

Technische Universität München

Department Chemie

Lehrstuhl für Biotechnologie

**Einfluss von Mutationen und niedermolekularen  
Modulatoren auf den konformationellen  
Zyklus von Hsp90**

Bettina Karolina Zierer

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Itzen

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner  
2. Univ.-Prof. Dr. M. Sattler

Die Dissertation wurde am 19.06.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 29.08.2013 angenommen.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Proteinfaltung in der Zelle und Chaperone.....	1
1.2	Das Chaperon Hsp90 .....	4
1.2.1	Struktur von Hsp90 .....	4
1.2.2	Konformationsänderungen von Hsp90.....	7
1.2.3	Cochaperone.....	10
1.2.4	Hsp90 und seine <i>client</i> -Proteine.....	15
1.3	Inhibition von Hsp90 als Anti-Tumor-Strategie .....	17
1.3.1	Rolle von Hsp90 in Krebszellen .....	17
1.3.2	Modulatoren von Hsp90.....	19
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1	Material.....	25
2.1.1	Oligodesoxynukleotide .....	25
2.1.2	Bakterien-, Hefestämme und Plasmide .....	26
2.1.3	Nährmedien .....	29
2.1.4	Enzyme.....	29
2.1.5	Chemikalien .....	30
2.1.6	Größenstandards und Kits.....	30
2.1.7	Verbrauchsmaterialien .....	30
2.1.8	Geräte .....	31
2.1.9	Computersoftware .....	31
2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Elektrophoretische Methoden .....	32
2.2.1.1	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.2.1.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	32
2.2.2	Präparation von Plasmiden.....	33
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.2.3.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten .....	34
2.2.3.2	Kolonie-PCR.....	34
2.2.3.3	<i>Blunt-end</i> -Mutagenese .....	35
2.2.4	Transformation von <i>E.coli</i> Zellen .....	36
2.2.4.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	36
2.2.4.2	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	36
2.2.5	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	37

2.2.6	Umklonieren der Hsp90-Varianten .....	37
2.2.6.1	Amplifikation aus pet28 .....	37
2.2.6.2	Restriktion .....	37
2.2.6.3	Ligation .....	38
2.2.7	Proteinexpression und Reinigung der Hsp90-Varianten .....	38
2.2.7.1	Fermentation und Zellaufschluss .....	38
2.2.7.2	Ni-NTA-Affinitätschromatographie .....	39
2.2.7.3	ResourceQ Anionenaustauschchromatographie .....	39
2.2.7.4	Hydroxylapatit-Chromatographie .....	40
2.2.7.5	Gelfiltrationschromatographie .....	40
2.2.8	Proteinexpression und Reinigung weiter Proteine .....	41
2.2.9	Proteinlabeling .....	42
2.2.10	Spektroskopische Charakterisierung .....	43
2.2.10.1	Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung .....	43
2.2.10.2	Bestimmung der Labelingeffizienz .....	43
2.2.10.3	Circulardichroismus (CD)-Spektren .....	44
2.2.11	Bestimmung der konformationellen Stabilität .....	45
2.2.12	Regenerativer ATPase Assay .....	45
2.2.12.1	Affinität für ATP .....	46
2.2.12.2	Bestimmung von apparenten $K_D$ -Werten .....	46
2.2.13	Förster-Resonanz-Energie-Transfer .....	47
2.2.13.1	FRET-Spektren .....	48
2.2.13.2	Kinetische Analyse Nukleotid-induzierter Konformationsänderungen .....	48
2.2.13.3	<i>Stopped-flow</i> Analyse Nukleotid-induzierter Konformationsänderungen .....	49
2.2.13.4	Stabilität der N-terminalen Dimerisierung von Hsp90 .....	50
2.2.14	Analytische Ultrazentrifugation .....	51
2.2.15	Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) .....	52
2.2.16	<i>Small angle X-ray scattering</i> (SAXS) .....	53
2.2.17	Screening nach Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen .....	53
2.2.18	<i>In vivo</i> Assays .....	54
2.2.18.1	Plasmid <i>Shuffling</i> .....	54
2.2.18.2	Temperatur-Sensitivität .....	55
2.2.18.3	Toleranz gegenüber UV und Radicol-Stress .....	55
2.2.18.4	Test auf <i>client</i> -Prozessierung: v-Src .....	55
2.2.18.5	Test auf <i>client</i> -Prozessierung: GR .....	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse &amp; Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Analyse ausgewählter Hsp90-Varianten .....</b>	<b>59</b>
3.1.1	Einfluss der Mutationen auf Struktur und Funktion von Hsp90 .....	61

---

3.1.2	Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen von Hsp90 .....	68
3.1.2.1	Gleichgewichtszustände (FRET-Spektren) .....	70
3.1.2.2	Kinetische Analyse der Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen .....	73
3.1.3	Globale Analyse der Konformationsänderungen der Hsp90-Varianten.....	75
3.1.4	N-terminale Dimerisierung der Hsp90-Varianten.....	80
3.1.5	Bindung der Cochaperone Aha1 und Sba1/p23 .....	83
3.1.6	<i>Small angle X-ray scattering (SAXS)</i> .....	86
<b>3.2</b>	<b>Einfluss der Mutationen auf <i>in vivo</i> Funktionalität von Hsp90 .....</b>	<b>89</b>
3.2.1	Lebensfähigkeit.....	89
3.2.2	Toleranz gegenüber Stress .....	91
3.2.3	Prozessierung von v-Src als ausgewählter Hsp90 <i>client</i> .....	95
<b>3.3</b>	<b>Diskussion der Hsp90 Konformationsanalyse .....</b>	<b>96</b>
<b>3.4</b>	<b>Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen .....</b>	<b>103</b>
3.4.1	FRET-basierter <i>Screen</i> nach niedermolekularen Modulatoren von yHsp90.....	103
3.4.2	Charakterisierung der Hsp90 Modulatoren.....	108
3.4.2.1	1 A2 bindet in die Nukleotidbindetasche .....	108
3.4.2.2	28 E3 inhibiert durch Bildung löslicher Oligomere .....	109
3.4.2.3	Einfluss der Modulatoren auf die Konformation von yHsp90 .....	111
3.4.2.4	Einfluss der Hsp90 Modulatoren auf Aha1 und Sba1/p23 Interaktion.....	114
3.4.2.5	Mechanismus der Aktivierung von Hsp90.....	119
3.4.2.6	Bindestelle der Hsp90 Modulatoren.....	120
3.4.2.7	Spezifität der identifizierten Hsp90 Modulatoren .....	122
3.4.2.8	Einfluss der Hsp90 Modulatoren auf <i>client</i> -Prozessierung <i>in vivo</i> .....	123
<b>3.5</b>	<b>Diskussion der Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen .....</b>	<b>126</b>
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>131</b>
<b>5</b>	<b>Summary .....</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>134</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>139</b>



---

# 1 Einleitung<sup>1</sup>

## 1.1 Proteinfaltung in der Zelle und Chaperone

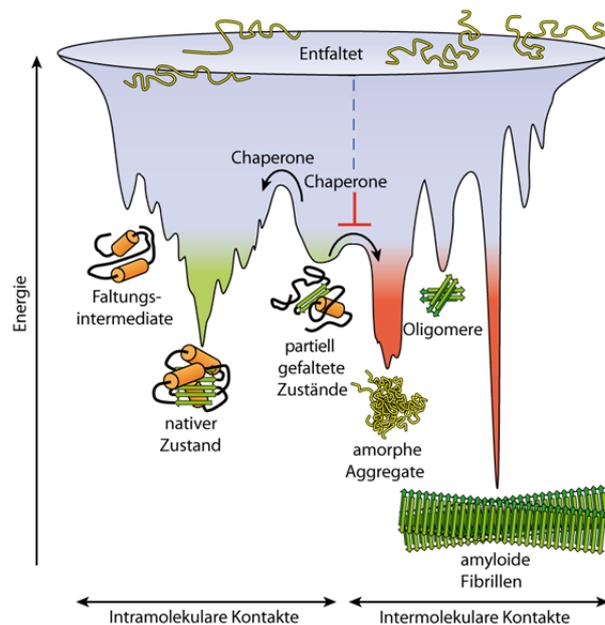
Um ihre Funktion ausüben zu können, müssen Proteine ihre korrekte räumliche Struktur einnehmen. Da einige ungefaltete Proteine in der Lage sind *in vitro* spontan ihren nativen Zustand einzunehmen, wurde angenommen, dass die Abfolge der Aminosäuren (Primärsequenz) die dreidimensionale Struktur der Proteine bestimmt (Anfinsen, 1973). Für ein Protein ist es jedoch zeitlich nicht möglich, alle möglichen Zustände „auszuprobieren“. Daraus schloss Levinthal, dass Proteine über spezifische Faltungswege falten müssen (Zwanzig *et al.*, 1992). Bei einer spontanen Faltung kollabiert die Polypeptidkette schnell, angetrieben davon hydrophobe Flächen zu verbergen. Die Vielfalt an funktionellen Gruppen, die in den Proteinen enthalten sind, ermöglicht durch Ausbildung von nichtkovalenten Wechselwirkung die Anordnung der Polypeptidkette in Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Die Tertiärstruktur wird dann gebildet, indem die verschiedenen Sekundärstrukturelemente miteinander interagieren, bis sie schließlich eine definierte räumliche Position einzunehmen (Daggett und Fersht, 2003; Dill und MacCallum, 2012). Während dieses Prozesses kann die Polypeptidkette auch definierte kinetische Intermediatzustände einnehmen, bis schließlich der native und energetisch günstigste Zustand erreicht ist (Dill *et al.*, 1995; Hartl, 1996). Der Tatsache, dass es eine Vielzahl an nicht nativen Interaktionen und Zustände gibt, wird in neuen Faltungsmodellen Rechnung getragen, indem der Faltungsweg eines Proteins mit einer Energielandschaft ähnlich einem Trichter verglichen wird (**Abbildung 1-1**), der eine Vielzahl an Intermediatzuständen und Wegen darstellt, auf welchen ein Protein seine native Struktur, den energetisch günstigsten und somit tiefsten Punkt, erreicht (Dill und Chan, 1997).

Für neusynthetisierte Proteine *in vivo* wurde zunächst ebenfalls angenommen, dass auch diese unkatalysiert und ohne Hilfe metabolischer Energie falten und assoziieren können. Das Zytosol einer eukaryotischen Zelle stellt aber mit einem Proteingehalt von 300 mg/ml (Ellis, 2007) eine sehr beengte Umgebung dar, in der teilgefaltete Proteine sehr viel stärker zur Aggregation neigen als *in vitro* (Ellis und Minton, 2006). Die unkontrollierte Aggregation von Proteinen muss in Zellen verhindert werden, da die Aggregate für Zellen nicht nur einen

---

<sup>1</sup> Dieses Kapitel wurde teilweise von Zierer und Buchner, 2012 adaptiert.

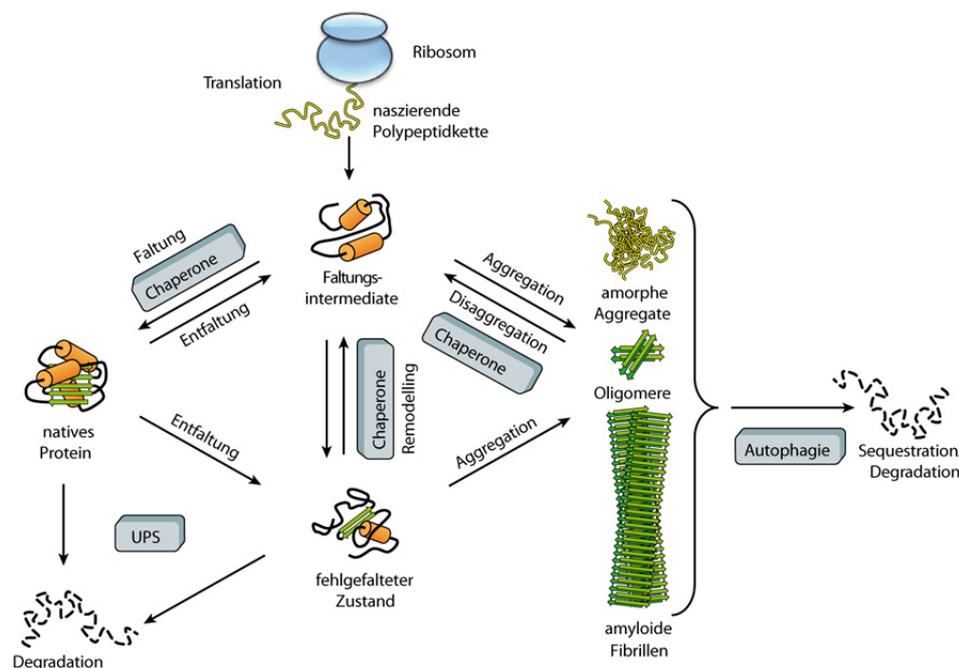
Verlust von funktionellen Proteinen darstellen, sondern die Aggregate auch zelluläre Vorgänge stören können. So führt die Aggregation oder die Ausbildung amyloider Fibrillen bestimmter Proteine in Säugern zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Huntington (Mulligan und Chakrabarty, 2013; Scheibel und Buchner, 2006). Fibrilläre Aggregation findet üblicherweise statt, nachdem sich zunächst ein Polymerisationskeim gebildet hat. Sie kann durch Intermediate initiiert werden, die während der *de novo* Faltung oder nach Destabilisierung eines nativen (oder partiell gefalteten) Zustandes auftreten.



**Abbildung 1-1: Kompetitierende Reaktionen während der Proteinfaltung und Aggregation.** Schema der trichterförmigen, freien Energielandschaft, die ein Protein während des Erreichens des nativen Zustandes (grün) durch Ausbildung intramolekularer Kontakte durchläuft. Die Unebenheit der freien Energielandschaft führt zur Anhäufung von kinetisch gefangenen Zuständen, die Energiebarrieren überwinden müssen, um einen bevorzugten Faltungspfad zu erreichen. *In vivo* sind diese Schritte von Chaperonen assistiert. Falten mehrere Moleküle im selben Kompartiment kann die Energielandschaft der Faltung mit der der Aggregation überlappen, was zur Ausbildung von amorphen Aggregaten, toxischen Oligomeren oder geordneten, amyloiden Fibrillen führt (rot). Diese Abbildung wurde aus Hartl *et al.* (2011) entnommen und modifiziert.

Um die korrekte Faltung der Proteine zu gewährleisten und deren ungewünschte Aggregation zu verhindern, hat sich ein breites Spektrum an molekularen Chaperonen entwickelt. Molekulare Chaperone sind Proteine, die andere nicht-native Proteine binden, stabilisieren oder ihnen helfen die native Konformation einzunehmen und im finalen funktionsfähigen Zustand nicht mehr anwesend sind (Ellis, 1987; Laskey *et al.*, 1978) (**Abbildung 1-2**). Sie sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, wie *de novo* Proteinfaltung, Rückfaltung von Stress-denaturierten Proteinen, Assemblierung von Oligomeren, intrazellulärem Proteintransport und sie assistieren beim proteolytischen Abbau (Ellis, 2006; Hartl und

Hayer-Hartl, 2009; Walter und Buchner, 2002). Da sie unkorrekte, nicht-native Interaktionen innerhalb von Proteinen verhindern und keine gerichtete aktive Faltung durchführen, erhöhen sie nur die Ausbeute und nicht die Rate von Faltungsreaktionen (Hartl, 1996). Somit unterscheiden sie sich von klassischen Faltungskatalysatoren wie Proteindisulfidisomerasen und Peptidylprolylisomerasen. Diese beschleunigen langsame Schritte in der Faltung mancher Proteine, wie die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken (Freedman *et al.*, 1994) und die *cis-trans* Isomerisierung von Peptidbindungen vor Prolinresten (Schmid, 1993).



**Abbildung 1-2: Proteinfaltung und molekulare Chaperone.** Chaperone sind an der Faltung neu synthetisierter Proteine beteiligt, bei der Umstrukturierung fehlgefalteter Zustände sowie bei der Disaggregation mit anschließender Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) oder Autophagie. Diese Abbildung wurde aus Hartl *et al.* (2011) entnommen und modifiziert.

Die Expression einiger molekularer Chaperone wird als Antwort auf Hitzestress hochreguliert (Finkelstein *et al.*, 1982), was zu ihrer Klassifizierung als Hitzeschockproteine (Hsp) führte. Sie werden in Familien entsprechend ihrer Größe geteilt (Hsp104, Hsp90, Hsp70, Hsp60/GroEL, Hsp40 und kleine Hsps). Die Chaperone der Klassen Hsp70, Hsp90 und die Chaperonine (Hsp60) sind an der *de novo* Faltung und Rückfaltung von Proteinen beteiligt. Chaperonine wie GroEL, sind Multikomponenten molekulare Maschinen, die durch ATP und Kofaktor-regulierte Binde- und Freilassungszyklen die Proteinfaltung erleichtern. Sie kooperieren funktionell häufig mit ATP-unabhängig wirkenden Chaperonen, wie z.B. den kleinen Hsps, die entfaltete Proteine binden und deren Aggregation verhindern und deshalb

als „holdasen“ bezeichnet werden (Haslbeck *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 2010). Nur wenige Mitglieder der Hsp104/ClpB Familie in Bakterien und Pilzen sind in der Lage aktiv Aggregate zu dissoziieren und sie der Proteinerückfaltung oder Degradation zuzuführen (Weibezahn *et al.*, 2005).

