

**Funktionen molekularer Chaperone
in der Qualitätskontrolle
zytosolischer Proteine**

Inaugural-Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Marceli Stanislaw Fröhlich

aus Köln

Köln, 2005

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2005

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Komponenten des zellulären, cytosolischen Protein-Qualitätskontrollsystems in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Der Begriff Protein-Qualitätskontrolle (PQC) bezeichnet zelluläre Prozesse, die die Faltung neusynthetisierter Proteine in ihre native, dreidimensionale Konformation überwachen und entweder die Rückfaltung mutierter Proteine oder deren Abbau vermitteln. Zentrale Komponenten der PQC in eukaryotischen Zellen sind die molekularen Chaperone und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Für die Untersuchung der PQC *in vivo*, wurden faltungsdefekte DHFR-Modellsubstrate generiert, die einem raschen, Proteasom-abhängigen Abbau unterlagen. Die Analysen zeigten, dass die mutierten DHFR-Varianten im Gegensatz zum Wildtyp-Protein in *S. cerevisiae* effizient ubiquityliert wurden. Diese Reaktion wird durch die Aktivität der E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 vermittelt. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die faltungsdefekten DHFR-Modellsubstrate zur Bildung von Proteinaggregaten in Zellen tendieren.

Um die Funktionen cytosolischer, molekularer Chaperone im Abbau falsch gefalteter Proteine zu untersuchen, wurde die Stabilität der DHFR-Modellsubstrate in verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen mit eingeschränkter Chaperon-Funktion analysiert. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass für die effiziente Proteolyse der Modellsubstrate die Ssa-Familie der Hsp70-Chaperone und die zugehörigen Cofaktoren Ydj1 und Fes1, sowie die Chaperone der Hsp90-Klasse benötigt werden. Hierbei übernehmen die verschiedenen Chaperon-Klassen unterschiedliche Funktionen im Abbau der Modellsubstrate. Ssa1, Ydj1 und Fes1 bilden wahrscheinlich einen funktionellen Komplex, der möglicherweise an der Erkennung und Ubiquitylierung der Substrate beteiligt ist. Sie werden spezifisch für den Abbau faltungsdefekter Proteine, nicht aber für die Beseitigung anderer Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems benötigt. Zusätzlich konnte hier eine verstärkte Aggregation der Modellsubstrate beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte den Hsp90-Chaperonen eine Funktion beim Abbau ubiquitylierter Formen zugeschrieben werden. Möglicherweise werden diese Chaperone benötigt, um die Interaktion polyubiquitylierter Substrate mit dem Proteasom zu ermöglichen. Der Befund, dass auch andere ubiquitylierte Substrate in Abwesenheit funktioneller Hsp90-Chaperone stabilisiert sind, während Ubiquitin-unabhängige Proteasomsubstrate weiterhin abgebaut werden, deutet ebenfalls auf eine solche Funktion hin. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in diesem Fall eine deutliche Akkumulation polyubiquitylierter Substrate in der Zelle vorliegt. Hingegen konnte hier keine verstärkte Aggregation der Modellsubstrate beobachtet werden.

Abstract

Protein quality control (PQC) is an important cellular process acting in protein folding, in preventing protein aggregation and in degradation of misfolded proteins. The central players in PQC in eukaryotic cells are molecular chaperones and the ubiquitin-proteasome system (UPS). In this study, misfolded DHFR model substrates were generated which are subject to rapid 26S proteasome-dependent degradation *in vivo*. By using these model substrates different components were identified that function in cellular PQC in the cytosol of the yeast *S. cerevisiae*. It could be shown that misfolded variants of DHFR model substrates but not the native protein are efficiently ubiquitylated *in vivo*. This reaction is mediated by the E2 enzymes Ubc4 and Ubc5. In addition, we observed that misfolded DHFR substrates tend to form protein aggregates in the cell.

In order to investigate whether cytosolic molecular chaperones play a role in the degradation of misfolded proteins we analysed the stability of DHFR model substrates in different chaperone mutants. It could be shown that rapid degradation of abnormal DHFR substrates requires the activity of distinct chaperone classes including the Ssa family of Hsp70 chaperones and its cofactors Ydj1 and Fes1, as well as the Hsp90 class of chaperones. Surprisingly, the Hsp70 and Hsp90 chaperones assume quite different functions in the degradation of abnormal proteins. Ssa1, Ydj1 and Fes1 are most likely involved in the recognition and ubiquitylation of substrates by forming a functional complex. The present findings indicate that these chaperones are involved specifically in the degradation of misfolded proteins and not in the elimination of other substrates of the ubiquitin-proteasome system. In addition, the absence of those chaperones enhanced aggregation of abnormal DHFR model substrates. The Hsp90 class of chaperones, in contrast, is required for the elimination of already ubiquitylated proteins by the proteasome. This is supported by the finding that abnormal and other ubiquitylated substrates are stabilized in the absence of Hsp90 chaperones, whereas the degradation of ubiquitin-independent substrates is not impaired. These chaperones may act as adapter proteins and mediate the interaction of polyubiquitylated substrates with proteasomes. In addition, it could be shown that the total amount of polyubiquitylated proteins is significantly increased in *hsp90* mutant cells. In contrast to *hsp70*, no increased aggregation of abnormal DHFR model substrates could be observed in the absence of Hsp90 chaperones.

Zusammenfassung

Abstract

A	Einleitung	1
A.1	Faltung und Fehlfaltung von Proteinen	1
A.1.1	Proteinfaltung <i>in vivo</i>	3
A.1.2	Entstehung von falsch gefalteten Proteinen	3
A.1.3	Proteinaggregate, „ <i>Inclusion Bodies</i> “ und Aggresomen	4
A.2	Protein-Qualitätskontrollsysteme	6
A.2.1	Die molekularen Chaperone und Cochaperone	8
A.2.1.1	Die Klasse der „kleinen“ Hitzeschockproteine (sHsp)	9
A.2.1.2	Die Hsp40-Familie	9
A.2.1.3	Die Hsp60-Familie	10
A.2.1.4	Die Hsp70 Familie	10
A.2.1.5	Die Hsp90-Familie	11
A.2.1.6	Die Hsp100-Familie	12
A.2.2	Die Hitzeschock-Antwort	13
A.2.3	Das UPR- und das ERAD-System	14
A.3	Proteinabbau in Eukaryoten	15
A.3.1	Das Ubiquitin-System	16
A.3.1.1	Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme)	17
A.3.2	Das Proteasom	19
A.4	Zielsetzung	20
B	Material und Methoden	21
B.1	Material	21
B.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	21
B.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	22
B.1.3	<i>Escherichia coli</i> -Klonierungsvektoren	22
B.1.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Vektoren	23
B.1.5	Oligonukleotide	23
B.1.6	Enzyme und Antikörper	24
B.1.7	Chemikalien	24

B.2	Methoden	25
B.2.1	Medien zur Anzucht von Bakterien und Hefen	25
B.2.2	Molekularbiologische und genetische Methoden	26
B.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
B.2.2.2	Restriktion von DNA mit Endonukleasen	26
B.2.2.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese	26
B.2.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	27
B.2.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten	27
B.2.2.6	DNA-Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion nach (Mullis et al., 1986)	27
B.2.2.7	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von <i>Escherichia coli</i>	28
B.2.2.8	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	29
B.2.2.9	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
B.2.2.10	Plasmid-Präparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nach (Robzyk et al., 1992)	30
B.2.2.11	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> nach (Rose et al., 1990)	31
B.2.2.12	Sequenzierung von DNA nach (Sanger et al., 1977)	31
B.2.3	Biochemische Methoden	32
B.2.3.1	Herstellung von zellfreien Proteinrohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	32
B.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli 1970)	32
B.2.3.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot	34
B.2.3.4	Unspezifisches Anfärben der Proteine durch Ponceau S	34
B.2.3.5	Untersuchung der Proteininstabilität durch „Cycloheximid-Chase“	35
B.2.3.6	Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Ultrazentrifugation	35
B.2.3.7	Immunpräzipitation der DHFR-FLAG-Modellsubstrate	35

B.2.4	Methoden der Hefegenetik	36
B.2.4.1	Kreuzung von haploiden Hefestämmen	36
B.2.4.2	Paarungstypanalyse von Hefezellen	36
B.2.4.3	Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse	36
B.2.4.4	Manipulation von Genen in <i>S. cerevisiae</i> nach (Knop et al., 1999). Herstellung der Stämme YMF31, YMF33, YMF35 und YMF36	37
B.2.4.5	Analyse des Wachstums von <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen durch serielle Verdünnung	37
B.2.4.6	Herstellung des Hefestammes YMF9 mit integrierter, mutanter Version des <i>DHFR-URA3</i> -Konstrukts	37
B.2.4.7	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von DHFR-GFP-exprimierenden Zellen	38
B.2.4.8	Anlage von Dauerkulturen von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	39
C	Ergebnisse	40
C.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle	40
C.1.1	Modellsubstrate zur Untersuchung zellulärer Protein-Qualitätskontrollsysteme	40
C.1.2	Mutierte DHFR-Proteine werden durch die E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 ubiquityliert und durch das Proteasom abgebaut	44
C.1.3	Die Suche nach E3-Enzymen.	47
C.2	Die molekularen Chaperone in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle	50
C.2.1	Die Hsp70-Chaperone sind am Abbau mutierter DHFR-Proteine beteiligt.	50
C.2.2	Faltungsdefekte DHFR-Modellsubstrate werden in <i>ydj1-151</i> -Zellen stabilisiert	57
C.2.3	Die Aktivität des „NEF“ Fes1 ist für die Proteolyse der DHFR-Modellsubstrate erforderlich	60
C.2.4	Die Rolle der Hsp90-Chaperone im Abbau mutierter DHFR-Proteine	64
C.2.5	Die Beteiligung anderer Chaperone in der Proteolyse mutanter DHFR-Proteine	68

C.2.6	Einfluss der Hsp70- und Hsp90-Chaperone auf die Ubiquitinhomöostase und auf die Ubiquitylierung faltungsdefekter DHFR-Substrate	70
C.3	Die Rolle von Proteinaggregaten in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle	73
C.3.1	Bildung von Proteinaggregaten in UPS- und Chaperon-Mutanten	74
D	Diskussion	77
D.1	Modellsubstrate zur Untersuchung zellulärer Protein-Qualitätskontrollsysteme in <i>S. cerevisiae</i>	77
D.2	Die E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 des Ubiquitin-Proteasom-Systems vermitteln die Ubiquitylierung der Modellsubstrate	78
D.2.1	Die Suche nach E3-Enzymen	79
D.3	Die Rolle der molekularen Chaperone in der Protein-Qualitätskontrolle	82
D.3.1	Die Ssa-Familie der Hsp70-Chaperone und die zugehörigen Cochaperone Ydj1 und Fes1 sind am Abbau der mutierten Modellsubstrate beteiligt	83
D.3.1.1	Der Abbau des „N-end rule“- und des „UFD“-Testsubstrats wird in Abwesenheit der Hsp70-Chaperone Ssa1 und Ssa2, des Hsp40-Cochaperons Ydj1 und des Fes1-Cofaktors nicht beeinträchtigt	86
D.3.1.2	Ssa1, Ydj1 und Fes1 sind mit der faltungsdefekten DHFR-Domäne assoziiert	86
D.3.2	Die Rolle der Hsp90-Chaperone in der Beseitigung faltungsdefekter Proteine	87
D.4	Ein Modell für die unterschiedlichen Funktionen der Hsp70- und Hsp90-Klasse molekularer Chaperone in der cytosolischen Protein-Qualitätskontrolle	89
E	Literaturverzeichnis	92
F	Abkürzungsverzeichnis	104
	Danksagung	
	Eidesstattliche Erklärung	
	Lebenslauf	

A Einleitung

Die Bildung und Aufrechterhaltung aktiver Proteine in einer Zelle hängt nicht nur von der Genauigkeit der Transkription und der korrekten Translation ab. Die synthetisierten Polypeptide müssen eine stabile dreidimensionale Struktur einnehmen und diese während der gesamten aktiven Lebensdauer erhalten. Die Akkumulation von Proteinen mit nicht-nativer Konformation stellt eine ständige Bedrohung für die Zellfunktion und -lebensfähigkeit dar. In der Evolution entwickelten sich verschiedene Mechanismen, um die Zelle vor der Akkumulation falsch gefalteter Proteine zu schützen. Diese Protein-Qualitätskontrollsysteme umfassen Mechanismen, die die Aggregation faltungsdefekter Proteine verhindern, eine Rückfaltung induzieren, oder wenn dies nicht möglich ist, diese Proteine zu Aminosäuren hydrolysieren. Wichtige Bestandteile dieser Qualitätskontrollsysteme sind die molekularen Chaperone, die die Struktur und Funktion der Proteine überwachen und Proteasen, die fehlgefaltete Proteine abbauen.

Die molekularen Chaperone fördern die Proteinfaltung in die korrekte Struktur und verhindern die Aggregation der Proteine. Die ATP-abhängigen Proteasen, wie das 26S-Proteasom in Eukaryoten, sind für die Proteolyse von irreversibel falsch gefalteten Proteinen verantwortlich. Wie wichtig die Erkennung und die effiziente, selektive Proteolyse faltungsdefekter Proteine ist, zeigt sich bei verschiedenen Krankheiten, bei denen die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen zu intrazellulären Ablagerungen führt, welche möglicherweise eine wichtige Rolle in der Krankheitspathogenese spielen.

Welche Rolle die molekularen Chaperone und deren Cofaktoren bei der Proteolyse faltungsdefekter Proteine spielen und wie die beiden protektiven Systeme zusammenarbeiten, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

A.1 Faltung und Fehlfaltung von Proteinen

Proteinfaltung ist der Prozess, bei dem sich aus der linearen Abfolge von Aminosäuren eine definierte dreidimensionale Struktur ergibt, die die Grundvoraussetzung für die Aktivität jedes Proteins ist (Dill *et al.*, 1995). Der native Zustand eines Proteins entspricht meistens der Struktur, die unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch am stabilsten ist (Dobson *et al.*, 1998). Eine einzige spezifische Struktur muss aus einem breiten Repertoire von sterisch verfügbaren Konformationen selektioniert werden. Da es einem Protein alleine zeitlich nicht

möglich ist alle Konformationen zu überprüfen, zu denen die Aminosäurekette fähig wäre, wurden gerichtete Faltungswege postuliert, die entlang eines Energiegradienten verlaufen (Levinthal 1968).

Der vollständig entfaltete Zustand eines Proteins ist nicht definierbar, sondern entspricht einem Ensemble verschiedener Strukturen, die einen höheren Energiegehalt als die native Struktur aufweisen (Shortle 1996). Auf dem Weg der Strukturfindung bewegt sich das Polypeptid auf parallelen Wegen zu energieärmeren Zuständen, um schließlich in einem Energieminimum seine Struktur zu finden (Wolynes *et al.*, 1996; Veitshans *et al.*, 1997). In den aktuellen Modellen wird deshalb der Mechanismus der Proteinfaltung mit „Faltungstrichtern“ verglichen, bei dem der Rand den verschiedenen höherenergetischen entfalteten Zuständen entspricht, die Innenwand der Energie-Potential-Fläche ΔG während des Faltungsweges und der Auslauf dem Energieminimum eines gefalteten Zustandes (Dill *et al.*, 1997; Gruebele 2002).

Die Untersuchung der Proteinfaltung *in vitro* basiert auf der Annahme, dass die dreidimensionale Struktur eines Proteins durch die Aminosäuresequenz vollständig determiniert ist. Dieses Dogma der Proteinfaltung wurde seit Anfinsens bahnbrechenden Experimenten mit RNase A (Anfinsen *et al.*, 1961) durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt (Wetlaufer 1973; Creighton 1975) bei denen es gelang, aus einem vollständig entfalteten Polypeptid wieder ein funktionelles Protein zu erhalten. Dennoch wurde festgestellt, dass die vollständige Rückfaltung der Proteine in den meisten Fällen nicht möglich ist, sondern Konkurrenzreaktionen die Ausbeute erheblich reduzieren. Besonders in der ersten Faltungsphase, die dadurch gekennzeichnet ist, dass hydrophobe Oberflächen noch exponiert werden, kommt es häufig zur Missfaltung oder Aggregation der Polypeptidkette (Jaenicke *et al.*, 1986).

Die Aggregation stellt in den meisten Fällen einen irreversiblen Vorgang dar, so dass die beteiligten Proteine vermutlich nicht mehr zurückgewonnen werden können. Die Proteinfaltung in einer lebenden Zelle unterscheidet sich wesentlich von der Situation *in vitro*, weil die Faltung in einer sehr dichten makromolekularen Umgebung stattfinden muss, in der Proteinfalschfaltung und Proteinaggregation favorisiert sind.

A.1.1 Proteinfaltung *in vivo*

Die Initialisierung der Proteinfaltung *in vivo* kann entweder posttranslational, nachdem die Polypeptidkette die Ribosomen verlassen hat, oder kotranslational, noch vor dem Abschluss der Proteinsynthese erfolgen (Hardesty *et al.*, 2001). Einige Proteine erreichen ihre native Konformation erst in spezifischen Kompartimenten, z.B. in den Mitochondrien oder im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Unvollständige oder nur partiell gefaltete Proteine weisen unvermeidlich hydrophobe Regionen an der Oberfläche auf, die im nativen Zustand im Inneren des Proteins eingeschlossen sind. Diese Sequenzen neigen einerseits zu Interaktionen mit anderen zellulären Molekülen und andererseits zur Bildung von Proteinaggregaten, wodurch die Zellfunktion erheblich gestört werden kann. Bei einer zellulären Proteinkonzentration von bis zu ~300mg/ml (Elowitz *et al.*, 1999) und einer Neusynthese von 60.000 Proteinen pro Minute (Lorimer 1996) sind Aggregationsprozesse unvermeidbar, weshalb in der Zelle mehrere Mechanismen Anwendung finden, um die konkurrierenden Reaktionen zu unterdrücken.

In diesem Kontext spielen die molekularen Chaperone eine besondere Rolle, weil sie spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen interagieren und somit direkt in Konkurrenz zu Aggregationsreaktionen treten können. Einige Mitglieder dieser Klasse von Proteinen interagieren mit naszierenden Polypeptidketten an den Ribosomen, während andere die späteren Schritte der Faltung überwachen können (Bukau *et al.*, 1998; Hartl *et al.*, 2002). Die Interaktion der molekularen Chaperone mit neusynthetisierten Polypeptidketten läuft oft tandemartig ab, damit die verschiedenen Stationen der Faltung in die tertiäre Struktur eines Proteins effizient vollendet werden können. Die molekularen Chaperone erhöhen nicht die Rate der individuellen Schritte in der Proteinfaltung, sondern erhöhen die Effizienz des Gesamtprozesses durch Verhinderung von konkurrierenden Reaktionen, wie z.B. die Proteinaggregation (Hartl 1996; Jaenicke 1996).

A.1.2 Entstehung von falsch gefalteten Proteinen

Metabolisch stabile Proteine, deren Halbwertszeit die Generationszeit überschreiten kann, koexistieren in der gleichen Zelle mit kurzlebigen Proteinen, die rasch abgebaut werden. Die Umsatzrate der Proteine hängt einerseits von dem physiologischen Zustand der Zelle ab, und andererseits ist die individuelle Stabilität der Proteine von verschiedenen regulatorischen

Systemen abhängig. Metabolische Instabilität ist nicht nur für regulatorische Proteine charakteristisch sondern auch für falsch gefaltete oder anders „abnormale“ Proteine.

Falsch gefaltete Proteine kommen in Zellen als Konsequenz vieler Ursachen vor. Unvollständig synthetisierte oder gefaltete Proteine sind konstante Nebenprodukte der Translation. In Säugerzellen machen sogenannte „defective ribosomal products“ (DriPs) ca. 30% aller neusynthetisierten Proteine unter normalen Wachstumsbedingungen aus (Schubert *et al.*, 2000; Yewdell 2001). Die Entstehungsrate defekter Proteine kann durch zahlreiche Stressfaktoren erhöht werden. Dazu zählen thermaler Stress, hohe Ethanolkonzentration, Aminosäureanaloge oder Behandlung mit Antibiotika, die ribosomale Funktionen inhibieren. Zusätzlich können falsch gefaltete Proteine aus normalen Proteinen als Resultat oxidativer Zerstörung entstehen. Es wird angenommen, dass die Akkumulation dieser Proteine zur Zellalterung beiträgt (Johnson *et al.*, 1999). Defekte Proteine können auch das Resultat von genetischen Änderungen sein. „Missense“ oder „nonsense“ Mutationen führen zur veränderter mRNA-Sequenz, deren Translation zu abnormalen Proteinen führt (Platt *et al.*, 1970; Parsell *et al.*, 1989; Betting *et al.*, 1996). Auch eine heterologe Expression oder eine Überexpression von Proteinen kann in bestimmten Zelltypen zu deren Abbau führen (Gottesman 1989). Ein weiteres Beispiel sind Proteinuntereinheiten, denen die dazugehörigen Partneruntereinheiten fehlen. Es wird vermutet, dass amphipathische Helices mit hydrophoben Oberflächen in dissoziierten Proteinen als Abbausignale erkannt werden (Sadis *et al.*, 1995; Wickner *et al.*, 1999). Falschgefaltete oder anders abnormale Proteine zeigen wahrscheinlich ähnliche Merkmale oder hydrophobe Bereiche, die in korrekt gefalteten Proteinen maskiert sind. Diese Beispiele zeigen, dass die Erkennung von Abbausignalen ein wichtiger Teil der zellulären Protein-Qualitätskontrolle ist und das Überleben der Zellen unter Stressbedingungen sichert.

A.1.3 Proteinaggregate, „*Inclusion Bodies*“ und Aggresomen

Eine charakteristische Eigenschaft von entfaltenen Proteinen ist die Tendenz zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten. Dies sind oligomere Komplexe, bestehend aus Proteinen mit nicht-nativer Konformation, die durch nicht-native Interaktionen von strukturell oder kinetisch gefangenen Intermediaten der Proteinfaltung entstehen (London *et al.*, 1974; Haase-Pettingell *et al.*, 1988; Wetzel 1994). Die Bildung von Proteinaggregaten in einer Zelle tritt ein, wenn die Kapazität des proteolytischen Systems sowie die der molekularen Chaperone,

die die Aggregation verhindern und die Rückfaltung in die native Form induzieren, die Entstehungsrate der falsch gefalteten Proteine nicht bewältigen kann (Prouty *et al.*, 1972; Klemes *et al.*, 1981; Sherman *et al.*, 2001).

Eine intrazelluläre Ansammlung von solchen Proteinaggregaten in größere Komplexe wird als Einschlußkörper („*Inclusion Bodies*“) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Entstehung von Einschlußkörpern in Säugerzellen die zelluläre Transportmaschinerie beteiligt ist. Allgemein wurden die Einschlußkörper an den Mikrotubuli-Organisierenden-Zentren gefunden (MTOK oder Centrosom), wofür ein aktiver, Mikrotubuli-abhängiger Transport von falsch gefalteten Proteinen benötigt wird (Garcia-Mata *et al.*, 1999). Um zwischen den Mikrotubuli-abhängigen Einschlußkörpern und solchen, die in Zellen und Organellen ohne Zytoskelett vorkommen, zu unterscheiden, werden die Mikrotubuli-abhängigen Einschlußkörper als Aggresomen bezeichnet (Johnston *et al.*, 1998). Ein charakteristisches Kennzeichen der Aggresomen ist deren Assoziation mit Hitzeschock-Proteinen, mit ubiquitylierten Proteinen, sowie mit Ubiquitin-transferierenden Enzymen und dem 26S-Proteasom. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Aggresomen entweder Orte der Proteolyse darstellen oder dass sie resistent gegen den Abbau sind und die Proteasomen dort in nicht-funktionellem Zustand gefangen sind. Es konnte gezeigt werden, dass Proteinaggregate, gebildet durch die Überexpression von defekten Proteinen, wieder abgebaut werden können, wenn die Produktion der defekten Proteine angehalten wird (Prouty *et al.*, 1975; Klemes *et al.*, 1981; Yamamoto *et al.*, 2000).

Wenn die Proteolysekapazität der Zelle durch defekte Proteine überschritten wird, werden diese in die Aggresomen am Centrosom segregiert und von dort später wieder abgelöst, gefaltet oder abgebaut (Wojcik *et al.*, 1996). Dieser Prozess könnte den Vorteil haben, dass die Verteilung der falsch gefalteten Proteine innerhalb der Zelle verhindert und dadurch die Assoziation mit anderen Zellkomponenten reduziert wird, was zu einer Unterbrechung unterschiedlicher zellulärer Funktionen führen könnte.

Trotz der beschriebenen zellulären Kontrollmechanismen spielen unlösliche Einschlußkörper eine entscheidende Rolle bei vielen neurologischen Krankheiten. Dazu zählen u.a. die Amyotrophe Laterale Sklerose, Alzheimer, Parkinson und verschiedene andere erbliche Krankheiten. Es wird angenommen, dass in allen diesen neurodegenerativen Krankheiten die Akkumulation von verschiedenen, defekten Polypeptiden für den Tod von spezifischen neuronalen Zellpopulationen verantwortlich ist (Alves-Rodrigues *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 1999). Es wird offensichtlich, dass die Korrelation zwischen den falsch gefalteten

Proteinen und der Bildung von intrazellulären Einschlusskörpern eine enge Verbindung zwischen Proteolyse und Neurodegeneration darstellt. Ob jedoch diese Strukturen ursächlich für die Pathogenität sind oder deren Begleiterscheinung, muss weiterhin untersucht werden.

A.2 Protein-Qualitätskontrollsysteme

Die Tendenz der falsch gefalteten Proteine zur Bildung von Proteinaggregaten und zur Interaktion mit anderen Proteinen kann die Funktion einer Zelle nicht nur maßgeblich stören, sondern für die Zelle potentiell toxisch sein. In der Evolution entwickelten die Zellen effiziente Protein-Qualitätskontrollsysteme, die die Akkumulation faltungsdefekter Proteine verhindern. Diese wurden im ER, in Mitochondrien, im Sekretorischen Weg, im Nukleus und im Cytosol identifiziert (Langer *et al.*, 1996; Hampton 2002; McDonough *et al.*, 2003; Trombetta *et al.*, 2003; Gardner *et al.*, 2005). Im Cytosol eukaryotischer Zellen wird die Protein-Qualitätskontrolle durch die molekularen Chaperone und das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) sichergestellt.

Es konnte ein Modell aufgestellt werden, das die Funktion der beiden Systeme in der cytosolischen Qualitätskontrolle beschreibt (Wickner *et al.*, 1999). Das Modell schlägt eine kinetische Aufteilung der entfalteten Polypeptide zwischen den molekularen Chaperonen und dem UPS vor, die in direkter Konkurrenz um die Substratbindung stehen. Durch eine zyklische Assoziation der entfalteten Proteine mit molekularen Chaperonen kann die Rückfaltung der Polypeptide in die native Struktur ermöglicht werden. Misslingt die Rückfaltung wird das entfaltete Protein freigelassen und durch das UPS zu Peptiden abgebaut. Dieses Modell schließt eine aktive Teilnahme der Chaperone im Abbau von falsch gefalteten Proteinen aus (Abb. 1A).

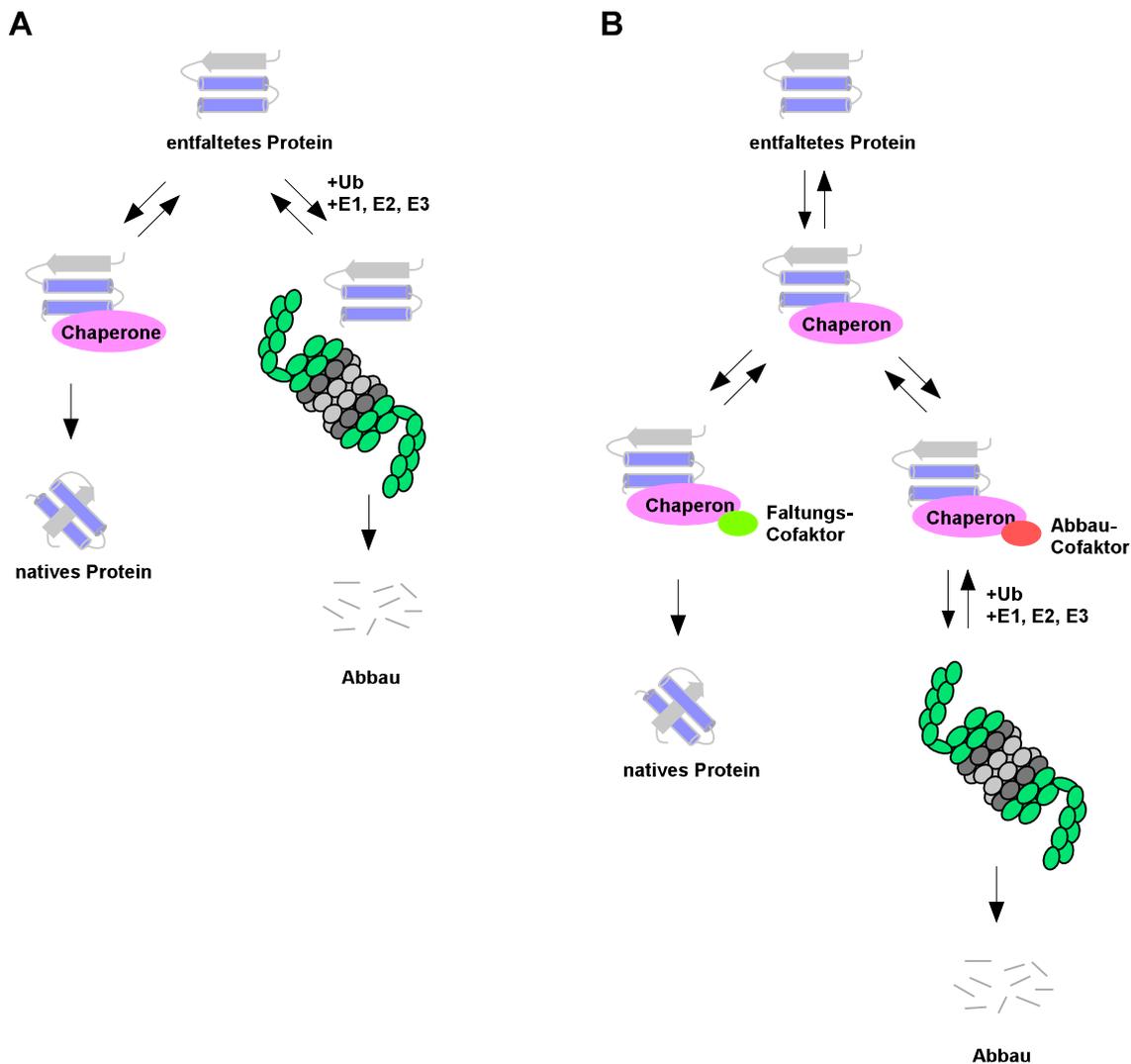


Abb. 1: Modelle der Protein-Qualitätskontrollsysteme in Zellen

- A) Die molekularen Chaperone und das Ubiquitin-Proteasom-System konkurrieren um die Substratsbindungsstelle. Durch die Assoziation des Substratproteins mit den molekularen Chaperonen kann die native Konformation erreicht werden, während die Interaktion des Substratproteins mit den Komponenten des UPS zu dessen Abbau führt.
- B) Die molekularen Chaperone sind aktiv an der Faltung und dem Abbau der Substratproteine beteiligt. Die Entscheidung für die Faltung oder den Abbau des Proteins wird durch einen Chaperon-assoziierten Cofaktor determiniert. Die Assoziation mit einem „Faltungs-Cofaktor“ führt zur Induktion der Faltung, während die Interaktion mit dem „Abbau-Cofaktor“ zur Rekrutierung von Komponenten des UPS und zum anschließenden Abbau des entfalteteten Proteins führt.

Durch die Identifizierung und Charakterisierung des Chaperon-Cofaktors CHIP wird jedoch dieses Modell in Frage gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass CHIP mit den molekularen Chaperonen der Hsp70 und Hsp90 Familie interagiert und die vermittelte Proteinfaltung unterdrücken kann (Ballinger *et al.*, 1999; Connell *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte die Assoziation des Cofaktors mit bestimmten E2-Enzymen des UPS und dessen Funktion als E3-Ligase nachgewiesen werden (Demand *et al.*, 2001; Jiang *et*

al., 2001; Murata *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen favorisieren ein neueres Modell der Protein-Qualitätskontrolle, in dem die molekularen Chaperone aktiv am Abbau der falsch gefalteten Proteine beteiligt sind (Hohfeld *et al.*, 2001; Cyr *et al.*, 2002). Die Aufgabe der Chaperone liegt hier sowohl in der spezifischen Erkennung von entfalteten Polypeptiden für die Faltung der Proteine in die native Konformation, als auch für den Abbau durch das UPS. Die Entscheidung für die Faltung oder den Abbau des Proteins wird durch Chaperon-assoziierte Cofaktoren determiniert (Abb. 1B). Die Assoziation mit einem „Faltungs-Cofaktor“ führt zur Induktion der Faltung, während die Interaktion mit dem „Abbau-Cofaktor“ zur Rekrutierung von Komponenten des UPS und anschließend zum Abbau des entfalteten Proteins führt (Esser *et al.*, 2004).

A.2.1 Die molekularen Chaperone und Cochaperone

Die Bezeichnung molekulare Chaperone beschreibt Proteine, die transient mit einem instabilen Konformer eines anderen Proteins interagieren, dieses stabilisieren und dessen Faltung sowie die Oligomerisierung, die Interaktion mit anderen zellulären Komponenten, den intrazellulären Transport oder den proteolytischen Abbau entweder alleine oder unter Zuhilfenahme von Cofaktoren vermitteln (Hendrick *et al.*, 1993).“

Molekulare Chaperone sind insbesondere im Zusammenhang mit ihrer Funktion als Stressproteine entdeckt worden, da sie zu einer Klasse von Proteinen gehören, deren Expression unter Stressbedingungen ansteigt (Lindquist 1986; Morimoto 1998). Dies führte zu dem Begriff Hitzeschockproteine (HSPs, engl.: *heat shock proteins*). In der letzten Dekade haben neue Erkenntnisse den Fokus hin zu einer Untersuchung der Rolle der HSPs als molekulare Chaperone gerichtet, da sie offensichtlich einen gewichtigen Anteil am Schutz der zellulären Proteine vor Stresseinwirkungen haben.

Da Chaperone in aller Regel nicht Teil des nativen Proteins sind, dessen Faltung sie unterstützen, haben viele Chaperone entsprechende Mechanismen entwickelt, die es ermöglichen, sich von dem Produkt wieder zu lösen. Es handelt sich um sogenannte ATPasen, deren Aktivität durch verschiedene Cofaktoren reguliert werden kann. Die Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden spielt hier eine entscheidende Rolle bei der Ausübung ihrer Funktion, da auf diese Weise strukturelle Veränderungen ausgelöst werden, die ein Freilassen des Substrates bewirken.

Homologieuntersuchungen zeigen, dass sich die meisten molekularen Chaperone in eine von fünf Klassen gliedern lassen, die nahezu ubiquitär zu finden sind. Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie bei ihren Substraten hydrophobe Oberflächen erkennen und dass sie unter zellulären Stressbedingungen, zum Beispiel Hitzestress, von der Zelle verstärkt synthetisiert werden (Ellis 1987).

A.2.1.1 Die Klasse der „kleinen“ Hitzeschockproteine (sHsp)

Zu der Klasse der kleinen Hitzeschockproteinen gehören Chaperone deren Molekulargewicht weniger als 40 kDa beträgt. Die sHsps sind vor allem dafür erforderlich, Aggregationsprozesse zu vermeiden oder zu kontrollieren (Horwitz 1992; Jakob *et al.*, 1994). Dazu binden diese Proteine spezifisch an entfaltete Proteine und bilden lösliche hocholigomere Komplexe mit ihren Substratproteinen (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999). Eine Rückfaltung der Substrate in die aktive Form konnte für das *E. coli*-System demonstriert werden. Dazu sind jedoch weitere Chaperone (vor allem Hsp70 und Hsp40) erforderlich (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000).

A.2.1.2 Die Hsp40-Familie

Der Begriff Chaperon-Cofaktoren oder Cochaperone bezeichnet regulatorische Proteine, die den physiologisch relevanten Zyklus von ATP-Bindung und -Hydrolyse durch die Chaperone induzieren können. Die Cochaperone der Hsp40-Familie stimulieren die ATP-Hydrolyse der Hsp70-Chaperone und spielen dadurch eine entscheidende Rolle in der Substratbindung. Der Übergang von einem ATP- zum ADP-gebundenen Zustand führt zu einer erhöhten Substrataffinität der Hsp70-Chaperone.

Die Gene *YDJ1* und *SIS1* kodieren für zwei Hsp40-Chaperone in *S. cerevisiae*. *Sis1* ist an der Initiation der Translation beteiligt und essentiell für das Überleben der Zellen (Zhong *et al.*, 1993). Für *Ydj1* konnte gezeigt werden, dass es mit bestimmten Mitgliedern der Hsp70-Familie an der Translokation von Proteinen durch Membranen sowie mit dem Hsp90-Chaperon an der Signaltransduktion beteiligt ist (Caplan *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1995). Desweiteren konnte beobachtet werden, dass *Ydj1* für den effizienten ubiquitinvermittelten Abbau von bestimmten nicht-nativen Proteinen benötigt wird (Lee *et al.*, 1996).

Für DnaJ den Hsp40-Vertreter in Bakterien sowie für Hdj2 in Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass sie spezifisch kurze hydrophobe Sequenzen in nicht-nativen Proteinen erkennen und diese dem Hsp70-System zuführen können. Dadurch besteht die Funktion der Hsp40-Chaperone nicht nur in der Stimulation der ATPase-Aktivität sondern gleichzeitig in der Selektion von Substratproteinen für die Hsp70-Chaperone (Rudiger *et al.*, 2001).

A.2.1.3 Die Hsp60-Familie

Dem aktiven Faltungshelfer am nächsten kommt die Klasse der Hsp60-Proteine, die auch als Chaperonine bezeichnet werden und der das *E. coli*-Protein GroEL und das humane CCT (engl. *Chaperonin Containing TCP-1*) angehören. GroEL besteht aus zwei übereinander liegenden Ringen aus je sieben Untereinheiten (Hartl 1996; Bukau *et al.*, 1998). Jeder der beiden Ringe bildet einen Hohlraum, in dem missgefaltete Polypeptide an den Innenseiten gebunden werden. Durch Anlagerung des GroES-Cochaperons an GroEL, das als Deckel agiert, wird das Substrat in der Faltungskammer eingeschlossen und unter ATP-Hydrolyse die Faltungsfindung unterstützt.

Das CCT-Protein ist aus 8 Untereinheiten zusammengesetzt, die zu einem Doppelring aus insgesamt 16 Untereinheiten assemblieren (Kubota *et al.*, 1995; Stoldt *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu GroEL benötigen diese Chaperone keinen GroES-ähnlichen Cofaktor. Stattdessen weist deren Struktur einen eingebauten "Deckel" in Form einer helikalen Ausstülpung auf (Klumpp *et al.*, 1997). Nach erfolgter Substratbindung schließt dieser, durch einen ATP-abhängigen Mechanismus, den Ring, wodurch das nicht-native Protein im Hohlraum zu seiner nativen Struktur finden kann.

