosäure in der Xaa-Position zu prüfen. Weiterhin wurden im proteasefreien Test Substrate des Typs Suc-Ala-X-Pro-Arg-pNa und Abz-Ala-Ala-Pro-Glu-Tyr(NO₂)-NH₂ verwendet, um einen möglichen Einfluss der Aminosäure C-terminal des Prolins zu prüfen. His₆-FKBP36 und His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ konnten in keinem Test die Isomerisierung der Substrate beschleunigen.

Eine Aktivierung der PPIase-Aktivität durch Zugabe eines Bindepartners ist für FKBP38 beschrieben [Edlich *et al.*, 2005]. In Gegenwart von Calmodulin wird dieses FKBP mit TPR-Domäne aktiviert. Die PPIase-Aktivität von His₆-FKBP36 wurde in Anwesenheit von Calmodulin untersucht. Eine Beschleunigung der unkatalysierten Reaktion wurde nicht festgestellt. Weiterhin konnte durch Zugabe verschiedener Interaktionspartner (Hsp90, Hsp72, GAPDH und CLH) bzw. der interagierenden Domänen (Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹, Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹) zu His₆-FKBP36 in mindestens equimolaren Mengen keinen Einfluss auf die PPIase-Aktivität beobachtet werden.

Im Kapitel 3.1. wurden die Aminosäuresequenz und ein Strukturmodell der FKBP-Domäne von FKBP36 analysiert und mit FKBP12 verglichen. Dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen den Aminosäuren Phe46 und Trp59 in FKBP12 und ihren korrespondierenden Aminosäuren Arg81 und Met94 in FKBP36 festgestellt. Es wurden zwei His₆-fusionierte FKBP36 Varianten (His₆-FKBP36R81F; His₆-FKBP36M94W) hergestellt, die in den entsprechenden Positionen des FKBP36 die zu FKBP12 korrespondierenden Aminosäurereste trugen. Beide Varianten waren in *E.coli* nicht löslich.

Weiterhin wurde die Variante His₆-FKBP36R81L hergestellt. Leucin gehört zu den hydrophoben Aminosäuren, besitzt aber ein kleineres Volumen als Phenylalanin, weshalb sich eine Substitution von Arginin zu Leucin in FKBP36 möglicherweise weniger störend auf die Struktur des Proteins auswirkt als die Substitution gegen Phenylalanin. Weiterhin korrespondiert in FKBP25 Leu162 zu FKBP12 Phe46 und beide Proteine besitzen vergleichbare PPIase-Aktivitäten.

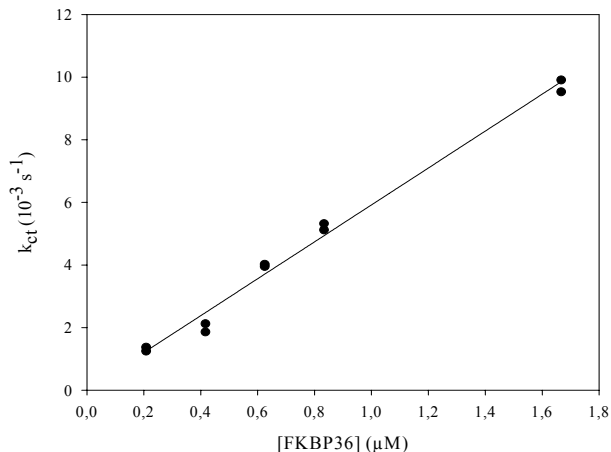
A



B

Konstrukt	Sequenzanalyse
His ₆ -FKBP36R81L	<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFMGGSA LNQGVLEGDDAPGQSLYERLSQRMLDISGDRGVLKDVIREG AGDLVAPDASVLVKYSGYLEHMDRPFDSNYFRKTPLLMLKG EDITLWGMELGLLSMRREGELARFLFKPNYAYGTLGCPPLIP PNTTVLFEIELLDLDFLDCAESDKFCALSAEQDQDFPLQKVLK VAATEREFGNYLFRQNRFYDAKVRYKRALLLLRRRSAPPEE QHLVEAAKLPVLLNLSFTYLKLDLDRPTIALCYGEQALIIDQK NAKALFRCGQACLILLTEYQKARDFLVRAQKEQPFNHDINNE LKKLASCYRDYVDKEKEMWHRMFAPCGDGSTAGES</p>

C



D

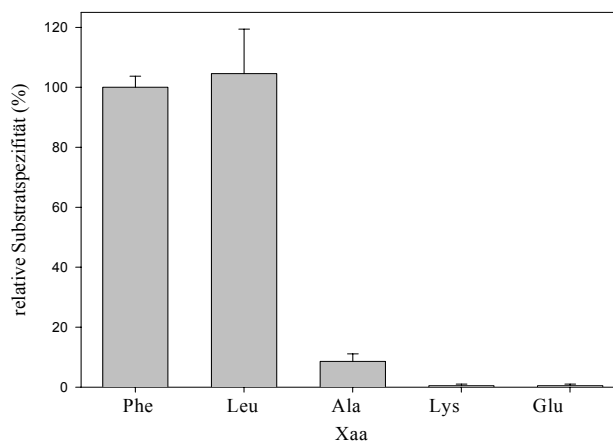


Abbildung 12: Charakterisierung von FKBP36R81L.

A) Gereinigtes His₆-FKBP36R81L (200 μL) wurden TCA gefällt in PP aufgenommen und mittels 12,5% SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert M: Proteinstandard B) Massenspektrometrische Identifizierung von His₆-FKBP36R81L. In der Aminosäuresequenzen des His₆-FKBP36R81L sind die Sequenzanteile der His₆-Fusion unterstrichen und die mittels LC/ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie identifizierte Peptide blau hervorgehoben. Darunter befindet sich auch ein Peptid das die Mutation R81L kennzeichnet (grau unterlegt). C) Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k_{ct} für die enzymkatalysierte *cis/trans* Isomerisierung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA von der FKBP36R81L Konzentration. Die durchgezogene Linie repräsentiert die lineare Regression. Aus dem Anstieg der Geraden wurde ein k_{cat}/K_M von $5898 \pm 218 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt. D) Relative Substratspezifität bezogen auf Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA gegenüber Substraten des Typs Suc-Ala-Xaa-Pro-phe-pNA. Mit Xaa = Phe, Leu, Ala, Lys, Glu. Alle Bestimmungen von k_{ct} erfolgten in 35 mM Hepes pH 7,8 bei 10°C. Die Substratkonzentrationen betragen 40 μM. Die Messung wurde im Chymotrypsin- gekoppelten PPIase Test durchgeführt.

Die Protein-Variante His₆-FKBP36R81L wurde hergestellt und lag in *E.coli* mit einer dem WT vergleichlichen Löslichkeit vor. Diese Variante wurde analog dem WT exprimiert und gereinigt (Abbildung 12A). Das Fern-UV CD-Spektrum und der Übergangsmittelpunkt der thermischen Denaturierung von FKBP36R81L sind mit dem Wildtyp vergleichbar.

Im Chymotrypsin gekoppelten PPIase-Test konnte His₆-FKBP36R81L die Isomerisierung verschiedener Substrates beschleunigen. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) für die Isomerisierung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA beträgt $5898 \pm 218 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Abbildung 12 C). Eine vergleichbarer k_{cat}/K_M wurde für Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA bestimmt ($6175 \pm 913 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA wurden nur ca. 8,6 % der zuvor beschriebenen katalytischen Effizienzen erreicht. Mit Lysin oder Glutamat N-terminal des Prolins in Tetrapeptidsubstraten wurde kein Umsatz des Substrates beobachtet (Abbildung 12 D). Im Protease freien Test wurden vergleichbare PPIase-Aktivitäten bestimmt.

Weiterhin wurde der Einfluss von FK506 und CsA auf die PPIase-Aktivität untersucht. Da die Inhibitoren in Ethanol gelöst waren, wurde die Kontrollmessung ohne Inhibitor in Gegenwart entsprechender Konzentrationen Ethanol durchgeführt. Die PPIase wurde mit den Inhibitoren 10 min vorinkubiert. Es wurden FK506- bzw. Csa-Konzentrationen von bis zu 10 μM untersucht. Die enzymatische Aktivität von FKBP36R81L weder durch CsA noch durch FK506 inhibiert.

Aufgrund der Insensitivität der PPIase-Aktivität von His₆-FKBP36R81L gegenüber PPIase Inhibitoren und der ermittelten Substratspezifität kann davon ausgegangen werden, dass die ermittelte PPIase-Aktivität nicht auf Verunreinigungen durch *E.coli* PPIasen zurückgeführt werden kann.

3.6. Expression von FKBP36 in Geweben und Zelllinien

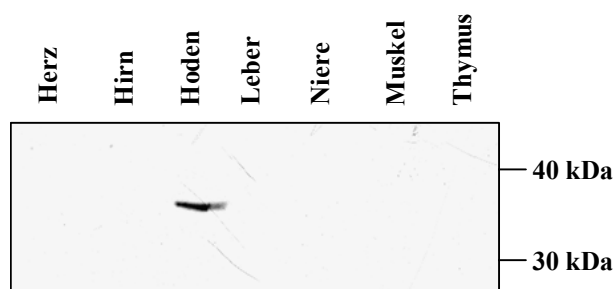
3.6.1. Endogene Expression

Die Kenntnis des Expressionsmusters von FKBP36 ist für *in vivo* und *in vitro* Studien mit endogenem FKBP36 unerlässlich. Eine Expression in reproduktivem Gewebe kann vermutet werden, da FKBP36 essentiell für die meiotischen Zellteilung ist [Crackower *et al.*, 2003]. In anderen Gewebetypen ist nichts über die Expression des Proteins bekannt. Es wurden verschiedene Gewebe und Zelllinien auf die Expression von FKBP36 untersucht, um geeignetes Zellmaterial für Studien mit endogenem Protein zu erhalten. Hierfür erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit einem in Kaninchen hergestellten FKBP36-Antiserum. In Voruntersuchungen wurden unterschiedliche Abnahmen des Antiserums auf ihre Affinität zu rekombinant in *E.coli* exprimiertem FKBP36

getestet. Verschieden Mengen FKBP36 wurden auf Nitrocellulose aufgetragen und einer Western-Blot-Analyse mit unterschiedlichen Verdünnungen der einzelnen Antikörper-Abnahmen unterzogen. Die vierte Abnahme des Antiserums zeigte die größte Spezifität. Mit Verdünnungen von 1:2500 konnte weniger als 0,5 ng rekombinantes FKBP36 detektiert werden (siehe Abbildung 13 B). Bei einem Titer $\geq 1:1000$ zeigte das Serum keine Kreuzreaktivitäten mit *E.coli* Proteinen.

Im Folgenden wurden verschiedene Gewebetypen auf eine FKBP36 Expression untersucht. Zum Einsatz kamen Lysate von Herz, Hirn, Hoden, Leber, Skelettmuskel, Niere und Thymus aus Maus und Ratte. Portionen (ca. 0,1 g) von Herz, Hirn, Hoden, Leber und Thymus aus Ratte wurden in Lysispuffer aufgenommen, und wie unter 2.2.3.5. beschrieben aufgearbeitet. Proben von Niere und Muskel aus Maus und Ratte waren Fertigpräparate. Je 10 μ g Protein der Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Bei Verwendung von Präimmunsereum wurde mit keiner der Proben ein Signal erhalten. Mit FKBP36 Antiserum wurde im Hodengewebe bei ca. 37 kDa eine Bande detektiert (Abbildung 13A). Das beobachtete Molekulargewicht der Bande im PA-Gel, entspricht annähernd dem theoretischen Gewicht (37,2 kDa) von FKBP36. Die unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführten, in der Literatur dokumentierten Western-Blot-Analysen beschreiben FKBP36 als Protein von ca. 36,5 kDa [Crackower *et al.*, 2003, Xiong *et al.*, 2003].

A



B

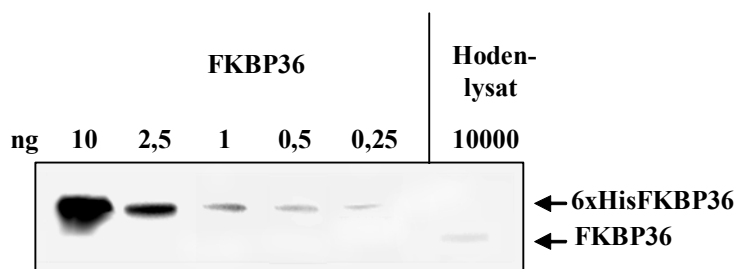


Abbildung 13: Expression von FKBP36 **A:** Analyse der Expression von FKBP36 in unterschiedlichen Geweben aus Ratte mit FKBP36 Antiserum 1:1000. Je 10 μ g Gesamtzellprotein wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels 12,5 %-iger SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. **B:** Analyse der Expressionsstärke von FKBP36 in Rattenhoden, neben 10 μ g gesamt-Hodenlysat wurden verschiedenen Konzentration gereinigtes, rekombinantes FKBP36 mit His₆-Fusion auf eine 12,5%-iger SDS-PAGE aufgetragen, auf Nitrocellulose transferiert und mit FKBP36-Antiserum (1:2000) analysiert.

Die Signalintensität (densitometrisches Volumen) der im Hodenlysat mit FKBP36-Antiserum detektierten Bande ist geringer als die Signalintensität, die mit 0,5 ng rekombinanten FKBP36 unter gleichen Bedingungen erhalten wurden. Unter der Annahme, dass endogenes und rekombinantes Protein mit gleicher Affinität vom FKBP36-Antiserum gebunden wurde, sind in 10 µg Hodenprotein < 0,5 ng FKBP36. Damit beträgt der Anteil von FKBP36 am Gesamthodenprotein < 0,005%. In anderen untersuchten Geweben wurde kein Western-Blot-Signal erhalten.

Weiterhin wurden zahlreiche Säuger-Zelllinien (A431, C2C12, COS-7, F9, H9c2, HEK293, HeLa, HUVEC, Jurkat, NTERA-2, PC-3, RCP, SH-SY5Y, U343, WI38) auf die Expression von FKBP36 untersucht. Je 10 µg Gesamtzellprotein wurden mittels SDS-PAGE, Western-Blot und FKBP36 Antiserum (1:1000) analysiert. Es konnte kein endogenes FKBP36 detektiert werden.

3.6.2. Rekombinante Expression in COS-7

Um Funktionsstudien von Proteinen *in vivo* durchzuführen, kommen häufig immortale Zelllinien zum Einsatz. Da in keiner der untersuchten Zelllinien endogenes FKBP36 nachgewiesen werden konnte, wurde eine Strategie entwickelt um FKBP36 in Säugerzellen zu exprimieren. Die für FKBP36 kodierende DNA-Sequenz wurde in einen pcDNA3.1-Vektor für Säugerzell-Expression gebracht. Da der verwendete Vektor keine Erweiterungen kodiert, wurde mit geeigneten Primern die DNA-Sequenz von FKBP36 mit N-terminaler His₆-Fusion des pET28a-Vektors amplifiziert und in pcDNA3.1 ligiert. Das erhaltene FKBP36-pcDNA Konstrukt sollte die Expression von FKBP36 mit N-terminaler His₆-Fusion ermöglichen.

3 x 10⁶ COS-7-Zellen wurden mittels Elektroporation mit 7,5 µg des FKBP36-pcDNA Konstrukts transfiziert. Als Kontrolle wurden untransfizierte COS-7-Zellen und mit pcDNA3.1 transfizierte Zellen unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Nach 48 h Stunden wurden die Zellen in Lysispuffer geerntet und aufgeschlossen. Je 10 µg Protein des Gesamtzelllysates wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis des rekombinanten FKBP36 erfolgte durch eine Western-Blot-Analyse mit FKBP36-Antiserum und Anti-His₆-Antikörpern. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 gezeigt. In den Western-Blot-Analysen der Kontrollen (COS-7-Zellen und mit pcDNA3.1 transfizierte COS-7-Zellen) wurde kein Hinweis für eine FKBP36 Expression erhalten. In den mit FKBP36-pcDNA transfizierten Zellen wurde mit FKBP36 Antiserum eine Bande bei ca. 40 kDa detektiert. Die Analyse mit Anti-His₆-Fusion Antikörpern bestätigte dieses Ergebnis.

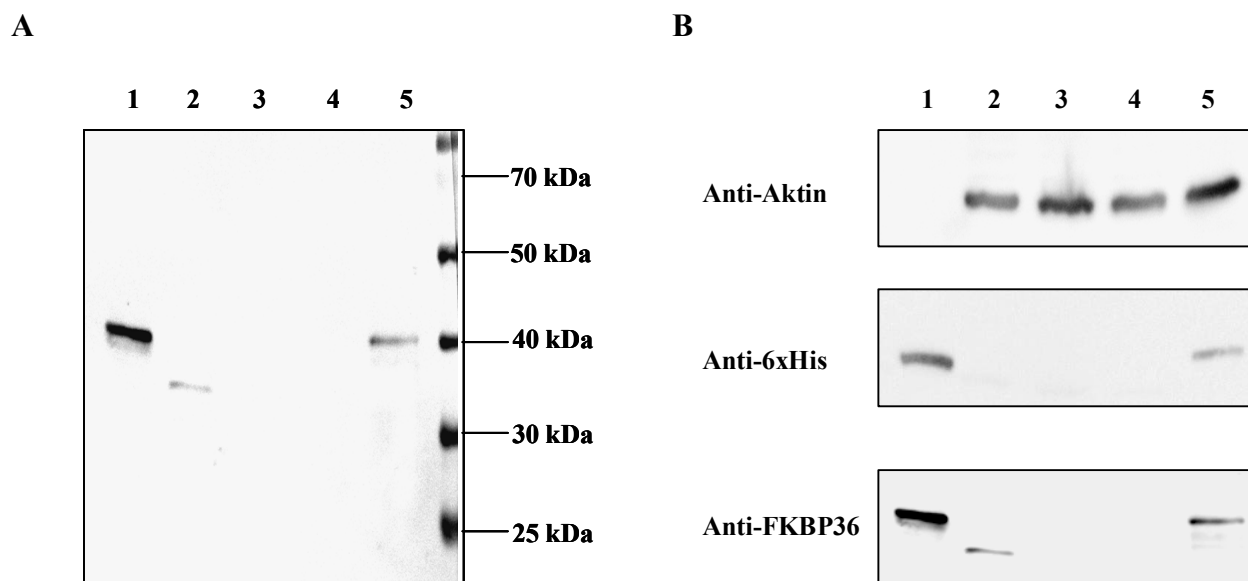


Abbildung 14: Expression von FKBP36 in COS-7-Zellen. 2,5 ng FKBP36 aus *E. coli* (Spur 1) und je 10 µg Gesamtzelllysate aus Hoden (Spur 2), untransfizierten COS-7-Zellen (Spur 3), mit pcDNA3.1 (Spur 4) bzw. FKBP36pcDNA (Spur 5) transfizierten COS-7-Zellen wurden aufgetrennt (SDS-PAGE 12,5% Acrylamid) auf Nitrozellulose transferiert und mit **A)** Anti-FKBP36-Antiserum, **B)** Antikörper gegen Aktin, FKBP36 und His₆-Fusion analysiert.

Das in COS-7-Zellen exprimierte FKBP36 Konstrukt zeigt das gleiche Migrationsverhalten im PA-Gel wie rekombinantes Protein aus *E. coli*. Beide rekombinanten Proteine erscheinen im PA-Gel um ca. 3 kDa größer als das in Hoden detektierte endogene Protein. Der Größenunterschied zwischen endogenem und rekombinant exprimiertem Protein kann auf die molekularbiologisch angefügte Erweiterung zurückgeführt werden, deren theoretische Masse 3 kDa beträgt. Endogenes FKBP36 besitzt keine posttranslationalen Modifikationen, die das Laufverhalten im PA-Gel sichtbar verändern.

3.7. Subzelluläre Lokalisation von FKBP36

3.7.1. Subzelluläre Verteilung von FKBP36 in Hodenzellen

Nach der Vorhersage der Analyseprogramme PSORT und TargetP ist FKBP36 vorwiegend im Cytosol lokalisiert. Klassische Lokalisationssignale für den Transport in andere Zellorganelle oder die Verankerung in der Membran können nicht identifiziert werden. Bei seiner Funktion während der Meiose ist FKBP36 als nukleares Protein beschrieben [Crackower *et al.*, 2003], über die sonstige Verteilung in der Zelle existieren keine publizierten Daten.

Zur Charakterisierung der subzellulären Verteilung von FKBP36 wurde Rattenhodenlysat in verschiedene Zellbestandteile fraktioniert. Hierzu wurden ca. 2 g Rattenhoden in Homo-

genisationspuffer aufgeschlossen (siehe 2.2.3.4.). Über die sich anschließende Zellfraktionierung gibt Abbildung 15 einen Überblick. Es wurden Zellkerne (nach Blobel & Potter [1966]) und Cytosol präpariert. Weiterhin erfolgte eine Extraktion der mikrosomalen Fraktion mit unterschiedlichen Puffern, da in Vorexperimenten FKBP36 auch nach mehreren Waschschrinen noch im Sediment der Ultrazentrifugation nachgewiesen wurde. Die Extraktion des Pellets mit 0,5 M Tris pH 8,1 überführt Bestandteile Clathrin-umhüllter Vesikel in den S100 Überstand. Hochmolekularer Tris-Puffer mit basischem pH-Wert induziert Strukturänderungen in den schweren Ketten Clathrin-umhüllter Vesikel, dadurch wird die Käfigstruktur instabilisiert und ihre Bestandteile freigesetzt. Das verbleibende Ultrazentrifugationspellet wurde mit 2 % (v/v) Triton X100 extrahiert, da durch Detergentien hydrophobe Membranproteine in die wässrige Phase überführt werden. Zur Kontrolle wurde Zelllysat aus Ratten-Leber nach dem gleichen Schema aufgearbeitet.

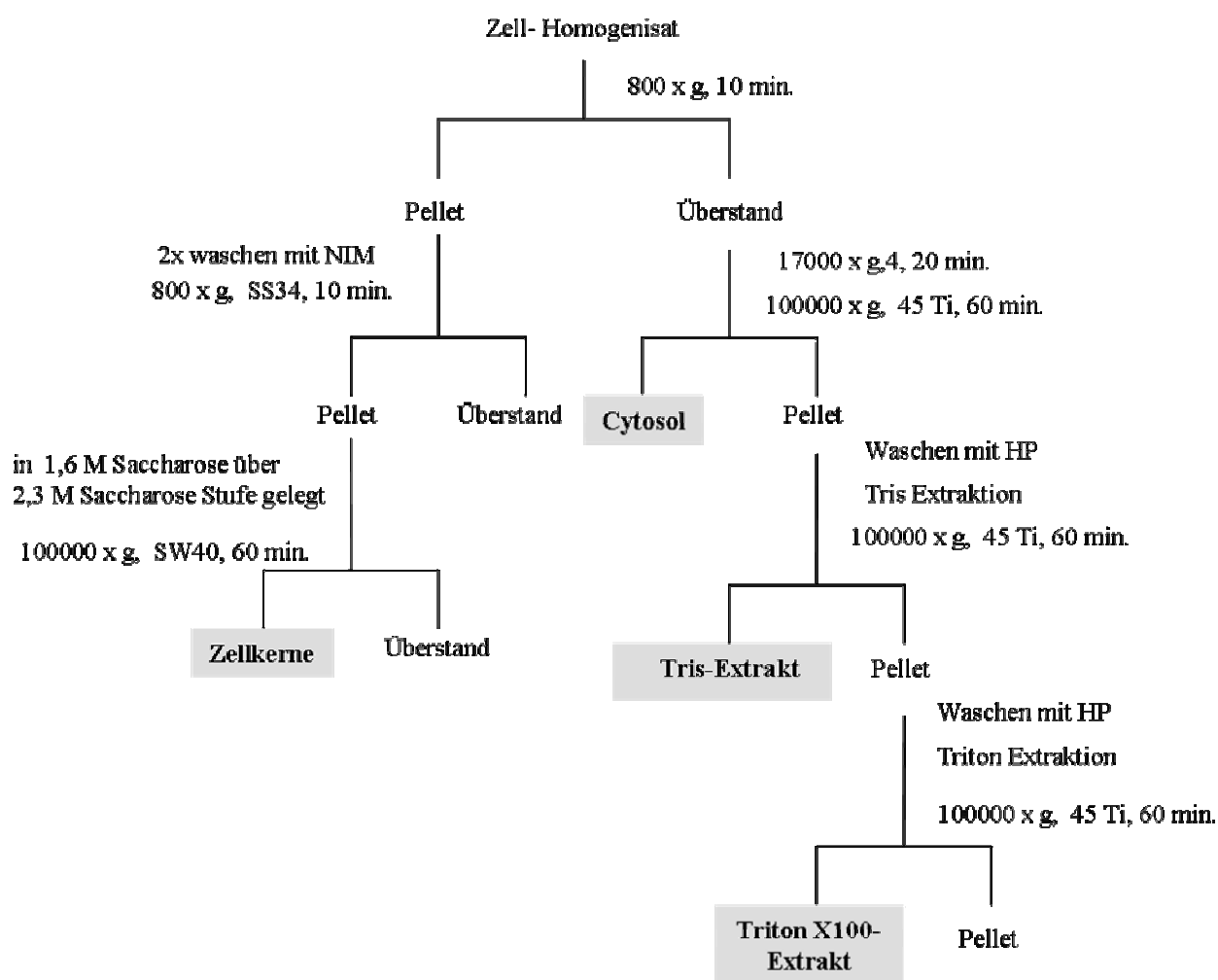


Abbildung 15: Fraktionierung von Zellen in Cytosol, Zellkerne, Bestandteile von Clathrin Vesikel (Tris-Extrakt) und membrangebundene Proteine (Triton X100-Extrakt)

10 µg Protein, der aus Leber und Hoden erhaltenen Fraktionen, wurden nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose immunologisch mit Antikörpern gegen GAPDH, Histon und CLH charakterisiert (Abbildung 16).

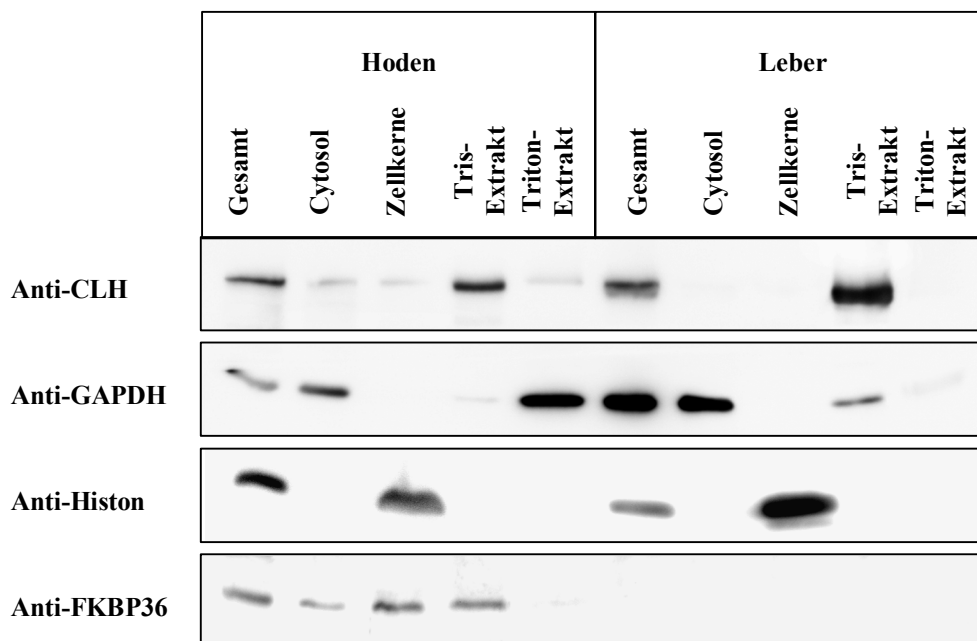


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse einer subzellulären Fraktionierung. Gesamtzelllysate aus Rattenhoden (links) bzw. Leber (rechts) wurden in Cytosol, Zellkerne, Clathrin bedeckte Vesikel und Membran Proteine fraktioniert. Je 10 µg Protein wurde mittels SDS-PAGE (für den Histon-Nachweis 15 % Acrylamid, ansonsten 10 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Anti-Histon-, Anti-CLH-, Anti-GAPDH- und Anti-FKBP36 Antikörpern analysiert.

GAPDH ist ein Markerprotein für das Cytosol. Für eine Lokalisation im Kern sind Histone als Marker beschrieben. CLH bildet das Grundgerüst von Clathrin umhüllten Vesikeln, weshalb dieses Protein in der Fraktion Clathrin-umhüllter Vesikel angereichert ist. In geringeren Konzentrationen ist trimeres CLH auch im Cytosol lokalisiert. Die Western-Blot-Analyse der Fraktionen zeigt Kerne in hoher Reinheit. Es konnte keine GAPDH nachgewiesen werden. Weiterhin zeigt ein Vergleich mit dem Gesamtzelllysat eine Anreicherung an Histon-Proteinen. Im Cytosol wurden eine große GAPDH-Konzentration, eine geringe Konzentration von CLH sowie keine Histone nachgewiesen. Die Western-Blot-Analyse des Tris-Extrakts aus Hoden zeigt eine Anreicherung von CLH im Vergleich zum Ausgangsmaterial. Histone wurden bei beiden Geweben nicht, GAPDH nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen. Es kann davon ausgegangen werden, dass Bestandteile Clathrin umhüllter Vesikel in dieser Fraktion frei von nuklearen- und cytosolischen Verunreinigungen in aufkonzentrierter Form vorliegen. Im Triton-Extrakt beider Gewebe konnten mit Hilfe von Western-Blot-Analysen keine Histone und nur sehr geringe Mengen CLH nachgewiesen werden. Das Triton-Extrakt aus Leber enthielt nur geringe Mengen GAPDH, im Extrakt aus Hoden wurde jedoch eine Anreicherung von GAPDH im Vergleich zum Cytosol

detektiert. Eine solche Anreicherung von GAPDH an Membranen ist nicht ungewöhnlich. Sie wird in der Literatur in Zusammenhang mit einer Funktion der GAPDH bei der Fusion von Membranen diskutiert [Sirover, 2005].

Die Verteilung von FKBP36 in den zuvor charakterisierten Fraktionen wurde ebenfalls mit einer Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 16). In Fraktionen, die aus Leberlysat gewonnen wurden, konnte kein FKBP36 nachgewiesen werden. Im Hodenlysat wurde FKBP36 in der cytosolischen und nuklearen Fraktion detektiert. Weiterhin konnte FKBP36, wie die Bestandteile der Clathrin-bedeckten Vesikel mit 0,5 M Tris aus dem Ultrazentrifugationspellet extrahiert und nachgewiesen werden. Mit Detergenz konnte kein FKBP36 aus dem Sediment der Ultrazentrifugation in die lösliche Fraktion überführt werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass FKBP36 kein Membranbestandteil ist. Ein Vergleich der Bandenintensität der Western-Blot-Analyse mit FKBP36 Antikörper zeigt, dass FKBP36 im Zellkern und im Tris-Extrakt in höherer Konzentration vorliegt als im Cytosol.

3.7.2. Subzelluläre Lokalisation von FKBP36 in COS-7-Zellen

Für *in vivo* Studien wurde FKBP36 in COS-7-Zellen exprimiert. Um die im heterologen System gewonnenen Daten auf das native System beziehen zu können, sollte die subzelluläre Verteilung des Proteins in beiden System vergleichbar sein.

Um die subzelluläre Verteilung von FKBP36 im Hoden und in COS-7-Zellen zu vergleichen, wurde Gesamtzelllysat aus 5×10^7 COS-7-Zellen nach dem bereits für das Hodenzelllysat beschriebenen Schema aufgearbeitet (Abbildung 15). Da weniger Gesamtzellmasse zur Verfügung stand, mussten die Volumina der einzelnen Präparationsschritte angepasst werden. Die Charakterisierung von je 10 µg Protein der einzelnen Fraktionen mit Histon-, GAPDH- und CLH-Antikörpern zeigt, dass nach diesem Schema auch aus COS-7-Zellen subzelluläre Fraktionen in hoher Reinheit gewonnen wurden (Abbildung 16).

Mit einer Western-Blot-Analyse wurde rekombinantes FKBP36 in der aus COS-7-Zellen gewonnenen Kernfraktion und dem Cytosol nachgewiesen. Dabei war das Western-Blot-Signal in der Kernfraktion stärker als im Cytosol. Dies ist mit der Verteilung des authentischen FKBP36 im nativen System vergleichbar. Weiterhin wurde im Tris-Extrakt der COS-7-Zellen geringere Mengen rekombinantes FKBP36 nachgewiesen als authentisches Protein im Vergleichsexperiment mit Zellen aus Rattenhoden (Abbildung 16 + Abbildung 16).

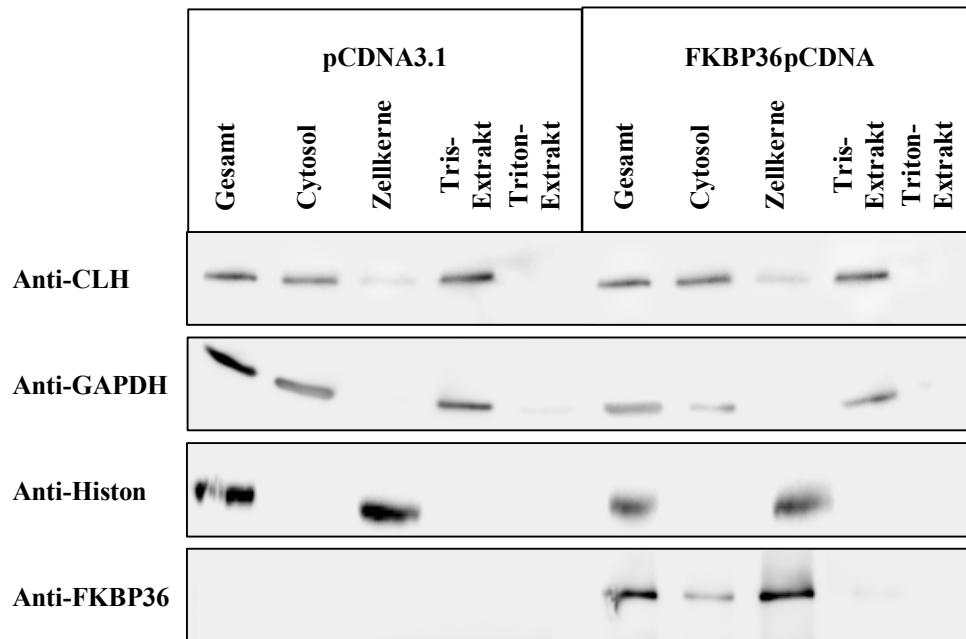


Abbildung 17: Western-Blot-Analyse einer subzellulären Fraktionierung. COS-7-Zellen wurden mit 36pcDNA bzw. pcDNA3.1 transfiziert und nach 48 h geerntet. Gesamtzelllysate mit pcDNA3.1 (links) bzw. FKBP36pcDNA (rechts) transfizierten COS-7-Zellen, wurde in Cytosol, Zellkerne, Clathrin-bedeckte Vesikel und Membran Proteine fraktioniert. Je 10 μ g Protein wurde mittels SDS-PAGE (für Histon-Nachweis 15 % Acrylamid ansonsten 10 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Anti-Histon, Anti-CLH-, Anti-GAPDH- und Anti-FKBP36 Antiserum analysiert.

In den bisher beschriebenen Lokalisationsstudien wurden Zellen durch Zentrifugation fraktioniert. Um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, erfolgten auch Lokalisationsstudien des rekombinanten FKBP36 in COS-7-Zellen mit Immunfluoreszenz. Hierzu wurden COS-7-Zellen mit FKBP36-pcDNA transfiziert. Als Negativ-Kontrolle dienten mit pcDNA3.1 transfizierte Zellen. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen, fixiert, permeabilisiert und einer Fluoreszenzfärbung unterzogen.

Antikörper gegen die His₆-Fusion des FKBP36 und sekundäre FITC-markierte Anti-Mauskörper sollten nach Anregung bei 488 nm mit grüner Fluoreszenz die Lokalisation von FKBP36 in der Zelle anzeigen. Um eine bessere Zuordnung dieser Fluoreszenz zu ermöglichen, wurden die Zellen mit DAPI und Rhodamin-Phalloidin ebenfalls gefärbt. DAPI ist ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert und mit blauer Fluoreszenz die Lage der Zellkerne kennzeichnet. Das Aktingerüst der Zelle wurde durch den Rhodamin markierten Aktin-Inhibitor Phalloidin spezifisch rot angefärbt.

In den Kontrollzellen wurde keine unspezifische Bindung des FKBP36-Antikörpers und des sekundären Antikörpers festgestellt (Abbildung 18). Die grüne Fluoreszenz in FKBP36 exprimierenden Zellen trat verstärkt im Kern sowie in Kernnähe im Cytoplasma auf (Abbildung 18). Die beobachtete Lokalisation in Kern und Cytoplasma steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Zellfraktionierung.