## 1.2 Das Chaperon Hsp90

Mit 1-2 % Anteil an den zytosolischen Proteinen einer Zelle ist Hsp90 eines der am häufigsten vorkommenden Proteinen in der Zelle. Die Klasse der Hsp90 Proteine ist hochkonserviert (Richter *et al.*, 2008). Sie kommen von Prokaryoten bis hin zu Eukaryoten vor. Einzig Archaea besitzen kein Hsp90 Homolog. Eubakterien besitzen meist ein Hsp90 Homolog (HtpG, in *Escherichia coli*), das nicht essentiell ist. Eukaryoten hingegen sind darauf angewiesen, dass zumindest eine funktionsfähige Hsp90 Variante vorhanden ist. Da Hsp90 in den verschiedenen Zellkompartimenten präsent ist, können innerhalb einer Zelle bis zu vier verschiedenen Homologe vorhanden sein. So ist in Eukaryoten Hsp90 nicht nur im Zytosol zu finden, sondern auch in Mitochondrien (Trap 1), im Endoplasmatischem Retikulum (Grp94) und in Chloroplasten (Hsp90C). Zudem kann zytosolisches Hsp90 in zwei Isoformen unterteilt werden: eine konstitutiv exprimierte und eine induzierbare Variante. Im Falle von *S. cerevisiae* ist hsc82 konstitutiv im Zytoplasma vorhanden und hsp82 wird im Rahmen der Hitzeschockantwort induziert.

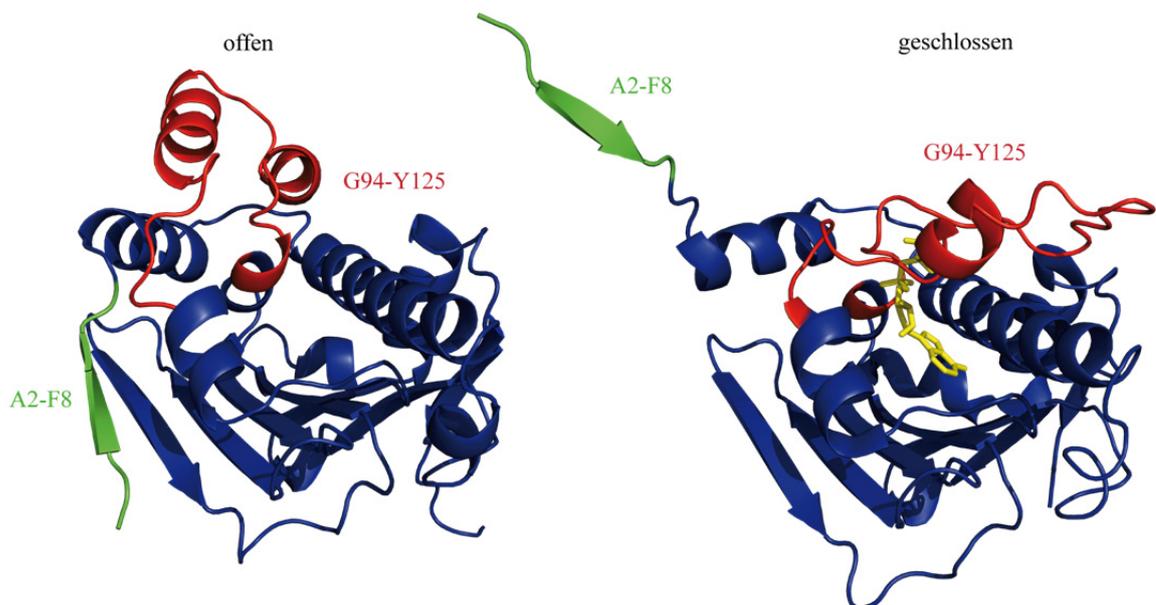
### 1.2.1 Struktur von Hsp90

*S. cerevisiae* Hsp90 (yHsp90) formt Homodimere mit einer Dissoziationskonstante von etwa 60 nM (Richter *et al.*, 2001). Jedes Monomer kann strukturell in drei Bereiche unterteilt werden (**Abbildung 1-3**). Eine N-terminale Domäne (N-Domäne), die über einen *linker* mit der Mitteldomäne (M-Domäne) verbunden ist, sowie die für die Dimerisierung essentielle C-terminale Domäne (C-Domäne).



**Abbildung 1-3: Domänenstruktur von yHsp90.** Hsp90 besteht aus einer N-Domäne, die über einen *linker* mit der M-Domäne verbunden ist. Das Ende der C-Domäne bilden die Aminosäuren des sog. MEEVD-Motivs.

Die Kristallstruktur der isolierten N-Domäne von  $\gamma$ Hsp90 zeigte die strukturelle Ähnlichkeit der Tertiärstruktur der N-Domäne zum N-terminalen ATP-Bindefragment der bakteriellen Typ II Topoisomerase (DNA Gyrase B) (Dutta und Inouye, 2000; Prodromou *et al.*, 1997a; Prodromou *et al.*, 1997b), weshalb Hsp90 der diversen Klasse der GHKL (Gyrase, Hsp90, Histidinkinase und MutL) ATPase/Kinase Familie zugeordnet wird. Dabei wird im Falle von Hsp90 die ATP-Bindetasche von einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, die von einer  $\alpha$ -helikalen Struktur flankiert wird, gebildet (**Abbildung 1-4**). Dadurch wurden einige Aminosäurereste identifiziert, die an der Bindung des Nukleotids involviert sind, sowie ein  $Mg^{2+}$ -Ion, das für die Nukleotidbindung unentbehrlich ist (Prodromou *et al.*, 1997a). Ein weiteres strukturell wichtiges Element in der N-Domäne ist der sogenannte *lid*. Er wird von den Aminosäuren 94-125 (in Falle von  $\gamma$ Hsp90) gebildet und vollzieht nach der Bindung von ATP die wohl größte Positionsänderung. Diese Struktur löst sich von seiner Position in der offenen Form, in der sie Aminosäuren Leu15 und Leu18 bedeckt (Ali *et al.*, 2006), und faltet über die Nukleotidbindetasche, um neue Kontakte mit dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat von ATP zu formen (Ali *et al.*, 2006). Wird dieses *lid*-Segment deletiert, führt dies zu einem ATPase inaktivem Hsp90. Werden jedoch Heterokomplexe mit wildtyp Monomeren erzeugt, führt dies zu einer Stimulation des wildtyp Monomers durch das *lid*-lose Monomer (Richter *et al.*, 2006), weshalb der *lid* ein autoinhibitorisches Element darstellt.



**Abbildung 1-4: N-Domäne in offener und geschlossener Form.** Kristallstruktur der  $\gamma$ Hsp90 N-Domäne (blau) in offener (pdb 1Ah6) und geschlossener form (pdb 2cg9). Das *lid*-Segment (Aminosäuren 94 bis 125) ist in rot dargestellt und die ersten acht Aminosäuren in grün. Das in der geschlossenen Form gebundene ATP ist in gelb gezeigt. Die Abbildung ist aus Zierer und Buchner (2012) entnommen und modifiziert.

Die N-Domäne wird in eukaryotischem Hsp90 über einen extensiveren *linker*-Bereich mit der M-Domäne verbunden, als dies in bakteriellem Hsp90 der Fall ist. Dieser *linker* ist eine sehr geladene und flexible Struktur, sodass es nicht möglich ist, Kristallstrukturdaten davon zu erlangen. Biochemische Studien legen jedoch nahe, dass er zur Regulation der ATP-abhängigen Chaperonaktivität beiträgt (Scheibel *et al.*, 1999). Zudem ermöglicht er die notwendige Flexibilität von Hsp90, da Deletionskonstrukte Defekte aufweisen, angefangen von milder Temperatursensitivität, beeinträchtigter Cochaperon Interaktion und *client*-Prozessierung bis hin zu einem lethalen Phänotyp in Hefen (Hainzl *et al.*, 2009), der durch Einfügen einer artifiziellen Sequenz wieder gerettet werden kann. Auch eine dem *linker* vorangehende Struktur in der N-Domäne, der  $\beta$ -Faltblatt-Strang 8, spielt eine wichtige Rolle in der Funktion von Hsp90. Mutationen in diesem Bereich führen neben Verlust der Lebensfähigkeit zu verminderter Sekretion von Hsp90 (Tsutsumi *et al.*, 2009).

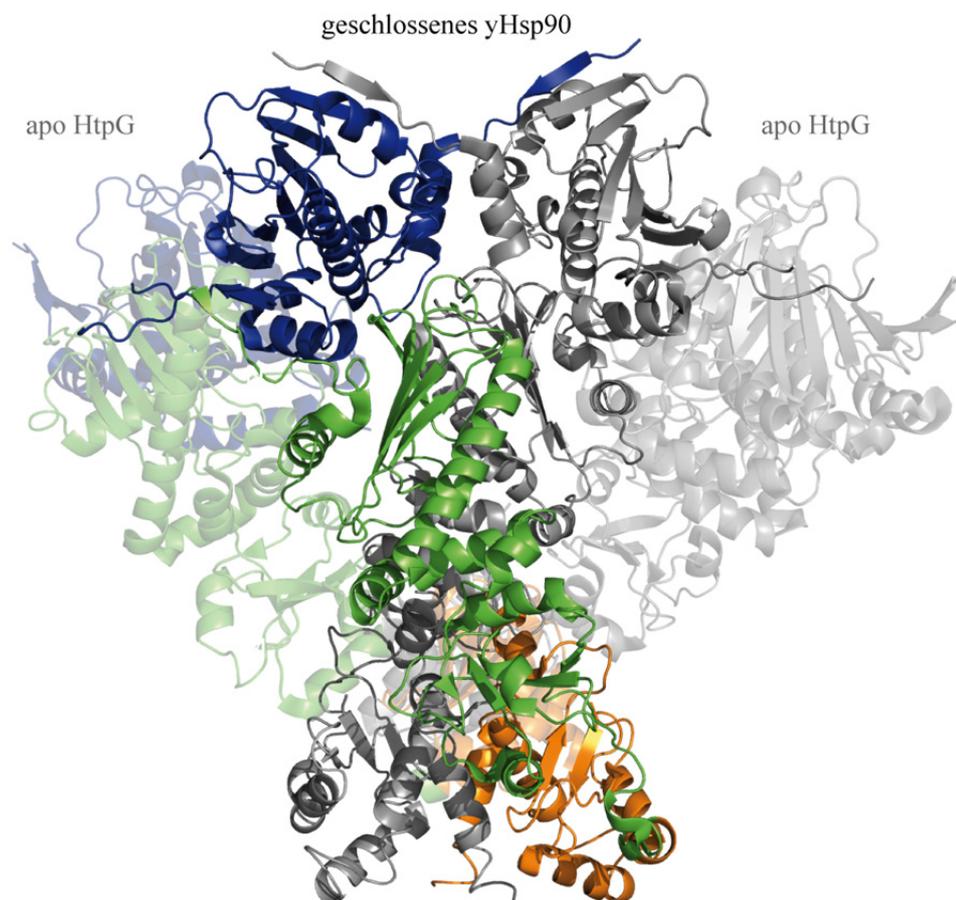
Die strukturelle Homologie von Hsp90 zu den GHKL-ATPasen wurde weiter unterstützt durch die Struktur der M-Domäne (Meyer *et al.*, 2003). Ihre Faltung in zwei  $\alpha\beta\alpha$ -Domänen verbunden über ein  $\alpha$ -helikales *Coil*-Segment ist der Faltung von GyrB und MutL homolog. Ein Sequenzalignment von Hsp90 und GyrB führte zur Identifikation des katalytischen *loops* innerhalb der M-Domäne (Aminosäuren 370-390), dessen Mobilität schon in der Kristallstruktur der isolierten M-Domäne beobachtet wurde. Dieser *loop* enthält mit Arg380 auch einen katalytisch essentiellen Rest. Eine Mutation von Arg380 zu Ala führt zu einem signifikanten Verlust der ATPase Aktivität und zum Verlust der Lebensfähigkeit von Hefezellen (Meyer *et al.*, 2003). Arg380 zeigt in die Nukleotidbindetasche und trägt zur Koordination des  $\gamma$ -Phosphats und somit zur effizienten Katalyse bei. Die Beteiligung eines „Argininfingers“, der zu einer anderen Proteinuntereinheit als die Nukleotidbindestelle gehört, wurde schon im Ras-GAP-System (Ahmadian *et al.*, 1997), in großen G-Proteinen (Bourne, 1997) oder F1 ATPasen, wo ein Arg von der  $\alpha$ -Untereinheit in das aktive Zentrum in der  $\beta$ -Untereinheit zeigt, beobachtet. Neuere Studien sehen die Funktion des R380 mehr in der Stabilisierung des geschlossenen Zustandes, als in der direkten Beteiligung am Hydrolysevorgang selbst (Cunningham *et al.*, 2012).

Die C-Domäne von Hsp90 besitzt zwei wichtige Funktionen: zum Einen ist sie für die Homodimerisierung verantwortlich (Nemoto *et al.*, 1995) und zum Anderen ist sie eine Bindestelle für Cochaperone. Die C-Domäne wird von einer dreisträngigen  $\beta$ -Faltblattstruktur gebildet, die sich zwischen einer gebogenen Helix befindet, die wiederum die C- und M-Domänen verbindet, sowie einem Dreihelix-*coil*, der die Dimerisierungsstelle

bildet (Ali *et al.*, 2006). Die Bildung von Homodimeren ist eine essentielle Voraussetzung für die effiziente ATPase Aktivität des Proteins (Weickl *et al.*, 2000). Die letzten fünf Aminosäuren sind hochkonserviert und bilden das sog. MEEVD-Motiv. Dies dient als Bindestelle für eine große Klasse von Hsp90 Cochaperonen, die danach klassifiziert werden, mit ihrer Tetratricopeptid (TPR)-Domäne an dieses Motiv zu binden.

### 1.2.2 Konformationsänderungen von Hsp90

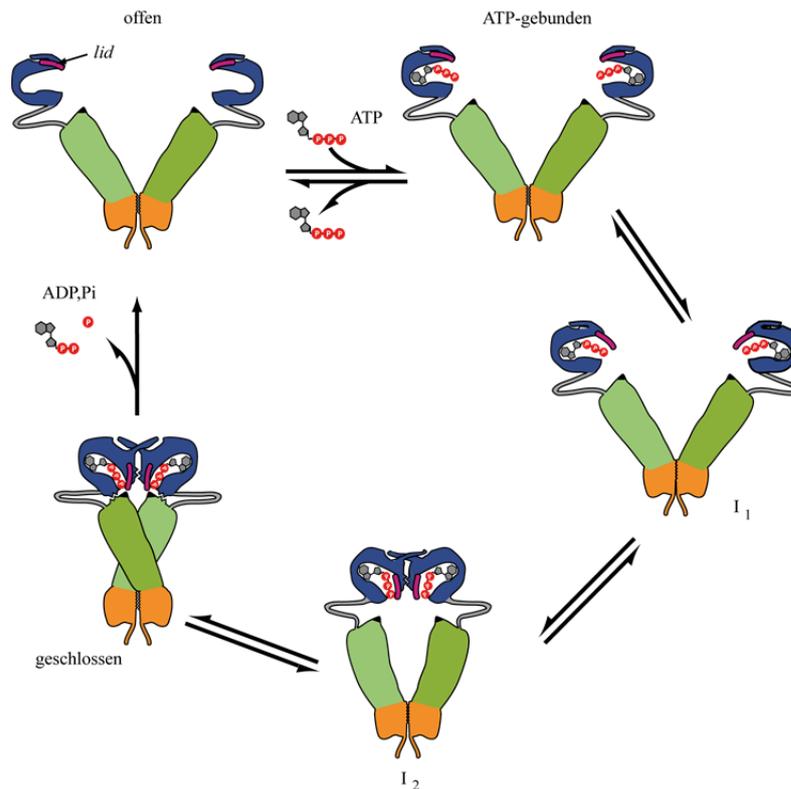
Erste Hinweise auf die strukturelle Diversität von Hsp90 lieferten die Kristallstrukturen vom *E. coli* Homolog HtpG und *S. cerevisiae* Hsp90 (**Abbildung 1-5**).