A.2.1.4 Die Hsp70-Familie

Die umfangreichste Klasse der Chaperone wird von den Hsp70-Proteinen gebildet. Proteine dieser Klasse wurden, mit Ausnahme einiger Archaeenarten, in allen Organismen nachgewiesen. Allein in *S. cerevisiae* wurden 14 verschiedene Gene identifiziert (Pahl *et al.*, 1997). Vertreter dieser Klasse werden auch in den größeren zellulären Kompartimenten gefunden. Hsp70-Proteine bestehen aus einer nukleotidbindenden Domäne und einer proteinbindenden Domäne, die sich in ihren Aktivitäten gegenseitig beeinflussen (Bukau *et al.*, 1998). Die Kristallstruktur der substratbindenden Domäne zeigt, dass die Geometrie

dieser Bindestelle vor allem für hydrophobe lineare Peptidsequenzen geschaffen ist (Zhu *et al.*, 1996). Für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wurde nachgewiesen, dass die Anwesenheit von Hsp70-Proteinen erforderlich ist. Dazu gehören die Translokation von Proteinen durch Membranen (Langer *et al.*, 1991; Ungermann *et al.*, 1994), die Rückfaltung von aggregierten Proteinen (Goloubinoff *et al.*, 1999) und Umordnung des Cytoskeletts (Liang *et al.*, 1997). Die Aktivität von Hsp70 wird dabei von verschiedenen Cochaperonen reguliert, die den ATP-Umsatz kontrollieren und für die Rückfaltung von Proteinen *in vitro* essentiell sind (Liberek *et al.*, 1991; Schroder *et al.*, 1993; Wall *et al.*, 1994).

Abhängig von der Art des gebundenen Nukleotids, liegen Hsp70-Proteine in zwei verschiedenen Konformationen vor. Im ADP-gebundenen Zustand werden stabile, langlebige Komplexe mit Peptiden gebildet, während im ATP-gebundenen Zustand nur eine temporäre, instabile Bindung auftritt (Zhu *et al.*, 1996; Bukau *et al.*, 1998). Die Proteine, die den Austausch von ADP zu ATP katalysieren werden als Nukleotidaustausch-Faktoren (NEF, engl. *nucleotide exchange factor*) bezeichnet, zu denen das *E. coli*-Protein GrpE, sowie die Säugerproteine BAG1 und HspBP1 gehören (Raynes *et al.*, 1998; Gassler *et al.*, 2001; Hartl *et al.*, 2002). In *S. cerevisiae* konnte das Fes1-Protein als NEF identifiziert werden, das mit dem Hsp70-Chaperon Ssa1 interagiert und die Freisetzung von ADP katalysieren kann (Kabani *et al.*, 2002). Die ATP-Hydrolyse der Hsp70-Chaperone, und damit der Übergang zum ADP-gebundenen Zustand wird von Hsp40-Cochaperonen stimuliert (siehe auch A.2.1.2).

A.2.1.5 Die Hsp90-Familie

Im Gegensatz zu den prokaryotischen sind die eukaryotischen Hsp90-Vertreter grundsätzlich essentielle Proteine, die in hohem Maße (ca. 1% des löslichen Proteins im eukaryotischen Cytosol) vorhanden sind (Borkovich *et al.*, 1989). Hsp90-Proteine treten als Dimere auf und verfügen über eine ATPase-Aktivität, die für ihre Funktionalität essentiell ist (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998).

Die Hsp90-Familie wird in *S. cerevisiae* durch die Gene *HSC82* und *HSP82* kodiert, die in ihrer Expression unterschiedlich reguliert werden, ansonsten aber weitgehend identisch sind (97,4% Sequenzidentität). *HSC82* ist ein konstitutiv exprimierter Vertreter der Hsp90-Familie, während *HSP82* unter Kontrolle des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors (HSF) exprimiert wird.

Die Chaperone der Hsp90-Familie haben neben einer grundsätzlichen Fähigkeit, nicht-native Proteine zu stabilisieren, die Aufgabe erworben, die Reifung komplexer Proteine zu ermöglichen. Viele dieser Substrate wie Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren oder Steroidhormonrezeptoren, sind in der Signaltransduktion der Zelle involviert (Pratt 1997).

Die *in vivo* und *in vitro* Aktivität der cytosolischen eukaryotischen Hsp90-Systeme ist von bestimmten akzessorischen Proteinen wie Hop/Sti1 (Hernandez *et al.*, 2002), p23/Sba1 (Young *et al.*, 2000), p50/Cdc37 (Grammatikakis *et al.*, 1999), die Cyclophiline Cpr6 und Cpr7, sowie das Immunophilin Cns1 oder Aha1 (Panaretou *et al.*, 2002)) abhängig. Die Identifizierung dieser Proteine erfolgte meist durch Untersuchungen von Hsp90-Substrat-Komplexen, bei denen dann weitere Proteine als Bestandteil der Komplexe identifiziert wurden. Diese Proteine werden allgemein als Partnerproteine bezeichnet. Ihre Anwesenheit in den Komplexen gewährleistet in vielen Fällen die stabile Bindung des Substrates. Auch diese Proteine sind im Reich der Eukaryoten erstaunlich hoch konserviert, so dass jedem identifizierten humanen Partnerprotein ein homologes in *S. cerevisiae* zugeordnet werden kann. Im Allgemeinen wird deshalb davon ausgegangen, dass die Rolle dieser Partnerproteine auch funktionell konserviert ist.

A.2.1.6 Die Hsp100-Familie

Der Klasse der Hsp100-Proteine wird die Funktion zugeschrieben, bereits bestehende Aggregate wieder aufzulösen und die darin enthaltenen Proteine mit Hilfe anderer Chaperone (vor allem Hsp70 und Hsp40) wieder zurückzufalten (Glover *et al.*, 1998; Goloubinoff *et al.*, 1999). Die bisher wenig charakterisierte Klasse von Proteinen verfügt über zwei ATP-Bindestellen und eine ATP-Hydrolyseaktivität, so dass auch hier zu vermuten ist, dass die Hydrolyse von ATP verwendet wird, um ansonsten endergonische Faltungsreaktionen wieder umzukehren (Weber-Ban *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass das Protein Hsp104 auch mit dem Hefepriion Sup35 interagiert und an der Ausbildung des charakteristischen Prion-Phänotypes beteiligt ist (Chernoff *et al.*, 1995; Eaglestone *et al.*, 2000). Auch das Protein ClpB aus *E. coli* wird dieser Klasse zugerechnet.

A.2.2 Die Hitzeschock-Antwort

Nachteilige physikalische Konditionen, wie hohe Temperatur, führen zur Denaturierung von Proteinen aufgrund der Schwächung von polaren Bindungen und der daraus resultierenden Exposition von hydrophoben Gruppen. Dieser Mechanismus führt zu missgefalteten und aggregierten Proteinen, die für die Zelle potentiell toxisch sein können.

Die Fähigkeit der Zellen, auf erhöhte Temperatur mit gesteigerter Expression bestimmter Genen zu reagieren, bezeichnet man als Hitzeschock-Antwort. Die Aktivierung dieses fundamentalen zellulären Stressprogramms resultiert vor allem in verstärkter Biosynthese von Hitzeschock-Proteinen (HSPs). Die meisten HSPs gehören zur Gruppe der molekularen Chaperone, die unter Stressbedingungen die Zelle vor Schäden schützen und die Faltung von denaturierten Proteinen unterstützen.

In Eukaryoten wird die Hitzeschock-Antwort primär durch den evolutionär stark konservierten Hitzeschock-Transkriptionsfaktor (HSF) reguliert. Die Aktivierung der Hitzeschock-Gene erfolgt, indem HSF einen Abschnitt der DNA im Promotorbereich des Hitzeschock-Gens bindet. Diese Bindungsstelle wird als Hitzeschock-Element (HSE) bezeichnet. In ungestressten Zellen liegt der HSF sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern in einer monomeren Form vor, die nicht an DNA binden kann. Als Antwort auf Stressbedingungen bildet der HSF aktive Trimere, die im Zellkern akkumulieren. In dieser Form bindet der HSF an das HSE des Promotors und aktiviert somit die Transkription der Hitzeschock-Gene. Beendet wird die Hitzeschock-Antwort durch die Konversion der trimeren in die monomere Form des HSF (Morimoto *et al.*, 1992).

Neben der HSF-vermittelten Expression der Hitzeschock-Gene entwickelten Zellen einen parallelen Mechanismus, der nicht nur durch Temperatur sondern auch durch verschiedene chemische und physikalische Stresskonditionen aktiviert werden kann. Dieses Stressprogramm wird als allgemeine Stress-Antwort bezeichnet und wird durch die Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 reguliert. Die Aktivierung erfolgt, indem Msn2 und Msn4 an das sogenannte Stress-Antwort-Element (STRE; engl. *stress response element*) im Promotorbereich der Gene bindet und die Transkription induziert. Unter anderen, wird die Expression von *HSP82*, *HSP70* und *UBC4* durch HSF induziert, während die Expression von *HSP104* und *HSP26* durch Msn2/Msn4 reguliert wird.

A.2.3 Das UPR- und das ERAD-System

Auf die Anhäufung missgefalteter Proteine im ER reagiert die Zelle mit einer Signaltransduktionskaskade, der *Unfolded Protein Response* (UPR) (Gething *et al.*, 1992; Lee 1992), die von der Hefe bis zu den Säugetieren konserviert ist (McMillan *et al.*, 1994; Shamu *et al.*, 1994). Die Aktivierung von UPR wird von drei Sensorproteinen, IRE1, PERK und ATF6 reguliert (Rutkowski *et al.*, 2004). Die Aktivierung führt zu einer transienten Reduktion der Translationsrate, einer gesteigerten Synthese von ER-Chaperonen sowie zum ER-assoziierten Abbau falsch gefalteter Proteine.

Die Interaktion von Kar2 (BIP), dem Hsp70-Chaperon im ER, mit falsch gefalteten Proteinen, führt zur Aktivierung der Transmembran Kinase/RNase Ire1p (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993), die das Signal vom ER-Lumen in das Cytosol vermittelt. Die cytosolische Domäne der Kinase induziert das *Splicing* der *HAC1*-mRNA, das zur Synthese des Transkriptionsfaktors Hac1 führt (Cox *et al.*, 1996; Nikawa *et al.*, 1996; Shamu *et al.*, 1996; Kawahara *et al.*, 1998). Das *Splicing* der mRNA führt dazu, dass eine effektive Translation stattfinden kann (Chapman *et al.*, 1997; Kawahara *et al.*, 1997). Hac1 bindet an das *Unfolded Protein Response Element* (UPRE) und aktiviert die Transkription verschiedener Gene, deren Produkte u.a. den retrograden Transport und damit den Abbau faltungsdefekter Proteine im Cytosol induzieren. Durch die UPR-aktivierte Expression des Transkriptionsfaktors Son1/Rpn4 werden auch Untereinheiten des Proteasoms verstärkt exprimiert (Ng *et al.*, 2000).

Zusätzlich führt die Akkumulation falsch gefalteter Proteine im ER zur Aktivierung von zwei weiteren Sensorproteinen, PERK (*PKR-like ER kinase*) und ATF6 (*activating transcription factor 6*). PERK vermittelt die Phosphorylierung und dadurch die Inaktivierung des eukaryotischen Translationsinitiation-Faktors (eIF2 α), woraufhin die Proteinsynthese in Zellen reduziert wird (Harding *et al.*, 2000). Die Aktivierung des ATF6-Proteins führt zur deren Translokation zum Nukleus, woraufhin die Synthese von ER-Chaperonen induziert wird (Chen *et al.*, 2002). Diese Mechanismen entwickelten sich, um der Akkumulation falsch gefalteter Proteine im ER unter Stressbedingungen entgegenzuwirken.

Die ER-assoziiertes Abbau (ERAD) ist ein Mechanismus, der ungefaltete Proteine oder Untereinheiten nicht korrekt assemblierter Proteinkomplexe aus dem ER entfernt und dem Abbau durch das cytosolische 26S-Proteasom zuführt (Sommer *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1995; Sommer *et al.*, 1997).

In einem ersten Schritt müssen missgefaltete Proteine im ER erkannt werden, woran die ER-residenten Chaperone und die Glykosylierungsmaschinerie beteiligt sind (McCracken

et al., 1996; Plemper *et al.*, 1997; Jakob *et al.*, 1998). Der zweite Schritt besteht aus dem retrograden Transport der Proteine vom ER in das Cytosol durch die zentrale Translokationspore (Sec61-Komplex), die auch am Proteinimport beteiligt ist (Wiertz *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999). Der dritte ERAD-Schritt besteht in der Polyubiquitylierung der Proteine, die durch die E2-Enzyme Ubc1, Ubc6, und Ubc7 sowie durch die E3-Ligasen Hrd1/Der3 und Doa10/Ssm4 vermittelt wird, und dem Abbau des Substrates durch das 26S-Proteasom (Bordallo *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 2001). Bis jetzt sind vor allem Proteine wie eine mutierte Version der Carboxypeptidase Y (CPY*) in der Hefe oder der „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR- Δ F508) als ERAD-Substrate bekannt (Jensen *et al.*, 1995; Hiller *et al.*, 1996; Knop *et al.*, 1996), aber auch natürliche ER-Proteine mit regulierter Kurzlebigkeit wie der HMG-CoA-Reduktase (Hmg2) (Hampton *et al.*, 1994).

ERAD und UPR sind eng miteinander verknüpft. So verursacht eine fehlende ERAD die konstitutive Aktivierung der UPR. Mutationen, die beide Mechanismen beeinträchtigen, führen zu synthetischen Wachstumsdefekten (Friedlander *et al.*, 2000; Travers *et al.*, 2000).

A.3 Proteinabbau in Eukaryoten

In der eukaryotischen Zelle gibt es zwei Wege des Proteinabbaus. Zum einen können Proteine in den Lysosomen, den membranbegrenzten Organellen der Zelle, gespalten werden. Die Proteine gelangen durch Endocytose in die Lysosomen und werden dort durch hydrolysierende Enzyme verschiedenster Art, den sogenannten sauren Hydrolasen, zersetzt.

Sehr viel selektiver ist der Proteinabbau durch das 26S-Proteasom. Dieser erfordert ein funktionierendes Ubiquitin-System, das die an der Konjugation des Ubiquitins mit anderen Proteinen beteiligten Enzyme und Mechanismen umfasst. Eine Kaskade enzymatischer Reaktionen führt zur Konjugation des C-terminalen Glycinrestes eines Ubiquitinpolypeptids mit der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysinrestes des Substratproteins (Chau *et al.*, 1989). In weiteren Schritten werden Ubiquitinmoleküle auf eine ϵ -Aminogruppe eines bereits an das Substrat konjugierten Ubiquitins übertragen. Dies führt zur Aufbau einer mit dem Substratprotein verknüpfter Ubiquitinkette, die zu einer effizienten Erkennung durch das Proteasom führt (Hochstrasser 1996; Hershko *et al.*, 1998). Generell können Substratproteine mono- oder polyubiquityliert werden, wobei nur die polyubiquitylierten Proteine zum Abbau in das Proteasom dirigiert werden (Hicke 2001).

Die meisten Substratproteine werden polyubiquityliert und durch das 26S-Proteasom abgebaut. Ein prominentes Beispiel für den Ubiquitin-unabhängigen Abbau durch das 26S-Proteasom liefert die Ornithin-Decarboxylase (ODC), ein Enzym, das die Biosynthese von Polyaminen reguliert (Coffino 2001; Palanimurugan *et al.*, 2004). Die Anhäufung von Polyaminen in der Zelle führt zur Synthese des Antizymproteins das an ODC bindet und als Adapterprotein den Abbau durch das Proteasom vermittelt.

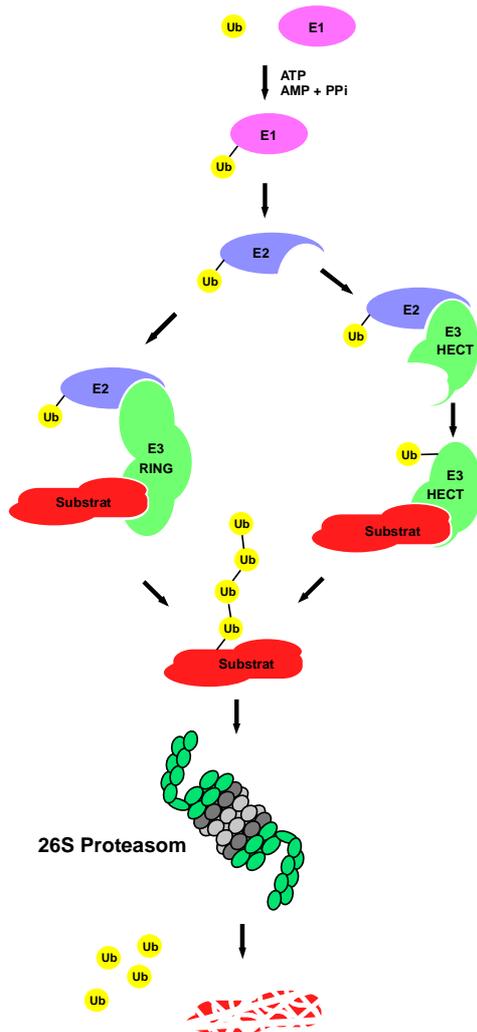


Abb. 2: Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Die Ubiquitylierung der Proteinsubstrate erfolgt durch die aufeinanderfolgende Aktivität dreier Enzyme: E1, E2 und E3.

Im ersten Schritt, der durch das E1-Enzym katalysiert wird, wird das Ubiquitin am C-terminalen Glycinrest unter ATP-Verbrauch aktiviert und auf einen Cysteinrest des E1-Enzyms übertragen. Im nächsten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf einen Cysteinrest des E2-Enzyms transferiert. Im letzten Schritt wird das Ubiquitin auf die ϵ -Aminogruppe eines internen Lysinrestes des Substratsproteins oder auf die bereits bestehende Polyubiquitinkette transferiert. Diese Reaktion wird von einem E3-Enzym katalysiert.

Die Übertragung des Ubiquitins auf ein Substrat kann durch ein RING-Finger- oder durch ein HECT-Domänen-E3-Enzym katalysiert werden. In der HECT-Domänen-vermittelten Katalyse wird das aktivierte Ubiquitin vom E2-Enzym auf einen Cysteinrest in der HECT-Domäne des E3-Enzyms und anschließend von dem E3-Enzym auf das Substratprotein transferiert (rechte Abbildungsseite).

In der RING-Finger E3-vermittelten Katalyse wird das aktivierte Ubiquitin vom E2-Enzym direkt auf das Substratprotein transferiert. Das RING-Finger E3-Enzym funktioniert als ein Adapterprotein zwischen dem E2-Enzym und dem Substratprotein (linke Abbildungsseite).

A.3.1 Das Ubiquitin-System

Ubiquitin (Ub) ist ein aus 76 Aminosäureresten bestehendes, nur bei Eukaryoten vorkommendes Polypeptid. Es kann in den Zellen entweder frei oder kovalent an andere Proteine gebunden existieren und ist sowohl in seiner Primär- als auch in seiner Tertiärstruktur stark konserviert. Die Übertragung des Ubiquitins auf die Zielproteine erfolgt

durch die aufeinanderfolgenden Aktivitäten dreier verschiedener „Enzymtypen“, welche als E1- („Ubiquitin-aktivierende“), E2- („Ubiquitin-konjugierende“) und E3- („Ubiquitin-Protein-ligierende“) Enzyme bezeichnet werden (Abb. 2).

Im ersten Schritt wird das Ubiquitin vom Ubiquitin-aktivierenden Enzym in einer energieverbrauchenden Reaktion adenyliert, wobei Pyrophosphat aus ATP freigesetzt wird (Haas *et al.*, 1982; Hershko *et al.*, 1992). Anschliessend wird das Ubiquitin-AMP-Intermediat am C-terminalen Glycinrest über eine Thioesterbindung mit einem spezifischen Cysteinrest des E1 verknüpft. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird ein solches Enzym durch das *UBA1*-Gen (Ubiquitin Aktivierung) kodiert. Die Deletion dieses Gens ist letal (McGrath *et al.*, 1991).

Nach der Aktivierung durch das E1-Enzym wird das Ubiquitin von diesem in einer Transesterifizierungsreaktion an die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (Ubc) weitergegeben, wobei es an einen spezifischen Cysteinrest der E2-Enzyme gebunden wird. Die Ubc-Enzyme übertragen Ubiquitin direkt oder über Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme) auf die Substratproteine. Die Bindung des Ubiquitins an ein Substrat erfolgt unter Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Akzeptorproteins.

Insgesamt sind mehr als dreißig Gene für E2-Enzyme in verschiedenen Eukaryoten beschrieben worden. Allein in der Bäckerhefe kodieren elf miteinander verwandte Gene (*UBC1-UBC8*, *UBC10*, *UBC11* und *UBC13*) für solche Träger-Enzyme (Hochstrasser 1996; Hershko *et al.*, 1998). Die verschiedenen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme sind an diversen zellulären Prozessen beteiligt und ermöglichen wahrscheinlich zu einem Teil die Spezifität des Ubiquitin-Systems.

A.3.1.1 Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme)

Der Transfer von Ubiquitin auf die ϵ -Aminogruppe eines internen Lysinrestes des Akzeptorproteins oder auf die bereits bestehende Polyubiquitinkette wird durch die sogenannten "E3-Enzyme", die auch als Ubiquitin-Protein-Ligasen bezeichnet werden, katalysiert. Die Übertragung von aktiviertem Ubiquitin auf das Substrat ist bei verschiedenen E3-Klassen unterschiedlich. Einige dieser Ubiquitin-Protein-Ligasen übernehmen das Ubiquitin selbst von einem E2-Protein unter Ausbildung einer Thioesterbindung, bevor sie es auf das Zielprotein übertragen, während andere die Übertragung des Ubiquitins von

E2-Enzymen auf Substratproteine vermitteln, ohne Ubiquitin selbst zu binden (Abb. 2). Im Allgemeinen können Ubiquitin-Protein-Ligasen in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt werden: HECT-Domänenproteine, RING-Finger-Proteine und U-box-Proteine (Scheffner *et al.*, 1990; Lorick *et al.*, 1999; Hatakeyama *et al.*, 2001).

Die HECT-Proteine (Homolog zu E6-AP C-Terminus) bilden eine Klasse der Ligasen, die das aktiviertes Ubiquitin von E2-Enzymen übernehmen und auf das Zielprotein übertragen. Hierfür besitzen die HECT-Proteine eine charakteristische C-terminale, ca. 350 Aminosäuren umfassende HECT-Domäne. Sie zeichnet sich durch einen konservierten, katalytisch aktiven Cysteinrest aus, der, wie die Cysteinreste der E1- und E2-Enzyme, einen Thioester mit Ubiquitin bildet. Anschließend wird das gebundene Ubiquitin von der HECT-Ligase auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins übertragen (Huibregtse *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1995). Das erste isolierte Protein mit einem derartigen Motiv war das sogenannte E6-assoziierte Protein (E6-AP), woraus sich der Domänenname HECT „homolog zum E6-AP-Terminus“ ableitet.

In Hefe konnten mehrere HECT-Proteine identifiziert werden: Rsp5p (Bregman 1995), Ufd4 (Johnson 1995), Tom1 (Utsugi 1999) und Hul4/Hul5 (Wang *et al.*, 1999).

RING-Finger-Proteine zeichnen sich durch eine sogenannte RING-Finger-Domäne aus, eine Protein-Protein-Interaktions-Domäne, die man erstmals für das „*really interesting new gene*“ (RING) -Protein beschrieben hat (Freemont *et al.*, 1991; Lovering *et al.*, 1993). Die Domäne enthält ein Oktett bestehend aus Cystein- und Histidinresten die eine Zink-bindende-Struktur darstellen, die dem Zinkfingermotiv DNA-bindender Proteine ähnlich ist. RING-Finger-Ligasen vermitteln die Übertragung des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Zielprotein nur indirekt. Das E2-Enzym bindet dabei an das RING-Finger-Motiv, während das Substrat mit anderen Protein-Protein-Interaktions-Domänen der Ubiquitin-Protein-Ligase interagiert. Vermutlich wird durch diese räumliche Annäherung von E2-Enzym und Substrat die Übertragung von Ubiquitin erleichtert (Jackson *et al.*, 2000; Joazeiro und Weissman, 2000). Die RING-Finger-Proteine konnten entsprechend ihrer funktionellen und molekularen Eigenschaften in weitere Unterklassen klassifiziert werden (SCF, CBC, APC/C und SPRF).

Die U-box-Proteine stellen die dritte Klasse der Ligasen dar. Dieser Klasse der Ligasen ist eine U-box-Domäne gemeinsam, die in ihrer dreidimensionalen Struktur der RING-Finger-Domäne ähnlich ist, der jedoch die Metall-bindenden Aminosäurereste Cystein und Histidin fehlen (Hatakeyama *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* konnte das Ufd2-Protein dieser

Klasse der Ligasen zugeordnet werden, das am Abbau von artifiziellen Modellsubstraten beteiligt ist (Johnson *et al.*, 1995). Zusätzlich konnte dem Ufd2-Protein eine Funktion in der Verlängerung der Ubiquitin-Ketten (die sogenannte E4-Aktivität) zugewiesen werden (Koegele *et al.*, 1999). Ein weiterer Vertreter der U-box-Familie der Ubiquitin-Ligasen ist das in Säugerzellen identifizierte CHIP, ein Protein das mit molekularen Chaperonen der Hsp70- und Hsp90-Klasse interagiert und am Abbau falsch gefalteter Proteine beteiligt ist (Connell *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2001).

A.3.2 Das Proteasom

Das Proteasom ist eine aus vielen Untereinheiten bestehende, selbst-kompartimentierende Protease mit einem Sedimentationskoeffizienten von 20S, bzw. 26S. Der kleinere Komplex stellt den katalytischen Kern des grösseren und wird als 20S-Proteasom bezeichnet. Das 20S-Proteasom ist nur aus zwei verschiedenen miteinander verwandten Untereinheiten-Klassen, α und β , zusammengesetzt, wobei die β -Untereinheiten zwei innere und die α -Untereinheiten zwei äussere Ringe eines $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Komplexes formen, so dass eine röhrenförmige Struktur entsteht (Baumeister *et al.*, 1988). Im Verlauf der Proteasom-Assemblierung kommt es bei drei der sieben β -Untereinheiten durch eine Prozessierung zur Freisetzung eines N-terminalen Threoninrestes, der als Bestandteil des aktiven Zentrums für die proteolytische Aktivität essentiell ist (Arendt *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1997). Das aktive Zentrum bildet eine katalytische Triade bestehend aus Thr1, Lys33 und Asp17, wobei das N-terminale Threonin einen nucleophilen Angriff auf die Peptidbindung ausführt (Fenteany *et al.*, 1995; Löwe *et al.*, 1995; Seemüller *et al.*, 1995; Ditzel *et al.*, 1998).

Jede der drei aktiven β -Untereinheiten besitzt eine unterschiedliche hydrolytische Aktivität. Die Polypeptide werden demnach hinter hydrophoben, basischen und sauren Aminosäureresten gespalten (Rivett 1989; Orłowski 1990).

Die Proteolyse ubiquitylierter Proteine erfolgt nur wenn zusätzlich regulatorische Komponenten, die sogenannten 19S-Kappen oder 19S-Komplexe, am 20S-Proteasom angelagert sind und so die komplexe Struktur des 26S-Proteasoms bilden. Die 19S-Komplexe katalysieren die Bindung, Entfaltung und Einführung der Substratproteine in die enzymatisch aktive Kammer des 20S-Proteasoms (Bochtler 1999; Voges 1999).

Von den insgesamt 18 verschiedenen Untereinheiten des 19S-Komplexes der Bäckerhefe lassen sich nach ihrer Sequenz sechs (Rpt1-Rpt6) den ATPasen vom Typ der AAA-Proteine („*ATPases associated with various cellular activities*“) zuordnen (Richmond *et al.*, 1997). Da die Proteolyse ubiquitylierter Proteine von ATP-Hydrolyse abhängig ist, wird diesen ATPasen eine Chaperon-ähnliche Funktion in der Entfaltung und Einschleusung der Substrate zugesprochen (Glickman *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 1999).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Proteine Dsk2 und Rad23 bestimmte Untereinheiten des 19S-Komplexes sowie bestimmte ubiquitylierte Substrate binden und diese für den effizienten Abbau durch das 26S-Proteasom rekrutieren können (Verma 2004).

Nach einer Modellvorstellung wird ein ubiquityliertes Protein folgendermaßen vom 26S-Proteasom abgebaut. Nach Bindung der Polyubiquitin-Kette an den Regulator-Komplex wird es durch dessen ATPasen entfaltet und ins Innere des Kernkomplexes geschleust. Dieser Vorgang geht mit der Abspaltung und Regenerierung des Ubiquitins durch Proteasom-assoziierte Isopeptidasen einher (Baumeister *et al.*, 1998). In der inneren zentralen Kammer wird es durch die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten zu Peptiden hydrolysiert.

A.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Komponenten des Protein-Qualitätskontrollsystems identifiziert werden, die am Abbau cytosolischer, faltungsdefekter Proteine in *S. cerevisiae* beteiligt sind. Als Modellsustrat wurde das DHFR-Protein der Maus verwendet, das in seiner nativen Konformation in den Hefezellen stabil ist. Es sollten mutierte Versionen des DHFR-Proteins generiert werden, die aufgrund der veränderten Struktur effizient abgebaut werden sollten. Im Verlauf der Arbeit wurde die *in vivo* Proteolyse dieser faltungsdefekten DHFR-Proteine mit genetischen und biochemischen Methoden untersucht. Vor allem sollte die Rolle molekularer Chaperonen und von Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems auf die Proteolyse der mutierten DHFR-Proteine untersucht werden.

B Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Derivat von	Referenz/Herkunft
JD47-13C	<i>MATa leu2-3,112 trp1-Δ63 his3-Δ200 ura3-52 lys2-801</i>	Ausgangsstamm	(Dohmen <i>et al.</i> , 1995)
JD53	<i>MATα leu2-3,112 trp1-Δ63 his3-Δ200 ura3-52 lys2-801</i>	JD47-13C	(Dohmen <i>et al.</i> , 1995)
JD59	<i>MATa ump1Δ::HIS3</i>	JD47-13C	(Ramos <i>et al.</i> , 1998)
JD177-1-1	<i>MATa uba1Δ::HIS3 pRSts26(uba1-ts)</i>	JD47-13C	(McGrath <i>et al.</i> , 1991)
DF5	<i>MATa/α leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 his3-Δ200/his3-Δ200 ura3-52/ura3-52 lys2-801/lys2-801</i>	Ausgangsstamm	(Finley <i>et al.</i> , 1987)
ubc4 ubc5	<i>MATa ubc4Δ::HIS3 ubc5Δ::LEU2</i>	DF5	(Seufert <i>et al.</i> , 1990)
MHY501	<i>MATα leu2-3,112 trp1-1 his3-Δ200 ura3-52 lys2-801</i>	Ausgangsstamm	(Chen <i>et al.</i> , 1993)
MHY552	<i>MATα ubc6Δ::HIS3 ubc7Δ::LEU2</i>	MHY501	(Chen <i>et al.</i> , 1993)
MHY570	<i>MATα ubc4Δ::TRP1 ubc5Δ::LEU2 ubc6Δ::HIS3 ubc7Δ::LEU2</i>	MHY501	(Chen <i>et al.</i> , 1993)
YMF5	<i>MATα ubc4Δ ubc5Δ::LEU2 ubc6Δ::HIS3 ubc7Δ::LEU2</i> Austausch des <i>TRP1</i> -Markergens in <i>ubc4Δ::TRP1</i> gegen <i>URA3</i> (pNKY1009) im MHY570, dann Selektion gegen <i>URA3</i> durch Wachstum auf FoA-haltigem Medium	MHY570	(Fröhlich 2001)
RKY1734	<i>rsp5-1</i>	JD47-13C	R. Kölling
JN54	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 lys2 trp1-Δ1 ura3-52</i>	Ausgangsstamm	(Nelson <i>et al.</i> , 1992)
JN55	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 lys2 trp1-Δ1 ura3-52</i>	JN54	(Nelson <i>et al.</i> , 1992)
MW123	<i>MATα ssa1Δ::HIS3 ssa2Δ::LEU2</i>	JN54	(Werner-Washburne <i>et al.</i> , 1987)
JN516	<i>MATα ssa2Δ::LEU2 ssa3Δ::TRP1 ssa4::LYS2</i>	JN54	E. Craig
YMF14	<i>MATα ssa2Δ::HIS3 ssa3Δ::URA3 ssa4Δ::LYS2</i>	JN516	diese Arbeit
JBY68	<i>MATa ssa1-45 ssa2Δ::LEU2 ssa3Δ::URA3 ssa4::LYS2</i>	JN54	E. Craig
YMF15	<i>MATa ssa1-45 ssa2Δ::LEU2 ssa3Δ::URA3 ssa4::LYS2</i>	JBY68	diese Arbeit
YMF19	<i>MATa ssa1Δ::HIS3</i>	JN54 x MW123	diese Arbeit
YMF20	<i>MATα ssa2Δ::LEU2</i>	JN54 x MW123	diese Arbeit
YMF24	<i>MATa ssa2Δ::LEU2 fes1Δ::HIS3</i>	YMF20 x YMF46	diese Arbeit
YMF26	<i>MATα ssa1Δ::HIS3 fes1Δ::HIS3</i>	YMF27 x YMF46	diese Arbeit
YMF27	<i>MATα ssa1Δ::HIS3</i>	JN54 x MW123	diese Arbeit
YMF31	<i>MATa SSA1-ha₃::HIS3</i>	JD47-13C	diese Arbeit
YMF33	<i>MATa YDJ1-ha₃::HIS3</i>	JD47-13C	diese Arbeit
YMF35	<i>MATa HSC82-ha₃::HIS3</i>	JD47-13C	diese Arbeit
YMF36	<i>MATa FES1-ha₃::HIS3</i>	JD47-13C	diese Arbeit
YMF46	<i>MATa fes1Δ::HIS3</i>	JN54	diese Arbeit
JN208	<i>MATa ssb1-1 ssb2-1</i>	JN54	(Nelson <i>et al.</i> , 1992)
W303-1b	<i>MATα his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100</i>	Ausgangsstamm	R. Rothstein
ACY17b	<i>MATα ydj1-2::HIS3 LEU2::ydj1-151</i>	W303	A. Caplan
iP82a	<i>MATa his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ade2-1 hsc82Δ::LEU2 hsp82Δ::LEU2 HSP82::HIS3</i>	W303	S. Lindquist

iG170Da	<i>MATa hsc82Δ::LEU2 hsp82, G170D::HIS3</i>	<i>hsp82Δ::LEU2</i>	W303	S. Lindquist
KFY100	<i>MATa his4-619 leu2-3,112 ura3-52</i>		Ausgangsstamm	K.U. Fröhlich
KFY188	<i>cdc48-ts</i>		KFY100	K.U. Fröhlich
BY4741	<i>MATa his3-Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3-Δ0</i>		Ausgangsstamm	EUROSCARF
<i>itt1Δ</i>	<i>itt1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>tul1Δ</i>	<i>tul1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>ris1Δ</i>	<i>ris1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>dma1Δ</i>	<i>dma1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>dma2Δ</i>	<i>dma2Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>mag2Δ</i>	<i>mag2Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>asr1Δ</i>	<i>asr1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>ymr247cΔ</i>	<i>ymr247cΔ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>ybr062cΔ</i>	<i>ybr062cΔ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>ykr017cΔ</i>	<i>ykr017cΔ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>yol138cΔ</i>	<i>yol138cΔ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>ydr266cΔ</i>	<i>ydr266cΔ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>tom1Δ</i>	<i>tom1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>hul4Δ</i>	<i>hul4Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>hul5Δ</i>	<i>hul5Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>hsp104Δ</i>	<i>hsp104Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>sse1Δ</i>	<i>sse1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>sse2Δ</i>	<i>sse2Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>aha1Δ</i>	<i>aha1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>hch1Δ</i>	<i>hch1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>snl1Δ</i>	<i>snl1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>sba1Δ</i>	<i>sba1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>sti1Δ</i>	<i>sti1Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF
<i>gim5Δ</i>	<i>gim5Δ::KanMX4</i>		BY4741	EUROSCARF

B.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
XL1-Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1, lac⁻, proAB⁺, lacIq, lacZ\squareM15, tn10(tetr)</i>	Stratagene, San Diego, USA

B.1.3 *Escherichia coli*-Klonierungsvektoren

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pBluescriptSK ⁺	enthält Resistenzgen gegen Ampicillin (kodiert für β -Lactamase), Möglichkeit der Blau-Weiß-Selektion durch α -Komplementation	Stratagene, San Diego, USA
pMAF20	5'UTR des <i>URA3</i> -Gens- <i>P_{CUP1}</i> -DHFR ^{mutC} -ha- <i>URA3</i> in pBluescriptSK ⁺	diese Arbeit

B.1.4 *Saccharomyces cerevisiae*-Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
YCplac22	<i>CEN4/ARS1, TRP1</i> ; Basisvektor	(Gietz <i>et al.</i> , 1988)
pRS314	<i>CEN4/ARS1, TRP1</i> ; Basisvektor	(Sikorski <i>et al.</i> , 1989)
pRS315	<i>CEN4/ARS1, LEU2</i> ; Basisvektor	(Sikorski <i>et al.</i> , 1989)
pJH10	P_{CUP1} - <i>DHFR-ha-URA3</i> in pRS315	J. Höckendorff
pJH10C	P_{CUP1} - <i>DHFR(T39A, V136A)-ha-URA3</i> in pRS315	J. Höckendorff
pJH23	P_{CUP1} - <i>DHFR-ha-URA3</i> in pRS314	J. Höckendorff
pJH23C	P_{CUP1} - <i>DHFR(T39A, V136A)-ha-URA3</i> in pRS314	J. Höckendorff
pCH11	P_{ODC} - <i>ODC-ha₃</i> in Ycplac22	P. Murugan; Ch. Reufsteck
pBA3	P_{CUP1} - <i>UBI-Arg-ha-URA3</i>	B. Andrews
pBA2VV	P_{CUP1} - <i>UBI(G76V)-ha-URA3</i>	B. Andrews
pRB240	P_{CUP1} - <i>myc-UBI</i> in pRS314	R. Backer
pMAF6	P_{CUP1} - <i>DHFR-GFP</i> in pRS315	M. Fröhlich 2001
pMAF30D	P_{CUP1} - <i>DHFR(Δ116-128)-ha-URA3</i> in pRS315	diese Arbeit
pMAF32D	P_{CUP1} - <i>DHFR(Δ116-128)-ha-URA3</i> in pRS314	diese Arbeit
pMAF57	P_{CUP1} - <i>DHFR-FLAG</i> in pRS315	diese Arbeit
pMAF57C	P_{CUP1} - <i>DHFR(T39A, V136A)-FLAG</i> in pRS315	diese Arbeit
pMAF57D	P_{CUP1} - <i>DHFR(Δ116-128)-FLAG</i> in pRS315	diese Arbeit
pMAF61	P_{CUP1} - <i>DHFR-FLAG</i> in pRS314	diese Arbeit
pMAF61D	P_{CUP1} - <i>DHFR(Δ116-128)-FLAG</i> in pRS314	diese Arbeit
pMAF62C	P_{CUP1} - <i>DHFR(T39A, V136A)-GFP</i> in pRS314	diese Arbeit
pMAF62D	P_{CUP1} - <i>DHFR(Δ116-128)-GFP</i> in pRS314	diese Arbeit
pMAF76C	P_{CUP1} - <i>DHFR(T39A, V136A)-FLAG</i> in pRS314	diese Arbeit

B.1.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
JD383	CGCGAGCTCGCTAAGAGATAGTGATGATA	5', <i>URA3</i> -Promotor, (Position -342)
JD118	AATGTCAGATCCTGTAGAGA	3', im <i>URA3</i> -Gen
JH357	CGCGGTACCCGGATCCGCTTTCTTCTCGTAGACTTC	3', im <i>mDHFR</i>
MAF854	TGAGGCTACTGCGCCAATTG	5', <i>URA3</i> -Promotor (Position -440)
JD903	CCTCAGTGGCAAATCCTAAC	Testoligo für <i>HIS3MX6</i> in pYM2 (Knop)
MAF1185	GTGCTCCTCCAGCTCCAGAGGCTGAAGGTCCAACCGT TGAAGAAGTTGATcgtacgctgcagtcgac	S3- <i>SSA1</i> , 5' von Stop-codon des <i>SSA1</i> -Gens für die Fusion mit <i>ha₃</i> aus pYM2 (Knop)
MAF1186	CAGATCATTAAGACATTTTCGTTATTATCAATTGC CGCACCAATTGGCATCGATGAATTCGAGCTCG	S2- <i>SSA1</i> , 3' von Stop-codon des <i>SSA1</i> -Gens für die Fusion mit <i>ha₃</i> aus pYM2 (Knop)
MAF1187	GCTTACTCTTTGAAGAACACC	T1 Testoligo für <i>SSA1</i> (Position +300 von Stop-codon)
MAF1188	ATCCGATGAAGAAGAACAAGGTGGCGAAGGTGTTC AATGTGCATCTCAAcgtacgctgcagtcgac	S3- <i>YDJ1</i> , 5' von Stop-codon des <i>YDJ1</i> -Gens für die Fusion mit <i>ha₃</i> aus pYM2 (Knop)

MAF1189	ATGATGAATAAATGAATCGTGAATAAGTTGATCTTTT TTTATCAAGAAAAATCGATGAATTCGAGCTCG	S2- <i>YDJ1</i> , 3' von Stop- codon des <i>YDJ1</i> -Gens für die Fusion mit <i>ha</i> ₃ aus pYM2 (Knop)
MAF1190	GGTCATCGAAGGTAAAGGTA	T1 Testoligo für <i>YDJ1</i> (Position +300 von Stop- codon)
MAF1249	CCTACATGTCTTCCAAGAAG	T1 Testoligo für <i>HSC82</i> (Position +320 von Stop- codon)
MAF1250	TAAAGGACAGACTTAATGAAGACGATTATTTAGCCGT AAAGTATGTATTACGTACGCTGCAGGTCGAC	S3- <i>FES1</i> , 5' von Stop- codon des <i>FES1</i> -Gens für die Fusion mit <i>ha</i> ₃ aus pYM2 (Knop)
MAF1251	AGATAATATGAAATGGTGAATGTAATATCATTTTATT TCTACGGACGTAAATCGATGAATTCGAGCTCG	S2- <i>FES1</i> , 3' von Stop- codon des <i>FES1</i> -Gens für die Fusion mit <i>ha</i> ₃ aus pYM2 (Knop)
MAF1252	GTGATAACACCGCCAAACC	T1 Testoligo für <i>FES1</i> (Position +320 von Stop- codon)
MAF1322	TAAGTAAACAAATTTATATAATATATAAAACATGAAG GCGAAAAAAGAGAATCGATGAATTCGAGCTCG	S2- <i>HSC82</i> , 3' von Stop- codon des <i>HSC82</i> -Gens für die Fusion mit <i>ha</i> ₃ aus pYM2 (Knop)
MAF1323	AAGCTCCAGTTGAAGAGGTTCCAGCTGACACCGAGA TGGAAGAAGTTGATCGTACGCTGCAGGTCGAC	S3- <i>HSC82</i> , 5' von Stop- codon des <i>HSC82</i> -Gens für die Fusion mit <i>ha</i> ₃ aus pYM2 (Knop)

B.1.6 Enzyme und Antikörper

β-Glucuronidase (aus <i>Helix pomatia</i>)	Roche, Mannheim
Klenow-Polymerase	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma, St- Louis, USA
T4-Ligase	NEB, Beverly, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Beverly, USA
<i>Taq/Pwo</i> -(„High Fidelity“-) Polymerase	Roche, Mannheim
16B12 Anti- <i>ha</i> Antikörper (Maus)	BABCO, Berkeley, USA
9B11 Anti- <i>myc</i> Antikörper (Maus)	Roche
Anti-Ubiquitin Antikörper (Maus)	Stanta Cruz, USA
Anti- <i>cdc11</i> Antikörper (Kaninchen)	Stanta Cruz, USA
Anti- <i>tpi1</i> Antikörper (Kaninchen)	J. Dohmen, Boston, USA
Anti-Maus-IgG-AK (Peroxidase gekoppelt)	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG-Ak (Peroxidase gekoppelt)	Amersham-Biosciences

B.1.7 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. Sie wurden bezogen von Affinit (Exeter, England), Amersham-Pharmacia(Uppsala, Schweden), Baker (Deventer, Niederlande), Becton-Dickinson (Heidelberg), BioRad (München), Calbiochem (Bad Soden),

Difco (Detroit, USA), Fluka (Neu-Ulm), Gibco (Paisley, Schottland), Merck (Darmstadt), Oxoid (Hampshire, England), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), und Serva (Heidelberg) bezogen.