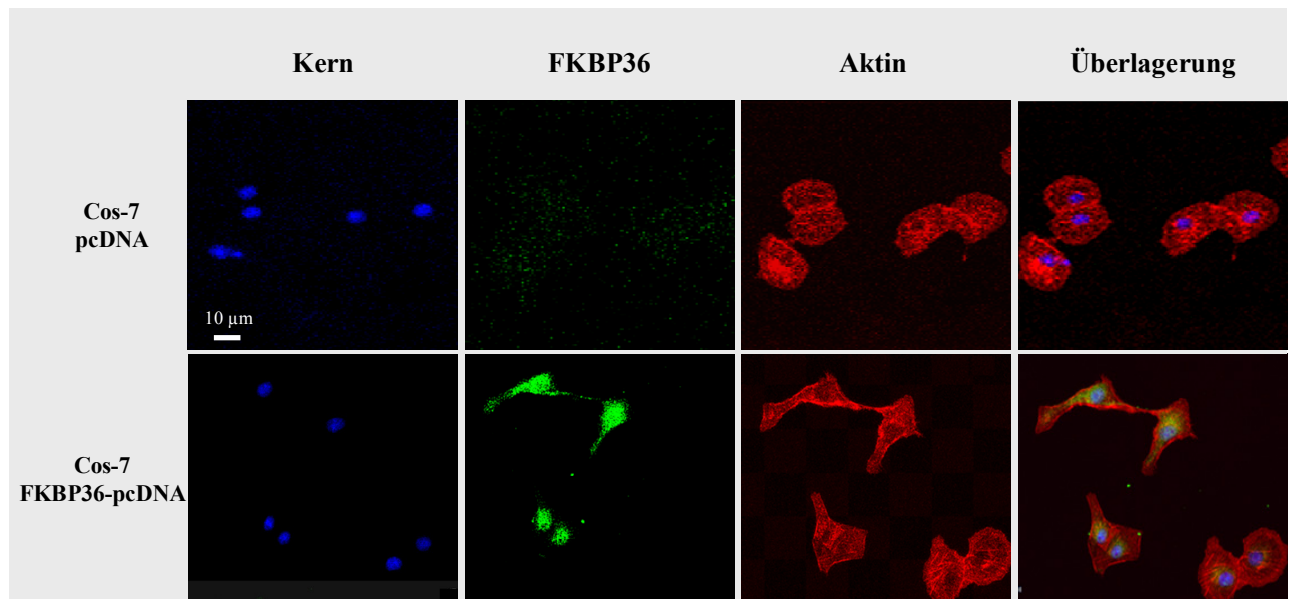


Abbildung 18: Konfokale-mikroskopische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von COS-7-Zellen in An- und Abwesenheit von rekombinanten FKBP36. COS-7 wurden mit pcDNA3.1 bzw. FKBP36-pcDNA transfiziert. Die auf mikroskopischen Deckgläschen kultivierten Zellen wurden fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden Zellkerne mit DAPI und Aktin mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt. His₆-fusioniertes FKBP36 wurde mit einer Kombination aus Anti-His₆-Fusion-Antikörper und FITC-markierten Anti-Mausantikörper markiert.

3.8. Identifizierung von Interaktionspartnern

Um ein besseres Verständnis der physiologischen Funktionen eines Proteins zu bekommen, ist die Kenntnis von Interaktionspartnern essentiell. Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Bindepartnern bieten Kopräzipitationsversuche mit anschließender massenspektrometrischer Analyse.

Mögliche FKBP36-Bindepartner wurden aus Hodencytoplasma mit GST-FKBP36 kopräzipitiert. Hierzu wurde je 100 µl GSH-Sepharose mit GST-FKBP36 bzw. GST beladen. Anschließend wurden je 50 µl der beladenen Sepharosematerialien mit vorgereinigtem Hodencytoplasma bzw. mit Lysispuffer inkubiert (3h, 4°C). Nach mehrfachem Waschen der Sepharose wurden die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 19). Ein Vergleich der erhaltenen Bandenmuster von GST-FKBP36, welches mit und ohne Cytoplasma inkubiert wurde, lässt zusätzliche Banden in der GST-FKBP36 Probe mit Cytoplasma erkennen. Diese migrieren bei ca. 200 kDa, 150 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 48 kDa, 41 kDa, 37 kDa und 25-27 kDa. Jede Zusätzliche Bande stellt einen potentiellen Interaktionspartner dar und wurde für die Analyse aus dem PA-Gel ausgeschnitten. Konnten in der GST-Kontrolle Proteinpopulationen mit einem ähnlichen Laufverhalten beobachtet werden (bei 200 kDa, 70 kDa, 41 kDa und 25-27 kDa), wurden diese ebenfalls ausgeschnitten. Um die mittels der Affinitätsmatrix isolierten Proteine zu identifizieren, wurden die ausgeschnittenen Proteinpopulationen, im Gel mit Trypsin behandelt, und die erhaltenen Spaltprodukte mittels Massen-

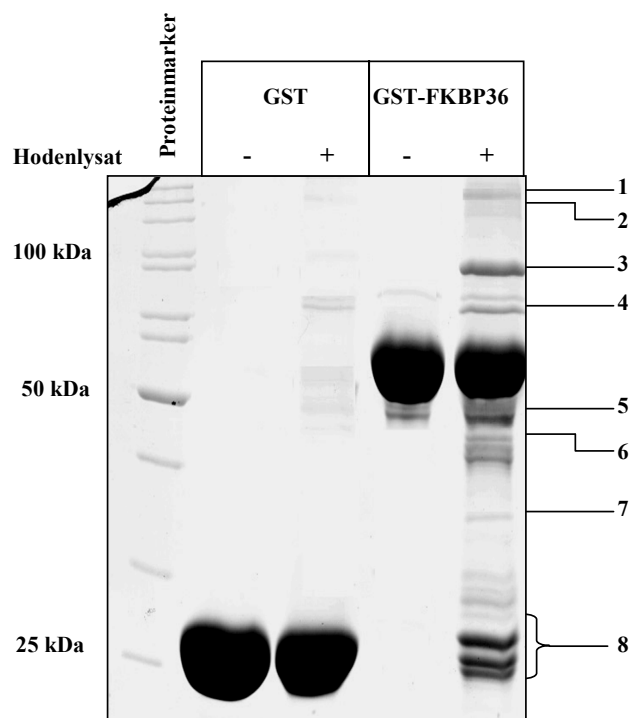


Abbildung 19: Präzipitationsexperiment zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern von FKBP36: SDS-PAGE (12,5% Acrylamid, Coomassie-Färbung) eines GST- Präzipitationsexperimentes. An 50 µl GSH-Sepharose wurde GST bzw. GST-FKBP36 immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Lysispuffer bzw. Rattenhodencytoplasma inkubiert (4h, 4°C), gewaschen und mit 50 µl Probenpuffer eluiert. Je 15µl der Elution wurden analysiert. Ausgeschnittene Proteinpopulationen sind mit 1-8 benannt und die massenspektrometrische Analyse ist in Tabelle 33 dargestellt.

Nr.	Genbank Eintrag Nr.	Protein	molekulare Masse (kDa)		Anzahl passender Peptide	Sequenzabdeckung (%)
			A	B		
1	AAA74950	Myosin	200	226,0	19	10,4
2	P11442	CLH	150	191,5	5	2,3
3	P34058	Hsp90	90	83,3	16	31,5
4	Q66HL1	Hsp72	71	69,6	27	39,5
4*	P63018	Hsc70	71	70,8	9	11,2
5	P68370 Q3KRE8	Tubulin α Tubulin β	48 50,1	49,9	21	33,7
6	P60711	Beta-Aktin	41	41,7	12	19,4
7	P04797	GAPDH	37	35,8	7	25,7
8	Q6LDP3	GST	25-27	25,6	7	25

Tabelle 3: Identifizierte Bindepartner der Präzipitationsexperimentes: Die identifizierten Proteinspezies 1-8 sind in Abbildung 19 dargestellt. Hierbei entspricht 4 der Proteinbande bei ca. 71 kDa im Experiment mit GST-FKBP36 und 4* der Proteinbande mit identischen Laufverhalten im Experiment mit GST. In Proteinbande 5 konnten zu gleichen Teilen Peptide für Tubulin α und Tubulin β nachgewiesen werden. Die Proteinbanden, die mit 8 gekennzeichnet sind, enthielten alle GST spezifische Peptide, eine Zuordnung der genauen GST-Spezies war nicht möglich. B = theoretisches aus Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht, A = das aus dem Gel abgeschätzte Molekulargewicht

spektrometrie (LC/ESI-Q-TOF) analysiert. Die mit Hilfe von Massenspektrometrie erhaltenen Peptidmassen wurden mit den Daten der SwissProt- und EMBL Datenbank verglichen. Dabei wurden die Peptide mit den theoretischen Spaltmustern bekannter Proteine, die sich nach hypothetischem Trypsin Verdau ergeben, verglichen. Dieser Vergleich ermöglicht die Identifizierung isolierter Proteinspezies. Es wurden Myosin, CLH, Hsp90, Hsp72, Tubulin, Actin, GAPDH und GST identifiziert (Tabelle 3). Actin, Myosin und Tubulin wurden in GST-Kontrolle und GST-FKBP36-Experiment identifiziert und sind in der Literatur als häufige „Falschpositive“ von Interaktionsstudien beschrieben [Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002]. Peptide, die Mitgliedern der Hsp70-Proteinfamilie zugeordnet werden können, wurden sowohl in der GST-Kontrolle als auch im GST-FKBP36 Experiment identifiziert. Im Kontrollexperiment wurden Peptide identifiziert, die für Hsc70 spezifisch sind. Im Experiment mit GST-FKBP36 konnten keine Hsc70-Peptide nachgewiesen werden. Es wurden jedoch Peptide gefunden, die Hsp72 als Bindepartner identifizieren. CLH, Hsp90 und GAPDH wurden ausschließlich in Anwesenheit von GST-FKBP36 identifiziert.

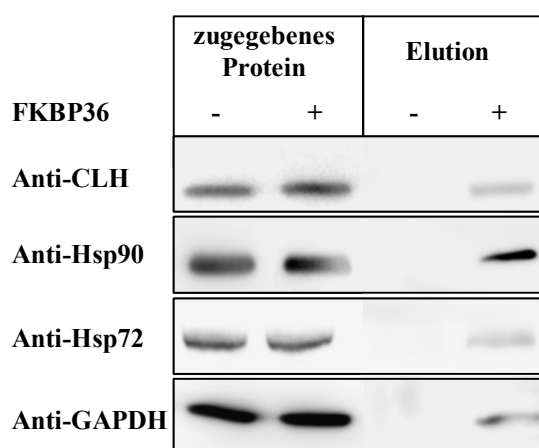


Abbildung 20: Western-Blot-Analyse identifizierter FKBP36-Bindepartner: Western-Blot-Analyse eines Präzipitationsexperimentes mit Strep-FKBP36. 50 μ l Streptactin-Sepharose mit Strep-FKBP36 bzw. das unbeladene Sepharosematerial wurden mit Hodencytoplasma inkubiert, gewaschen und mit 50 μ l Probenpuffer eluiert. Je 15 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Analyse erfolgte mit Hsp90-, Hsp72-, CLH- und GAPDH- Antikörpern.

Um artifizielle Einflüsse des GST-GSH-Sepharose-Systems weiter auszuschließen, wurde ein analoges Experiment mit *StreptagII* fusioniertem FKBP36 (Strep-FKBP36) und Streptactin-Sepharose durchgeführt. An Streptactin-Sepharose konnten wesentlich geringere Konzentrationen des Fusionsproteins immobilisiert werden, dies setzt die erreichbare Konzentration der kopräzipitierten Bindepartner im Experiment herab. Weiterhin besitzt dieses Sepharose-Material große Affinität zu einer Vielzahl von Proteinen des Zelllysates. Eine effiziente Vorreinigung des

Cytoplasmas durch mehrfache Vorinkubation mit Streptactin-Sepharose gelang nicht. Die Auswertung des Experiments nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zeigte keine Unterschiede zwischen Strep-FKBP36 Experiment und Kontrolle ohne FKBP36. Die Western-Blot-Analyse (Abbildung 20) dieses Experiments bestätigt jedoch eine spezifische Interaktion von Strep-FKBP36 mit GAPDH, Hsp72, Hsp90 und Clathrin. Keines dieser Proteine wurde von der Streptactin-Matrix ohne immobilisiertes Protein gebunden.

Die Ergebnisse zeigen, dass zwei verschiedene Affinitätssysteme CLH, Hsp90, Hsp72 und GAPDH als spezifische Bindepartner von FKBP36 identifizieren konnten. Im Folgenden wurden die einzelnen Interaktionen verifiziert.

3.9. Wechselwirkung zwischen FKBP36 und Hsp90

3.9.1. Expression und Reinigung von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹

Zahlreichen Studien belegen, dass die C-terminale Domäne von Hsp90 (Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹) nicht nur für die Dimerisierung des Proteins essentiell ist, sondern auch die Interaktion mit TPR-Domänen verschiedener Proteine vermittelt [Carello *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1998; Nemoto *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1998]. Für Proteininteraktionsstudien wurde die kodierende DNA-Sequenz von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ in pET28a und pGEXT4 kloniert. Die verwendeten Vektoren erlauben die Expression in *E.coli* mit N-terminaler His₆-Fusion bzw. GST-Fusion. Beide Varianten wurden bei 30°C in *E.coli* Rosetta (DE3) exprimiert.

Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ mit His₆-Fusion wurde in drei Schritten aus *E.coli* Lysat gereinigt. Zuerst passierte die lösliche Fraktion eine mit 10 mM Mes pH 6,8 equilibrierte Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule (30 ml). Der Durchlauf wurde mit 1 M Tris Lösung auf einen pH Wert von 7,5 eingestellt und auf eine Nickel-NTA-Affinitätssäule (5 ml) aufgetragen. Unspezifisch an das Säulenmaterial gebundene Proteine wurden mit Waschpuffer I abgetrennt und spezifisch gebundene Proteine mit einem Imidazolgradienten (50 mM bis 500 mM) eluiert. Zum Abschluss wurden die Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ enthaltenden Fraktionen bei pH 7,5 auf eine Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule (2 ml) aufgetragen und mit 300 mM NaCl eluiert. Es wurden 50 mg zur Homogenität gereinigtes Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ erhalten. In Gelfiltrationsexperimenten wurde eine Dimerisierung von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ beobachtet, welches auf eine funktionelle Faltung dieser rekombinanten Hsp90-Domäne hinweist.

GST- Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ wurde in einer 6 l Überexpressionskultur, wie oben beschrieben, exprimiert. Aus der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses wurde mit Hilfe einer GSH-Affinitätschromatographie (1 ml GSH-Sepharose) GST- Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ in einem Schritt gereinigt. Die Analyse durch SDS-

PAGE zeigte zusätzlich zum Hauptprodukt Verunreinigungen, die bis zu 10 kDa unter dem Hauptprodukt migrierten. Die massenspektrometrische Analyse identifizierte die Nebenprodukte als C-terminal verkürzte Fragmente des Hauptprodukts. Diese konnten durch keinen weiteren Chromatographieschritt entfernt werden. Das Protein wurde gegen 20 mM Tris pH 7,5 dialysiert und gelagert.

3.9.2. Subzelluläre Verteilung von Hsp90

Die subzelluläre Verteilung von Hsp90 wurde, anhand der im Kapitel 3.7.1. beschriebenen Fraktionen einer differentiellen Zentrifugation und Extraktion zu Gewinnung von Cytosol, Zellkernen, Bestandteilen von Clathrin bedeckten Vesikeln und membrangebundenen Proteinen, charakterisiert. Fraktionen, die aus Hoden und Leber von Ratten gewonnen wurden, wurden durch einen Western-Blot mit Anti- Hsp90-Antikörpern analysiert (Abbildung 21)

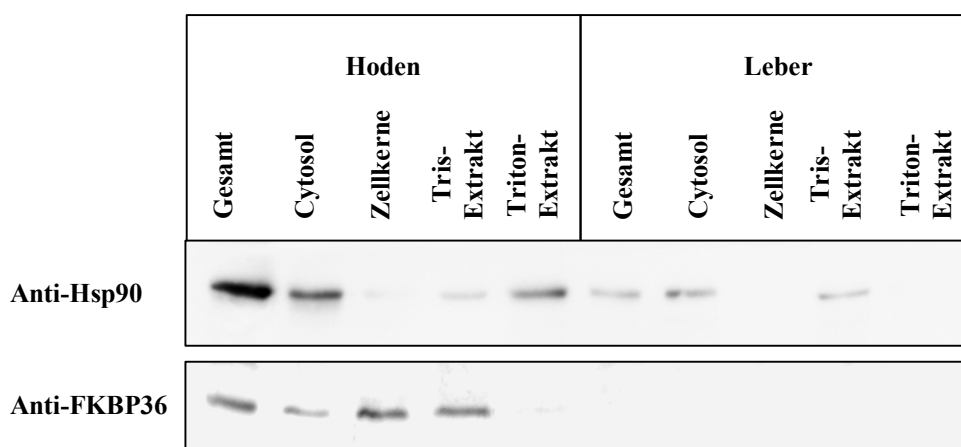


Abbildung 21: Western-Blot-Analyse einer Zellfraktionierung mit Anti-Hsp90-Antikörpern. Gesamtzelllysate aus Rattenhoden (links) bzw. Leber (rechts) wurden in Cytosol und Zellkerne fraktioniert. Aus der Membranfraktion wurden durch Tris- bzw. Triton-Extraktion Clathrin bedeckte Vesikel bzw. Membran Proteine angereichert. Je 10 µg Protein wurde mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Anti-Hsp90-Antikörpern und FKBP36-Antiserum analysiert.

In beiden Organen wurde die höchste Konzentration an Hsp90 im Cytosol und geringere Konzentrationen in der Fraktion mit Bestandteilen von Clathrin-bedeckten Vesikeln nachgewiesen. Im Hoden wurde Hsp90 weiterhin in der Membranproteinfraktion detektiert. Ein Vergleich der Verteilungsmuster von Hsp90 und FKBP36 zeigt, dass eine Kolo-kalisierung und damit die Möglichkeit einer Interaktion nur im Cytosol oder den Clathrin-umhüllten Vesikel gegeben ist.

3.9.3. Hsp90-Binderegion in FKBP36

Um die Binderegion von Hsp90 in FKBP36 näher einzugrenzen, wurden GST-fusioniertes FKBP36 (GST-FKBP36), eine Variante, die die N-terminale Erweiterung und die FKBP-Domäne (GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵) sowie eine Variante, die die TPR-Domäne und C-terminale Erweiterung (GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷) umfasst, auf Interaktion mit Hsp90 aus dem Cytoplasma von Rattenhoden untersucht. Hierzu wurden GST, GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Cytoplasma inkubiert. Nach fünffachem Waschen wurde das Sepharose-Material mit 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Anschließend wurden 10 µl der Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Western-Blot-Analyse mit Hsp90-Antikörpern auf Hsp90 untersucht (Abbildung 22).

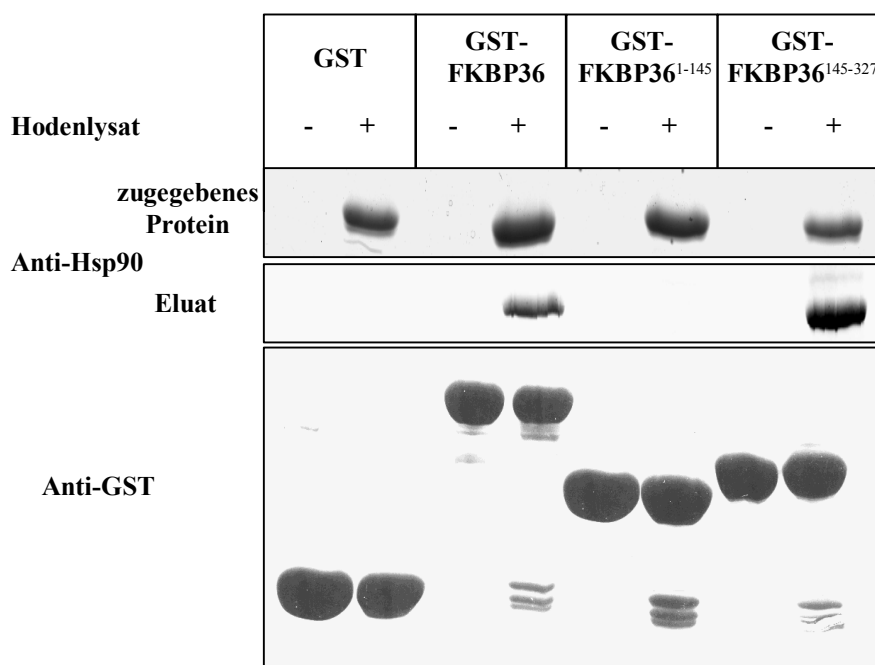


Abbildung 22: Interaktion von Hsp90 mit verschiedenen GST-FKBP36-Varianten. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. Je 30 µl GSH-Sepharose wurde mit GST, GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ bzw. GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ gesättigt. Die beladene Sepharose wurde mit Lysispuffer bzw. Hodencytoplasma inkubiert (2 h, 4°C), gewaschen und mit 40 µl Probenpuffer eluiert. Je 10 µl der Elution und 10 µl der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Hsp90- und Anti-GST-Antikörpern analysiert.

In Experimenten mit GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und der GST-Kontrolle wurde kein Hsp90 kopräzipitiert. Dagegen interagiert endogenes Hsp90 mit GST-fusioniertem FKBP36 und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷. In den zuvor beschriebenen Präzipitationsexperimenten interagiert Hsp90 mit FKBP36-Varianten, die die TPR-Motive und die C-terminale Erweiterung des Proteins enthalten. Ähnliche Erweiterungen bilden in verwandten Proteinen eine α -Helix aus, die im Zusammenhang mit der Stabilisierung des TPR/Hsp90-Komplexes diskutiert werden [Cheung-Flynn *et al.*, 2003; Allan *et al.*, 2006]. Obwohl

der C-Terminus einiger PPIasen mit TPR-Motiv keinen Einfluss auf deren Interaktion mit Hsp90 zu haben scheint, ist bei anderen, wie z.B. FKBP51, dieser Bereich entscheidend für die Bindung an Hsp90. Zur Untersuchung der möglichen Funktion der C-terminalen FKBP36 Erweiterung bei der Bindung an Hsp90 wurden C-terminal verkürzte FKBP36 Fragmente hergestellt und mit endogenem Hsp90 inkubiert. Die Western-Blot-Analyse eines Kopräzipitationsversuches mit matrixgebundenen GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻²⁹⁸ und GST-FKBP36¹⁻²⁸⁶ und Cytoplasma aus Rattenhoden ist in Abbildung 23 gezeigt. Hsp90 interagiert mit allen Varianten in diesem Experiment. Eine densitometrische Auswertung zeigt, dass vergleichbare Menge Hsp90 präzipitert wurden. Daher wurde kein Einfluss der C-terminalen FKBP36 Erweiterung auf die Bildung des FKBP36/Hsp90-Komplexes festgestellt.

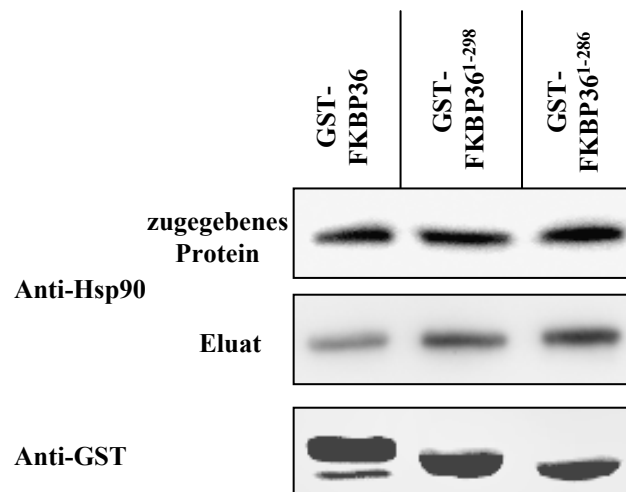


Abbildung 23: Interaktion von Hsp90 mit verschiedenen GST-FKBP36-Varianten. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST, GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻²⁹⁸ und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻²⁸⁶ immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Hodencytoplasma inkubiert (2 h, 4°C), gewaschen und mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Hsp90- und Anti-GST-Antikörpern analysiert.

3.9.4. FKBP36 Binderegion in Hsp90

Hsp90 ist aus drei Domänen mit unterschiedlichen Funktionen aufgebaut. Eine Identifizierung der FKBP36-Bindestelle in Hsp90 kann Aufschluss über die Funktion des Proteins im Komplex mit Hsp90 geben. Für eine Vielzahl von TPR-Domänen wurde die Bindung an die C-terminale Domäne von Hsp90 (Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹) gezeigt [Chen *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998]. Interagieren TPR-Domänen mit der C-terminalen Domäne von Hsp90, so ist Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ ein Kompetitor der Interaktion. Die Bindung an Hsp90 kann auch bei Proteinen mit TPR-Domäne außerhalb von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ erfolgen [Catlett *et al.*, 2006]. Einige dieser Interaktionen mit Hsp90 können abhängig

von ATP sein und sind durch die Inhibierbarkeit durch Geldanamycin charakterisiert [Yin *et al.*, 2006]. In einem Kopräzipitationsversuch wurde der Einfluss von Geldanamycin und Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion untersucht (Abbildung 24). Die Gegenwart von 5 μM Geldanamycin im Präzipitationsansatz hatte keinen Einfluss auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion. Die Zugabe von 50 μM Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ hemmte die Interaktion mit Hsp90 fast vollständig, während His₆-fusioniertes Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ an der FKBP36-Affinitätsmatrix bindet. Dieses Experiment zeigt, dass FKBP36 mit der C-terminalen Domäne von Hsp90 interagiert.

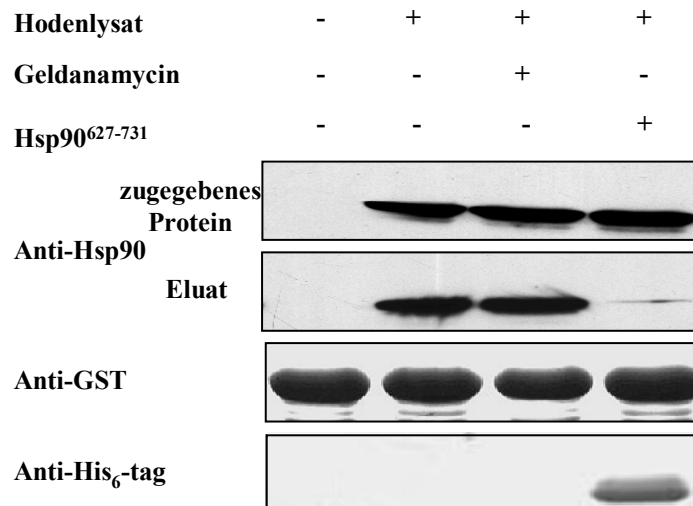


Abbildung 24: Interaktion von GST-FKBP36 mit der C-terminalen Domäne von Hsp90: Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. Mit GST-FKBP36 gesättigte Sepharose wurde mit Lysispuffer bzw. Hodencytoplasma versehen. Weiterhin wurden Reaktionsansätze 5 μM Geldanamycin bzw. mit 50 μM Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ zugesetzt. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Affinitätsmatrix gewaschen und mit 40 μl Probenpuffer eluiert. Je 10 μl der Elution und 10 μl des zugegebenen Proteins wurden auf einer SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Hsp90-Antikörpern analysiert. Mit Anti-His₆-Fusion-Antikörpern wurde Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ und mit GST-Antikörpern GST-FKBP36 im Eluat nachgewiesen.

3.9.5. Einfluss von Peptiden auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion

Für die Bindung von TPR-Domänen an Hsp90 ist der C-Terminus von Hsp90, bestehend aus den Aminosäuremotiv EEVD essentiell [Scheufler *et al.*, 2000]. Die Spezifität und Stabilität dieser Interaktion kann durch Aminosäuren, die N-terminal des EEVD-Motivs lokalisiert sind, beeinflusst werden [Carello *et al.*, 1999; Scheufler *et al.*, 2000]. In einem Kompetitionsversuch sollte untersucht werden, wieviele Aminosäuren des C-Terminus von Hsp90 hinreichend sind, um mit endogenem Hsp90 um die Bindung an FKBP36 zu kompetieren. Getestet wurden die letzten 104 Aminosäuren in Form der C-terminalen Domäne (Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹), die letzten 20 Aminosäuren (Hsp90C20), 7 Aminosäuren (Hsp90C7) und 5 Aminosäuren (Hsp90C5) des Hitzeschockproteins. Je 50 μM der Hsp90-Variante bzw. Peptide wurden mit Rattenhodenlysat und immobilisierten GST-FKBP36 inkubiert.

Alle getesteten Oligopeptide kompetieren mit Hsp90 (Abbildung 25). Bei Zugabe von Hsp90C20 und Hsp90C7 wurde die Menge des gebundenen Hsp90 deutlich reduziert. Die densitometrische Auswertung zeigte, dass in Anwesenheit von Hsp90C20 bzw. Hsp90C7 nur ca. 10 % des Hsp90 detektiert wurden, die im Kontrollexperimentes mit der FKBP36-Affinitätsmatrix nachgewiesen wurden. Weiterhin ließ eine densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analyse erkennen, dass bei Zugabe von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ und Hsp90C5 weniger als 1,0 % des endogenen Hsp90 an der FKBP36-Affinitätsmatrix gebunden hatte, als im Experiment ohne Peptidzugabe. Das geladene MEEVD-Motiv des Hitzeschockproteins ist ausreichend für die FKBP36/Hsp90-Interaktion.

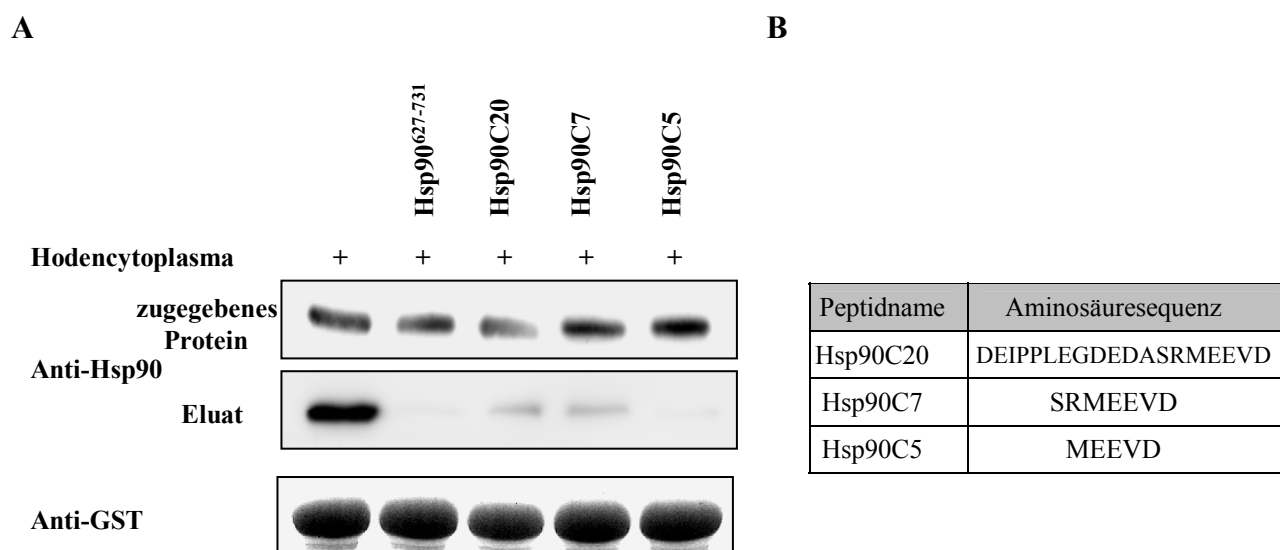


Abbildung 25: Einfluss unterschiedlicher Peptide auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion. **A:** Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes bei dem je 30 μ l GSH-Sepharose mit GST-FKBP36 gesättigt wurden. Die FKBP36-Affinitätsmatrix wurde mit Hodencytoplasma und je 50 μ M Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹, Hsp90C20, Hsp90C7 und Hsp90C5 inkubiert (2 h, 4°C). Die gewaschene FKBP36-Affinitätsmatrix wurde mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Hsp90- und GST-Antikörpern analysiert. **B:** Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide. Alle Peptide waren N-terminal acetyliert und C-terminal frei.

3.9.6. Einfluss niedermolekularer Verbindungen auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion

Novobiocin und cis-Platin sind niedermolekulare Verbindungen, deren Interaktion mit der C-terminalen Domäne von Hsp90 und eine daraus resultierend Hemmung der Interaktion zwischen TPR-Domänen und Hsp90 beschrieben ist [Allan *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2004; Rosenhagen *et al.*, 2003]. In Kopräzipitationsexperimenten mit immobilisierten GST-FKBP36 und Cytoplasma bzw. gereinigtem Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ wurde der Einfluss dieser Verbindungen auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion getestet. Unter Verwendung der Konzentrationen aus publizierter Literatur (5 mM Novobiocin und 10 μ M Cisplatin) wurde Aggregation der Proteine im Cytoplasma bzw. von

rekombinanten Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ beobachtet. In Konzentrationsbereichen, die keine Aggregation der Proteine verursachte, konnte kein Einfluss auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion beobachtet werden. Für die TPR-Domäne der PP5 ist eine Interaktion mit Arachidonsäure beschrieben [Chen & Cohen, 1997]. Arachidonsäure und Hsp90 kompetieren hierbei um die Bindung an PP5 [Zeke *et al.*, 2005]. Der Einfluss von Arachidonsäure auf die FKBP36/Hsp90-Interaktion wurde in Kopräzipitationsexperimenten untersucht. Die Zugabe von Arachidonsäure (bis zu Löslichkeitsgrenze) zum FKBP36/Hsp90-Komplex hatte keinen Einfluss auf die Interaktion beider Proteine.

3.9.7. Direkte Interaktion zwischen FKBP36 und Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹

Die bisher dargestellten Bindungsstudien untersuchten die FKBP36/Hsp90-Interaktion immer in Anwesenheit des komplexen Proteingemischs eines Zelllysates. Die Interaktionen von TPR-Domänen mit Hsp90 sind in der Regel direkt und werden nicht durch einen weiteren Faktor vermittelt [Young *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998]. Für FKBP38 wurde jedoch gezeigt, dass für eine Interaktion mit Hsp90 die Anwesenheit von CaM notwendig ist [Edlich *et al.*, 2007].

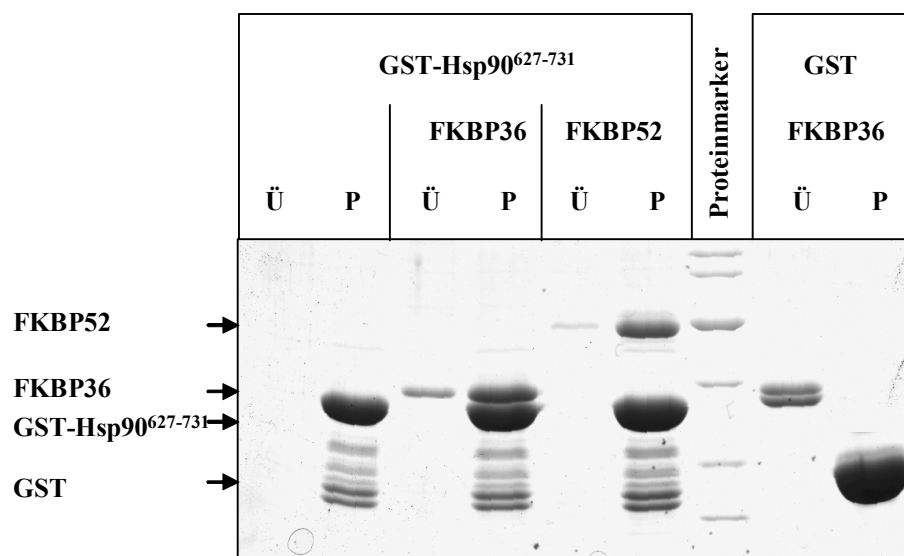


Abbildung 26: Interaktion von His₆-FKBP36 und FKBP52 mit GST-Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹. SDS-PAGE (15% Acrylamid, Coomassie-Färbung) eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 µl GSH-Sepharose wurden GST-Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ bzw. GST immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Lysispuffer, 10 µM His₆-FKBP36 bzw. 10 µM FKBP52 inkubiert (2 h, 4°C). Nach Waschen der Sepharose erfolgte eine Elution mit 30 µl Probenpuffer. Je 10 µl der Elution (P) und 10 µl des Überstandes nach der Inkubation (Ü) wurden analysiert.

Im Folgenden wurde untersucht, ob Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ direkt, ohne weitere Faktoren an FKBP36 bindet. Die Ergebnisse von Kopräzipitationsexperimenten mit immobilisierten GST-Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ und gereinigtem His₆-FKBP36 bzw. FKBP52 ist in Abbildung 26 dargestellt. Die beiden isolierten

FKBP interagierten mit der C-terminale Domäne des Hitzchockproteins. Eine densitometrische Auswertung zeigte, dass ca. 66 % des eingesetzten His₆-FKBP36 und ca. 77 % des eingesetzten FKBP52 an GST-Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ gebunden waren, während FKBP36 nicht mit GST interagierte.