**Abbildung 1-5: Offener und geschlossener Zustand von Hsp90.** Gezeigt sind die auf Basis der C-Domänen übereinander gelegten Kristallstrukturen von apo *E. coli* HtpG (pdb 2ioq) und der geschlossenen Form von *S. cerevisiae* Hsp90 (pdb 2cg9). In jeder Struktur ist ein monomer in grau dargestellt und im zweiten Monomer ist die N-Domäne in blau, die M-Domäne in grün und die C-Domäne in orange dargestellt. Die Abbildung ist aus Zierer und Buchner (2012) entnommen und modifiziert.

yHsp90 wurde in Komplex mit dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogen AMP-PNP und dem Cochaperon Sba1/p23 in einer geschlossenen, kompakten Struktur kristallisiert, in der sowohl eine Dimerisierung der C-Domänen vorhanden ist, als auch die N-Domänen assoziiert sind (Ali *et al.*, 2006). Elektronenmikroskopische Analysen von HtpG zeigten, dass es hauptsächlich in drei Zuständen vorkommt (Shiau *et al.*, 2006). In Abwesenheit von Nukleotid wurde es in einer offenen v-förmigen Struktur vorgefunden, in der die C-Domäne dimerisiert vorliegt und die N-Domänen räumlich weit getrennt liegen. Im Komplex mit AMP-PNP nimmt es einen geschlossenen länglichen Zustand, ähnlich dem von yHsp90 mit AMP-PNP und Sba1/p23, ein. In Gegenwart von ADP nimmt HtpG eine signifikant kompaktere globuläre Konformation ein (Shiau *et al.*, 2006).

Diese Strukturen stellen Schnappschüsse der großen Konformationsänderungen dar, die Hsp90 durchläuft. Da yHsp90 intrinsisch keine Cysteine besitzt, war es möglich, eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung der yHsp90 Monomere an eingeführten Cysteine durchzuführen. Nach Mischen von Donor und Akzeptor markierten Hsp90 Dimeren findet ein Austausch der Monomere statt, was zur Ausbildung von Donor-Akzeptor-Heterokomplexen führt (Hessling *et al.*, 2009). Durch den auftretenden Förster Resonanz Energietransfer (FRET) des Donor- und Akzeptorfarbstoffs konnten die Konformationsänderungen, die nach Bindung von Nukleotid stattfinden, kinetisch analysiert werden (Hessling *et al.*, 2009; Mickler *et al.*, 2009). Dadurch konnten zwei Intermediate identifiziert werden, die während der konformationellen Umstrukturierungen nach der Nukleotidbindung auftreten (Hessling *et al.*, 2009). Mittels Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie konnte auch in Abwesenheit von Nukleotiden eine spontane Fluktuation zwischen offenem und geschlossenem Zustand bei yHsp90 gezeigt werden (Ratzke *et al.*, 2010), die Anwesenheit von Nukleotiden führt jedoch zu einem gerichteten Ablauf der konformationellen Umstrukturierungen in yHsp90 (Hessling *et al.*, 2009) (**Abbildung 1-6**).



**Abbildung 1-6: Konformationsänderungen von Hsp90.** Zyklus der Nukleotid-induzierten konformationellen Änderungen von Hsp90. Nach schneller ATP Bindung erfolgen konformationelle Änderungen in der N-Domäne, die wahrscheinlich die Bewegung des ATP lids und die Freisetzung des N-terminalen Segments von seiner Interaktion mit dem lid-Segment ( $I_1$ ). Diese Reaktion ist bevorzugt. Dann führt die N-terminale Dimerisierung zur Ausbildung des  $I_2$ , in welchem die N-Domänen dimerisiert vorliegen. Die Interaktion der N-Domäne mit der M-Domäne resultiert in der Ausbildung des geschlossenen Zustandes, in welchem die Hydrolyse des ATP stattfinden muss. Diese Abbildung ist aus Zierer und Buchner, 2012 entnommen und modifiziert.

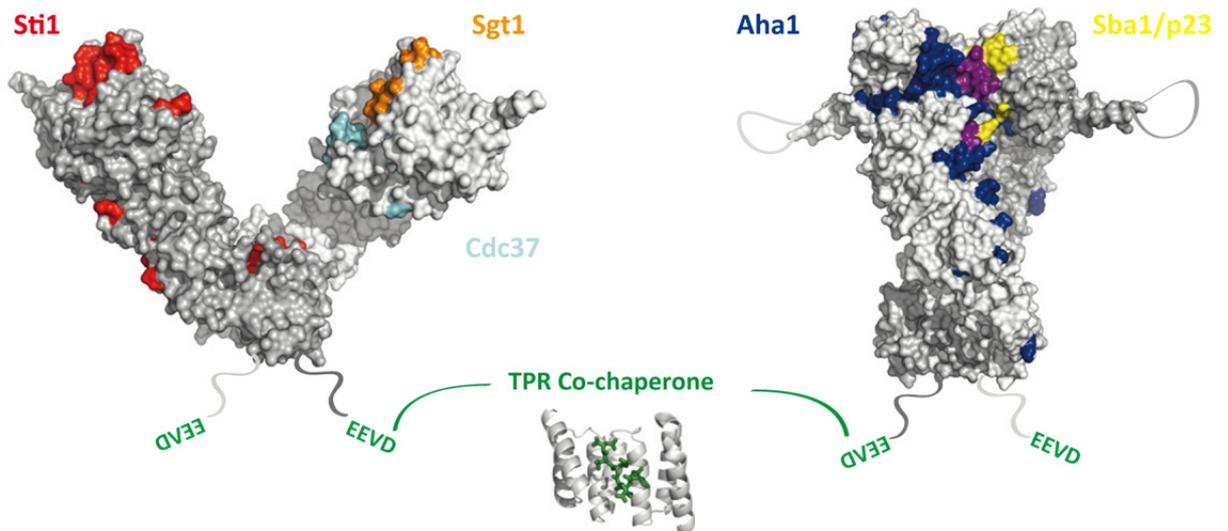
Hsp90 bindet im offenen Zustand das Nukleotid in einer sehr schnellen Reaktion (Weikl *et al.*, 2000). Die eher langsame Bildung des ersten Intermediats ( $I_1$ ) könnte dem Umklappen des lids von seiner Position im offenen Zustand hin zu der im geschlossenen Zustand über der Nukleotidbindetasche korrespondieren. Die Repositionierung des lid-Segments legt eine hydrophobe Fläche frei, die an der Stabilisierung der transienten Dimerisierung der N-Domänen beteiligt ist, welche auf das Schließen des lids folgt. Dies könnte der Bildung des zweiten Intermediats ( $I_2$ ) entsprechen. Im N-terminal dimerisierten Zustand schwingt die N-terminale Helix des einen Monomers hinüber zur anderen Untereinheit, was zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum zweiten Monomer führt. Um den finalen geschlossenen Zustand zu erreichen, finden noch weitere Repositionierungen der Kontakte der N- und M-Domäne statt, bis das Dimer schließlich in einer gedrehten Konformation vorliegt. Hier im geschlossenen Zustand muss die Hydrolyse des ATP stattfinden, denn nur nach erfolgter Hydrolyse kehrt Hsp90 zum offenen Zustand zurück. Die Raten-limitierenden

Schritte dieses Zyklus sind weder die Bindung von ATP noch dessen Hydrolyse, sondern vielmehr die großen konformationellen Umstrukturierungen (Hessling *et al.*, 2009; Weikl *et al.*, 2000), die Hsp90 vollziehen muss, um schließlich die Hydrolyse des ATP vollziehen zu können. Die Fähigkeit von Hsp90, ATP hydrolysieren zu können, ist essentiell für das Überleben der Zellen (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998). Aber wie die konformationellen Änderungen von Hsp90 mit der Prozessierung seiner *clients* verknüpft ist, bleibt eine große, ungeklärte Frage.

Der konformationelle Zyklus von Hsp90 und somit die ATPase Aktivität können durch mehrere Mechanismen reguliert werden, vermutlich, um die Funktion von Hsp90 an die Ansprüche des entsprechenden *clients* anzupassen. Neben einer Vielzahl an Cochaperonen stellen posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Nitrosylierung, Acetylierung und Ubiquitylierung einen wichtigen Regulationsmechanismus dar (Mollapour und Neckers, 2012; Retzlaff *et al.*, 2009; Soroka *et al.*, 2012).

### 1.2.3 Cochaperone

Der Hsp90 ATPase Zyklus und die damit verbundenen Konformationsänderungen von Hsp90 können durch Proteine, die an Hsp90 binden und selbst keine Substrate sind, moduliert und reguliert werden, um zu gewährleisten, dass Hsp90 seine Funktion in der Prozessierung der verschiedensten *client*-Proteine erfüllen kann. Diese Hsp90-assoziierten Proteine werden Cochaperone genannt. In *E. coli* wurden bisher keine derartigen Cochaperone gefunden, aber in Hefen und höheren Eukaryoten sind bereits zahlreiche Cochaperone identifiziert worden, die notwendig sind, cytosolischem Hsp90 bei der Bindung und Reifung seiner *clients* zu assistieren oder die Interaktion mit anderen Proteinen zu vermitteln. Sie interagieren dabei an unterschiedlichsten Stellen mit Hsp90, wie **Abbildung 1-7** zeigt.



**Abbildung 1-7: Interaktionsstellen von Cochaperonen mit Hsp90.** Die Oberflächendarstellung der offenen Form von HtpG (links, pdb 2ioq) zeigt farblich codiert die Interaktionsstellen der Cochaperone Sti1/HOP (rot), Cdc37 (hellblau), Sgt1 (orange) und TPR-Cochaperone (grün), die bevorzugt an die offene Form von Hsp90 binden. Die Oberflächendarstellung der geschlossenen Form von  $\gamma$ Hsp90 (rechts, pdb 2cg9) zeigt farblich gekennzeichnet die Interaktionsstellen der Cochaperone Aha1 (blau), Sba1/p23 (gelb) und den TPR-Cochaperonen (grün), die bevorzugt an die geschlossene Form von Hsp90 binden. Der überlappende Bereich der Bindestellen von Sba1/p23 und Aha1 ist violett dargestellt. In der Mitte ist die Struktur einer TPR-Domäne (grau) in Komplex mit dem C-terminalem Peptid von Hsp90 (grün) (pdb 3upv) gezeigt. Die Abbildung wurde aus Röhl *et al.* (2013) entnommen und modifiziert.

Das am intensivsten studierte System ist das Hsp90 Chaperon System aus *S. cerevisiae*, in dem die Funktion der meisten Cochaperone mittlerweile bekannt ist. Einige Cochaperone nehmen aktiv Einfluss auf die Konformationsänderungen von Hsp90 und modulieren so dessen ATPase Aktivität. Andere übertragen *clients* auf Hsp90 oder beeinflussen auf bisher unbekannt Weise deren Reifung. Die Hsp90 Cochaperone können grob in zwei große Klassen unterteilt werden: TPR- und nicht-TPR-Cochaperone. Die Klassifizierung erfolgt strukturell nach dem Vorhandensein einer Tetratricorepeat (TPR)-Domäne, die in der Lage ist, an das C-terminale MEEVD-Motiv von Hsp90 zu binden. TPR-Domänen bestehen aus 6-16 Wiederholungen einer degenerierten 34 Aminosäure langen Sequenz, dem sog. TPR-Motiv (Goebl und Yanagida, 1991). Jedes TPR-Motiv bildet ein antiparalleles Paar von  $\alpha$ -Helices und die Helices der verschiedenen Wiederholungen assoziieren zu einer rechtsgängigen, helikalen Struktur, die die Bindetasche für das EEVD-Motiv formt (Das *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* gehören zu dieser diversen Gruppe an Cochaperonen Sti1, die Proteinphosphatase Ppt1, die Peptidylprolylisomerasen Cpr6 und Cpr7, Cns1 und Tah1. Aber nicht jedes Protein, das eine TPR-Domäne enthält, interagiert zwingend damit mit Hsp90. So besitzt das Hsp90 Cochaperon Sgt1 eine TPR-Domäne, diese ist an der Bindung an Hsp90 jedoch nicht

beteiligt (Lee *et al.*, 2004). Andere TPR-Domänen binden nicht an Hsp90, sondern an das verwandte IEEVD-Motiv am C-terminus von Hsp70.

Hefe Sti1 ist ein nicht essentielles, monomeres Cochaperon, das neben drei TPR-Domänen (TPR1, TPR2A und TPR2B) noch zwei einzigartige Domänen mit homologer  $\alpha$ -helikaler Struktur (DP1 und DP2) (Schmid *et al.*, 2012). Die DP2 Domäne folgt auf die TPR1 Domäne und dieses Segment ist über einen langen flexiblen *linker* an ein eher rigides TPR2A-TPR2B Modul und DP2 gekoppelt. Da Sti1 in der Lage ist, sowohl Hsp90 über die TPR2A Domäne als auch Hsp70 über die TPR1 oder TPR2B Domäne zu binden, dient es als Adaptor, um den Hsp70 und Hsp90 Zyklus miteinander zu verbinden und so einen effizienten Transfer der *clients* zwischen den Systemen zu gewährleisten. Dies wurde im Speziellen für die Steroidhormonrezeptoren (SHR) gezeigt (Pratt und Toft, 2003; Smith *et al.*, 1990). TPR1 scheint hierbei für die Rekrutierung von Hsp70 für TPR2B verantwortlich zu sein, wo der eigentliche *client*-Transfer auf Hsp90 stattfindet. Sti1 inhibiert die ATPase Aktivität von Hsp90 in einer nicht-kompetitiven Art und Weise (Richter *et al.*, 2003), indem es die konformationelle Flexibilität von Hsp90 einschränkt (Hessling *et al.*, 2009). Das TPR2A-TPR2B-Segment stellt dabei die kleinste Einheit dar, die für die Inhibition notwendig ist (Schmid *et al.*, 2012). Ein Sti1 Molekül pro Hsp90 Dimer ist dabei ausreichend, um Hsp90 zu inhibieren (Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011).

Zu den TPR-Cochaperonen gehört auch die Serin/Threonin Proteinphosphatase Ppt1. Sie besteht aus einer katalytisch aktiven C-terminalen Domäne und einer N-terminalen TPR-Domäne, die mit Hsp90 interagiert (Chen *et al.*, 1994). Die intrinsische Phosphataseaktivität von Ppt1 ist sehr gering, da die TPR-Domäne eine autoinhibitorische Funktion erfüllt, indem sie die katalytische Domäne blockiert (Chen und Cohen, 1997; Yang *et al.*, 2005). Die Bindung der TPR-Domäne an Hsp90 führt schließlich zur Aufhebung der Autoinhibition und Ppt1 kann spezifisch Hsp90 und das Cochaperon Cdc37 dephosphorylieren (Vaughan *et al.*, 2008; Wandinger *et al.*, 2006). Die Bindung von Ppt1 selbst hat keinen Einfluss auf die Funktion von Hsp90, die Dephosphorylierung ändert jedoch die posttranslationale Modifikation von Hsp90 und kann somit Einfluss auf die Funktion von Hsp90 nehmen. Hefestämme können ohne Ppt1 sogar unter Stressbedingungen normal wachsen (Chen *et al.*, 1994). Es wurde jedoch gezeigt, dass Deletion von Ppt1 zu einer verringerten *client*-Prozessierung führt (Wandinger *et al.*, 2006).

Die beiden Prolyl-cis/trans-isomerasen Cpr6 und Cpr7 besitzen ebenfalls eine TPR-Domäne, mit der sie mit etwa gleicher Affinität Hsp90 binden können (Mayr *et al.*,

2000). Neben der TPR-Domäne besitzen beide katalytisch aktive PPIase Domänen, mit der sie eine cis/trans-Isomerisierung von Peptidbindungen vor Prolinen durchführen können, wobei Cpr6 die potentere Isomerase ist (Mayr *et al.*, 2000). Beide sind in Hefe nicht essentiell, aber die Deletion von Cpr7 resultiert in einem Wachstumsdefekt (Duina *et al.*, 1996). Cpr6 und Cpr7 binden mit etwa gleicher Affinität an Hsp90 (Mayr *et al.*, 2000), jedoch nur die Bindung von Cpr6 aktiviert die ATPase Aktivität von Hsp90 (Panaretou *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Cpr6 einen ternären Komplex mit Hsp90 und Sti1 bilden kann, der ein entscheidendes Intermediat im Hsp90 Chaperon Zyklus darstellt (Li *et al.*, 2011).

Der Wachstumsdefekt von Cpr7 kann durch Überexpression von Cns1 (*Cyclophilin seven suppressor*) kompensiert werden (Dolinski *et al.*, 1998). Cns1 selbst ist in Hefe essentiell (Marsh *et al.*, 1998), aber über seine Funktion ist sehr wenig bekannt. Es enthält eine TPR-Domäne, die für die Interaktion mit Hsp90 verantwortlich ist, dabei bleibt die ATPase Aktivität von Hsp90 unbeeinflusst. Neben Hsp90 kann Cns1 auch an Ssa1 (Hsp70 in *S. cerevisiae*) binden, was die ATPase Aktivität von Ssa1 stimuliert (Hainzl *et al.*, 2004). Hsp90 und Hsp70 kompetitieren in diesem Fall um die TPR-Domäne, da Cns1 nicht, wie Sti1, mehrere TPR-Domänen besitzt (Hainzl *et al.*, 2004).

Aber nicht alle Hsp90 Cochaperone, die eine TPR-Domäne besitzen binden, mit dieser an Hsp90. Sgt1 stellt eine Ausnahme dar. Die TPR-Domäne dient in diesem Fall der Bindung von Skp1, einer Komponente des SCF-Ubiquitin-Ligase Komplexes (Kitagawa *et al.*, 1999) und Hsp90 wird mit der CS-Domäne gebunden (Catlett und Kaplan, 2006). Die CS-Domäne besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Sba1/p23, dennoch überlappen die Bindestellen der beiden Cochaperone nicht (Zhang *et al.*, 2010). Die Bindung von Sgt1 an Hsp90 hat auch, im Gegensatz zur Sba1/p23 Bindung, keinen Einfluss auf die Hsp90 ATPase Aktivität (Catlett und Kaplan, 2006).