B.2 Methoden

B.2.1 Medien zur Anzucht von Bakterien und Hefen

Medien zur Aufzucht von *Saccharomyces cerevisiae*:

Vollmedium YPD:	1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose
Vollmedium YPG:	1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Galaktose
Minimalmedium SD:	6,7g/l Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren, 2% Glukose
Je nach Selektion wurden zugegeben:	20mg/l Arginin, 10mg/l Histidin, 60mg/l Isoleucin, 60mg/l Leucin, 40mg/l Lysin, 10mg/l Methionin, 60mg/l Phenylalanin, 50mg/l Threonin, 40mg/l Tryptophan, 40mg/l Uracil, 20mg/l Adenin
Minimalmedium SG:	wie SD mit 2% Galaktose statt Glukose

Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar.

Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte die Aufzucht von Hefen bei 30°C.

Medien zur Aufzucht von *Escherichia coli*:

LB-Medium:	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl
SOC-Medium:	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 20mM Glukose, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , pH 7,5

Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar. Bei Bedarf wurde dem Medium 50mg/l Ampicillin und 0,008% X-Gal (Stocklösung: 2% in DMF) zugesetzt. Die Aufzucht erfolgte bei 37°C.

B.2.2 Molekularbiologische und genetische Methoden

B.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen in H₂O wurden entweder im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel durch Vergleich mit einem Standard oder photometrisch durch Messung der Absorption bei 260nm ermittelt. Eine Absorption von 1 bei 260nm entspricht 50µg/ml doppelsträngiger DNA, und 40µg/ml für einzelsträngige DNA und RNA. Der Quotient aus A₂₆₀ und A₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure, er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

B.2.2.2 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Die Restriktion von DNA mittels Endonukleasen erfolgte nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des mitgelieferten Reaktionspuffers für 1-2 Stunden.

B.2.2.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese

Lösungen:

TAE-Puffer:	0,04	M	Tris-HCl, pH
	17,5	%	Essigsäure
	0,01	M	EDTA (aus Stammlösung, pH 8,0)
6fach Auftragungspuffer:	0,25	%	(w/v) Bromphenolblau
	0,25	%	(w/v) Xylencyanol
	15	%	(w/v) Ficoll (Typ 400)

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8-1,5%igen TAE-Agarosegelen. Größe und Menge der aufgetrennten DNA wurde durch Vergleich der Ethidiumbromid-Anfärbbarkeit mit einem Standard ermittelt (1µg *EcoRI/HinDIII*-restringierte doppelsträngige DNA des Phagen Lambda). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (312nm) sichtbar gemacht und fotografiert. Die Gelstücke mit den entsprechenden Banden wurden dann mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten.

B.2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN oder das „Nucleospin Extract Kit“ der Firma Macherey und Nagel benutzt. Es wurde nach den Angaben der Hersteller verfahren.

B.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden T4-DNA-Ligase und Reaktionspuffer der Firmen Gibco-BRL oder NEB benutzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C oder 1std bei Raumtemperatur inkubiert.

B.2.2.6 DNA-Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion nach Mullis *et al.* (1986)

Zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung des „High Fidelity Kit“ der Firma Roche durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<u>Ansatz:</u>	1	µl	Plasmid-DNA (50ng)
	1	µl	Oligonukleotid 1 (100pmol/µl)
	1	µl	Oligonukleotid 2 (100pmol/µl)
	10	µl	10fach Reaktionspuffer vom Hersteller mitgeliefert
	4	µl	MgCl ₂ -Lösung (25mM)
	3,5	µl	Desoxynukleotidmix (je 10mM)
	1	µl	Polymerasemix (<i>Taq</i> - und <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase)
	79,5	µl	H ₂ O
100	µl	Gesamtvolumen

Üblicherweise verlief eine PCR wie folgt:

<u>Reaktion:</u>	1.	Denaturierung	3 min 92°C
	2.	Denaturierung	30 sek 92°C
	3.	Hybridisierung	40 sek 55°C
	4.	Elongation	1 min 72°C (ca. 1min pro 1000 Basen)
	Die Schritte 2 - 4 wurden dann 25 mal wiederholt.		
	5.	Polymerisation	5 min 72°C (zur Auffüllung unvollständiger Reaktionen)

Zur Isolierung der PCR-Produkte aus dem Reaktionsgemisch wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN benutzt, wobei die Angaben des Herstellers befolgt wurden (QIAGEN, Hilden).

B.2.2.7 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von *Escherichia coli*

Diese Methode stellt eine Abwandlung der Methode nach Hanahan (1985) dar.

Lösungen:

TfB1-Lösung	30	mM	Kaliumacetat
	50	mM	MnCl ₂
	100	mM	KCl
	10	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin

steril filtrieren

TfB2-Lösung	10	mM	Mops (pH 6,8 mit NaOH einstellen)
	10	mM	KCl
	75	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin

steril filtrieren

100ml LB-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 herangezogen. Der Kolben wurde dann auf Eis schnell herabgekühlt. Bei allen folgenden Schritten wurden die Zellen immer auf Eis gekühlt. Durch 5min Zentrifugation bei 4°C und 5000g wurden die Zellen geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 20ml TfB1 resuspendiert und 5min auf Eis inkubiert. Durch 5min Zentrifugation bei 4°C und 5000g wurden die Zellen erneut pelletiert und anschließend in 2ml TfB2 resuspendiert. Es wurden dann Aliquots von 100µl in Eppendorfgefäße pipettiert, bei -80°C gefroren und bis zur Verwendung gelagert.

Transformation:

Ein Aliquot (150µl) tiefgefrorener, kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und sofort zur Transformation eingesetzt. Nach Zugabe der Plasmid-DNA wurden die Zellen 60min auf Eis inkubiert und anschließend für 45sek bis 2min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium wurden die Zellen 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um das plasmidkodierte Resistenzgen zu exprimieren. Die Zellen wurden 1min bei 15.800g abzentrifugiert, auf LB-Platten mit 50µg Ampicillin pro ml ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

B.2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde das „Plasmid Mini Kit“ der Firma QIAGEN benutzt. Zur Aufreinigung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde das „Plasmid Midi Kit“ derselben Firma eingesetzt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (QIAGEN, Hilden).

B.2.2.9 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von *Saccharomyces*

cerevisiae

Gefrierkompetente Zellen nach (Dohmen *et al.*, 1991):

Lösung A:	1	M	Sorbitol
	10	mM	Bicin pH 8,35
	3	%	(w/v) Ethylenglykol
	5	%	(v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

Lösung B:	40	%	(w/v) PEG 1000
	200	mM	Bicin pH 8,35

Lösung C:	150	mM	NaCl
	10	mM	Bicin pH 8,35

Die Zellen wurden in 100ml YPD bis zu einer Zelldichte von 0,4-0,8 OD₆₀₀ herangezogen, abzentrifugiert (2000rpm, 5min) und mit 50ml Lösung A gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendierung in 2ml Lösung A wurden Aliquots von 200µl bei -80°C eingefroren und bis zum Gebrauch gelagert.

Zu einem Aliquot kompetenter Hefezellen wurden 0,1 - 5 µg Plasmid-DNA und 5µl (10mg/ml) einzelsträngige Kalbsthymus-DNA gegeben. Die Zellen wurden dann 5min bei 37°C geschüttelt und mit 1ml Lösung B 1std bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation (3000rpm, 5min) wurden die Zellen mit 1ml Lösung C gewaschen, abzentrifugiert, in 150µl Lösung C aufgenommen und auf selektivem Medium ausplattiert.

Lithium-Acetat/ss-DNA/PEG-Transformation nach (Gietz *et al.*, 1995):

Die Lithium-Acetat-Transformation wurde durchgeführt, wenn eine hohe Effizienz, d.h. eine große Zahl an Transformanten benötigt wurde. 50ml Medium wurden mit Zellen aus einer 5ml Übernachtskultur zu einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Nach Aufzucht bis zu einer OD₆₀₀ von

0,8-0,9 wurden die Zellen 5min bei 3000g zentrifugiert, mit 25ml sterilem H₂O gewaschen und in 1ml 100mM LiAc aufgenommen. Nach Überführung in ein Eppendorf-Gefäß und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 500µl 100mM LiAc resuspendiert und in Aliquots von 50µl aufgeteilt. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und auf das Pellet wurden 240µl PEG3350 (w/v), 36µl 1M LiAc, 5µl denaturierte Kalbsthymus-DNA (10mg/ml) und 0,1 bis 10µg DNA in 70µl H₂O pipettiert. Der Ansatz wurde durch 1min starkes vortexen vermischt und 30min bei 30°C inkubiert. Nach 25min bei 42°C wurden die Zellen pelletiert (2min, 8000upm in einer Eppendorf-Zentrifuge) mit 1ml sterilem Wasser gewaschen und auf Selektivmedium ausplattiert. Kolonien aus transformierten Zellen konnten nach 2-4 Tagen bei 30°C isoliert werden.

B.2.2.10 Plasmid-Präparation aus *Saccharomyces cerevisiae* nach (Robzyk *et al.*, 1992)

Lösungen:

STET	8	%	Saccharose
	50	mM	Tris-Cl pH 8,0
	50	mM	EDTA
	5	%	Triton-X 100
	10	mM	Tris-Cl pH 8,5

Zellen aus 3ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert, mit Wasser gewaschen und in 100µl STET-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen (Ø 0,45mm) bis unter den Meniskus wurden die Zellen 5min in einem IKA-Vibrax-VXR (Janke und Kunkel) geschüttelt. Die Suspension wurde nach erneuter Zugabe von 100µl STET-Lösung 3min bei 95°C inkubiert, 10min auf Eis gekühlt und 10min bei 4°C und 15.800g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit der Hälfte des Volumens 7,5M NH₄-Acetat versetzt und 1std bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (10min, 4°C, 15.800g) wurden 100µl des Überstandes abgenommen, mit dem zweifachen Volumen 96% Ethanol gefällt. Das Pellet wurde nach erneuter Zentrifugation mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl Tris-Cl, pH 8,5, aufgenommen. 10µl dieser Lösung wurden zur Transformation von *E. coli* verwendet.

B.2.2.11 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* nach Rose *et al.*, 1990

Zellen aus 5ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (10sek. 15.000g) und in 500µl 1M Sorbitol, 0,1M EDTA pH7,5 resuspendiert. Nach Zugabe von 0,25mg/ml Lyticase (Sigma) wurde für 1std bei 37°C inkubiert. Die sphäroplastierten Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (15sek 15.000g) und in 500µl 50mM Tris-Cl (pH 7,4), 20mM EDTA resuspendiert. Nach Zugabe von 50µl 10% SDS erfolgte eine Inkubation für 30min bei 65°C. Die Proteine wurden durch Zugabe von 200µl 5M Kaliumacetatlösung für 1std auf Eis ausgefällt und anschließend für 5min bei 18.000g abzentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 700µl Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt und durch Zentrifugation (5min 18.000g) pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 100µl 10mM Tris-Cl (pH 8,5).

B.2.2.12 Sequenzierung von DNA nach (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxynukleotid-Methode von Sanger unter Verwendung des „BigDye Terminator V.3.1“-Kits der Firma Becton-Dickinson und des Sequenziergeräts ABI-Prism 3100 der Firma Applied Biosystems durchgeführt. 500ng Plasmid-DNA wurden mit dem fertigen Sequenziermix und 5pmol Primer vermischt. Die Reaktion erfolgte durch Polymerasekettenreaktion nach folgendem Programm:

1.	96°C	5 min
2.	96°C	30 sek
3.	50°C	15 sek
4.	60°C	4 min

Die Schritte 2-4 wurden 26 mal wiederholt. Die Aufarbeitung der Proben fand im zentralen Sequenzierlabor des Instituts für Genetik statt.

B.2.3 Biochemische Methoden

B.2.3.1 Herstellung von zellfreien Proteinrohextrakten aus *S. cerevisiae*

Glasperlen-Aufschluss:

Lysis Puffer	50	mM	HEPES pH 7,5
	150	mM	NaCl
	1	%	(v/v) Triton-X-100
	5	mM	EDTA

vor der Verwendung wurden zugegeben:

„Complete Mini“ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
20µmol/l Proteasominhibitor MG132 (Affiniti)

Zur Gewinnung der Rohextrakte wurden 5-50ml einer exponentiell wachsenden Kultur ($OD_{600} = 0,8-1,2$) abzentrifugiert (5min, 2000upm, Beckman GS-6K), mit H₂O gewaschen und in 150-300µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von Glasperlen bis unter den Meniskus erfolgte der Aufschluss durch 5minütiges heftiges Schütteln auf einem IKA-Vibrax-VXR (Janke und Kunkel), bei 4°C. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10min, 4°C, 20.000g) pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen.

Kochaufschluss:

Zur Herstellung von Zellextrakten für Western-Blot-Analysen wurden 5-20ml einer exponentiell wachsenden Kultur ($OD_{600} = 0,8-1,2$) abzentrifugiert (5min, 2000upm, Beckman GS-6K), mit 1 ml 1 × PBS gewaschen und in 100 µl 1 × Lämmli–Auftragungspuffer (LLB, siehe unten) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch fünfminütiges Kochen. Unlösliche Zellbestandteile wurden 10min bei 12000 g und RT abzentrifugiert.

B.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli 1970)

Lösungen:

Gel-Lösungen:	1	M	Tris pH 6,8
	1,5	M	Tris pH 8,8
	30	%	(w/v) Acrylamid / 2% (w/v) Bisacrylamid
	10	%	(w/v) APS
	10	%	(w/v) SDS
			TEMED

Lämmli-Laufpuffer (LRB):	25	mM	Tris pH 8,3
	192	mM	Glycin
	0,1	%	(w/v) SDS
Lämmli-Auftragungspuffer:	125	mM	Tris pH 6,8
	10	%	β -Mercaptoethanol
	4	%	(w/v) SDS
	20	%	(w/v) Glyzerin
	0,04	%	(w/v) Bromphenolblau

Das Trenngel (15ml) wurde wie folgt hergestellt:

Prozent	6	7	8	10	12
H ₂ O	8,1ml	7,6ml	7,1ml	6,1ml	5,1ml
1,5M Tris-Cl, pH 8,8	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml
Acrylamidlösung	3ml	3,5ml	4ml	5ml	6ml
10% SDS	150 μ l				
10% APS	50 μ l				
TEMED	10 μ l				

Das Sammelgel (5ml) wurde wie folgt hergestellt:

Prozent	3
H ₂ O	3,66ml
1M Tris-Cl, pH 6,8	625 μ l
Acrylamidlösung	650 μ l
10% SDS	50 μ l
10% APS	10 μ l
TEMED	5 μ l

Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet und für ca. 30min auspolymerisiert. Das Isopropanol wurde abgenommen, die Geloberfläche mit H₂O nachgespült, das Sammelgel gegossen und der taschenbildende Kamm eingeführt. Die verwendeten Apparaturen stammten entweder von der Firma Hoefer Scientific (San Francisco, USA) oder von der Firma BioRad (München).

Erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels Glasperlen, so wurden die proteinenthaltende Überstände mit Auftragungspuffer versetzt und 5min bei 100°C inkubiert, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Durch das SDS und das β -Mercaptoethanol werden die Proteine denaturiert. Das SDS lagert sich an die Polypeptidketten an. Es entsteht ein negativ geladener Komplex, dessen Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dem Logarithmus der Masse des Proteins annähernd proportional.

B.2.3.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot

Lösungen:

Transfer-Puffer:	25	mM	Tris pH 8,3
	190	mM	Glycin
	20	%	(v/v) Methanol
	0,1	%	(w/v) SDS

PBS:	8	g/l	NaCl
	0,2	g/l	KCl
	1,44	g/l	Na ₂ HPO ₄
	0,24	g/l	KH ₂ PO ₄
			pH 7,4

PBST: PBS + 0,1%Tween-20

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine durch Semi-Dry-Blotting aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Milipore) übertragen. Der Transfer wurde in Transferpuffer bei 240mA für eine Stunde durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde erst durch Schwenken in Methanol angefeuchtet und dann in Transferpuffer geschwenkt. Nach dem Transfer wurde die Membran 30min gekocht und anschließend 1Std. in Blockinglösung (3% Milchpulver in PBST) inkubiert. Die Membran wurde dann 1std mit dem 1.-Antikörper (1:2000-1:5000 verdünnt in Blockinglösung) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3x 10min waschen in PBST wurde der 2.-Antikörper (Peroxidase gekoppelt) ebenfalls 1:2000-1:5000 in Blockinglösung verdünnt zugegeben und 1std bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4x Waschen für je 10min in PBST wurde die Membran 1min in PBS gewaschen und anschließend in „Lumi-Light-Plus Western Blotting“ Chemilumineszenz-Lösung inkubiert (Roche). Das Ergebnis wurde auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

B.2.3.4 Unspezifisches Anfärben der Proteine durch Ponceau S

Um die Effizienz der Übertragung zu überprüfen, wurden die Proteine auf der Membran für 2 min mit Ponceau S (Sigma, Taufkirchen) rot angefärbt und durch mehrmaliges Waschen in H₂O wieder entfärbt.

B.2.3.5 Untersuchung der Proteinstabilität durch „Cycloheximide chase“

Zur Untersuchung der Stabilität von Proteinen wurden exponentiell wachsende Kulturen von Hefezellen mit 100µg/ml Cycloheximid versetzt, um die Proteintranslation zu unterbinden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, mit H₂O gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Präparation des Proteinrohextraktes erfolgte wie unter B.2.3.1 beschrieben. Anschließend erfolgte die Analyse durch SDS-PAGE und Western-Blot.

B.2.3.6 Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Ultrazentrifugation

Gleiche Zellmengen wurden mittels Glasperlen aufgeschlossen, intakte Zellen und Zellorganellen abzentrifugiert (5min, 4°C, 800 x g). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Proben in einem Volumen von max. 100µl 30min bei 100.000 x g (40.000rpm im TLA-55 Rotor) und 4°C in der Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) zentrifugiert. Partikel, die unter diesen Bedingungen im Überstand verbleiben, gelten als löslich (Hjelmeland *et al.*, 1984). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 5 x Lämmli–Auftragungspuffer versetzt, um die Endkonzentration von 1 x Lämmli–Auftragungspuffer einzustellen. Das Pellet wurde im gleichen Volumen 1 x Lämmli–Auftragungspuffer resuspendiert. Alle Proben wurden 5min bei 100°C inkubiert.

B.2.3.7 Immunpräzipitation der DHFR-FLAG-Modellsubstrate

Für die Immunpräzipitation (IP) wurden pro IP-Probe jeweils 40µl des Anti-FLAG-Affinitätsgels (EZviewTM Red Anti-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma) in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und 2 x mit 1ml Lysis-Puffer (B.2.3.1) gewaschen. Proteinextrakte wurden zu dem Affinitätsgel gegeben und eine Stunde bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 1ml Lysis-Puffer auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die IP-Proben abzentrifugiert (300 x g, 30sec, 4°C), der Überstand verworfen, die Matrix in ein 1,5ml Reaktionsgefäß übertragen und 4 x mit 1ml Lysis-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer möglichst vollständig entfernt und die Matrix nach Zugabe von 100µl Lysis-Puffer mit Anti-FLAG-Peptid (1µg/ml, Sigma) 30min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die IP-Proben abzentrifugiert (300 x g, 30sec,

4°C), der Überstand abgenommen und in 1 x Lämmli–Auftragungspuffer 5min bei 100°C inkubiert.

B.2.4 Methoden der Hefegenetik

B.2.4.1 Kreuzung von haploiden Hefestämmen

Zellen der zu paarenden Hefestämme wurden auf einer YPD-Agarplatte durch überkreuzende Ausstriche vermischt und 2-6std bei Raumtemperatur inkubiert. Enthielten die Ausgangsstämme unterschiedliche Auxotrophiemarker, so konnten diploide Kreuzungsprodukte durch Replikaplattierung auf ein selektives Medium isoliert werden. War dies nicht möglich, so wurden die Kreuzungsprodukte vereinzelt und in Paarungstests auf ihr Verhalten hin überprüft. Zellen, die weder mit a- noch mit α -Zellen effizient paaren konnten, wurden als Diploide identifiziert und zur weiteren Arbeit isoliert.

B.2.4.2 Paarungstypanalyse von Hefezellen

Zur Feststellung des Paarungstyps von Hefestämmen wurden diese mit den Testerstämmen KMY38 (*Mat α , trp5-27*) und KMY39 (*Mata, trp5-27*) auf einer YPD-Platte überkreuzend ausgestrichen und für 2-6std bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Replikaplattierung auf SD-Medium ohne Tryptophan. Da alle anderen benutzten Stämme eine Mutation im *TRP1*-Gen besitzen (*trp1 Δ 63*), konnten diploide Paarungsprodukte aufgrund der Fähigkeit zur gegenseitigen Komplementation der *trp1*- und *trp5*-Mutation auf diesen Minimalmediumsplatten wachsen und identifiziert werden. Haploide Zellen aller Stämme sind aufgrund der Tryptophanauxotrophie nicht zum Wachstum befähigt.

B.2.4.3 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse

Zur Induktion der Meiose wurden die zu analysierenden Zellen auf Sporulationsmedium (0,1% Hefeextrakt, 1% Kaliumacetat, 2% Agar) ausgestrichen und für einige Tage bei 30°C inkubiert. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden einige Zellen abgenommen und in 200 μ l sterilem H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 3 μ l β -Glucuronidase und 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension in einem waagerechten Strich vorsichtig auf einer YPD-Platte verteilt. Tetraden wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert und die vier

Sporen systematisch auf der Agar-Platte abgelegt. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Sporklone isoliert und auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

B.2.4.4 Manipulation von Genen in *S. cerevisiae* nach (Knop *et al.*, 1999). Herstellung der Stämme YMF31, YMF33, YMF35 und YMF36

Die Manipulation von Genen in *S. cerevisiae* erfolgte nach der Methode von (Knop *et al.*, 1999). Hierzu wurden die offenen Leserahmen (ORF) von Genen am 3'-Ende mit einer für ein Epitop kodierenden Sequenz fusioniert. Dafür wurden Oligonukleotidpaare generiert, deren 5'-Ende ca. 40 Nukleotide beinhaltet, die der Sequenz vor dem Stopcodon (S3-Oligo) oder hinter dem Stopcodon (S2-Oligo) des zu manipulierenden Genes entsprach. Das 3'-Ende dieser Oligonukleotide wurde so gewählt, dass eine Amplifikation der in (Knop *et al.*, 1999) beschriebenen Manipulationskassette im Plasmid pYM2 (*ha₃-HIS3*) ermöglicht wurde. Durch Transformation von Hefezellen mit den so erzeugten linearen PCR-Produkten kam es dann durch homologe Rekombination zur Integration des linearen PCR-Produkts am 3'-Ende des gewünschten ORF statt.

B.2.4.5 Analyse des Wachstums von *S. cerevisiae*-Stämmen durch serielle Verdünnung

Zur Analyse des Wachstums verschiedener Stämme von *S. cerevisiae* wurden Zellen über Nacht in Flüssigkulturen angezogen. Aus diesen Kulturen wurden verschiedenen Verdünnungen in Mikrotiterplatten in folgenden Stufen angesetzt: 5000 Zellen pro µl, 1000 Zellen pro µl, 200 Zellen pro µl, 40 Zellen pro µl, 8 Zellen pro µl. Aus jeder Verdünnung wurde je 1µl auf die gewünschten Nährmedien aufgebracht. Die Anzucht erfolgte für 2-4 Tage unter den im jeweiligen Experiment angegebenen Bedingungen.

B.2.4.6 Herstellung des Hefestammes YMF9 mit integrierter, mutanter Version des DHFR-URA3-Konstrukts

Die Integration einer mutanten Version des DHFR-Ura3 Konstrukts (DU-C-ha) in den *URA3*-Lokus wurde mittels homologer Rekombination durchgeführt.

Durch eine *SacI/EcoRI*-Restriktion des Plasmids pJD526 wurde die 5' „untranslating region“ des *URA3*-Gens mit Kupfer-regulierbaren Promotor (5'-UTR-*URA3*-P_{CUP1}) isoliert.

Durch eine *EcoRI/XhoI*-Restriktion des Plasmids pJH10C wurde das *DHFR-URA3*-Konstrukt (*DHFR*(T39A, E173D)-*ha-URA3*) isoliert. Diese Fragmente wurden in den *SacI/XhoI*-geschnittenen Klonierungsvektor pBlueskriptSK⁺ inseriert und der *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert. Das gewonnene 5'-UTR-*URA3-P_{CUP1}-DHFR*(T39A, E173D)-*ha-URA3*-Fragment wurde mittels PCR (Oligonukleotide JD118 und JD383) amplifiziert. Für die Transformation mit dem amplifizierten Fragment wurde der Hefestamm JD59 (*MATa ump1Δ::HIS3*) verwendet, da dieser Stamm einen Defekt beim proteasomalen Proteinabbau aufweist. Nach erfolgter homologer Rekombination waren die transformierten Hefezellen auf Medium ohne Uracil lebensfähig, und konnten zusätzlich mittels PCR (Oligonukleotide MAF854 und JH357) auf das Vorhandensein der Integration am richtigen Genlokus verifiziert werden. Der auf diese Weise hergestellte Hefestamm YMF8 (*MATa ump1Δ::HIS3 ura3::P_{CUP1}-DHFR*(T39A, E173D)-*ha-URA3*) wurde anschließend mit dem Wildtypstamm JD53:pRS315 (*MATα, LEU2-markiert*) gekreuzt und die diploiden Zellen auf Sporulationsmedium 5 Tage lang inkubiert. Nach der Zerlegung der Tetraden wurden die Sporen einer Tetrade auf Medium ohne Uracil ausgestrichen. Mittels PCR (Oligonukleotide MAF854 und JH357) wurden die Uracil-auxotrophen Sporen auf das Vorhandensein der Integration am richtigen Genlokus verifiziert. Dadurch konnte der Wildtypstamm YMF9 (*MATa ura3::P_{CUP1}-DHFR*(T39A, E173D)-*ha-URA3*) mit integrierter Version des mutierten *DHFR^{mutC}-URA3*-Konstrukts im *URA3*-Lokus generiert werden.

B.2.4.7 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von DHFR-GFP-exprimierenden Zellen

Das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* ist zur Beobachtung in lebenden Zellen sehr gut geeignet, da blaues Licht das GFP zur Abstrahlung einer grünen Fluoreszenz anregt, ohne dass weitere Behandlung erforderlich ist. Fusionsproteine aus den DHFR-Varianten mit GFP wurden in Wildtyp und verschiedenen Mutanten gebildet und im Fluoreszenzmikroskop (Axioplan2, Zeiss) betrachtet. Zur Anregung der Fluoreszenz wurden die Zellen mit Licht der Wellenlänge 480nm bestrahlt, wodurch das GFP Licht der Wellenlänge 510nm emittierte. Die Dokumentation der Zellen erfolgte bei 100facher Vergrößerung mit einer Quantix-Kamera (Photometrix), die nachfolgende Bearbeitung mit Hilfe des Metamorph 4.5 -Programms.

B.2.4.8 Anlage von Dauerkulturen von *E. coli* und *S. cerevisiae*

Zur längerfristigen Lagerung wurden Flüssigkulturen von Hefe- und Bakterienstämmen mit sterilem 75%igem Glycerin auf eine Endkonzentration von 25% Glycerin eingestellt und bei -80°C tiefgefroren. In diesem Zustand sind Kulturen für mehrere Jahre haltbar und können durch Ausstreichen auf entsprechende Medien (LB bzw. YPD) reanimiert werden.

C Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden genetische und biochemische Untersuchungen zum Abbau faltungsdefekter Proteine in *S. cerevisiae* vorgenommen. Proteine, die keine korrekt gefaltete Struktur einnehmen können, werden erkannt und zu Aminosäuren abgebaut. Alle Komponenten der Zelle, die die Faltung der Proteine in die native Konformation vermitteln, Aggregationsprozesse verhindern oder am Abbau beteiligt sind, werden als Protein-Qualitätskontrollsystem bezeichnet. Dazu zählen vor allem die molekularen Chaperone und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Der Mechanismus der Erkennung von faltungsdefekten Proteinen und der Übertragung zum 26S-Proteasom ist jedoch noch weitgehend unbekannt (siehe Einleitung). Weitgehend unerforscht ist vor allem die Rolle der molekularen Chaperone und deren Zusammenarbeit mit dem UPS in der Beseitigung von falsch gefalteten Proteinen in der Zelle.

C.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle

Ein kürzlich publizierter Artikel weist darauf hin, dass der Abbau mancher faltungsdefekter Proteine Ubiquitin-unabhängig durch das 26S-Proteasom erfolgen kann (Liu *et al.*, 2003). Die meisten Substratproteine werden jedoch ubiquityliert bevor sie durch das 26S-Proteasom abgebaut werden können. Wahrscheinlich folgt auch die Mehrzahl der faltungsdefekten Proteine diesem Mechanismus und wird für den Abbau mit dem Polypeptid Ubiquitin markiert. Die spezifische Erkennung wird durch die Aktivitäten der Ubiquitin-konjugierenden Proteine (E2-Enzyme) und der Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme) bewerkstelligt. Diese Enzyme müssen entweder selbst oder über geeignete Adapterproteine zwischen einer nicht-nativen Konformation und dem nativen Zustand eines Proteins unterscheiden zu können. Wahrscheinlich dienen die hydrophoben Sequenzen, die in faltungsdefekten Proteinen an der Oberfläche exponiert sind und in nativem Zustand maskiert sind, als Bindungsstellen für die E2/E3-Proteine.

C.1.1 Modellsubstrate zur Untersuchung zellulärer Protein-Qualitätskontrollsysteme

Ausgangspunkt für die Untersuchung des Protein-Qualitätskontrollsystems in *S. cerevisiae* war die Generierung von faltungsdefekten Modellkonstrukten, die keine native Struktur

einnehmen können. Als Modellsubstrat wurde die Dihydrofolatreduktase (DHFR) der Maus ausgewählt, ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Das DHFR-Gen wurde mit dem *URA3*-Gen der Hefe im selben Leserahmen fusioniert (J. Höckendorf und R.J. Dohmen, unveröffentlichtes Resultat). Mittels zufälliger PCR-Mutagenese (engl. *random PCR mutagenesis*) wurden in diesem Konstrukt Mutationen eingeführt und die PCR-Produkte durch *In-vivo*-Rekombination in Plasmide (pRS315, *CEN/LEU2*) inseriert. Es sollten solche Mutationen identifiziert werden, die die Struktur der DHFR-Domäne destabilisieren und dadurch zur Proteolyse des Fusionsproteins in *S. cerevisiae*-Zellen führen. Das Ura3-Protein (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase) wird für die Uracil-Biosynthese in der Hefe *S. cerevisiae* benötigt und soll in dem Modellsubstrat als Reportermodul dienen. Sowohl die An- als auch die Abwesenheit des Ura3-Proteins führt zu einem detektierbaren Phänotyp. Durch phänotypische Analyse der Transformanten konnten mutierte DHFR-Ura3-Fusionsproteine identifiziert werden, die dem proteasomalen Abbau unterlagen.

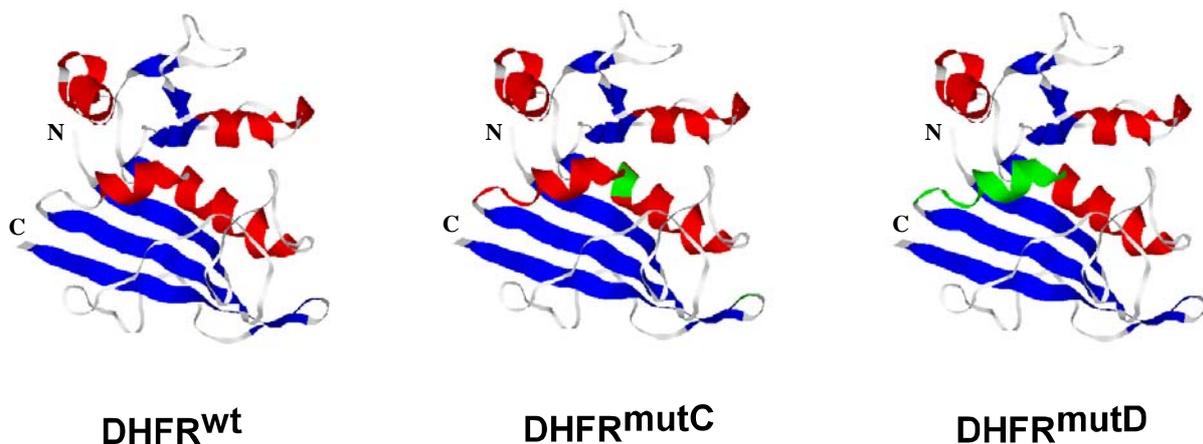


Abb.3: Struktur der menschlichen DHFR-Domäne.

Die Sequenz der menschlichen DHFR ist mit der in dieser Arbeit verwendeten DHFR der Maus zu 90% identisch. Das DHFR-Protein besteht aus sechs α -Helix- (rot) und acht β -Faltblatt- Strukturen (blau). Die in DHFR^{mutC} durch Punktmutationen veränderten Aminosäurereste (T39A in der α -Helix und E173D in der β -Faltblatt- Struktur), sowie die in DHFR^{mutD} deletierte α -Helix sind als Grün markierte Bereiche in den Strukturen angedeutet. Die Strukturen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Ras-Mol erstellt.