3.9.8. Spektroskopische Charakterisierung des FKBP36/Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹-Komplexes

Die Interaktion zweier Proteine kann mit strukturellen Änderungen in mindestens einem der beiden Bindepartner verbunden sein. Betreffen diese Änderungen die unmittelbare Umgebung von aromatischen Aminosäuren, vor allem Tryptophan und Tyrosin, können Änderungen im Fluoreszenzspektrum beobachtet werden, da durch Veränderung in der Exposition von Aromaten zum Lösungsmittel dynamische Quenchvorgänge des angeregten Zustandes und damit die Fluoreszenzintensität beeinflusst werden. Bei Veränderungen in der Umgebung der Seitenketten von Tryptophanresten kann weiterhin eine Verschiebung des Intensitätsmaximums beobachtet werden.

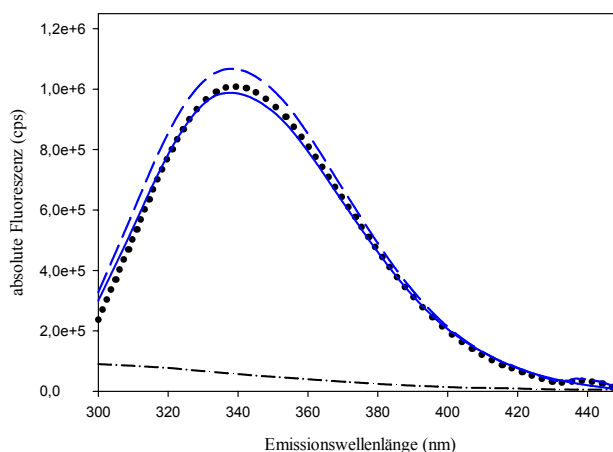


Abbildung 27: Veränderung der Fluoreszenzemission nach Bildung des FKBP36/HSP90⁶²⁷⁻⁷³¹-Komplexes. Fluoreszenzspektren von 0,5 μ M freien His₆-FKBP36 (.), 1 μ M freien Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ (---) sowie das theoretische (---) und gemessene Spektrum (—) des His₆-FKBP36/HSP90⁶²⁷⁻⁷³¹-Komplexes. Die Messungen erfolgten bei 20°C, in 20 mM Tris pH 7,5 und bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm.

Nach Anregung bei 280 nm wurde die Fluoreszenzemission von His₆-FKBP36 und Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ einzeln und nach dem Mischen detektiert. Dabei wurden Unterschiede in der Signalintensität des errechneten Additivspektrums und dem detektierten Spektrum von His₆-FKBP36 und Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ festgestellt (Abbildung 27). Das beobachtete *quenching* ist ein Hinweis auf die Bildung eines His₆-FKBP36/Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹-Komplexes. Da keine Veränderung in der Lage des Fluoreszenzmaximums beobachtet wurde, dürften keine Tryptophanreste an der Komplexbildung beteiligt sein. Ein analoges Experiment wurde mit His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ durchgeführt. Hierbei wurden

keine Unterschiede festgestellt. In Übereinstimmung mit dem Präzipitationsexperiment zeigte auch die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen Hsp90 und diesem Sequenzbereich von FKBP36.

Treten bei einer Interaktion Veränderungen im Sekundärstrukturgehalt mindestens einer der beiden Interaktionspartner auf, können diese mit Hilfe von Fern-UV CD-Spektroskopie identifiziert werden. In einer Doppelkammerküvette wurden die Fern-UV CD-Spektren von 2 μM His₆-FKBP36 und 4 μM Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ vor und nach dem Mischen bestimmt. Vor dem Mischen entspricht das beobachtete Spektrum dem Additiv-Spektrum der beiden Einzelproteinspektren. Eventuelle Veränderungen des Spektrums, die nach dem Mischen auftreten, sind Hinweise auf die Bildung eines FKBP36/Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹-Komplexes. Ein Vergleich der Spektren vor und nach dem Mischen zeigt eine Änderung im Bereich zwischen 205 nm bis 212 nm (Abbildung 28). Diese Unterschiede der CD-Spektren deuten auf Veränderungen in der Sekundärstruktur mindestens eines Bindepartners durch Bildung eines FKBP36/Hsp90-Komplexes.

Analoge Untersuchungen erfolgten mit His₆-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ sowie mit His₆-FKBP36 und den C-terminalen Peptiden von Hsp90 (Hsp90C5, Hsp90C7, Hsp90C20). In diesen Experimenten konnten auch nach Erhöhung der Konzentration der His₆-FKBP36-Variante auf 7,5 μM und der Peptidkonzentration auf 25 μM keine Unterschiede vor und nach dem Mischen detektiert werden.

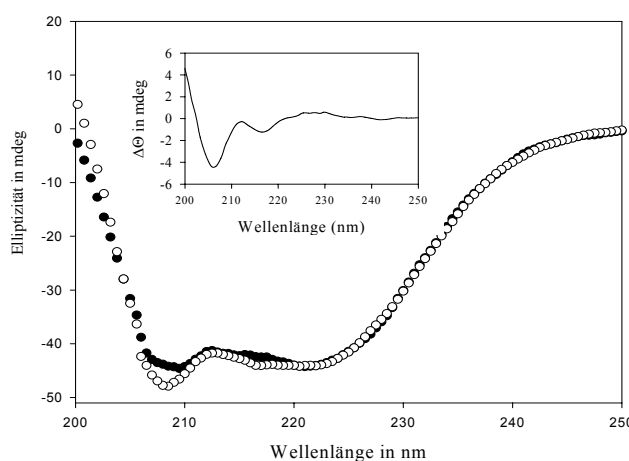


Abbildung 28: Charakterisierung der Sekundärstruktur von FKBP36 und Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ vor und nach der Komplexbildung. Fern/UV CD-Spektrum von 2 μM His₆-FKBP36 und 4 μM Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5. Die Spektren wurden in einer Doppelkammerküvette vor (\circ) und nach (\bullet) dem Mischen bei 20°C aufgenommen und sind pufferkorrigiert (Schichtdicke einer Kammer: 4,34 mm; 10 Akkumulationen, Integrationszeit 1s). Im Inset ist das Differenzspektrum (\circ - \bullet) dargestellt.

3.10. Wechselwirkung zwischen FKBP36 und Hsp72

3.10.1. Reinigung von Hsp72

3.10.1.1. Hsp72 Reinigung aus Gewebe

Hsp72 ist essentiell für die Spermatogenese und wird in hohen Konzentrationen im Hoden exprimiert [Eddy, 1999]. Die Präparation von *RnHsp72* erfolgte aus dem Cytosol von 6 Rattenhoden (ca. 4,5 g cytosolisches Protein). Dies bietet den Vorteil, endogenes Protein mit allen nativen Modifikationen zu erhalten. In Abbildung 29 ist die Reinigung schematisch dargestellt. Da endogenes *RnHsp72* im Coomassie-gefärbten PA-Gel nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Auswertung der einzelnen Reinigungsschritte mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse mit Anti-Hsp72 Antikörpern.

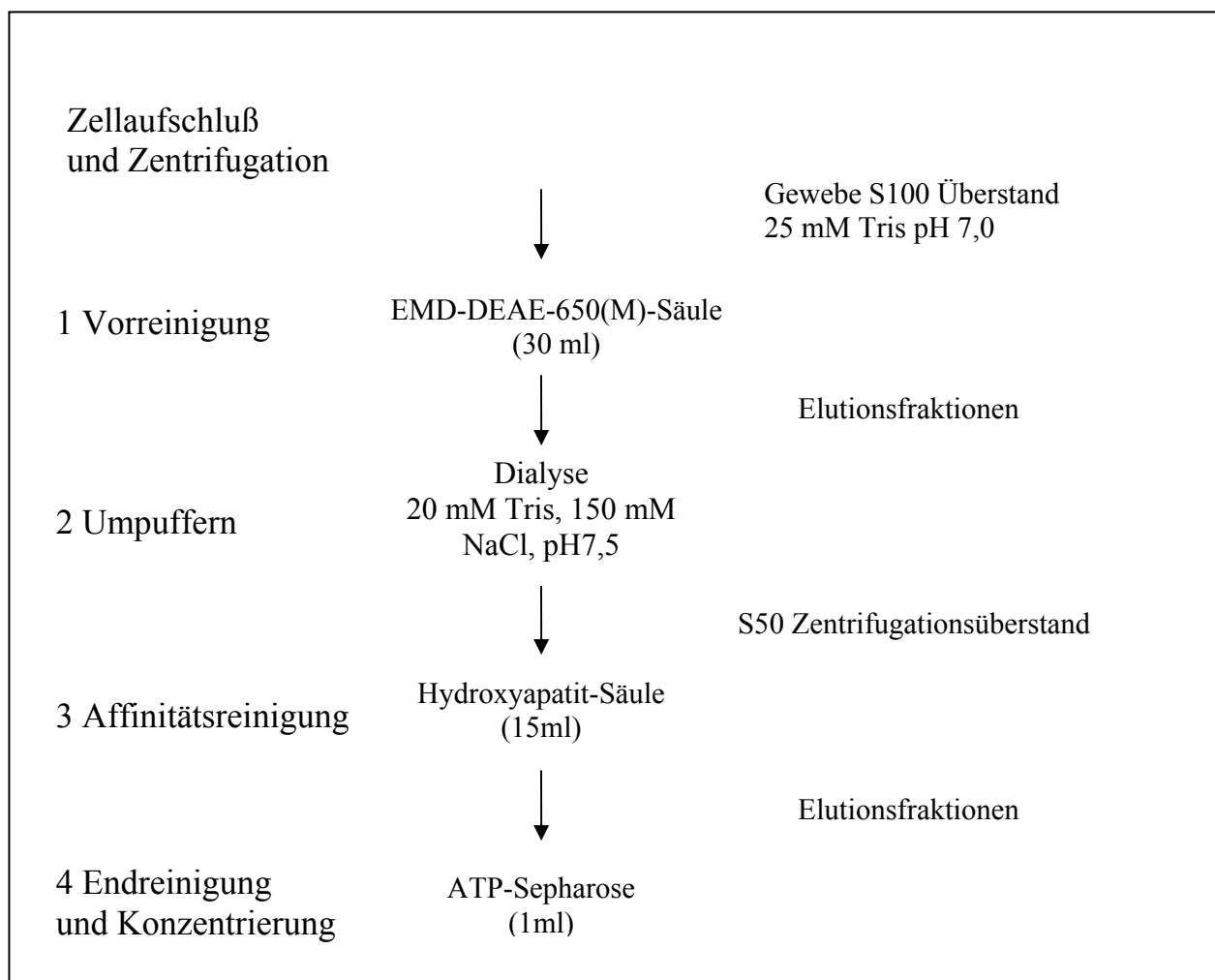


Abbildung 29: Der dargestellte Reinigungsablauf gilt für die Reinigung von endogenem Hsp72 aus dem Cytosol von Rattenhoden und rekombinanten Hsp72 aus *E.coli*. (Bei His₆-fusionierten Hsp72 aus *E.coli* folgte nach der DEAE Anionenaustauschchromatographie eine Affinitätschromatographie mit NiNTA Material)

Nachdem das Gesamtprotein aus Rattenhodencytosol gegen 25 mM Tris pH 7,5 dialysiert wurde, passierte es einen DEAE-Anionentauscher und wurde im steigenden NaCl Gradienten eluiert. Fraktionen, in denen *RnHsp72* angereichert vorlag, wurden gegen 20 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,5 dialysiert und auf eine Hydroxyapatitsäule aufgetragen. Bei der Reinigung mit Hydroxyapatit wird das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie mit einer spezifischen Komplexierung von Carboxylatgruppen kombiniert. Unter den gewählten Bedingungen haben nur wenige Proteine an das Säulenmaterial gebunden. Nach waschen mit 20 mM HEPES, 20 mM Na_2HPO_4 pH 7,5 wurde *RnHsp72* im steigenden Na_2HPO_4 Gradienten am Ende des Gradienten in hoher Reinheit eluiert. Im abschließenden Affinitätschromatographischen Schritt mit ATP-Sepharose wurden nur Proteine mit einer ATP-bindenden Domäne spezifisch an das Säulenmaterial gebunden. Nach Elution mit ATP wurde im Coomassie-gefärbten PA-Gel eine einzelne Bande bei ca. 70 kDa beobachtet. Diese Proteinspezies wurde durch Western-Blot-Analyse als Hsp72 identifiziert.

Im Hoden von Nagern und Mensch sind neben Hsp72 noch weitere cytosolische Mitglieder der Hsp70 Proteinfamilie beschrieben [Allen *et al.*, 1988; Maekawa *et al.*, 1989]. Die meisten von ihnen (Hsc70, Hsp71 und Hsp70L) besitzen ähnliche proteinchemische Eigenschaften, weshalb eine Anreicherung dieser Proteine ebenfalls wahrscheinlich ist. Da diese Hitzeschockproteine ein ähnliches Molekulargewicht besitzen, sind sie im PA-Gel nur schwer von Hsp72 zu unterscheiden. Eine Differenzierung ermöglicht eine isoelektrische Fokussierung, bei der Unterschiede der isoelektrischen Punkte genutzt werden.

50 μg des gereinigten Hsp70 wurden linear zwischen pH 3-11 isoelektrisch fokussiert und anschließend im PA-Gel aufgetrennt. Eine Coomassie-Färbung des Gels ermöglichte die Beobachtung von mindestens 4 Proteinpopulationen, die sich in der Probe befunden haben (Abbildung 30 A). Drei der Proteinpopulationen besaßen sehr ähnliche isoelektrische Punkte zwischen pH 5-6,5. Um diese besser zu separieren, wurden 25 μg des gereinigten Proteins aus Rattenhodencytoplasma zwischen pH 4-7 fokussiert und im 10%-igen PA-Gel aufgetrennt (Abbildung 30 B). Für die Identifizierung der Proteine wurden die Proben der Proteinpopulationen aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch analysiert. Der Vergleich der erhaltenen Peptidmassen mit theoretischen Peptidmassen, die aus der Proteolyse bekannter Proteine mit Trypsin resultieren, erfolgte mit der Swiss Prot- und EMBL-Datenbank. Es wurden *RnHsc70*, *RnHsp72* und *RnHsp70L* identifiziert (Tabelle 44 gibt einen Überblick).

Eine densitometrische Auswertung des Gels in Abbildung 30 A zeigt, dass 79 % des gereinigten Hsp70 aus Hoden von *RnHsp72* gebildet wurde. Für *RnHsp72* wurde eine Fokussierung mit

unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (IEP) beobachtet. Veränderungen des IEP eines Proteins können ein Hinweis auf posttranslationale Modifikationen des Proteins sein, diese wurden jedoch massenspektroskopisch nicht nachgewiesen.

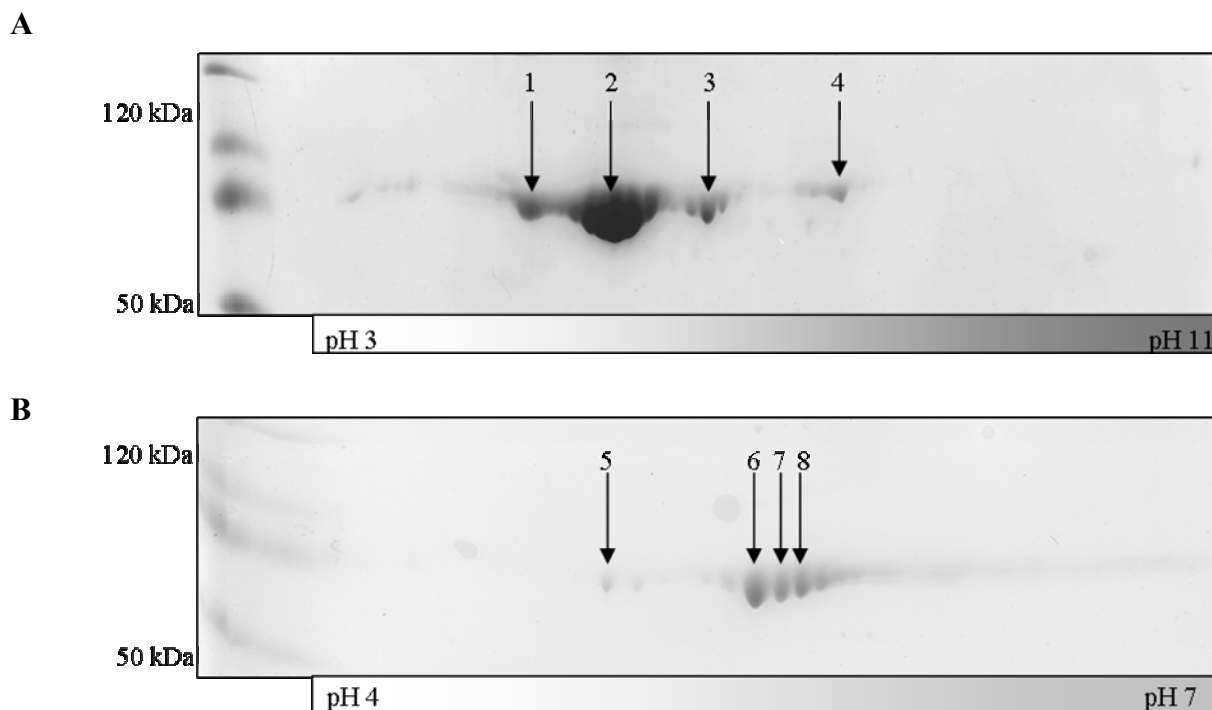


Abbildung 30: Zweidimensionale Auftrennung von gereinigtem Hsp70 aus Rattenhoden: A: 50 µg gereinigtes Hsp70 aus Rattenhoden wurde zwischen pH 3-11 isoelektrisch fokussiert und anschließend im 10%-igen PA-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt. B: 25 µg gereinigtes Hsp70 wurde zwischen pH 4-7 isoelektrisch fokussiert und anschließend im 10%-igen PA-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

Nr.	Genbank Eintrag Nr.	Protein	IEP		Anzahl passender Peptide	Sequenzabdeckung (%)
			A	B		
1	P63018	<i>RnHsc70</i>	5,37	5,0	21	43,6
2	P14659	<i>RnHsp72</i>	5,51	5,5	23	42,4
3	P14659	<i>RnHsp72</i>	5,51	6,0	19	39,3
4	P55063	<i>RnHsp70L</i>	5,91	7,7	16	30,4
5	P63018	<i>RnHsc70</i>	5,37	4,9	4	6,3
6	P14659	<i>RnHsp72</i>	5,51	5,5	8	11,9
7	P14659	<i>RnHsp72</i>	5,51	5,7	5	7,2
8	P14659	<i>RnHsp72</i>	5,51	5,8	3	4,2

Tabelle 4: Auswertung der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine der 2D-Gelelektrophorese gereinigter Hsp70 Proteine. Die Nummerierung 1-8 beziehen sich auf Abbildung 30. IEP= isoelektrischer Punkt der Proteine; A = theoretischer aus Aminosäure-Sequenz berechneter IEP, B = aus dem Gel abgeschätzter IEP

3.10.1.2. Hsp72 Expression und Reinigung aus *E.coli*

Zur präparativen Herstellung von Hsp72 wurde dieses Hitzschock Protein in *E.coli* rekombinant hergestellt. Hsp72 aus Mensch und Ratte besitzen 98 % Sequenzidentität und vergleichbare isoelektrischen Punkte (human pI: 5,56 bzw. *R. norvegicus* pI: 5,51), weshalb es möglich war, das Reinigungsschema zur Gewinnung von endogenem Protein aus Rattenhoden auf die Reinigung von rekombinanten Hsp72 aus *E.coli* anzuwenden. Zur Abtrennung des DnaK, der Hsp70-Vertreter aus *E.coli*, welches ähnliche proteinchemische Eigenschaften wie Hsp72 besitzt, wurden zwei Strategien verfolgt.

In der ersten Strategie erfolgte die Trennung von Hsp72 und DnaK auf genetischer Ebene. Hierzu wurde Hsp72 in einem DnaK-deletierten *E.coli* Stamm (MC4100 Δ DnaK52) exprimiert. Der verwendete Expressionsvektor (Hsp72pSM) kodiert für Hsp72 ohne Erweiterung. In diesem System war die Hsp72 Expressionsrate gering. Weiterhin lag ein Großteil des rekombinanten Proteins unlöslich als Einschlußkörperchen vor.

Die zweite Strategie verfolgte eine chromatographische Abtrennung von DnaK, wobei Hsp72 als N-terminale His₆-Fusion in *E.coli* Rosetta Zellen exprimiert wurde. Die Fusion vermittelt die Interaktion mit NiNTA-Material, an das DnaK nicht bindet. Dieses *E.coli* Expressionssystem hatte den Vorteil, dass wesentlich mehr Hsp72 löslich exprimiert wurde.

Bei der Reinigung beider Hsp72-Varianten aus *E.coli* wurden Unterschiede im Vergleich zum authentischen Protein beobachtet. Im ersten Reinigungsschritt passierten die beiden Hsp72 Varianten aus *E.coli* genau wie authentisches *RnHsp72* aus Hoden einen DEAE-Anionentauscher bei pH 7,0. Authentischen Protein wurde unter diesen Bedingungen vollständig gebunden. Sowohl die Hsp72-Variante ohne His₆-Fusion als auch die His₆-fusionsierte Variante aus *E.coli* befanden sich zu großen Teilen im Effluat der Säule. Weder das Erhöhen der Säulenkapazität, noch des pH-Wertes auf pH 8,6 konnte die Bindekapazität gegenüber rekombinanten Hsp72 erhöhen. Die Fraktionen des rekombinanten Proteins, die mit dem authentischen *RnHsp72* vergleichbare Eigenschaften besaßen, wurden weiter aufgearbeitet. In der Hydroxyapatitchromatographie wurden keine Unterschiede beobachtet. Im abschließenden Affinitätsreinigungsschritt mit ATP-Sepharose wurde *RnHsp72* aus Hoden vollständig an die Säulenmaterial gebunden. Die in *E.coli* produziertem Hsp72-Varianten befanden sich hingegen vollständig im Effluat der Säule. Da in *E.coli* exprimiertes Hsp72 keine Affinität zu ATP-Sepharose besitzt, ist die ATPase-Domäne des rekombinanten Hsp72 möglicherweise nicht funktionell gefaltet.

3.10.2. Expression und Reinigung der C-terminalen Domänen verschiedener Hsp70

Untersuchungen weisen eine Interaktion unterschiedlicher Mitglieder der Hsp70-Proteinfamilie mit TPR-Domänen nach [Carrello *et al.*, 2004; Cliff *et al.*, 2006;]. Dabei wird die Interaktion durch die C-terminale Domäne der Hsp70-Proteine vermittelt [Wu *et al.*, 2001].

Die C-terminalen Domänen verschiedener Mitglieder der Hsp70 Proteinfamilie wurden kloniert, exprimiert und gereinigt. Hierzu wurden die korrespondierenden DNA-Sequenzen von Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹, Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁵⁰, Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹ aus Mensch in pET28a kloniert. Für die Expression wurden die His₆-fusionierten Varianten in *E.coli* BL21 (DE3) Codon plus RIL-Zellen transformiert und wie in Kapitel 2.2.1.1. beschrieben exprimiert. Alle Varianten konnten in 3 Chromatographie-schritten zur Homogenität gereinigt werden. Nachdem die lösliche Fraktion des *E.coli* Lysats eine mit 10 mM Mes (pH 6,6) equilibrierte Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule (30 ml) passiert hatte, wurde der Durchlauf mit 1 M Tris-Lösung auf pH 7,5 eingestellt und auf eine Nickel-NTA-Affinitätssäule (5 ml) aufgetragen. Das Säulenmaterial wurde mit 500 mM NaCl und 50 mM Imidazol gewaschen und spezifisch gebundene Proteine im Imidazolgradienten (50 mM bis 500 mM) eluiert. Zum Abschluss wurden Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten bei pH 7,5 auf eine Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule (2 ml) aufgetragen und mit 300 mM NaCl eluiert. Aus 6 Litern Expressionskultur wurden im Durchschnitt 35 mg der gereinigten C-terminalen Domänen erhalten.

3.10.3. Subzelluläre Verteilung von Hsp72

Cytosol, Zellkerne, Bestandteile von Clathrin bedeckten Vesikeln und Membran gebundene Proteine wurde aus Hoden und Leber von Ratten präpariert (Kapitel 3.7.1.). Die Verteilung von Hsp72 in diesen Fraktionen wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 31).

In Leber wurde kein Hsp72 identifiziert, während in allen aus Hoden gewonnen Fraktionen Hsp72 nachgewiesen wurde. Im Cytosol, Zellkernen und der Fraktion mit Bestandteilen Clathrin-bedeckter Vesikel lag Hsp72 in höheren Konzentrationen vor, wobei im Cytosol das stärkste Signal erhalten wurde. In der Membranproteinfraktion wurden nur sehr geringe Konzentration Hsp72 detektiert.

Der Vergleich mit dem Verteilungsmuster von FKBP36 zeigt eine ähnliche Verteilung beider Protein in der Zelle (Abbildung 31). Theoretisch ist die Bildung eines FKBP36/Hsp72-Komplexes in Cytosol, Zellkernen und Clathrin bedeckten Vesikeln möglich.

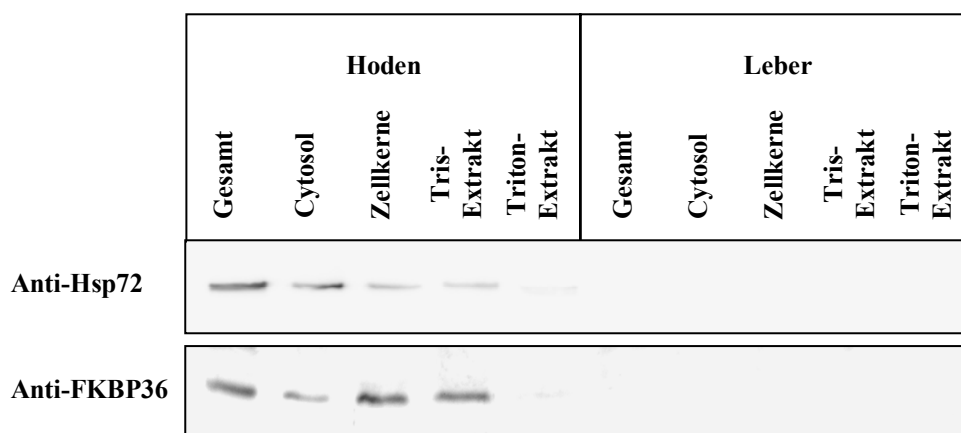


Abbildung 31: Western-Blot-Analyse einer Zellfraktionierung mit Anti-Hsp72 Antikörpern. Gesamtllysate aus Rattenhoden (links) und Rattenleber (rechts) wurden in Cytosol, Zellkerne und Membranfraktion fraktioniert. Aus der Membranfraktion wurden durch Tris- bzw. Triton-Extraktion Clathrin-bedeckte Vesikel bzw. Membranproteine angereichert. Je 10 µg Protein wurde mittels SDS-PAGE (10 %-igen Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Anti-Hsp72- und Anti-FKBP36-Antikörpern analysiert.

3.10.4. Hsp72-Binderegion in FKBP36

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Hsp72 und FKBP36 wurde der Sequenzbereich im FKBP36, der eine Interaktion mit Hsp72 vermittelt, eingegrenzt.

Hierzu wurden in einem Kopräzipitationsexperiment GST, GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Cytoplasma aus Rattenhoden inkubiert. Anschließend wurde in einer Western-Blot-Analyse kopräzipitiertes Hsp72 detektiert (Abbildung 32).

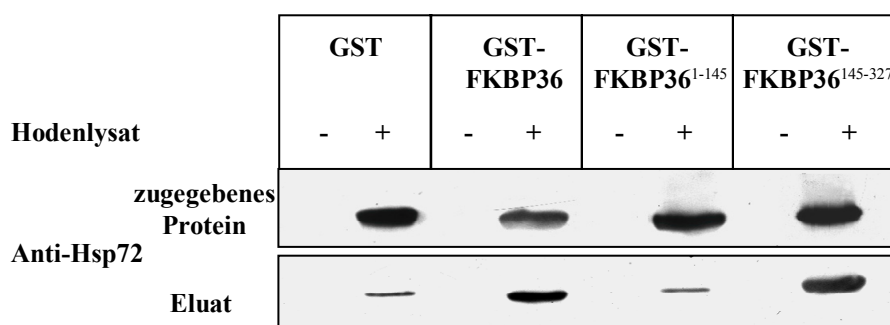


Abbildung 32: Interaktion von Hsp72 mit verschiedenen GST-FKBP36-Varianten. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. Je 30 µl GSH-Sepharose wurde mit GST, GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ bzw. GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ gesättigt und mit Lysispuffer bzw. Hodencytoplasma versetzt. Nach Inkubation (2 h, 4°C) wurde die Sepharose gewaschen und mit 40 µl Probenpuffer eluiert. Je 10 µl der Elution und 10 µl der Zugabe wurden mit Anti-Hsp72- Antikörpern analysiert.

Mit GST-FKBP36 und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ wurden deutlich größere Mengen Hsp72 kopräzipitiert als mit GST und GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵. Da mit GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ eine mit der GST-Kontrolle vergleichbare Menge Hsp72 präzipitiert wurde, interagiert Hsp72 nicht spezifisch mit FKBP36¹⁻¹⁴⁵. Mit GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ wurde deutlich mehr Hsp72 präzipitiert als im Kontrollexperiment, weshalb FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ eine spezifische Wechselwirkung mit Hsp72 vermittelt. Die Interaktion zwischen Hsp72 und GST beruht wahrscheinlich auf einer Peptidsequenz der verwendeten GST, welche Homologie zu bekannten Hsp70-Substraten aufweist [Rial & Ceccarelli, 2002].

Hsp72 bindet mit deutlich höherer Affinität an FKBP36-Varianten, die die TPR-Domäne und die C-terminale Erweiterung umfassen. Um eine mögliche Funktion der C-terminalen Erweiterung von FKBP36 bei der Interaktion mit Hsp72 zu untersuchen, wurde ein Kopräzipitationsexperiment mit C-terminal verkürzten FKBP36 Varianten durchgeführt (Abbildung 33). Mit einer um 29 Aminosäuren verkürzten GST-FKBP36 Variante (GST-FKBP36¹⁻²⁹⁸) wurde eine mit dem Vollängenprotein vergleichbare Menge Hsp72 aus dem Cytoplasma kopräzipitiert. Eine zusätzlich verkürzte Variante (GST-FKBP36¹⁻²⁸⁶) interagiert nicht mehr mit Hsp72. Damit bilden die Aminosäure His286-Ser297 des FKBP36 einen Bereich, der essentiell für die Interaktion mit Hsp72 ist.

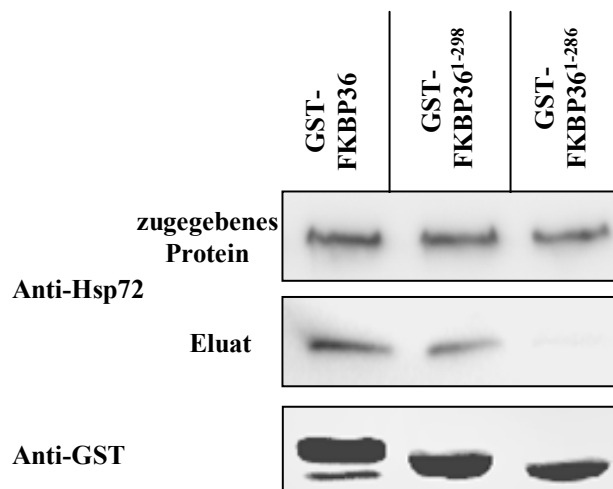


Abbildung 33: Interaktion von Hsp72 mit verschiedenen GST-FKBP36-Varianten. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻²⁹⁸ und GST-FKBP36¹⁻²⁸⁶ immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Hodencytoplasma inkubiert (2 h, 4°C), gewaschen und mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid, aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Hsp72-Antikörpern analysiert.

3.10.6. Direkte Interaktion zwischen FKBP36 und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹

Mit gereinigtem FKBP36 und GST-Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ wurde in einem Kopräzipitationsexperiment eine direkte Bindung der beiden Proteine nachgewiesen (Abbildung 34). Hierzu wurde GST-Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ an GSH-Sepharose immobilisiert und mit 7,5 μ M His₆-FKBP36 bzw. 7,5 μ M FKBP52 inkubiert.

Nach fünffachem Waschen erfolgte die Elution gebundener Proteine. Die Analyse im Coomassie gefärbtem PA-Gel zeigt eine Kopräzipitation von His₆-FKBP36 mit GST-Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹. FKBP52 bindet nicht an GST-Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹. GST-Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ diskriminiert zwischen FKBP36 und FKBP52.

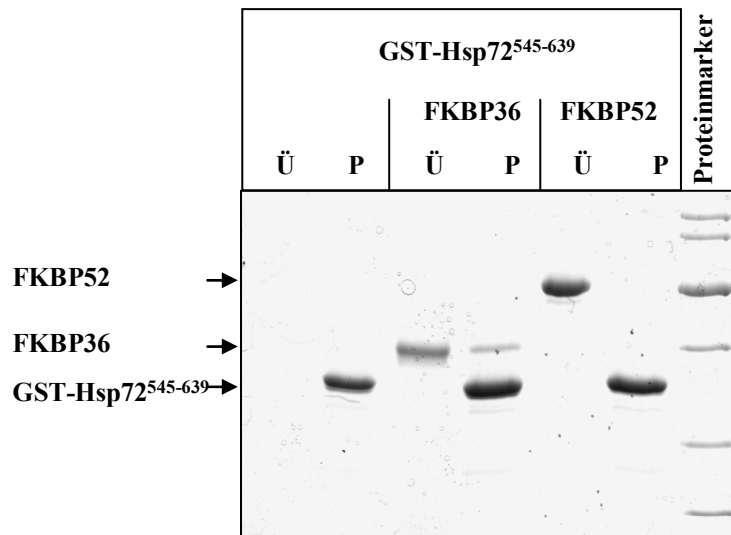


Abbildung 344: Bindung von FKBP36 an GST-Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹. SDS-PAGE (15% Acrylamid, Coomassie-Färbung) eines GST-Präzipitationsexperimentes. 30 µl GSH-Sepharose wurden GST-Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ gesättigt und mit Lysispuffer, 7,5 µM His₆-FKBP36 bzw. 7,5µM FKBP52 inkubiert (2 h, 4°C). Die gewaschene Sepharose wurde mit 30 µl Probenpuffer eluiert. Je 10 µl der Elution (P) und 10 µl des Überstandes nach der Inkubation (Ü) wurden analysiert.

3.10.5. Konkurrenz von Hsp72 und Hsp90 um FKBP36

Hsp90 und Hsp70 binden auf vergleichbare Weise an TPR-Domänen [Cliff *et al.*, 2006; Scheufler *et al.*, 2000]. Nicht alle TPR-Domänen diskriminieren vollständig zwischen beiden Hitzeschockproteinen. Einige TPR-Domänen interagieren mit Hsp90 und Hsp70, dabei kann eine Konkurrenz beider Hitzeschockproteine um die Bindestelle in der TPR-Domäne beobachtet werden [Carello *et al.*, 2004].

Für FKBP36 wurde eine Interaktion mit Hsp90 und Hsp72 nachgewiesen. Beide Hitzeschockproteine interagieren mit der TPR-Domäne von FKBP36, wobei die Konkurrenz um die Bindung an FKBP36 ein Hinweis auf eine gemeinsame Bindestelle beider Hitzeschockproteine wäre. Hierzu wurde GST-FKBP36 an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Cytoplasma inkubiert. Der Einfluss der Addition von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ bzw. Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ auf die Interaktion mit endogenem Hsp90 und Hsp72 wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 34). Gereinigtes Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ kompetierte nicht nur mit Hsp90 aus Cytoplasma um die Bindung an GST-FKBP36, sondern reduziert auch den Anteil an kopräzipitierten Hsp72. Die Zugabe von Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ hatte

einen vergleichbaren Effekt. Durch Zugabe dieser Hsp72-Domäne wurde die Interaktion mit Hsp72 und Hsp90 fast vollständig gehemmt, stattdessen interagierte Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ mit der FKBP36 Affinitätsmatrix. Die C-terminalen Domänen beider Hitzeschockproteine binden an FKBP36 und kompetieren miteinander.