Tah1 bindet zusammen mit Pih1 an Hsp90, um es bei der Umstrukturierung von Chromatin und bei der Reifung von kleinen nuklären RNPs zu unterstützen (Zhao *et al.*, 2008). Die Bindung des Tah1/Pih1 Heterodimers führt zu einer Inhibition der Hsp90 ATPase Aktivität, so dass angenommen werden kann, dass das Heterodimer als Adaptor dient, der spezifisch *clients* an Hsp90 überträgt (Eckert *et al.*, 2010).

Cdc37 ist ein essentielles, Kinase-spezifisches Cochaperon, das assoziiert mit Hsp90 und verschiedenen Kinasen vorgefunden wurde (Caplan *et al.*, 2007). Es wirkt als Adaptor, indem es Kinasen mit seiner N-terminalen Domäne bindet und auf diese Weise die Interakti-

on mit Hsp90 ermöglicht. Die C-terminale Domäne von Cdc37 bindet schließlich die N-Domäne von Hsp90 (Silverstein *et al.*, 1998). Neuere Studien mit *C. elegans* Proteinen zeigen, dass die M-Domäne von Hsp90 ebenfalls an der Interaktion beteiligt ist (Eckl *et al.*, 2013). Die Proteine Hsp40, Hsp70, Hsp90, Cdc37 und Sti1/Hop stellen das minimale Set dar, das notwendig sind, um Kinasen vor Missfaltung und Aggregation zu schützen (Caplan *et al.*, 2007). Daraus kann abgeleitet werden, dass eine missgefaltete Kinase zunächst von dem Hsp40/Hsp70 System gebunden wird. Via Sti1, das die Bindung von Hsp90 und Cdc37 stabilisiert (Caplan *et al.*, 2007), wird die Kinase schließlich auf Hsp90 übertragen. Neben seiner Funktion als Adaptor besitzt Cdc37 auch eine regulatorische Funktion auf den Hsp90 ATPase Zyklus, indem es die ATPase Aktivität inhibiert (Siligardi *et al.*, 2002). Die Lösung der Kristallstruktur der C-terminalen Domäne des humanen Homolog von Cdc37 (p50) mit der N-Domäne von yHsp90 zeigte, dass die Inhibition vorrangig durch die Bindung von p50 an die offene Form von Hsp90 erzeugt wird. Die Bindung involviert das *lid*-Segment und verhindert dessen schließen. So verhindert das gebundene Cdc37 die N-terminale Dimerisierung von Hsp90 (Roe *et al.*, 2004).

Die Bindung des Cochaperons Sba1/p23 an Hsp90 ist stark Nukleotid abhängig (Johnson und Toft, 1994). Es bindet mit 70-fach höherer Affinität in Anwesenheit eines Nukleotid-Analogon (Siligardi *et al.*, 2004), wobei ein Hsp90 in der Lage ist, zwei Sba1/p23-Moleküle zu binden (Richter *et al.*, 2004). Der Grund für die starke Nukleotidabhängigkeit der Bindung zeigte sich in der Kristallstruktur von geschlossenem yHsp90 in Gegenwart von AMP-PNP und p23. Der Großteil der Bindestelle von Sba1/p23 wird erst nach N-terminaler Dimerisierung geformt. Reste des C-terminalen Schwanz von Sba1/p23 (nach Aminosäure 125) könnten sogar Interaktion mit der M-Domäne von Hsp90 eingehen (Ali *et al.*, 2006). Aus diesen strukturellen Gründen ist die ATPase inhibierende Funktion von p23 nicht verwunderlich, obwohl anders als bei Sti1 oder Cdc37 nur eine Teilinhibition der Aktivität von Hsp90 erfolgt (Panaretou *et al.*, 2002). Strukturell zeigt Sba1/p23 mit seiner wie  $\alpha$ -Kristallin gefalteten Domäne Ähnlichkeit zu den sHsps (Garcia-Ranea *et al.*, 2002) und der lange unstrukturierte Schwanz scheint essentiell für die Chaperonaktivität des Sba1/p23 (Weaver *et al.*, 2000; Weikl *et al.*, 1999).

Aha1 (*accelerator of Hsp90 Atpase*) ist neben Cpr6 der zweite bekannte Aktivator der Hsp90 ATPase Aktivität (Panaretou *et al.*, 2002). Sowohl Aha1 als auch seine kürzere Isoform Hch1 sind beide nicht essentiell in Hefen. Homologe von Aha1 können in allen Spezies gefunden werden, wohingegen Homologe von Hch1 nur in niederen Eukaryoten

vorkommen (Lotz *et al.*, 2003; Panaretou *et al.*, 2002). Zuerst wurde die aktivierende Wirkung von Aha1 auf die Bindung der N-Domäne von Aha1 an die M-Domäne von Hsp90 zurückgeführt, die eine Repositionierung des katalytischen *loops* verursacht (Meyer *et al.*, 2004). Neuere NMR Studien und *Crosslinking*-Experimente zeigen jedoch, dass an der Aktivierung auch eine Interaktion von Aha1 mit der N-Domäne von Hsp90 beteiligt ist (Koulov *et al.*, 2010; Retzlaff *et al.*, 2010). Aha1 induziert und stabilisiert einen energetisch ungünstigen Zustand, in dem die N-Domänen von Hsp90 in räumlicher Nähe sind und ermöglicht so das I<sub>1</sub> im Konformationszyklus zu umgehen (Hessling *et al.*, 2009; Retzlaff *et al.*, 2010). Aha1 scheint als Cochaperon an der Aktivierung mehrerer *clients* wie z.B. v-Src und dem Glucocorticoidrezeptor (GR) beteiligt zu sein (Holmes *et al.*, 2008; Lotz *et al.*, 2003; Panaretou *et al.*, 2002). Zudem ist es in der Qualitätskontrolle des CTFR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) involviert (Wang *et al.*, 2006).

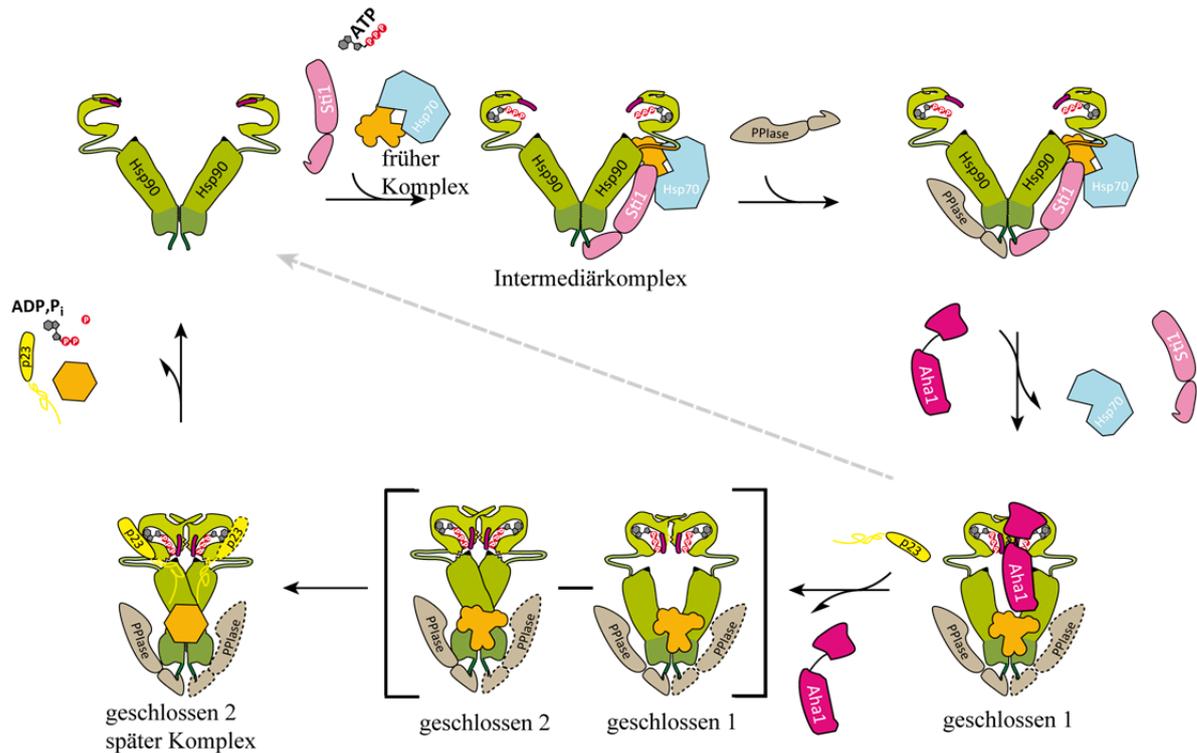
#### 1.2.4 Hsp90 und seine *client*-Proteine

Eine große Anzahl unterschiedlicher sog. *client*-Proteine sind in ihrer Faltung, Stabilität oder beim Erreichen oder Erhalt ihrer funktionsfähigen Struktur auf Hsp90 und dessen ATP-abhängigen konformationellen Zyklus angewiesen. Studien mit *S. cerevisiae* lassen vermuten, dass etwa 20 % des Proteoms direkt oder indirekt von Hsp90 abhängen und in ihrer Struktur oder Funktion betroffen sind, falls Hsp90 in seiner Funktion eingeschränkt ist (Taipale *et al.*, 2010). Solche *clients* können in den verschiedensten Proteinklassen gefunden werden, wie nukleäre Transkriptionsfaktoren, SHR, E3 Ligasen oder Proteinkinasen. Eine Liste an Hsp90 Interaktoren, die regelmäßig aktualisiert wird, ist auf <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf> zu finden. *Client*-Proteine sind meist instabile Proteine. So ist z.B. die virale Src-Kinase (v-Src), deren Aktivität Hsp90 abhängig ist, instabiler als die zelluläre Variante (c-Src), die weniger Abhängigkeit von Hsp90 zeigt (Falsone *et al.*, 2004). Darüber hinaus gehören einige krebssassoziierte Proteine, wie das Tumorsuppressorprotein p53 und die Kinasen Raf-1, Bcr-Abl sowie ErbB2 zu den Hsp90 *clients*. Die Struktur der verschiedenen *clients* ist sehr divers und es konnte bis jetzt keine Konsensussequenz oder gemeinsames strukturelles Element identifiziert werden, das als Erkennungsmerkmal als Hsp90 Bindestelle dienen könnte. Ebenso konnte auch an Hsp90 keine eindeutige *client*-Bindestelle gefunden werden. Im Rahmen verschiedener Studien mit *clients* konnten Interaktionsstellen in jeder Domäne gezeigt werden. So wurde für p53

gezeigt, dass es mit der C-Domäne interagiert, aber ebenso schwache Interaktion mit der N- und M-Domäne eingeht (Hagn *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011). Eine ausführliche tabellarische Zusammenfassung der bis jetzt identifizierten *client*-Bindestellen ist in Röhl *et al.* (2013) zu finden.

Mittlerweile ist es akzeptiert, dass Hsp90 nicht an genereller Proteinfaltung teilnimmt, wie dies zum Beispiel GroEL und Hsp70 tun (Kim *et al.*, 1998; Nathan *et al.*, 1997), sondern dass Hsp90 vielmehr partiell unstrukturierte Bereiche von *clients* bindet, und diese unterstützt, eine aktive Konformation einzunehmen. Für p53 wurde etwa gezeigt, dass es in einer nativ-ähnlichen Struktur an Hsp90 bindet. *In vitro* Studien legen nahe, dass das *client*-Protein selbst einen stimulierenden Effekt auf die Hsp90 ATPase Aktivität und dessen Konformationsänderungen besitzt (McLaughlin *et al.*, 2002; Street *et al.*, 2011).

Hsp90 prozessiert seine *clients* nicht alleine, sondern eine enorme Anzahl an Cochaperonen erhöht die Komplexität der Funktionsweise der Hsp90-Maschinerie (**Abbildung 1-8**). Sie scheinen Hsp90 für die Interaktion mit bestimmten *clients* vorzuprogrammieren oder zumindest Hsp90 während der Reifung selektiver *clients* zu unterstützen. So ist Cdc37 ein Kinase-spezifisches Cochaperon und hilft Hsp90 ausschließlich bei der Prozessierung von Kinasen (Caplan *et al.*, 2007). Andere Cochaperone hingegen helfen Hsp90 bei der Reifung verschiedener *clients*. Das Zusammenspiel von verschiedenen Cochaperonen und Hsp90 bei der *client*-Prozessierung ist für die SHR am besten untersucht und verstanden. SHRs sind nukleäre Transkriptionsfaktoren, an welche in eine hydrophobe Tasche in der C-terminalen Ligandenbindedomäne Steroidhormone binden (Pratt *et al.*, 2006). Für die SHRs ist bekannt, dass sie zuerst von Hsp70 gebunden werden und dann unter Beteiligung von Hop/Sti1 an das Hsp90 System übergeben werden (Chen *et al.*, 1996). Hop scheint dabei Adaptorfunktion zu haben, da es sowohl Hsp90 als auch Hsp70 binden kann. Die Kolokalisation der beiden Chaperone soll die Effizienz der *client*-Übertragung erhöhen (Chen und Smith, 1998; Johnson *et al.*, 1998). Die Hsp90 Maschinerie bindet den teilweise ungefalteten SHR und induziert bei diesem einen hormonbindekompetenten Zustand (Pratt *et al.*, 2004). Um den prozessierten SHR wieder freizusetzen, ist die Beteiligung weiterer Cochaperone notwendig, wie z.B. der PPIase Cpr6 und Sba1/p23, die beide ebenfalls assoziiert mit dem SHR-Hsp90-Komplex vorgefunden wurden (Johnson und Toft, 1994, 1995). Nukleotidbindung führt zur Dissoziation der TPR-Cochaperone unter Ausbildung des späten Komplexes, in welchem ATP-Hydrolyse und die Freisetzung des *clients* stattfinden.



**Abbildung 1-8: Cochaperonezyklus des Hsp90 bei der Substratreifung.** Sti1/Hop bindet an die offene Konformation von Hsp90 zusammen mit Hsp70 und dem *client*-Protein und bildet so den Intermediärkomplex. Der ATPase-inhibierte Zustand scheint Hsp90 auf die Bindung einer PPIase auf die freie Akzeptorbindestelle vorzubereiten, was zu der Ausbildung eines asymmetrischen Komplexes führt. Der Aktivator Aha1 schwächt die Bindung von Sti1 an Hsp90, was zu dessen Freisetzung führt zusammen mit Hsp70. Vorher fand der Transfer des *clients* von Hsp70 auf Hsp90 statt. Aha1 beschleunigt die Bildung des N-terminal geschlossenen Zustandes (geschlossen 1). Die Bindung von p23 schließlich verdrängt Aha1 und führt zum vollständig geschlossenen Zustand (geschlossen 2). Nach erfolgreicher ATP-Hydrolyse werden p23 und der aktivierte *client* freigesetzt. In Abwesenheit weiterer Cochaperone führt Aha1 zu einer beschleunigten ATP-Hydrolyse (grauer Pfeil). Diese Abbildung wurde aus Röhl *et al.* (2013) entnommen und modifiziert.

### 1.3 Inhibition von Hsp90 als Anti-Tumor-Strategie

#### 1.3.1 Rolle von Hsp90 in Krebszellen

Unter normalen zellulären Bedingungen helfen Chaperone wie Hsp90 vielen Substratproteinen dabei ihre korrekte Faltung beizubehalten und schützen sie so vor proteolytischem Abbau und ermöglichen es ihnen, ihre Funktion auszuüben. Werden Zellen proteotoxischem Stress (wie z.B. Hitze, Schwermetallen, Hypoxie oder Acidose) ausgesetzt, so führt dies zu einer erhöhten Expression an Chaperonen, als adaptive Antwort, um die Überlebenschancen von Zellen erhöhen. Aufgrund dieser beiden Eigenschaften spielen Chaperone eine zentrale Rolle in Tumorzellen (Whitesell und Lindquist, 2005). In den meisten menschlichen Tumoren ist eine erhöhte Expression von einem oder mehreren Hsps im Vergleich zu normalen Gewebe (Chant *et al.*, 1995; Ciocca *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1993), so auch von Hsp90

(Conroy *et al.*, 1998; Pick *et al.*, 2007), vorhanden. Mit einer vermehrten Expression von Hsp70 entziehen sich Tumorzellen der stress-induzierten Apoptose, da für eine erfolgreiche Inhibition der stress-induzierten Apoptose die intakte Chaperonaktivität von Hsp70 notwendig ist (Mosser *et al.*, 2000). Der Grund hierfür liegt an der Beteiligung von Hsp70 am Apoptose Signalweg an verschiedensten Stellen, wie z.B. der Regulation des Apoptose Signalweges durch den JNK-SAPK (*Jun N-terminal kinase-stress-activated protein kinase*) Weg, der Caspase-Aktivierung oder der Beteiligung an Prozessen nach der Caspase-Aktivierung (Mosser und Morimoto, 2004).