Eine der entstandenen mutierten Version des DHFR-Proteins wurde als DHFR^{mutC} bezeichnet (Abb. 3) und enthielt Punktmutationen die zur Veränderung von zwei Aminosäureresten führten, eine in der α -Helix (T39A) und eine in der β -Faltblattstruktur (E173D). Eine weitere mutierte Version des DHFR-Proteins wurde in dieser Arbeit generiert und als DHFR^{mutD} bezeichnet. DHFR^{mutD} entstand durch eine Assemblierungs-PCR (engl. *assembly PCR*) in der gezielt eine komplette α -Helix (Aminosäurerest 116 bis 128)

deletiert wurde (Abb. 3). Die Deletion einer kompletten α -Helix führt wahrscheinlich zur gravierenden Veränderung der nativen Konformation.

Neben der DHFR^{mutC} und der Wildtyp-Version DHFR^{wt} wurde auch DHFR^{mutD} mit dem *URA3*-Gen der Hefe fusioniert. Für die entstandenen Modellsubstrate wurden die Abkürzungen DU-wt-ha, DU-C-ha sowie DU-D-ha verwendet. Die Modellsubstrate enthalten zwischen der DHFR- und der Ura3-Domäne zusätzlich ein Hämagglutinin (ha)-Epitop des Influenzavirus, für die immunologische Detektion der Fusionsproteine (Abb. 4A).

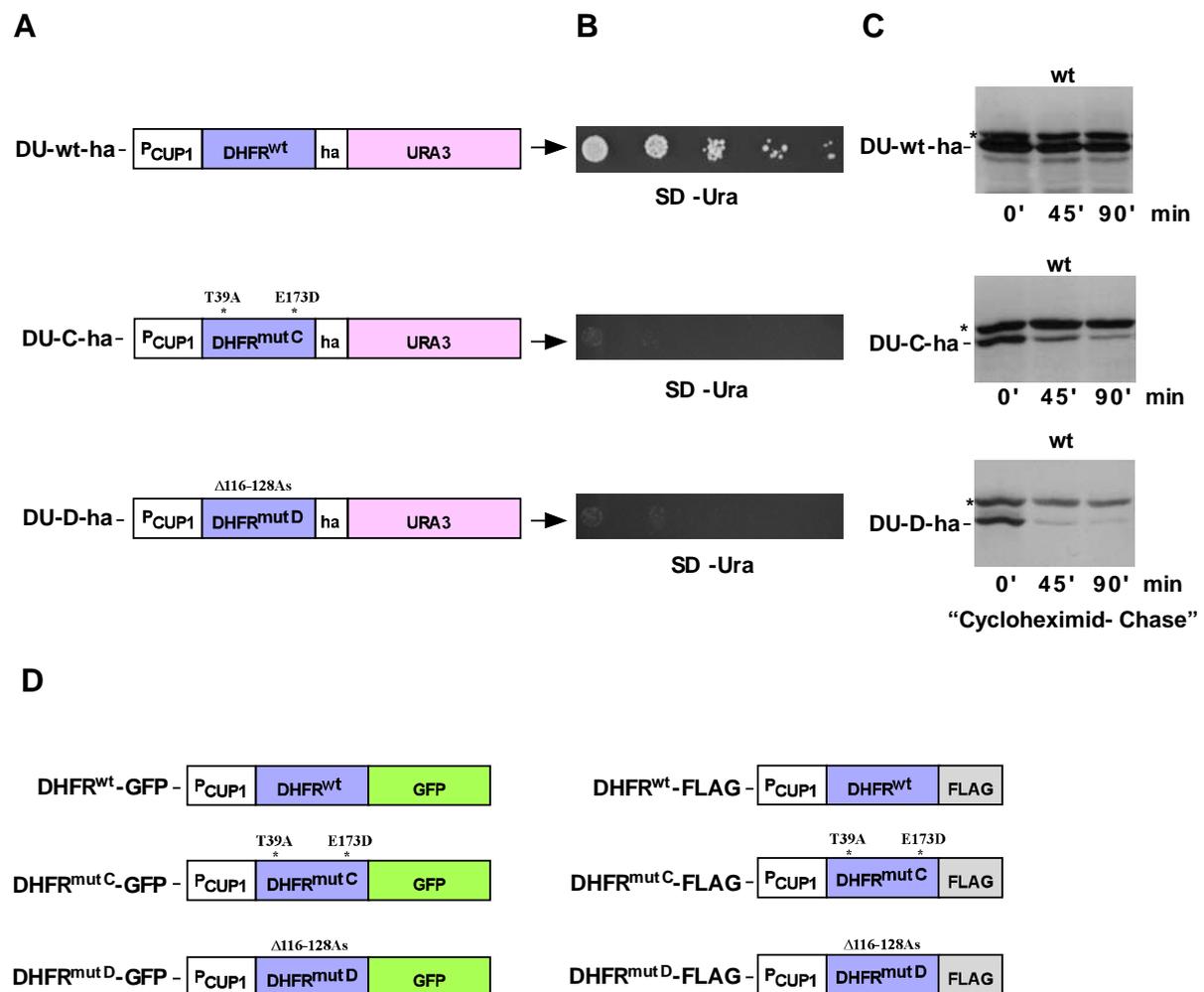


Abb.4: In dieser Arbeit verwendete künstliche Proteolyse-Testsubstrate.

(A) Die native (wt) und die mutierten Versionen des *DHFR*-Gens (C und D) sind mit dem *URA3*-Gen fusioniert, worauf sich die Abkürzungen DU-wt-ha, DU-C-ha und DU-D-ha beziehen. Das ha-Peptid wurde für die immunologische Detektion der Testsubstrate verwendet. Die entstandenen Modellkonstrukte wurden unter Kontrolle eines Kupfer induzierbaren Promotors (P_{CUP1}) exprimiert. (B) Zellen des Stammes JD47-13C (wt) wurden mit den Plasmiden pJH10 (*DU-wt-ha*), pJH10C (*DU-C-ha*) und pMAF30D (*DU-D-ha*) transformiert. Zellen aus Übernachtskultur wurden in geeigneten Verdünnungen auf SD-Agar aufgetropft und 3 Tage bei 30°C inkubiert. (C) Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Transformanten (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. (D) Alle *DHFR*-GFP bzw. *DHFR*-FLAG-Versionen entstanden durch Austausch des *URA3*-Gens mit der für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) bzw. für das FLAG-Epitop kodierenden Sequenz.

Die Mutationen in der DHFR-Domäne sollten sich auf die Stabilität der Fusionsproteine auswirken und zu deren Abbau führen. Durch die Anwesenheit des Reportermoduls (Ura3) in den Modellsubstraten konnten phänotypische Analysen unternommen werden. Dazu wurde ein Wildtyp-Hefestamm (JD47-13C) mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und anschließend auf Minimalmedium ohne Uracil aufgetropft. Die Wachstumsanalyse in der Abb. 4B zeigt, dass Wildtyp-Zellen, die das native DHFR-Ura3 (DU-wt-ha) enthalten, Uracil-prototroph sind. Im Gegensatz dazu weisen Zellen, die die mutierte Version DU-C-ha oder DU-D-ha enthalten, auf Medium ohne Uracil deutliche Wachstumsdefekte auf.

Um die Befunde aus der phänotypischen Analyse der Transformanden zu bestätigen, wurde die Halbwertszeit der Fusionsproteine in einem „Cycloheximid-Chase“-Experiment mit anschließendem Immunoblot verfolgt. Cycloheximid blockiert die Ribosomenassemblierung an der mRNA, inhibiert dadurch die Proteintranslation und kann für die Analyse der Halbwertszeit der Proteine verwendet werden. Nach Zugabe von Cycloheximid zu einer exponentiell wachsenden Kultur der entsprechenden Transformanden, wurden zu angegebenen Zeiten Proben entnommen, Proteinextrakte hergestellt und die Stabilität der mit ha-Epitop-markierten DHFR-Ura3-Proteine in einem Immunoblot verfolgt. Die Abb. 4C zeigt, dass die DU-wt-ha-Version in Wildtyp-Zellen stabil ist, während die beiden mutierten Fusionsproteine DU-C-ha und DU-D-ha rasch abgebaut werden. Diese Resultate korrelieren mit den phänotypischen Untersuchungen dieser Transformanden bezüglich der Wachstumsfähigkeit auf Medium ohne Uracil. Die effiziente Proteolyse der Substrate ist für die Uracil-Auxotrophie der DU-C-ha und DU-D-ha enthaltenden Zellen verantwortlich.

Neben den DHFR-Ura3-Fusionsproteinen wurden in dieser Arbeit DHFR-GFP- und DHFR-FLAG-Modellsubstrate generiert und verwendet. Das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) kann für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisierung der mutierten DHFR-Proteine in einer Zelle verwendet werden und das FLAG-Epitop zur Coimmunpräzipitation der DHFR-Proteine mit Komponenten des Qualitätskontroll-Systems (Abb. 4D).

C.1.2 Mutierte DHFR-Proteine werden durch die E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 ubiquityliert und durch das Proteasom abgebaut

Nachdem die reduzierte Stabilität der mutierten Fusionsproteine in Wildtyp-Zellen durch phänotypische und biochemische Analysen gezeigt werden konnte, sollte die Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) an der Proteolyse dieser Testsubstrate untersucht werden.

Zunächst wurde die Beteiligung des Proteasoms am Abbau der mutierten Modellsubstrate verifiziert. Dazu wurde ein *ump1*-Deletionsstamm (JD59) mit dem für das DU-D-ha kodierenden Plasmid transformiert und anschließend auf Minimalmedium ohne Uracil aufgetropft. Das Ump1-Protein besitzt eine wichtige Funktion bei der Assemblierung des Proteasoms und der autokatalytischen Prozessierung der aktiven β -Untereinheiten (Ramos *et al.*, 1998). Zellen, denen das *UMPI*-Gen fehlt, weisen einen Defekt in der Proteolyse der Proteine und daher im Wachstum auf. Dennoch wachsen *ump1*-Transformanten auf Medium ohne Uracil deutlich besser als Wildtyp (Abb. 5A).

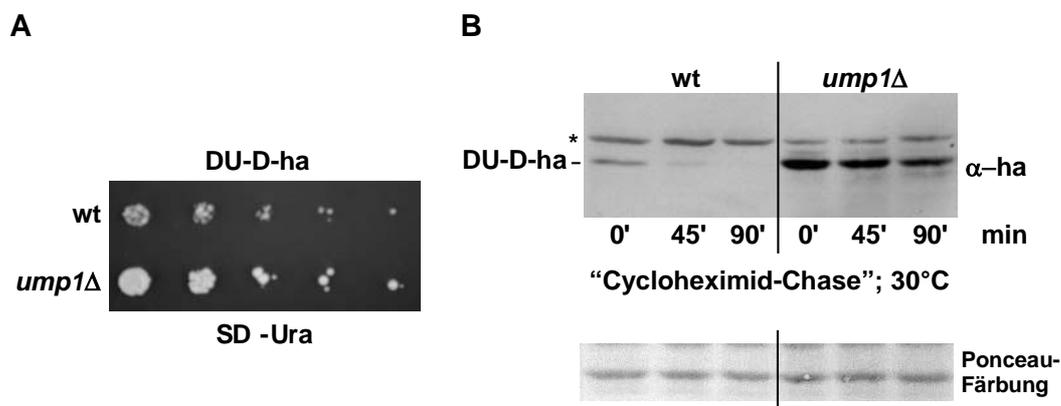


Abb. 5: Ein funktionelles Proteasom ist für den Abbau mutierte DHFR-Ura3-Proteine erforderlich.

(A) Die Stämme JD47-13C (wt) und JD59 (*ump1*Δ) wurden mit dem Plasmid pMAF30D (*DU-D-ha*) transformiert. Zellen aus einer Übernachtskultur wurden in geeigneten Verdünnungen auf SD-Agar aufgetropft und 3 Tage bei 30°C inkubiert. (B) Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung dient als Kontrolle der Proteinkonzentration.

Außer der phänotypischen Analyse zur Beteiligung des Proteasoms an der Proteolyse des Modellsubstrats, konnte in einem Immunoblot gezeigt werden, dass der Abbau von DU-D-ha in dem *ump1*-Deletionsstamm stark beeinträchtigt ist (Abb. 5B).

Bis auf wenige Ausnahmen werden Substrate durch Polyubiquitylierung für den Abbau markiert (Rosenberg-Hasson *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1992; Jariel-Encontre *et al.*, 1995). Da die mutierten DHFR-Ura3-Fusionsproteine offensichtlich durch das Proteasom abgebaut werden, sollte untersucht werden, ob das Ubiquitin-System daran beteiligt ist.

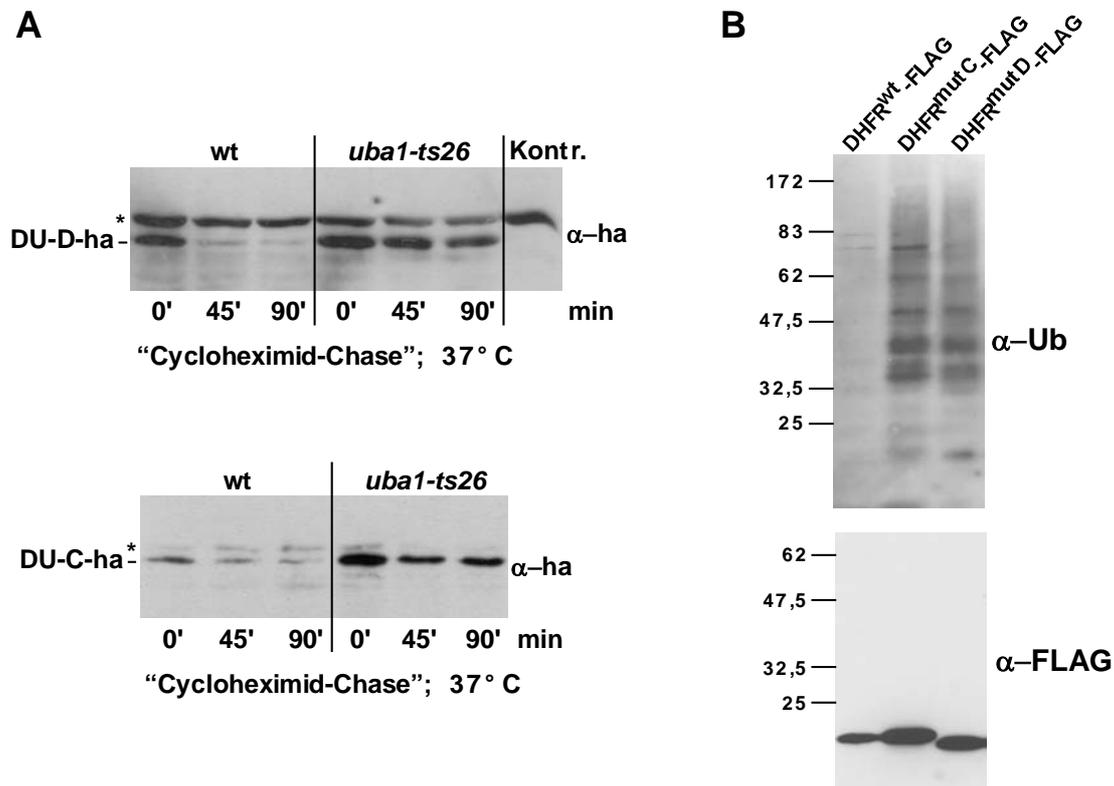


Abb. 6: Die mutierten DHFR-Modellsubstrate werden für den Abbau durch das Proteasom ubiquityliert.

(A) Wildtyp (JD47-13C) und *uba1-ts26* (JD77-1-1)-Zellen wurden mit *DU-C-ha* (pJH23C) und *DU-D-ha* (pMAF32D) kodierenden Plasmiden transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden 20 Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ auf die für den *uba1-ts26*-Hefestamm restriktive Temperatur von 37°C gesetzt. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. (B) Kulturen der Wildtyp-Zellen, transformiert mit den Plasmiden pMAF61 (*DHFR^{wt}-FLAG*), pMAF76C (*DHFR^{mutC}-FLAG*) und pMAF61D (*DHFR^{mutD}-FLAG*) wurden bei 30°C angezogen. Die Expression der mutierten *DHFR*-Versionen wurde durch Zugabe von 100µM Kupfersulfat induziert. Die Zellen wurden durch 3 minütiges Kochen aufgeschlossen und die Proteinextrakte zur Präzipitation der *DHFR-FLAG*-Proteine mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Ubiquitinkonjugate in einem Anti-Ubiquitin-Immunoblot detektiert. Anschließend wurde die Membran 50 Minuten in 0,2M NaOH inkubiert, um den Anti-Ub-Antikörper abzulösen, und danach mit einem Anti-FLAG-Antikörper hybridisiert.

In Anwesenheit von ATP wird das Ubiquitin durch eine nacheinander folgende Reaktion von E1, E2 und E3-Enzymen auf Proteinsubstrate übertragen, wodurch diese für den Abbau durch das Proteasom markiert werden (siehe Einleitung). In der Hefe *S. cerevisiae*

wird das E1-Enzym vom *UBA1*-Gen kodiert, deren Aktivität für das Überleben der Zellen essentiell ist.

Um die Beteiligung des *UBA1*-Gens in der Proteolyse falsch gefalteter DHFR-Ura3-Substrate zu untersuchen, wurde der *uba1-ts26*-Hefestamm eingesetzt, der eine temperatursensitive Variante des Uba1-Proteins enthält. In einem „Cycloheximid-Chase“ und anschließender Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Abbau beider mutierter Modellsubstrate DU-C-ha und DU-D-ha in den *uba1-ts26*-Zellen stark beeinträchtigt ist (Abb. 6A). Dies deutet darauf hin, dass für die effiziente Proteolyse der mutierten Fusionsproteine die Aktivität des Uba1-Proteins und damit die Ubiquitylierung notwendig ist.

Die Resultate suggerieren, dass die faltungsdefekten Versionen des DHFR-Proteins ubiquityliert und dadurch für den Abbau durch das Proteasom markiert werden. Um die Ubiquitylierung der Modellsubstrate direkt nachzuweisen, wurden die in der Abb. 4D vorgestellten *DHFR-FLAG*-Konstrukte verwendet und in Wildtyp-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden in einem Selektivmedium bei 30°C angezogen, Proteinextrakte hergestellt und diese mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die mit einem FLAG-Epitop fusionierten DHFR-Proteine wurden nach der Immunpräzipitation in einem Immunoblot detektiert. Die Detektion der Ubiquitinkonjugate erfolgte durch einen Anti-Ubiquitin-Antikörper. Wie der Abb. 6B zu entnehmen ist, konnte eine deutliche Bildung von Ubiquitinketten nur an den beiden mutierten Versionen $\text{DHFR}^{\text{mutC}}\text{-FLAG}$ und $\text{DHFR}^{\text{mutD}}\text{-FLAG}$ detektiert werden. Hingegen konnten keine Ubiquitin-Konjugate des wildtypischen DHFR detektiert werden. Dieses Resultat zeigt, dass die faltungsdefekte DHFR-Domäne durch die Komponenten des Ubiquitin-Systems erkannt wird, was zu einer raschen Proteolyse der Modellsubstrate durch das 26S-Proteasom führt.

Nachdem die Ubiquitylierung der faltungsdefekten DHFR-Modellsubstrate verifiziert worden war, stellte sich die Frage welche der 11 verschiedenen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2-Enzyme) in *S. cerevisiae* diese Reaktion vermitteln. Besonderes Interesse galt den Enzymen Ubc4 und Ubc5, da deren Beteiligung an der Proteolyse cytosolischer, kurzlebiger und faltungsdefekter Proteine beobachtet werden konnte (Seufert *et al.*, 1990), und den Enzymen Ubc6 und Ubc7, die für die Proteolyse faltungsdefekter Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich sind (Sommer *et al.*, 1997; Bonifacino *et al.*, 1998; Plemper *et al.*, 1999). Um die an der Proteolyse der falsch gefalteten Modellsubstrate beteiligten Enzyme zu identifizieren, wurde die Stabilität des mutierten

DU-D-ha-Fusionproteins in Zellen untersucht, in denen die Gene *ubc4* und *ubc5*; *ubc6* und *ubc7* oder alle vier *ubc4-7* deletiert wurden (Abb. 7).

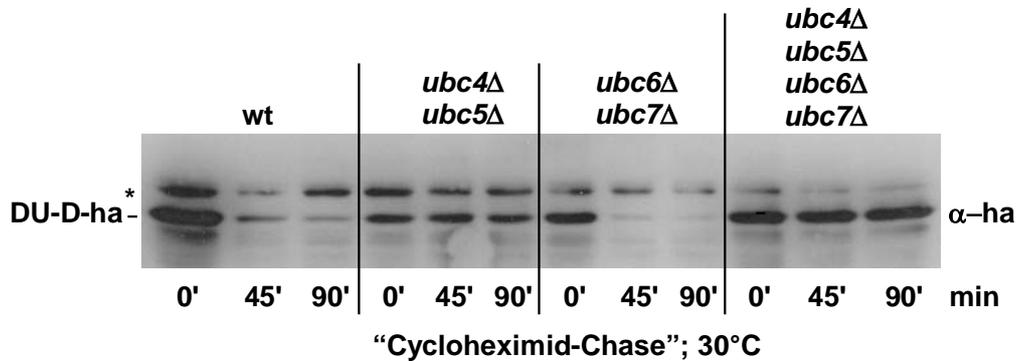


Abb. 7: Die mutierten DHFR-Modellsubstrate werden in *ubc4*Δ *ubc5*Δ-Zellen nicht abgebaut.

Der Wildtypstamm (JD47-13C), und die Hefestämme *ubc4*Δ *ubc5*Δ, *ubc6*Δ *ubc7*Δ und *ubc4*Δ *ubc5*Δ *ubc6*Δ *ubc7*Δ wurden mit dem *DU-D-ha* kodierenden Plasmid pMAF32D transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Abb. 7 zeigt, dass für die effiziente Proteolyse des faltungsdefekten DU-D-ha-Proteins die Aktivitäten des Ubc4- und Ubc5-Enzyms erforderlich ist, während die Funktion der Ubc6- und Ubc7-Enzyme, für dessen Abbau entbehrlich ist. Die Ubiquitin-konjugierende Enzyme Ubc4 und Ubc5 weisen eine hohe Homologie auf (92% identische Aminosäurereste). Beim Ausfall eines der beiden Proteine wird dessen Funktion durch das andere komplementiert (Seufert *et al.*, 1990). Aufgrund dessen konnte nur eine partielle Stabilisierung des Testsubstrats in Zellen beobachtet werden, denen entweder das *UBC4*- oder das *UBC5*-Gen fehlte (Daten nicht gezeigt).

C.1.3 Die Suche nach E3-Enzymen.

Die Ubiquitin-Protein-Ligasen oder E3-Enzyme übernehmen die wichtige Funktion der spezifischen Substraterkennung (Glickman *et al.*, 2002). In Säugerzellen konnten viele verschiedene E3-Enzyme identifiziert werden, die zusammen mit E2-Enzymen, die Ubiquitylierung bestimmter Proteinsubstrate vermitteln. Unbekannt ist jedoch, welche E3-Enzyme in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle beteiligt sind, und wie faltungsdefekte Proteine erkannt werden. Kürzlich konnte ein Protein in Säugerzellen identifiziert werden, das

an der Ubiquitylierung bestimmter mutierte Proteine beteiligt ist (Murata *et al.*, 2001). Dieses E3-Enzym wurde als CHIP (engl. *carboxy terminus of Hsp70-interacting protein*) bezeichnet, da für die Ubiquitylierung der Substrate die Interaktion des CHIP-Proteins mit den Hsp70 oder Hsp90 Chaperonen erforderlich ist (siehe Einleitung). Die Erkennung und Bindung des Substrats wird in diesem Prozess durch die molekularen Chaperone vermittelt. Es wird spekuliert, ob CHIP generell die Ubiquitylierung der faltungsdefekten Proteine vermittelt, oder ob mehrere E3-Enzyme am Abbau unterschiedlicher faltungsdefekter Proteine beteiligt sind (Meacham *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2001; Goldberg 2003) In der Hefe *S. cerevisiae* konnten bis jetzt jedoch keine CHIP-homologen Enzyme identifiziert werden.

Bis jetzt konnten, außer CHIP, keine weiteren E3-Enzyme gefunden werden, die in der Qualitätskontrolle mutanter cytosolischer Proteine beteiligt sind. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein genetisches Selektionsverfahren zur Identifizierung potentieller E3-Enzyme, aber auch anderer Komponenten des zytosolischen Protein-Qualitätskontrollsystems etabliert. Dieses „screening“-Verfahren basiert auf der Selektion von *S. cerevisiae*-Mutanten die das instabile DHFR-Ura3-Fusionsprotein (DU-C-ha) nicht effizient abbauen können. Die effiziente Proteolyse dieses Modellsubstrats in einem Wildtypstamm führt zur Uracil-Auxotrophie der Hefezellen (Abb. 4). Daher können Mutanten mit Defekten in der Proteolyse des Testsubstrats durch phänotypische Analyse auf Medium ohne Uracil identifiziert werden. Durch die Einführung einer Genbank in die mutanten Zellen kann anschließend das betroffene Gen identifiziert werden. Für das „screening“-Verfahren wurde ein Hefestamm (YMF9) mit chromosomal integrierter Version des mutierten *DU-C-ha*-Konstrukts generiert (siehe Material & Methoden), um Kopienzahlschwankungen zu vermeiden, die mit Plasmid-kodiertem *DU-C-ha*-Konstrukten auftreten können. Die Selektion der *S. cerevisiae*-Mutanten wurde dann durch eine Diplomstudentin (Christina Reufsteck) weitergeführt.

Die E3-Enzyme lassen sich, entsprechend einer charakteristischen Domäne (RING-Finger, HECT oder U-box-Domäne) in drei Klassen einteilen (siehe Einleitung). Neben dem „screening“-Verfahren wurde daher die Proteolyse des Modellsubstrats DU-D-ha in verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen untersucht, denen bestimmte RING-Finger-Domänen oder HECT-Domänen enthaltende Proteine fehlten. Auf diese Weise wurde gezielt nach einem potentiellen E3-Enzym gesucht, das in der Proteolyse faltungsdefekter Proteine beteiligt ist. Für diese Untersuchungen wurde die Kollektion der *S. cerevisiae* Deletionsstämme (Euroscarf, Frankfurt) verwendet. In der Abb. 8 sind einige der Deletionsstämme aufgeführt, in denen die Stabilisierung von DU-D-ha untersucht wurde.

Gene, die für RING-Finger-Domänen enthaltende Proteine kodieren	DU-D-ha „Cycloheximid-Chase“ 0' 60'	Gene, die für RING-Finger-Domänen enthaltende Proteine kodieren	DU-D-ha „Cycloheximid-Chase“ 0' 60'
YML068WΔ <i>itt1Δ</i>		YNL116WΔ <i>dma2Δ</i>	
YOL138CΔ		YPR093CΔ <i>asr1Δ</i>	
YDR266CΔ		YBR062CΔ	
YHR115CΔ <i>dma1Δ</i>		YKL034WΔ <i>tul1Δ</i>	
YLR427WΔ <i>mag2Δ</i>		YKR017CΔ	
YMR247CΔ		YOR191WΔ <i>ris1Δ</i>	
Gene, die für HECT-Domänen enthaltende Proteine kodieren	DU-D-ha „Cycloheximid-Chase“ 0' 45' 90'	Gene, die für HECT-Domänen enthaltende Proteine kodieren	DU-D-ha „Cycloheximid-Chase“ 0' 45' 90'
YER125W <i>rsp5-1ts</i>		YJR036CΔ <i>hul4Δ</i>	
YDR457WΔ <i>tom1Δ</i>		YGL141WΔ <i>hul5Δ</i>	
YKL010CΔ <i>ufd4Δ</i>			

Abb. 8: Untersuchungen zum Abbau von DU-D-ha in Abwesenheit bestimmter RING-Finger- oder HECT-Domänen-Proteine in *S. cerevisiae*.

Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme ($3 \times OD_{600}$) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert.

In keinem der aufgeführten Deletionsstämmen konnte jedoch eine Stabilisierung des mutanten Modellsubstrats festgestellt werden. Mittlerweile sind weitere RING-Finger enthaltende Proteine in der Hefe identifiziert worden. Die Beteiligung dieser Proteine am Abbau faltungsdefekter Proteine ist Gegenstand andauernder Untersuchungen.

Zusammenfassend, bleibt an dieser Stelle festzustellen, dass weder das phänotypische „screening“-Verfahren, noch die gezielten Untersuchungen der verschiedenen Deletionsstämmen, zu einer eindeutigen Identifizierung eines für den Abbau der untersuchten Modellsubstrate benötigten E3-Enzyms geführt haben.

C.2 Die molekularen Chaperone in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle

Die molekularen Chaperone bilden eine einzigartige Klasse von Proteinen, da sie in sehr vielen zellulären Prozessen eine essentielle Rolle spielen. Dazu gehören u.a. die Faltung der neusynthetisierten Polypeptide in die native Struktur, die Translokation von Proteinen durch Membranen, die Beteiligung an der Umordnung des Cytoskeletts und die Beteiligung an der Signaltransduktion (Hartl *et al.*, 2002). Die Rolle der molekularen Chaperone in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle besteht vor allem in der Verhinderung von Aggregationsprozessen durch die Abschirmung hydrophober Sequenzen, die in faltungsdefekten Proteinen exponiert sind, sowie in der Rückfaltung von aggregierten und falsch gefalteten Proteinen in ihre native Konformation. Neuere Untersuchungen deuten auf eine direkte Beteiligung der Chaperone in der selektiven Proteolyse faltungsdefekter Proteine (Hohfeld *et al.*, 2001; Cyr *et al.*, 2002). Die Indizien dafür stammen vor allem aus Studien mit Substraten die dem ER-assoziierten Abbau (ERAD) unterliegen, oder aus Untersuchungen die in einem *in vitro* System durchgeführt wurden. Im folgenden Kapitel wurde daher die Beteiligung molekularer Chaperone beim Abbau faltungsdefekter cytosolischer DHFR-Modellsubstrate *in vivo* untersucht.

C.2.1 Die Hsp70-Chaperone sind am Abbau mutierter DHFR-Proteine beteiligt.

Die Hsp70-Chaperone bestehen aus einer N-terminalen, 44 kDa großen ATPase-Domäne, einer 18 kDa großen Substratbindungsdomäne und einer 10 kDa großen, variablen Domäne am C-Terminus. Das Binden und Loslassen des Substrats wird durch ADP/ATP-Austausch kontrolliert und durch Hsp40-Cochaperone (z.B. DnaJ in *E. coli* oder Ydj1 in *S. cerevisiae*) und Nucleotidaustausch-Faktoren (NEF; z.B. GrpE in *E. coli* oder Fes1 in *S. cerevisiae*) reguliert. Im ATP-gebundenen Zustand werden Substrate von Hsp70-Chaperonen sehr schnell gebunden und wieder freigesetzt. In diesem Zustand ist die Substrataffinität sehr gering. Im ADP-gebundenen Zustand weisen Hsp70-Chaperone eine hohe Substrataffinität auf, Substratbindung und -dissoziation sind jedoch sehr langsam. Die ATP-Hydrolyse wird durch Hsp40-Cochaperone, welche ebenfalls das Substrat durch hydrophobe Wechselwirkungen binden können, stimuliert. Unter physiologischen Bedingungen wird die Substratdissoziation durch den ADP/ATP-Austausch kontrolliert, der durch Nucleotidaustausch-Faktoren stimuliert wird (Abb. 9).

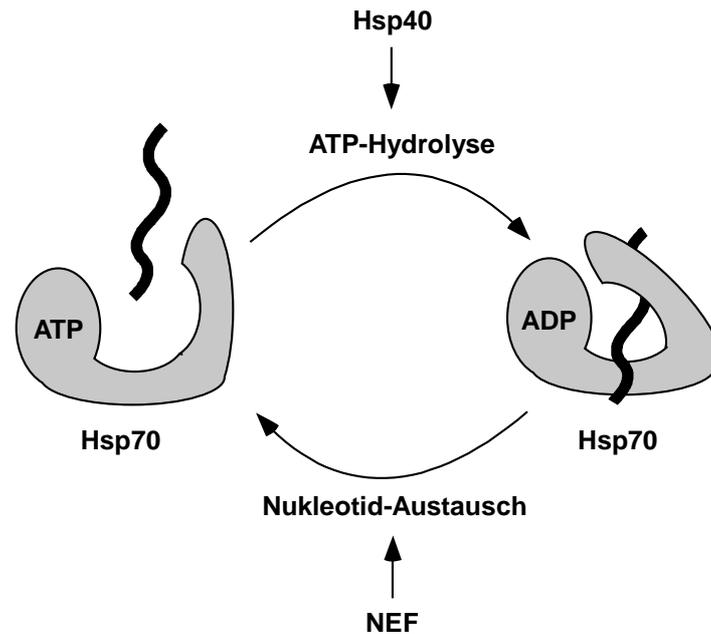


Abb. 9: Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von Hsp70.

Im ATP-Zustand erfolgt die Bindung und Dissoziation des Substrats (schwarz) mit hoher Geschwindigkeit. Im ADP-Zustand ist das Substrat in der Substratbindedomäne eingeschlossen und fest an Hsp70 gebunden. Der Übergang von der niedrigaffinen zur hochaffinen Konformation erfolgt durch ATP-Hydrolyse, die durch die Interaktion mit dem Substrat und dem Hsp40-Cochaperon ausgelöst wird. Der ADP/ATP-Austausch, der über die Dauer der Substratbindung entscheidet, wird durch einen Nukleotidaustausch-Faktor (NEF) reguliert.

Die im Cytosol der Hefe *S. cerevisiae* vorkommenden Hsp70-Chaperone können in vier Unterfamilien eingeteilt werden: Ssa, Ssb, Sse und Ssz. Die Ssa-Familie besteht aus vier Mitgliedern Ssa1-Ssa4. Die Expression von mindestens einem der Mitglieder ist essentiell für die Lebensfähigkeit der Zellen. Unter nicht-physiologischen Bedingungen (erhöhte Temperatur) kann die Expression des *SSA1*-Gens um das 10-fache stimuliert werden, während die Expression des *SSA2*-Gens konstant bleibt (Werner-Washburne *et al.*, 1987). Die Expression von *SSA3* und *SSA4* unter physiologischen Bedingungen ist sehr niedrig, kann jedoch bei erhöhten Temperaturen induziert werden (Werner-Washburne *et al.*, 1989). Im folgenden Unterkapitel wurde die Beteiligung dieser Familie am Abbau faltungsdefekter DHFR-Modellsubstrate untersucht. Der Einfluss der anderen genannten Familien in der Proteolyse falsch gefalteter Proteine wird in einem späteren Kapitel behandelt (siehe C.2.5).

Für die Untersuchung der Beteiligung von Ssa-Proteinen in der Proteolyse falsch gefalteter Proteine wurde ein Hefestamm (*ssa1-45*) verwendet, der eine temperatursensitive Variante des Ssa1-Proteins bildet und in dem die drei weiteren Gene *SSA2-SSA4* deletiert wurden (*ssa1-45 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ*). Wildtyp und *ssa1-45*-Zellen wurden zwanzig Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei der für den *ssa1-45*-Hefestamm restriktiven Temperatur

von 37°C inkubiert und der Abbau beider Modellsubstrate DU-C-ha und DU-D-ha anschließend im Western-Blot untersucht.

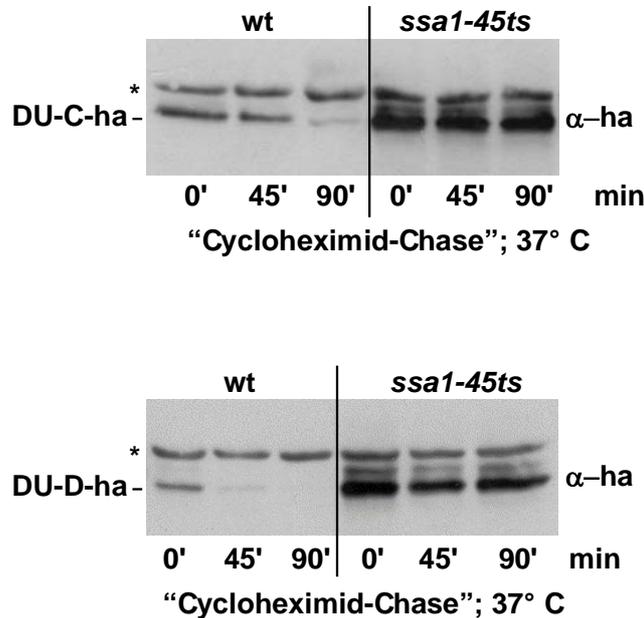


Abb. 10: Die Ssa-Familie der Hsp70-Chaperone ist für den Abbau der mutierten DHFR-Modellsubstrate erforderlich.

Wildtyp (JN54) und *ssa1-45*-Zellen (YMF15) wurden mit *DU-C-ha* (pJH23C) und *DU-D-ha* (pMAF32D) kodierenden Plasmiden transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden 20 Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei der für den *ssa1-45*-Hefestamm restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Abb. 10 zeigt, dass beide Substrate in den *ssa1-45*-Zellen stabilisiert sind, was auf eine Beteiligung dieser Familie der molekularen Chaperone in der Beseitigung mutierter cytosolischer Proteine hindeutet.

Wie oben beschrieben, wird die Expression der vier Ssa-Proteine unter permissiven und nicht-permissiven Bedingungen unterschiedlich reguliert. Dadurch stellte sich die Frage, ob alle vier oder nur bestimmte Vertreter der Ssa-Familie die Proteolyse mutanter Proteine vermitteln. Um die Beteiligung einzelner Ssa-Mitglieder am Abbau falsch gefalteter Proteine zu untersuchen wurde die Halbwertszeit des Modellproteins DU-D-ha in verschiedenen *ssa*-Deletionsstämmen untersucht (Abb. 11).