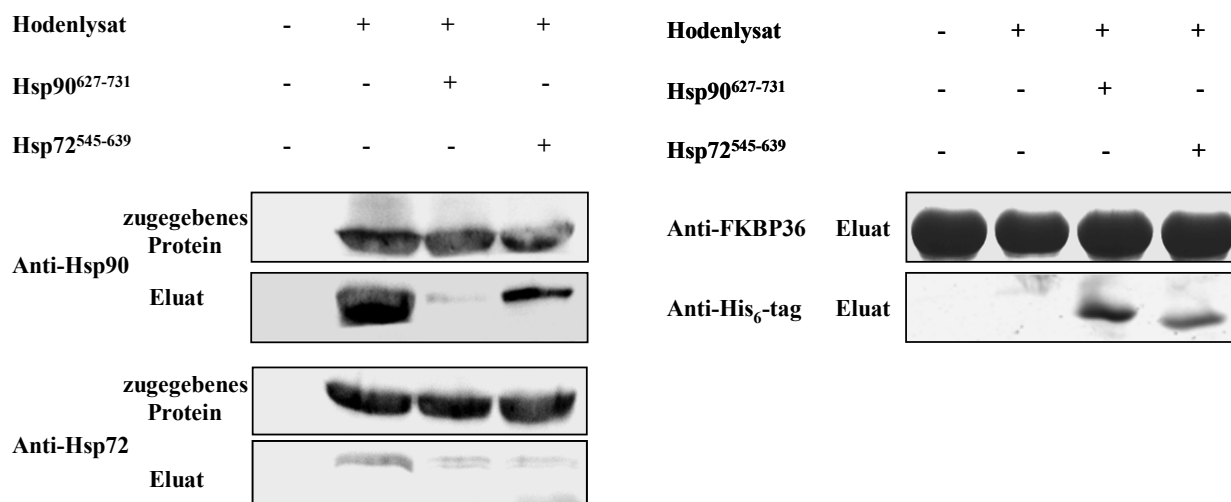


Abbildung 35: Einfluss von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ auf die Interaktion von Hsp72 und GST-FKBP36
 Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 µl GSH-Sepharose wurde GST-FKBP36 immobilisiert. Diese FKBP36-Affinitätsmatrix wurde mit Lysispuffer bzw. Hodencytoplasma und je 50 µM Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ bzw. Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ inkubiert (2 h, 4°C) und anschließend mit 40 µl Probenpuffer eluiert. Je 10 µl der Elution bzw. 10 µl der zugegebenen Proteinlösung wurden auf einer SDS-PAGE (10 % Acrylamid, für die Analyse mit Anti-His₆-Fusion Antikörper 15% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Hsp90- und Anti-Hsp72-Antikörpern analysiert. Mit Anti-His₆-Fusion-Antikörpern wurde rekombinantes Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ und mit GST- Antikörpern GST-FKBP36 im Eluat nachgewiesen

3.10.7. Bindestudien mit FKBP36 und C-terminalen Domänen von Hsp72-Homologen

Für die C-terminalen Domänen verschiedener Mitglieder der Hsp70 Proteinfamilie ist eine Interaktion mit TPR-Domänen beschrieben [Carrello *et al.*, 2004; Cliff *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2001].

Die gereinigten C-terminalen Domänen unterschiedlicher Hsp70 Vertreter wurden auf die Fähigkeit untersucht, an FKBP36 zu binden. In GST-Kopräzipitationsexperimenten wurde Matrix gebundenes GST-FKBP36 mit je 20 µM Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹, Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹, Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ bzw. Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹ inkubiert. Nach Waschen und Elution der FKBP36-Matrix erfolgte die Analyse von 10 µl der Elutionsfraktion mit einer 15%-igen SDS-PAGE. In der Coomassie-Färbung des PA-Gels wurde eine Kopräzipitation von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ mit GST-FKBP36 beobachtet (Abbildung 36 A). Interaktionen zwischen FKBP36 und Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ bzw. Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹ konnte mit Coomassie-Färbung nicht beobachtet werden. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit Anti-His₆-Fusion-Antikörpern durchgeführt (Abbildung 36 B). Hierbei wurden

neben Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ auch geringere Konzentrationen von Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶ und Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ im Präzipitat detektiert. In der Western-Blot-Analyse der GST Kontrolle konnte keine Kopräzipitation der C-terminalen Domäne nachgewiesen werden.

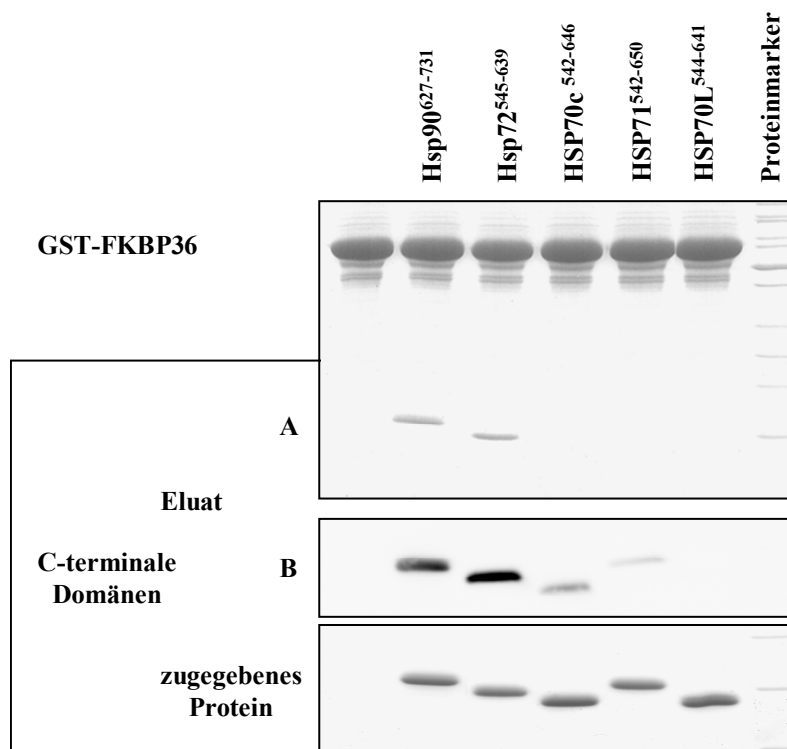


Abbildung 36: Bindestudie mit GST-FKBP36 und Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹, Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹, Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ bzw. Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹. Je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST-FKBP36 inkubiert. Die FKBP36-Affinitätsmatrix wurde mit Lysispuffer bzw. je 50 μ M Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹, Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹, Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹, Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹ inkubiert (2 h, 4°C). Die gewaschene Sepharose wurde mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution wurden auf einer SDS-PAGE (15 % Acrylamid) aufgetrennt und Coomassie gefärbt (A) bzw. mit einem Western-Blot analysiert (B). Mit Anti-His₆-Fusion-Antikörpern erfolgte der Nachweis der His₆-fusionierten C-terminalen Domänen der Hitzeschockproteine.

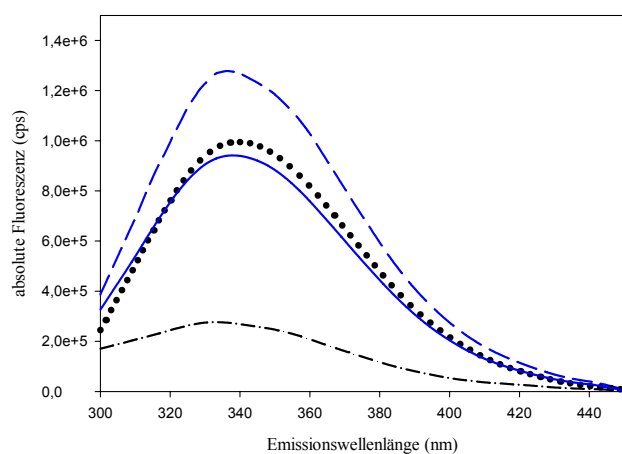
Weiterhin erfolgten spektroskopische Analysen der Bindung zwischen FKBP36 und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹, Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ bzw. Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹. Die Fluoreszenzemissionsspektren der isolierten Hsp70-Varianten, des isolierten FKBP36 sowie ein Gemisch aus Hsp70-Variante und FKBP36 wurden nach Anregung der Tyrosin- und Tryptophanseitenketten (280 nm) detektiert (Abbildung 37A)

Das theoretische Additivspektrum von FKBP36 und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ besaß eine höhere Signalintensität als das detektierte Fluoreszenzspektrum von einem Gemisch aus FKBP36 und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹. Das beobachtete *quenching* zwischen FKBP36 und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ gibt einen Hinweis auf eine Interaktion beider Proteine und bestätigt damit das Ergebnis der Kopräzipitationsexperimente. Eine

Verschiebung des Signalmaximums wurde nicht beobachtet, weshalb eine Beteiligung von Tryptophanresten an der Interaktion unwahrscheinlich ist.

Nach Mischen von FKBP36 mit Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ bzw. Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹ wurde kein Unterschied zwischen theoretischen und detektierten Fluoreszenzspektrum festgestellt (Abbildung 37B). Damit ergaben die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung, wie auch das Präzipitationsexperiment, keine Hinweise auf eine Interaktion von FKBP36 mit Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ bzw. Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹.

A



B

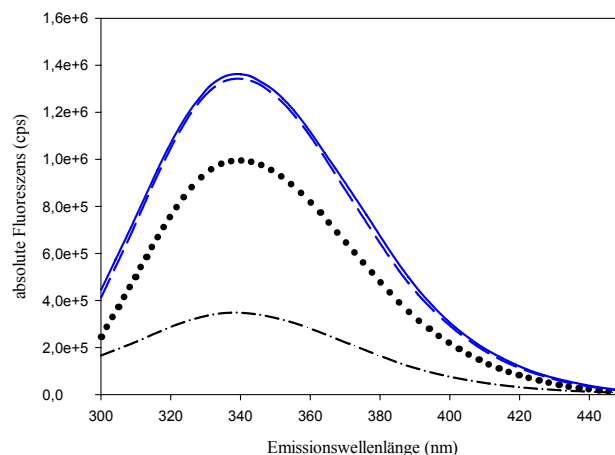


Abbildung 37: Veränderung der Fluoreszenzemission nach Bildung des FKBP36/Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹-Komplexes. **A:** Fluoreszenzspektren von 0,5 μ M freien His₆-FKBP36 (···), 1 μ M freien Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ (---) sowie das theoretische (---) und gemessene Spektrum (—) des His₆-FKBP36/Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ Komplexes. **B:** Fluoreszenzspektren von 0,5 μ M freien His₆-FKBP36 (···), 1 μ M freien Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹ (---) sowie das theoretische (---) und gemessene Spektrum (—) einer Mischung von 0,5 μ M His₆-FKBP36 und 1 μ M Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹. Die Messungen erfolgten bei 20°C, in 20 mM Tris pH 7,5 und bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm.

Weiterhin wurden Fern-UV CD-spektroskopische Untersuchungen von FKBP36 und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹, Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ bzw. Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹ in einer Doppelkammerküvette durchgeführt. Der Vergleich der Spektren vor und nach dem Mischen zeigte keine Änderungen und gibt damit keinen Hinweis auf eine Interaktion der Proteine.

3.10.8. Einfluss von Peptiden auf die FKBP36/Hsp72-Interaktion

Wie in Abbildung 36 und 37 gezeigt, diskriminiert FKBP36 zwischen Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹, Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶, Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹ und Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹. Dabei wurde deutlich mehr Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ gebunden als Hsc70⁵⁴²⁻⁶⁴⁶ und Hsp71⁵⁴²⁻⁶⁴¹. Eine Interaktion mit Hsp70L⁵⁴⁴⁻⁶⁴¹ wurde unter den verwendeten Bedingungen nicht beobachtet. Weiterhin interagiert FKBP36 mit Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹. Alle vorgestellten Hitzeschockproteine besitzen am C-Terminus das Aminosäuresequenzmotiv EEVD. Der C-Terminus aller cytosolischen Hsp70 Vertreter wird durch die 8 Aminosäurereste: GPTIEEVD

gebildet. Für die Bildung des FKBP36/Hsp90-Komplexes wurde die Bedeutung des Pentapeptids MEEVD gezeigt (Abbildung 25).

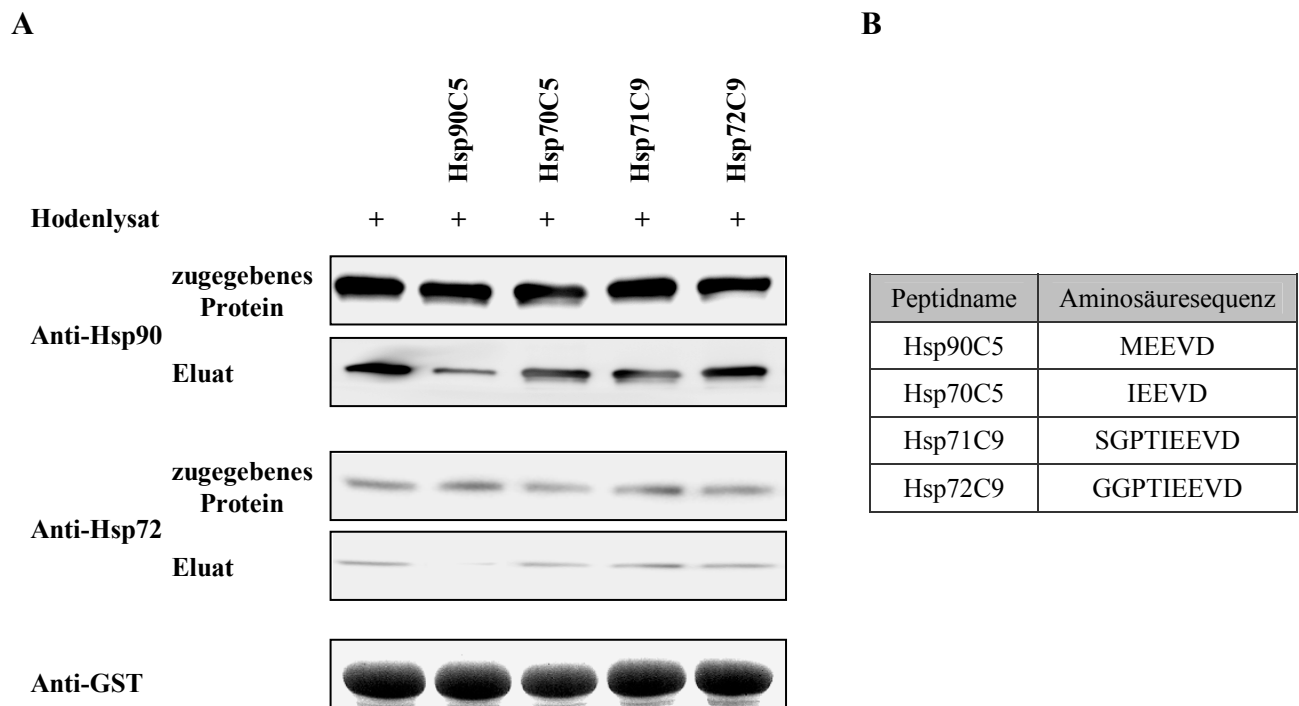


Abbildung 38: Einfluss unterschiedlicher Peptide auf die FKBP36/Hsp72-Interaktion. **A:** Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST-FKBP36 immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Hodencytoplasma und je 50 μ M Hsp90C5, Hsc70C5, Hsp71C9 und Hsp72C9 inkubiert (2 h, 4°C). Die gewaschene Sepharose wurde mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Hsp90-, Anti-GST sowie Anti-Hsp72-Antikörpern analysiert. **B:** Überblick über die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide. Alle Peptide waren N-terminal acetyliert und C-terminal frei.

In weiteren Konkurrenzexperimenten wurde das Pentapeptid IEEVD (Hsp70C5) und die Nonapeptide SGPTIEEVD (Hsp71C9) und GGPTIEEVD (Hsp72C9), die den C-Termini von Hsp71/Hsc70 bzw. Hsp72 entsprechen, untersucht. Matrix-gebundenes FKBP36 wurde mit Cytoplasma und 50 μ M des jeweiligen Peptides inkubiert. Anschließend wurde mit einer Western-Blot-Analyse gebundenes Hsp90 und Hsp72 identifiziert (Abbildung 38). Durch Zugabe von MEEVD wurde die Bindung von GST-FKBP36 an Hsp90 und an Hsp72 inhibiert. Beide Hitzeschockproteine scheinen an der Bindestelle, die durch das MEEVD-Peptid besetzt wird, zu binden.

Durch die Zugabe von IEEVD wurde die Interaktion zwischen GST-FKBP36 und Hsp90 bzw. Hsp72 nicht beeinflusst. Auch nach Erhöhung der Peptidkonzentration auf 200 μ M konnte keine Inhibition der Interaktion mit den Hitzeschockproteinen beobachtet werden.

Eine N-terminale Verlängerung des IEEVD-Peptids zu den verwendeten Nonapeptiden hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen GST-FKBP36 und den Hitzeschockproteinen.

3.11. Wechselwirkung zwischen FKBP36 und GAPDH

3.11.1. Binderegion von GAPDH in FKBP36

Mit Hilfe eines Kopräzipitationsexperimentes wurde die Binderegion von GAPDH in FKBP36 näher eingegrenzt. Hierzu wurden GST, GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Cytoplasma aus Rattenhoden inkubiert. Aus dem Cytoplasma adsorbierte GAPDH wurde mit einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 39). In Experimenten mit GST und GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ wurde keine GAPDH kopräzipitiert. Dagegen konnten GST-FKBP36 und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ GAPDH aus dem Cytosol an die Sepharose-Matrix überführen.

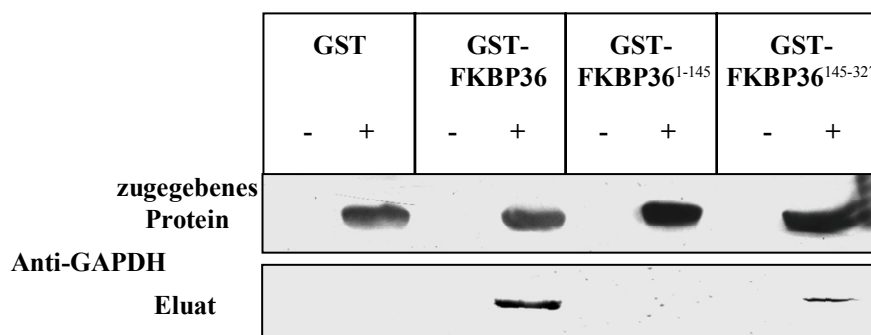


Abbildung 39: Bindestudie mit unterschiedlichen GST-FKBP36 Varianten und GAPDH. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 µl GSH-Sepharose wurden GST, GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Lysispuffer bzw. Hodencytoplasma inkubiert (2 h, 4°C), gewaschen und mit 40 µl Probenpuffer eluiert. Je 10 µl der Elution und 10 µl der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-GAPDH Antikörpern analysiert.

GAPDH interagiert mit FKBP36-Varianten, die neben der TPR-Domäne auch die C-terminale Erweiterung umfassen. Um eine mögliche Funktion der C-terminalen Erweiterung von FKBP36 bei dieser Interaktion zu untersuchen, wurden C-terminal verkürzte FKBP36-Varianten (GST-FKBP36¹⁻²⁹⁸ und GST-FKBP36¹⁻²⁸⁶) in einem Kopräzipitationsexperiment verwendet (Abbildung 40). Die Western-Blot-Analyse des Experimentes zeigt, dass alle FKBP36-Varianten mit GAPDH interagieren. Mit GST-FKBP36 und GST-FKBP36¹⁻²⁹⁸ wurden vergleichbare Mengen kopräzipitiert, während an die um 41 Aminosäuren verkürzte Variante GST-FKBP36¹⁻²⁸⁶ deutlich

geringere Mengen GAPDH gebunden wurde. Dies gibt einen ersten Hinweis auf eine wichtige Funktion der Aminosäure His286-Ser297 von FKBP36 bei der Bindung an GAPDH.

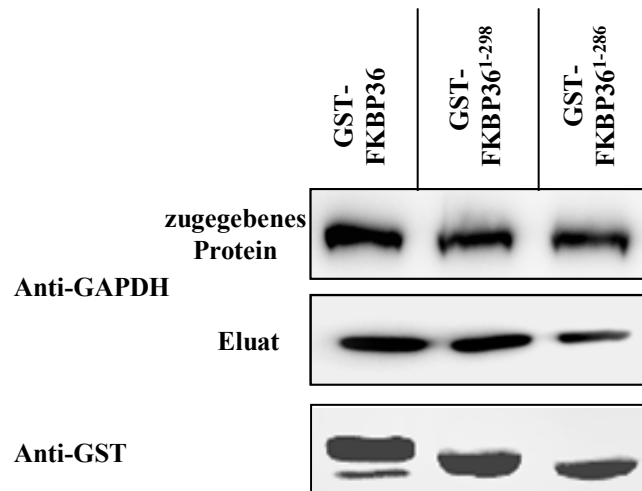


Abbildung 40: Interaktion von GAPDH mit verschiedenen GST-FKBP36-Varianten. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻²⁹⁸ und GST-FKBP36¹⁻²⁸⁶ immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Hodencytoplasma inkubiert (2 h, 4°C), gewaschen und mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-GAPDH- und Anti-GST-Antikörpern analysiert.

3.11.2. Einfluss von Hsp90 und Hsp72 auf die FKBP36/GAPDH-Interaktion

Für die TPR-Domänen verschiedener Proteine wurden Interaktionen mit Hsp90 und Rezeptoren an differentiellen Bindestellen beschrieben [Kazlauskas *et al.*, 2002; Owens-Grillo *et al.*, 1996, Silverstein *et al.*, 1999]. Hierbei ist die Interaktion des Rezeptors mit der TPR-Domäne einer PPIase unabhängig von der Hsp90 Interaktion und umgekehrt. Für die TPR-Domäne von FKBP36 wurde neben einer Interaktion mit Hsp90 und Hsp72 ebenfalls eine Bindung an GAPDH nachgewiesen (Abbildung 22, 32). Ein möglicher Einfluss der Interaktionspartner Hsp90 und Hsp72 auf die FKBP36/GAPDH-Interaktion wurde in einem Konkurrenzexperiment untersucht. Hierzu wurde GST-FKBP36 an GSH-Sepharose immobilisiert und mit Cytoplasma aus Rattenhoden inkubiert. Durch Zugabe von rekombinanten Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ bzw. Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ wurde die Interaktion mit den endogenen Hitzeschockproteinen aus dem Cytoplasma inhibiert. Die Western-Blot-Analyse mit GAPDH-Antikörpern zeigt, dass die Gegenwart von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ keinen Einfluss auf die FKBP36/GAPDH-Interaktion hatte (Abbildung 41). Daraus folgt, dass GAPDH und Hsp90 an unterschiedlichen Bereichen von FKBP36 binden. Andererseits wurde durch Zugabe von Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ die Interaktion zwischen FKBP36 und GAPDH fast vollständig inhibiert.

In weiteren Konkurrenzexperimenten mit zusätzlicher Zugabe von GAPDH wurde untersucht, ob entweder GAPDH und Hsp72 ähnliche Bindestellen in FKBP36 besetzen oder die Interaktion zwischen FKBP36 und GAPDH durch Hsp72 bedingt ist. Abbildung 41 zeigt, dass GAPDH-

Zugabe die Menge an FKBP36-gebundenem Hsp72 reduziert. Damit konkurrieren GAPDH und Hsp72 um die gleiche Bindestelle in FKBP36. Die Interaktion von FKBP36 mit Hsp90 wurde durch GAPDH-Zugabe nicht beeinflusst.

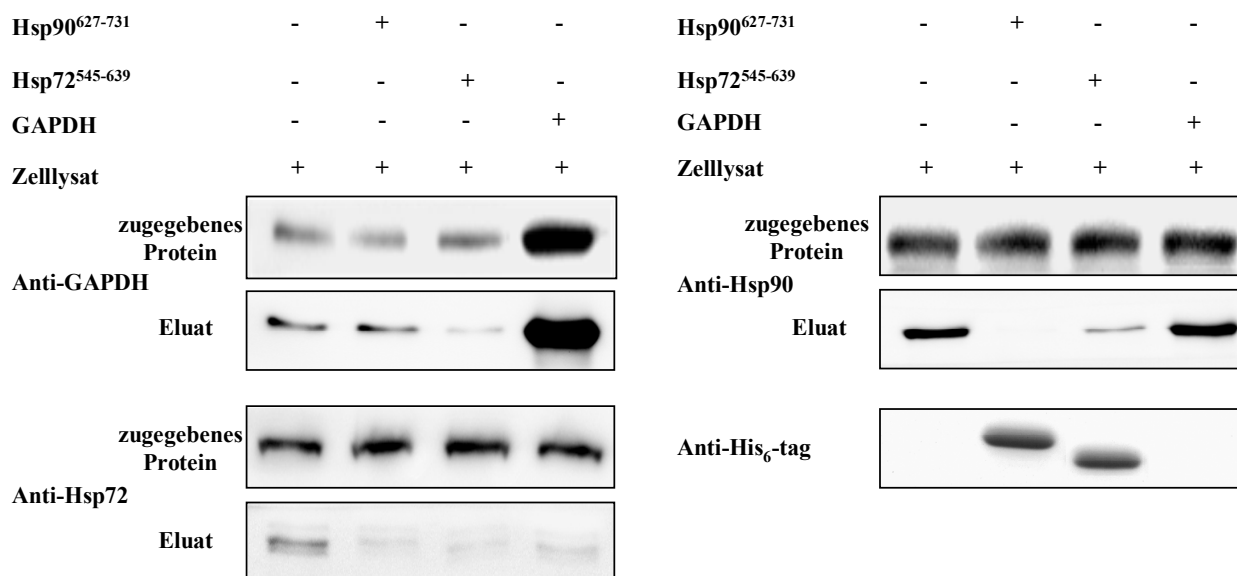


Abbildung 41: Einfluss von Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ und Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ auf die GAPDH/FKBP36-Interaktion Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurde GST-FKBP36 immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Hodencytoplasma und je 50 μ M Hsp90⁶²⁷⁻⁷³¹ bzw. Hsp72⁵⁴⁵⁻⁶³⁹ und 10 μ M GAPDH inkubiert (2 h, 4°C) und nach dem Waschen mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (10 % Acrylamid, für die Analyse mit Anti-His₆-Fusion-Antikörper 15% Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-Hsp90-, Anti-His₆-Fusion-, Anti-Hsp72- und Anti-GAPDH-Antikörpern analysiert.

3.11.3. Bindestudien mit gereinigter GAPDH und FKBP36

Ein Kopräzipitationsexperiment mit gereinigter GAPDH aus Kaninchenmuskel sollte untersuchen, ob GAPDH direkt und unabhängig von einem cytoplasmatischen Faktor an FKBP36 bindet. (Abbildung 42). Die Reinheit der eingesetzten GAPDH wurde zuvor im Coomassie-gefärbten PAGE gel geprüft. Dabei wurde neben GAPDH (Migration bei ca. 36 kDa) eine weitere Proteinpopulation, die bei ca. 24 kDa migrierte, beobachtet. Die massenspektrometrischen Analyse dieses Proteins identifizierte 13 Peptide, die der Aminosäuresequenz von GAPDH im Bereich zwischen den Aminosäuren Val2-Leu247 zugeordnet wurden. Die Verunreinigung der GAPDH-Probe entspricht einem C-terminal verkürzten Fragment von GAPDH. Im Kopräzipitationsexperiment mit GST-FKBP36 wurde nicht nur eine direkte Interaktion zwischen GAPDH und FKBP36, sondern auch mit der verkürzten GAPDH-Variante beobachtet. Dieses Ergebnis erlaubt den Schluss, dass das Segment Glu248-Glu333 der GAPDH nicht essentiell für eine Interaktion mit FKBP36 ist. Für GST allein wurde weder im Coomassie-gefärbten Gel noch in

der Western-Blot-Analyse eine Interaktion mit GAPDH oder der kürzeren GAPDH-Variante nachgewiesen.

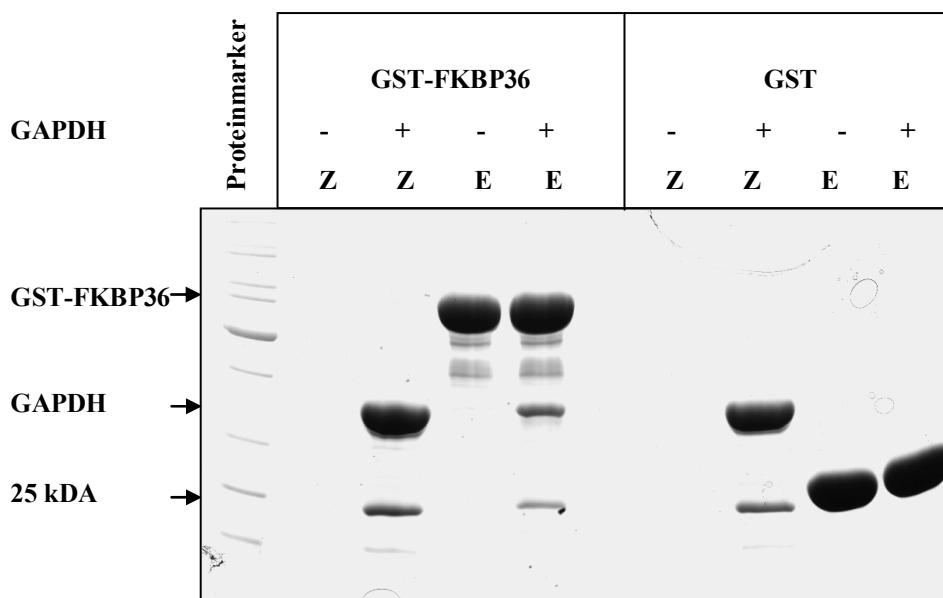


Abbildung 42: Bindung von GAPDH an eine FKBP36-Affinitätsmatrix. SDS-PAGE: (12,5% Acrylamid, Coomassie-Färbung) eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST FKBP36 bzw. GST immobilisiert. Die Affinitätsmatrix wurde mit Lysispuffer bzw. 25 μ M GAPDH inkubiert (2 h, 4°C). Die gewaschene Sepharose wurde mit 30 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution (E) und 20 μ l der Zugabe (Z) wurden analysiert.

3.11.4. Einfluss von GAPDH-Substraten auf die Interaktion mit FKBP36

GAPDH ist neben der oxidativen Phosphorylierung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA3P) in der Glykolyse auch an einer Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen beteiligt [Sirover, 1999; Chuang *et al.*, 2005; Hara & Snyder, 2006]. Hierbei können Substrate und Produkte der Glykolyse mit diesen nicht-glykolytischen Funktionen und Interaktionen der GAPDH interferieren.

In einem Kopräzipitationsexperiment wurde der Einfluss von NAD^+ , NADH, GA3P und Arsenat auf die GST-FKBP36/GAPDH-Interaktion untersucht. Cytoplasma aus Rattenhoden wurde mit jeweils 1 mM NAD^+ , NADH, GA3P bzw. Arsenat versetzt und mit der FKBP36-Affinitätsmatrix inkubiert. Nach Waschen und Elution wurden die Proben mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und kopräzipitiertes GAPDH mit einer Western-Blot-Analyse detektiert (Abbildung 43). Die Ergebnisse zeigen, dass GA3P und Arsenat im Präzipitationsexperiment keinen Einfluss auf die FKBP36/GAPDH-Interaktion haben. Aber die Zugabe von NAD^+ bzw. NADH inhibiert die FKBP36/GAPDH-Interaktion fast vollständig.

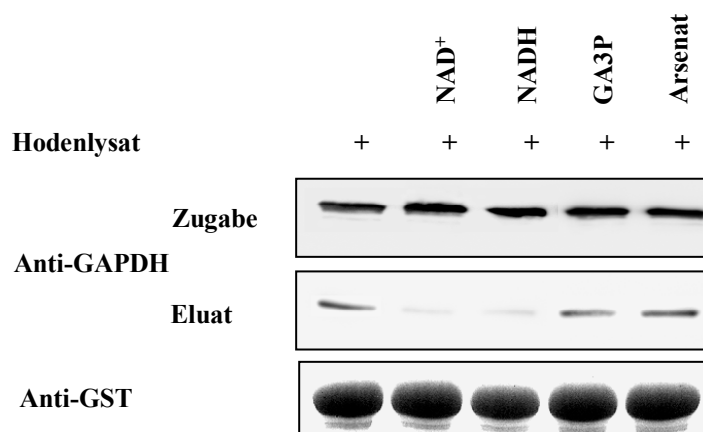


Abbildung 43: Einfluss unterschiedlicher GAPDH-Substrate auf die FKBP36/GAPDH-Interaktion Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST-FKBP36 immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Hodencytoplasma und je 1 mM NAD, NADH, GA3P und Arsenat inkubiert (2 h, 4°C). Die gewaschene Sepharose wurde mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-GST und Anti-GAPDH Antikörpern analysiert.

3.11.5. Einfluß des FKBP36 auf die GAPDH-Aktivität

In Kopräzipitationsexperimenten wurde gezeigt, dass NAD⁺ die Interaktion von FKBP36 mit GAPDH verhindert. Umgekehrt könnte FKBP36 die Bindung von NAD⁺ an GAPDH inhibieren. In diesem Fall würde die katalytische Aktivität der GAPDH durch FKBP36 verringert werden. GAPDH katalysiert die oxidative Phosphorylierung von GA3P zu 1,3-Bisphospho-D-Glycerat (BPG) unter Reduktion des Coenzym NAD⁺. Durch die Verwendung von Na-Arsenat statt Na-Phosphat wird die Reaktion irreversibel, da das entstehende Produkt 1-Arseno-3-Phospho-D-Glycerat instabil ist und dem Gleichgewicht entzogen wird.

Die Aktivität von GAPDH wurde in Gegenwart unterschiedlicher Substrat-, Coenzym- und His₆-FKBP36-Konzentrationen bestimmt. Unter Substratsättigung (1mM NAD⁺, 1mM GA3P) wurde eine geringe Inhibition der GAPDH-Aktivität durch His₆-FKBP36 beobachtet (Abbildung 44). Diese war abhängig von der His₆-FKBP36-Konzentration. Durch Zugabe von 2,48 μ M His₆-FKBP36 wurde die GAPDH-Aktivität um 12% vermindert. Eine Verringerung der GA3P-Konzentration auf 0,01 mM hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Inhibition durch His₆-FKBP36. Deutliche Inhibitionseffekte durch His₆-FKBP36 konnten bei niedrigen NAD⁺-Konzentrationen beobachtet werden. Mit 0,1 mM bzw. 0,01 mM NAD⁺ im Meßansatz wurden bei Zugabe von 2,48 μ M His₆-FKBP36 71 % bzw. 36 % GAPDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle bestimmt.

Nach Auftragung der reziproken Initialgeschwindigkeit gegen die reziproke NAD⁺-Konzentration in Gegenwart unterschiedlichen His₆-FKBP36-Konzentrationen wurden die Daten durch lineare

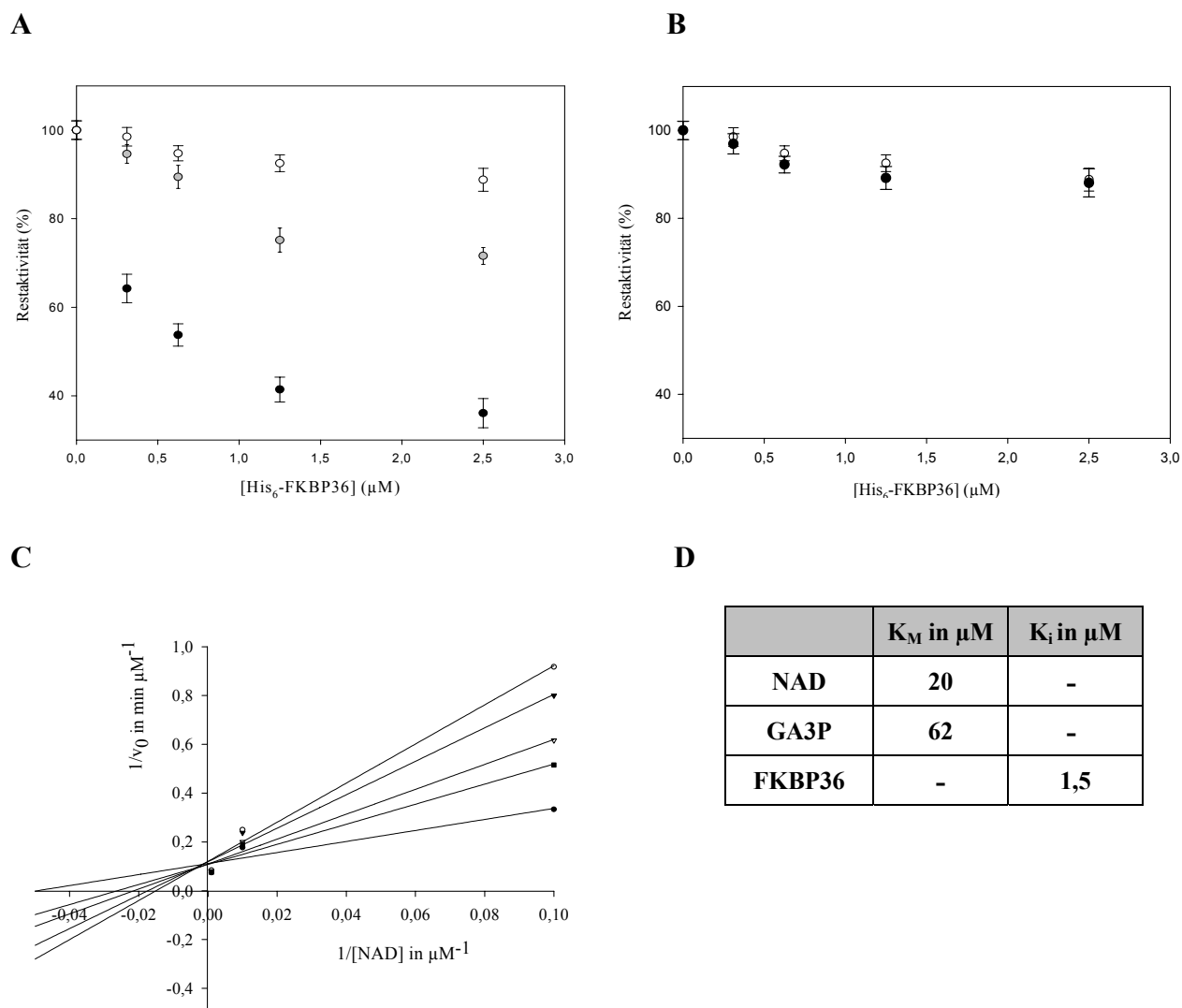


Abbildung 44: Inhibition der GAPDH-Aktivität durch FKBP36: Die Bestimmung der Initialgeschwindigkeit von $1 \mu\text{g/ml}$ GAPDH erfolgte in 50 mM Tris, $2,5 \text{ mM}$ EDTA, $2,5 \text{ mM}$ DTT, 20 mM Arsenat pH $7,8$ bei 20°C . Die Extinktionszunahme wurde bei 340 nm verfolgt. Es wurden $0 \mu\text{M}$; $0,31 \mu\text{M}$; $0,62 \mu\text{M}$; $1,24 \mu\text{M}$ und $2,48 \mu\text{M}$ His₆-FKBP36 zugegeben. **A:** 1 mM GA3P wurden mit 1 mM NAD⁺ (○), $0,1 \text{ mM}$ NAD⁺ (◻), $0,01 \text{ mM}$ NAD⁺ (●) inkubiert; **B:** 1 mM NAD⁺ und 1 mM GA3P (○), $0,01 \text{ mM}$ GA3P (●) **C:** doppelt reziproke Auftragung der in A dargestellten Messwerte. Die Linien stellen eine lineare Regression der Messpunkte bei unterschiedlichen FKBP36 Konzentrationen dar ($0 \mu\text{M}$ (●); $0,31 \mu\text{M}$ (■); $0,62 \mu\text{M}$ (▽); $1,24 \mu\text{M}$ (▼) und $2,48 \mu\text{M}$ (○) His₆-FKBP36). Aus den Anstiegen und Ordinatenabschnitten der Regressionsgeraden wurden die in D dargestellten Konstanten berechnet.