Die Rolle von Hsp90 in Krebszellen ist vielfältiger als die Verhinderung von Apoptose, obwohl es durch seinen Effekt auf AKT (Basso *et al.*, 2002), TNF (*tumor necrosis factor*)-Rezeptoren (Vanden Berghe *et al.*, 2003) und NF (*nuclear factor*)- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2002) auch Einfluss auf die Apoptose von Tumorzellen nimmt. Die Tatsache, dass auch einige Onkoproteine selbst Substrate von Hsp90 sind, davon stabilisiert und in einem aktivem Zustand gehalten werden, zeigt die zentrale Rolle, die Hsp90 in der Tumorentstehung einnimmt. Eines der dramatischen Beispiele ist die Src-Tyrosinkinase. Die Kinaseaktivität von c-Src wird durch intramolekulare Interaktionen der Kinasedomäne, der SH3- und der SH2-Domäne reprimiert (Williams *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997). Diese Interaktion stabilisiert gleichzeitig das Protein, weshalb c-Src kaum auf die Stabilisierung von Hsp90 angewiesen ist (Xu *et al.*, 1999). Konstitutiv aktiven v-Src Mutanten hingegen fehlt die SH2-Domäne, d.h. sie sind meist instabiler und stärker auf die Hilfe von Hsp90 angewiesen (Falsone *et al.*, 2004). Die unregulierte Aktivität der v-Src-Varianten ist der Grund für ihre tumorfördernde Wirkung. Durch deren Stabilisierung ist Hsp90 maßgeblich an dieser Tumorgenese beteiligt (Whitesell *et al.*, 1994; Xu und Lindquist, 1993).

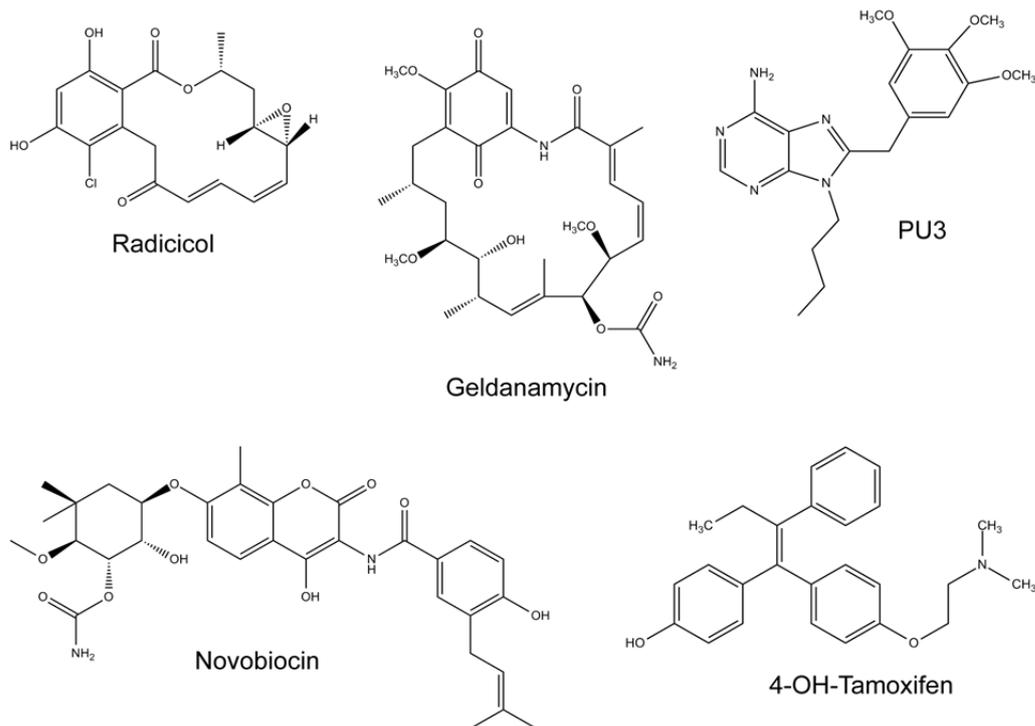
Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung von Hsp90 an Tumorentstehung ist die Stabilisierung mutierter Varianten des Tumorsuppressorproteins p53. Mutationen von p53 sind einer der häufigsten genetischen Defekte in humanen Krebsarten (Whitesell und Lindquist, 2005). p53 ist ein kurzlebige Protein, das durch transiente Interaktion mit der Hsp90 Maschinerie in einem aktiven Zustand gehalten wird und dessen Abbau über das Ubiquitin-Proteasom System reguliert wird (Muller *et al.*, 2004; Walerych *et al.*, 2004). Die Mutation von p53 führt meist zu einer abnormen Konformation, die in einer stärkeren Abhängigkeit von der Hsp90 Chaperonfunktion resultiert, sodass dadurch der Abbau durch das Proteasom verhindert wird. Zudem verliert p53 durch die veränderte Konformation seine Fähigkeit DNA zu binden und somit seine Tumorsuppressorfunktion (Whitesell und Lindquist, 2005).

Wird Hsp90 inhibiert, so führt dies zur vermehrten Ubiquitylierung seiner *client*-Proteine und dem anschließendem Abbau durch das Proteasom (Workman *et al.*, 2007; Zuehlke und Johnson, 2010). Die Inhibition von Hsp90 ist heute eine wichtige Strategie in der Bekämpfung von Krebs, da dessen Inhibition Auswirkung auf gleich mehrere onkogene Signalwege hat. Zunächst galt es jedoch als kritisch, ein *Housekeeping* Protein zu inhibieren, das konstitutiv exprimiert wird und in seiner Funktion essentiell ist. Doch die Ergebnisse der ersten Phase der klinischen Studien des Geldanamycin Derivats 17-Allylamino-17-desmethoxygeldanamycin (17-AAG) zeigten, dass die Verabreichung dieses Hsp90 Inhibitors an Patienten mit akzeptabler Toxizität einhergeht und sich zugleich die erwünschten pharmakodynamischen Veränderungen des Hsp90 *client*-Protein Levels ergeben (Banerji *et al.*, 2005; Goetz *et al.*, 2005; Grem *et al.*, 2005).

Nicht nur cytoplasmatisches Hsp90 spielt in Tumoren eine entscheidende Rolle. Neuere Studien zeigen auch, dass die Menge an Hsp90 an der Zelloberfläche in Krebszellen deutlich erhöht ist und mit Metastasierungsaktivität korreliert (Becker *et al.*, 2004). Die Inhibition von sekretiertem Hsp90 kann Zellmotilität *in vivo* und die Metastasierungsaktivität von Tumoren *in vivo* reduzieren (Tsutsumi *et al.*, 2008).

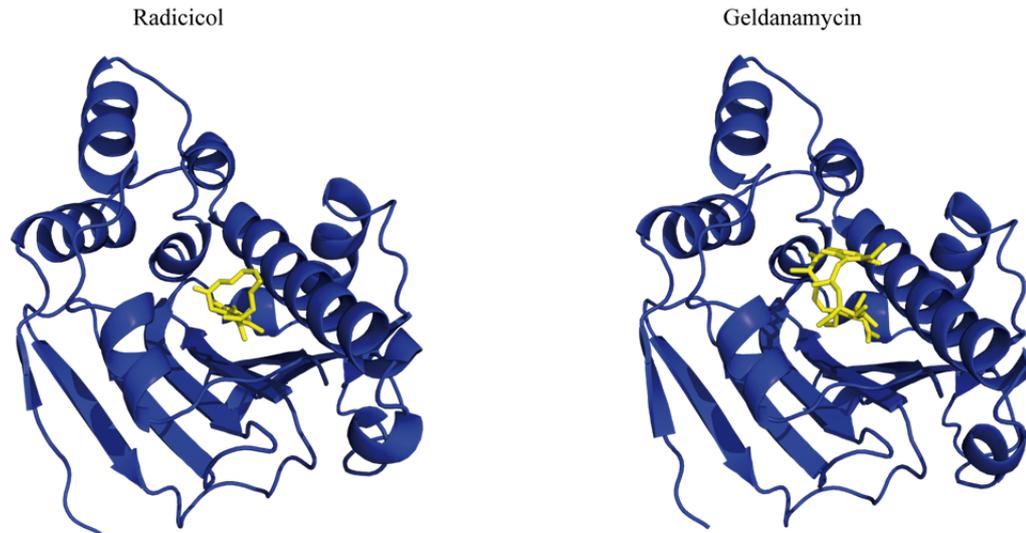
### 1.3.2 Modulatoren von Hsp90

Es wurden bereits mehrere natürliche Substanzen identifiziert, die die Funktion von Hsp90 inhibieren können. Strukturell sind Modulatoren der Hsp90 Aktivität eine sehr diverse Gruppe und zeigen keine große Ähnlichkeit. Strukturen ausgewählter Hsp90 Modulatoren sind in **Abbildung 1-9** gezeigt.



**Abbildung 1-9: Strukturen ausgewählter Hsp90 Modulatoren.** Chemische Strukturformeln der Hsp90 Inhibitoren Radicicol, Geldanamycin, PU-H71 und Novobiocin. 4-OH-Tamoxifen ein Aktivator der Hsp90 ATPase Aktivität. Die Strukturen wurden mit dem Programm ChemDraw Ultra 12.0 erstellt.

Geldanamycin ist ein natürliches Ansamycin-Antibiotikum, das aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde (DeBoer *et al.*, 1970). Die Anti-Tumor Wirkung von Ansamycinen auf Fibroblasten, die mit onkogenen Tyrosinkinasen transformiert wurden, wurde zunächst als Kinase-Inhibition gedeutet (Uehara *et al.*, 1988). Schließlich konnte gezeigt werden, dass ihr eigentliches Ziel Hsp90 ist (Whitesell *et al.*, 1994). Ein weiterer natürlicher Hsp90 Inhibitor ist Radicicol, ein makrozyklisches Lakton-Antibiotikum, das aus *Monocillium nordinii* isoliert wurde (Delmotte und Delmotte-Plaqué, 1953). Beiden Inhibitoren ist gemeinsam, dass sie in die N-terminale Nukleotidbindetasche von Hsp90 mit höherer Affinität als ATP binden und so mit der Nukleotidbindung direkt kompetieren und die ATPase Aktivität von Hsp90 inhibieren (Grenert *et al.*, 1997; Roe *et al.*, 1999) (**Abbildung 1-10**). Dies führt zur Ubiquitylierung und dem proteasomalen Abbau seiner *client*-Proteine (Workman *et al.*, 2007; Zuehlke und Johnson, 2010).



**Abbildung 1-10: Kristallstrukturen von Radicol und Geldanamycin gebunden an die N-Domäne von  $\gamma$ Hsp90.** Gezeigt sind die Kristallstrukturen der N-Domäne von  $\gamma$ Hsp90 in Komplex mit Radicol (pdb 1bgq) und Geldanamycin (pdb 1ah4). Die Struktur der N-Domäne ist jeweils in blau dargestellt, die Inhibitoren in gelb. Die Abbildung wurde mit Hilfe von Pymol erstellt.

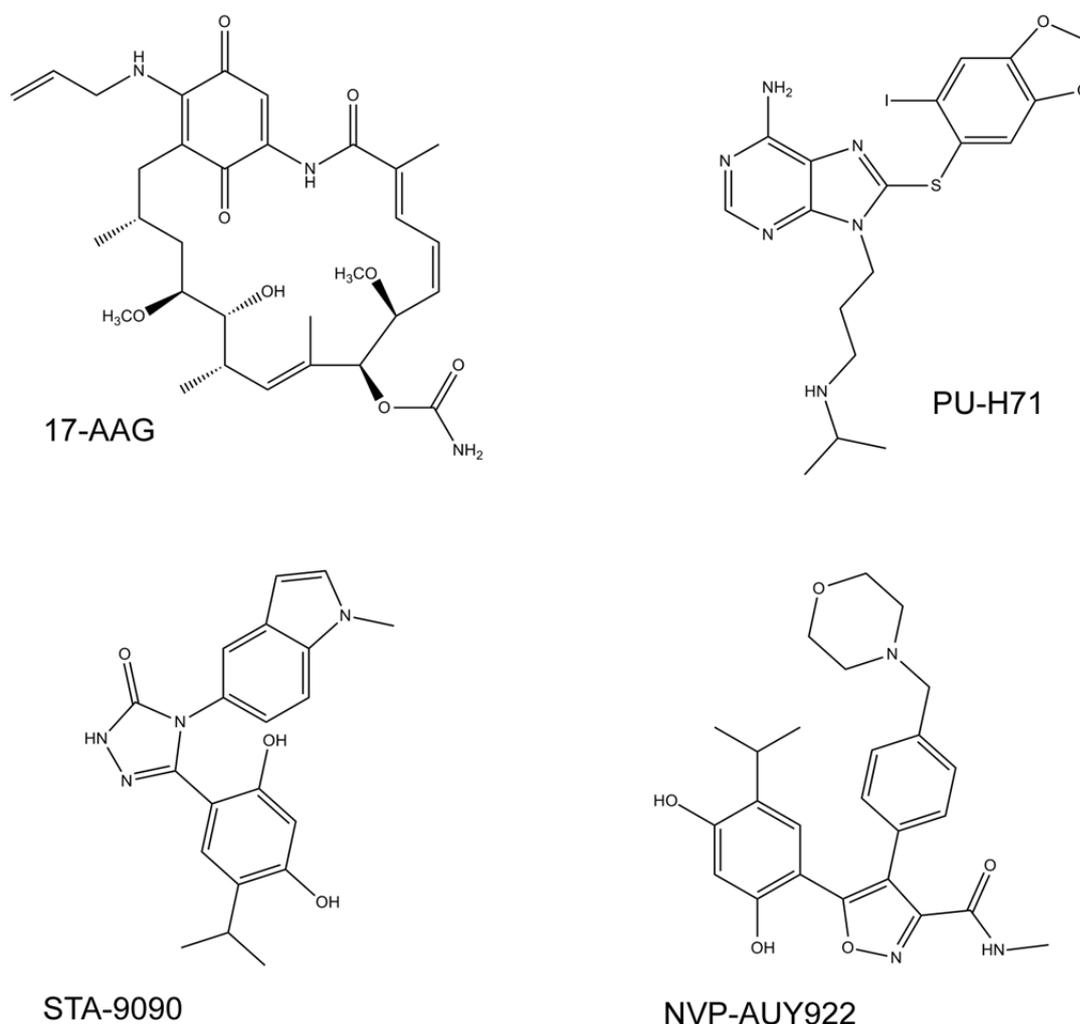
Im Gegensatz zu Geldanamycin besitzt Radicol keine *in vivo* Aktivität, da es im Serum instabil ist (Jhaveri *et al.*, 2012). Geldanamycin besitzt jedoch eine sehr große Hepatoxizität, was eine Derivatisierung erforderte. 17-AAG (**Abbildung 1-11**) ist eines der Derivate mit verminderten Nebenwirkungen und war auch der erste Hsp90 Inhibitor, der in humanen klinischen Studien getestet wurde (Banerji *et al.*, 2005). Mittlerweile sind einige Derivate von Geldanamycin, Radicol oder des Resorcinol-Rings (z.B. STA9090, NVP-AUY922 siehe **Abbildung 1-11**) in der klinischen Phase für die unterschiedlichsten Krebsarten, bis hin zu Phase III (Hong *et al.*, 2013; Jhaveri *et al.*, 2012).

Die Lösung der Kristallstrukturen der N-Domäne von Hsp90 allein, in Gegenwart von ATP/ADP, Radicol oder Geldanamycin ermöglichte das rationale Design von Hsp90 Inhibitoren wie PU3 (**Abbildung 1-9**), das von einer Purin-Struktur abgeleitet ist (Chiosis *et al.*, 2001). Einige Derivate von PU3 sind mittlerweile auch in die klinische Testphase eingetreten wie PU-H71 (Jhaveri *et al.*, 2012) (**Abbildung 1-11**).

Novobiocin ist ein Antibiotikum aus *Streptomyces niveus*, das ein Aminocumarin enthält (**Abbildung 1-9**). Ursprünglich wurde es als Inhibitor der bakteriellen DNA-Gyrase B identifiziert, wo es in die Nukleotidbindetasche bindet. Es wurde gezeigt, dass Novobiocin auch mit Hsp90 interagieren kann und seine Chaperonfunktion inhibiert, ähnlich wie Geldanamycin und Radicol (Marcu *et al.*, 2000b). Anders als Radicol und Geldanamycin bindet Novobiocin an eine neue Stelle in der C-Domäne von Hsp90 (Marcu *et al.*, 2000a). Basierend auf der Struktur von Novobiocin wurden weitere Hsp90 Inhibitoren synthetisiert

(Yu *et al.*, 2005) und die Selektivität gegen das eigentliche Ziel des Antibiotikums Novobiocin, nämlich die bakterielle DNA-Gyrase B, erhöht (Burlison *et al.*, 2006).

Mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT, **Abbildung 1-9**) und Tamoxifen wurden bereits erste Aktivatoren der Hsp90 ATPase Aktivität beschrieben (Zhao *et al.*, 2010). Sie wurden im Rahmen einer Dockingstudie entdeckt, in der für neue Bindepartner dieser Östrogenblocker gesucht wurde (Zhao *et al.*, 2010). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass 4-OHT mit einer Affinität von 60 -100  $\mu\text{M}$  an Hsp90 bindet und die ATPase Aktivität zweifach stimuliert, der Wirkungsmechanismus bleibt ungeklärt (Zhao *et al.*, 2010). Des Weiteren ist der Einfluss von Aktivatoren auf die *client*-Prozessierung von Hsp90 bisher unbekannt.