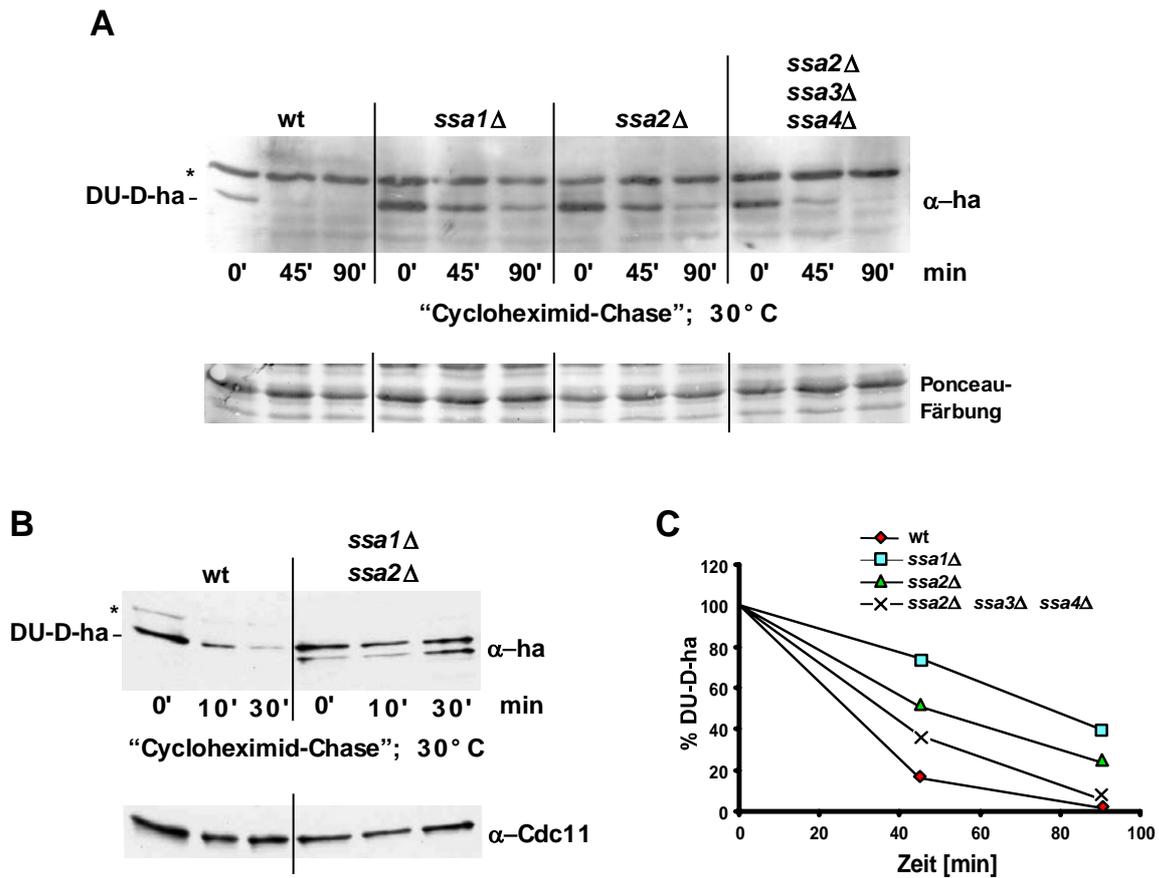


Abb. 11: Der Abbau des mutierten DHFR-Modellsubstrates ist in *ssa1Δ ssa2Δ*-Zellen beeinträchtigt.

(A) und (B) Der Wildtypstamm (JN54), sowie die Hefestämme *ssa1Δ* (YMF19), *ssa2Δ* (YMF20), *ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* (YMF14) und *ssa1Δ ssa2Δ* (MW123) wurden mit dem *DU-D-ha* kodierenden Plasmid (pMAF32D) transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme ($3 \times OD_{600}$) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung oder Cdc11 dient zur Kontrolle der Proteinkonzentration. (C) Quantifizierung der Signale zur Bestimmung der Abbaurates des Substrats in wt sowie in *ssa1Δ*, *ssa2Δ* und *ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ*-Zellen.

Die Deletion des *SSA1*- oder des *SSA2*-Gens führte zu einer partiellen Stabilisierung des mutanten Modellsubstrats. Der Ausfall von zwei weiteren Mitgliedern der Familie (*ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ*) führte nicht zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Substrats (Abb. 11A). Die Chaperone Ssa1 und Ssa2 weisen eine hohe Homologie auf (97% identische Aminosäurereste). Beim Ausfall eines der beiden Proteine wird dessen Funktion durch das andere komplementiert. Auf Grund dessen wurde der Abbau des Testsubstrats in dem Stamm *ssa1Δ ssa2Δ* untersucht. Während der „Cycloheximid-Chase“-Experimente konnte eine erhöhte Sensitivität der *ssa1Δ ssa2Δ*-Zellen gegen Cycloheximid beobachtet werden, woraufhin die Inkubationszeit der Wildtyp und *ssa1Δ ssa2Δ*-Zellen verkürzt wurde. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass der Abbau des Substrats DU-D-ha in dem Stamm

ssa1Δ ssa2Δ stark beeinträchtigt ist (Abb. 11B). Diese Resultate deuten darauf hin, dass für die effiziente Proteolyse mutanter Proteine die Aktivität beider Mitglieder (Ssa1 und Ssa2) der Ssa-Familie erforderlich ist.

Wie beschrieben sind die molekularen Chaperone an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Der Ausfall bestimmter Chaperone führt also zur Beeinträchtigung verschiedener zellulärer Mechanismen, unter Umständen auch zur Beeinträchtigung der generellen Proteolyse verschiedener Substrate. Da in dieser Arbeit die spezifische Auswirkung der Chaperone auf die Proteolyse falsch gefalteter Proteine studiert werden sollte, wurden zwei weitere Substrate als Kontrolle verwendet. Die Analyse des Abbaus dieser Substrate in den Stämmen mit eingeschränkter Chaperon-Funktion sollte überprüfen, ob diese Stämme generelle Proteolysedefekte aufweisen.

Die Fusionsproteine Ub-R-Ura3 (R=Arginin) und Ub_{V76}-Ura3 (Ub_{V76} = Austausch des letzten C-terminalen Glycinrestes im nativen Ubiquitin zu Valin) wurden als Testsubstrate für die biochemischen Analysen ausgewählt, da deren Abbau in *S. cerevisiae* genau studiert und gut charakterisiert ist. Das Fusionsprotein Ub-R-Ura3 wird über den „N-end rule“-Weg abgebaut. Dabei wird das Ubiquitin in Zellen kotranslational abgespalten, so dass deubiquityliertes R-Ura3 Protein entsteht. Die „N-end rule“ besagt, dass die metabolische Stabilität eines Proteins *in vivo* von der Identität des N-terminalen Aminosäurerestes abhängt (Bachmair *et al.*, 1986). Die Reste an der N-terminalen Position werden nach dieser Regel in stabilisierende und destabilisierende eingeteilt. So stellt zum Beispiel Methionin (M) einen stabilisierenden und Arginin (R) einen destabilisierenden Rest dar. Der destabilisierende N-terminale Aminosäurerest dient als Abbausignal des „N-end rule“-Wegs. Das R-Ura3-Substrat wird vom E2-Enzym Ubc2 und vom E3-Enzym Ubr1 erkannt, ubiquityliert und anschließend durch das Proteasom abgebaut. Das Fusionsprotein Ub_{V76}-Ura3 wird über den „UFD“-Weg („Ubiquitin fusion degradation“) abgebaut (Johnson *et al.*, 1995). In diesem Fall stellt das N-terminale Ubiquitin das Abbausignal dar, da es nicht abgespalten werden kann. Das Substrat wird vom E2-Enzym Ubc4 und vom E3-Enzym Ufd4 erkannt, ubiquityliert und anschließend durch das Proteasom abgebaut.

Wildtyp und die *ssa1Δ ssa2Δ*-Zellen wurden mit entsprechenden Plasmiden, die für die Testkonstrukte *Ub-R-URA3* und *Ub_{V76}-URA3* kodieren, transformiert und die Abbauraten der Substrate in einem „Cycloheximid-Chase“-Experiment und anschließendem Western-Blot analysiert (Abb. 12).

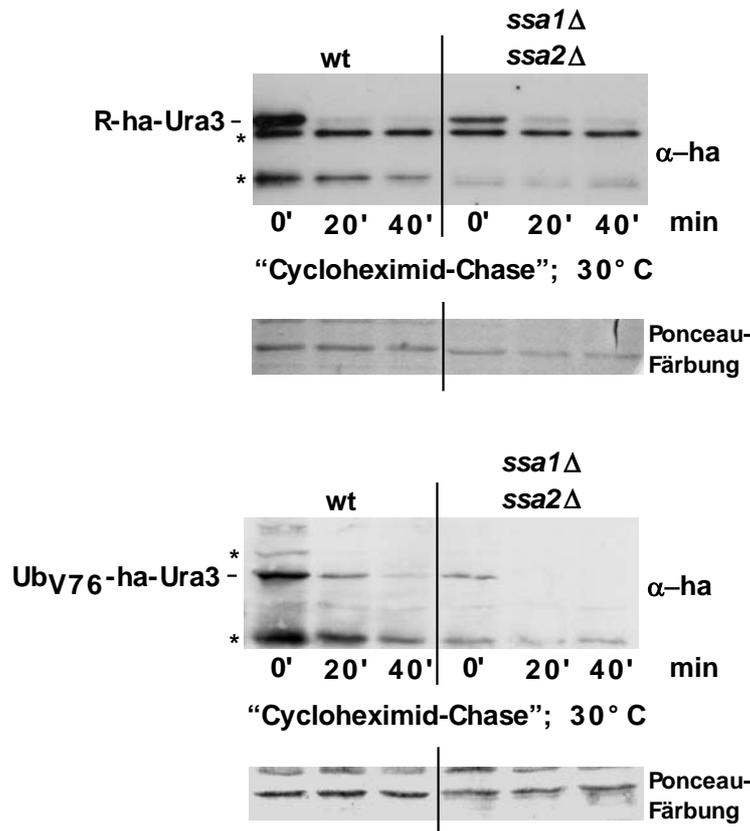


Abb. 12: Die Testsubstrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 werden in *ssa1Δ ssa2Δ*-Zellen effizient abgebaut.

Wildtyp (JN54) und *ssa1Δ ssa2Δ*-Zellen (MW123) wurden mit *Ub-R-URA3* (pBA3) und *Ub_{V76}-URA3* (pBA2VV) kodierenden Plasmiden transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung dient zur Kontrolle der Proteinkonzentration.

Es konnte keine Beeinträchtigung der Proteolyse der Substrate in den *ssa1Δ ssa2Δ*-Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz zum Modellsubstrat DU-D-ha wurde sowohl das „N-end rule“-Substrat R-Ura3 als auch das „UFD“-Substrat Ub_{V76}-Ura3 effizient abgebaut. Die Abwesenheit von Ssa1 und Ssa2 in der Zelle führt offensichtlich nicht zu einem allgemeinen Proteolysedefekt, sondern spezifisch zur Beeinträchtigung des Abbaus von faltungsdefekten Proteinen.

In einem Coimmunpräzitations-Experiment sollte untersucht werden, ob die Ssa-Chaperone, die am Abbau faltungsdefekter Modellsubstrate beteiligt sind, mit diesen physikalisch interagieren können. Dafür wurde in dem Wildtypstamm JD47-13C das chromosomale *SSA1*-Gen, mit einer für das dreifache ha-Epitop kodierenden Sequenz fusioniert, um das Ssa1-Protein mit dem kommerziell erhältlichen Anti-ha-Antikörper detektieren zu können. Das *SSA1*-Gen wird unter physikalischen Bedingungen stark exprimiert, was die Detektion nach erfolgter Präzipation erleichtern sollte. Dieser Hefestamm (YMF31) wurde mit für das *DHFR^{wt}-FLAG* bzw. *DHFR^{mutC}-FLAG* kodierenden Plasmiden transformiert. Für die Coimmunpräzitation wurden diese Konstrukte ausgewählt, um eine mögliche Bindung des Ssa1-Proteins an die Ura3-Domäne der DHFR-Ura3-Fusionsproteine zu vermeiden. Die Zellen wurden in Selektivmedium bei 30°C angezogen, die Proteinextrakte hergestellt und diese mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die DHFR-FLAG-Modellsubstrate wurden nach der Immunpräzitation im Western-Blot detektiert. Die Detektion des Ssa1-Proteins erfolgte durch einen Anti-ha-Antikörper (Abb. 13).

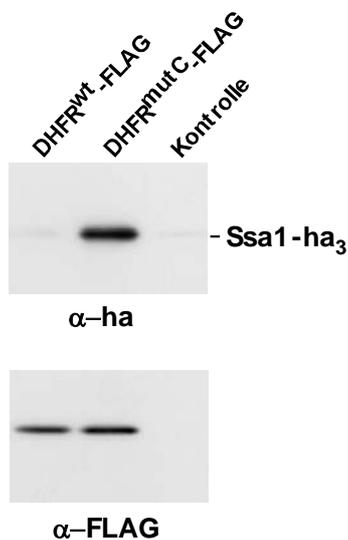


Abb. 13: Das Ssa1-Chaperon interagiert mit der mutierten DHFR^{mutC}-Version *in vivo*.

Die Zellen des YMF31-Hefestammes (*SSA1-ha₃*), wurden mit den Plasmiden pMAF57 (*DHFR^{wt}-FLAG*), pMAF57C (*DHFR^{mutC}-FLAG*) und pRS315 (leerer Vektor, Kontrolle) transformiert und bei 30°C angezogen. Die Expression von *DHFR^{mutC}-FLAG* wurde durch Zugabe von 100µM Kupfersulfat induziert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen und die Proteinextrakte zur Präzitation der DHFR-FLAG-Proteine mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die präzitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und das Ssa1-Protein in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Anschließend wurde die Membran 50 Minuten in 0,2M NaOH inkubiert, um den Ani-ha-Antikörper abzulösen und danach mit einem Anti-FLAG-Antikörper hybridisiert.

Die Abb. 13 zeigt, dass Ssa1 nur mit der faltungsdefekten Version DHFR^{mutC}-FLAG coimmunpräzitiert werden kann. Dagegen konnte keine Bindung des Chaperons an die nativ-gefaltete Version DHFR^{wt}-FLAG beobachtet werden. Es konnte eindeutig eine direkte physikalische Interaktion des Ssa1-Chaperons mit der faltungsdefekten Struktur des DHFR-Proteins detektiert werden. Die Assoziation der Chaperone mit faltungsdefekten Proteinen ist wahrscheinlich für deren Abbau in der Zelle erforderlich.

C.2.2 Faltungsdefekte DHFR-Modellsubstrate werden in *ydj1-151*-Zellen stabilisiert

Die Hsp40-Cochaperone kooperieren mit Hsp70-Chaperonen in verschiedenen zellulären Prozessen (siehe Einleitung). Durch die Interaktion wird die ATPase-Aktivität der Hsp70-Chaperone stimuliert, was zu einer erhöhten Substrataffinität der Chaperone im ADP-gebundenem Zustand führt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Hsp40-Cochaperone entfaltete Proteine binden können und diese dem Hsp70-System für die Faltung in die native Konformation zuliefern. Für die Hsp40-Vertreter in *S. cerevisiae*, Ydj1 und Sis1, konnte eine direkte Interaktion mit dem Ssa1-Chaperon der Hsp70-Familie in der Proteinfaltung gezeigt werden (Lu *et al.*, 1998). Da im vorangegangenen Kapitel die Beteiligung der Ssa-Familie am Abbau faltungsdefekter DHFR-Modellsubstrate sowie die Assoziation von Ssa1 mit der mutierten Version DHFR^{mutC} gezeigt werden konnte, sollte hier der Einfluss des Hsp40-Cochaperons Ydj1 in der Proteolyse der Testsubstrate untersucht werden.

Die Beteiligung von Ydj1 am Abbau falsch gefalteter Proteine wurde in Zellen analysiert, die eine temperatursensitive Variante des Ydj1-Proteins enthalten (*ydj1-151*). Wildtyp und *ydj1-151*-Zellen wurden zwanzig Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei der für den *ydj1-151*-Hefestamm restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert und der Abbau beider Modellsubstrate DU-C-ha und DU-D-ha anschließend im Western-Blot untersucht.

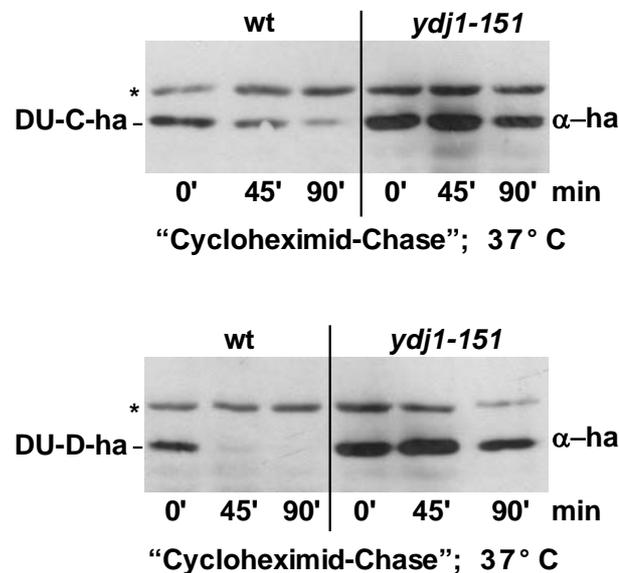


Abb. 14: Das Hsp40-Chaperon Ydj1 ist für den Abbau der DHFR-Modellsubstrate erforderlich.

Wildtyp (W303-1b) und *ydj1-151*-Zellen (ACY17b) wurden mit *DU-C-ha* (pJH23C) und *DU-D-ha* (pMAF32D) kodierenden Plasmiden transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden 20 Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei der für den *ydj1-151*-Hefestamm restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Abb. 14 zeigt, dass die Proteolyse beider Substrate in den temperatursensitiven *ydj1-151*-Zellen stark beeinträchtigt ist, was auf die Beteiligung dieses Cochaperons in der Beseitigung mutierter, cytosolischer Proteine hindeutet.

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob die fehlende Aktivität des Ydj1-Proteins bei 37°C den Abbau anderer Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems beeinflusst. Dafür wurde die Abbaurate der Testsubstrate R-Ura3 („N-end rule“-Abbauweg) und UbV76-Ura3 („UFD“-Abbauweg) in Wildtyp und *ydj1-151*-Zellen analysiert (Abb. 15).

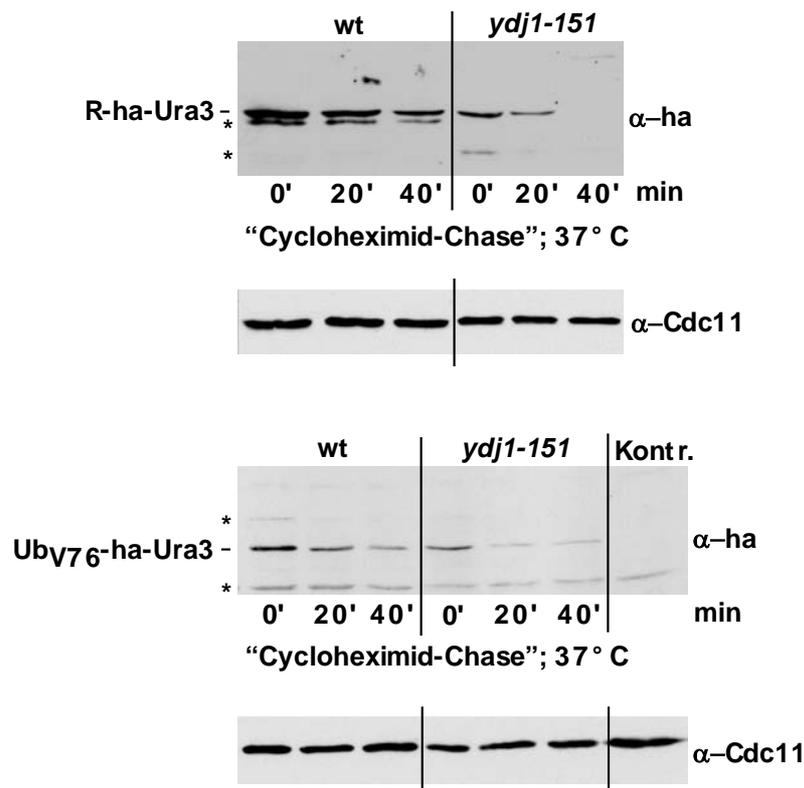


Abb. 15: Die Testsubstrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 werden in *ydj1-151*-Zellen effizient abgebaut.

Wildtyp (W303-1b) und *ydj1-151*-Zellen (ACY17b) wurden mit *Ub-R-URA3* (pBA3) und *Ub_{V76}-URA3* (pBA2VV) kodierenden Plasmiden transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden 20 Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei der für den *ydj1-151*-Hefestamm restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Detektion von Cdc11 diente zur Kontrolle der Proteinkonzentration.

Beide Substrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 wurden in den *ydj1-151*-Zellen effizient abgebaut. Die fehlende Aktivität des Ydj1-Proteins führt offensichtlich nicht zu einem allgemeinen Proteolysedefekt *in vivo*, sondern spezifisch zur Beeinträchtigung des Abbaus von faltungsdefekten Proteinen.

In einem Coimmunpräzitations-Experiment sollte untersucht werden, ob Ydj1 mit den faltungsdefekten Modellsubstraten physikalisch interagiert, wie es schon für das Ssa1-Chaperon gezeigt werden konnte. Dafür wurde in dem Wildtypstamm JD47-13C das chromosomale *YDJ1*-Gen mit einer für ein dreifaches ha-Epitop kodierenden Sequenz fusioniert. Dieser Hefestamm (YMF33) wurde mit für das *DHFR^{wt}-FLAG* und *DHFR^{mutC}-FLAG* kodierenden Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden in Selektivmedium bei 30°C angezogen, die Proteinextrakte hergestellt und diese mit dem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die DHFR-FLAG-Modellsubstrate wurden nach der Immunpräzitation im Western-Blot detektiert. Die Detektion des Ydj1-Proteins erfolgte durch einen Anti-ha-Antikörper.

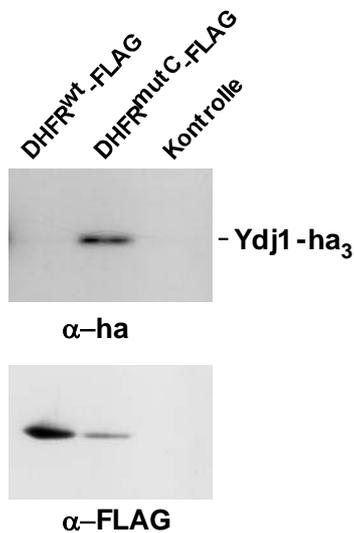


Abb. 16: Das Ydj1-Chaperon interagiert mit der mutierten DHFR^{mutC}-Version *in vivo*.

Die Zellen des YMF33-Hefestammes (*YDJ1-ha₃*), wurden mit den Plasmiden pMAF57 (*DHFR^{wt}-FLAG*), pMAF57C (*DHFR^{mutC}-FLAG*) und pRS315 (leerer Vektor, Kontrolle) transformiert und bei 30°C angezogen. Die Expression von DHFR^{mutC}-FLAG wurde durch Zugabe von 100µM Kupfersulfat induziert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen und die Proteinextrakte zur Präzitation der DHFR-FLAG-Proteine mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die präzitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und das Ydj1-Protein in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Anschließend wurde die Membran 50 Minuten in 0,2M NaOH inkubiert, um den Ani-ha-Antikörper abzulösen und danach mit einem Anti-FLAG-Antikörper hybridisiert.

Die Abb. 16 zeigt, dass Ydj1 nur mit der faltungsdefekten Version DHFR^{mutC}-FLAG coimmunpräzitiert werden kann. Dagegen konnte keine Bindung des Cochaperons mit der nativ-gefalteten Version DHFR^{wt}-FLAG beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass eine physikalische Interaktion des Hsp70-Chaperons Ssa1 und des Hsp40-Cochaperons Ydj1 mit der faltungsdefekten Struktur des DHFR-Proteins für deren effizienten Abbau erforderlich ist. Die Bindung des Ydj1-Proteins an DHFR kann allerdings über Ssa1 oder umgekehrt erfolgen, so dass eine direkte Assoziation der Chaperone mit dem Modellsubstrat nicht bewiesen werden kann.

C.2.3 Die Aktivität des „NEF“ Fes1 ist für die Proteolyse der DHFR-Modellsubstrate erforderlich

Unter physiologischen Bedingungen wird der ATPase-Zyklus der Hsp70-Chaperone durch Hsp40-Cochaperone und Nukleotidaustausch-Faktoren (NEF) reguliert (siehe Abb. 9). Die NEFs kontrollieren dabei den ADP/ATP-Austausch und stimulieren dadurch die Substratdissoziation von den entsprechenden Hsp70-Chaperonen. In *S. cerevisiae* konnte das Fes1-Protein als ein NEF identifiziert werden, das mit dem Hsp70-Chaperon Ssa1 interagieren kann und die Freisetzung von ADP katalysiert (Kabani *et al.*, 2002). Es ist immer noch unbekannt, in welchen zellulären Prozessen die Aktivität des Fes1-Proteins benötigt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Fes1 im Gegensatz zu Ssa1, keine signifikante Rolle in der Proteintranslokation durch Membranen, ERAD oder in der Proteinfaltung spielt. Zusätzlich konnte eine antagonistische Funktion des Fes1-Proteins zum Ydj1-Chaperon beobachtet werden (Kabani *et al.*, 2002). Im Hinblick auf die detektierbare Assoziation des Ssa1- und des Ydj1-Proteins mit mutierten DHFR-Substraten wurde in diesem Kapitel die Funktion des Fes1-Proteins im Abbau faltungsdefekter, cytosolischer Proteine analysiert.

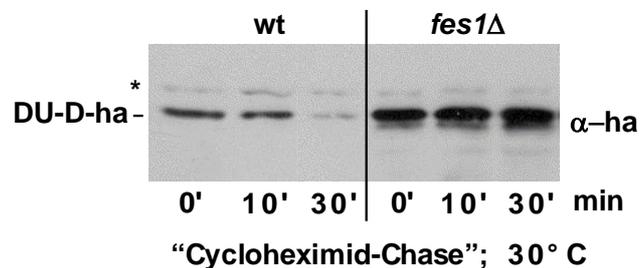


Abb. 17: Der Abbau des DU-D-ha-Modellsubstrates ist in *fes1Δ*-Zellen beeinträchtigt.

Der Wildtypstamm (JN54) und *fes1*-Deletionsstamm (YMF46) wurden mit dem *DU-D-ha* kodierenden Plasmid (pMAF32D) transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Abb. 17 zeigt, dass die Proteolyse des Modellsubstrats DU-D-ha im *fes1*-Deletionsstamm stark beeinträchtigt ist. Im Gegensatz zum Abbau von ERAD-Substraten in dem offensichtlich die Aktivität des Nukleotidaustausch-Faktors Fes1 nicht benötigt wird, ist die Funktion von Fes1 im Abbau cytosolischer, faltungsdefekter Proteine essentiell.

Analog zu vorangegangenen Untersuchungen mit den *ssa1Δ ssa2Δ* und *ydj1-151*-Zellen sollte überprüft werden, ob die fehlende Aktivität des Fes1-Proteins den

Abbau anderer Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems beeinflusst. Dafür wurde der Abbau der Testsubstrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 in Wildtyp und *fes1Δ*-Zellen analysiert (Abb. 18).

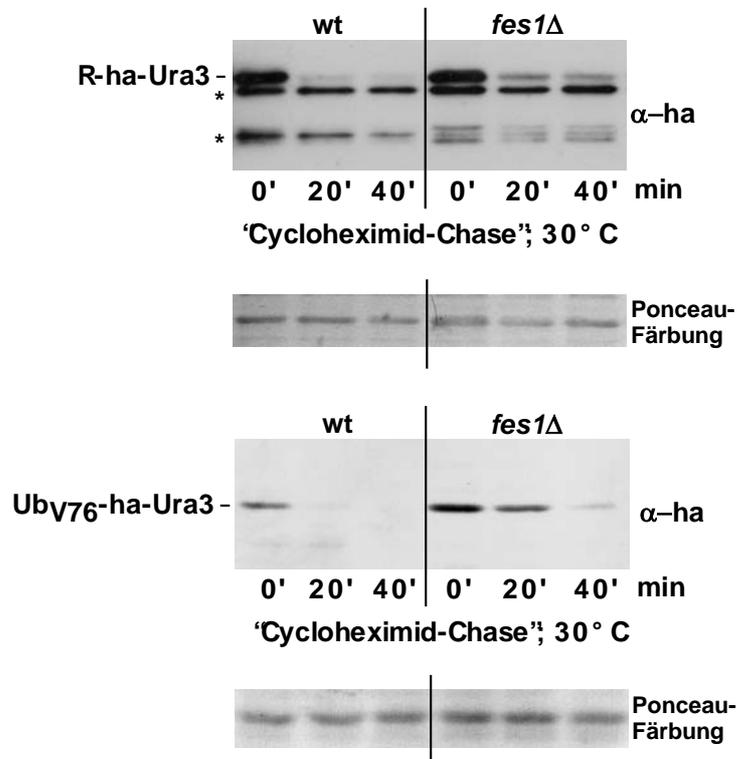


Abb. 18: Die Testsubstrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 werden in *fes1Δ*-Zellen effizient abgebaut

Wildtyp (JN54) und *fes1Δ*-Zellen (YMF46) wurden mit *Ub-R-URA3* (pBA3) und *Ub_{V76}-URA3* (pBA2VV) kodierenden Plasmiden transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung dient zur Kontrolle der Proteinkonzentration.

Beide Substrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 wurden in *fes1Δ*-Zellen abgebaut. Analog zu Untersuchungen in *ssa1Δ ssa2Δ* und *ydj1-151*-Zellen wirkt sich die fehlende Aktivität von Fes1 nicht auf den allgemeinen Proteinabbau aus, sondern auf die effiziente Proteolyse von faltungsdefekten Proteinen.

Entsprechend der Coimmunpräzipitations-Experimente mit Ssa1 und Ydj1 sollte auch für Fes1 untersucht werden ob eine physikalische Interaktion mit den faltungsdefekten Modellsubstraten detektiert werden kann. Dafür wurde in dem Wildtypstamm JD47-13C das chromosomale *FES1*-Gen, mit einer für ein dreifaches ha-Epitop kodierenden Sequenz fusioniert und dieser Hefestamm (YMF36) analog der Experimente mit Ssa1 und Ydj1 für die Coimmunpräzipitation verwendet.

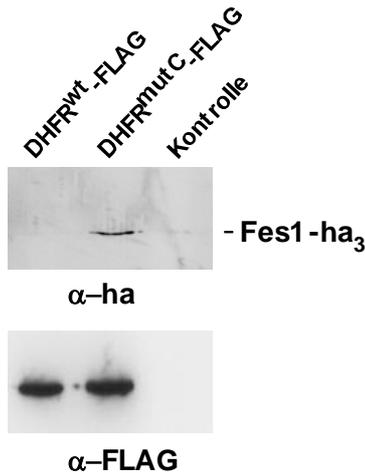


Abb. 19: Das Fes1-Chaperon ist mit der mutierten Version DHFR^{mutC} assoziiert.

Die Zellen des YMF36-Hefestammes (*FES1-ha₃*), wurden mit den Plasmiden pMAF57 (*DHFR^{wt}-FLAG*), pMAF57C (*DHFR^{mutC}-FLAG*) und pRS315 (leerer Vektor, Kontrolle) transformiert und bei 30°C angezogen. Die Expression von DHFR^{mutC}-FLAG wurde durch Zugabe von 100µM Kupfersulfat induziert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen und die Proteinextrakte zur Präzipitation der DHFR-FLAG-Proteine mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und das Fes1-Protein in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Anschließend wurde die Membran 50 Minuten in 0,2M NaOH inkubiert, um den Ani-ha-Antikörper abzulösen und danach mit einem Anti-FLAG-Antikörper hybridisiert.

Die Abb. 19 zeigt, dass Fes1 mit der faltungsdefekten Version DHFR^{mutC}-FLAG coimmunpräzipitiert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass das Hsp70-Chaperon Ssa1 mit dem Hsp40-Cochaperon Ydj1 und dem NEF Fes1 einen Komplex bildet, der die faltungsdefekte Struktur des DHFR-Proteins in der Zelle erkennt. Ob Fes1 direkt die mutierte DHFR-Domäne bindet, kann mit diesem Experiment nicht gezeigt werden. Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass Ssa1 und Ydj1 mit faltungsdefekten Proteinen interagieren, da in beiden Chaperonen eine Substrat-bindende-Domäne identifiziert werden konnte (James *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998). Die Assoziation des Fes1-Cofaktors mit dem Ssa1-Chaperon führt zu ADP/ATP Austausch und entscheidet über die Dauer der Substratbindung (Kabani *et al.*, 2002). Die Abwesenheit eines der Mitglieder führt zur Stabilisierung von faltungsdefekten Proteinen *in vivo*, weil die Bildung oder die Funktion des Komplexes beeinträchtigt ist.

Die Funktion des Fes1-Cofaktors als NEF wurde bis jetzt nur für das Ssa1-Chaperon untersucht. Die Deletion des *SSA1*-Gens in Zellen führte jedoch nur zu einer partiellen Stabilisierung des mutanten Modellsubstrats DU-D-ha. Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Deletion des *FES1*-Gens in Kombination mit einer Deletion von *SSA1* oder *SSA2* die Stabilität des mutierten Testsubstrats zusätzlich beeinflussen kann. Dafür wurde die Abbaurate von DU-D-ha in wt-, *fes1Δ*-, *fes1Δ ssa1Δ*- und *fes1Δ ssa2Δ*-Zellen in einem „Cycloheximid-Chase“-Experiment und zusätzlich die Wachstumsfähigkeit der Zellen auf Medium ohne Uracil, untersucht (Abb. 20A und B).

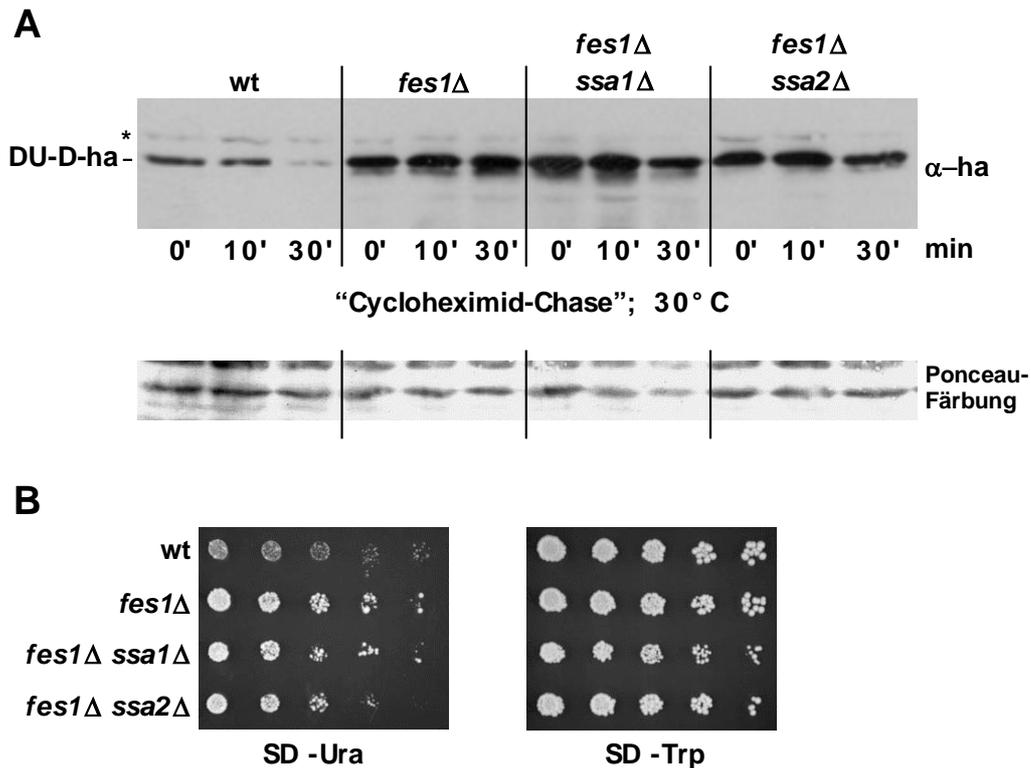


Abb. 20: Die Deletion des *SSA1* oder des *SSA2*-Gens in *fes1Δ*-Zellen führt nicht zu einer zusätzlichen Stabilisierung des mutierten DHFR-Modellsubstrats.

(A) Der Wildtypstamm (JN54), sowie die Hefestämme *fes1Δ* (YMF46), *fes1Δ ssa2Δ* (YMF24) und *fes1Δ ssa1Δ* (YMF26) wurden mit dem *DU-D-ha* kodierenden Plasmid (pMAF32D) transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung dient zur Kontrolle der Proteinkonzentration. (B) Zellen aus Übernachtskulturen wurden in geeigneten Verdünnungen auf SD-Agar aufgetropft und 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Durch die biochemische Analyse zum Abbau des *DU-D-ha*-Testsubstrats in den verschiedenen mutanten Stämmen konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *FES1*-Gens in Kombination mit *SSA1* oder *SSA2* nicht zu einer zusätzlichen Akkumulation des Modellsubstrats führte (Abb. 20A). Dies korreliert mit der phänotypischen Analyse zur Wachstumsfähigkeit der Stämme auf Medium ohne Uracil. Es konnten keine Unterschiede im Wachstum der verschiedenen mutanten Stämme beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass *Fes1* nicht nur den ADP/ATP-Austausch des *Ssa1*-Chaperons katalysieren kann, sondern wahrscheinlich auch den von *Ssa2* oder der anderen Mitglieder dieser Familie.

C.2.4 Die Rolle der Hsp90-Chaperone im Abbau mutierter DHFR-Proteine

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Einfluss einiger Mitglieder der Hsp70-Chaperone und deren Cofaktoren am Abbau faltungsdefekter Modellsubstrate *in vivo* beschrieben. Die cytosolischen Hsp90-Proteine gehören zu einer weiteren Klasse der molekularen Chaperone, die mit der Hsp70-Klasse in bestimmten zellulären Prozessen kooperieren und eine Multichaperon-Maschinerie bilden können. Die Kooperation der beiden Chaperonklassen wurde vor allem in der Signaltransduktion genau studiert. Dabei führt die Interaktion der Hsp70/Hsp90-Chaperonen mit inaktiven Signalproteinen, wie Steroidhormon-Rezeptoren und bestimmten Proteinkinasen, zu deren Aktivierung. Diese Interaktion wird durch mehrere Cofaktoren reguliert, u.a. durch Hsp40, Hip (engl. *Hsc70-interacting protein*), Hop (engl. *Hsp70/Hsp90-organizing protein*), p23 und verschiedene Immunophiline.

Neuere Studien in Säugerzellen suggerieren eine Interaktion des Hsp70/Hsp90-Systems mit dem Ubiquitin-Proteasom-System. Dies wird durch die Cofaktoren CHIP (engl. *carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein*) und BAG1 (engl. *BCL-associated athanogene-1*) vermittelt (siehe Einleitung). CHIP, ein E3-Enzym, das eine U-box-Domäne enthält, interagiert entweder mit Hsp70 oder Hsp90 und vermittelt die Ubiquitylierung bestimmter, chaperongebundener Substrate. Das BAG1-Protein reguliert die ATPase-Domäne der Hsc70-Chaperone und vermittelt deren Interaktion als Adapterprotein mit dem 26S-Proteasom (Alberti *et al.*, 2003). Aufgrund der beobachteten Beteiligung der Hsp70-Chaperone am Abbau der falsch gefalteten Modellsubstrate sollte der Einfluss von Hsp90-Chaperonen an der Beseitigung der Testsubstrate untersucht werden.

Die Hsp90-Klasse der molekularen Chaperone in *S. cerevisiae* ist essentiell und wird durch die Gene *HSC82* und *HSP82* kodiert. Die Beteiligung dieser Chaperone am Abbau falsch gefalteter Proteine wurde daher in Zellen analysiert, die eine temperatursensitive Variante des Hsp82-Chaperons bilden und in denen das *HSC82*-Gen deletiert wurde (*hsp90^{G170D}*). Wildtyp und *hsp90^{G170D}*-Zellen wurden zwanzig Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei der für den *hsp90^{G170D}*-Hefestamm restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert und der Abbau des Modellsubstrats DU-D-ha anschließend im Western-Blot untersucht.