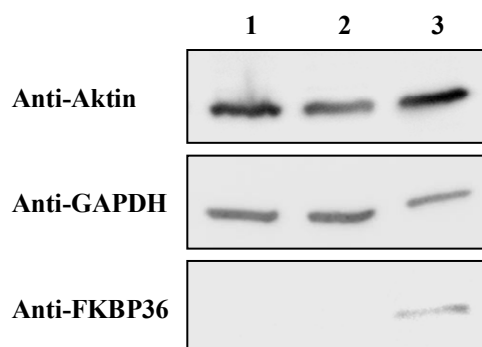
Regression angepasst. Die Regressionsgeraden der Messwerte bei verschiedenen FKBP36-Konzentrationen unterscheiden sich in ihren Anstiegen und schneiden im gleichen Punkt die Ordinate. Damit inhibiert FKBP36 die GAPDH-Aktivität durch Konkurrenz mit NAD⁺. Die Auftragung der Anstiege der Regressionsgeraden gegen die His₆-FKBP36 Konzentration ergibt für die Inhibition von GAPDH durch FKBP36 einen K_i von $1,5 \mu\text{M}$. Weiterhin wurde durch Auswertung aller erhaltenen Daten K_M -Werte von $20 \mu\text{M}$ für NAD⁺ und $60 \mu\text{M}$ für GA3P bestimmt. Diese Werte entsprechen den Angaben in der Literatur für Coenzym und Substrat [Nakamura *et al.*, 1984].

3.11.6. Regulation GAPDH-Aktivität in COS-7-Zellen durch FKBP36

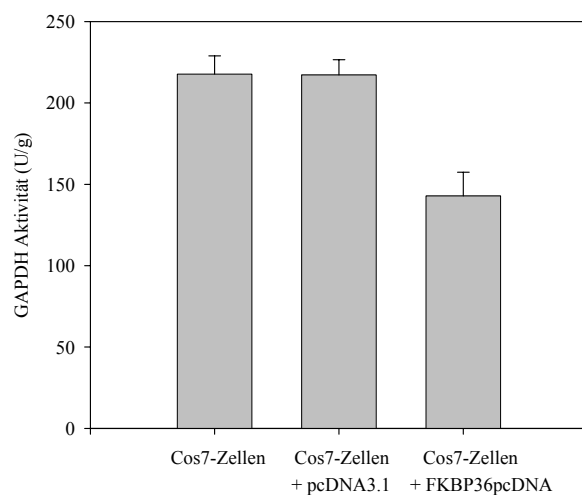
Aufgrund der in unterschiedlichen Untersuchungen gezeigten Konkurrenz zwischen NAD^+ und FKBP36 um eine Bindung an GAPDH, wurde untersucht, ob FKBP36 die GAPDH-Aktivität in Zellen beeinflusst. Hierzu wurde die GAPDH-Aktivität im Cytoplasma von COS-7-Zellen, die FKBP36 exprimieren, mit Wildtyp COS-7-Zellen, die kein FKBP36 enthalten, verglichen. Zuvor wurden COS-7-Zellen mit einem FKBP36pcDNA-Konstrukt bzw. pcDNA3.1 transfiziert. Nach 48 h wurden untransfizierte und transfizierte COS-7-Zellen geerntet und das Zellpellet im Lysispuffer aufgeschlossen. Die GAPDH-Aktivität in der Cytoplasmafraktion der Zellen wurde anschließend bestimmt (Abbildung 45).

Unter Substratsättigung wurde ein deutlicher Unterschied der spezifischen GAPDH-Aktivität von COS-7-Zellen mit und ohne FKBP36-Expression festgestellt. In untransfizierten und mit pcDNA3.1 transfizierten COS-7-Zellen wurde eine spezifische Aktivität von $217 \pm 11,2$ U/g festgestellt. Dagegen war die spezifische Aktivität in FKBP36-exprimierenden COS-7-Zellen um 34 % reduziert und lag bei $143 \pm 14,9$ U/g. Die beobachtete Verringerung der spezifischen GAPDH-Aktivität wurde in drei unabhängigen Experimenten beobachtet und war deutlich höher als die in Kapitel 3.11.5. beschriebene Inhibition von GAPDH durch FKBP36. Eine Western-Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten zeigt, dass in FKBP36-exprimierenden COS-7-Zellen weniger GAPDH nachgewiesen wurde als in COS-7-Zellen ohne FKBP36-Expression. Die densitometrische Auswertung des Western-Blot-Signals ergab, dass COS-7-Zellen mit FKBP36-Expression 36 % weniger GAPDH enthalten als COS-7-Zellen ohne FKBP36.

A



B



C

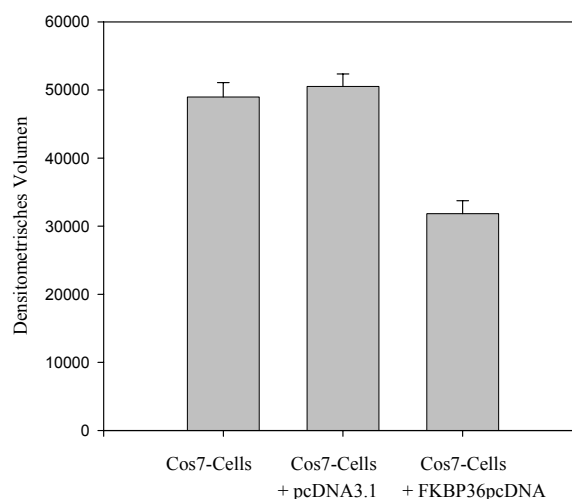


Abbildung 45: Reduktion der cytoplasmatischen GAPDH Aktivität und Proteinexpression von GAPDH in COS7-Zellen nach FKBP36-Expression. Untransfizierte und mit FKBP36pcDNA bzw. pcDNA3.1 transfizierte COS-7-Zellen wurden nach 48 h geerntet und in Lysispuffer aufgeschlossen. Die hier dargestellten Ergebnisse sind beispielhaft für drei unabhängige Experimente. **A:** Western-Blot-Analyse der Gesamtzellaufschlusses von untransfizierten (1) und mit pcDNA3.1 (2) bzw. FKBP36pcDNA (3) transfizierten COS-7-Zellen. Je 10 µg Protein wurden mit Anti-FKBP36-, Anti-GAPDH- und Anti-Aktin-Antikörpern untersucht. **B:** Densitometrische Auswertung des mit Anti-GAPDH-Antikörpern in A erhaltenen Western-Blot-Signals. **C:** Bestimmung der spezifischen GAPDH-Aktivität im Cytoplasma von COS-7-Zellen mit und ohne FKBP36 Expression. Die Messungen erfolgten in 50 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 20 mM Arsenat pH 7,8 mit 1mM NAD⁺ und 1mM GA3P bei 20°C.

3.12. Wechselwirkung zwischen FKBP36 und CLH

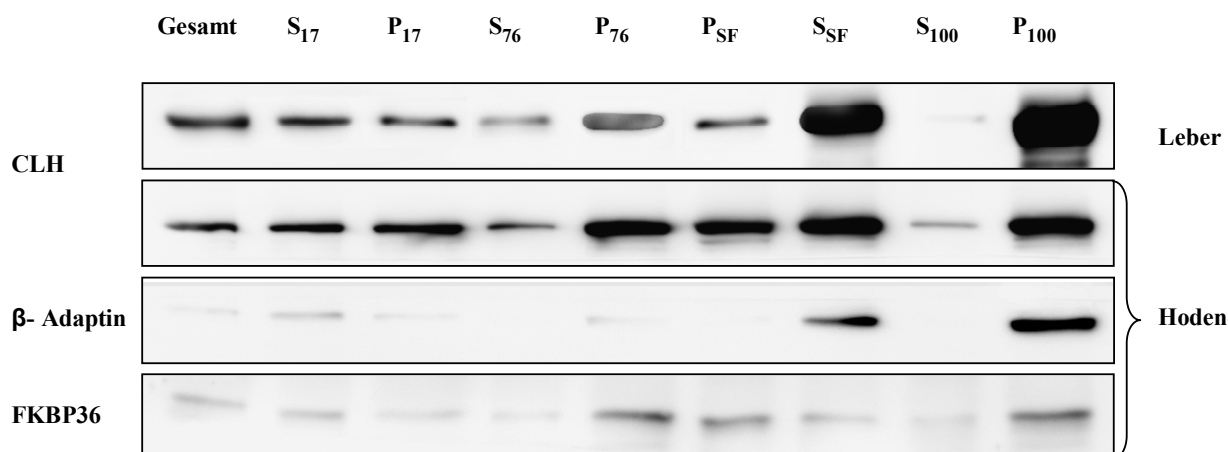
3.12.1. Reinigung von CLH beschichteten Vesikeln

Authentisches CLH wurde durch die Isolierung Clathrin-bedeckter Vesikel aus Rattenleber und Rinderhoden angereichert. Nach Girard *et al.* [2005] wurden aus 30 g Rattenleber bzw. 75 g Rinderhoden Clathrin-bedeckte Vesikel präpariert. Die einzelnen Fraktionen der Präparation wurden durch eine Western-Blot-Analyse mit Anti-CLH- und Anti- β -Adaptin-Antikörpern charakterisiert (Abbildung 46). Das gemeinsame Vorkommen von CLH und β -Adaptin in einer Fraktion ist ein Indiz für CLH beschichtete Vesikel.

Das verwendete Protokoll wurde für die Präparation Clathrin-bedeckte Vesikel aus Leber optimiert. Im ersten Zentrifugationsschritt (17.000 x g) wurden Zelltrümmer und größere Zellorganellen pelletiert. Die Sedimentation Clathrin-bedeckter Vesikel erfolgte anschließend durch Ultrazentrifugation (76.000 x g). Nach Resuspension der Pellets in einem Saccharose-Ficoll-Dichtemedium erfolgte erneut eine Zentrifugation (20 min., 40.000 x g). Unter diesen Bedingungen sedimentieren größere mikrosomale Membranen und Clathrin-bedeckte Vesikel verbleiben im Überstand [Girard *et al.*, 2005]. Entsprechend der Literatur, konnte bei den Präparationen aus Leber CLH und Adaptin fast ausschließlich im Überstand dieses Zentrifugationsschrittes nachgewiesen werden. Auch bei der Präparation aus Hoden verblieben über 50% des detektierten CLH und β -Adaptin im Überstand, es konnten jedoch auch deutliche Mengen CLH und geringe Mengen β -Adaptin im Pellet detektiert werden.

Für die Sedimentierung, der im Saccharose-Ficoll Medium angereicherten Clathrin-bedeckten Vesikel wurde die Lösung mit vier Volumen Puffer verdünnt und zentrifugiert. Die weitere Aufreinigung des erhaltenen Pellets erfolgte in einem Saccharosegradienten (Stufen: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%). Bei einstündiger Zentrifugation resultiert eine Auftrennung der Partikel im Saccharose Gradienten nach ihrer Größe. Clathrin-bedeckte Vesikel bilden in der Mitte des Gradienten eine milchig trübe Bande, während größere Membranbestandteile sedimentieren. Die so angereicherten Vesikel wurden erneut verdünnt und sedimentiert. Mit Hilfe dieser Reinigungsstrategie wurde aus Rattenleber ca. 4,5 mg und aus Rinderhoden ca. 2 mg Clathrin-bedeckte Vesikel gewonnen.

A



B

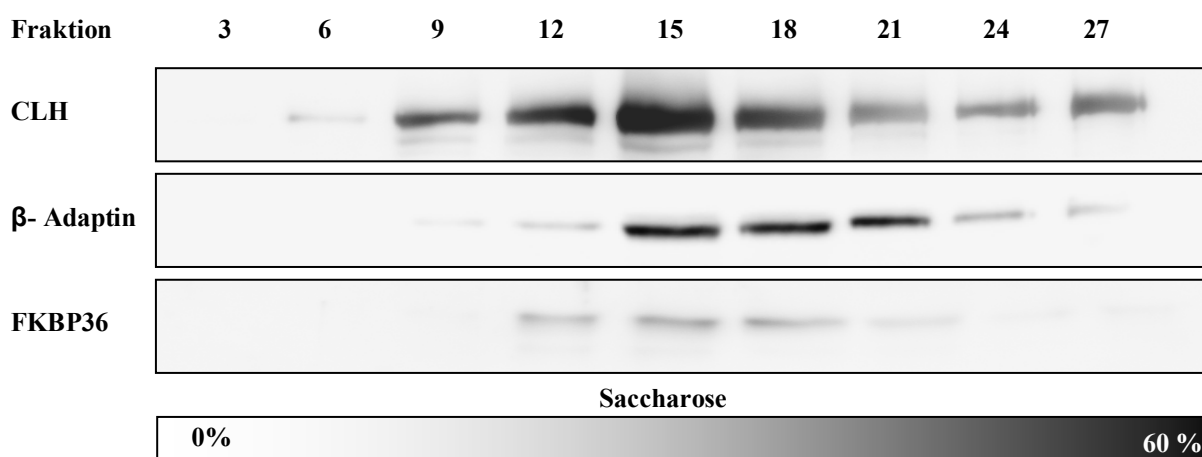


Abbildung 46: Präparation von Clathrin-bedeckten Vesikeln. A: Western-Blot-Analyse von Proben des Überstandes (S) und Pellets (P) unterschiedlicher Zentrifugationsschritte zur Anreicherung Clathrin-bedeckter Vesikel. In Homogenisationspuffer aufgeschlossenes Gewebe wurde 20 min. bei 17.000 x g (S₁₇ und P₁₇); 60 min. bei 76.000 x g (S₇₆ und P₇₆) sedimentiert. Die mikrosomale Fraktion wurde in Saccharose-Ficoll-Dichtemedium resuspendiert und 20 min. bei 40.000 x g zentrifugiert (S_{SF} und P_{SF}). Der Überstand wurde mit vier Volumen Homogenisationspuffer verdünnt und bei 100.000 x g, 60 min. sedimentiert (S₁₀₀ und P₁₀₀). B: Western-Blot-Analyse einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von angereicherten Clathrin-bedeckten Vesikeln. Auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%) wurden 2 ml der zuvor angereicherten Vesikel gegeben und zentrifugiert (79.000 x g, 45 min.). Anschließend wurden 28 Fraktionen (0,5 ml) gesammelt. Die Fraktionen sind oben entsprechend ihrer Position im Gradienten benannt.

3.12.2. Reinigung von CLH

In Abbildung 46 ist gezeigt, dass bei der Reinigung Clathrin-bedeckter Vesikel CLH angereichert wurde. Für die weitere Aufreinigung von CLH ist es notwendig, das Protein aus den beschichteten Vesikeln freizusetzen. Keen *et al.* [1979] stellten eine Sensitivität Clathrin-bedeckter Vesikel gegenüber protonierten Aminen fest. In Tris-haltigen Puffer mit basischen pH-Wert neigt das Clathringerüst der Vesikel zur Dissemblierung. Die gereinigten Clathrin-bedeckten Vesikel wurden

mit $\frac{1}{3}$ Volumen 2 M Tris pH 8,1 versetzt und geschüttelt (über Nacht, 4°C). Unlösliche Bestandteile wurden durch anschließende Ultrazentrifugation von den disassemblierten Clathringerüst abgetrennt. Die disassemblierten Bestandteile wurden mittels Gelfiltration aufgetrennt. Fraktionen, die zu Homogenität gereinigtes CLH enthielten, wurden vereinigt und mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt. Das Proteinpellet wurde in 10 mM Hepes pH 7,0 resuspendiert, über Nacht in Resuspensionspuffer dialysiert und bei 4°C gelagert.

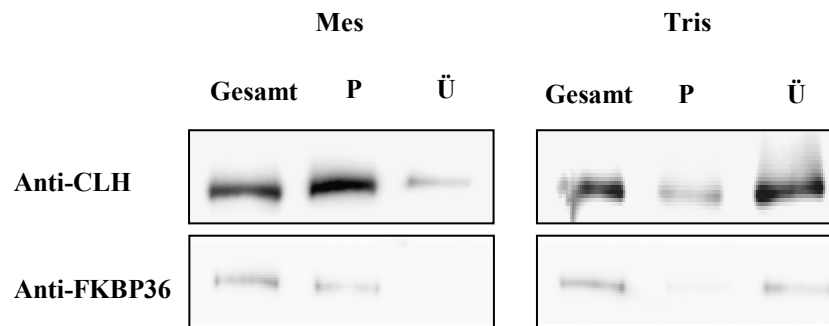


Abbildung 47: Disassemblierung von CLH beschichteten Vesikeln. CLH beschichtete Vesikel wurden mit $\frac{1}{3}$ Volumen 2 M Mes pH 6,6 bzw. 2 M Tris pH 8,1 versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Nach Zentrifugation ($100.000 \times g$; 1h) wurde das erhaltene Sediment mit einem Volumen des Ausgangspuffers versetzt. 5 μ l jeder Fraktion (Gesamt: vor der Zentrifugation, Ü: Überstand und P: Pellets der Zentrifugation) wurde 1:1 mit PP versetzt, auf einer SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Zur Analyse wurden Anti-CLH- bzw. Anti-FKBP36 Antikörper verwendet.

CLH bildet das Grundgerüst Clathrin-bedeckte Vesikel und vermittelt eine Vielzahl von Interaktionen zu anderen Proteinen. In einem GST-Präzipitationsexperiment wurde CLH als Interaktionspartner von FKBP36 identifiziert. Eine co-Reinigung von FKBP36 mit Clathrin-bedeckten Vesikeln würde einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion zwischen FKBP36 und CLH *in vivo* geben. Die bei der Präparation von Clathrin-bedeckten Vesikeln aus Hodenlysat erhaltenen Fraktionen wurden mit einer Western-Blot-Analyse auf FKBP36 untersucht (Abbildung 46). Dabei wurde FKBP36 wie CLH und Adaptin in der mikrosomalen Fraktion nachgewiesen. Bei der weiteren Auftrennung in einem Saccharose-Ficoll-Dichtemedium verblieben FKBP36 und CLH im Überstand. Ebenfalls wies FKBP36 in einem sechsstufigen Saccharosegradient ein ähnliches Sedimentationsverhalten wie CLH und β -Adaptin auf. Dies gibt einen Hinweis auf eine Interaktion der endogenen Proteine.

Bei einer Interaktion von FKBP36 mit dem Clathringerüst von Vesikeln sollten unter Disassemblierungsbedingungen alle Interaktionspartner des Clathringerüsts freigesetzt werden. Nach Disassemblierung der Clathrin-bedeckten Vesikel mit Tris-Puffer, konnte FKBP36 nicht mehr im Sediment der Ultrazentrifugation nachgewiesen werden. Dies entspricht dem Verhalten eines CLH-Bindepartners (Abbildung 47). FKBP36 ist demnach an das Clathringerüst von Vesikeln in der Zelle gebunden.

3.12.3. FKBP36 interagiert direkt mit CLH

Eine Vielzahl von Proteinen sind Bestandteile von Clathrin-bedeckten Vesikeln [Drake *et al.*, 2000; Goodman *et al.*, 1997; Lindner & Ungewickel 1991]. Weitere Proteine sind an Prozessen der Assemblierung und Dissemblierung beteiligt. Nicht alle diese Proteine interagieren dabei direkt mit CLH. Diese Proteine können mittels eines vermittelnden Proteins wie z.B. β -Adaptin oder Auxilin, an das Clathringerüst gebunden werden. [Lafer, 2002]

In Kopräzipitationsexperimenten mit GST-FKBP36 und Clathrin-bedeckten Vesikeln aus Rinderhoden wurde neben CLH auch β -Adaptin und Hsp72 mit einer Western-Blot-Analyse im Präzipitat nachgewiesen (Abbildung 54). Für β -Adaptin und Hsp70 ist eine Interaktion mit Clathrin-bedeckten Vesikeln bereits beschrieben [Heymann, *et al.*, 2005; Lafer, 2002]. Damit besteht die Möglichkeit einer durch β -Adaptin oder Hsp72 vermittelten Kopräzipitation von CLH mit FKBP36. In diesem Fall würde keine direkte Interaktion zwischen CLH und FKBP36 bestehen. Deshalb wurde ein Kopräzipitationsexperiment mit GST-FKBP36 und Clathrin-bedeckten Vesikeln, die durch Tris-Puffer dissembliert wurden, durchgeführt. Hierbei liegen Hsp72, β -Adaptin und CLH nicht als Multiproteinkomplex, sondern als Gemisch einzelner Proteine vor. Die Western-Blot- Analyse

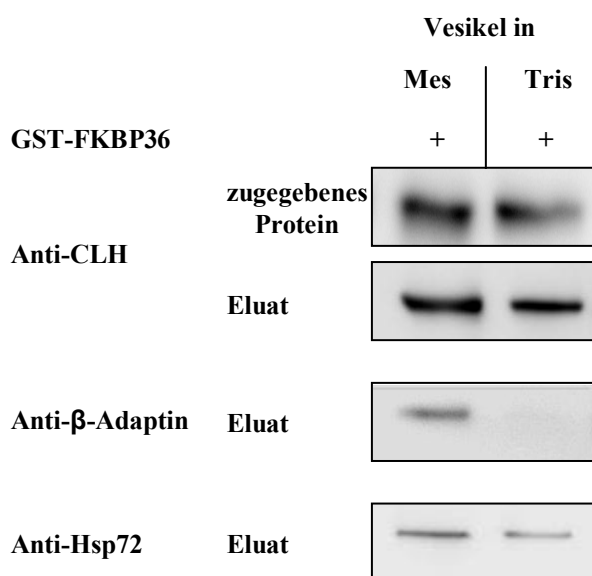


Abbildung 48: Interaktion von GST-FKBP36 mit assemblierten und dissemblierten CLH. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST-FKBP36 immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit assemblierten Clathrin-bedeckten Vesikeln in Mes-Puffer und Bestandteilen dissemblierter Clathrin-bedeckter Vesikel in Tris-Puffer inkubiert (2 h, 4°C), gewaschen und mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (10 % Acrylamid,) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-CLH, Anti- β -Adaptin und Anti-Hsp72 Antikörpern analysiert. Zur Stabilisierung der assemblierten Clathrin-bedeckten Vesikel wurden diese mit $\frac{1}{3}$ Volumen 2 M Mes pH 6,6 (links) bzw. zur Dissemblierung mit 2 M Tris pH 8,1 (rechts) versetzt, über Nacht bei 4°C geschüttelt und anschließend mit 3 Volumen 5 mM Mes pH 6,6 bzw. 5 mM Tris pH 8,1 verdünnt. Der Assemblierungszustand der Vesikel wurde durch Ultrazentrifugation einer Probe überprüft (Abbildung 47).

dieses Experimentes bestätigt die Interaktion zwischen GST-FKBP36 und CLH (Abbildung 48). Die Interaktion zwischen GST-FKBP36 und CLH war unabhängig vom Assemblierungszustand (Triskelion oder Käfig) von CLH. Weiterhin wurde unter Dissemblierungsbedingungen keine Kopräzipitation von β -Adaptin mit GST-FKBP36 festgestellt (Abbildung 54). Die Interaktion zwischen FKBP36 und CLH ist demnach unabhängig von β -Adaptin. Neben der Interaktion zwischen FKBP36 und CLH ist auch die Wechselwirkung von FKBP36 und Hsp72 unabhängig vom Assemblierungszustand der Clathrin-bedeckten Vesikel, denn auch Hsp72 konnte im Präzipitat beider Experimente nachgewiesen werden.

Für Hsp72 wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits eine direkte Interaktion mit FKBP36 gezeigt (Kapitel 3.10.). Außerdem ist das Hsp72 verwandte Hsc70 ein Bestandteil Clathrin-bedeckter Vesikel [Barouch *et al.*, 1994]. Demnach besteht die Möglichkeit einer Hsp72-vermittelten Kopräzipitation von CLH und FKBP36. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurde an GSH-Sepharose immobilisiertes GST-FKBP36 mit gereinigtem CLH inkubiert (Abbildung 49). Im Coomassie gefärbtem PA-Gel wurde eine Interaktion der CLH mit FKBP36 nachgewiesen. Im Kontrollexperiment mit GST wurde keine Interaktion mit CLH beobachtet. Diese Experimente beweisen, dass die FKBP36/CLH Interaktion unabhängig von Hsp72 und FKBP36 direkt an CLH bindet.

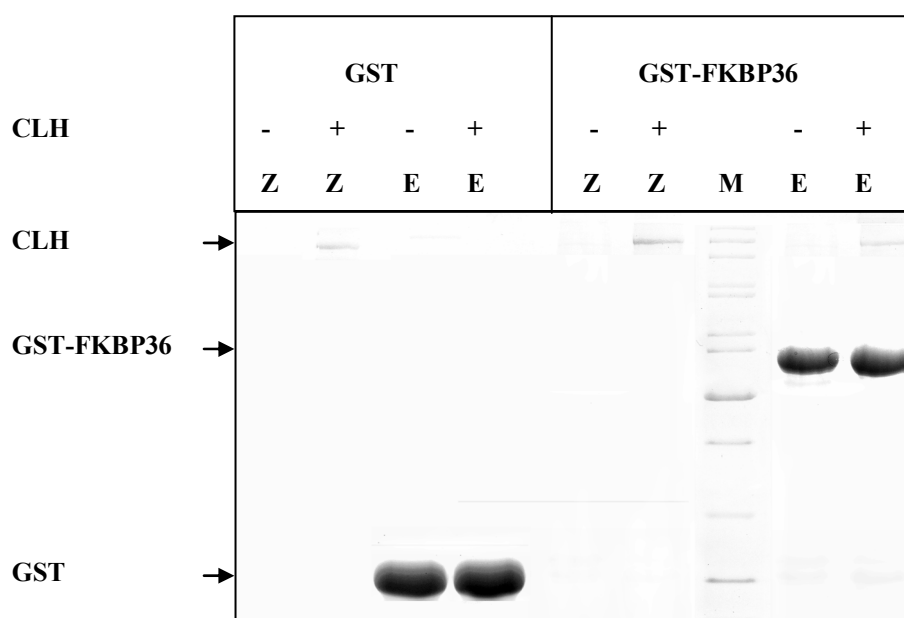


Abbildung 49: Direkte Interaktion zwischen GST-FKBP36 und CLH. SDS-PAGE (12,5% Acrylamid, Coomassie-Färbung) eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST-FKBP36 bzw. GST immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Lysispuffer bzw. 0,5 μ M CLH inkubiert (2 h, 4°C). Die gewaschene Sepharose wurde mit 30 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution (E) und 10 μ l der Zugabe (Z) wurden analysiert. M: Proteinstandard

3.12.4. CLH Binderegion in FKBP36

Die Binderegion von CLH in der Aminosäuresequenz von FKBP36 wurde in Kopräzipitationsexperimenten mit verschiedenen GST fusionierten FKBP36 Varianten eingegrenzt (Abbildung 50). Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Interaktion von CLH aus dem Cytoplasma von Rattenhoden an matrixgebundenes GST-FKBP36 und GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ nachgewiesen. Dagegen wurde weder mit GST noch mit GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ CLH kopräzipitiert.

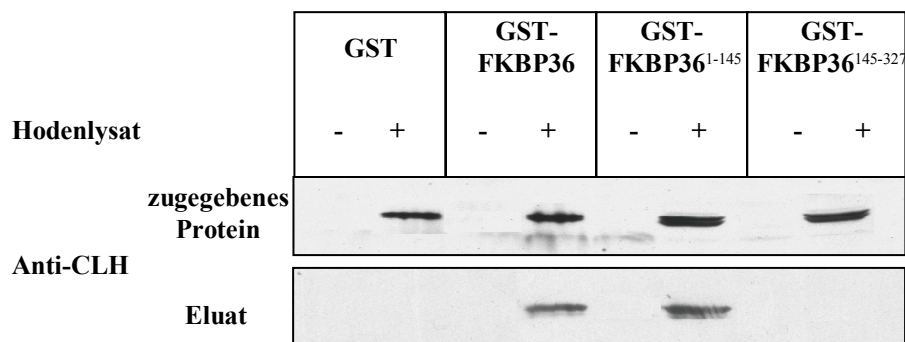


Abbildung 50: Interaktion von CLH mit verschiedenen GST-FKBP36-Varianten. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 µl GSH-Sepharose wurden GST, GST-FKBP36, GST-FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und GST-FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Lysispuffer bzw. Hodencytoplasma inkubiert (2 h, 4°C), gewaschen und mit 40 µl Probenpuffer eluiert. Je 10 µl der Elution und 10 µl der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Anti-CLH-Antikörpern analysiert.

Alle FKBP36-Varianten, die mit CLH interagieren, beinhalten die N-terminale Erweiterung (Aminosäuren Gly1-Gly36) des Proteins. Um eine mögliche Funktion der Aminosäuren Gly1-Gly36 bei der Interaktion mit CLH zu untersuchen wurde eine GST-FKBP36 Variante (GST-FKBP36³⁶⁻³²⁷), die um diesen Bereich verkürzt ist, hergestellt. In einem Kopräzipitationsexperiment wurden matrixgebundenes GST-FKBP36 bzw. GST-FKBP36³⁶⁻³²⁷ mit Cytoplasma aus Rattenhoden inkubiert. Nach Waschen und Elution erfolgte die Western-Blot-Analyse der präzipitierten Proteine. Für beide Varianten wurden vergleichbare Mengen kopräzipitiertes CLH nachgewiesen (Abbildung 51). Die N-terminale Erweiterung in FKBP36 hat also keinen Einfluss auf die Bindung an CLH. Wie Abbildung 50 zeigt, sind die Aminosäuren Ala145-Ser327 im FKBP36 ebenfalls nicht notwendig für eine Wechselwirkung mit CLH. Somit vermittelt die FKBP-Domäne von FKBP36 (FKBP36³⁶⁻¹⁴⁷) die Interaktion mit CLH.

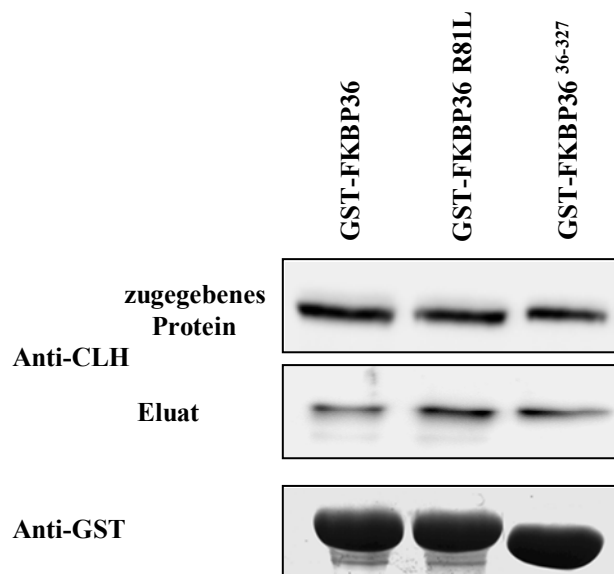


Abbildung 51: Interaktion von CLH mit verschiedenen GST-FKBP36-Varianten. Western-Blot-Analyse eines GST-Präzipitationsexperimentes. An je 30 μ l GSH-Sepharose wurden GST-FKBP36, GST-FKBP36R81L und GST-FKBP36³⁶⁻³²⁷ immobilisiert. Die beladene Sepharose wurde mit Cytoplasma aus Rattenhoden inkubiert (2 h, 4°C), gewaschen und mit 40 μ l Probenpuffer eluiert. Je 10 μ l der Elution und 10 μ l der Zugabe wurden auf einer SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit CLH- Antikörpern analysiert.

Anschließend erfolgten Untersuchungen, in deren Fokus eine mögliche Vermittlung der Interaktion durch das putative katalytische Zentrum der PPIase-Domäne von FKBP36 stand. In einem Kopräzipitationsexperiment wurde eine FKBP36-Variante (GST-FKBP36R81L) verwendet, deren PPIase-Aktivität gegenüber Oligopeptidsubstraten durch eine Mutation beeinflusst war. Die Western-Blot-Analyse des Experimentes zeigt, dass mit dieser FKBP36-Variante mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen CLH interagieren (Abbildung 51).

Weiterhin erfolgten PPIase-Messungen des Wildtypes und der FKBP36R81L Variante in Anwesenheit von CLH. Bei Zugabe mindestens equimolarer Mengen CLH konnte kein Einfluss auf die PPIase-Aktivität beider Varianten beobachtet werden. Es wurde somit kein Hinweis für eine Vermittlung der FKBP36/CLH-Interaktion durch das aktive Zentrum der PPIase gefunden.

4. Diskussion

4.1. FKBP36 – eine humane PPIase

4.1.1. Charakterisierung der Proteineigenschaften

Das für FKBP36 kodierende Gen wurde erstmalig 1998 von Meng *et al.* beschrieben. Eine Sequenzanalyse des korrespondierenden Proteins zeigte, dass ein Segment, begrenzt von den Aminosäuren Gly36 bis Leu142 dieses 327 Reste beinhaltenden Proteins, Homologie zu bekannten FKBP-Domänen besitzt. In der Literatur sind bisher keine Angaben zu proteinchemischen Eigenschaften von FKBP36 veröffentlicht. Deshalb war es ein Schwerpunkt dieser Arbeit, diese Eigenschaften der PPIase FKBP36 mit Hilfe verschiedener FKBP36-Varianten zu analysieren. Dies erfolgte zum einen am Beispiel des rekombinant in *E.coli* exprimierten und gereinigten Volllängenproteins FKBP36 und zum anderen auch an der C-terminal verkürzten Variante FKBP36¹⁻¹⁴⁵.

Zunächst wurde die Ausbildung von Sekundärstrukturmerkmalen und die Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung der gereinigten Proteine FKBP36 und FKBP36¹⁻¹⁴⁵ mit Fern-UV CD-Spektroskopie untersucht. Das CD-Spektrum von FKBP36 entspricht den Spektren homologer Multidomänen FKBP wie z.B. FKBP52, FKBP51 und FKBP44 [Gallon *et al.*, 2004; Pirkl, 2001]. Außerdem sind die Form und Signalintensität des FKBP36¹⁻¹⁴⁵-CD-Spektrums vergleichbar mit CD-Spektren anderer FKBP-Domänen. Dabei ist das CD-Spektrum von FKBP36¹⁻¹⁴⁵ den Spektren von *OcFKBP52*¹⁻¹⁴⁸ und *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ ähnlicher als dem Spektrum des prototypischen Vertreters FKBP12 [Kamphausen 2002; Pirkl, 2001]. FKBP36¹⁻¹⁴⁵, *OcFKBP52*¹⁻¹⁴⁸ und *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ enthalten N- und C-terminal der FKBP-Domäne Sequenzerweiterungen, die den N-Terminus der Proteine und die Übergangsregion zur folgenden Domäne darstellen. Kristallstrukturanalysen von FKBP52 und *AtFKBP42* zeigen, dass diese Bereiche flexibel und wenig strukturiert im Protein vorliegen [Wu *et al.*, 2004; Grazin *et al.*, 2006]. Deshalb ist der Anteil unstrukturierter Bereiche in diesen FKBP-Domänen gegenüber FKBP12 erhöht. Dieser Umstand führt zu Unterschieden der CD-Spektren von Multidomänen FKBP und FKBP12. Insgesamt zeigen die CD-Spektren aller FKBP36-Varianten die Ausbildung von Sekundärstrukturmerkmalen, wie sie bereits für andere FKBP mit TPR-Motiv beschrieben wurden.