**Abbildung 1-11: Hsp90 Inhibitoren in klinischen Studien.** Gezeigt sind die chemischen Strukturformeln von Hsp90 Inhibitoren, die in klinischen Studien untersucht werden bzw. wurden. Darunter das Geldanamycin-Derivat 17AAG, das von PU3 abgeleitete PU-H71, sowie STA-9090 (Ganetespib<sup>2</sup>) und NVP-AUY922, die zur Klasse der Resorcinol-Derivate gehören. Die Strukturen wurden mit dem Program Chem Draw Ultra 12.0 erstellt.

<sup>2</sup> Struktur entnommen aus [http://www.syntapharma.com/documents/Ganetespib\\_GALAXY-2\\_ASCO\\_2013\\_Poster.pdf](http://www.syntapharma.com/documents/Ganetespib_GALAXY-2_ASCO_2013_Poster.pdf) aufgerufen am 17.06.2013.

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Hsp90 ATP zu binden und zu hydrolysieren essentiell für die Lebensfähigkeit von eukaryontischen Zellen ist (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998). Die Bindung des Nukleotids induziert im Hsp90 große strukturelle Änderungen (Shiau *et al.*, 2006), deren genauere Analyse mittels FRET-Techniken zur Identifikation zweier *on pathway* Intermediate führte (Hessling *et al.*, 2009; Mickler *et al.*, 2009). Welche Rolle das *Timing* der Population dieser Intermediate für die Funktionalität von Hsp90 spielt, ist noch unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Hsp90-Varianten charakterisiert werden, mit dem Ziel, Intermediatzustände während des Konformationszyklus anzureichern, um einen besseren Einblick in die Bedeutung der Konformationsänderungen von Hsp90 *in vitro* und *in vivo* zu erlangen.

Die Inhibition von Hsp90 stellt aufgrund seiner zentralen Rolle in Krebszellen eine wichtige Strategie zur Bekämpfung des Tumorwachstums dar. Die Identifizierung neuer Substanzen oder Substanzklassen, die die Hsp90 Aktivität inhibieren ist deswegen von großer Bedeutung. Meist werden derartige Substanzen durch Screens auf Basis der Hsp90 ATPase Aktivität gesucht. Mit Hilfe des etablierten Hsp90 FRET-Systems (Hessling *et al.*, 2009), das die Konformationsänderungen sichtbar macht, die mit der Nukleotidbindung assoziiert sind, sollte zum einen eine *Screening* Methode etabliert und neue Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen identifiziert werden. Die so erhaltenen Substanzen sollten anschließend in Bezug auf ihren Funktionsmechanismus näher charakterisiert werden.



## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Oligodesoxynukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in **Tabelle 2-1** aufgeführt. Sie wurden von MWG Eurofins (Ebersberg) bezogen.

**Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxyribonukleotide.**

Primer	Nukleotidequenz 5'-3'	Verwendung
Delta8 (+)	CAAGCTGAAATTACTCAGTTGATGA G	Mutagenese Deletion ersten acht Aminosäuren yHsp90
Delta8 (-)	CAT ATG GCT GCC GCG CG	Mutagenese Deletion ersten acht Aminosäuren yHsp90
A10T (+)	ACTGAAATTACTCAGTTGATGAGTT T	Mutagenese A10T yHsp90
A10T (-)	TTGAAATTCAAAGTTTCACTAGCC AT	Mutagenese A10T yHsp90
L18R (+)	CGGATCATCAACACCGTCTATTCTA AC	Mutagenese L18R yHsp90
L18R (-)	ACTCATCAACTGAGTAATTTTCAGCT TG	Mutagenese L18R yHsp90
T22I (+)	ATTGTCTATTCTAACAAGGAAATTT TCTTGAG	Mutagenese T22I yHsp90
T22I (-)	GTTGATGATCAAACATCAACTGA G	Mutagenese T22I yHsp90
E33A (+)	CACTGATATCTAATGCCTCGGAT	Mutagenese E33A yHsp90
E33A (-)	CTCTCAAGAAAATTTCTTGTTAGA	Mutagenese E33A yHsp90
D79N (+)	AATTCTGGTATTGGTATGACCAAGG	Mutagenese D79N yHsp90
D79N (-)	TCTGATTTCCAAAACTTTTGCTCTG G	Mutagenese D79N yHsp90
T101I (+)	ATTAAAGCCTTCATGGAAGCTCTAT CTG	Mutagenese T101I yHsp90
T101I (-)	ACCAGACTTGGCAATGGTACCC	Mutagenese T101I yHsp90
A107N (+)	AATCTATCTGCTGGTGCCGATGTAT C	Mutagenese A107N yHsp90
A107N (-)	TTCCATGAAGGCTTTGGTACCAGAC	Mutagenese A107N yHsp90
R346S (+)	AGTCGTGTTTTTCATCACTGATGAAG	Mutagenese R346S yHsp90
R346S (-)	AACGTACAACCTTGATATTATTCTTCT TC	Mutagenese R346S yHsp90
R380A (+)	GCAGAAATGTTACAACAAAATAAG ATCATG	Mutagenese R380A yHsp90
R380A (-)	GGACAAATTCAATGGTAAATCCTC	Mutagenese R380A yHsp90

Fortsetzung Tabelle 2-1

Primer	Nukleotidsequenz 5'-3'	Verwendung
yHsp90fwd- BamHI	TTTTGTACGGATCCATGGCTAGTGAAA CTTTTGAATTTTC	Klonierung yHsp90 Einfügen <i>Bam</i> HI Schnittstelle
y90neu_rev SalI	CTAGCTAGGTGGACCTAATCTACCTCT TCCATTTCGG TGTC	Klonierung yHsp90 Einfügen <i>Sal</i> I Schnittstelle
Delta8_fwd BamHI	TTTTGTACGGATCCATGCAAGCTGAA ATTACTCAGTTGATG	Klonierung $\Delta$ 8yHsp90 Einfügen <i>Bam</i> HI Schnittstelle
T7 forward	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung
T7 reverse	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	Sequenzierung
yHsp82fwd205	CCAATTAGTCGTCACCAAGG	Sequenzierung
CycTerm_rev	TAATAGGGACCTAGCTTCAGGTTG	Sequenzierung
GPDPPro_F	CGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG	Sequenzierung

### 2.1.2 Bakterien-, Hefestämme und Plasmide

Im **Tabelle 2-2** sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme aufgelistet. *E. coli* DH10B und *Mach1* Zellen wurden zur Plasmid Vermehrung verwendet. Zur Proteinexpression wurden *E. coli* BL21 Zellen herangezogen.

Für die *in vivo* Charakterisierung der Hsp90-Varianten wurde der Stamm *ECU 82 $\alpha$*  verwendet. Der Einfluss der Hsp90 Modulatoren auf die *client*-Prozessierung wurde in BY4741 untersucht.

Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendeten Hefestämme und Plasmide.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74 recA1 endA1 araD139 (ara, leu)</i> 7697 <i>galU galK - rpsL nupG tonA</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> Mach 1	$\Delta$ <i>recA1398 endA1 tonA <math>\Phi</math>80<math>\Delta</math><i>lacM15</i> <math>\Delta</math><i>lacX74</i> <i>hsdR(rK- mK+)</i></i>	Invitrogen (Darmstadt)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdS(rB- mB-)</i> <i>dcm+</i> <i>Tetr gal 1</i> (DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW CamR]</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>ECU 82<math>\alpha</math></i>	Genotyp Hsp82:: <i>LEU</i> hsc82:: <i>LEU2</i> <i>ade2 his3</i> <i>leu2 trp1 ura3 + pRS 426 Hsp82</i>	(Nathan <i>et al.</i> , 1997)
BY4741	MATa; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0	Euroscarf (Frankfurt)
BY4741 $\Delta$ Aha1	MATa; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YDR214w:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in **Tabelle 2-3** aufgelistet. Sie wurden von den angegebenen Quellen bezogen, oder mittels *blunt-end*-Mutagenese (2.2.3.3) mit den in **Tabelle 2-1** gelisteten *Primern* erzeugt.

**Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.**

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pET28	Expressionsvektor für <i>E. coli</i>	Merck Biosciences (Schwalbach)
pET28-yAha1	Expression Hefe Aha1 in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	Dr. Klaus Richter, TU München
pET28-y90	Expression Hefe Hsp82 in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	Dr. Klaus Richter, TU München
pET28-y90 D61C	Expression Hefe Hsp82 D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	Dr. Martin Hessling, TU München
pET28-y90 Q385C	Expression Hefe Hsp82 Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	Dr. Martin Hessling, TU München
pET28-y90 Δ8	Expression Hefe Hsp82 Δ8 in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	Dr. Klaus Richter, TU München
pET28-y90 Δ8 D61C	Expression Hefe Hsp82 Δ8 D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 Δ8 Q385C	Expression Hefe Hsp82 Δ8 Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 A10T	Expression Hefe Hsp82 A10T in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 A10T D61C	Expression Hefe Hsp82 A10T D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 A10T Q385C	Expression Hefe Hsp82 A10T Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 L18R	Expression Hefe Hsp82 L18R in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 L18R D61C	Expression Hefe Hsp82 L18R D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 L18R Q385C	Expression Hefe Hsp82 L18R Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 T22I	Expression Hefe Hsp82 L18R in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 T22I D61C	Expression Hefe Hsp82 L18R D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 T22I Q385C	Expression Hefe Hsp82 L18R Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 E33A	Expression Hefe Hsp82 L18R in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 E33A D61C	Expression Hefe Hsp82 L18R D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 E33A Q385C	Expression Hefe Hsp82 L18R Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2-3 Teil 1

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pET28-y90 D79N	Expression Hefe Hsp82 L18R in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 D79N D61C	Expression Hefe Hsp82 L18R D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 D79N Q385C	Expression Hefe Hsp82 L18R Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 T101I	Expression Hefe Hsp82 T101I in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 A107N	Expression Hefe Hsp82 A107N in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 A107N D61C	Expression Hefe Hsp82 A107N D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 A107N Q385C	Expression Hefe Hsp82 A107N Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 R346S	Expression Hefe Hsp82 R346S in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 R346S D61C	Expression Hefe Hsp82 R346S D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 R346S Q385C	Expression Hefe Hsp82 R346S Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 R380A	Expression Hefe Hsp82 R380A in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 R380A D61C	Expression Hefe Hsp82 R380A D61C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28-y90 R380A Q385C	Expression Hefe Hsp82 R380A Q385C in <i>E.coli</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
p423GPD	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i>	ATCC, Manassas, USA
p423GPD-y90	Expression Hefe Hsp82 in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	Christine John, Masterarbeit
p423GPD-y90 Δ8	Expression Hefe Hsp82 Δ8 in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p423GPD-y90 A10T	Expression Hefe Hsp82 A10T in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p423GPD-y90 L18R	Expression Hefe Hsp82 L18R in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p423GPD-y90 T22I	Expression Hefe Hsp82 T22I in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p423GPD-y90 E33A	Expression Hefe Hsp82 E33A in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p423GPD-y90 D79N	Expression Hefe Hsp82 D79N in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p423GPD-y90 T101I	Expression Hefe Hsp82 T101I in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p423GPD-y90 A107N	Expression Hefe Hsp82 A107N in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p423GPD-y90 R346S	Expression Hefe Hsp82 R346S in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2-3 Teil 2

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
p423GPD-y90 R380A	Expression Hefe Hsp82 R380A in <i>S. cerevisiae</i> ; ohne Tag; Amp <sup>R</sup> ; his	diese Arbeit
p413GPD human GR	GR- Expressionsplasmid für <i>S. cerevisiae</i> ; GPD-Promotor; his	Dr. Andreas Schmid, TU München
pUCΔSS-26X	β-Galactosidase-Reporterplasmid für GR für <i>S. cerevisiae</i>	J.F. Louvion (Louvion <i>et al.</i> , 1996)
p426GPDβGal	β-Galactosidase-Expressionsplasmid für <i>S. cerevisiae</i>	Dr. Andreas Schmid, TU München

### 2.1.3 Nährmedien

dYT-Medium:	5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton
feste Nährböden:	LB <sub>0</sub> -Medium +20 g/l Agar-Agar
Selektionsmedium:	20 g/l Glucose, 6,7 g/l YNB, 1 ml/l 1M NaOH, 2 g/l Aminosäuremix
Feste Nährböden:	Selektionsmedium + 20 g/l Agar-Agar
Aminosäuremix:	0,5 g Adenin, 2 g Arginin, 2 g Aspartat, 2 g Histidin, 10 g Leucin, 2 g Lysin, 2 g Methionin, 2 g Phenylalanin, 2 g Threonin, 2 g Tyrosin, 3 g Uracil

Je nach Resistenz der zu kultivierenden *E. coli* Zellen wurden dem autoklavierten Medium bzw. den Nährböden 35 µg/ml Kanamycin, 25 µg/ml Chloramphenicol oder 200 mg/ml Ampicillin in Form sterilfiltrierter Lösungen zugegeben.

Da zur Selektion von *S. cerevisiae* Auxotrophien verwendet werden fehlt im Selektionsmedium jeweils die entsprechende Aminosäure.

### 2.1.4 Enzyme

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (~ 6 U/µl),	Promega, Madison, USA
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/µl),	
T4-DNA-Ligase (1 Weiss U/µl),	
<i>Dpn</i> I (20 U/µl)	
<i>Bam</i> HI HF, <i>Sal</i> I HF,	New England Biolabs, Frankfurt
bovines Serumalbumin (BSA 100x) (100 mg/ml)	

T4-Polynukleotidkinase (10 U/ $\mu$ l), rAPid Alkalische Phosphatase, LDH (2750 U/ml in 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), PK (2000 U/ml in 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	Roche, Mannheim  Roche, Mannheim
--	--

### 2.1.5 Chemikalien

ATTO 488 Maleimid, ATTO 550 Maleimid 5(6)-FAM, 5- iodacetamido-fluorescein Lachssperma DNA, Radicicol, Imidazol ATP, ATP $\gamma$ S, AMP-PNP, PEP, NADH	ATTO-TEC, Siegen Invitrogen/ <i>Life Technologies</i> , Paisley, UK Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Roche, Mannheim
--	--

Alle weiteren Chemikalien wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, in der Reinheit p.A. von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen.

### 2.1.6 Größenstandards und Kits

peqGOLD 1 kb DNA Ladder <i>Low Molecular Weight</i> Standard Wizard <i>Plus SV</i> Minipreps DNA Purification System, Wizard <i>SV</i> Gel and Clean- Up System	Peqlab, Erlangen BioRad, München Promega, Madison, USA
---	--

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Ni-NTA FF, Resource Q 6ml, Superdex 75 Prep Grade, Superdex 200 Prep Grade, Superdex 75, CFT-Hydroxylapatit Millipore-Filter Typ SV (Porengröße 0,025 $\mu$ M), Zentrikons 10/30 Dialyseschläuche ERG 1,5 ml/ 2 mL, Pipettenspitzen	GE Healthcare, Freiburg  BioRad, München Millipore, Bedford, USA  Spectrum, Houston, USA Sarstedt, Nümbrecht
--	--

### 2.1.8 Geräte

Soweit nicht anders angegeben, wurden die am Lehrstuhl für Biotechnologie vorhandenen Standardgeräte verwendet.

Spektrophotometer:

Cary 50 Bio UV-Vis

Agilent, Santa Clara, USA

UV 1100

GE Healthcare, Freiburg

Spektropolarimeter:

Jasco, Groß-Umstadt

Jasco J715 mit PTC 343 Peltier

Fluoreszenzspektrophotometer:

Horiba Yobin Yvon, München

FluoroMax-2

FluoroMax-3

FluoroMax-4

FPLC: ÄKTA

GE Healthcare, Freiburg

HPLC:

Jasco, Groß-Umstadt

Pumpe PU-1850, UV-Detektor UV-1575,

Fluoreszenzdetektor FP-920

Sequential *stopped-flow* Spektrofluorimeter

Applied Photophysics, Leatherhead, GB

SX18-MV

Analytische Ultrazentrifuge

BeckmannCoulter, Krefeld

XL-A

### 2.1.9 Computersoftware

Adobe Suite

Adobe System, San Jose, USA

Borwin

Jasco, Groß-Umstadt

Berkeley-Madonna

Robert I. Macey & George F. Oster  
([www.berkeleymadonna.com](http://www.berkeleymadonna.com))

ChemDraw Ultra 12.0

PerkinElmer informatics  
([www.cambridgesoft.com](http://www.cambridgesoft.com))

Endnote X5

Adept Scientific, Herts, GB

Microsoft Office 2011

Microsoft Corporation, Redmond, USA

Origin 8G	Originlab, Northhampton, USA
PyMOL	Schrödinger (www.schrodinger.com)
Sedview	Hayes D.B. & Stafford W.F. (Hayes und Stafford, 2010)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Elektrophoretische Methoden

#### 2.2.1.1 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Probenpuffer (10x): 0,2 % (w/v) Xylencyanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 50 % (v/v) Glycerol, 10 mM EDTA

TAE-Puffer (50x): 2 M Tris/Acetat pH<sup>RT</sup> 8, 50 mM EDTA, 0,11 % Eisessig

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Identifizierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten genutzt. Es wurde dabei eine Agarosekonzentration von 1 % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer verwendet. Zusätzlich wurde die Agaroselösung mit 2 µL pro 100 mL *Stain G* (Serva, Heidelberg) versetzt. Die Proben wurden mit 1/10 Probenvolumen an Probenpuffer versetzt. Hierauf konnte bei Kolonie-PCR Proben verzichtet werden, da hier der PCR-Puffer direkt als Probenpuffer diente und die Proben unmittelbar aufgetragen werden konnten. Die Trennung erfolgte für 30 min in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer in 0,5 % TAE-Puffer, bei 130 V. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch Anregung der *Stain G* Fluoreszenz ( $\lambda = 302$  nm).