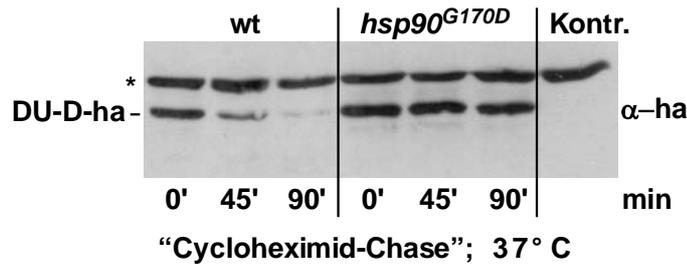


Abb. 21: Die Hsp90-Chaperone sind für den Abbau der mutierten DHFR-Modellsubstrate erforderlich.

Wildtyp (iP82a) und *hsp90^{G170D}*-Zellen (iG170Da) wurden mit *DU-D-ha* (pMAF32D) kodierendem Plasmid transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden 20 Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei der für den *hsp90^{G170D}*-Hefestamm restriktive Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Abb. 21 zeigt, dass die Proteolyse des Testsubstrats in den temperatursensitiven *hsp90^{G170D}*-Zellen stark beeinträchtigt ist, was auf die Beteiligung dieser Chaperone in der Beseitigung mutanter cytosolischer Proteine hindeutet.

Analog zu vorangegangenen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die fehlende Aktivität der Hsp90-Proteine den Abbau anderer Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems beeinflusst. Dafür wurde die Halbwertszeit der Testsubstrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 in Wildtyp und *hsp90^{G170D}*-Zellen analysiert (Abb. 22). Interessanterweise und im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Chaperon-Mutanten, wurden diese Testsubstrate in den *hsp90^{G170D}*-Zellen stark stabilisiert. Für diese Beobachtung gibt es Erklärungsmöglichkeiten. So könnte die Beeinträchtigung des Abbaus der verwendeten Substrate in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone durch einen allgemeinen Proteolysedefekt hervorgerufen werden. Diese Erklärung wird durch einen kürzlich publizierten Artikel gestützt, in dem gezeigt werden konnte, dass die Hsp90-Chaperone eine signifikante Rolle in der Assemblierung und Stabilisierung des 26S-Proteasoms spielen (Imai *et al.*, 2003). Alternativ, könnte man vermuten, dass Hsp90-Chaperone an der Zulieferung polyubiquitylierter Substrate zum 26S-Proteasom beteiligt sind. Die fehlende Aktivität der Chaperone würde dann den Abbau ubiquitylierter Substrate beeinträchtigen, während die Beseitigung von Ubiquitin-unabhängigen Substraten durch das Proteasom weitgehend unbeeinflusst wäre.

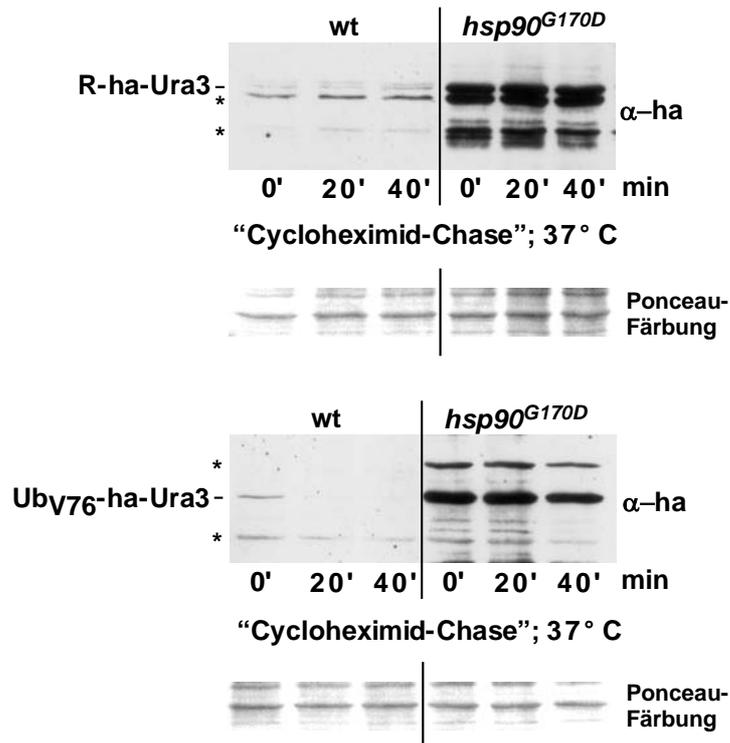


Abb. 22: Der Abbau der Testsubstrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 ist in *hsp90^{G170D}*-Zellen beeinträchtigt. Wildtyp (iP82a) und *hsp90^{G170D}*-Zellen (iG170Da) wurden mit *Ub-R-URA3* (pBA3) und *Ub_{V76}-URA3* (pBA2VV) kodierenden Plasmiden transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden 20 Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei der für den *hsp90^{G170D}*-Hefestamm restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung dient zur Kontrolle der Proteinkonzentration.

Um dies zu überprüfen, wurde die Ornithin-Decarboxylase (ODC), ein Enzym das die Biosynthese von Polyaminen reguliert, als Testsubstrat ausgewählt. Die Anhäufung von Polyaminen in der Zelle führt zur Synthese des Antizymproteins, das an ODC bindet und als Adapterprotein, Ubiquitin-unabhängig den Abbau des ODC-Enzyms durch das 26S-Proteasom vermittelt (Coffino 2001; Palanimurugan *et al.*, 2004).

Wildtyp und *hsp90^{G170D}*-Zellen wurden mit einem für ODC-ha kodierenden Plasmid transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Der Abbau des ODC-ha wurde eine Stunde vor dem „Cycloheximid-Chase“ durch Zugabe von Spermidin (Polyamin) induziert. Die Inkubation der Zellen erfolgte entweder bei der restriktiven Temperatur von 37°C oder bei 30°C. Der Abbau des Modellsubstrats ODC-ha wurde anschließend im Western-Blot untersucht.

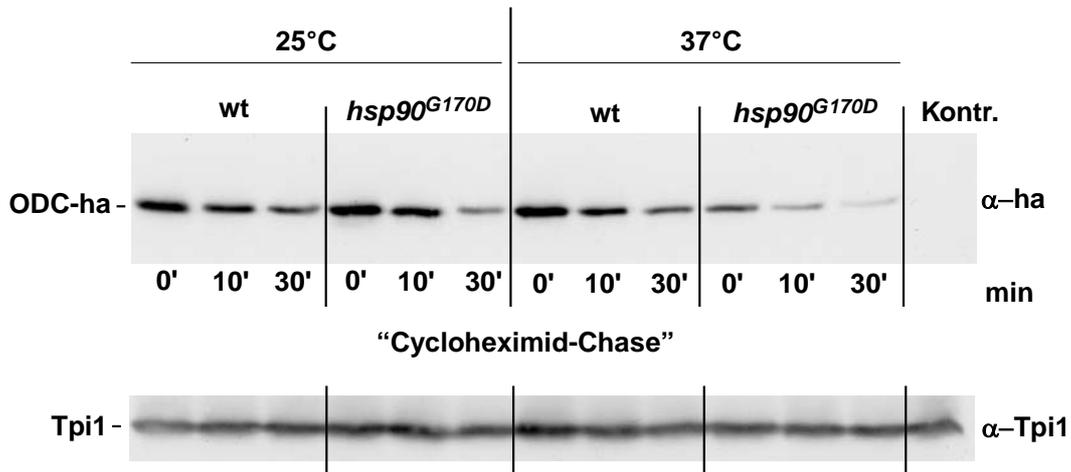


Abb. 23: Der Ubiquitin-unabhängige Abbau des Modellsubstrats ODC-ha ist in *hsp90^{G170D}*-Zellen nicht beeinträchtigt.

Wildtyp (iP82a) und *hsp90^{G170D}*-Zellen (iG170Da) wurden mit ODC-ha (pCH11) kondierendem Plasmid transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Der Abbau des ODC-ha-Substrats wurde eine Stunde vor dem „Cycloheximid-Chase“ durch Zugabe von 100µg/ml Spermidin (Polyamin) induziert. Die Kulturen wurden 20 Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ geteilt und eine Hälfte bei 30°C und die andere bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Die Detektion von Tpi1 (Triosephosphatisomerase) dient zur Kontrolle der Proteinkonzentration.

Die Abb. 23 zeigt, dass das ODC-ha-Substrat in *hsp90^{G170D}*-Zellen bei 30°C und bei der restriktiven Temperatur von 37°C ungehindert abgebaut wurde. Dieses Resultat deutet eindeutig darauf hin, dass die Beeinträchtigung des Abbaus der mutierten DHFR-Versionen, sowie des „N-end rule“ und „UFD“-Substrats in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone, nicht durch eine reduzierte Proteasomaktivität verursacht wurde. Die Aktivität der Hsp90-Chaperone wird wahrscheinlich nur für den Abbau von ubiquitylierten Substraten benötigt. Dabei könnten diese Chaperone als Adapterproteine funktionieren und die ubiquitylierten Substrate dem 26S-Proteasom zuführen. Analog dazu, dient das Antizym als Adapterprotein für ODC und vermittelt dadurch Ubiquitin-unabhängig dessen Abbau durch das Proteasom.

Anschließend sollte durch Coimmunpräzipitations-Experimente untersucht werden, ob eine physikalische Interaktion des Hsc82-Chaperons mit den faltungsdefekten Modellsubstraten detektiert werden kann. Dafür wurde in dem Wildtypstamm JD47-13C das chromosomale *HSC82*-Gen mit einer für ein dreifaches ha-Epitop kodierenden Sequenz fusioniert. Dieser Hefestamm (YMF35) wurde analog der Experimente mit Ssa1, Ydj1 und Fes1 für die Coimmunpräzipitation verwendet.

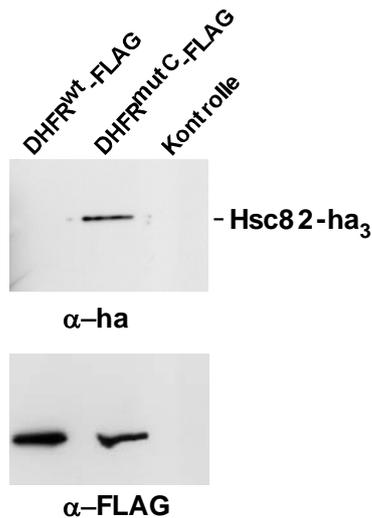


Abb. 24: Das Hsc82-Chaperon interagiert mit der mutierten Version DHFR^{mutC} *in vivo*.

Die Zellen des YMF35-Hefestammes (*HSC82-ha₃*), wurden mit den Plasmiden pMAF57 (*DHFR^{wt}-FLAG*), pMAF57C (*DHFR^{mutC}-FLAG*) und pRS315 (leerer Vektor, Kontrolle) transformiert und bei 30°C angezogen. Die Expression von *DHFR^{mutC}-FLAG* wurde durch Zugabe von 100µM Kupfersulfat induziert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen und die Proteinextrakte zur Präzipitation der DHFR-FLAG-Proteine mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und das Hsc82-Protein in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Anschließend wurde die Membran 50 Minuten in 0,2M NaOH inkubiert, um den Anti-ha-Antikörper abzulösen und danach mit einem Anti-FLAG-Antikörper hybridisiert.

Die Abb. 24 zeigt, dass Hsc82 nur mit der faltungsdefekten Version DHFR^{mutC}-FLAG coimmunpräzipitiert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass auch Mitglieder dieser Klasse der molekularen Chaperone mit dem faltungsdefekten DHFR-Protein interagieren. Da auch die artifiziellen Substrate R-Ura3 und Ub_{V76}-Ura3 in *hsp90^{G170D}* stabil sind, könnten möglicherweise die Ubiquitinketten an Substratproteinen als Bindungsstellen für Hsp90-Chaperone dienen.

C.2.5 Die Beteiligung anderer Chaperone in der Proteolyse mutanter DHFR-Proteine

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Beteiligung der Ssa-Familie der Hsp70-Chaperone, des Hsp40-Chaperons Ydj1, des Nukleotid austausch-Faktors Fes1 und der Hsp90-Chaperone am Abbau faltungsdefekter Modellsubstrate dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der genannten Proteine für die Proteolyse der mutierten Testsubstrate absolut erforderlich ist. Dies konnte durch die Untersuchung der Halbwertszeit der Modellsubstrate in *S. cerevisiae*-Stämmen gezeigt werden, in denen entweder die Aktivität des jeweiligen Chaperons durch eine Mutation beeinträchtigt war, oder bei nicht essentieller Funktion des Chaperons das entsprechende Gen durch Deletion beseitigt worden war. Analog zu diesen Untersuchungen wurde der Einfluss weiterer Chaperone, Cochaperone oder Cofaktoren auf den Abbau der mutierten Substrate untersucht (Abb. 25).

Chaperone und Chaperon-Cofaktoren	DU-D-ha „Cycloheximid-Chase“			Chaperone und Chaperon-Cofaktoren	Du-D-ha „Cycloheximid-Chase“		
	0'	45'	90'		0'	45'	90'
<i>hsp104Δ</i>				<i>aha1Δ</i>			
<i>ssb1-1, ssb2-1</i>				<i>hch1Δ</i>			
<i>sse1Δ</i>				<i>snl1Δ</i>			
<i>sse2Δ</i>				<i>p23/sba1Δ</i>			
<i>cdc48 ts</i>				<i>sti1Δ</i>			
<i>Gim5Δ/ PrefoldinUE5Δ</i>							

Abb. 25: Untersuchungen zum Abbau des Modellsubstrats DU-D-ha in Abwesenheit bestimmter Chaperone oder Chaperon-Cofaktoren in *S. cerevisiae*.

Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme (3xOD₆₀₀) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion des Chaperons Hsp104, das für die Thermotoleranz der Zellen oder für die Auflösung von Proteinaggregaten in Zellen verantwortlich ist, für den Abbau der falsch gefalteten Proteine nicht benötigt wird (Sanchez *et al.*, 1990; Glover *et al.*, 1998).

Auch die Abwesenheit der Ssb-Familie und der Mitglieder Sse1 bzw. Sse2 der Hsp70-Chaperone führte nicht zur Stabilisierung des faltungsdefekten Modellsubstrats. Die Ssb1 und Ssb2-Chaperone interagieren mit den Hsp40-Chaperonen Sis1 und Zuotin und sind wahrscheinlich in der Translationselongation beteiligt, da sie als Bestandteile der Ribosomenkomplexe identifiziert wurden (Zhong *et al.*, 1993; Pfund *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1998). Die Sse1 und Sse2-Proteine interagieren mit Hsp90-Chaperonen und stimulieren wahrscheinlich deren Aktivität bei der Interaktion mit Steroidhormon-Rezeptoren und bestimmten Kinasen (Goeckeler *et al.*, 2002).

Snl1 wurde ursprünglich als Bestandteil des Kernporen-Komplexes identifiziert (Ho *et al.*, 1998). Neuere Studien zeigten, dass Snl1 als Bag-Domänen-NEF für die Ssa- und Ssb-Familie der Hsp70-Chaperone in *S. cerevisiae* fungiert (Sondermann *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu Fes1 wird die Aktivität des Snl1 nicht für den effizienten Abbau des

Modellsubstrats benötigt, was auf eine komplexe Regulierung der ATPase-Domäne der Hsp70-Chaperone in verschiedenen zellulären Mechanismen hindeutet.

Desweiteren wurden Hefestämme analysiert, denen verschiedene, mit Hsp90-Chaperonen assoziierte Partnerproteine fehlten. Die Proteine Aha1, Hch1, Sba1(p23) und Sti1 (Hop in Säugerzellen) regulieren die ATPase-Aktivität der Hsp90-Chaperone (Fang *et al.*, 1998; Prodromou *et al.*, 1999; Panaretou *et al.*, 2002). Zusätzlich wird die Aktivität des Sti1 für die Zulieferung der Substrate zum Hsp90-Chaperonsystem und für die Interaktion des Hsp70- mit dem Hsp90-Chaperonsystem benötigt.

Der GIM/Prefoldin-Komplex ist zusammen mit Chaperoninen an der Faltung der Aktin und Tubulinproteine beteiligt (Geissler *et al.*, 1998). *In vitro* Studien zeigten, dass der GIM-Komplex ATP-unabhängig, nicht-native Substrate binden kann und diese den Chaperoninen zuliefert (Vainberg *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1999).

Für die AAA-ATPase Cdc48 konnte eine Beteiligung in der Proteolyse von ERAD-Substraten gezeigt werden. Dabei wird die Aktivität dieses Komplexes für die effiziente Dislokation der faltungsdefekten Substrate aus dem ER und für den Abbau durch das 26S-Proteasom benötigt (Jarosch *et al.*, 2002). Außerdem ist dieser auch als „Segregase“ bezeichneter Komplex auch am Abbau von Substraten des „UFD“-Weges beteiligt (Richly *et al.*, 2005).

Keine der erwähnten Chaperone oder Chaperon-Cofaktoren sind am Abbau der faltungsdefekten Modellsubstrate beteiligt. Nur bestimmte Chaperone besitzen somit eine direkte Funktion im Abbau falsch gefalteter Proteine.

C.2.6 Einfluss der Hsp70- und Hsp90-Chaperone auf die Ubiquitinhomöostase und auf die Ubiquitylierung faltungsdefekter DHFR-Substrate

Durch die in vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, dass die Ssa-Familie der Hsp70-Chaperone und die Cochaperone Ydj1 und Fes1 spezifisch am Abbau faltungsdefekter Modellsubstrate beteiligt sind. Eine Stabilisierung des „N-end rule“-Substrats R-Ura3 sowie des „UFD“-Substrats Ub_{V76}-Ura3 in diesen Chaperon-Mutanten konnte nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu scheint die Hsp90-Klasse der Chaperone in *S. cerevisiae* am Abbau aller untersuchten Substrate Ubiquitin-vermittelter Proteolyse beteiligt zu sein. Dies deutet auf einen unterschiedlichen Mechanismus der beiden Chaperonsysteme in der Beseitigung von Proteinsubstraten hin. Ein

denkbares Modell dafür wäre, dass die Interaktion des Hsp70/Hsp40/Fes1-Komplexes mit mutierten Proteinen für deren Ubiquitylierung benötigt wird, während die Hsp90-Chaperone den Abbau der falsch gefalteten Proteine und anderer Substrate erst nach der Markierung mit Ubiquitin vermitteln. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst die Menge der Ubiquitinkonjugate in verschiedenen Chaperon-Mutanten bei permissiver und restriktiver Temperatur untersucht.

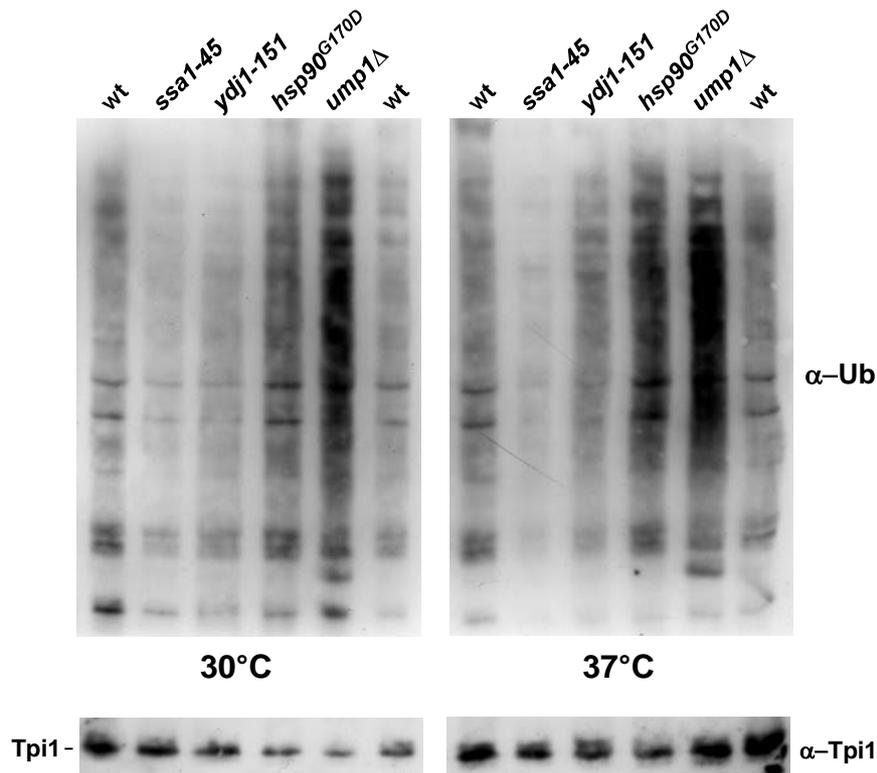


Abb. 26: Ubiquitinhomöostase in Wildtyp-Zellen und verschiedenen Chaperon-Mutanten *in vivo*.

Die Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden bei einer $OD_{600}=0,8$ geteilt und eine Stunde bei 30°C oder 37°C inkubiert. Es wurden zwei Wildtypstämme verwendet, links der korrespondierende Wildtypstamm zum *ssa1-45* und rechts der korrespondierende Wildtypstamm zum *hsp90^{G170D}*-Hefestamm. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme ($1,5 \times OD_{600}$) wurden durch 5 minütiges Kochen aufgebrochen, die Proteinextrakte in einem SDS-Gel aufgetrennt und die polyubiquitylierten Proteine in einem Anti-Ub-Immunoblot detektiert.

Die Abb. 26 zeigt, dass in Zellen mit temperatursensitivem Ssa1-Protein (*ssa1-45*) schon bei der permissiven Temperatur von 30°C eine starke Reduktion der Ubiquitinkonjugate im Vergleich zu Wildtyp-Zellen beobachtet werden kann. Durch die Inkubation der Zellen bei der restriktiven Temperatur von 37°C konnte eine weitere Abnahme der Ubiquitinkonjugate festgestellt werden. Auch in Zellen, die eine temperatursensitive Variante des Ydj1-Proteins bilden, konnte eine leicht reduzierte Menge der Ubiquitinkonjugate beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte eindeutig eine Akkumulation ubiquitylierter Proteine in der temperatursensitiven *hsp90^{G170D}*-Mutante

festgestellt werden. Die *ump1*-Mutante wurde hier zur Kontrolle verwendet, da die Beeinträchtigung der Proteasomassemblierung zur reduzierten Proteolyse der Substrate und dadurch zur Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten führt. Dabei konnte eine vergleichbare Anhäufung ubiquitylierter Proteine in der *ump1*- und der *hsp90^{G170D}*-Mutante beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Hsp90-Klasse, anders als die Hsp70-Klasse der Chaperone, nicht für die effiziente Ubiquitylierung der Substrate benötigt wird.

Ausgehend von der oben formulierten Arbeitshypothese sollte analysiert werden, ob Unterschiede in der Ubiquitylierung der mutierten DHFR-Substrate in Hsp70- bzw. in Hsp90-Mutanten detektiert werden können. Dafür wurde zu besserer Detektion der Ubiquitinkonjugate ein mit dem myc-Epitop fusioniertes Ubiquitin verwendet und entweder mit *DHFR^{wt}-FLAG* oder *DHFR^{mutD}-FLAG* coexprimiert. Für die Untersuchung wurde der *ssa1 ssa2*-Deletionsstamm verwendet, da aufgrund fehlender Marker Mutationen, nicht ohne Weiteres möglich war, das myc-Ubiquitin und das *DHFR-FLAG* kodierende Plasmid in der temperatursensitiven *ssa1-45*-Zellen zusammen zu exprimieren.

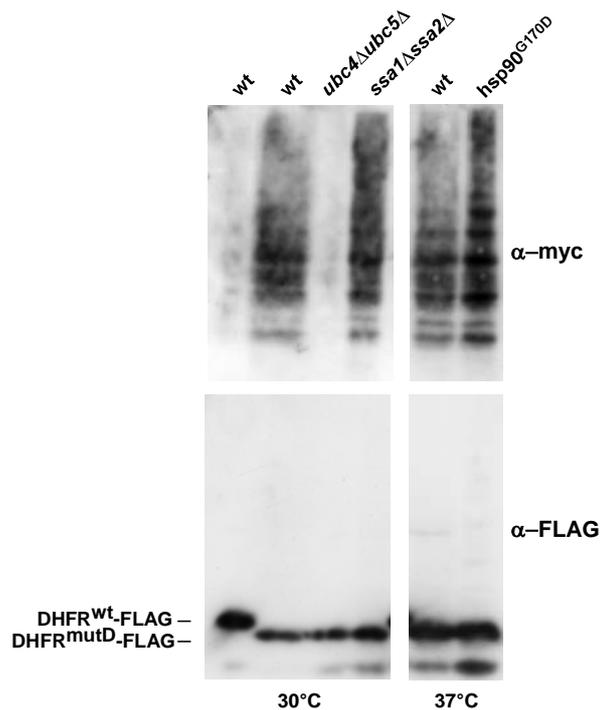


Abb. 27: Einfluss der Hsp70- und Hsp90-Chaperone auf die Polyubiquitylierung mutierter *DHFR^{mutD}*-Version *in vivo*.

Die Kulturen exponentiell wachsender Hefezellen wurden bei 30°C oder eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Expression von *DHFR^{mutD}-FLAG* wurde durch Zugabe von 100µM Kupfersulfat induziert. Die Zellen wurden durch 3-minütiges Kochen aufgeschlossen und die Proteinextrakte für die Präzipitation der DHFR-FLAG-Proteine mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Ubiquitinkonjugate in einem Anti-myc-Immunoblot detektiert. Anschließend wurde die Membran 50 Minuten in 0,2M NaOH inkubiert, um den Ani-myc-Antikörper abzulösen, und danach mit einem Anti-FLAG-Antikörper hybridisiert.

Die Zellen wurden bei 30°C in einem Selektivmedium angezogen. Der Wildtyp und der *hsp90^{G170D}*-Hefestamm wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch 3-minütiges Kochen aufgebrochen, Proteinextrakte hergestellt und diese mit einem Anti-FLAG-Affinitätsgel inkubiert. Die DHFR-FLAG-Proteine wurden nach der Immunpräzipitation in einem Immunoblot detektiert. Die Detektion der Ubiquitinkonjugate erfolgte durch einen Anti-myc-Antikörper (Abb. 27).

Es konnten eindeutig erhöhte Mengen ubiquitylierter Formen des DHFR^{mutD}-Substrats in *hsp90^{G170D}*-Zellen detektiert werden, was mit den Untersuchungen zur allgemeinen Menge der Ubiquitin-Konjugate in dieser Mutante korreliert. Im Gegensatz dazu, konnte keine Reduktion der ubiquitylierten DHFR^{mutD}-Substrate im *ssa1 ssa2*-Deletionsstamm beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass in Abwesenheit der Ssa1- und Ssa2-Chaperone in Zellen, der Abbau der mutierten Modellsubstrate beeinträchtigt wird, die Ubiquitylierung der Substrate jedoch möglicherweise durch die zwei weiteren Mitglieder der Familie (Ssa3 und Ssa4) noch vermittelt werden kann. Eventuell führt erst ein Ausfall der kompletten Familie der Hsp70-Chaperone Ssa1-Ssa4 zu einer gravierenden Reduktion der Ubiquitinkonjugate in der Hefe *S. cerevisiae*. Im Gegensatz dazu, kommt es in Abwesenheit der Hsp90-Klasse der Chaperone zur Akkumulation ubiquitylierter Proteine. Zusammengenommen deuten die beschriebenen Daten darauf hin, dass die Funktion der Hsp70-Chaperone wahrscheinlich für die Ubiquitylierung der Substrate benötigt wird, während die Hsp90-Chaperone den Abbau der falsch gefalteten Proteine und anderer Substrate erst nach der Markierung mit Ubiquitin vermitteln.

C.3 Die Rolle von Proteinaggregaten in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle

Proteinaggregate werden durch ihre Unlöslichkeit in wässriger Lösung, ihre abweichende intrazelluläre Lokalisation, sowie durch ihre nicht-native Sekundärstruktur definiert (Fink 1998). Ihre Entstehung wird durch faltungsdefekte Proteine vermittelt, die wiederum durch thermalen oder oxidativen Stress und durch Änderung in der Primärstruktur verursacht durch Mutationen oder durch Fehleinbau von Aminosäuren während der Translation entstehen können (Wetzel 1994). Die molekularen Chaperone und das Ubiquitin-Proteasom-System gehören zu den Hauptkomponenten der zellulären Protein-Qualitätskontrollsysteme, die der Akkumulation und Aggregation der faltungsdefekten Proteine entgegenwirken. Wenn die Kapazität der beiden protektiven Systeme, falsch

gefaltete Proteine wieder in die native Konformation zu falten oder diese abzubauen, überschritten wird, was experimentell durch Überexpression eines mutanten Proteins oder durch Proteasominhibition erzielt werden kann, kommt es zur Bildung von Proteinaggregaten (Dubois *et al.*, 1991; Gragerov *et al.*, 1991; Kampinga *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1998). Die Akkumulation faltungsdefekter Proteine in große fibrilläre Strukturen, die als Amyloide bezeichnet wurden, spielt in vielen neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Amyotrophe Laterale Sklerose eine entscheidende Rolle (Taylor *et al.*, 2002). Es ist jedoch noch unbekannt, ob die Bildung von Proteinaggregaten ursächlich für die Pathogenität ist oder nur deren Begleiterscheinung darstellt.

C.3.1 Bildung von Proteinaggregaten in UPS- und Chaperon-Mutanten

Durch die im folgenden Kapitel beschriebenen Experimente sollte untersucht werden, ob die Abwesenheit verschiedener Komponenten des UPS und des Chaperon-Systems zur verstärkten Aggregation der mutierten Versionen des DHFR-Proteins in *S. cerevisiae*-Zellen führt.

Die DHFR-Versionen DHFR^{mutC} und DHFR^{mutD} wurden mit der für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) kodierenden Sequenz fusioniert und die Expression der Konstrukte zunächst in einem Wildtypstamm im Fluoreszenz-Lichtmikroskop untersucht. Die Bildung von Proteinaggregaten, die sich als Punkte stark erhöhter Fluoreszenz erkennen lassen, konnte durch erhöhte Expression der Konstrukte oder durch Inkubation bei erhöhter Temperatur erreicht werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass DHFR^{mutD}-GFP unter diesen Bedingungen in ca. 90% und DHFR^{mutC}-GFP in ca. 20% der Zellen in Form von Aggregaten vorliegt. Hingegen konnte in Zellen mit DHFR^{wt}-GFP keine Aggregation nachgewiesen werden (Fröhlich 2001).

Um den Einfluss von molekularen Chaperonen und Komponenten des UPS auf die Bildung von Proteinaggregaten zu untersuchen, wurde die DHFR^{mutC}-GFP-Version in allen zuvor beschriebenen Hefestämmen exprimiert, in denen eine Stabilisierung der DHFR-Modellsubstrate beobachtet werden konnte. Dabei sollten eventuelle Unterschiede in der Aggregation des mutierten DHFR-GFP-Fusionsproteins in Abwesenheit unterschiedlicher Chaperonklassen analysiert werden.

Die Abb. 28 zeigt, dass in Abwesenheit der Hsp70-Chaperone Ssa1 und Ssa2, des Hsp40-Chaperons Ydj1, des NEF Fes1 und des Proteasomreifungsfaktors Ump1, eine

verstärkte Bildung von Proteinaggregaten beobachtet werden konnte. Hingegen unterschied sich die Entstehung von Proteinaggregaten in *hsp90^{G170D}*-Zellen nicht signifikant von der in Wildtyp-Zellen. Dies deutet auf einen unterschiedlichen Mechanismus der Hsp70-Familie und zugehöriger Cofaktoren und der Hsp90-Familie der Chaperone in der Interaktion mit faltungsdefekten Proteinen. Obwohl beide Klassen von Chaperonen am Abbau faltungsdefekter Proteine beteiligt sind, besteht die Aufgabe der Hsp90-Chaperone nicht in der Prevention der Proteinaggregation *in vivo*.

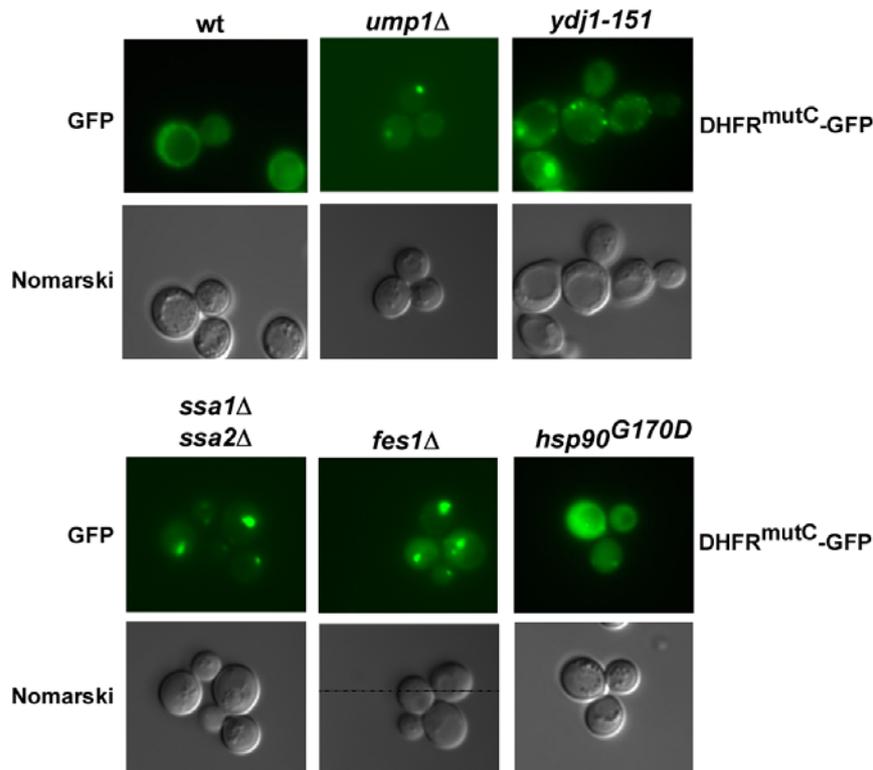


Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Beteiligung molekularer Chaperone in der Aggregation mutierter DHFR^{mutC}-Version in *S. cerevisiae*.

Der Wildtypstamm (JN54), sowie die Hefestämme *ump1Δ* (JD59), *ydj1-151* (CAC176), *ssa1Δssa2Δ* (MW123), *fes1Δ* (YMF46) und *hsp90^{G170D}* (iG170D) wurden mit dem DHFR^{mutC}-GFP kodierenden Plasmid (pMAF62C) transformiert und die Zellen bei 30°C angezogen. Die Kulturen wurden 30 Minuten vor den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bei 37°C inkubiert.

Durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Aggregation von Proteinen können nur relativ große Proteinaggregate visuell detektiert werden. Zur Sensitivitätssteigerung sollte daher die differentielle Zentrifugation verwendet werden. Dabei kann die lösliche von der unlöslichen Fraktion durch Zentrifugation bei 100.000 x g separiert und die Proteine in einem Immunoblot detektiert werden. Da hauptsächlich das Modellsubstrat DU-D-ha für die Untersuchungen zum Abbau faltungsdefekter Proteine

verwendet wurde, sollte der Einfluss molekularer Chaperone auf die Löslichkeit dieses Substrates analysiert werden.

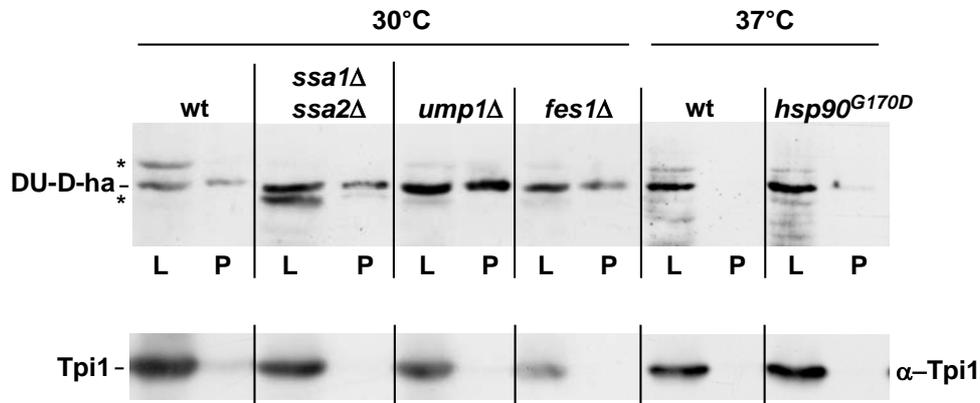


Abb. 29: Untersuchungen zur Löslichkeit mutierter DHFR-Modellsubstrate.

Exponentiell wachsende Hefezellen wurden bei 30°C oder wenn angegeben 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Jeweils gleiche Zellmengen der Hefestämme ($3 \times OD_{600}$) wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen, 5 Minuten bei 800 x g und anschließend 30 Minuten bei 100.000 x g zentrifugiert. Die lösliche (L) und unlösliche (P) Fraktion wurde in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine in einem Anti-ha-Immunoblot detektiert. Unspezifisch detektierte Proteinformen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Detektion des löslichen Proteins Tpi1 diente zur Kontrolle der differentiellen Zentrifugation.

Die in Abb. 29 gezeigten Ergebnisse korrelieren mit den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Aggregation faltungsdefekter Proteine. In Abwesenheit des Ump1-Proteasomreifungsfaktors, des Fes1-Cofaktors und der Chaperone Ssa1 und Ssa2 konnten im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Mengen des DU-D-ha-Modellsubstrats in den unlöslichen Fraktionen (P) detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte keine erhöhte Aggregation des Substrats in *hsp90^{G170D}*-Zellen detektiert werden. Zusätzlich konnte in allen Mutanten eine erhöhte Konzentration des Substrats in der löslichen Fraktion (L) detektiert werden, was auf die Beeinträchtigung der Proteolyse des Substrats in Abwesenheit dieser Proteine schließen lässt.

D Diskussion

Der Begriff Protein-Qualitätskontrolle (PQC) bezeichnet zelluläre Prozesse, die die Faltung neusynthetisierter Proteine in ihre native, dreidimensionale Konformation überwachen und entweder die Rückfaltung mutierter Proteine oder deren Abbau vermitteln (Wickner *et al.*, 1999). Diese Qualitätskontrollsysteme wurden im Cytosol, im ER, in Mitochondrien, im Sekretorischen Weg und vor kurzem auch im Nukleus identifiziert (Arnold *et al.*, 2002; Hampton 2002; McDonough *et al.*, 2003; Trombetta *et al.*, 2003; Gardner *et al.*, 2005). PQC ist essentiell, da es die Akkumulation falsch gefalteter Proteine verhindert, die zur Bildung von Proteinaggregaten und zur Interaktion mit anderen Proteinen tendieren, was die Funktion der Zellen maßgeblich stören kann. Zu den zentralen Komponenten der PQC in eukaryotischen Zellen gehören molekulare Chaperone und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Die molekularen Chaperone binden hydrophobe Sequenzen, die an der Oberfläche nicht-nativer Polypeptide exponiert sind, wodurch die Faltung der naszierenden Polypeptide in die native Struktur unterstützt wird, die Rückfaltung falsch gefalteter Proteine in die korrekte Struktur induziert wird und Proteinaggregationsprozesse unterdrückt werden (Frydman *et al.*, 1994; Hartl 1996; Bukau *et al.*, 1998). Wenn die native Konformation eines Proteins nicht erreicht werden kann, werden diese Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System zu Peptiden abgebaut (Hershko *et al.*, 1998; Pickart 2001). Neuere Studien suggerieren, dass molekulare Chaperone direkt am Abbau faltungsdefekter Proteine beteiligt sind (Hohfeld *et al.*, 2001; Cyr *et al.*, 2002). Der Mechanismus der Erkennung und Rekrutierung der falsch gefalteten Proteine zum Proteasom ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Komponenten der PQC in *S. cerevisiae* zu identifizieren und die spezifische Funktion der molekularen Chaperone in der Beseitigung faltungsdefekter Proteine *in vivo* zu untersuchen.