Der Denaturierungsmittelpunkt von FKBP36¹⁻¹⁴⁵ (64°C) ist vergleichbar mit dem von FKBP12 (65,5°C) [Kamphausen, 2002]. Weiterhin zeigt ein Vergleich der Proteinestabilität von FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und FKBP36 gegenüber thermischer Denaturierung, dass der Übergangsmittelpunkt der

Denaturierung von FKBP36¹⁻¹⁴⁵ um 5°C gegenüber FKBP36 erhöht ist. Höhere thermische Stabilität der FKBP-Domänen gegenüber den Vollängenproteinen wurde bereits für FKBP52¹⁻¹⁴⁸ und AtFKBP42¹⁻¹⁸⁰ beschrieben [Kamphausen, 2002; Pirkl, 2001]. Die CD-spektroskopische Charakterisierung aller untersuchten FKBP36-Varianten deutet auf eine native Faltung und Funktionalität dieser rekombinanten Proteine.

Für zahlreiche humane FKBP wurde neben ihrer charakteristischen Faltung auch eine PPIase-Aktivität beschrieben, die durch das Peptidmakrolid FK506 inhibierbar ist. Allerdings konnte bisher nicht für alle FKBP eine katalytische Aktivität bzw. eine FK506-Bindung nachgewiesen werden. Beispielsweise kann die PPIase-Aktivität von FKBP52 ausschließlich auf die N-terminale PPIase-Domäne zurückgeführt werden [Pirkl *et al.*, 2001]. Die Aminosäureseitenketten, die die Bindung von FK506 an FKBP12 vermitteln, sind in dieser PPIase-Domäne von FKBP52 konserviert, während sie in der anschließenden, inaktiven FKBP-Domäne ausgetauscht sind [Kay, 1996; Pirkl, 2001]. Die Sequenzanalyse der FKBP-Domäne von FKBP36 weist große Ähnlichkeit mit der aktiven FKBP-Domäne von FKBP52 auf, dennoch konnte für FKBP36 keine PPIase-Aktivität nachgewiesen werden.

Zahlreiche Kristallstrukturanalysen von aktiven FKBP zeigen eine hydrophobe Bindetasche, die von Aminosäureresten gebildet wird, deren Beteiligung an der FK506-Bindung und Katalyse diskutiert wird [Craescu *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1996; Michnick *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1995]. Da bisher keine strukturellen Daten eines FKBP/Substrat-Komplexes existieren, kann die Bindung des Substrates in der hydrophoben Bindetasche der verschiedenen FKBP nur aufgrund von Mutagenesestudien und Strukturen mit Liganden vermutet werden [Sich *et al.*, 2000; Van Duyne *et al.*, 1993]. Strukturanalysen von FKBP12/Inhibitor-Komplexen erlauben die Schlussfolgerung, dass der sechsgliedrige Pipecolinyl-Rest des FK506 im FKBP12/FK506-Komplex und der fünfgliedrige Pyrrolidinyl-Rest des GPI1046 im FKBP12/GPI1046 die Bindestelle des Prolyl-Rests eines Peptidsubstrates im Enzyms besetzen (Abbildung 52).

Ein Strukturmodell der FKBP-Domäne von FKBP36, das auf Sequenzähnlichkeit zu FKBP mit bereits geklärter 3D-Struktur basiert, zeigt, dass die Ausbildung einer FKBP-typischen Bindetasche für FKBP36 angenommen werden kann. Der hydrophobe Charakter der möglichen Substratbindetasche von FKBP36 könnte jedoch durch Arginin in Position 81 gestört sein, da aktive FKBP in homologen Positionen einen hydrophoben Leucin- bzw. Phenylalaninrest besitzen (Abbildung 52). Die Seitenkette des Arginin 81 könnte im FKBP36 zu verminderter Bindung prolinhaltiger FKBP-Substrate führen. Dieser Annahme folgend könnte also die beobachtete

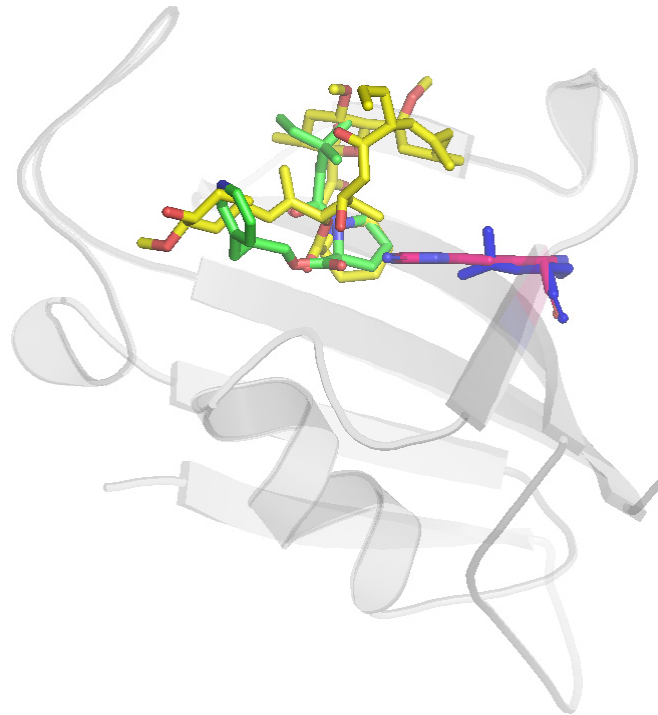


Abbildung 52: 3D-Darstellung des Strukturmodells der FKBP-Domäne von FKBP36. Die Sekundärstrukturelemente der FKBP-Domäne sind in grau dargestellt. Die Position der Aminosäure 81 ist hervorgehoben, dabei ist ein Argininrest in dieser Position, wie in Wildtyp FKBP36, in rot und ein Leucinrest, wie in der FKBP36R81L-Variante bzw. FKBP25, in blau gezeigt. In gelb bzw. grün sind die aufgrund einer Strukturüberlagerung mit den FKBP12/Inhibitor-Komplexen (RCSB-Datenbank: 1FKJ; 1F40) vermuteten Positionen der FKBP-Inhibitoren FK506 und GPI1046 gezeigt.

enzymatische Inaktivität von FKBP36 auf eine geringe Affinität des FKBP36 gegenüber dem Pyrrolidinyl-Rest von Prolin und damit den PPIase-Substraten zurückgeführt werden. PPIase-Messungen mit der hergestellten Proteinvariante (FKBP36R81L), die in Position 81 einen hydrophoben Leucinrest trägt, zeigt PPIase-Aktivität und unterstützt diese Hypothese.

FKBP36R81L bevorzugt Peptidsubstrate, die einen Phenylalanin- bzw. einen Leucinrest N-terminal zur Aminosäure Prolin besitzen, gegenüber Substraten mit einem Alanin in dieser Position. Diese Substratspezifität ist typisch für FKBP [Harrison & Stein, 1990]. Abweichend von anderen PPIasen wird die Isomerisierung von Substraten, die eine geladene Aminosäure, wie Glutamat oder Lysin N-terminal zu Prolin besitzen, nicht beschleunigt. Diese Substratspezifität ist ein charakteristisches Merkmal für FKBP36R81L und schließt eine Verunreinigung durch *E. coli* PPIasen aus (Tabelle 5). Die PPIase-Aktivität von FKBP36R81L kann auch durch hohe Konzentrationen (10 μ M) FK506 nicht inhibiert werden. Eine solche Insensitivität der enzymatischen Aktivität gegenüber einer Hemmung durch FK506 ist bereits für zwei FKBP (SlyD und Triggerfaktor) aus *E. coli* gezeigt. Die Ursache dafür wird bei diesen Enzymen auf Unterschiede in einigen Aminosäureseitenketten, die in Zusammenhang mit FK506-Bindung diskutiert werden, zurückgeführt [Vogtherr *et al.*, 2002]. Auch in FKBP36R81L sind nicht alle Aminosäuren, die in Zusammenhang mit FK506-Bindung diskutiert werden, konserviert. Dies könnte auch im Fall der Variante FKBP36R81L die fehlende

Wechselwirkung mit FK506 und strukturverwandten Verbindungen, wie z.B. Rapamycin erklären. Niedermolekulare Verbindungen, die mit dem putativen aktiven Zentrum von FKBP36R81L bzw. FKBP36 interagieren, müssten durch eine umfangreiche Substanzsuche ermittelt werden.

Xaa	FKBP36R81L	<i>E. coli</i> Triggerfaktor ^a	<i>E. coli</i> FKBP22 ^b	<i>E. coli</i> FKBP16 ^c	<i>E. coli</i> Cyp18 ^d	<i>E. coli</i> Cyp21 ^d	<i>E. coli</i> Parvulin ^e
Phe	100	100	100	100	100	100	100
Leu	105	58	205	83	120	192	120
Ala	9	22	6	37	400	345	60
Lys	0	23	53	38	17	39	30
Glu	0	0	0	0	86	64	15

Tabelle 5: Vergleich der relativen Substratspezifitäten der FKBP36 Variante FKBP36R81L und *E. coli* PPIasen gegenüber Substraten des Typs Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-NA. Der k_{cat}/K_m -Wert für das Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-NA entspricht 100%. Die Werte der *E. coli* PPIasen wurden der Literatur entnommen. a: [Stoller *et al.*, 1995]; b: [Rahfeld *et al.*, 1996]; c: [Hottenrott *et al.*, 1997]; d: [Compton *et al.*, 1992]; e: [Rahfeld *et al.*, 1994]

Die PPIase-Aktivität von FKBP36R81L ist mit einem k_{cat}/K_M von $5898 \pm 218 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA um Faktor 100 geringer als die Aktivität der konstitutiv aktiven PPIasen FKBP12 und FKBP52, aber mit der Aktivität des Calmodulin- Ca^{2+} -aktivierten FKBP38 vergleichbar [Edlich *et al.*, 2005; Harrison & Stein, 1990; Pirkl *et al.*, 2001].

Möglicherweise kann auch beim Wildtyp von FKBP36 eine Bindung und Isomerisierung von prolinhaltigen Substraten erfolgen, wenn durch strukturelle Veränderung des Proteins eine Änderung der Raumlage des Arginin 81 induziert wird. Eine Aktivierung der PPIase-Aktivität durch strukturelle Veränderungen im Bereich des aktiven Zentrums ist für FKBP38 beschrieben [Edlich *et al.*, 2005]. Die NMR-Strukturanalyse der inaktiven Form von FKBP38 zeigt eine Salzbrücke über dem putativen aktiven Zentrum, an der Arg127 in FKBP38 beteiligt ist. Durch Bildung eines FKBP38/Calmodulin- Ca^{2+} -Komplexes erfolgen strukturelle Änderungen, die unter anderem Lageänderungen des Arg127 in einem flexiblen Segment der FKBP-Domäne im Rahmen der Aktivierung der PPIase zur Folge haben könnten [F. Edlich, persönlich Mitteilung]. Ein Strukturmodell der FKBP-Domäne von FKBP36 besitzt im Bereich des putativen aktiven Zentrums nur geringe Ähnlichkeit zur FKBP-Domäne von FKBP38 (Abbildung 53), weshalb ein zu FKBP38 analoger Aktivierungsmechanismus unwahrscheinlich ist.

Nicht nur die Bindung von Interaktionspartnern kann Einfluss auf die Struktur und Funktion eines Proteins besitzen, sondern auch posttranslationale Modifizierungen wie z.B. Phosphorylierungen. Die Einführung negativ geladener Phosphatreste kann Konformationsänderungen der Polypeptidkette induzieren und so die Eigenschaften der Proteine beeinflussen [Johnson & O'Reilly,

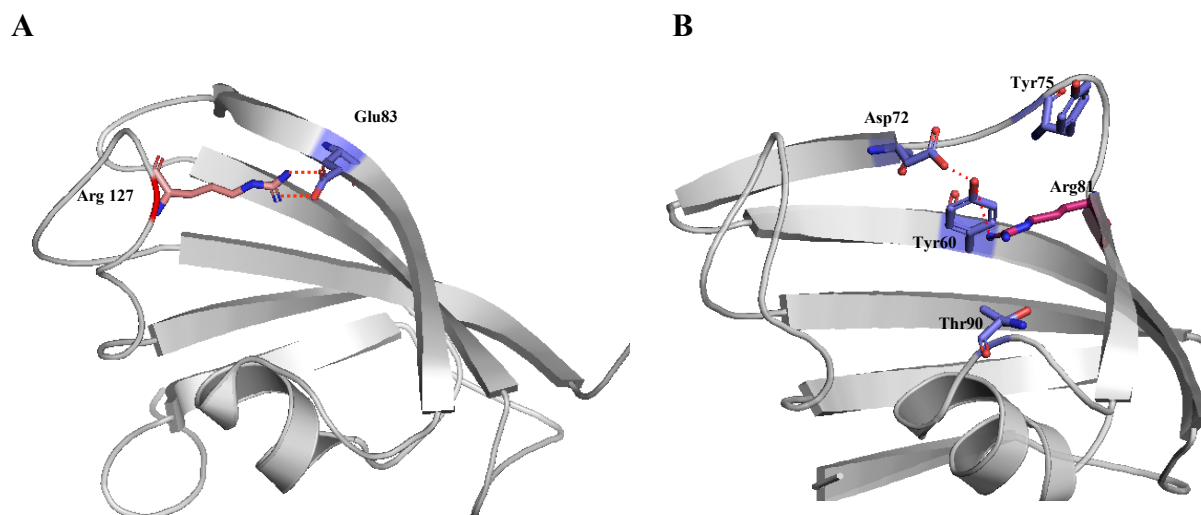


Abbildung 53: 3D-Darstellung der A: NMR Struktur der FKBP-Domäne von FKBP38 [Maestre-Martinez et al., 2006] und B: eines Strukturmodells der FKBP-Domäne von FKBP36. Die Sekundärstrukturelemente beider FKBP-Domänen sind schematisch in grau dargestellt. Hervorgehoben sind Aminosäuren deren Seitenketten mögliche polare Wechselwirkungen (.....) im Bereich des putativen aktiven Zentrums von FKBP38 (Glu83, Arg127) bzw. FKBP36 (Tyr60, Asp72, Arg81) eingehen können. Im FKBP36 Strukturmodell sind weiterhin Aminosäurereste (Tyr75, Thr90), deren Phosphorylierung möglicherweise eine Änderung der Raumlage des Arg81 bewirken könnte, gekennzeichnet.

1996]. Möglicherweise könnte die Phosphorylierung einer Aminosäure des FKBP36 Veränderung im aktiven Zentrum, insbesondere die räumliche Orientierung des Arg81 durch Bildung einer Salzbrücke, induzieren und so die PPIase Aktivität von FKBP36 aktivieren. In Eukaryonten werden vor allem Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen beobachtet. Die Aminosäuresequenz von FKBP36 enthält insgesamt 37 Serin-, Threonin- und Tyrosinreste. Nicht alle diese Aminosäurereste sind für Kinasen zugänglich an der Oberfläche von FKBP36 lokalisiert und befinden sich in räumlicher Nähe zu Arg81. Im Strukturmodell der FKBP-Domäne erfüllen die Aminosäurereste Tyr75 und Thr90 und weitere Serinreste in den Bereichen N- und C-terminal der FKBP-Domäne diese Bedingungen (Abbildung 53). Die Aktivierungsmechanismen von Proteinen sind oft evolutionär konserviert, weshalb die beteiligten Aminosäuren in allen paralogen Proteinen identisch bzw. ähnlich ausgetauscht sind [Hudson *et al.*, 1993]. Arg81 und Thr90 sind in allen FKBP36-paralogen aus Vertebraten konserviert, weshalb eine Beteiligung dieser Reste an der Aktivierung von FKBP36 wahrscheinlicher ist als der Einfluss anderer Aminosäuren (Abbildung 7). Die Aktivierung einer PPIase durch Phosphorylierung ist bisher noch nicht beschrieben, jedoch sind Wechselwirkungen zwischen FKBP und Kinase bzw. Phosphatasen bekannt [Miyata *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1997]. Beispielsweise wurde für *fpr3*, einem FKBP mit wesentlicher Funktion bei der Meioseregulation in Hefe, eine Interaktion mit Casein Kinase 2 (CK2) und der Proteinphosphatase1 (PP1) nachgewiesen [Wilson *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1997]. Die Bindung an die PP1 wird durch die FKBP-Domäne von *fpr3* vermittelt. Dabei ist Thr345,

dessen Position homolog zur Position des Tyr75 in FKBP36 ist, essentiell für die Interaktion [Hochwagen *et al.*, 2005].

Die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen mit den untersuchten FKBP36 Varianten zeigen, dass FKBP36 katalytisch aktiv ist und wahrscheinlich eine bisher ungeklärter Mechanismus der Aktivierung dem Wildtyp des FKBP36 zugrunde liegt. Die Bestätigung und Aufklärung dieses Aktivierungsmechanismus erfordert die Aufklärung der Struktur von FKBP36 sowie weitere Mutagenese- und Phosphorylierungsstudien.

4.1.2. Interaktion der PPIase-Domäne von FKBP36

Die zelluläre Funktion der FKBP-Domänen vieler Proteine ist noch unverstanden. Für die N-terminale FKBP-Domäne von FKBP52 wurde eine Bindung an das Dyneingerüst der Zelle gezeigt [Galigniana *et al.*, 2002; Silverstein *et al.*, 1999]. Diese Interaktion ist unabhängig vom aktiven Zentrum der FKBP-Domäne und besitzt eine Funktion beim zellulären Transport von SHR-Komplexen. In dieser Arbeit wurde für FKBP36 eine vergleichbare Interaktion mit CLH nachgewiesen. Auch in diesem FKBP-Komplex bindet die FKBP-Domäne des Proteins unabhängig vom aktiven Zentrum an einen Bestandteil der Transportmaschinerie der Zelle. Der Bereich der FKBP-Domäne, der die Wechselwirkung mit CLH vermittelt, ist nicht näher bekannt, jedoch besitzt das Segment FKBP36¹³⁴⁻¹³⁸ Sequenzhomologie zu Clathrin-Box-Motiven, die von der N-terminalen Domäne der CLH gebunden werden [Lafer, 2002].

Spekulationen über eine Funktion des FKBP36/CLH-Komplexes bei zellulären Transportvorgängen werden durch eine vergleichbare subzelluläre Verteilung von FKBP36 und CLH gestützt. Es kann vermutet werden, dass FKBP36 und CLH am Transport eines Multiproteinkomplexes in Analogie zum FKBP52/Dynein/Hsp90/SHR-Komplex beteiligt sind, da Wechselwirkungen des FKBP36/CLH-Komplexes zu weiteren Proteinen nachgewiesen wurden. Beispielsweise kann Hsp72 aufgrund seiner subzellulären Verteilung und der Bindung an den FKBP36/CLH-Komplex ein weiterer Bestandteil dieses Multiproteinkomplexes sein.

4.2. Interaktionen der TPR-Domäne des FKBP36

4.2.1. Allgemeine Einordnung der TPR-Domäne

TPR-Domänen sind aus TPR-Motiven aufgebaut und vermitteln Protein-Protein-Wechselwirkungen [D'Andrea & Regan 2003; Lamb *et al.*, 1995]. Dabei bilden die TPR-Domänen eine konkave Bindetasche, in der gestreckte unstrukturierte Bereiche eines Bindepartners fixiert werden können.

In den Bindetaschen der TPR-Domänen von PPIasen, Hop und PP5 sind an bestimmten Positionen vorwiegend basische Aminosäurereste konserviert, die sogenannte zweifache Carboxylatklammern bilden und damit den C-Terminus eines sauren Sequenzmotivs der Form EEVD fixieren [Brinker *et al.*, 2002; Cliff *et al.*, 2006; Russel *et al.*, 1999; Scheufler *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004]. Dabei sind beide Carboxylatfunktionen des Aspartatrestes im EEVD-Motiv in ein dichtes Netzwerk von Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäureseitenketten der zweifachen Carboxylatklammer eingebettet. Das EEVD-Sequenzmotiv ist am C-Terminus aller eukaryontischen, cytosolischen Hsp90 und Hsp70 Proteine konserviert. Die Bindung dieser Chaperone an verschiedene TPR-Domänen wurde vielfach nachgewiesen [Pratt & Toft, 1997; Smith, 2004]. Ein Sequenzvergleich unterschiedlicher TPR-Domänen zeigt, dass auch für FKBP36 eine Bindung an Hsp90 bzw. Hsp70 erwartet werden kann. Durch verschiedene Bindestudien wurde eine Interaktion von FKBP36 mit Hsp90 und Hsp72 im Rahmen dieser Arbeit erstmals belegt. Die geladene C-terminale Sequenz EEVD, die Hsp90 und Hsp72 gemeinsam ist, bindet an eine zweifache Carboxylatklammer in FKBP36, da die Zugabe sowohl der C-terminalen Domänen als auch des MEEVD-Peptids die Interaktion hemmt.

4.2.2. Bindung an Hsp90 und Hsp72

Die Wechselwirkungen zwischen dem EEVD-Motiv eines Hitzeschockproteins und der zweifachen Carboxylatklammer einer TPR-Domäne sind zwar notwendig für eine effiziente TPR/Hsp-Interaktion, aber nicht hinreichend zur Sicherstellung einer physiologisch relevanten Ligandenbindung [Brinker *et al.*, 2002; Scheufler *et al.*, 2000]. Entscheidend für die Stabilität der TPR/Hsp-Interaktion und die Ausbildung einer Spezifität der TPR-Domänen sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Bindetasche der TPR-Domäne und Aminosäuren N-terminal des EEVD-Motivs der Chaperone. Die N-terminal an die EEVD Sequenz grenzenden hydrophoben Aminosäuren sind spezifisch für Hsp70 bzw. Hsp90, insbesondere das Isoleucin und Prolin im Hsp70 C-Terminus (PTIEEVD) und das Methionin im Hsp90 C-Terminus (MEEVD) sind konserviert. Die Aminosäurereste der TPR-Domänen, die mit Methionin bzw. Isoleucin und Prolin wechselwirken, wurden durch Kristallstrukturanalysen verschiedener TPR-Domänen im Komplex mit den entsprechenden Penta- bzw. Heptapeptiden identifiziert [Cliff *et al.*, 2006; Scheufler *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004]. Dabei stellte sich heraus, dass die Aminosäuren der TPR-Domäne und die Raumlage der untersuchten Penta- bzw. Heptapeptide in der Bindetasche unter den verschiedenen Komplexen nicht konserviert sind, weshalb eine Vorhersage über die Spezifität einer TPR-Domäne gegenüber Hsp90 bzw. Hsp70 bisher nicht möglich ist.

Für FKBP36 wurde in dieser Arbeit eine Interaktion mit Hsp90 und Hsp72 nachgewiesen. Hierbei sind Wechselwirkungen zwischen dem MEEVD-Motiv von Hsp90 und der TPR-Domäne hinreichend für die Ausbildung des Hsp90/FKBP36-Komplexes. Für das IEEVD-Motiv von Hsp72 konnte hingegen keine stabile Interaktion mit FKBP36 nachgewiesen werden, weshalb zusätzliche Interaktionen zwischen der C-terminalen Domäne von Hsp72 mit FKBP36 notwendig sind. Diese Wechselwirkungen sind spezifisch für Hsp72, da in keinem Experiment Komplexe zwischen FKBP36 und anderen Vertretern der Hsp70-Familie identifiziert wurden. Ein Sequenzvergleich der C-terminalen Domänen cytosolischen Hsp70-Vertreter zeigt, dass nicht nur die 8 Aminosäurereste am C-Terminus, sondern auch der N-terminale Bereiche dieser Domänen hohe Sequenzübereinstimmung aufweisen und somit keine Unterschiede im Bindeverhalten der Hsp70 verursachen sollten (Abbildung 54). Wenig konserviert ist ein kurzer Sequenzbereich N-terminal des konservierten GPTIEEVD-Motivs, der die Aminosäuren Gly615- Gly631 von Hsp72 umfasst. Das Segment Hsp72⁶¹⁵⁻⁶³¹ stellt möglicherweise eine sekundäre Bindestelle dar, die die Stabilität und Spezifität der Interaktionen im FKBP36/Hsp72-Komplexes vermittelt.

<i>hHsp72</i>	LESYTYNIKQTVEDEKLRGKISEQDKNKILDKQCQEVINWLDNRQMAEKDEYEHKQKELE	600
<i>hHsp70C</i>	LESYAFNMKATVEDEKLQKINDEDKQKILDKCNELINWLDKNQTAEKEEFQKELE	597
<i>hHsp71</i>	LESYAFNMKSAVEDEGLKGISEADKVKVLDKQCQEVISWLDANTLAEKDEFQKKELE	597
<i>hHsp70L</i>	LESYAFNMKSVSDEGLKGISES DKNKILDKCNELLSWLEVNQLAEKDEFQKKELE	599
<i>hHsp72</i>	RVCNPIISKLYQ-----GGPGGGSGGGSGASG GPTIEEVD	639
<i>hHsp70C</i>	KVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD	646
<i>hHsp71</i>	QVCNPIISGLYQ-----GAGGPGGGFQAQGPKGSGSGPTIEEVD	641
<i>hHsp70L</i>	QMCNPIITKLYQ-----GGCTGPACGTGYVPRPATGPTIEEVD	641

Abbildung 54: Sequenzvergleich der C-terminalen Domänen unterschiedlicher Hsp70-Proteine. Identische Aminosäuren sind dunkelgrau, ähnliche Aminosäuren hellgrau unterlegt. In blau hervorgehoben ist ein Hsp72-Segment, das die größte Variabilität zu anderen Hsp70-Proteinen aufweist.

Die Wechselwirkungen zwischen andere PPIasen mit TPR-Domäne und Hsp70-Proteinen sind nur wenig untersucht. Für Cyp40 und FKBP37.7 wurde eine Interaktion mit Hsc70 gezeigt [Carrello *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2003]. Die Ausbildung einer Spezifität gegenüber einem bestimmten Hsp70-Vertreter, wie bei FKBP36, ist für diese PPIasen jedoch bisher nicht näher analysiert.

Die Charakterisierung des FKBP36/Hsp72-Komplexes zeigte erstmals die Ausbildung einer spezifischen TPR/Hsp70-Interaktion, die durch Aminosäuren außerhalb des GPTIEEVD-Motivs der Hsp70-Proteine vermittelt wird. Strukturuntersuchungen zwischen der ersten TPR-Domäne des Hop und einem vom C-Terminus der Hsp70-Proteine abgeleiteten Oktapeptid (GPTIEEVD) zeigten, dass die Bindetasche der TPR-Domänen mit maximal acht Aminosäure-Resten des Hitzeschockproteins wechselwirken kann. Wechselwirkungen der TPR-Domäne mit

Sequenzbereichen des Hitzeschockproteins, die N-terminal dieses Oktapeptid liegen, wie im FKBP36/Hsp72-Komplex, müssen folglich außerhalb der Bindetasche der TPR-Domäne erfolgen. Bindestudien mit C-terminal verkürzten FKBP36 Varianten zeigen, dass das Segment FKBP36²⁸⁶⁻²⁹⁸ essentiell für eine Interaktion mit Hsp72 ist, aber die Bindung an Hsp90 nicht beeinflusst wird. Homologe Sequenzbereiche in anderen TPR-Domänen nehmen die Faltung einer Helix an [Granzin *et al.*, 2006; Sinars *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004]. In FKBP51 wurde ein Einfluss der korrespondierenden Helix für die Bildung eines stabilen FKBP51/Hsp90-Komplexes gezeigt, während homologe Bereiche in FKBP52 die Interaktion mit Hsp90 nicht wesentlich beeinflussen [Cheung-Flynn *et al.*, 2003].

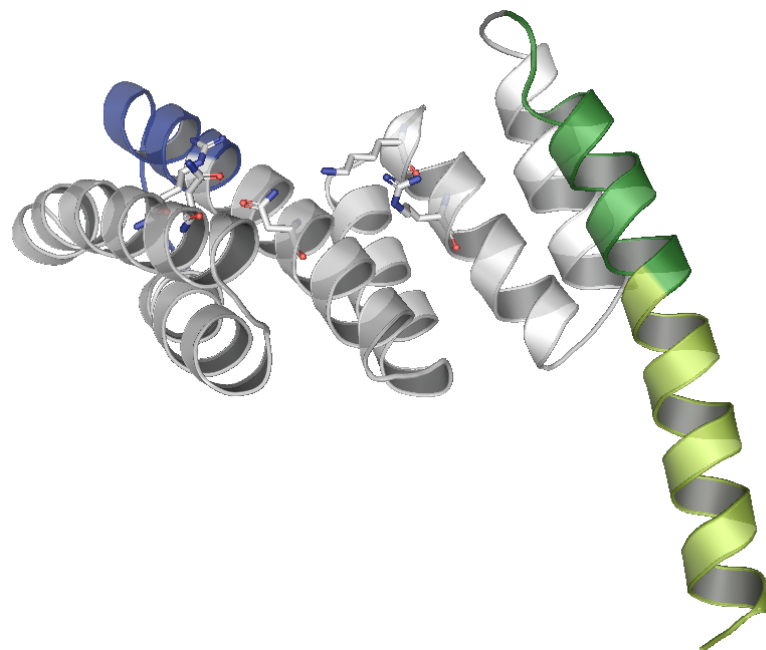


Abbildung 55: 3D-Darstellung eines Strukturmodells der TPR-Domäne von FKBP36. Die Aminosäuren Leu164-Ser326 von FKBP36 wurden für die Modellierung der TPR-Domäne mit dem Programm 3D-PSSM [Kelly, *et al.*, 2000] herangezogen. Als Grundlage dienten die Koordinaten der Röntgenkristallstruktur von FKBP51 (RCSB-Datenbank: 1KT0). Die drei TPR-Motive sind schematisch in grau dargestellt, innerhalb dieser Motive sind die konservierten Reste der Dicarboxylatklammer, die Wechselwirkungen zu Hsp90 bzw. Hsp72, hervorgehoben. In blau abgebildet ist das Rückgrat der Aminosäuren Ser204-Lys217, diese bilden in Sequenzvergleichen mit anderen TPR-Domänen einen Sequenzeinschub zwischen dem ersten und zweiten TPR-Motiv. Die C-terminale siebente Helix ist in grün gezeigt. Dabei ist der Bereich, der an der Bindung, von GAPDH bzw. HSP72 beteiligt ist (Aminosäuren His286-Ser297), in dunkel- und die Aminosäuren Cys298-Ser326 in hellgrün dargestellt.

4.2.3. Bindung an GAPDH

Frühere Publikationen zeigen, dass TPR-Domänen Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht nur über zweifach Carboxylatklammern vermitteln, sondern auch über Sequenzbereiche außerhalb der TPR-Motive [Cheung-Flynn *et al.*, 2003; Lapouge *et al.*, 2000]. C-terminal der drei TPR-Motive

folgt in allen TPR-Domänen eine wenig konservierte Sequenz unterschiedlicher Länge. Strukturuntersuchungen zeigen für diesen Sequenzbereich die Ausbildung einer weiteren, siebenten Helix [Das *et al.*, 1998; Scheufler *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004]. Diese Helix wird nicht nur im Zusammenhang mit der FKBP51/Hsp90-Interaktion diskutiert, sondern auch mit der Bindung von Calmodulin, z.B. an FKBP38 [Edlich *et al.*, 2007]. Weiterhin befindet sich zwischen dem ersten und dem zweiten TPR-Motiv einiger TPR-Domänen ein Sequenzeinschub. Dieser Sequenzeinschub kann eine Helix oder Haarnadelstruktur ausbilden und vermittelt Protein spezifische Wechselwirkungen [Lapouge *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004]. Beispielsweise wurde für den Sequenzeinschub der NADPH Oxidase Untereinheit p67phox eine spezifische Bindung an das kleine G-Protein Rac(GTP) nachgewiesen [Lapouge *et al.*, 2000].

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von FKBP36 mit weiteren TPR-Domänen zeigt, dass in FKBP36 sowohl eine siebente Helix C-terminal der TPR-Motive als auch ein Sequenzeinschub zwischen dem ersten und zweiten TPR-Motiv als potentielle Interaktionsstellen wahrscheinlich sind (Abbildung 4). Für die TPR-Domäne von FKBP36 wurde neben der naheliegenden Interaktion mit Hitzeschockproteinen auch eine Bindung an GAPDH nachgewiesen. GAPDH ist bisher nicht als Bindepartner eines TPR-Domänenproteins beschrieben und kompetiert nicht mit Hsp90 um die FKBP36-Bindung, weshalb eine gemeinsame Bindestelle in der Carboxylatklemme ausgeschlossen werden kann. Tatsächlich ist das Segment FKBP36²⁸⁶⁻²⁹⁸, C-Terminal zu den TPR-Motiven, wichtig für die Interaktion mit GAPDH. FKBP36²⁸⁶⁻²⁹⁸ ist, neben der zweifachen Carboxylatklammer des FKBP36, auch an der Bindung von Hsp72 beteiligt. Damit kann die beobachtete Kompetition von GAPDH und Hsp72 um eine FKBP36-Bindung auf diesen Bereich von FKBP36 zurückgeführt werden. Für die Bildung des FKBP36/GAPDH-Komplexes ist dieses Segment von FKBP36 jedoch nicht ausreichend. Der Sequenzeinschub zwischen ersten und zweiten TPR-Motiv von FKBP36 könnte eine weitere spezifische Interaktionsstelle für die Bildung des FKBP36/GAPDH-Komplexes darstellen. Dieser Sequenzbereich von FKBP36 ist in homologen Proteinen wenig konserviert und oberflächenexponiert. Damit ist er eine mögliche spezifische Proteininteraktionsstelle. Zur Bestätigung dieser Theorie könnten Mutagenesestudien und Matrix-gebundene Peptidbibliotheken einen wichtigen Beitrag leisten.

Die Bindung zwischen der TPR-Domäne von FKBP36 und GAPDH ist bisher beispiellos. GAPDH ist ein multifunktionales Protein, das neben der glykolytischen Katalysereaktion an zahlreichen zellulären Funktionen beteiligt ist [Chuang *et al.*, 2005; Sirover, 1999]. Hierbei tritt GAPDH in Wechselwirkung mit Proteinen, Membranen, RNA oder DNA [Mazzola & Sirover, 2002; Meyer-Siegler *et al.*, 2001; Singh & Green, 1993]. Unter anderem zeigen frühere Arbeiten Wechselwirkungen zwischen der NAD⁺-bindenden Domäne der GAPDH und 3'-UTR mRNA oder

dem Tubulin-bindenden Protein TPPP/p25 [Nagy *et al.*, 2000; Olah *et al.*, 2006]. An der GAPDH/Membran-Interaktion scheint die GA3P-Bindestelle in der katalytischen Domäne der GAPDH beteiligt zu sein, während Lysinreste im C-terminalen Bereich dieser Domäne die Bindung von polyglutaminreichen Proteinen wie β APP oder dem Huntingtonprotein vermitteln. Der Sequenzbereich der GAPDH, der für die Wechselwirkung mit FKBP36 notwendig ist, wurde auf die Aminosäuren Val2-Leu247 eingegrenzt. In diesem Sequenzbereich sind die nukleotidbindende Domäne und ein Teil der katalytischen Domäne lokalisiert. FKBP36 kompetiert mit NAD^+ um eine Bindung an GAPDH, weshalb die Bindung des FKBP36 entweder im Bereich der NAD^+ -Bindestelle erfolgt oder die Faltung der NAD^+ -Bindestelle durch FKBP36-Bindung verändert wird. Die Bildung eines GAPDH/FKBP36-Komplexes konnte mit GAPDH aus verschiedenen Säugern (Maus, Ratte, Rind, Kaninchen) nachgewiesen werden. Eine Interaktion von FKBP36 mit *E.coli* GAPDH oder der Sperma-spezifischen GAPD-S wurde jedoch nicht beobachtet. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von GAPDH aus Säugern, *E.coli* und GAPDS ergab keine linearen Sequenzbereiche die aufgrund ihrer Konservierung unter den verschiedenen Spezies auf eine Bindestelle für FKBP36 hindeuten.

4.2.4. Multiproteinkomplexe von FKBP36

PPIasen mit TPR-Domänen vermitteln aufgrund ihres strukturellen Aufbaus die Bildung von Multiproteinkomplexen [D'Andrea & Regan 2003; Pratt & Toft, 1997; Smith, 2004]. Dabei interagiert die PPIase mit TPR-Domäne nicht nur mit Hsp90 oder Hsp70 sondern beispielsweise auch mit dem Substratprotein des Chaperons. Dies wurde sowohl für den FKBP52/Hsp90/SHR-Komplex als auch für den FKBP37.7/Hsp90/AHR-Komplex nachgewiesen. Aufgrund des zu FKBP51, FKBP52 bzw. FKBP37.7 homologen Domänenaufbaus von FKBP36 ist für dieses FKBP ebenfalls die Bildung eines Multiproteinkomplexes bestehend aus FKBP36/Chaperon/Substrat möglich. Als Interaktionspartner von FKBP36 wurden die zwei Chaperone Hsp72 und Hsp90 identifiziert. Für beide Chaperone sind unterschiedliche Funktionen beschrieben [Eddy, 1999; Pratt *et al.*, 2004]. Da beide Chaperone um eine FKBP36 Bindung konkurrieren, kann davon ausgegangen werden, dass FKBP36 zwei funktionell-verschiedene Komplexe mit Hsp90 bzw. Hsp72 ausbildet.