Im Falle eines präparativen Gels wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit Hilfe des *Wizard SV Gel Clean-Up* Kits präpariert.

#### 2.2.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

SDS-Probenpuffer (5x): 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin 300 mM Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 6,8 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (w/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris/HCl pH<sup>RT</sup> 8,8, 0,8 % (w/v) SDS

---

Sammelgelpuffer (2x):	250 mM Tris/HCl pH <sup>RT</sup> 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer (10x):	255 mM Tris/HCl pH <sup>RT</sup> 6,8, 2 M Glycerol 1 % (w/v) SDS
Fairbanks A:	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Blau R
Fairbanks D:	10 % (v/v) Eisessig in ddH <sub>2</sub> O

Die SDS-PAGE wurde zur Größenbestimmung von Proteinen und Kontrolle der Reinheit der gereinigten Proteine verwendet. Es wurden Elektrophoresegele mit 12,5 %igem Trenngel verwendet. Die Polymerisation von 10 ml Trenngel (3,475 ml ddH<sub>2</sub>O, 2,5 ml Trenngelpuffer (4x), 3,125 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid) wurde durch Zugabe von 100 ml 10 % APS und 15 ml TEMED gestartet. Das ca. 5 cm hoch gegossene Trenngel wurde sofort mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet und abgedeckt. Nach Ende der Polymerisation wurde das Isobutanol abgegossen und durch gründliches Spülen mit ddH<sub>2</sub>O vollständig entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel (1,85 ml ddH<sub>2</sub>O, 52,5 ml Sammelgelpuffer (2x), 0,625 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid) durch Zugabe von 100 µl 10 % (w/v) APS und 10 µl TEMED die Polymerisation gestartet und nach kurzem Durchmischen das Sammelgel ca. 1,5 cm hoch gegossen. Nach dem Einsetzen der Kämme wurde das Gel etwa 20 min abgedeckt zur Polymerisation stengelassen. Die fertigen Gele wurden bei 4 °C gelagert. □

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (5x) versetzt und anschließend im Heizblock bei 95 °C 5 min lang erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation (13000 rpm, 5 s) wurden die Proben auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Hoefer Mighty Small II-Vertikal-Elektrophorese-Apparatur (GE Healthcare, Freiburg) bei RT durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA bis der Farbmaler des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hatte. Das Gel wurde in heißer Fairbanks A ca. 5 min gefärbt und in Fairbanks D entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

### 2.2.2 Präparation von Plasmiden

Plasmide aus *E. coli* wurden ausgehend von einer 5 ml ÜNK mit Hilfe des Wizard *Plus SV* Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Plasmide aus *S. cerevisiae* wurden aus 3 ml einer stationären Kultur präpariert. Die pelletierten Zellen (3 min, 3000 rpm) wurden in 200 µl PBS aufgenommen und anschließend 30 min bei 37 °C mit 8 U Lytikase verdaut. Um die Zellen möglichst effektiv aufzuschließen wurde ein Aufschluss mit Glasperlen und Kugelmühle durchgeführt (4 mal, 2 min, 30 sec<sup>-1</sup>, 4 °C). Die Plasmid DNA wurde schließlich aus dem Überstand des Zellaufschlusses mit Hilfe des Wizard *Plus SV* Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben isoliert.

### 2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 2.2.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die PCR ist eine sehr effektive Methode, um durch Primer definierte DNA-Abschnitte exponentiell zu vermehren. Die Amplifikation erfolgte im 100 µl Ansatz mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase. Die *Pfu*-Polymerase besitzt eine geringere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase, da sie eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität besitzt. Für die PCR wurden 10 µl *Pfu*-Puffer (10x), 3 µl dNTPs (10 mM), je 4 µl Primer (10 µM), 0,5 µl *Template*-DNA, 78 µl ddH<sub>2</sub>O und 3 U *Pfu*-Polymerase vermischt. Die Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt. Dabei wurde zunächst 2 min auf 95 °C aufgeheizt; danach wurden 30 Zyklen von je 30 s 95 °C zur Denaturierung der DNA, 30 s bei 50°C zur Anlagerung der Primer, 1 min 20 min bei 72 °C zur Polymerisation durchgeführt. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Polymerisation bei 72 °C. Zur Überprüfung des Erfolgs der PCR wurden 4 µl des Ansatzes mit 4 µl ddH<sub>2</sub>O und 2 µl Probenpuffer (10x) versetzt und die Fragmente wie unter 2.2.1.1 beschrieben elektrophoretisch getrennt.

#### 2.2.3.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient zum Nachweis korrekter Insertlänge des während der Transformation aufgenommenen Plasmids. Hierfür kann die fehleranfälligeren *Taq*-Polymerase verwendet werden, da diese robuster ist und die PCR nur zu Kontrollzwecken durchgeführt wurde. Dabei wurden für 50 µl Ansatz 39 µl ddH<sub>2</sub>O, 10 µl *Go-Taq*-Puffer (5x), 1,5 µl dNTPs (10 mM je Nukleotid), je 2 µl Primer (10 µM) sowie 0,5 µl *Go-Taq*-Polymerase verwendet. Nach Teilen des Ansatzes auf 10 µl-Ansätze wurden Kolonien von den Selektivmediumplatten mit einer Pipettenspitze gepickt und in den Ansatz gegeben. Mit derselben Spitze

wurden 50 µl LB<sub>0</sub>-Medium mit dem restlichen Zellmaterial beimpft, um positive Klone zu kultivieren (Vorkultur für ÜNK). Die PCR erfolgte mit dem in 2.2.3.1 beschriebenen Programm, wobei lediglich die Elongationszeit auf 3 min reduziert wurde. Zur Überprüfung der Länge des erhaltenen PCR Produkts wurden die Ansätze direkt auf ein 1 %iges Agarosegels geladen und wie in 2.2.1.1 beschrieben getrennt.

### 2.2.3.3 *Blunt-end-Mutagenese*

Die *blunt-end*-Mutagenese ermöglicht das Einführen gezielter Mutationen in zirkuläre DNA. Dabei werden gegenläufige Primer verwendet, die die einzuführende Mutation tragen. Im Anschluss daran muss das amplifizierte, lineare DNA-Fragment in einer Ligationsreaktion zirkularisiert werden.

In den 50 µl Ansatz für die PCR wurden 39 µl ddH<sub>2</sub>O, 5 µl *Pfu*-Puffer (10x), 1,5 µl dNTPs (10 mM je Nukleotid), je 2 µl Primer, 1 µl *Template*-DNA und 1 µl *Pfu*-Polymerase gegeben. Die Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt. Dabei wurde zunächst auf 95 °C geheizt. Anschließend wurden 25 Zyklen von je 30 s bei 95 °C zur Denaturierung der DNA, 30 s bei entsprechender Temperatur zur Primeranlagerung und 20 min bei 68 °C zur Polymerisation durchgeführt. Der PCR Ansatz wurde anschließend mit Hilfe des *Wizard SV Gel Clean- Up Kit* nach Herstellerangaben gereinigt und in 40 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Das lineare Fragment wurde anschließend in einem 30 µl Ansatz phosphoryliert. Dazu wurden 24 µl des gereinigten PCR-Produkts, 3 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), 3 µl ATP (10mM) und 1 µl T4-Polynukleotidkinase gemischt und 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Ligation wurden dem Phosphorylierungsansatz 3 µl ATP (10 mM) und 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und 4 h lang bei 18 °C inkubiert. □ Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme (65 °C, 25 min) und Abkühlen auf RT wurde dem Ansatz 1 µl *DpnI* zugefügt und mindestens drei Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Dabei wird von der Restriktionsendonuklease selektiv die methylierte *Template*-DNA verdaut, das unmethylierte PCR-Produkt bleibt dabei erhalten. Um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen wurde der *DpnI*-Verdau wie in 2.2.4.2 beschrieben transformiert. Einzelne Kolonien wurden in LB<sub>0</sub>-Medium überimpft und deren DNA mit Hilfe des *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* isoliert und durch Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz oder MWG Eurofins, Ebersberg) die Sequenz auf Richtigkeit geprüft.

## 2.2.4 Transformation von *E.coli* Zellen

### 2.2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Lösung A: 40 mM Natriumacetat, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 70 mM MnCl<sub>2</sub>

LösungA/Glycerin: 69 ml Lösung A, 31 ml 87 % (v/v) Glycerin

Um chemisch kompetente Zellen herzustellen, wurden zunächst 100 ml LB<sub>0</sub>-Medium mit 500 µl einer *E. coli* ÜNK angeimpft. Diese wurde bei 37 °C unter schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 1 bebrütet. Bei Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurden die Zellen mit 2 ml einer sterilen 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung für weitere 10 min versetzt und anschließend pelletiert (5000 rpm, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 20 ml der steriler Lösung A resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem pelletieren der Zellen (3000 rpm, 5 min, 4 °C) wurden diese in 4 ml der Lösung A/Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.4.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Transformation CaCl<sub>2</sub> kompetenter *E. coli* Zellen wurden je nach Bedarf verschiedene Stämme verwendet. *Mach1* und DH10B Zellen dienten dabei der Plasmidvermehrung und um durch *blunt-end*-Mutagenese veränderte Plasmid-DNA aufzunehmen. *BL21DE3Cd+* Zellen dienten ausschließlich der Proteinexpression. Zu 100 µl entsprechender *E. coli* Zellen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 10 µl des DpnI Verdaus oder 1 µl gereinigtes Plasmid gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert, um die Anlagerung der Plasmid-DNA an die Zellen zu ermöglichen. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec, der dazu führt, dass die Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen wird. Anschließend wurden die Zellen kurz auf Eis gestellt, 700 µl LB<sub>0</sub>-Medium zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (8000 rpm, 1 min) wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet in der verbliebenen Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB<sub>0</sub><sup>KAN</sup>-(35 µg/ml) bzw. auf LB<sub>0</sub><sup>AMP</sup>-Platten ausplattiert. Bei Inkubation über Nacht bei 37 °C können nur Zellen Kolonien bilden, die durch die Transformation durch pET28 eine Kanamycinresistenz bzw. durch p423GPD eine Ampicillinresistenz erhalten haben.

## 2.2.5 Transformation von *S. cerevisiae*

PLATE-Lösung: 90 ml 45 % (w/v) PEG 4000, 10 ml 1 M LiOAc, 1 ml 1 M Tris/HCl  
pH<sup>RT</sup> 7,5, 0,2 ml 0,5 M EDTA

400 µl einer Hefe-ÜNK wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (3000 rpm, 5 min). Nach abgießen des Überstandes wurden 2 µl Lachssperma DNA zugegeben. Diese einzelsträngige, genomische DNA steigert die Effizienz der Transformation, da sie als Träger dient, um die viel kleinere Plasmid-DNA in die Hefezellen zu transportieren. Nach Zugabe von 200 ng des Plasmids und kurzem Vortexen wurden 300 µl PLATE-Lösung dazu pipettiert und erneut gevortext. Schließlich werden 12 µl 1 M DTT zugegeben, erneut gevortext und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein 1stündiger Hitzeschock bei 42 °C bevor die Hefen auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert und für 4 Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

## 2.2.6 Umklonieren der Hsp90-Varianten

### 2.2.6.1 Amplifikation aus pet28

Die mittels *blunt-end* Mutagenese erzeugten Varianten von Hsp90 wurden zur *in vivo* Analyse in *S. cerevisiae* auch in den Vektor p423GPD kloniert (ATCC, Manassas, USA). Dazu wurde ein Fragment, das für Hsp90 kodiert mittels Standard PCR (2.2.3.1) aus dem Expressionsvektor pET28 amplifiziert. Über die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurde der N-terminale His –Tag entfernt und Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Sal*I eingefügt. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarosegel) (2.2.1.1) überprüft.

### 2.2.6.2 Restriktion

Um die Gene der *in vivo* zu analysierenden Hsp90-Varianten in den Hefektor p423GPD zu klonieren, wurde das jeweilige Genfragment mit den Enzymen *Bam*HI HF und *Sal*I HF verdaut. Zu diesem Zweck wurden 50 µl DNA mit 6 µl 10x NEB-Puffer 4, 1 µl 100x BSA und jeweils 1 µl der Restriktionsenzyme gemischt und 4 h lang bei 37 °C inkubiert. Das geschnittene DNA-Fragment wurde mit Hilfe des Wizard *SV* Gel and PCR Clean-Up

System (Promega, Madison, USA) gereinigt. Die Restriktion des Hefevektors p423GPD erfolgte unter gleichen Bedingungen, wobei allerdings über Nacht inkubiert wurde. Zusätzlich wurden 0,6 U alkalische Phosphatase (TSAP, Promega, Madison, USA) zugesetzt, um die freien Phosphatgruppen der 5'-Enden abzuspalten. Dadurch konnte eine Religation des leeren Vektors weitgehend unterdrückt werden. Der geschnittene Vektor wurde ebenfalls mit Hilfe des Wizard *SV* Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) gereinigt.

### 2.2.6.3 Ligation

Für die Ligation wurden 1 µl geschnittener Vektor, 10 µl geschnittenes Fragment, 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 7 µl ddH<sub>2</sub>O und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 Weiss U) vereinigt und über Nacht bei 18 °C inkubiert. CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* Mach 1 Zellen wurden mit 10 µl des Ligationsproduktes transformiert (2.2.4.2). Eine erfolgreiche Klonierung wurde durch die Kolonie-PCR (2.2.3.2) und die Richtigkeit der Sequenz durch Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz oder MWG Eurofins, Ebersberg) nachgewiesen.

## 2.2.7 Proteinexpression und Reinigung der Hsp90-Varianten

### 2.2.7.1 Fermentation und Zellaufschluss

Die Fermentation der Hsp90-Varianten erfolgte in einem Gesamtvolumen von je 8 l dYT<sup>Kan</sup>-Medium (35 µg/ml), aufgeteilt auf vier 5 l Erlenmeyerkolben. Die einzelnen Kolben wurden mit je 0,5 ml einer *E. coli* BL21 (DE3) ÜNK angeimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 wurde die Überexpression von Hsp90 durch Zugabe von 2 ml 1 M IPTG-Lösung induziert. Nach weiteren 4 h Inkubationszeit wurden die Zellen im JA-10 Rotor abzentrifugiert (7000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand dekantiert. Die Zellpellets wurden in insgesamt 80 ml Ni-NTA-A Puffer aufgenommen, mit Protease-Inhibitorcocktail Mix HP (Serva, ) versetzt und entweder bei – 80 °C eingefroren oder direkt aufgeschlossen.

Der Zellsuspension wurde mit einer Spatelspitze DNase I (Invitrogen/*Life Technologies*, Paisley, UK) versetzt und an einer Zellaufschlussmaschine (*Cell disrupter* Basic Z Model, Constant Systems Ltd) bei 1,8 kbar aufgeschlossen. Die lysierte Zellsuspension wurde im JA-25.50-Rotor zentrifugiert (20 000 rpm, 45 min, 4 °C). Da die überexprimierten Hsp90-

Varianten löslich im Zytosol vorlagen wurden diese aus dem Überstand gereinigt und das Pellet verworfen.

### **2.2.7.2 Ni-NTA-Affinitätschromatographie**

Ni-NTA A Puffer: 50 mM NaP pH 7,8, 300 mM NaCl

Ni-NTA B Puffer: 50 mM NaP pH 7,8, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Die Hsp90-Varianten sind auf dem Expressionsvektor mit einem N-terminalen Histidin-Tag versehen, was die Reinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht. Um Abbau durch Proteasen zu minimieren wurde diese bei einer Temperatur von 8 °C durchgeführt. Dabei wurde die Ni-NTA Säule mit Auftragspuffer äquilibriert und mit dem proteinhaltigem Überstand der Zentrifugation nach Zellaufschluss (2.2.7.1) mit einer Flussrate von 2 ml/min beladen. Anschließend wurde die Säule 35 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 4 ml/min gespült, indem der Anteil an Ni-NTA B Puffer erhöht wurde, sodass sich ein Imidazolgehalt von 30 mM ergab. Die Elution der gebundenen Hsp90-Varianten erfolgte anschließend mit 300 mM Imidazol, wobei Fraktionen zu je 5 ml gesammelt wurden. Schließlich wurde durch Waschen mit 5 Säulenvolumen 500 mM Imidazol die Säule von Proteinresten befreit. Die laut Absorptionsdetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden nachfolgend einer Ionenaustauschchromatographie unterzogen und Proben einer SDS-PAGE (2.2.1.2) unterzogen.