D.1 Modellsubstrate zur Untersuchung zellulärer Protein-Qualitätskontroll-Systeme in *S. cerevisiae*

Für die Untersuchung der PQC wurden mutierte Modellsubstrate entwickelt, die in *S. cerevisiae*-Zellen rasch abgebaut werden. Als Modellsubstrat wurde die Dihydrofolatreduktase (DHFR) der Maus ausgewählt, ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Das *DHFR*-Gen wurde mit dem *URA3*-Gen der Hefe im

selben Leserahmen fusioniert (J. Höckendorff und R.J. Dohmen, unveröffentlichtes Resultat). Das Ura3-Protein (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase) wird für die Uracil-Biosynthese in der Hefe *S. cerevisiae* benötigt und diente in dem Modellsubstrat als Reportermodul. Das DHFR-Ura3-Fusionsprotein ist im Wildtyp stabil und ermöglicht den Zellen ein Wachstum auf Medium ohne Uracil. Mittels zufälliger PCR-Mutagenese wurden in dieses Konstrukt Mutationen eingeführt und die PCR-Produkte in Plasmide inseriert. Auf diese Weise wurden mutierte Varianten des DHFR-Ura3-Modellsubstrats isoliert, die in Wildtyp-Zellen rasch abgebaut, jedoch in Proteasom-Mutanten (*ump1Δ*) stabilisiert wurden. Die Sequenzierung dieser mutierten Varianten ergab, dass einige auch Punktmutationen in der *URA3*-Domäne enthielten (J. Höckendorff und R.J. Dohmen, unveröffentlichtes Resultat). Daher wurde für die Identifizierung der Komponenten der PQC in dieser Arbeit, die als DHFR^{mutC} bezeichnete Version verwendet. Diese enthielt zwei Punktmutationen, die zur Veränderung von zwei Aminosäureresten nur in der DHFR-Domäne führten. Eine weitere mutierte Variante wurde in dieser Arbeit durch Assemblierungs-PCR generiert und als DHFR^{mutD} bezeichnet (Abb. 3). Das Ziel war, die native Konformation des DHFR-Proteins durch Deletion einer kompletten α -Helix gravierend zu verändern. Beide mutierte DHFR-Varianten wurden in Wildtyp-Zellen effizient abgebaut, was durch phänotypische und biochemische Analysen gezeigt werden konnte (Abb. 4). Die Generierung geeigneter, mutierter Modellsubstrate war der Ausgangspunkt für die Untersuchung der Beteiligung des Ubiquitin-Systems und der molekularen Chaperone am Abbau faltungsdefekter Proteine *in vivo*.

D.2 Die E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 des Ubiquitin-Proteasom Systems vermitteln die Ubiquitylierung der Modellsubstrate

Die Beteiligung des Proteasoms an der Proteolyse des mutierten Modellsubstrats DHFR^{mutC} war eine Voraussetzung für dessen Isolation. Auch für die mutierte Variante DHFR^{mutD} konnte ein Proteasom-abhängiger Abbau gezeigt werden (Abb. 5). Die Beteiligung der Lysosomen (Vakuolen in der Hefe) am Abbau dieser Substrate konnte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der *DHFR-GFP* exprimierenden Zellen ausgeschlossen werden. Dabei konnten keine Fluoreszenzsignale in der Vakuole der Hefe detektiert werden. Dies wurde durch die Untersuchung der Abbaurate des mutierten DU-D-ha-Fusionsproteins in verschiedenen Autophagozytose-Mutanten (*aut1Δ*, *aut2Δ*, *aut3Δ*, *aut7Δ* und *aut8Δ*) bestätigt. In diesen Zellen wurde keine Stabilisierung des Modellsubstrats beobachtet, was zusammen mit dem Befund, dass die Substrate in Zellen mit

defekten Proteasomen (*ump1*) deutlich stabilisiert waren, den lysosomalen Abbau der Substrate ausschließt.

Die Proteasom-abhängige Proteolyse der meisten Substrate benötigt die Enzyme des Ubiquitin-Systems. Die Ubiquitylierung der Substrate in eukaryotischen Zellen wird durch eine nacheinander folgende Reaktion des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1), der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2) und der Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3) katalysiert. Dabei wird die spezifische Rolle der Substraterkennung nur den E3-Enzymen zugeschrieben. In faltungsdefekten Proteinen dienen vermutlich, die an der Oberfläche der Proteine exponierten, hydrophoben Sequenzen, als Erkennungs- und Bindungsstellen für Ubiquitylierungskomplexe. Obwohl keine Strukturinformationen zu den mutierten DHFR-Varianten vorliegen, zeigen wahrscheinlich auch diese, hydrophobe Bereiche an der Oberfläche, die im nativen Zustand maskiert sind. Die Untersuchungen zur Beteiligung des Ubiquitin-Systems im Abbau der Modellsubstrate zeigten, dass nur die mutierten DHFR-Varianten in *S. cerevisiae* effizient ubiquityliert wurden. Dagegen konnte keine Ubiquitylierung der wildtypischen DHFR beobachtet werden (Abb. 6). Desweiteren konnten die E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 identifiziert werden, die die Ubiquitylierung der Modellsubstrate vermitteln. In Abwesenheit dieser Enzyme konnten die mutierten DHFR-Modellsubstrate nicht effizient abgebaut werden (Abb. 7), da die Ausbildung von Ubiquitinketten und damit die Markierung der mutierten DHFR-Proteine für den Abbau durch das 26S-Proteasom unterbrochen war (Abb. 27). Zusätzlich wurde nur eine partielle Stabilisierung der Modellsubstrate in Abwesenheit des Ubc4- oder des Ubc5-Enzyms beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ubc4- und Ubc5-Enzyme weisen eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz auf und besitzen komplementierende Funktionen. Durch das Vorkommen eines „Hitzeschock-Elements“ in der Promotorregion dieser Gene, kann deren Expression unter Stressbedingungen (z.B. erhöhte Temperatur), die zur verstärkten Denaturierung von Proteinen führen, stark induziert werden. Auf diese Weise entwickelten Zellen ein effizientes System, das der Akkumulation falsch gefalteter Proteine, durch verstärkte Bildung der in der PQC beteiligten E2-Enzyme entgegenwirkt.

D.2.1 Die Suche nach E3-Enzymen

Die zentrale Rolle der E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 im Abbau abnormaler Proteine, wie sie z.B. in *S. cerevisiae*-Zellen behandelt mit dem Arginin-Analogon Canavanin auftreten, wurde

bereits publiziert (Seufert *et al.*, 1990). Bis jetzt konnten jedoch keine E3-Enzyme identifiziert werden, die für die spezifische Erkennung faltungsdefekter Proteine verantwortlich sind. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein genetisches Selektionsverfahren zur Identifizierung potentieller E3-Enzyme, aber auch anderer Komponenten des cytosolischen Protein-Qualitätskontrollsystems etabliert. Dieses „screening“-Verfahren basiert auf der Selektion von *S. cerevisiae*-Mutanten, die das instabile DHFR-Ura3-Fusionsprotein (DU-C-ha) nicht effizient abbauen können. Die effiziente Proteolyse dieses Modellsubstrats in einem Wildtypstamm führt zur Uracil-Auxotrophie der Hefezellen (Abb. 4). Daher können Mutanten mit Defekten in der Proteolyse des Testsubstrats durch phänotypische Analyse auf Medium ohne Uracil identifiziert werden. Durch die Einführung einer Genbank in die mutanten Zellen kann anschließend das betroffene Gen identifiziert werden. Für das „screening“-Verfahren wurde ein Hefestamm (YMF9) mit chromosomal integrierter Version des mutierten DU-C-ha-Konstrukts generiert (siehe Material & Methoden), um Kopienzahlchwankungen zu vermeiden, die mit Plasmid-kodiertem DU-C-ha-Konstrukten auftreten können. Das „screening“-Verfahren, das zu Anfang dieser Arbeit durchgeführt wurde und anschließend durch eine Diplomstudentin (Christina Reufsteck) weitergeführt wurde, führte jedoch bislang nicht zur Selektion von Mutanten, in denen E3-kodierende Gene betroffen sind.

Eine Möglichkeit für die fehlgeschlagene Identifikation der E3-Enzyme könnte mit Hilfe einer Redundanz dieser Proteine erklärt werden. Wenn mehrere E3-Enzyme die Fähigkeit besitzen, falsch gefaltete Proteine zu erkennen und damit die Ubiquitylierung und den Abbau des Modellsubstrats zu vermitteln, würde der Ausfall eines der Proteine, nicht zu einem detektierbaren Phänotyp führen. Die Funktion dieses Proteins (E3x) könnte nämlich dann, durch die Aktivität eines anderen (E3y) kompensiert werden (Abb. 30A). Hingegen ist die Wahrscheinlichkeit der Selektion solcher Mutanten, in denen mehrere E3-kodierende Gene betroffen sind, verschwindend gering. Alternativ könnten auch molekulare Chaperone die Rolle der E3-Enzyme übernehmen. Diese besitzen die Fähigkeit hydrophobe Sequenzen an falsch gefalteten Proteinen zu erkennen. Durch Interaktion der Chaperone mit faltungsdefekten Proteinen und E2-Enzymen könnten die Chaperone als Adapterproteine wirken und dadurch die Ubiquitylierung des Substrats vermitteln (Abb. 30B).

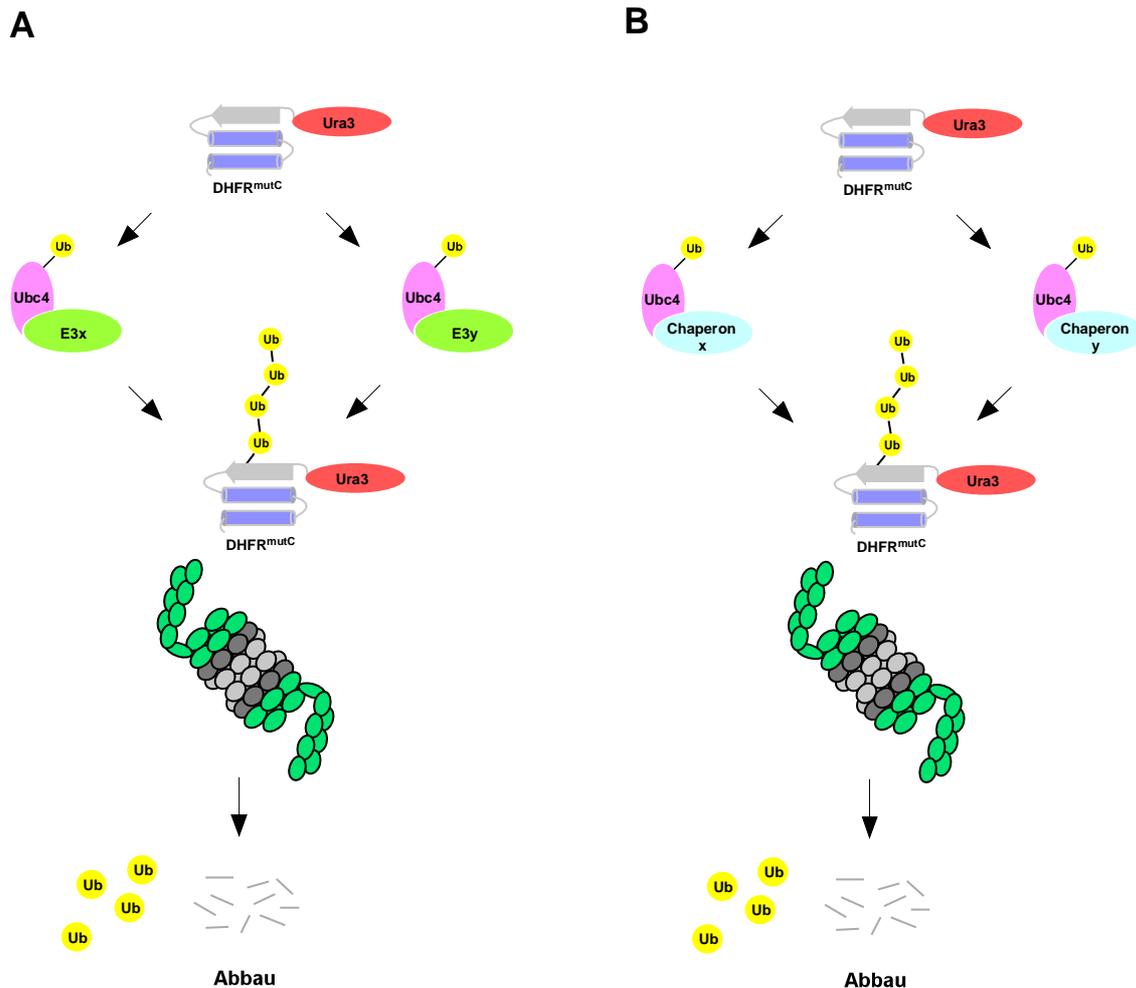


Abb. 30: Modelle zur Beteiligung der E3-Enzyme oder Chaperone in der Erkennung und Ubiquitylierung faltungsdefekter DHFR-Modellsubstrate.

- (A) Mehrere E3-Enzyme sind unabhängig an der Erkennung faltungsdefekter DHFR-Proteine beteiligt. Die Interaktion dieser mit den E2-Enzymen Ubc4/Ubc5 und DHFR führt zu Ubiquitylierung und Abbau des Substrats. Beim Ausfall eines der E3-Enzyme (E3x) wird dessen Aktivität durch ein anderes (E3y) kompensiert, wodurch die Proteolyse des Substrats nicht beeinträchtigt wird.
- (B) Die Funktion der Substraterkennung wird durch mehrere Chaperone (Chaperon x oder Chaperon y) übernommen. Diese interagieren mit den E2-Enzymen Ubc4/Ubc5 und vermitteln dadurch die Ubiquitylierung und die Proteolyse des Substrats.

Die vorgestellten Modelle können durch die Tatsache unterstützt werden, dass die meisten Enzyme, die in der PQC beteiligt sind, kompensierende Funktionen besitzen, z.B. Ubc4 und Ubc5, die molekularen Chaperone Ssa1 und Ssa2 sowie die Chaperone der Hsp90-Klasse Hsc82 und Hsp82. Die E3-Enzyme lassen sich, entsprechend einer charakteristischen Domäne (RING-Finger, HECT oder U-box-Domäne) in drei Klassen einteilen (siehe Einleitung). Neben der Untersuchung spontan auftretender Mutanten wurde daher die Proteolyse des Modellsubstrats DU-D-ha in verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen analysiert, denen bestimmte RING-Finger-Domänen oder HECT-Domänen enthaltende

Proteine fehlten. Auf diese Weise wurde gezielt nach potentiellen E3-Enzymen gesucht, die in der Proteolyse faltungsdefekter Proteine beteiligt sind. Auch diese Untersuchungen führten nicht zur Identifizierung eines E3-Enzyms, das am Abbau der Modellsubstrate beteiligt ist. Aufgrund der angesprochenen möglichen Redundanz der Proteine, könnte nur eine mehrfache Deletion dieser Gene zur Stabilisierung des Modellsubstrats führen und damit zur Identifizierung des E3-Enzyms oder wahrscheinlicher der E3-Enzyme. Eventuell könnte auch ein Protein an der Erkennung der mutierten Proteine beteiligt sein, dessen Sequenz keine Hinweise auf dessen Funktion als E3-Enzym zulässt. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass bis jetzt noch kein CHIP-homologes Protein gefunden wurde. Schließlich könnte es sich auch um essentielle Gene handeln, deren Deletion für die Zelle letal ist.

D.3 Die Rolle der molekularen Chaperone in der Protein-Qualitätskontrolle

Die Beteiligung der molekularen Chaperone in der zellulären Protein-Qualitätskontrolle könnte folgende Prozesse beinhalten:

1. Sie können Aggregationsprozesse durch Abschirmung hydrophober Sequenzen in faltungsdefekten Proteinen verhindern. Proteinaggregate oder *Inclusion Bodies* sind charakteristische Eigenschaften mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen, wie Parkinson, Alzheimer oder die sogenannten Polyglutamin (PolyQ)-Krankheiten (CAG-Wiederholungen in bestimmten Genen). In mehreren Modellorganismen wie *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und Mäusen konnten Aggregationsprozesse, hervorgerufen durch die Bildung von Proteinen mit verlängerten Polyglutaminketten, und die Rolle der Chaperone studiert werden (Warrick *et al.*, 1999; Kazemi-Esfarjani *et al.*, 2000; Krobitsch *et al.*, 2000; Muchowski *et al.*, 2000). In diesen Studien konnte durch die Co-expression der für Hsp70 und Hsp40-Chaperone kodierenden Gene gezeigt werden, dass die Anzahl der Proteinaggregate und deren biochemische Eigenschaften verändert werden, die Bildung der Proteinaggregate jedoch nicht komplett verhindert werden kann. Daher ist immer noch weitgehend unbekannt, welche Rolle diese Aggregate in der Krankheitspathogenese spielen.
2. Die molekularen Chaperone können die Rückfaltung von aggregierten und falsch gefalteten Proteinen in ihre native Konformation vermitteln. An diesem Prozess sind vor

allem die Chaperone der Hsp104-Klasse beteiligt die zusammen mit den Hsp70 und Hsp40-Chaperonen Proteinaggregate wieder auflösen können (Glover *et al.*, 1998).

3. Molekulare Chaperone können im Abbau faltungsdefekter Proteine beteiligt sein, z.B. in dem sie diese dem Ubiquitin-Proteasom-System präsentieren. Indizien dafür stammen vor allem aus *in vitro* Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass der Abbau bestimmter Proteine beeinträchtigt ist, wenn die Konzentration der Hsc70-Chaperone reduziert wurde (Bercovich *et al.*, 1997). Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit bestimmter Hsp70-Chaperone zur Stabilisierung des mutierten ERAD-Substrats CFTR- Δ F508 in *S. cerevisiae*-Zellen führt (Zhang *et al.*, 2001). Neuere Studien führten zur Identifizierung der Chaperon-Cofaktoren CHIP und BAG1. Das in Säugerzellen identifizierte CHIP ist eine U-box-E3-Ligase, die mit den E2-Enzymen Ubc4 und Ubc5 und mit den Chaperonen Hsp70 und Hsp90 interagiert (Connell *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass die Aktivität des CHIP-Proteins für die effiziente Ubiquitylierung chaperongebundener, faltungsdefekter Substrate benötigt wird (Murata *et al.*, 2001). Das in Säugerzellen identifizierte BAG1-Protein ist ein Nukleotidaustausch-Faktor, das die ATPase-Domäne der Hsp70 und Hsp90-Klasse der Chaperone reguliert (Hohfeld *et al.*, 1997; Gassler *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass BAG1 mit dem 26S-Proteasom interagiert und dadurch als Adapterprotein, den Abbau der chaperongebundenen Substrate vermitteln kann (Luders *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde systematisch die Rolle verschiedener Chaperonklassen und Chaperon-Cofaktoren im Abbau faltungsdefekter Proteine *in vivo* in *S. cerevisiae* analysiert.

D.3.1 Die Ssa-Familie der Hsp70-Chaperone und die zugehörigen Cochaperone Ydj1 und Fes1 sind am Abbau der mutierten Modellsubstrate beteiligt

Die im Cytosol der Hefe vorkommenden Hsp70-Chaperone können in vier Familien eingeteilt werden: Ssa, Ssb, Sse und Ssz. Die Ssa-Familie besteht aus vier Mitgliedern Ssa1-Ssa4. Die Expression von mindestens einem der Mitglieder ist für die Lebensfähigkeit der Zellen essentiell. Die Untersuchungen zur Stabilität der Modellsubstrate wurden daher in Zellen durchgeführt, die eine temperatursensitive Variante des Ssa1-Proteins bildeten und in denen die Gene *SSA2-SSA4* deletiert waren. Dabei wurde festgestellt, dass der Abbau der DHFR-Modellsubstrate DU-C-ha und DU-D-ha komplett blockiert wurde (Abb. 10). Dies deutet darauf hin, dass diese Familie der Chaperone nicht nur am ER-assoziierten Abbau

bestimmter Substrate beteiligt ist, sondern maßgeblich auch an der Beseitigung cytosolischer, faltungsdefekter Proteine. Darauf hin wurde untersucht, ob alle vier Ssa-Mitglieder oder nur bestimmte Ssa-Chaperone für die effiziente Proteolyse der Modellsubstrate notwendig sind. Durch Analyse der Abbauraten des Testsubstrats DU-D-ha in Zellen, in denen bestimmte Mitglieder dieser Familie deletiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Ssa1- und Ssa2-Chaperone hauptsächlich am Abbau des Substrats beteiligt sind (Abb. 11). Beide Chaperone weisen eine sehr hohe Homologie auf (97% identische Aminosäurereste) und können gegenseitig ihre Funktionen kompensieren. Aufgrunddessen konnte eine starke Stabilisierung des Testsubstrats nur in Zellen beobachtet werden, in denen beide Mitglieder deletiert wurden (Abb. 11B).

Die ATPase-Domäne der Hsp70-Chaperone wird durch Cochaperone der Hsp40-Klasse stimuliert (Kelley 1998). Diese Cochaperone werden auch als DnaJ-Proteine bezeichnet, da sie eine typische 70 Aminosäurereste große J-Domäne enthalten, die für die Interaktion mit den entsprechenden Hsp70-Chaperonen erforderlich ist. Dabei führt die ATP-Hydrolyse zur erhöhten Substrataffinität der Hsp70-Chaperone im ADP-gebundenen Zustand (Modell, siehe Abb. 9). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Hsp40-Vertreter Ydj1 und Sis1 mit dem Hsp70-Chaperon Ssa1 interagieren und dessen ATPase-Aktivität stimulieren können (Lu *et al.*, 1998). Da für den Abbau des Modellsubstrats DU-D-ha die Aktivität der Ssa1 und Ssa2-Chaperone erforderlich ist, wurde auch die Beteiligung dieser Cochaperone in der Proteolyse des Substrats untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Abbau der Testsubstrate nur in *ydj1-151*-Mutanten, jedoch nicht in *sis1-85*-Zellen beeinträchtigt wurde (Abb. 14 und Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Ssa1- und Ssa2-Chaperone und das Ydj1-Cochaperon für die effiziente Proteolyse der cytosolischen, faltungsdefekten Proteine benötigt werden. Das Ydj1 könnte in diesem Prozess unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Zu einem könnte dieses Cochaperon faltungsdefekte Proteine binden und dem Hsp70-System zuführen und zusätzlich dessen ATPase-Domäne stimulieren. Alternativ könnte Ydj1 selbstständig als Chaperon, ohne Verbindung mit dem Hsp70-System, fungieren und die gebunden falsch gefalteten Proteine dem UPS zuführen.

Neben den Hsp40-Chaperonen gibt es eine weitere Gruppe von Proteinen, die den ATPase-Zyklus der Hsp70-Chaperone regulieren können. Es handelt sich dabei um die Nukleotidaustausch-Faktoren (NEF), die den ADP/ATP-Austausch regulieren und dadurch die Substratdissoziation von den entsprechenden Chaperonen regulieren (Modell, Abb. 9). In *S. cerevisiae* konnte das Fes1-Protein als Nucleotidaustausch-Faktor identifiziert werden, das

mit dem Ssa1-Chaperon interagieren kann und die Freisetzung von ADP katalysiert (Kabani *et al.*, 2002). In Säugerzellen konnte das HspBP1 (engl. *Hsp70-binding protein 1*) als Fes1-homologes Protein identifiziert werden (Kabani *et al.*, 2002). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass die Interaktion des Proteins mit der ATPase-Domäne des Hsp70-Proteins die Assoziation des Chaperons mit CHIP induziert, so dass ein HspBP1/Hsp70/CHIP-Komplex entsteht. Dies führt zur Abschwächung der Ubiquitin-Ligase-Aktivität des CHIP-Proteins und dadurch zur Stabilisierung des verwendeten Modellsubstrats CFTR (Alberti *et al.*, 2004).

Aufgrund dieser Untersuchungen wurde die Beteiligung des Fes1-Proteins im Abbau faltungsdefekter, cytosolischer DHFR-Modellsubstrate *in vivo* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Abbau des Modellsubstrats DU-D-ha in Abwesenheit des NEF Fes1 stark beeinträchtigt wurde. Dieses Resultat korreliert nicht mit den erwähnten *in vitro* Studien zur Beteiligung des humanen HspBP1-Proteins im Abbau Chaperon-gebundener Substrate. Die *in vivo* Untersuchungen zur Beteiligung des HspBP1-homologen Proteins Fes1 zeigen, dass dessen Aktivität für die effiziente Proteolyse der DHFR-Modellsubstrate notwendig ist. Für die unterschiedlichen Resultate können folgende Erklärungen aufgestellt werden. Zum einen unterscheidet sich die Situation *in vitro*, in der nur eine begrenzte Anzahl und Art der Proteine vorhanden ist, maßgeblich von der dichten makromolekularen Umgebung *in vivo*. Die Regulation der Chaperone ist ein hoch komplexer Prozess in dem viele weitere Cochaperone oder Cofaktoren eine Rolle spielen, die in einem *in vitro*-Experiment nicht erfasst werden können. Alternativ könnte sich der Hsp70-Komplex mit den zugehörigen Cofaktoren in *S. cerevisiae* von dem komplexeren Säugerzellen unterscheiden, so dass HspBP1 und Fes1 zwar eine Homologie (25%), jedoch keine Analogie in der Funktion aufweisen. Diese Hypothese könnte durch die Tatsache unterstützt werden, dass bis jetzt noch keine CHIP-homologen Proteine in der Hefe identifiziert werden konnten.

Die Aktivität des Fes1 als NEF wurde nur für das Ssa1-Chaperon untersucht und gezeigt. Die Deletion des *SSA1*-Gens in Zellen führte jedoch nur zur partiellen Stabilisierung des mutierten Modellsubstrats DU-D-ha. Aufgründessen wurde der Abbau des Substrats in Abwesenheit von Fes1 in Kombination mit Ssa1 bzw. Ssa2 untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede in der Stabilisierung des Testsubstrats in *fes1Δ ssa1Δ* bzw. *fes1Δ ssa2Δ*-Zellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Fes1 wahrscheinlich auch die ATPase-Domäne des Ssa2-Chaperons oder auch der weiteren Mitglieder dieser Familie regulieren kann.

D.3.1.1 Der Abbau des „N-end rule“ und des „UFD“-Testsubstrats wird in Abwesenheit der Hsp70-Chaperone Ssa1 und Ssa2, des Hsp40-Cochaperons Ydj1 und des Fes1-Cofaktors nicht beeinträchtigt

Die molekularen Chaperone der Hsp70-Klasse sind an sehr vielen, unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt (siehe Einleitung). Der Ausfall dieser Chaperone oder deren Cofaktoren führt also zur Beeinträchtigung unterschiedlicher zellulärer Mechanismen und unter Umständen auch zur Beeinträchtigung der allgemeinen Proteolyse verschiedener Substrate. Da in dieser Arbeit die spezifische Proteolyse der cytosolischen, faltungsdefekten Proteine untersucht werden sollte, wurde der Abbau von zwei weiteren, gut charakterisierten Testsubstraten in den oben beschriebenen Zellen verfolgt. Dafür wurden die artifiziellen R-Ura3- und Ub_{V76}-Ura3-Substrate ausgewählt, die über den „N-end rule“-Weg bzw. über den „UFD“-Weg abgebaut werden. Anschließend wurde die Abbaurate dieser Substrate in Mutanten untersucht, in denen die Proteolyse der DHFR-Modellsubstrate beeinträchtigt war.

Beide Testsubstrate wurden in den untersuchten *ssa1Δ ssa2Δ*-, *ydj1-151*- und *fes1Δ*-Zellen effizient abgebaut (Abb. 12, 15, 18). Damit konnte bestätigt werden, dass die Stabilisierung der mutierten DHFR-Modellsubstrate in Abwesenheit der Proteine Ssa1/2, Ydj1 und Fes1 nicht auf indirekte Effekte oder einen allgemeinen Proteolysedefekt zurückzuführen ist. Die Aktivität dieser Chaperone und Chaperon-Cofaktoren ist spezifisch für den Abbau cytosolischer, faltungsdefekter Proteine erforderlich.

D.3.1.2 Ssa1, Ydj1 und Fes1 sind mit der faltungsdefekten DHFR-Domäne assoziiert

Die Fähigkeit der Chaperone selektiv mit faltungsdefekten Proteinen physikalisch zu interagieren ist für deren Proteolyse von entscheidender Bedeutung. Dabei könnten die Chaperone die Aufgabe der Erkennung der Substrate für das UPS übernehmen. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch Ssa1, Ydj1 und Fes1 die mutierten DHFR-Varianten erkennen und mit diesen physikalisch interagieren können. Tatsächlich konnten diese Proteine mit der mutierten DHFR^{mutC}-Variante coimmunpräzipitiert werden. Ob jedoch jedes dieser Proteine die Fähigkeit besitzt, mit der mutierten DHFR direkt zu interagieren, kann mit diesem Experiment nicht beantwortet werden. Wahrscheinlich bildet das Hsp70-Chaperon mit dem Hsp40-Cochaperon Ydj1 und dem NEF Fes1 einen Komplex, der die faltungsdefekte Struktur des DHFR-Proteins in der Zelle erkennt. Dabei könnte das folgende Modell die Funktion der einzelnen Komponenten des Komplexes beschreiben. Das Ydj1-Protein könnte

die faltungsdefekten DHFR-Proteine binden und diese den Hsp70-Chaperonen Ssa1 oder Ssa2 zuführen. Zusätzlich könnte Ydj1 in diesem Prozess die ATPase-Domäne des entsprechenden Chaperons, durch die Stimulierung der ATP-Hydrolyse, regulieren. *In vitro* Studien zeigten, dass Ydj1 in der Tat dem Hsp70-Chaperon-System denaturierte Proteine präsentieren kann (Johnson *et al.*, 2001). Die Assoziation des Fes1-Cofaktors mit dem Ssa1-Chaperon führt dann zu ADP/ATP-Austausch und entscheidet über die Dauer der Substratbindung. Die Abwesenheit eines der Mitglieder führt zur Stabilisierung von faltungsdefekten Proteinen *in vivo*, weil die Bildung oder die Funktion des Komplexes beeinträchtigt ist. Dieses Modell könnte z.B. durch Untersuchungen zur Interaktion von Hsp70-Chaperonen mit mutierten DHFR-Proteinen in *ydj1-151* oder *fes1Δ*-Zellen überprüft werden. Wenn die Rolle des Ydj1 in der Zulieferung der Substrate für die Hsp70-Chaperone besteht, so sollte in dessen Abwesenheit die Assoziation des Ssa1-Chaperons mit DHFR beeinträchtigt sein. In Abwesenheit des Fes1-Proteins wird der ADP/ATP-Austausch von Hsp70-Chaperonen inhibiert. Da die Substratbindung der Hsp70-Chaperone im ADP-gebundenen Zustand stark verlangsamt ist, sollte ebenfalls die Assoziation des Ssa1-Chaperons mit DHFR in *fes1Δ*-Zellen beeinträchtigt sein. Analog kann auch der Einfluss auf die Bindung von Ydj1 und Fes1 mit DHFR in *ssa1Δ ssa2 Δ*-Zellen studiert werden.

D.3.2 Die Rolle der Hsp90-Chaperone in der Beseitigung faltungsdefekter Proteine

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Ssa-Familie der Hsp70-Chaperone und die zugehörigen Chaperon-Cofaktoren Ydj1 und Fes1 für die effiziente Proteolyse der faltungsdefekten DHFR-Modellsubstrate erforderlich sind, wurde die Beteiligung der Hsp90-Klasse der molekularen Chaperone im Abbau dieser Substrate analysiert. Die Beteiligung beider Klassen wurde in der Signaltransduktion genau studiert, in der die Interaktion des Hsp70/Hsp90-Komplexes mit inaktiven Signalproteinen zu deren Aktivierung führt. Diese Interaktion wird durch mehrere Cofaktoren reguliert, u.a. durch Hsp40, Hip (engl. *Hsc70-interacting protein*), Hop (engl. *Hsp70/Hsp90-organizing protein*), p23 und verschiedene Immunophiline. Studien in Säugerzellen zeigten, dass die Interaktion der schon erwähnten CHIP und BAG1-Cofaktoren mit dem Hsp70/Hsp90-Komplex Ubiquitylierung und Abbau bestimmter Substrate vermittelt (Luders *et al.*, 2000; Connell *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2001; Alberti *et al.*, 2003).

Die Hsp90-Klasse der molekularen Chaperone in *S. cerevisiae* ist essentiell und wird durch die Gene *HSC82* und *HSP82* kodiert. Die Beteiligung dieser Chaperone am Abbau falsch gefalteter Proteine wurde daher in Zellen analysiert, die eine temperatursensitive Variante des Hsp82-Chaperons bildeten und in denen das *HSC82*-Gen deletiert wurde. Dabei konnte beobachtet werden, dass die mutierte DHFR-D-ha-Variante in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone stabilisiert wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass auch diese Klasse der Chaperone in der Beseitigung, cytosolischer faltungsdefekter Proteine involviert ist (Abb. 21). Zusätzlich konnte analog der Coimmunpräzipitation-Experimente mit Ssa1, Ydj1 und Fes1 gezeigt werden, dass Hsc82 mit der faltungsdefekten DHFR^{mutC} physikalisch interagiert (Abb. 23). Dies deutet darauf hin, dass die faltungsdefekte DHFR-Domäne nicht nur mit dem Ssa1/Ydj1/Fes1-Komplex sondern auch mit den Hsp90-Chaperonen assoziiert ist. Zusätzlich konnte die Beteiligung verschiedener, mit Hsp90-Chaperonen assoziierte Partnerproteine an der Proteolyse der Modellsubstrate ausgeschlossen werden. Die Abwesenheit der Proteine Aha1, Hch1, Sba1(p23) und Sti1 (Hop in Säugerzellen), die für die ATPase-Aktivität der Hsp90-Chaperone benötigt werden (Fang *et al.*, 1998; Prodromou *et al.*, 1999; Panaretou *et al.*, 2002), führte nicht zur Stabilisierung der Modellsubstrate (Abb. 25). Dies deutet darauf hin, dass die Funktion der Hsp90-Chaperone in verschiedenen zellulären Prozessen durch bestimmte Cofaktoren genau reguliert wird.

Interessanterweise wurden auch die „N-end rule“- und „UFD“-Testsubstrate R-Ura3 und Ub₇₆-Ura3 in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone stark stabilisiert. So könnte die Beeinträchtigung des Abbaus der verwendeten Substrate in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone durch einen allgemeinen Proteolysedefekt, also auch einen indirekten Effekt hervorgerufen werden. Diese Erklärung wird durch einen kürzlich publizierten Artikel gestützt, in dem gezeigt werden konnte, dass die Hsp90-Chaperone eine signifikante Rolle in der Assemblierung und Stabilisierung des 26S-Proteasoms spielen (Imai *et al.*, 2003). Die Autoren konnten u.a. eine Disassemblierung der 26S-Proteasome und damit eine Reduktion der proteolytischen Aktivität beobachten, wenn die Zellen eines temperatursensitiven *hsp90*-Hefestammes einer langen Inkubation (4-8 Stunden) bei der restriktiven Temperatur von 37°C ausgesetzt wurden. Da die Experimente zur Stabilität der Modellsubstrate in dieser Arbeit nur 20 Minuten vor dem „Cycloheximid-Chase“ bei 37°C inkubiert wurden, erschien unwahrscheinlich, dass die Beeinträchtigung der Proteolyse auf diesen Effekt zurückzuführen ist. Alternativ, könnten Hsp90-Chaperone an der Zulieferung von polyubiquitylierten Substraten zum 26S-Proteasom beteiligt sein. Die fehlende Aktivität der Chaperone würde

dann den Abbau ubiquitylierter Substrate beeinträchtigen, während die Beseitigung von Ubiquitin-unabhängigen Substraten durch das Proteasom, weitgehend unbeeinflusst wäre.

Um dies zu überprüfen, wurde die Ornithin-Decarboxylase (ODC), ein Enzym das die Biosynthese von Polyaminen reguliert, als Testsubstrat ausgewählt. Die Anhäufung von Polyaminen in der Zelle führt zur Synthese des Antizymproteins, das an ODC bindet und als Adapterprotein, Ubiquitin-unabhängig den Abbau des ODC-Enzyms durch das 26S-Proteasom vermittelt (Coffino 2001; Palanimurugan *et al.*, 2004). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ODC in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone ungehindert abgebaut wurde. Dieses Resultat deutet eindeutig darauf hin, dass die beobachtete Stabilisierung der mutierten DHFR-Versionen, sowie des „N-end rule“- und „UFD“-Substrats in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone, nicht durch eine Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität oder Stabilität verursacht wurde. Die Aktivität der Hsp90-Chaperone wird daher offenbar für den Abbau von ubiquitylierten Proteinen benötigt. Dabei könnten diese Chaperone als Adapterproteine funktionieren und die ubiquitylierten Substrate dem 26S-Proteasom zuführen.

Diese Hypothese wurde durch weitere Experimente unterstützt, in denen die allgemeine Menge der Ubiquitin-Konjugate als auch die Ubiquitylierung der mutierten DHFR in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone analysiert wurde. Dabei konnte eindeutig eine Akkumulation der Ubiquitin-Konjugate und der ubiquitylierten DHFR^{mutD}-Substrate in *hsp90^{G170D}*-Zellen detektiert werden. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die beiden Klassen der molekularen Chaperone Hsp70 und Hsp90 unterschiedliche Funktionen in der Beseitigung cytosolischer, faltungsdefekter Proteine ausüben. Diese werden in dem nachfolgenden Modell zu Funktionen der Chaperone in der cytosolischen PQC diskutiert.