Als weiterer möglicher Interaktionspartner des FKBP36/Chaperon-Komplexes wurde CLH identifiziert. CLH interagiert unabhängig von Hsp90 bzw. Hsp72 mit der FKBP-Domäne von FKBP36 und erlaubt damit die Bildung von trimeren FKBP36/Chaperon/CLH-Komplexen. Für eine physiologisch relevante Funktion des FKBP36/Hsp72/CLH-Komplexes sprechen die vergleichbaren subzellulären Verteilungsmuster der drei Proteine und die gemeinsame Reinigung

von Hsp72 und FKBP36 mit Clathrin-bedeckten Vesikeln. Eine direkte Wechselwirkung zwischen Chaperon und CLH ist für das Hsp72 homologe Hsc70 beschrieben [Barouch *et al.*, 1994]. Hierbei bewirkt Hsc70 strukturelle Änderungen im Clathringerüst Clathrin-bedeckter Vesikel und vermittelt den Dissemblierungsprozess [Fotin *et al.*, 2004; Heymann *et al.*, 2005]. Auch in den Keimzellen des Hodens sind Clathrin-bedeckte Vesikel an unterschiedlichen Transportvorgängen beteiligt, jedoch wird in diesen Zellen nicht Hsc70 sondern Hsp72 vorwiegend exprimiert [Daugaard, *et al.*, 2007]. Da der Sequenzbereich der ATPase- und substratbindenden Domänen von Hsc70 und Hsp72 89 % Sequenzidentität besitzen, ist in Keimzellen des Hodens ein durch Hsp72 vermittelter Dissemblierungsprozess Clathrin-bedeckter Vesikel möglich. Für die Dissemblierung Clathrin-bedeckter Vesikel ist Hsc70 allein nicht ausreichend, da für die Interaktion mit Clathrin ein Kofaktor notwendig ist. In Nervenzellen übernimmt Auxilin diese Funktion [Ungewickell *et al.*, 1995]. Auxilin interagiert über zwei distinkte Bereiche mit CLH und Hsp70 [Fotin *et al.*, 2004]. Weiterhin wird durch Auxilin die Bindung von CLH an Hsc70 vermittelt und die ATPase-Aktivität des Chaperons stimuliert. Diese Funktionen von Auxilin haben die Dissemblierung Clathrin-bedeckter Vesikel zur Folge. Für andere Gewebe, insbesondere Hoden und Keimzellen ist der Dissemblierungsprozess weniger gut untersucht. Es sind jedoch einige Proteine wie z.B. GAK mit einer Auxilin ähnlichen Funktion beschrieben [Umeda *et al.*, 2000]. Diese Proteine interagieren wie FKBP36 über zwei distinkte Bereiche mit Hsp70 und CLH. Essentiell für die Dissemblierung Clathrin-bedeckter Vesikel ist nicht nur die ATPase- und substratbindende- Domäne sondern auch die C-terminale Domäne von Hsc70 [Tsai & Wang, 1994]. Diese Domäne besitzt keinen direkten Einfluss auf die Aktivität und Substratbindung des Chaperons, vermittelt aber Interaktionen zu Proteinen mit TPR-Domäne, die die Hsp70-Aktivität beeinflussen können [Wu *et al.*, 2001]. FKBP36 interagiert spezifisch mit der C-terminalen Domäne von Hsp72. Deshalb könnte FKBP36 die Chaperonaktivität von Hsp72 und damit den Dissemblierungsprozess Clathrin-bedeckter Vesikel beeinflussen.

Hinweise zur Bestätigung dieser Theorie könnten verschiedene *in vitro* Untersuchungen mit gereinigten CLH bzw. Clathrin-bedeckten Vesikeln geben, die den Einfluss von FKBP36 und Hsp72 auf die Struktur und Stabilität von Clathrin-bedeckten Vesikeln näher charakterisieren. Auch die Untersuchung des Einflusses von FKBP36 auf die Chaperonaktivität von Hsp72, z.B. mit einem Luciferase-Rückfaltungstest, wäre von Interesse. Solche Untersuchungen sind für die TPR-Domänen Proteine wie z.B. Chip, TPR1 oder hSGT beschrieben [Wu *et al.*, 2001]. Für diese Experimente ist zu Homogenität gereinigtes Hsp72 notwendig. Wie in dieser Arbeit belegt, war die Präparation von zu Homogenität gereinigten authentischen Hsp72 aus tierischem Gewebe im Milligramm-Maßstab nicht möglich. Weiterhin führte eine rekombinante Expression von Hsp72 in

E.coli zu nicht funktionell gefalteten Protein. Von Hafizur *et al.* [2004] wurde eine Expression von funktionellen Hsp72 in einem Baculovirus- Expressionssystem beschrieben, weshalb für die rekombinante Herstellung von funktionellem Hsp72 ein eukaryontisches Expressionssystem notwendig ist.

Um den Einfluss von FKBP36 auf die Clathrin-vermittelte Endozytose *in vivo* z.B. mit einem Transferrin-Aufnahmetest zu untersuchen, ist die Expression von FKBP36 in einer immortalen Zelllinie notwendig. Bisher konnte authentisches FKBP36 nur in Hodengewebe nachgewiesen werden. Keine der untersuchten immortalen Zelllinien exprimiert durch Western-Blot detektierbare FKBP36-Konzentration, weshalb FKBP36 in COS7-Zellen heterolog exprimiert wurde. Die subzelluläre Verteilung von FKBP36 wies in diesem Zellsystem Unterschiede zum authentischen System auf. In COS-7-Zellen konnte, im Unterschied zum authentischen System, nur ein sehr geringer Anteil des FKBP36 als Bestandteil von Clathrin-bedeckten Vesikeln nachgewiesen werden. Für Studien, die den Einfluss des FKBP36 auf die Endozytose untersuchen, ist die subzelluläre Verteilung des FKBP36 von großer Bedeutung. Für die Durchführung solcher Experimente ist die Entwicklung eines heterologen Zellsystem, das dem authentischen System von FKBP36 ähnlicher ist, erforderlich.

Weiterhin wurde GAPDH als Interaktionspartner von FKBP36 identifiziert. Bei dieser Interaktion ist ebenfalls die Bildung eines trimeren Komplexes der Form FKBP36/Chaperon/GAPDH denkbar. Da Hsp72 und GAPDH um die Bindung an FKBP36 kompetieren, ist nur die Bildung eines FKBP36/Hsp90/GAPDH-Komplexes möglich. Durch direkte Wechselwirkungen zwischen PPIasen mit TPR-Domäne und dem Hsp90-Substrat im trimeren Komplex kann die Aktivität des Substrates beeinflusst werden [Reynolds *et al.*, 1999; Rigges *et al.*, 2003]. Beispielsweise inhibiert FKBP51 im FKBP51/Hsp90/GR-Komplex die transkriptionelle Aktivität des GR. Analog hierzu inhibiert FKBP36 durch direkte Wechselwirkung mit GAPDH die Aktivität der Dehydrogenase. Im Unterschied zum trimeren FKBP51/Hsp90/GR-Komplex ist GAPDH kein bekannter Hsp90 Klient. Möglicherweise wird erst durch die FKBP36/GAPDH-Interaktion eine direkte Bindung zwischen Hsp90 und GAPDH ermöglicht oder der FKBP36/GAPDH/Hsp90-Komplex vermittelt die räumliche Nähe zwischen GAPDH und Hsp90-Substraten, wie z.B. eNOS.

Die NO-Synthase eNOS kann durch Bildung von NO die Aktivität zahlreicher Proteine, darunter GAPDH beeinflussen [Hara *et al.*, 2006]. Die Aktivität der eNOS wird durch die Bindung an Hsp90 stimuliert [Shah *et al.*, 1999]. Möglicherweise agiert FKBP36 als Mittler zwischen GAPDH und dem Hsp90/eNOS-Komplex. Dies würde den Anteil NO-modifizierter GAPDH in der Zelle erhöhen.

4.3. Multiproteinkomplexe des FKBP36 in der Spermatogenese

Der Verlust des *FKBP6*-Gens führt in Mäusen und Ratten ausschließlich zur Sterilität männlicher Tiere [Crackower *et al.*, 2003; Ikadai *et al.*, 1992]. FKBP36 defiziente Nager sind zwar Azosperm besitzen jedoch ein zum Wildtyp analoges Verhalten und einen vergleichbaren Hormonhaushalt. Die in Ratten und Mäusen gezeigte Funktion von FKBP36 in der Spermatogenese und der damit verbundene molekulare Prozess sind wahrscheinlich auch in Menschen konserviert. Da die Lokalisation und die Funktion von FKBP36 auf den Hoden und die Spermatogenese eingegrenzt werden kann, stellt FKBP36 ein Ziel für ein nicht hormonelles Kontrazeptivum des Mannes dar. Grundlegend für die Entwicklung eines Kontrazeptivums auf Basis der Störung der FKBP36-Funktion, ist das Verständnis dieser Funktion auf molekularer Ebene. In FKBP36-defizienten Nagern kommt es zur Apoptose der Spermatozyten im Pachytän-Stadium. In diesem Stadium kann FKBP36 als Bestandteil des synaptonemalen Komplexes im Zellkern nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit der geschlechtsspezifischen Funktion wird die Koloalisation von FKBP36 mit dem XY-Bivalent während des Pachytäns angesehen [Kolas *et al.*, 2005]. Die Deletion einiger Proteine wie z.B. BRAC2, Scp3, H2AX und Hsp72 verursacht einen zur FKBP36-Deletion vergleichbaren Phänotyp mit azospermen Männchen und einem Abbruch der Meiose im Pachytän [Morelli & Cohen, 2005]. Da diese Proteine in Zusammenhang mit geschlechtsspezifischen Vorgängen im Pachytänstadium diskutiert werden, sind sie möglicherweise an derselben zellulären Funktion beteiligt. In dieser Arbeit konnte erstmals eine direkte Interaktion zwischen FKBP36 und Hsp72 nachgewiesen werden. Für FKBP36 und Hsp72 ist nicht nur eine essentielle Funktion im Pachytän sondern auch eine Lokalisation am XY-Bivalent beschrieben [Allen *et al.*, 1996; Dix *et al.*, 1997]. Möglicherweise ist die Ausbildung eines FKBP36/Hsp72-Komplexes essentiell für die Spermatogenese und bietet somit den Angriffspunkt für niedermolekulare Effektoren, welche die Spermatogenese beeinflussen könnten. Erste Untersuchungen zur FKBP36/Hsp72-Interaktion zeigen, dass an der Komplexbildung mindestens zwei Bereiche von FKBP36 beteiligt sind. Dies wiederum sollte die Entwicklung einer solchen Substanz erschweren.

Für den FKBP36/Hsp72-Komplex wurde weiterhin eine Bindung an CLH gezeigt. CLH ist bisher nicht als Meiose-relevantes Protein bekannt, besitzt jedoch eine Funktion bei der Bildung der Mitose-Spindel [Okamoto *et al.*, 2000; Royle *et al.*, 2005]. Da die Bestandteile des FKBP36/CLH/Hsp72-Komplexes auch in Zellkernen von Hoden nachgewiesen wurden, ist neben FKBP36/Hsp72 möglicherweise auch CLH Bestandteil des synaptonemalen Komplexes. Hinweise hierfür könnte die Färbung gespreizter Pachytän-Chromosomen mit CLH-spezifischen Antikörpern geben.

Neben der bereits beschriebenen Funktion von FKBP36 bei der meiotischen Zellteilung konnte erstmals auch eine Funktion dieser PPIase bei der Regulation eines Stoffwechsellzyms, der GAPDH, nachgewiesen werden. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, dessen cytosolische Aktivität auf vielfältige Weise reguliert wird. In Körperzellen ist GAPDH kein Schlüsselenzym der Glykolyse, nur eine weitgehende Hemmung dieses Enzyms zeigt nachweisbare Effekte auf die Glykolyse [Melendez-Hevia *et al.*, 1984]. Andererseits ist eine Regulation dieses Enzyms entscheidend für die Glykolyse in Pachytän Spermatozyten. Bereits bei einer geringfügigen Inhibierung der GAPDH werden deutliche Effekte nachgewiesen [Nakamura *et al.*, 1984a; Nakamura *et al.*, 1984b]. Die Ursachen dieser in Spermatozyten abweichenden Glykolyse- und Stoffwechselregulation sind bisher unverstanden. In dieser Arbeit wurde eine Inhibition der GAPDH-Aktivität durch FKBP36 beschrieben. FKBP36 wird vorwiegend in Hoden, insbesondere den Spermatozyten exprimiert, weshalb eine Beteiligung des FKBP36 an der Regulation von GAPDH und Glykolyse in Spermatozyten wahrscheinlich ist. FKBP36 kompetiert *in vitro* mit NAD^+ um eine Bindung an GAPDH. In Spermatozyten ist die NAD^+ Konzentration im Vergleich zu anderen Zelltypen relativ gering [Nakamura *et al.*, 1984a], weshalb FKBP36 in diesen Zellen durch direkte Interaktion mit GAPDH einen deutlichen Einfluss auf den Umsatz von Glukose ausüben könnte.

Weiterhin verringert die Expression von FKBP36 in COS7-Zellen die GAPDH-Konzentration und Aktivität im Cytoplasma. Trotz allgemein hoher Konzentrationen der GAPDH in allen Geweben können dennoch Konzentrationsunterschiede des Enzyms in Gewebe und Zelllinien nachgewiesen werden [Barber *et al.*, 2005]. Die Regulation der GAPDH-Konzentration ist bisher nur für Leberzellen gut untersucht. Hier kann die Regulation der GAPDH-Konzentration auf eine Regulation der Expression des Enzyms durch unterschiedliche Faktoren wie z.B. Alkohol, Aminosäuren oder Insulin zurückgeführt werden [Alexander *et al.*, 1988; Claeysens *et al.*, 2003; de la Monte *et al.*, 1999]. Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Organen wie sie z.B. zwischen Leber und Hoden gefunden werden, sind bisher nicht näher untersucht. Für Hoden, in denen die FKBP36 Expression hoch ist, wurde eine besonders geringe GAPDH Expression beschrieben [Barber *et al.*, 2005; Piechaczyk, *et al.*, 1984]. Möglicherweise hat FKBP36 auch im authentischen System Einfluss auf die GAPDH-Konzentration. Vergleiche der GAPDH-Konzentration und -Aktivität in Spermatozyten von Wildtyp Mäusen und FKBP36 defiziente Mäusen könnten Aufschluss darüber geben, ob FKBP36 nicht nur ein Regulator der Chromosomenpaarung sondern auch des Stoffwechsels in Spermatozyten ist.

Weiterhin unklar ist, ob FKBP36 die GAPDH-Konzentration über eine Hemmung der Genexpression oder Destabilisierung des Proteins reguliert. Da viele Proteine mit TPR-Motiv, wie

z.B. FKBP52, Cyc8 oder TCC1 Bestandteil von Proteinkomplexen die Einfluss auf die Genexpression besitzen sind [Kaneco *et al.*, 2006], ist dies auch für FKBP36 möglich. Untersuchungen der mRNA-Konzentrationen von GAPDH und FKBP36 könnten dies bestätigen.

5. Zusammenfassung

Die PPIase FKBP36 ist aus einer FKBP- und einer TPR-Domäne aufgebaut und besitzt eine essentielle Funktion bei der Paarung homologer Chromosomen während der Spermatogenese. Bisher sind nur genetische und immunohistochemische Untersuchungen publiziert, weshalb Gegenstand dieser Arbeit die proteinchemische Charakterisierung und die Identifizierung von Wechselwirkungspartner war.

- Mit Hilfe einer Sequenzanalyse des FKBP36 mit dem Programm *SMART* wurden eine N-terminale FKBP-Domäne und eine TPR-Domäne bestehend aus drei TPR-Motiven identifiziert.
- FKBP36 homologe Proteine in Mensch und Vertebraten wurden durch Datenbankanalysen (Sequenzvergleiche) identifiziert. Sie weisen ebenfalls den Aufbau des FKBP36 aus einer FKBP-Domäne und einer TPR-Domäne auf.
- FKBP36 sowie die verkürzten Proteinvarianten KBP36¹⁻¹⁴⁵, FKBP36³⁶⁻³²⁷, FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷, FKBP36¹⁻²⁸⁶ und FKBP36¹⁻²⁹⁸ wurden kloniert und in *E. coli* ohne Erweiterung, mit His₆-Fusion bzw. GST-Fusion exprimiert und gereinigt. Dabei wurden die Expression und die Stabilität der gereinigten Proteine optimiert.
- Durch Fern-UV CD-Spektroskopie von FKBP36, FKBP36¹⁻¹⁴⁵ und FKBP36¹⁴⁵⁻³²⁷ wurden Sekundärstrukturelemente der gereinigten Proteine nachgewiesen. Die bei 20°C aufgenommenen CD Spektren sind mit den Spektren von FKBP12 bzw. FKBP51, FKBP52 oder *At*FKBP42 vergleichbar. Eine Temperaturerhöhung führte zu einer Veränderung der CD-Signale. Dies deutet auf einen temperaturabhängigen Strukturverlust hin.
- Für FKBP36 und FKBP36¹⁻¹⁴⁵ konnte auch in Gegenwart der identifizierten Interaktionspartner keine PPIase-Aktivität nachgewiesen werden. Durch Sequenzanalyse und das Erstellen eines Strukturmodells der FKBP-Domäne des FKBP36 wurde ein Argininrest in Position 81 als mögliche Ursache der Inaktivität identifiziert.

- Variation der Aminosäure in Position 81 beeinflusst die PPIase Aktivität des FKBP36. Die hergestellte Variante FKBP36R81L war PPIase-aktiv und besaß mit dem Wildtyp vergleichbare proteinbiochemische und spektroskopische Eigenschaften. Diese Variante gibt einen Hinweis auf einen möglichen Aktivierungsmechanismus des Wildtyp FKBP36.
- Mit einem im Rahmen dieser Arbeit erzeugten, polyklonalen Anti-FKBP36-Antikörper wurde die Proteinexpression des FKBP in verschiedenen Nagetiergeweben untersucht. Für FKBP36 wurde eine spezifische Expression in Hoden nachgewiesen.
- Die durchgeführten Experimente zur Lokalisation von FKBP36 in Hodenzellen zeigten eine Verteilung in Cytoplasma und Zellkern. Weiterhin wurde FKBP36 als Bestandteil von Clathrin-bedeckten Vesikeln identifiziert. Diese Verteilung in unterschiedlichen Zellkompartimenten weist darauf hin, dass FKBP36 neben Funktion bei der Paarung homologer Chromosomen im Zellkern auch an weiteren zellulären Prozessen im Cytoplasma oder Clathrin-bedeckten Vesikeln beteiligt sein könnte.
- FKBP36 wurde in einem Säugerzellsystem (COS-7-Zellen) rekombinant exprimiert. Die Lokalisation des FKBP36 in COS-7 wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und subzellulärer Fraktionierung untersucht. In diesem Zellsystem ist FKBP36 vorwiegend in Cytoplasma und Zellkernen lokalisiert. Im Unterschied zum authentischen System sind in COS-7-Zellen nur geringe Mengen FKBP36 mit Clathrin-bedeckten Vesikeln assoziiert.
- Als spezifische Interaktionspartner von FKBP36 wurden CLH, GAPDH, Hsp72 und Hsp90 identifiziert. Die für Proteine mit TPR-Domäne charakteristische Interaktion mit Vertretern der Hsp90- bzw. Hsp70-Proteinfamilie wurde damit auch für FKBP36 nachgewiesen. Die Interaktionen mit CLH und GAPDH sind spezifisch für FKBP36.
- Die Charakterisierung der FKBP36/Hsp90-Interaktion zeigte, dass die C-terminale Domäne des Hsp90 mit der TPR-Domäne des FKBP36 interagiert. Die Hsp90-Bindung von FKBP36 ist damit vergleichbar mit anderen TPR-Domänen humaner PPIasen.
- Ein vom C-Terminus des Hsp90 abgeleitetes Pentapeptid (MEEVD) ist hinreichend für eine physiologische relevante FKBP36/Hsp90-Interaktion

- Die Bildung des FKBP36/Hsp90-Komplexes hat Änderungen des Fluoreszenzemissionspektrums und des Fern-UV CD-Spektrums zur Folge.
- Die Charakterisierung der FKBP36/Hsp72-Interaktion zeigte, dass die C-terminale Domäne des Hsp72 mit der TPR-Domäne des FKBP36 interagiert.
- Hsp72 und Hsp90 kompetieren um eine FKBP36-Bindung. Im Unterschied zur FKBP36/Hsp90-Interaktion sind Wechselwirkungen des FKBP36 mit Penta- bzw. Nonapeptiden abgeleitet vom C-Terminus des Hsp72 allein nicht ausreichend für eine physiologische relevante FKBP36/Hsp72-Interaktion. Die Aminosäuren His286-Ser297 des FKBP36 bilden eine weitere, für die FKBP36/Hsp72-Komplexbildung essentielle, Hsp72-Bindestelle.
- Untersuchungen mit den C-terminalen Domänen weiter Mitglieder der Hsp70 Proteinfamilie zeigten, dass die Bildung eines FKBP36/Hsp70-Komplexes spezifisch für Hsp72 ist.
- Die Charakterisierung der FKBP36/GAPDH-Interaktion zeigte, dass GAPDH an die TPR-Domäne des FKBP36 bindet. Die Bildung des FKBP36/GAPDH-Komplexes war unabhängig von der Dicarboxylatklemme des FKBP, weshalb die Bildung trimerer FKBP36/HSP90/GAPDH-Komplexe möglich ist.
- GAPDH und Hsp72 kompetieren um eine Bindung an den Aminosäuren His286-Ser297 des FKBP36.
- FKBP36 kompetiert mit dem Coenzym NAD⁺ der GAPDH um eine Bindung an GAPDH und inhibiert dadurch die katalytische Aktivität der GAPDH.
- Die Expression von FKBP36 in COS7-Zellen verringerte der GAPDH-Aktivität und -Konzentration in diesem Zellsystem.
- Die Charakterisierung der FKBP36/CLH-Interaktion zeigte, dass CLH direkt mit der FKBP-Domäne des FKBP36 interagiert. Die Interaktion ist unabhängig von der PPIase-Aktivität des FKBP36.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass FKBP36 große Ähnlichkeit zu anderen PPIasen mit TPR-Domäne aufweist. Die physiologische Bedeutung dieser Proteine ist eng mit der Ausbildung von Hsp90-enthaltenden Multiproteinkomplexen verbunden. Auch für FKBP36 wurde eine Interaktion mit Hsp90 nachgewiesen. Interessanterweise interagiert das Meiose-relevante Hsp72 ähnlich wie Hsp90 mit FKBP36. Die Ausbildung, des erstmals identifizierten FKBP36/Hsp72-Komplexes könnte essentiell für die Paarung homologer Chromosomen während der Spermatogenese sein. Der Nachweis von Interaktionen des FKBP36 mit nicht Meiose-relevanten Interaktionspartnern, wie z.B. GAPDH, zeigt dass FKBP36 auch an weiteren zellulären Prozessen beteiligt ist und legt eine Multifunktionalität des FKBP36 nahe.

Literaturverzeichnis

- Akner, G., Mossberg, K., Sundqvist, K.G., Gustafsson, J.A. and Wikstrom, A.C. (1992)** "Evidence for reversible, non-microtubule and non-microfilament-dependent nuclear translocation of hsp90 after heat shock in human fibroblasts" European Journal of Cell Biology **58**(2):356-364
- Alekseev, O.M., Widgren, E.E., Richardson, R.T., O'Rand, M.G. (2005)** "Association of NASP with HSP90 in mouse spermatogenic cells: stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei." Journal of biological chemistry **280**(4):2904-2911
- Alexander, M.C., Lomanto, M., Nasrin, N. Ramaika, C. (1988)** "Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(14):5092-5096
- Allan, R.K., Mok D., Ward, B.K., Ratajczak, T. (2006)** "Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90: evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization." Journal of biological chemistry **281**(11):7161-7171
- Allen, R.L., O'Brien D.A., Eddy, E.M. (1988)** "A Novel hsp70-Like Protein (P70) Is Present In Mouse Spermatogenic Cells." Molecular and Cellular Biology **8**(2): 828-832
- Ashley, T. (2004)** "The mouse "tool box" for meiotic studies." Cytogenetic and genome research **105**(2-4):166-171
- Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., Clark, B.J. (2005)** "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." Physiological Genomics **21**(3):389-395
- Barouch, W., Prasad, K., Greene, L.E., Eisenberg, E. (1994)** "ATPase activity associated with the uncoating of clathrin baskets by Hsp70." Journal of biological chemistry **269**(46):28563-28568
- Basso, A.D., Solit, D.B., Chiosis, G., Giri, B., Tsiachlis, P. and Rosen, N. (2002)** "Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function." Journal of Biological Chemistry **277**(42):39858-39866
- Baulieu, E.E., Atger, M., Best-Belpomme, M., Corvol, P., Courvalin, J.C., Mester, J., Milgrom, E., Robel, P., Rochefort, H., De Catalogne, D. (1975)** "Steroid hormone receptors." Vitamins & Hormones **33**: 649-736
- Bell, A., Monaghan, P. and Page, A.P. (2006)** "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action." International journal for parasitology **36**(3):261-276
- Blatch, G.L. and Lässle, M. (1999)** "The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein- protein interactions." Bioessays **21**(11):932-939
- Blobel, G. and Potter, V.R. (1966)** "Nuclei from rat liver: An isolation method that combines purity with high yield." Science **154**(2675):1662-1665
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S.E., Dower, W.J., Lipshutz, R.J., Sprang, S.R., Sambrook, J.F. and Gething, M.J. (1993)** "Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP" Cell **75**(4):717-728
- Bose, S., Weikl, T., Bugl, H. & Buchner, J. (1996)** "Chaperone function of Hsp90-associated proteins." Science **274**(5293): 1715-1717
- Brinker, A., Scheufler, C., Von Der Mulbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I., Hartl, F.U. (2002)** "Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes." The Journal of biological chemistry **277**(22):19265-19275
- Buchberger, A., Valencia, A., McMacken, R., Sander, C. and Bukau, B. (1994)** "The chaperone function of DnaK requires the coupling of ATPase activity with substrate binding through residue E171" EMBO Journal **13**(7):1687-1695

- Buchner, J. (1996)** "Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones." The FASEB journal **10**(1):10-19
- Buchner, J. (1999)** "Hsp90 & Co. - a holding for folding." Trends in biochemical sciences **24**(4):136-141
- Bukau, B. & Horwich, A.L. (1998)** "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." Cell **92**(3):351-366
- Burgess, S.M. (2002)** "Homologous chromosome associations and nuclear order in meiotic and mitotically dividing cells of budding yeast." Advances in genetics **46**:49-90
- Burke, J.R., Enghild, J.J., Martin, M.E., Jou, Y.S., Myers, R.M., Roses, A.D., Vance, J.M. and Strittmatter, W.J. (1996)** "Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH." Nature Medicine **2**(3):347-350
- Callebaut, I., Renoir, J.M., Lebeau, M.C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E.E., Mornon, J.P. (1992)** "An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(14):6270-6274
- Carrello, A., Allan, R.K., Morgan, S.L., Owen, B.A., Mok, D., Ward, B.K., Minchin, R.F., Toft, D.O., Ratajczak, T. (2004)** "Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70" Cell Stress Chaperones **9**(2):167-81
- Carrello, A., Ingley, E., Minchin, R.F., Tsai, S. and Ratajczak, T. (1999)** "The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor-associated immunophilins and hop is located in the dimerization domain of Hsp90". The Journal of biological chemistry **274**(5):2682-2689
- Carrigan, P.E., Sikink, L.A., Smith, D.F., Ramirez-Alvarado, M. (2006)** "Domain:domain interactions within Hop, the Hsp70/Hsp90 organizing protein, are required for protein stability and structure." Protein science **15**(3):522-32
- Castro, A. & Lorca, T. (2005)** "Exploring meiotic division in Cargèse. Meeting on meiotic divisions and checkpoints." EMBO reports **6**(9):821-825
- Catlett, M.G., Kaplan, K.B. (2006)** "Sgt1p is a unique co-chaperone that acts as a client adaptor to link Hsp90 to Skp1p" The Journal of biological chemistry **281**(44):33739-48
- Chang, H.C., Nathan, D.F. and Lindquist, S. (1997)** "In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60)" Molecular & Cellular Biology **17**(1):318-325
- Chen, M.X. & Cohen, P.T. (1997)** "Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain" FEBS letters **400**(1):136-140
- Chen, M.S., Silverstein, A.M., Pratt, W.B. and Chinkers, M. (1996a)** "The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant" Journal of Biological Chemistry **271**(50):32315-32320
- Chen, S., Sullivan, W.P., Toft, D.O. and Smith, D.F. (1998)** "Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants." Cell Stress & Chaperones **3**(2):118-12
- Cheung-Flynn, J., Roberts, P.J., Riggs, D.L., Smith, D.F. (2003)** "C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90" Journal of biological chemistry **278**(19):17388-17394
- Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Cox, M.B., Riggs, D.L., Suarez-Quian, C., Smith, D.F. (2005)** "Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling." Molecular endocrinology **19**(6):1654-1666
- Chuang, D.M., Hough, C. and Senatorov, V.V. (2005)** "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases." Annual review of pharmacology and toxicology **45**:269-290
- Citri, A., Alroy, I., Lavi, S., Rubin, C., Xu, W., Grammatikakis, N., Patterson, C., Neckers, L., Fry, D.W. and Yarden, Y. (2002)** "Drug-induced ubiquitylation and degradation of ErbB receptor tyrosine kinases: implications for cancer therapy." EMBO journal **21**(10):2407-2417

- Claeysens, S., Gangneux, C., Brasse-Lagnel, C., Ruminy, P., Aki, T., Lavoinne, A. Salier, J.P. (2003)** "Amino acid control of the human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene transcription in hepatocyte." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology* **285**(5):840-849
- Cliff, M.J., Harris, R., Barford, D., Ladbury, J.E., Williams, M.A. (2006)** "Conformational diversity in the TPR domain-mediated interaction of protein phosphatase 5 with Hsp90" *Structure* **14**(3): 415-26
- Cobb, J. & Handel, M.A.(1998)** "Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division." *Seminars in cell & developmental biology* **9**(4):445-50
- Coss, M.C., Winterstein, D., Sowder, R.C. , Simek, S.L.(1995)** "Molecular cloning, DNA sequence analysis, and biochemical characterization of a novel 65-kDa FK506-binding protein (FKBP65)" *The Journal of biological chemistry* **270**(49):29336-29341
- Crackower, M.A., Kolas, N.K., Noguchi, J., Sarao, R., Kikuchi, K., Kaneko, H., Kobayashi, E., Kawai, Y., Kozieradzki, I., Landers, R., Mo, M., Hui, C., Nieves, N., Cohen, P.E., Osborne, L.R., Wada, T., Kunieda, T., Moens, P.E., Penninger, J.M. (2003)** "Essential Role of Fkbp6 in Male Fertility and Homologous Chromosome Pairing in Meiosis" *Science* **300**(5623): 1291-1295
- Craescu, C.T., Rouvière, N., Popescu, A., Cerpolini, E., Lebeau, M.C., Baulieu, E.E., Mispelter, J. (1996)** "Three-dimensional structure of the immunophilin-like domain of FKBP59 in solution." *Biochemistry* **35**(34):11045-11052
- Csermely, P., Kajtar, J., Hollosi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C. R., Gergely, P., Jr., Soti, C., Mihaly, K. & Somogyi, J. (1993)** "ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90)" *Journal of biological chemistry*. **268**(10):1901-1907
- D'Andrea, L.D. & Regan, L. (2003)** "TPR proteins: the versatile helix." *Trends in biochemical sciences* **28**(12):655-662
- Das, A.K., Cohen, P.W., Barford, D.(1998)** "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions." *The EMBO journal* **17**(5):1192-1199
- Davies, T.H., Ning, Y.M., Sanchez, E.R. (2002)** "A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins." *Journal of Biological Chemistry* **277**(7): 4597-4600
- DeCenzo, M. T., Park, S. T., Jarrett, B. P., Aldape, R. A., Futer, O., Murcko, M. A. & Livingston, D. J. (1996)** "FK506-Binding Protein Mutational Analysis - Defining the Active-Site Residue Contributions to Catalysis and the Stability of Ligand Complexes." *Protein Engineering* **9**(2): 173-180
- De la Monte, S.M., Ganju, N., Tanaka, S., Banerjee, K., Karl, P.J., Brown, N.V. Wands, J.R. (1999)** "Differential effects of ethanol on insulin-signaling through the insulin receptor substrate-1." *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* **23**(5):770-777
- De Vries, F.A., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W.M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J.G., van Zeeland, A.A., Heyting, C., Pastink, A.(2005)** "Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. " *Genes & development* **19**(11):1376-1389
- Dehner, A., Furrer, J., Richter, K., Schuster, I., Buchner, J., Kessler, H. (2003)** "NMR chemical shift perturbation study of the N-terminal domain of Hsp90 upon binding of ADP, AMP-PNP, geldanamycin, and radicicol." *European journal of chemical biology* **4**(9):870-877
- Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Poorman-Allen, P., Mori, C., Blizard, D.R., Brown, P.R., Goulding, E.H., Strong, B.D., Eddy, E.M. (1997)** "HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes." *Development* **124**(22):4595-4603
- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M., Heitman, J. (1997)** "All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(24):13093-13098

- Drake, M.T., Downs, M.A., Traub, L.M. (2000)** "Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites." Journal of Biological Chemistry **275**(9):6479-6489
- Eddy, E.M. (1999)** "Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis." Reviews of reproduction **4**(1):23-30
- Edlich, F., Erdmann, F., Jarczowski, F., Moutty, M.C., Weiwad, M., Fischer, G. (2007)** "The Bcl-2 Regulator FKBP38-Calmodulin-Ca²⁺ Is Inhibited by Hsp90" Journal of biological chemistry **282**(21): 15341-15346
- Edlich, F., Weiwad, M., Erdmann, F., Fanghänel, J., Jarczowski, F., Rahfeld, J.U., Fischer G. (2005)** "Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin." EMBO journal **24**(14): 2688-99
- Eftink, M.R. (1997)** "Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions." Methods in Enzymology **278**: 221-257
- Eppig, J.T., Bult, C.J., Kadin, J.A., Richardson, J.E., Blake, J.A., the members of the Mouse Genome Database Group. (2005)** "The Mouse Genome Database (MGD): from genes to mice—a community resource for mouse biology." Nucleic acids research **33**:471-475
- Felsenstein, J. (1989)** "PHYLIP -- Phylogeny Inference Package" Cladistics**5**: 164-166
- Felts, S.J., Owen, B.A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D.B., Toft, D.O. (2000)** "The Hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties." Journal of biological chemistry **275**(5):3305-12
- Fischer, G., Bang, H., Berger, E. & Schellenberger, A. (1984a)** "Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates." Biochimica et Biophysica Acta **791**(1):87-97
- Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984b)** "Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden." Biomedica Biochimica Acta **43**(10):1101-1111
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmid, F.X. (1989)** "Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins." Nature. **337**(6206):476-478
- Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T., Sessa, W.C. (2002)** "Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release." Circulation research **90**(8):866-873
- Fotin, A., Cheng, Y., Grigorieff, N., Walz, T., Harrison, S.C., Kirchhausen, T. (2004)** "Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating." Nature **432**(7017):649-653
- Fournier, J.B., Dommersnes, P.G., Galatola, P. (2003)** "Dynamitin recruitment by clathrin coats: a physical step?" Comptes rendus biologies **326**(5):467-476
- Galigniana, M.D., Harrell, J.M., Murphy, P.J., Chinkers, M., Radanyi, C., Renoir, J.M., Zhang, M., Pratt, W.B. (2002)** "Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain." Biochemistry **41**(46):13602-13610
- Galigniana, M.D., Harrell, J.M., O'Hagen, H.M., Ljungman, M. Pratt, W.B. (2004)** "Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus." Journal of Biological Chemistry **279**(18): 22483-22489
- Gallon, V.A., Wilkie, S.E., Deery, E.C., Newbold, R.J., Sohocki, M.M., Bhattacharya, S.S., Hunt, D.M., Warren, M.J. (2004)** "Purification, characterisation and intracellular localisation of aryl hydrocarbon interacting protein-like 1 (AIP1) and effects of mutations associated with inherited retinal dystrophies." Biochimica et biophysica acta **1690**(2): 141-149
- Gatto, G. J., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J., Berg, J. M. (2000)** "Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human Pex5" Nature structural biology **7**(12):1091-1095
- Gavin, A.C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Bork, P., Seraphin, B., Kuster,**