D.4 Ein Modell für die unterschiedlichen Funktionen der Hsp70- und Hsp90-Klasse molekularer Chaperone in der cytosolischen Protein-Qualitätskontrolle

Die effiziente Proteolyse faltungsdefekter Proteine in *S. cerevisiae* benötigt die Aktivität bestimmter Chaperone und ein funktionierendes Ubiquitin-Proteasom-System. Dieser Zusammenhang ist modellhaft in der Abbildung 31 dargestellt. Die Ubiquitylierung der mutierten Substrate wird durch die E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 vermittelt. Eine Ubiquitin-Proteine-Ligase konnte bis jetzt nicht identifiziert werden. Eine starke

Stabilisierung des mutierten Modellsubstrates konnte in Zellen beobachtet werden, die eine temperatursensitive Variante des Ssa1-Proteins bildeten und in denen die weiteren Mitglieder SSA2-SSA4 deletiert wurden (*ssa1-45*). Anschließend wurde gezeigt, dass die Ssa1- und Ssa2-Proteine für den Abbau des Modellsubstrats hauptverantwortlich sind. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Menge der Ubiquitin-Konjugate in den *ssa1-45*-Zellen reduziert ist (Abb. 26). Aufgründessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Hsp70-Chaperone für die Ubiquitylierung der Substrate erforderlich sind. Die Untersuchungen zur Ubiquitinomöostase in *ssa1Δ ssa2Δ*-Zellen zeigten jedoch, dass die Menge der Ubiquitin-Konjugate in diesen Zellen nicht reduziert ist (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnte keine Reduktion der präzipitierten, ubiquitylierten DHFR^{mutC}-Modellsubstrate beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass in Abwesenheit der Chaperone Ssa1 und Ssa2 in Zellen der Abbau mutierter Proteine zwar beeinträchtigt wird, die Ubiquitylierung der Substrate jedoch möglicherweise durch die zwei weiteren Mitglieder der Familie (Ssa3 und Ssa4) noch vermittelt werden kann. Eventuell führt erst ein Ausfall der kompletten Familie der Hsp70-Chaperone Ssa1-Ssa4 zu einer gravierenden Reduktion der Ubiquitin-Konjugate in der Hefe *S. cerevisiae*. Aufgrund dieser Daten wird deutlich, dass die Aktivität dieser Familie der Chaperone für die Ubiquitinomöostase in Zellen erforderlich ist. Ob diese Chaperone jedoch direkt für die effiziente Ubiquitylierung der faltungsdefekten Substrate benötigt werden, lässt sich daher auf der Basis der vorliegenden Daten nicht mit aller Sicherheit beantworten. Alternativ könnte auch die Störung der Ubiquitinomöostase indirekt zur Inhibition der Proteolyse führen. Experimentell könnte dies z.B. dadurch untersucht werden, dass der Abbau in Mutanten mit defekten Hsp70-System bei gleichzeitiger, erhöhter Expression von Ubiquitin analysiert wird.

Anders als für die Hsp70-Chaperone konnte die Funktion der Hsp90-Chaperone im Abbau faltungsdefekter Substrate präziser angegeben werden. Die Aktivität dieser Chaperone wird nicht nur für die Beseitigung faltungsdefekter Proteine benötigt, sondern auch für andere Substrate, die durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Ubiquitin-unabhängige Abbau des ODC-Proteins in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone nicht gestört wurde. Die Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten und ubiquitylierter DHFR^{mutC}-Substrate in Abwesenheit der Hsp90-Chaperone in *S. cerevisiae*-Zellen beweist, dass diese Klasse der Chaperone nicht für die effiziente Ubiquitylierung der Substrate benötigt wird, sondern wahrscheinlich für die Zulieferung der für den Abbau Ubiquitin-markierten Substrate zum 26S-Proteasomen.

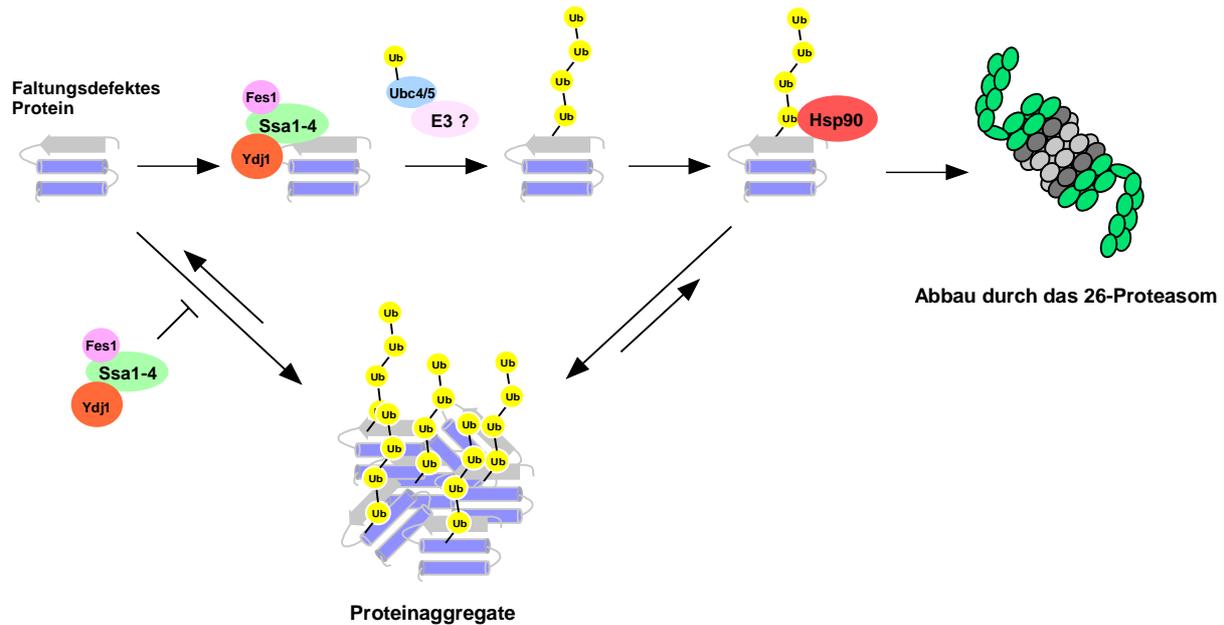


Abb. 31: Modelle für das Protein-Qualitätskontrollsystem im Cytoplast der Hefe *S. cerevisiae*.

Faltungsdefekte Proteine werden für den selektiven Abbau durch das 26S-Proteasom durch die Aktivität des E1-Enzyms Uba1 und der E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 ubiquityliert. Für den effizienten Abbau der faltungsdefekten Proteine wird die Aktivität der Hsp70-Chaperone der Ssa-Familie und der zugehörigen Chaperon-Cofaktoren Ydj1 und Fes1 benötigt. Eine weitere Aufgabe dieser Komponenten, die möglicherweise einen Komplex bilden, besteht in der Verhinderung von Aggregationsprozessen falsch gefalteter Proteine. Die Hsp90-Chaperone sind am Abbau faltungsdefekter Proteine aber auch anderer Substrate beteiligt, nachdem diese erfolgreich für die Proteolyse durch das 26S-Proteasom ubiquityliert wurden. Eine signifikante Rolle in der Prävention der Proteinaggregation konnte nicht beobachtet werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Klassen der molekularen Chaperone Hsp70 und Hsp90 konnte auch im Bezug auf die Bildung von Proteinaggregaten beobachtet werden (Abb. 28 und 29). In Abwesenheit der Chaperone Ssa1 und Ssa2, des Ydj1-Cochaperons und des NEF Fes1 wurde eine verstärkte Aggregation der mutierten DHFR-Proteine beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass diese Proteine, die möglicherweise einen Komplex bilden, auch für die Verhinderung der Aggregationsprozesse benötigt werden. In Abwesenheit der Hsp90-Chaperone konnten keine Unterschiede in der Bildung der Aggregate im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Wenn die Aktivität der Hsp90-Chaperone für die effiziente Proteolyse ubiquitylierter Substrate benötigt wird, würde man allerdings erhöhte Aggregation in Abwesenheit dieser Chaperone erwarten, ähnlich wie es in Proteasom-Mutanten beobachtet werden kann. Eine experimentell gestützte Erklärung für diese Beobachtung kann hier nicht geboten werden, es kann nur darüber spekuliert werden, dass die gestörte Aktivität der Hsp90-Chaperone zur erhöhten Produktion anderer Chaperone führt, die der Bildung der Proteinaggregate entgegenwirken.

E Literaturverzeichnis

- Alberti, S., Bohse, K., Arndt, V., Schmitz, A. and Hohfeld, J. (2004). "The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *Mol Biol Cell* 15(9): 4003-10.
- Alberti, S., Esser, C. and Hohfeld, J. (2003). "BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions." *Cell Stress Chaperones* 8(3): 225-31.
- Alves-Rodrigues, A., Gregori, L. and Figueiredo-Pereira, M. E. (1998). "Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration." *Trends Neurosci* 21(12): 516-20.
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. and White, F. H., Jr. (1961). "The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 47: 1309-14.
- Arendt, C. S. and Hochstrasser, M. (1997). "Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14): 7156-61.
- Arnold, I. and Langer, T. (2002). "Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1592(1): 89-96.
- Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986). "In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue." *Science* 234(4773): 179-86.
- Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L. J., Yin, L. Y. and Patterson, C. (1999). "Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions." *Mol Cell Biol* 19(6): 4535-45.
- Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L. and Pfeifer, G. (1988). "Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase." *FEBS Lett* 241(1-2): 239-45.
- Bercovich, B., Stancovski, I., Mayer, A., Blumenfeld, N., Laszlo, A., Schwartz, A. L. and Ciechanover, A. (1997). "Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70." *J Biol Chem* 272(14): 9002-10.
- Betting, J. and Seufert, W. (1996). "A yeast Ubc9 mutant protein with temperature-sensitive in vivo function is subject to conditional proteolysis by a ubiquitin- and proteasome- dependent pathway." *J Biol Chem* 271(42): 25790-6.
- Bonifacino, J. S. and Weissman, A. M. (1998). "Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways." *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 19-57.
- Bordallo, J., Plemper, R. K., Finger, A. and Wolf, D. H. (1998). "Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins." *Mol Biol Cell* 9(1): 209-22.
- Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J. and Lindquist, S. (1989). "hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures." *Mol Cell Biol* 9(9): 3919-30.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999). "The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity." *Nat Cell Biol* 1(4): 221-6.
- Bukau, B. and Horwich, A. L. (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." *Cell* 92(3): 351-66.
- Caplan, A. J. and Douglas, M. G. (1991). "Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein." *J Cell Biol* 114(4): 609-21.

- Chapman, R. E. and Walter, P. (1997). "Translational attenuation mediated by an mRNA intron." *Curr Biol* 7(11): 850-9.
- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K. and Varshavsky, A. (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." *Science* 243(4898): 1576-83.
- Chen, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S. and Hochstrasser, M. (1993). "Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor." *Cell* 74(2): 357-69.
- Chen, X., Shen, J. and Prywes, R. (2002). "The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi." *J Biol Chem* 277(15): 13045-52.
- Chernoff, Y. O., Lindquist, S. L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S. G. and Liebman, S. W. (1995). "Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]." *Science* 268(5212): 880-4.
- Coffino, P. (2001). "Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation." *Biochimie* 83(3-4): 319-23.
- Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001). "The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins." *Nat Cell Biol* 3(1): 93-6.
- Cox, J. S. and Walter, P. (1996). "A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response." *Cell* 87(3): 391-404.
- Cox, J. S., Shamu, C. E. and Walter, P. (1993). "Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase." *Cell* 73(6): 1197-206.
- Creighton, T. E. (1975). "The two-disulphide intermediates and the folding pathway of reduced pancreatic trypsin inhibitor." *J Mol Biol* 95(2): 167-99.
- Cyr, D. M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2002). "Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold." *Trends Biochem Sci* 27(7): 368-75.
- Demand, J., Alberti, S., Patterson, C. and Hohfeld, J. (2001). "Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling." *Curr Biol* 11(20): 1569-77.
- Dill, K. A. and Chan, H. S. (1997). "From Levinthal to pathways to funnels." *Nat Struct Biol* 4(1): 10-9.
- Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D. and Chan, H. S. (1995). "Principles of protein folding--a perspective from simple exact models." *Protein Sci* 4(4): 561-602.
- Ditzel, L., Huber, R., Mann, K., Heinemeyer, W., Wolf, D. H. and Groll, M. (1998). "Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome." *J Mol Biol* 279(5): 1187-91.
- Dobson, C. M. and Ellis, R. J. (1998). "Protein folding and misfolding inside and outside the cell." *Embo J* 17(18): 5251-4.
- Dohmen, R. J., Stappen, R., McGrath, J. P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A. and Varshavsky, A. (1995). "An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme." *J Biol Chem* 270(30): 18099-109.
- Dohmen, R. J., Strasser, A. W., Honer, C. B. and Hollenberg, C. P. (1991). "An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera." *Yeast* 7(7): 691-2.
- Dubois, M. F., Hovanessian, A. G. and Bensaude, O. (1991). "Heat-shock-induced denaturation of proteins. Characterization of the insolubilization of the interferon-induced p68 kinase." *J Biol Chem* 266(15): 9707-11.

- Eaglestone, S. S., Ruddock, L. W., Cox, B. S. and Tuite, M. F. (2000). "Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI(+)] of *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1): 240-4.
- Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M. and Buchner, J. (1997). "Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation." *Embo J* 16(2): 221-9.
- Ellis, J. (1987). "Proteins as molecular chaperones." *Nature* 328(6129): 378-9.
- Elowitz, M. B., Surette, M. G., Wolf, P. E., Stock, J. B. and Leibler, S. (1999). "Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 181(1): 197-203.
- Esser, C., Alberti, S. and Hohfeld, J. (2004). "Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system." *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 171-88.
- Fang, Y., Fliss, A. E., Rao, J. and Caplan, A. J. (1998). "SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins." *Mol Cell Biol* 18(7): 3727-34.
- Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. and Schreiber, S. L. (1995). "Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin." *Science* 268(5211): 726-31.
- Fink, A. L. (1998). "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid." *Fold Des* 3(1): R9-23.
- Finley, D., Ozkaynak, E. and Varshavsky, A. (1987). "The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses." *Cell* 48(6): 1035-46.
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T. (2000). "A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response." *Nat Cell Biol* 2(7): 379-84.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E. J. and Sztul, E. S. (1999). "Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP- chimera." *J Cell Biol* 146(6): 1239-54.
- Gardner, R. G., Nelson, Z. W. and Gottschling, D. E. (2005). "Degradation-mediated protein quality control in the nucleus." *Cell* 120(6): 803-15.
- Gardner, R. G., Nelson, Z. W. and Gottschling, D. E. (2005). "Degradation-mediated protein quality control in the nucleus." *Cell* 120(6): 803-15.
- Gassler, C. S., Wiederkehr, T., Brehmer, D., Bukau, B. and Mayer, M. P. (2001). "Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor." *J Biol Chem* 276(35): 32538-44.
- Geissler, S., Siegers, K. and Schiebel, E. (1998). "A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin." *Embo J* 17(4): 952-66.
- Gething, M. J. and Sambrook, J. (1992). "Protein folding in the cell." *Nature* 355(6355): 33-45.
- Gietz, R. D. and Sugino, A. (1988). "New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites." *Gene* 74(2): 527-34.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. and Woods, R. A. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure." *Yeast* 11(4): 355-60.
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." *Physiol Rev* 82(2): 373-428.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. and Finley, D. (1998). "The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome." *Mol Cell Biol* 18(6): 3149-62.

- Glover, J. R. and Lindquist, S. (1998). "Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins." *Cell* 94(1): 73-82.
- Goeckeler, J. L., Stephens, A., Lee, P., Caplan, A. J. and Brodsky, J. L. (2002). "Overexpression of yeast Hsp110 homolog Sse1p suppresses ydj1-151 thermosensitivity and restores Hsp90-dependent activity." *Mol Biol Cell* 13(8): 2760-70.
- Goldberg, A. L. (2003). "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins." *Nature* 426(6968): 895-9.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A. P., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (1999). "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13732-7.
- Gottesman, S. (1989). "Genetics of proteolysis in *Escherichia coli**." *Annu Rev Genet* 23: 163-98.
- Gragerov, A. I., Martin, E. S., Krupenko, M. A., Kashlev, M. V. and Nikiforov, V. G. (1991). "Protein aggregation and inclusion body formation in *Escherichia coli* rpoH mutant defective in heat shock protein induction." *FEBS Lett* 291(2): 222-4.
- Grammatikakis, N., Lin, J. H., Grammatikakis, A., Tsiachlis, P. N. and Cochran, B. H. (1999). "p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function." *Mol Cell Biol* 19(3): 1661-72.
- Gruebele, M. (2002). "Protein folding: the free energy surface." *Curr Opin Struct Biol* 12(2): 161-8.
- Haas, A. L. and Rose, I. A. (1982). "The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis." *J Biol Chem* 257(17): 10329-37.
- Haase-Pettingell, C. A. and King, J. (1988). "Formation of aggregates from a thermolabile in vivo folding intermediate in P22 tailspike maturation. A model for inclusion body formation." *J Biol Chem* 263(10): 4977-83.
- Hampton, R. Y. (2002). "ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation." *Curr Opin Cell Biol* 14(4): 476-82.
- Hampton, R. Y. and Rine, J. (1994). "Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast." *J Cell Biol* 125(2): 299-312.
- Hansen, W. J., Cowan, N. J. and Welch, W. J. (1999). "Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins." *J Cell Biol* 145(2): 265-77.
- Hardesty, B. and Kramer, G. (2001). "Folding of a nascent peptide on the ribosome." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 41-66.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. and Ron, D. (2000). "Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response." *Mol Cell* 5(5): 897-904.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Nature* 381(6583): 571-9.
- Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." *Science* 295(5561): 1852-8.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. and Buchner, J. (1999). "Hsp26: a temperature-regulated chaperone." *Embo J* 18(23): 6744-51.
- Hatakeyama, S. and Nakayama, K. I. (2003). "U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases." *Biochem Biophys Res Commun* 302(4): 635-45.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. and Nakayama, K. I. (2001). "U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases." *J Biol Chem* 276(35): 33111-20.

- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. and Wolf, D. H. (1997). "The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing." *J Biol Chem* 272(40): 25200-9.
- Hendrick, J. P. and Hartl, F. U. (1993). "Molecular chaperone functions of heat-shock proteins." *Annu Rev Biochem* 62: 349-84.
- Hernandez, M. P., Sullivan, W. P. and Toft, D. O. (2002). "The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex." *J Biol Chem* 277(41): 38294-304.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1992). "The ubiquitin system for protein degradation." *Annu Rev Biochem* 61: 761-807.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* 67: 425-79.
- Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 195-201.
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M. and Wolf, D. H. (1996). "ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway." *Science* 273(5282): 1725-8.
- Hjelmeland, L. M. and Chrambach, A. (1984). "Solubilization of functional membrane proteins." *Methods Enzymol* 104: 305-18.
- Ho, A. K., Racznik, G. A., Ives, E. B. and Wentz, S. R. (1998). "The integral membrane protein snl1p is genetically linked to yeast nuclear pore complex function." *Mol Biol Cell* 9(2): 355-73.
- Hochstrasser, M. (1996). "Ubiquitin-dependent protein degradation." *Annu Rev Genet* 30: 405-39.
- Hohfeld, J. and Jentsch, S. (1997). "GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1." *Embo J* 16(20): 6209-16.
- Hohfeld, J., Cyr, D. M. and Patterson, C. (2001). "From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation." *EMBO Rep* 2(10): 885-90.
- Horwitz, J. (1992). "Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10449-53.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S. and Howley, P. M. (1995). "A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 5249.
- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I. and Tanaka, K. (2003). "The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome." *Embo J* 22(14): 3557-67.
- Jaenicke, R. (1996). "Protein folding and association: in vitro studies for self-organization and targeting in the cell." *Curr Top Cell Regul* 34: 209-314.
- Jaenicke, R. and Rudolph, R. (1986). "Refolding and association of oligomeric proteins." *Methods Enzymol* 131: 218-50.
- Jakob, C. A., Burda, P., Roth, J. and Aebi, M. (1998). "Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure." *J Cell Biol* 142(5): 1223-33.
- Jakob, U. and Buchner, J. (1994). "Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones." *Trends Biochem Sci* 19(5): 205-11.
- James, P., Pfund, C. and Craig, E. A. (1997). "Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones." *Science* 275(5298): 387-9.
- Jariel-Encontre, I., Pariat, M., Martin, F., Carillo, S., Salvat, C. and Piechaczyk, M. (1995). "Ubiquitylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26 S proteasome." *J Biol Chem* 270(19): 11623-7.

- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H. and Sommer, T. (2002). "Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48." *Nat Cell Biol* 4(2): 134-9.
- Jensen, T. J., Loo, M. A., Pind, S., Williams, D. B., Goldberg, A. L. and Riordan, J. R. (1995). "Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing." *Cell* 83(1): 129-35.
- Jiang, J., Ballinger, C. A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D. M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001). "CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation." *J Biol Chem* 276(46): 42938-44.
- Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M. and Varshavsky, A. (1995). "A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal." *J Biol Chem* 270(29): 17442-56.
- Johnson, F. B., Sinclair, D. A. and Guarente, L. (1999). "Molecular biology of aging." *Cell* 96(2): 291-302.
- Johnson, J. L. and Craig, E. A. (2001). "An essential role for the substrate-binding region of Hsp40s in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* 152(4): 851-6.
- Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R. (1998). "Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins." *J Cell Biol* 143(7): 1883-98.
- Kabani, M., Beckerich, J. M. and Brodsky, J. L. (2002). "Nucleotide exchange factor for the yeast Hsp70 molecular chaperone Ssa1p." *Mol Cell Biol* 22(13): 4677-89.
- Kabani, M., McLellan, C., Raynes, D. A., Guerriero, V. and Brodsky, J. L. (2002). "HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor." *FEBS Lett* 531(2): 339-42.
- Kampinga, H. H., Brunsting, J. F., Stege, G. J., Burgman, P. W. and Konings, A. W. (1995). "Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins." *Exp Cell Res* 219(2): 536-46.
- Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1997). "Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response." *Mol Biol Cell* 8(10): 1845-62.
- Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1998). "Unconventional splicing of HAC1/ERN4 mRNA required for the unfolded protein response. Sequence-specific and non-sequential cleavage of the splice sites." *J Biol Chem* 273(3): 1802-7.
- Kazemi-Esfarjani, P. and Benzer, S. (2000). "Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*." *Science* 287(5459): 1837-40.
- Kelley, W. L. (1998). "The J-domain family and the recruitment of chaperone power." *Trends Biochem Sci* 23(6): 222-7.
- Kim, K. K., Kim, R. and Kim, S. H. (1998). "Crystal structure of a small heat-shock protein." *Nature* 394(6693): 595-9.
- Kimura, Y., Yahara, I. and Lindquist, S. (1995). "Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing Hsp90-mediated signal transduction pathways." *Science* 268(5215): 1362-5.
- Klemes, Y., Etlinger, J. D. and Goldberg, A. L. (1981). "Properties of abnormal proteins degraded rapidly in reticulocytes. Intracellular aggregation of the globin molecules prior to hydrolysis." *J Biol Chem* 256(16): 8436-44.
- Klumpp, M., Baumeister, W. and Essen, L. O. (1997). "Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin." *Cell* 91(2): 263-70.
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K. and Wolf, D. H. (1996). "Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast." *Embo J* 15(4): 753-63.

- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (1999). "Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines." *Yeast* 15(10B): 963-72.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U. and Jentsch, S. (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." *Cell* 96(5): 635-44.
- Krobitsch, S. and Lindquist, S. (2000). "Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1589-94.
- Kubota, H., Hynes, G. and Willison, K. (1995). "The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol." *Eur J Biochem* 230(1): 3-16.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Langer, T. and Neupert, W. (1991). "Heat shock proteins hsp60 and hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins." *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 3-30.
- Langer, T. and Neupert, W. (1996). "Regulated protein degradation in mitochondria." *Experientia* 52(12): 1069-76.
- Lee, A. S. (1992). "Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family." *Curr Opin Cell Biol* 4(2): 267-73.
- Lee, D. H., Sherman, M. Y. and Goldberg, A. L. (1996). "Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 16(9): 4773-81.
- Lee, G. J. and Vierling, E. (2000). "A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein." *Plant Physiol* 122(1): 189-98.
- Liang, P. and MacRae, T. H. (1997). "Molecular chaperones and the cytoskeleton." *J Cell Sci* 110 (Pt 13): 1431-40.
- Liberek, K., Marszałek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1991). "Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2874-8.
- Lindquist, S. (1986). "The heat-shock response." *Annu Rev Biochem* 55: 1151-91.
- Liu, C. W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N. and Thomas, P. J. (2003). "Endoproteolytic activity of the proteasome." *Science* 299(5605): 408-11.
- London, J., Skrzynia, C. and Goldberg, M. E. (1974). "Renaturation of Escherichia coli tryptophanase after exposure to 8 M urea. Evidence for the existence of nucleation centers." *Eur J Biochem* 47(2): 409-15.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. and Weissman, A. M. (1999). "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11364-9.
- Lorimer, G. H. (1996). "A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo." *Faseb J* 10(1): 5-9.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995). "Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution [see comments]." *Science* 268(5210): 533-9.
- Lu, Z. and Cyr, D. M. (1998). "Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1." *J Biol Chem* 273(43): 27824-30.

- Lu, Z. and Cyr, D. M. (1998). "The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding." *J Biol Chem* 273(10): 5970-8.
- Luders, J., Demand, J. and Hohfeld, J. (2000). "The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome." *J Biol Chem* 275(7): 4613-7.
- McCracken, A. A. and Brodsky, J. L. (1996). "Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP." *J Cell Biol* 132(3): 291-8.
- McDonough, H. and Patterson, C. (2003). "CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems." *Cell Stress Chaperones* 8(4): 303-8.
- McGrath, J. P., Jentsch, S. and Varshavsky, A. (1991). "UBA1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme." *Embo J* 10(1): 227-36.
- McMillan, D. R., Gething, M. J. and Sambrook, J. (1994). "The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling." *Curr Opin Biotechnol* 5(5): 540-5.
- Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M. and Cyr, D. M. (2001). "The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation." *Nat Cell Biol* 3(1): 100-5.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M. J. and Sambrook, J. (1993). "A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus." *Cell* 74(4): 743-56.
- Morimoto, R. I. (1998). "Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators." *Genes Dev* 12(24): 3788-96.
- Morimoto, R. I., Sarge, K. D. and Abravaya, K. (1992). "Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses." *J Biol Chem* 267(31): 21987-90.
- Muchowski, P. J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E. E., Hayer-Hartl, M. K. and Hartl, F. U. (2000). "Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7841-6.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1992). "Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination." *Nature* 360(6404): 597-9.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. and Tanaka, K. (2001). "CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein." *EMBO Rep* 2(12): 1133-8.
- Ng, D. T., Spear, E. D. and Walter, P. (2000). "The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control." *J Cell Biol* 150(1): 77-88.
- Nelson, R. J., Heschl, M. F. and Craig, E. A. (1992). "Isolation and characterization of extragenic suppressors of mutations in the SSA hsp70 genes of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 131(2): 277-85.
- Nelson, R. J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. and Craig, E. A. (1992). "The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis." *Cell* 71(1): 97-105.
- Nikawa, J., Akiyoshi, M., Hirata, S. and Fukuda, T. (1996). "*Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression." *Nucleic Acids Res* 24(21): 4222-6.
- Obermann, W. M., Sonderrmann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P. and Hartl, F. U. (1998). "In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis." *J Cell Biol* 143(4): 901-10.
- Orlowski, M. (1990). "The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system." *Biochemistry* 29(45): 10289-97.

- Pahl, A., Brune, K. and Bang, H. (1997). "Fit for life? Evolution of chaperones and folding catalysts parallels the development of complex organisms." *Cell Stress Chaperones* 2(2): 78-86.
- Palanimurugan, R., Scheel, H., Hofmann, K. and Dohmen, R. J. (2004). "Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme." *Embo J* 23(24): 4857-67.
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. and Pearl, L. H. (1998). "ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo." *Embo J* 17(16): 4829-36.
- Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J. K., Singh, S., Millson, S. H., Clarke, P. A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Cramer, R., Mollapour, M., Workman, P., Piper, P. W., Pearl, L. H. and Prodromou, C. (2002). "Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1." *Mol Cell* 10(6): 1307-18.
- Parsell, D. A. and Sauer, R. T. (1989). "The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 264(13): 7590-5.
- Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B. A., Lopez-Buesa, P., Walter, W. A., Wiedmann, M. and Craig, E. A. (1998). "The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex." *Embo J* 17(14): 3981-9.
- Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." *Annu Rev Biochem* 70: 503-33.
- Platt, T., Miller, J. H. and Weber, K. (1970). "In vivo degradation of mutant lac repressor." *Nature* 228(277): 1154-6.
- Plempner, R. K. and Wolf, D. H. (1999). "Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome." *Mol Biol Rep* 26(1-2): 125-30.
- Plempner, R. K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. and Wolf, D. H. (1997). "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation." *Nature* 388(6645): 891-5.
- Pratt, W. B. (1997). "The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 297-326.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D. N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J. E., Piper, P. W. and Pearl, L. H. (1999). "Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones." *Embo J* 18(3): 754-62.
- Prouty, W. F. and Goldberg, A. L. (1972). "Fate of abnormal proteins in *E. coli* accumulation in intracellular granules before catabolism." *Nat New Biol* 240(100): 147-50.
- Prouty, W. F., Karnovsky, M. J. and Goldberg, A. L. (1975). "Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs." *J Biol Chem* 250(3): 1112-22.
- Ramos, P. C., Hockendorff, J., Johnson, E. S., Varshavsky, A. and Dohmen, R. J. (1998). "Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly." *Cell* 92(4): 489-99.
- Raynes, D. A. and Guerriero, V., Jr. (1998). "Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein." *J Biol Chem* 273(49): 32883-8.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegge, C. and Jentsch, S. (2005). "A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting." *Cell* 120(1): 73-84.
- Richmond, C., Gorbea, C. and Rechsteiner, M. (1997). "Specific interactions between ATPase subunits of the 26 S protease." *J Biol Chem* 272(20): 13403-11.

- Rivett, A. J. (1989). "The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities." *J Biol Chem* 264(21): 12215-9.
- Robzyk, K. and Kassir, Y. (1992). "A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast." *Nucleic Acids Res* 20(14): 3790.
- Rosenberg-Hasson, Y., Bercovich, Z., Ciechanover, A. and Kahana, C. (1989). "Degradation of ornithine decarboxylase in mammalian cells is ATP dependent but ubiquitin independent." *Eur J Biochem* 185(2): 469-74.
- Rudiger, S., Schneider-Mergener, J. and Bukau, B. (2001). "Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone." *Embo J* 20(5): 1042-50.
- Rutkowski, D. T. and Kaufman, R. J. (2004). "A trip to the ER: coping with stress." *Trends Cell Biol* 14(1): 20-8.
- Sadis, S., Atienza, C., Jr. and Finley, D. (1995). "Synthetic signals for ubiquitin-dependent proteolysis." *Mol Cell Biol* 15(8): 4086-94.
- Sanchez, Y. and Lindquist, S. L. (1990). "HSP104 required for induced thermotolerance." *Science* 248(4959): 1112-5.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Scheffner, M., Nuber, U. and Huibregtse, J. M. (1995). "Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade." *Nature* 373(6509): 81-3.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. and Howley, P. M. (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* 63(6): 1129-36.
- Schroder, H., Langer, T., Hartl, F. U. and Bukau, B. (1993). "DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage." *Embo J* 12(11): 4137-44.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. (2000). "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." *Nature* 404(6779): 770-4.
- Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. and Baumeister, W. (1995). "Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease." *Science* 268(5210): 579-82.
- Seufert, W. and Jentsch, S. (1990). "Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins." *Embo J* 9(2): 543-50.
- Shamu, C. E. and Walter, P. (1996). "Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus." *Embo J* 15(12): 3028-39.
- Shamu, C. E., Cox, J. S. and Walter, P. (1994). "The unfolded-protein-response pathway in yeast." *Trends Cell Biol* 4(2): 56-60.
- Sherman, M. Y. and Goldberg, A. L. (2001). "Cellular Defenses against Unfolded Proteins. A Cell Biologist Thinks about Neurodegenerative Diseases." *Neuron* 29(1): 15-32.
- Shortle, D. (1996). "The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability." *Faseb J* 10(1): 27-34.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 122(1): 19-27.

- Sommer, T. and Jentsch, S. (1993). "A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum." *Nature* 365(6442): 176-9.
- Sommer, T. and Wolf, D. H. (1997). "Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return." *Faseb J* 11(14): 1227-33.
- Sommer, T. and Wolf, D. H. (1997). "Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return." *Faseb J* 11(14): 1227-33.
- Sondermann, H., Ho, A. K., Listenberger, L. L., Siegers, K., Moarefi, I., Wentz, S. R., Hartl, F. U. and Young, J. C. (2002). "Prediction of novel Bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 277(36): 33220-7.
- Stoldt, V., Rademacher, F., Kehren, V., Ernst, J. F., Pearce, D. A. and Sherman, F. (1996). "Review: the Cct eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts." *Yeast* 12(6): 523-9.
- Swanson, R., Locher, M. and Hochstrasser, M. (2001). "A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation." *Genes Dev* 15(20): 2660-74.
- Taylor, J. P., Hardy, J. and Fischbeck, K. H. (2002). "Toxic proteins in neurodegenerative disease." *Science* 296(5575): 1991-5.
- Tran, P. B. and Miller, R. J. (1999). "Aggregates in neurodegenerative disease: crowds and power?" *Trends Neurosci* 22(5): 194-7.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S. and Walter, P. (2000). "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." *Cell* 101(3): 249-58.
- Trombetta, E. S. and Parodi, A. J. (2003). "Quality control and protein folding in the secretory pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 649-76.
- Ungermann, C., Neupert, W. and Cyr, D. M. (1994). "The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria." *Science* 266(5188): 1250-3.
- Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L. and Cowan, N. J. (1998). "Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin." *Cell* 93(5): 863-73.
- Veitshans, T., Klimov, D. and Thirumalai, D. (1997). "Protein folding kinetics: timescales, pathways and energy landscapes in terms of sequence-dependent properties." *Fold Des* 2(1): 1-22.
- Wall, D., Zylitz, M. and Georgopoulos, C. (1994). "The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication." *J Biol Chem* 269(7): 5446-51.
- Wang, G., Yang, J. and Huijbregtse, J. M. (1999). "Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase." *Mol Cell Biol* 19(1): 342-52.
- Warrick, J. M., Chan, H. Y., Gray-Board, G. L., Chai, Y., Paulson, H. L. and Bonini, N. M. (1999). "Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70." *Nat Genet* 23(4): 425-8.
- Weber-Ban, E. U., Reid, B. G., Miranker, A. D. and Horwich, A. L. (1999). "Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA." *Nature* 401(6748): 90-3.
- Werner-Washburne, M., Stone, D. E. and Craig, E. A. (1987). "Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 7(7): 2568-77.
- Werner-Washburne, M. and Craig, E. A. (1989). "Expression of members of the *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 multigene family." *Genome* 31(2): 684-9.

- Werner-Washburne, M., Stone, D. E. and Craig, E. A. (1987). "Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 7(7): 2568-77.
- Wetzel, R. (1994). "Mutations and off-pathway aggregation of proteins." *Trends Biotechnol* 12(5): 193-8.
- Wetlaufer, D. B. (1973). "Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(3): 697-701.
- Wetzel, R. (1994). "Mutations and off-pathway aggregation of proteins." *Trends Biotechnol* 12(5): 193-8.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. and Gottesman, S. (1999). "Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins." *Science* 286(5446): 1888-93.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. and Ploegh, H. L. (1996). "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." *Nature* 384(6608): 432-8.
- Wojcik, C., Schroeter, D., Wilk, S., Lamprecht, J. and Paweletz, N. (1996). "Ubiquitin-mediated proteolysis centers in HeLa cells: indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome." *Eur J Cell Biol* 71(3): 311-8.
- Wolynes, P., Luthey-Schulten, Z. and Onuchic, J. (1996). "Fast-folding experiments and the topography of protein folding energy landscapes." *Chem Biol* 3(6): 425-32.
- Yamamoto, A., Lucas, J. J. and Hen, R. (2000). "Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease." *Cell* 101(1): 57-66.
- Yewdell, J. W. (2001). "Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing." *Trends Cell Biol* 11(7): 294-7.
- Yan, W., Schilke, B., Pfund, C., Walter, W., Kim, S. and Craig, E. A. (1998). "Zuotin, a ribosome-associated DnaJ molecular chaperone." *Embo J* 17(16): 4809-17.
- Young, J. C. and Hartl, F. U. (2000). "Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23." *Embo J* 19(21): 5930-40.
- Zhong, T. and Arndt, K. T. (1993). "The yeast SIS1 protein, a DnaJ homolog, is required for the initiation of translation." *Cell* 73(6): 1175-86.
- Zhou, M. and Schekman, R. (1999). "The engagement of Sec61p in the ER dislocation process." *Mol Cell* 4(6): 925-34.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E. and Hendrickson, W. A. (1996). "Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK." *Science* 272(5268): 1606-14.
- Zhang, Y., Nijbroek, G., Sullivan, M. L., McCracken, A. A., Watkins, S. C., Michaelis, S. and Brodsky, J. L. (2001). "Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast." *Mol Biol Cell* 12(5): 1303-14.

F Abkürzungsverzeichnis

Für chemische Elemente und physikalische Einheiten wurden die international gültigen Zeichen verwendet. Folgende Abkürzungen wurden zusätzlich verwendet.

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ARS	Autonom replizierende Sequenz
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	Zirka
CCT	engl. <i>Chaperonin Containing TCP1</i>
CEN	Centromersequenz
Cys bzw. C	Cystein
Da	Dalton
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dXTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FES1	engl. <i>factor exchange for Ssa1</i>
GFP	Grün-floreszierendes Protein
ha	Hämagglutinin-Epitop
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HSE	Hitzeschock-Element
HSF	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
His bzw. H	Histidin
KDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani (Vollmedium für <i>E. coli</i>)
M bzw. Met	Methionin
MG132	Carboxybenzoyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
min	Minute

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	„open reading frame“, offenes Leseraster
PBS	engl. <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R bzw. Arg	Arginin
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SSA	engl. <i>stress-seventy subfamily A</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
std	Stunde
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
ts	temperatursensitiv
Ub	Ubiquitin
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
UV	ultraviolett
w/v	Masse/Volumen-Verhältnis (weight/volume)
YDJ1	engl. <i>yeast dnaJ</i>
YPD	„Yeast“ (Hefe-)Extrakt, Pepton, Dextrose

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen für die Überlassung des Themas, die Betreuung dieser Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die experimentellen Anregungen während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Langer möchte ich ganz besonders für die Übernahme des Koreferates danken.

Ein großer Dank gilt Markus London für die freundschaftlichen Diskussionen und fachlichen Ratschläge sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Dohmen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie danke ich für ihre fortwährende Unterstützung, vor allem mit Nahrungsmitteln.

Und schließlich danke ich meiner Freundin Ania für ihre seelisch-moralische Unterstützung. Sie hat mich vor allem in den letzten Monaten ausgehalten. Das muss Liebe sein!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen betreut worden.

Köln, Mai 2005

Marceli Fröhlich

Lebenslauf

Name Marcell Stanislaw Fröhlich
Geburtsdatum 13.11.1973
Geburtsort Kreuzburg / Polen
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

09/1980-06/1988 Volksschule Oberkuzendorf / Polen
09/1988-06/1991 Katholische Hauptschule / Köln
09/1991-06/1995 Genoveva Gymnasium / Köln

Zivildienst

07/1995-07/1996 Marie-Juchacz Altenzentrum / Köln

Berufsausbildung

10/1996-11/2001 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Diplomarbeit im Institut für Genetik bei
Prof. Dr. R.J. Dohmen mit dem Thema
„Genetische Studien zum Abbau faltungsdefekter
Proteine“

seit 01/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für
Genetik der Universität zu Köln bei
Prof. Dr. R.J. Dohmen
Promotion mit dem Thema
„Funktionen molekularer Chaperone in der
Qualitätskontrolle zytosolischer Proteine“