- B.,Neubauer, G. & Superti-Furga, G. (2002)** "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." Nature **415**(6731):141-147
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989)** "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data [published erratum appears in Anal Biochem 1990 Sep;189(2):283]." Analytical Biochemistry **182**(2): 319-326
- Girard, M., Allaire, P.D., Blondeau, F.,McPherson P.S. (2005)** "Isolation of Clathrin-Coated Vesicles by Differential and Density Gradient Centrifugation" Current Protocols in Cell Biology 3131-31331
- Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., Benovic, J.L., Keen, J.H. (1997)** "Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain." Journal of Biological Chemistry **272**(23):15017-15022
- Gothel, S.F. & Marahiel, M.A.(1999)** "Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts." Cellular and molecular life sciences **55**(3):423-436
- Granzin, J., Eckhoff, A., Weiergräber, O.,H., (2006)** "Crystal structure of a multi-domain immunophilin from *Arabidopsis thaliana*: a paradigm for regulation of plant ABC transporters." Journal of Molecular Biology **364**(4):799-809
- Grenert, J.P., Johnson, B.D., Toft, D.O. (1999)** "The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes." Journal of Biological Chemistry **274**(25):17525-17533
- Grenert, J. P., Sullivan, W. P., Fadden, P., Haystead, T. A., Clark, J., Mimnaugh, E.,Kruttsch, H., Ochel, H. J., Schulte, T. W., Sausville, E., Neckers, L. M. & Toft, D. O.(1997)** "The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation." Journal of Biological Chemistry **272**(29):23843-23850
- Groves, M.R. & Barford, D. (1999)** "Topological characteristics of helical repeat proteins." Current opinion in structural biology **9**(3):383-389
- Gutensohn, M., Pahnke, S., Kolukisaoglu, U., Schulz, B., Schierhorn, A., Voigt, A., Hust, B., Rollwitz, I., Stöckel, J., Geimer, S., Albrecht, V., Flügge, U. I., Klösgen, R. B. (2004)** "Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor atToc33 from chloroplasts" Molecular genetics and genomics **272**(4):379-396
- Hanahan, D. (1983)** "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**(4): 557-580
- Handel, M.A. (2004)** "The XY body: a specialized meiotic chromatin domain." Experimental Cell Research **296**(1): 57-63
- Handel, M.A. & Eppig, J.J. (1998)** "Sexual dimorphism in the regulation of mammalian meiosis." Current Topics in Developmental Biology **37**:333-358
- Hara, M.R., Cascio, M.B., Sawa, A. (2006)** "GAPDH as a sensor of NO stress." Biochimica et biophysica acta **1762**(5):502-509
- Hara, M.R. & Snyder, S.H. (2006)** "Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade." Cellular and molecular neurobiology **26**(4-6):527-538
- Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., Schreiber, S.L.(1989)** "A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase." Nature **341**(6244):758-760
- Harrison, R.K. & Stein, R.L. (1990)** "Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK506 binding protein: evidence for the existenceof a family of distinct enzymes." Biochemistry **29**(16):3813-3816
- Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M. (2002)** "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561):1852-1858

- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988)** "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." Electrophoresis **9**(1): 28-32
- Heymann, J.B., Iwasaki, K., Yim, Y.I., Cheng, N., Belnap, D.M., Greene, L.E., Eisenberg, E., Steven, A.C. (2005)** "Visualization of the binding of Hsc70 ATPase to clathrin baskets: implications for an uncoating mechanism." Journal of Biological Chemistry **280**(8):7156-7161
- Hickey, E., Brandon, S.E., Smale, G., Lloyd, D., Weber, L.A. (1989)** "Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein." Molecular & Cellular Biology **9**(6):2615-2626
- Hirano, T., Kinoshita, N., Morikawa, K., Yanagida, M. (1990)** "Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+." Cell **60**(2):319-328
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano C., Dewar, D., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sørensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W.V., Figeys, D. & Tyers, M. (2002)** "Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry." Nature **415**(6231):180-183
- Hochwagen, A., Tham, W.H., Brar, G.A., Amon, A. (2005)** "The FK506 binding protein Fpr3 counteracts protein phosphatase 1 to maintain meiotic recombination checkpoint activity." Cell **122**(6):861-873
- Hoffmann, K. & Handschumacher, R.E. (1995)** "Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90" Biochemical Journal **307**(1):5-8
- Hottenrott, S., Schumann, T., Plückthun, A., Fischer, G., Rahfeld, J.U. (1997)** "The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase." The Journal of biological chemistry **272**(25):15697-15701
- Hunt, P.A. & Hassold, T.J. (2002)** "Sex matters in meiosis." Science **296**(5576):2181-2183
- Ikadai, H., Noguchi, J., Yoshida, M., Imamichi, T. (1992)** "An aspermia rat mutant (as/as) with spermatogenic failure at meiosis." The Journal of veterinary medical science **54**(4):745-749
- Itoh, H. & Tashima, Y. (1993)** "Domain structure of the 90-kDa stress protein: heparin- and antibody-binding domain." The International journal of biochemistry **25**(2):157-61
- Jaenicke, R. (1993)** "What does protein refolding in vitro tell us about protein folding in the cell?" Philosophical transactions of the Royal Society of London **339**(1289):287-294
- Janowski, B., Wöllner, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1997)** "A Protease-Free Assay For Peptidyl Prolyl *Cis/Trans* Isomerases Using Standard Peptide Substrates." Analytical Biochemistry **252**(2): 299-307
- Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D., Toft, D.O. (1998)** "Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding." Journal of Biological Chemistry **273**(6):3679-3686
- Kamphausen, T. (2002)** "Charakterisierung von AtFKBP42 und weiteren Peptidyl-Prolyl*cis/trans*-Isomerasen aus *Arabidopsis thaliana*" Promotion Universität Halle
- Kaneko, A., Umeyama, T., Utena-Abe, Y., Yamagoe, S., Niimi, M., Uehara, Y. (2006)** "Tcc1p, a novel protein containing the tetratricopeptide repeat motif, interacts with Tup1p to regulate morphological transition and virulence in *Candida albicans*." Eukaryotic Cell **5**(11):1894-1905
- Kay, J.E. (1996)** "Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl *cis-trans* isomerases" Biochemical Journal **314**(2): 361-385
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (2000)** "The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor." Journal of Biological Chemistry **275**(52):41317-41324
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (2002)** "Two distinct regions of the immunophilin-like protein XAP2 regulate dioxin receptor function and interaction with hsp90" Journal of Biological Chemistry **277**(14):11795-11801

- Keen, J.H., Willingham, M.C., Pastan, I.H. (1979)** "Clathrin-coated vesicles: Isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets." Cell **16**(2): 303-312
- Kelley, L.A., MacCallum, R.M., Sternberg, M.J.E. (2000)** "Enhanced Genome Annotation Using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM" Journal of molecular biology **299**(2):499-520
- Kirchhausen, T. & Harrison, S.C. (1981)** "Protein organization in clathrin trimers." Cell **23**(3): 755-761
- Kirchhausen, T. & Harrison, S.C. (1984)** "Structural domains of clathrin heavy chains." The Journal of cell biology **99**(5):1725-1734
- Kleckner, N. (1996)** "Meiosis: how could it work?" Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8167-8174
- Kolas, N.K., Marcon, E., Crackower, M.A., Höög, C., Penninger, J.M., Spyropoulos, B., Moens, P.B. (2005)** "Mutant meiotic chromosome core components in mice can cause apparent sexual dimorphic endpoints at prophase or X-Y defective male-specific sterility." Chromosoma **114**(2): 92-102
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001)** "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." Journal of Molecular Biology **305**(3): 567-580
- Kurek, I., Dulberger, R., Azem, A., Tzvi, B. B., Sudhakar, D., Christou, P. & Breiman, A. (2002a)** "Deletion of the C-terminal 138 amino acids of the wheat FKBP73 abrogates calmodulin binding, dimerization and male fertility in transgenic rice." Plant Molecular Biology **48**(4): 369-381
- Kurek, I., Pirkl, F., Fischer, E., Buchner, J., Breiman, A. (2002b)** "Wheat FKBP73 functions in vitro as a molecular chaperone independently of its peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity." Planta **215**(1): 119-126
- Kyhse-Andersen, J. (1984)** "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **10**(3-4): 203-209
- Laemmli, U. K. (1970)** "Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4" Nature **227**(5259): 680-685
- Lafer, E.M. (2002)** "Clathrin-protein interactions." Traffic **3**(8):513-520
- Lamb, J.R., Tugendreich, S., Hieter, P. (1995)** "Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?" Trends in biochemical sciences **20**(7): 257-259
- Lapouge, K., Smith, S. J.M., Walker, P. A., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., Rittinger, K. (2000)** "Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac-GTP." Molecular cell **6**(4): 899-907
- Liang, J., Hung, D.T., Schreiber, S.L., Clardy, J. (1996)** "Structure of the human 25 kDa FK506 binding protein complexed with rapamycin" Journal of the American Chemical Society **118**(5): 231-1232
- Lindner, R. & Ungewickell, E. (1991)** "Light-chain-independent binding of adaptors, AP180, and auxilin to clathrin." Biochemistry **30**(37): 9097-9101
- Liu, J., Farmer, J.D. Jr, Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L. (1991)** "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes." Cell **66**(4): 807-815
- Liu, F.H., Wu, S.J., Hu, S.M., Hsiao, C.D., Wang, C. (1999)** "Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats." Journal of Biological Chemistry **274**(48): 34425-34432
- Liu, S.H., Wong, M.L., Craik, C.S., Brodsky, F.M. (1995)** "Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs." Cell **83**(2): 257-267
- Maekawa M., O'Brien D.A., Allen, R.L., Eddy, E.M. (1989)** "Heat-Shock Cognate Protein (hsc71) and Related Proteins In Mouse Spermatogenic Cells" Biology of Reproduction **40**(2): 843-852
- Maestre-Martinez, M., Edlich, F., Jarczowski, F., Weiwad, M., Fischer, G., Lucke, C. (2006)** "Solution structure of the FK506-binding domain of human FKBP38" Journal of biomolecular NMR **34**(3):197-202

- Maldonado-Baez, L. & Wendland, B. (2006)** "Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators." Trends in Cell Biology **16**(10): 505-513
- Manning, M.C. & Woody, R.W. (1987)** "Theoretical determination of the CD of proteins containing closely packed antiparallel beta-sheets." Biopolymers **26**(4): 1731-1752
- Maruyama, T., Suzuki, R., Furutani, M. (2004)** "Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases) update 2004" Frontiers in bioscience **9**: 1680-1720
- Mazzola, J.L., Sirover, M.A. (2002)** "Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders?" Neurotoxicology **23**(4-5): 603-609
- Massol, N., Lebeau, M. C., Renoir, J. M., Faber, L. E. & Baulieu, E. E. (1992)** "Rabbit FKBP59-heat shock protein binding immunophilin (HBI) is a calmodulin binding protein." Biochemical and Biophysical Research Communications **187**(3): 1330-1335
- Mayer, M.P. & Bukau, B. (1998)** "Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action." Biological Chemistry **379**(3): 261-268
- Mayer, M.P., Schroder, H., Rudiger, S., Paal, K., Laufen, T., Bukau, B. (2000)** "Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70" Nature structural biology **7**(7): 586-593
- McKee, B.D. (1996)** "The license to pair: identification of meiotic pairing sites in Drosophila." Chromosoma **105**(3): 135-141
- Melendez-Hevia, E., Siverio, J.M., Perez, J.A. (1984)** "Studies on glycolysis in vitro: role of glucose phosphorylation and phosphofructokinase activity on total velocity." International journal of biochemistry **5**(16): 469-476
- Meyer, B.K. & Perdew, G.H. (1999)** "Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization." Biochemistry **38**(28): 8907-8917
- Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H. (1998)** "Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity." Molecular & Cellular Biology **18**(2): 978-988
- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W., Pearl, L.H. (2003)** "Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions." Molecular cell **11**(3): 647-658
- Meyer-Siegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J.K., Sirover, M.A. (1991)** "A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(19): 8460-8464
- 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**(5007): 836-839
- Miyata, Y. (2005)** "Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents." Current Pharmaceutical Design **11**(9):1131-1138
- Miyata, Y., Chambrud, B., Radanyi, C., Leclerc, J., Lebeau, M.C., Renoir, J.M., Shirai, R., Catelli, M.G., Yahara, I., Baulieu, E.E. (1997)** "Phosphorylation of the immunosuppressant FK506-binding protein FKBP52 by casein kinase II: regulation of HSP90-binding activity of FKBP52." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(26):14500-14505
- 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**(6323):248-250
- Morelli, M.A. & Cohen, P.E. (2005)** "Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis." Reproduction **130**(6):761-781
- Morero, R.D., Vinals, A.L., Bloj, B., Farias, R.N. (1985)** "Fusion of phospholipid vesicles induced by muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the absence of calcium." Biochemistry **24**(8):1904-1909

- Morgan, J.R., Prasad, K., Jin, S., Augustine, G.J., Lafer, E.M. (2001)** "Uncoating of clathrin-coated vesicles in presynaptic terminals: roles for Hsc70 and auxilin." Neuron **32**(2):289-300
- Mues, G.I., Munn, T.Z., Raese, J.D. (1986)** "A human gene family with sequence homology to *Drosophila melanogaster* Hsp70 heat shock genes." Journal of Biological Chemistry **261**(2):874-877
- Munn, K. & Steward, R. (2000)** "The shut-down gene of *Drosophila melanogaster* encodes a novel FK506-binding protein essential for the formation of germline cysts during oogenesis." Genetics **156**(1):245-256
- Nagradova, N.K. (2001)** "Study of the properties of phosphorylating D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." Biochemistry **66**(10):1067-1076
- Nagy, E., Henics, T., Eckert, M., Miseta, A., Lightowers, R.N., Kellermayer, M. (2000)** "Identification of the NAD(+)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain." Biochemical & Biophysical Research Communications **275**(2):253-260
- Nair, S.C., Toran, E.J., Rimerman, R.A., Hjermstad, S., Smithgall, T.E., Smith, D.F. (1996)** "A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor." Cell Stress & Chaperones **1**(4):237-250
- Nakamura, M., Okinaga, S., Arai, K. (1984a)** "Metabolism of pachytene primary spermatocytes from rat testes: pyruvate maintenance of adenosine triphosphate level." Biology of Reproduction **30**(5):1187-1197
- Nakamura, M., Okinaga, S., Arai, K. (1984b)** "Inhibition of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by adenine nucleotides in pachytene primary spermatocytes from rat testes." Andrologia **16**(5):446-450
- Nathke, I.S., Heuser, J., Lupas, A., Stock, J., Turck, C.W., Brodsky, F.M. (1992)** "Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub." Cell **68**(5):899-910
- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M., Takagi, T., Yokoyama, K. (1995)** "Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein." European journal of biochemistry **233**(1):1-8
- Nemoto, T., Sato, N., Iwanari, H., Yamashita, H., Takagi, T. (1997)** "Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP90) Probing with a library of anti-HSP90 monoclonal antibodies and limited proteolysis." The Journal of biological chemistry **272**(42):26179-87
- Obermann, W. M., Sondermann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P. & Hartl, F. U. (1998)** "In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis." Journal of cell biology. **143**(4):901-910
- Odunuga, O.O., Hornby, J.A., Bies, C., Zimmermann, R., Pugh, D.J., Blatch, G.L. (2003)** "Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70-mSTII interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity." The Journal of biological chemistry, **278**(9):6896-6904
- Okamoto, C.T., McKinney, J., Jeng, Y.Y. (2000)** "Clathrin in mitotic spindles." American journal of physiology **279**(2): 369-374
- Olah, J., Tokesi, N., Vincze, O., Horvath, I., Lehotzky, A., Erdei, A., Szajli, E., Medzihradzky, K.F., Orosz, F., Kovacs, G.G., Ovadi, J. (2006)** "Interaction of TPPP/p25 protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and their co-localization in Lewy bodies." FEBS letters **580**(25):5807-5814
- Owen, D.J., Collins, B.M., Evans, P.R. (2004)** "Adaptors for clathrin coats: structure and function." Annual Review of Cell & Developmental Biology **20**(1):153-191
- Owens-Grillo, J.K., Czar, M.J., Hutchison, K.A., Hoffmann, K., Perdew, G.H., Pratt, W.B. (1995)** "A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains." Journal of Biological Chemistry **271**(23):13468-13475
- Page, A.M. (1999)** "The anaphase-promoting complex: New subunits and regulators." Annual review of biochemistry **68**:583-609
- Page, S.L. & Hawley, R. S. (2003)** "Chromosome choreography: the meiotic ballet." Science **301**(5634):785-789

- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. & Pearl, L.H. (1998)** "ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo." EMBO journal **17**(16):4829-36
- Perdew, G. H., Hord, N., Hollenback, C.E., Welsh, M.J. (1993)** "Localization and characterization of the 86- and 84-kDa heat shock proteins in Hepa 1c1c7 cells." Experimental cell research **209**(2):350-6
- Pfanner, N. & Geissler A. (2001)** "Versatility of the mitochondrial import machinery." Nature reviews. Molecular cell biology **2**(5):339-349
- Piechaczyk, M., Blanchard, J.M., Marty, L., Dani, C., Panabieres, F., El Sabouty, S., Fort, P., Jeanteur, P. (1984)** "Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues." Nucleic Acids Research **12**(5):6951-6963
- Pirkl, F., Fischer, E., Modrow, S., Buchner, J. (2001)** "Localization of the chaperone domain of FKBP52" Journal of biological chemistry **276**(40):37034-37041
- Pirkl, F. (2001)** "Funktionelle Analyse der großen Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerasen FKBP51, FKBP52 und Cyp40" Dissertation, Universität München
- Pongrac, J.L., Middleton, F.A., Peng, L., Lewis, D.A., Levitt, P., Mirnics, K. (2004)** "Heat shock protein 12A shows reduced expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia" Biological psychiatry **56**(12): 943-950
- Prasad, K., Heuser, J., Eisenberg, E., Greene, L. (1994)** "Complex formation between clathrin and uncoating ATPase." Journal of biological chemistry **269**(9):6931-6939
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., DeFranco, D.B. (2004)** "Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement." Cellular Signalling **16**(8):857-872
- Pratt, W.B. & Toft, D.O.(1997)** "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones." Endocrine reviews **18**(3):306-360
- Pratt, W.B. & Toft, D.O. (2003)** "Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery." Experimental biology and medicine **228**(2):111-133
- Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., Pearl, L.H. (1997)** "Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone." Cell **90**(1):65-75
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., Pearl, L.H. (1999)** "Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones." EMBO Journal **18**(3):754-762
- Rahfeld, J.U., Schierhorn, A., Mann, K., Fischer, G. (1994)** "A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*." FEBS letters **343**(1):65-69
- Ratajczak, T., Ward, B.K., Minchin, R.F. (2003)** "Immunophilin chaperones in steroid receptor signalling." Current Topics in Medicinal Chemistry, **3**(12):1348-1357
- 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" Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **84**(2):663-669
- Rial, D.V. & Ceccarelli, E.A. (2002)** "Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications." Protein Expression & Purification **25**(3):503-507
- Riggs, D.L., Roberts, P.J., Chirillo, S.C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., Smith, D.F. (2003)** "The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo." EMBO Journal **22**(5):1158-1167

- Rosenhagen, M.C., Soti, C., Schmidt, U., Wochnik, G.M., Hartl, F.U., Holsboer, F., Young, J.C., Rein, T. (2003) "The heat shock protein 90-targeting drug cisplatin selectively inhibits steroid receptor activation." Journal of molecular endocrinology 17(10): 1991-2001
- Royle, S.J. (2006) "The cellular functions of clathrin." Cellular & Molecular Life Sciences 63(16):1823-1832
- Royle, S.J., Bright, N.A., Lagnado, L. (2005) "Clathrin is required for the function of the mitotic spindle." Nature 434(7037):1152-1157
- Rudiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. (1997) "Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries." EMBO Journal 16(7):1501-1507
- Russell, L.C., Whitt, S.R., Chen, M.S., Chinkers, M. (1999) "Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90" Journal of Biological Chemistry, 274(29):20060-20063
- Sato, S., Fujita, N., Tsuruo, T. (2000) "Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(20):10832-10837
- Scammell, J.G., Denny, W.B., Valentine, D.L., Smith, D.F. (2001) "Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates." General and comparative endocrinology 124(2):152-165
- Scherer, S.W., Cheung, J., MacDonald, J.R., Osborne, L.R., Nakabayashi, K., Herbrick, J.A., Carson, A.R., Parker-Katiraei, L., Skaug, J., Khaja, R., Zhang, J., Hudek, A.K., Li, M., Haddad, M., Duggan, G.E., Fernandez, B.A., Kanematsu, E., Gentles, S., Christopoulos, C.C., Choufani, S., Kwasnicka, D., Zheng, X.H., Lai, Z., Nusskern, D., Zhang, Q., Gu, Z., Lu, F., Zeesman, S., Nowaczyk, M.J., Teshima, I., Chitayat, D., Shuman, C., Weksberg, R., Zackai, E.H., Grebe, T.A., Cox, S.R., Kirkpatrick, S.J., Rahman, N., Friedman, J.M., Heng, H.H., Pelicci, P.G., Lo-Coco, F., Belloni, E., Shaffer, L.G., Pober, B., Morton, C.C., Gusella, J.F., Bruns, G.A., Korf, B.R., Quade, B.J., Ligon, A.H., Ferguson, H., Higgins, A.W., Leach, N.T., Herrick, S.R., Lemyre, E., Farra, C.G., Kim, H.G., Summers, A.M., Gripp, K.W., Roberts, W., Szatmari, P., Winsor, E.J., Grzeschik, K.H., Teebi, A., Minassian, B.A., Kere, J., Armengol, L., Pujana, M.A., Estivill, X., Wilson, M.D., Koop, B.F., Tosi, S., Moore, G.E., Boright, A.P., Zlotorynski, E., Kerem, B., Kroisel, P.M., Petek, E., Oscier, D.G., Mould, S.J., Dohner, H., Dohner, K., Rommens, J.M., Vincent, J.B., Venter, J.C., Li, P.W., Mural, R.J., Adams, M.D. and Tsui, L.C. (2003) "Human chromosome 7: DNA sequence and biology." Science 300 (22):767-772
- Scheffler, 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(2): 199-210
- Schiene-Fischer, C., Habazettl, J., Schmid, F.X., Fischer, G. (2002) "The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase." Nature structural biology 9(6):419-424
- Schmid, F.X. (1989) "Protein Structure: A Practical Approach" IRL Press, Oxford: 251-285
- Schultz, D.E., Hardin, C.C., Lemon, S.M. (1996) "Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus." Journal of Biological Chemistry 271(24):14134-14142
- Shah, V., Wiest, R., Garcia-Cardena, G., Cadelina, G., Groszmann, R.J., Sessa, W.C. (1999) "Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension." American journal of physiology 277(2):G463-468
- Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D.L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M.J., Mathews, L.M., Schneider, M.D., Hamilton, S.L., Matzuk, M.M. (1998) "Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12" Nature 391(6666):489-492
- Sich, C., Improta, S., Cowley, D.J., Guenet, C., Merly, J.P., Teufel, M., Saudek, V. (2000) "Solution structure of a neurotrophic ligand bound to FKBP12 and its effects on protein dynamics." European journal of biochemistry 267(17):5342-5355
- 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(2): 307-317

- Sikorski, R.S., Michaud, W.A., Wootton, J.C., Boguski, M.S., Connelly, C., Hieter, P. (1991)** "TPR proteins as essential components of the yeast cell cycle." Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology **56**:663-673
- Siligardi, G., Panaretou, B., Meyer, P., Singh, S., Woolfson, D.N., Piper, P.W., Pearl, L.H., Prodromou, C. (2002)** "Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37" Journal of Biological Chemistry **277**(23):20151-20159
- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Chen, M.S., Owens-Grillo, J.K., Chinkers, M., Pratt, W.B. (1997)** "Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin." Journal of Biological Chemistry **272**(26):16224-16230
- Silverstein, A.M., Grammatikakis, N., Cochran, B.H., Chinkers, M., Pratt, W.B. (1998)** "p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site." Journal of Biological Chemistry **273**(32):20090-20095
- 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." Journal of Biological Chemistry **274**(52):36980-36986
- Sinars, C.R., Cheung-Flynn J., Rimerman, R.A., Scammell, J.G., Smith, D.F., Clardy J. (2003)** "Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(3):868-73
- Singh, R. & Green, M.R. (1993)** "Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." Science **259**(5093):365-368
- Sirover, M.A. (1997)** "Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology." Journal of cellular biochemistry **66**(2):33-140
- Sirover, M.A. (1999)** "New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." Biochimica et biophysica acta **1432**(2):159-184
- Sirover, M.A. (2005)** "New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells." Journal of Cellular Biochemistry **95**(1):45-52
- Smith, C.J. & Pearse, B.M. (1999)** "Clathrin: anatomy of a coat protein." Trends Cell Biology **9**(9):335-338
- Smith, D.F. (2004)** "Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes." Cell Stress Chaperones **9**(2):109-121
- Smith, D.F., Whitesell, L., Nair, S.C., Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R.A. (1995)** "Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent." Molecular and cellular biology **15**(12):6804-6812
- Sohocki, M.M., Bowne, S.J., Sullivan, L.S., Blackshaw, S., Cepko, C.L., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Khaliq, S., Qasim Mehdi, S., Birch, D.G., Harrison, W.R., Elder, F.F., Heckenlively, J.R., Daiger, S.P. (2000)** "Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis." Nature genetics **24**(1):79-83
- Son, W.Y., Hwang, S.H., Han, C.T., Lee, J.H., Kim, S., Kim, Y.C. (1999)** "Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells." Molecular human reproduction **5**(12):1122-1126
- Sousa, R. & Lafer, E.M. (2006)** "Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor." Traffic **7**(12):1596-1603
- Stanley, W.A., Pursiainen, N.V., Garman, E.F., Juffer, A.H., Wilmanns, M., Kursula, P. (2007)** "A previously unobserved conformation for the human Pex5p receptor suggests roles for intrinsic flexibility and rigid domain motions in ligand binding." BMC Structural Biology **7**:24
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer, C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A.A., Rubin, G.M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin,**

- T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S.S., Loquellano, N.A., Peters, G.J., Abramson, R.D., Mullahy, S.J., Bosak, S.A., McEwan, P.J., McKernan, K.J., Malek, J.A., Gunaratne, P.H., Richards, S., Worley, K.C., Hale, S., Garcia, A.M., Gay, L.J., Hulyk, S.W., Villalon, D.K., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Lu, X., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madan, A., Young, A.C., Shevchenko, Y., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Touchman, J.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Krzywinski, M.I., Skalska, U., Smailus, D.E., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J., Marra, M.A. (2002) "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(26):16899-16903
- Sullivan, W., Stensgard, B., Caucutt, G., Bartha, B., McMahon, N., Alnemri, E.S., Litwack, G., Toft, D. (1997) "Nucleotides and two functional states of hsp90" Journal of Biological Chemistry **272**(12):8007-8012
- Svetlanov, A. & Cohen, P.E. (2004) "Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis." Experimental cell research **296**(1):71-79
- Tahara, H., Yokota, E., Igarashi, H., Orii, H., Yao, M., Sonobe, S., Hashimoto, T., Hussey, P.J., Shimmen, T. (2007) "Clathrin is involved in organization of mitotic spindle and phragmoplast as well as in endocytosis in tobacco cell cultures." Protoplasma **230**(1-2):1-11
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., Anderson, R.L. (1996) "A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family." Cell Stress & Chaperones **1**(1):23-28
- ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S.C., Kirchhausen, T. (1998) "Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker." Cell **95**(4):563-573
- Thulasiraman, V. & Matts, R.L. (1996) "Effect of geldanamycin on the kinetics of chaperone-mediated renaturation of firefly luciferase in rabbit reticulocyte lysate." Biochemistry **35**(41):13443-13450
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to Nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(9): 4350-4354
- Tranguch, S., Cheung-Flynn, J., Daikoku, T., Prapapanich, V., Cox, M.B., Xie, H., Wang, H., Das, S.K., Smith, D.F., Dey, S.K.(2005) "Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(40):14326-14331
- Tradler, T., Stoller, G., Rücknagel, K. P., Schierhorn, A., Rahfeld, J.-U., Fischer, G. (1997) "Comparative mutational analysis of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases: active sites of *Escherichia coli* trigger factor and human FKBP12" FEBS Letters **407**(2): 184-190
- Tsai, M.Y. & Wang, C. (1994) "Uncoupling of peptide-stimulated ATPase and clathrin-uncoating activity in deletion mutant of hsc70." Journal of biological chemistry **269**(8):5958-5962.
- Umeda, A., Meyerholz, A., Ungewickell, E. (2000) "Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation." European Journal of Cell Biology **79**(5):336-342
- Ungermann, C., Neupert, W., Cyr, D.M. (1994) "The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria." Science **266**(5188):1250-1253
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S.E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L.E., Eisenberg, E. (1995) "Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles." Nature **378**(6557):632-635
- Van Der Spuy, J., Kana, B.D., Dirr, H.W., Blatch, G.L. (2000) "Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs." Biochemical Journal **345**(3):645-651
- Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., Clardy, J. (1991) "Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex." Science **252**(5007): 839-842
- Vogtherr, M., Jacobs, D.M., Parac, T.N., Maurer, M., Pahl, A., Saxena, K., Ruterjans, H., Griesinger, C., Fiebig, K.M. (2002) "NMR solution structure and dynamics of the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase domain of the trigger

- factor from *Mycoplasma genitalium* compared to FK506-binding protein." Journal of molecular biology **318**(4):1097-1115
- Vollberg, T.M., Siegler, K.M., Cool, B.L., Sirover, M.A. (1989)** "Isolation and characterization of the human uracil DNA glycosylase gene." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(22):8693-8697
- Walker, J. M. (1994)** "The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation." Methods in Molecular Biology **32**: 5-8
- Walter, S. & Buchner, J. (2002)** "Molecular chaperones--cellular machines for protein folding." Angewandte Chemie **41**(7):1098-113
- Wang, Z., Chen, W., Kono, E., Dang, T. and Garabedian, M.J. (2007)** "Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase." Molecular endocrinology **21**(3):625-634
- Ward, B.K., Allan, R.K., Mok, D., Temple, S.E., Taylor, P., Dornan, J., Mark, P.J., Shaw, D.J., Kumar, P., Walkinshaw, M.D., Ratajczak, T. (2002)** "A structure-based mutational analysis of cyclophilin 40 identifies key residues in the core tetratricopeptide repeat domain that mediate binding to Hsp90" Journal of biological chemistry **277**(43):40799-40809
- Waugh, D.S. (2005)** "Making the most affinity tags" Trends in Biotechnology **23**(6): 316-320
- Wearsch, P.A. & Nicchitta, C.V. (1996)** "Purification and partial molecular characterization of GRP94, an ER resident chaperone." Protein expression and purification **7**(1):114-121
- Wegele, H., Muller, L., Buchner, J. (2004)** "Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding." Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology **151**:1-44
- Wegele, H., Haslbeck, M., Reinstein, J., Buchner, J. (2003)** "Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins." Journal of Biological Chemistry **278**(28):25970-25976
- Welch, W. J. & Feramisco, J. R. (1982)** "Purification of the major mammalian heat shock proteins" Journal of Biological Chemistry **257**(8):14949-14959
- Welch, W.J. & Feramisco J.R. (1985)** "Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides" Molecular and Cellular Biology **5**: 1229-37
- Wilson, L.K., Dhillon, N., Thorner, J., Martin, G.S. (1997)** "Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3." Journal of Biological Chemistry **272**(20):12961-12967
- 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., Navia, M.A. (1995)** "Comparative X-Ray Structures of the Major Binding-Protein for the Immunosuppressant FK506 (Tacrolimus) in Unliganded Form and in Complex with FK506 and Rapamycin." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **51**(4): 511-521
- Wochnik, G.M., Ruegg, J., Abel, G.A., Schmidt, U., Holsboer, F., Rein, T. (2005)** "FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells." Journal of Biological Chemistry **280**(6):4609-4616
- Wu, S.J., Liu, F.H., Hu, S.M., Wang, C. (2001)** "Different combinations of the heat-shock cognate protein 70 (hsc70) C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat-containing proteins." Biochemical journal **359**(2):419-26
- Wu, B., Li, P., Liu, Y., Lou, Z., Ding, Y., Shu, C., Ye, S., Bartlam, M., Shen, B., Rao, Z. (2004)** "3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(22):8348-53
- Wu, S.J., Liu, F.H., Hu, S.M., Wang, C. (2001)** "Different combinations of the heat-shock cognate protein 70 (hsc70) C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat-containing proteins." Biochemical journal **359**(2):419-426

- Xiong, X.D., Li, E.M., Xu L.Y., Chen H.B., Chen L., Cai W.J., Han, Y.L., Shen Z.Y., Zeng Y. (2003)** "Separation and identification of differentially expressed nuclear matrix proteins between human esophageal immortalized and carcinomatous cell lines." World journal of gastroenterology **9**(10):2143-8
- Ybe, J.A., Greene, B., Liu, S.H., Pley, U., Parham, P., Brodsky, F.M. (1998)** "Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges." EMBO Journal **17**(5): 1297-1303
- Yin, H., Wang, H., Zong, H., Chen, X., Wang, Y., Yun, X., Wu, Y., Wang, J., Gu, J. (2006)** "SGT, a Hsp90beta binding partner, is accumulated in the nucleus during cell apoptosis." Biochemical and biophysical research communications **343**(4):1153-8
- Yano, M., Terada, K., Mori, M. (2003)** "AIP is a mitochondrial import mediator that binds to both import receptor Tom20 and preproteins." Journal of cell biology **163**(1):45-56
- Young, J.C. & Hartl, F.U. (2000)** "Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23" EMBO Journal **19**(21):5930-5940
- 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" Journal of Biological Chemistry **273**(29):18007-18010
- Yun, B.G., Huang, W., Leach, N., Hartson, S.D., Matts, R.L. (2004)** "Novobiocin induces a distinct conformation of Hsp90 and alters Hsp90-cochaperone-client interactions." Biochemistry **43**(25): 8217-29
- Zeke, T., Morrice, N., Vazquez-Martin, C., Cohen, P.T. (2005)** "Human protein phosphatase 5 dissociates from heat-shock proteins and is proteolytically activated in response to arachidonic acid and the microtubule-depolymerizing drug nocodazole." Biochemical journal **385**(1): 45-56
- Zhang, S.L., Yu, J., Cheng, X.K., Ding, L., Heng, F.Y., Wu, N.H., Shen, Y.F. (1999)** "Regulation of human hsp90alpha gene expression." FEBS Letters **444**(1):130-135
- Zhu, D., Dix, D.J., Eddy, E.M. (1997)** "HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes" Development **124**(15):3007-3014
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., Hendrickson, W.A. (1996)** "Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK." Science **272**(5268):1606-1614

Danksagung

Prof. G. Fischer möchte ich für die Möglichkeit danken, in der Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung diese Arbeit anzufertigen. Weiterhin möchte ich mich für die große Freiheit, mit der ich dieses Thema bearbeiten durfte und das Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Im Besonderen möchte ich Herrn Dr. F. Edlich für das Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für die unermüdliche Unterstützung bei zahlreichen großen und kleinen Problemen danken.

Herrn Dr. M. Weiwad danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die zahlreichen Diskussionen.

Herrn Dr. F. Erdmann und Frau M. Heidler möchte ich für die durchgeführten Arbeiten im Bereich Zellkultur danken.

Herrn Dr. M. Liebscher möchte ich für die Ratschläge und Tipps sowie für die Bereitstellung verschiedener Überexpressionsklone danken.

Frau Dr. A. Schierhorn danke ich für die Durchführung zahlreicher massenspektrometrischer Analysen.

Herrn Dr. G. Jahreis danke ich für die Synthese und Bereitstellung der verwendeten Peptide.

Frau Dr. C. Brandsch und Herrn R. Klinger möchte ich für die Präparation und Bereitstellung der verwendeten Säugetiergewebe danken.

Herrn Dr. G. Hause für die Durchführung elektronenmikroskopischer Aufnahmen.

Frau B. Rappsilber und Frau M. Kirchner möchte ich für die Unterstützung im Laboralltag danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: **Jarczowski**
Vorname: **Franziska**
Geboren am: 04.04.1979
Geburtsort: Lutherstadt Eisleben
Staatsang.: deutsch
Familienst.: ledig

Schulausbildung:

09/1985 - 06/1989 Grundschule Röblingen
09/1990 - 06/1992 Polytechnische Oberschule, Röblingen
09/1992 - 06/1997 Gymnasium an der Bergmannsallee, Eisleben
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Fachliche Ausbildung:

09/1997 - 03/1998 HTWK Leipzig, Studium der Wirtschaftsmathematik (1 Semester)
09/1998 - 11/2003 Martin-Luther-Universität Halle, Studium der Biochemie,
Diplomarbeit zum Thema: „Vergleichende Substratspezifität humaner
FKBP“
Abschluss als Diplom-Biochemiker
11/2003 – 06/2007 Promotionsarbeit an der Max Planck Forschungsstelle – Enzymologie
der Proteinfaltung (Prof. Dr. G. Fischer) zum Thema:
"Proteinbiochemische und funktionelle Charakterisierung des
hFKBP36"

Erklärung

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

Halle, Dezember 2007