### **2.2.7.3 ResourceQ Anionenaustauschchromatographie**

Resource Q A Puffer: 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

Resource Q B Puffer: 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 1 KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

Hsp90 besitzt einen berechneten Isoelektrischen Punkt von 4,9 (Protparam Expasy) und kann über eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt werden. Hierfür wurden die vereinigten Fraktionen der Ni-NTA (Fraktion 1-4) mit Resource Q A Puffer auf 150 ml verdünnt, um die Ionenstärke zu reduzieren und eine Bindung von Hsp90 an die Säule zu gewährleisten. Dies wurde auf eine in Resource Q A Puffer äquilibrierte Resource Q geladen und anschließend mit 35 Säulenvolumen Resource Q A Puffer gewaschen. Zur Verbesserung der

Reinigung wurde zunächst die KCl Konzentration kontinuierlich innerhalb von 10 ml auf 100 mM erhöht und anschließend innerhalb von 150 ml auf 500 mM. Dabei wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Während der gesamten Reinigung betrug die Flussrate 4 ml/min. Von den laut Absorptionsdetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden Proben einer SDS-PAGE (2.2.1.2) unterzogen. Hsp90-Varianten ohne Cysteine wurden weiter über eine Hydroxylapatit-Chromatographie gereinigt, Hsp90-Varianten mit Cysteinen wurden direkt einer Gelfiltration unterzogen.

#### **2.2.7.4 Hydroxylapatit-Chromatographie**

HAT A Puffer: 20 mM KP pH 7,5, 1 mM DTT

HAT B Puffer: 500 mM KP pH 7,5, 1 mM DTT

Um Hsp90 von anderen verunreinigenden ATPasen zu trennen lieferte die Hydroxylapatit-Chromatographie die besten Ergebnisse. WW. Hierfür wurden die vereinigten Fraktionen der Resource Q zweimal für je 1 Stunde gegen HAT A Puffer dialysiert und anschließend auf eine in HAT A Puffer äquilibrierte CFT-HAT Säule geladen. Nach Spülen mit 4 Säulenvolumen HAT A Puffer wurde der KP Gehalt zunächst innerhalb von 10 ml kontinuierlich auf 50 mM erhöht und schließlich innerhalb von 150 ml auf 400 mM. Hierbei wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Die Flussrate betrug während der gesamten Reinigung 4 ml/min. Von den laut Absorptionsdetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden Proben einer SDS-PAGE (2.2.1.2) unterzogen. Die Fraktionen, die Hsp90 enthielten, wurden weiter einer Gelfiltration unterzogen.

#### **2.2.7.5 Gelfiltrationschromatographie**

Gelfiltrationspuffer: 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Bevor die vereinigten Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie (im Falle cysteinhaltiger Hsp90-Varianten) oder Hydroxylapatitchromatographie (im Falle cysteinfreier Hsp90-Varianten) einer Gelfiltration unterzogen wurden, wurde ihr Volumen mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra, Millipore) durch Zentrifugation (3800 rpm, 4 °C) auf 5 ml reduziert. Die Proteinlösung wurde über eine in Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad

---

SuperdexG75 *prep-grade* Gelfiltrationssäule (XK 16/60, GE Healthcare, Freiburg) bei einer Temperatur von 8 °C weiter gereinigt. Anschließend wurde die Proteinlösung 90 min lang mit Gelfiltrationspuffer eluiert (Flussrate 1 ml/min), wobei Fraktionen zu je 5 ml gesammelt wurden. Im Falle cysteinhaltiger Hsp90-Varianten wurde im Gelfiltrationspuffer auf MgCl<sub>2</sub> verzichtet und ein KCl Gehalt von 300 mM verwendet. Um die Cysteine im reduzierten Zustand zu halten wurde dem Gelfiltrationspuffer zusätzlich 5 mM DTT beigesetzt. Von den laut Absorptionsdetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden Proben einer SDS-PAGE (2.2.1.2) unterzogen.

Die Fraktionen, die Hsp90 enthielten, wurden schließlich vereinigt und mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra, Millipore) durch Zentrifugation (3800 rpm, 4 °C) auf ein Volumen von ca. 500-1000 µl eingengt. Nach Bestimmung der Konzentration wurden die cysteinfreien Hsp90-Varianten zu je 50 µl aliquotiert, die cysteinhaltigen in zwei Portionen geteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.8 Proteinexpression und Reinigung weiter Proteine

Die Proteinexpression und der Zellaufschluss von yAha1 erfolgte Analog zu den Hsp90-Varianten. Der Durchlauf der ersten Ni-NTA Affinitätschromatographie wurde erneut auf eine Ni-NTA Affinitätssäule geladen und mit 300 mM Imidazol eluiert. Von den laut Absorptionsdetektion bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden Proben einer SDS-PAGE (2.2.1.2) unterzogen. Die Fraktionen die yAha1 enthielten wurden analog zu den cysteinhaltigen Hsp90-Varianten über eine HiLoad SuperdexG75 *prep-grade* Gelfiltrationssäule (XK 16/60, GE Healthcare, Freiburg) gereinigt. Im Anschluss wurden die yAha1 haltigen Fraktionen gegen 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 20 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM DTT über Nacht bei 8 °C dialysiert, bevor sie mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra, Millipore) durch Zentrifugation (3800 rpm, 4 °C) auf ein Volumen von ca. 500-1000 µl eingengt wurden. Nach Bestimmung der Konzentration wurden Aliquots zu je 50 µl angefertigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Proteinexpression der weiteren Cochaperone und der verwendeten Hsp90-Fragmente wurde wie bereits publiziert durchgeführt.

### 2.2.9 Proteinlabeling

Labeling-Puffer: 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

In dieser Arbeit wurden die cysteinhaltigen Hsp90-Varianten mit Donor- und Akzeptor-fluoreszenzlabeln versehen, um FRET-Studien durchzuführen. Des Weiteren wurden Cochaperone wie yAha1 und Sba1/p23 mit einem Fluoreszenzlabel versehen, um die bei der Bindung von Hsp90 stattfindende Massenzunahme mit Hilfe der Ultrazentrifugation mit Fluoreszenzdetektion zu ermitteln.

Die Hsp90-Varianten wurden ortsspezifisch an ihrem Cystein mit einem Donor- (Atto 488, ATTO-TEC, Siegen) oder Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff (Atto 550, ATTO-TEC, Siegen) via Maleimidchemie gekoppelt. Da das zur Reduktion der Cystein verwendete DTT hier stört, wurde dies zunächst über eine in Labeling-Puffer äquilibrierte Superdex 200 Säule HR 10/30 (GE Healthcare, Freiburg) abgetrennt. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und das laut Absorptionsmessung bei 280 nm proteinhaltige Eluat wurde aufgefangen. Eine Hälfte der Proteinlösung wurde mit in 10 µl DMSO gelöstem Atto488-Maleimid die Andere mit Atto550-Maleimid versetzt und 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur gelabelt. Zum Abstoppen der Reaktion und Absättigen des noch reaktiven Labels wurden 5 mM DTT zugegeben und die Mischung eine halbe Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das freie Label wurde anschließend über eine Superdex 200 Säule HR 10/30 (GE Healthcare, Freiburg) abgetrennt. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und das laut Absorptionsmessung bei 280 nm proteinhaltige Eluat wurde aufgefangen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration sowie die Labelingeffizienz wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

yAha1 wurde unspezifisch über die im Protein enthaltenen Lysine mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-FAM (Invitrogen/*Life Technologies*, Paisley, UK) versehen. Dazu wurde das aufgetaute Protein mit in 10 µl DMSO gelöstem 5(6)-FAM versetzt und eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion und Absättigen des noch reaktiven Labels wurden 5 mM Tris zugegeben und die Mischung eine halbe Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der ungebundene Farbstoff durch analytische Gelfiltration (Superdex 75 Säule HR 10/30, GE Healthcare, Freiburg) analog zu den Hsp90-Varianten abgetrennt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration sowie die Labelingeffizienz wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Sba1/p23 wurde ebenfalls ortsspezifisch an einem eingefügten Cystein an Position zwei (Cys2) mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5-Iodacetamido-fluorescein (Invitrogen/*Life Technologies*, Paisley, UK) markiert. Das von Martin Hessling gereinigte und gelabelte Protein wurde über eine analytische Gelfiltration wie die Hsp90 Varianten vom freien Label getrennt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration sowie die Labelingeffizienz wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 2.2.10 Spektroskopische Charakterisierung

### 2.2.10.1 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden UV-Absorptionsspektren an einem Cary 50 UV-VIS-Spektrophotometer im Bereich zwischen 240 und 350 nm aufgenommen. Dazu wurde das gelöste, bei -80 °C gelagerte, Protein auf Eis aufgetaut. Durch 30minütige Zentrifugation bei 4 °C wurden Aggregate, die während des Auftauprozesses entstehen können, abgetrennt. Die Absorptionsspektren wurden in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm gegen Messpuffer (40 mM HEPES/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gemessen. Die Konzentration der Proteinlösung wurde anhand der Absorption bei 280 nm nach dem Lambert- Beerschen Gesetz (**Gl. 1**) bestimmt.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 1}$$

A	= gemessene Absorption
$\varepsilon$	= molarer Extinktionskoeffizient in l mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
c	= Proteinkonzentration in mol l <sup>-1</sup>
d	= Schichtdicke der Küvette in cm

Die molaren Absorptionskoeffizienten ( $\varepsilon_{280}$ ) der Proteine bei 280 nm wurden mit Hilfe des ExPASy Server durch Addition der tabellierten Beiträge der chromophoren Aminosäuren berechnet (Gill und von Hippel, 1989).

### 2.2.10.2 Bestimmung der Labelingeffizienz

Zur Bestimmung der Labelingeffizienz (*degree of labelling*, DOL) wurden von den gelabelten Proteinen UV-Vis Absorptionsspektren an einem Cary 50 UV-VIS-

Spektrophotometer im Bereich zwischen 240 und 600 nm aufgenommen. Die Absorptionsspektren wurden in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm gegen Messpuffer (40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gemessen. Die Labelingeffizienz ergibt sich als Quotient der Labelkonzentration und der Proteinkonzentration. Da die verwendeten Fluoreszenzlabel neben den Proteinen zur Absorption bei 280 nm beitragen, muss die Absorption bei 280 nm um den Absorptionsanteil des Labels korrigiert werden. Hierfür gibt der Hersteller spezielle Korrekturfaktoren (cf<sub>280</sub>) an. Dies ist in Gleichung 2, die zur Berechnung der Labelingeffizienz verwendet wurde, bereits berücksichtigt.

$$DOL = \frac{A_{\max}/\varepsilon_l}{A_{\text{prot}}/\varepsilon_{\text{prot}}} = \frac{A_{\max}/\varepsilon_{\text{prot}}}{(A_{280} - A_{\max} \cdot cf_{280}) \cdot \varepsilon_l} \quad \text{Gl. 2}$$

- A<sub>prot</sub> = Absorptionsanteil des Proteins
- ε<sub>prot</sub> = molarer Extinktionskoeffizient des Proteins in l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>
- A<sub>max</sub> = gemessene Absorption des Labels
- ε<sub>l</sub> = molarer Extinktionskoeffizient des Labels in l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>
- A<sub>280</sub> = gemessene Absorption
- cf<sub>280</sub> = Absorptionsanteil des Labels bei 280 nm

### 2.2.10.3 Circular dichroismus (CD)-Spektren

An einem Jasco J-600 Spektropolarimeter wurden Fern-UV-Circular dichroismus-Spektren nativer und entfalteter Proteine in Quarzküvetten aufgenommen. Alle Spektren nativer Proteine wurden bei 20 °C, die Spektren entfalteter Proteine bei 95 °C gemessen. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0,2 mg/ml in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5. Die Fern-UV-Spektren wurden im Bereich von 190-250 nm bei einer Schichtdicke von 1 mm aufgenommen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 20 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 4 s. Von 10 gemittelten Spektren wurde das Pufferspektrum subtrahiert und mit Gleichung 3 die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure berechnet.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{AS}} \quad \text{Gl. 3}$$

- [Θ]<sub>MRW</sub> = mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure in Grad·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>
- Θ = gemessene Elliptizität in Grad
- c = Proteinkonzentration in M
- d = Schichtdicke der Küvette in cm
- N<sub>AS</sub> = Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

### 2.2.11 Bestimmung der konformationellen Stabilität

Bei der Entfaltung eines Proteins werden hydrophobe Flächen exponiert, die im gefalteten Zustand im Inneren verborgen bleiben. Der Fluoreszenzfarbstoff *Sypro-Orange* (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) ist in der Lage diese hydrophoben Flächen zu binden. Die Bindung kann durch Änderung des Fluoreszenzsignals (Anregung 490 nm/Emission 575 nm) verfolgt werden. Dazu wurden je 5 µg Hsp90 in einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet. Gemessen wurde in 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und einer 1:1000 Verdünnung des *Sypro-Orange*. Die Änderung des Fluoreszenzsignals (490 nm / 575 nm) wurde in einem M 3000P qPCR System (Agilent/Stratagene, Waldbronn) in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 95 °C bei einer Heizrate von 1 °C/Zyklus gemessen. Die Schmelztemperaturen wurden als Nullstellen der 2. Ableitung der Schmelzkurve mit Hilfe eines Makros in Microsoft Excel bestimmt.

### 2.2.12 Regenerativer ATPase Assay

Messpuffer: 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Die ATPase Aktivität von Hsp90 wurde mit Hilfe eines ATP-regenerierenden Systems bestimmt. So kann ausgeschlossen werden, dass das entstehende ADP Hsp90 inhibiert also eine Produktinhibition eintritt. In diesem gekoppelten Enzymatischen Assay wurde das entstehende ADP sofort unter Verwendung von Phosphoenolpyruvat (PEP) und NADH durch die Enzyme Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) wieder zu ATP umgewandelt. Die Abnahme der NADH-Konzentration lässt sich spektroskopisch bei 340 nm verfolgen und ist direkt zur ATP Abnahme proportional.

Dazu wurde zunächst ein Prämix hergestellt, indem 240 µl 100 mM PEP (Roche, Mannheim), 48 µl 50 mM NADH (Roche, Mannheim), 12 µl PK (Roche, Mannheim) und 44 µl LDH (Roche, Mannheim) in 4341 µl Messpuffer vereinigt wurden. Für einen 150 µl Ansatz wurden soweit nicht anders vermerkt 75 µL Prämix verwendet, sowie 3 µM Hsp90. Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Varian Cary 50 UV-Vis-Spektrometer bei einer Temperatur von 30 °C. Die Messung wurde durch Zugabe von 3 µl 100 mM ATP (Roche, Mannheim) gestartet und die Abnahme der NADH-Absorption bei 340 nm verfolgt. Die spezifische Aktivität wurde nach Gleichung 4 ermittelt.

$$k_{\text{cat}} = - \frac{\Delta A}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot c(\text{Hsp90}) \cdot d} \quad \text{Gl. 4}$$

$k_{\text{cat}}$	= spezifische Aktivität in $\text{min}^{-1}$
$\Delta A$	= Abnahme der NADH-Absorption bei 340 nm in $\text{min}^{-1}$
$\epsilon_{\text{NADH}}$	= molarer Extinktionskoeffizient des NADH ( $6200 \text{ l M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
$c(\text{Hsp90})$	= Konzentration an Hsp90 im Assay in M
$d$	= Schichtdicke der Küvette in cm

### 2.2.12.1 Affinität für ATP

Die apparente Affinität der einzelnen Hsp90-Varianten wurde ermittelt, indem bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen die ATP-Konzentration von 0 mM bis 3 mM im Assay variierte. Anschließend wurden die spezifischen Aktivitäten gegen die ATP-Konzentration aufgetragen und durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Programms Origin 8G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) nach Gleichung 5 konnte sowohl die apparente Affinität, als auch die maximale Umsatzrate bestimmt.

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} \cdot \frac{c}{c + K_{\text{Dapp}}} \quad \text{Gl. 5}$$

$k_{\text{cat}}$	= spezifische Aktivität in $\text{min}^{-1}$
$V_{\text{max}}$	= maximale Umsatzrate in $\text{min}^{-1}$
$c$	= Konzentration an ATP
$K_{\text{Dapp}}$	= apparente Affinität

### 2.2.12.2 Bestimmung von apparenten $K_D$ -Werten

Für Cochaperone oder kleine Moleküle, die die Hsp90 ATPase Aktivität beeinflussen, kann ein apparenter  $K_D$ -Wert mittels ATPase Assay bestimmt werden. Dazu wird unter gleichbleibenden Bedingungen von Hsp90 und ATP die Konzentration an Cochaperon oder Modulator variiert. Nach Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurden diese gegen die entsprechende Konzentration an Cochaperon bzw. Modulator aufgetragen. Durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Programms Origin 8G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) nach Gleichung 6 kann ein apparenter  $K_{\text{Dapp}}$ -Wert für das entsprechende Cochaperon bzw. den Modulator bestimmt werden, sowie eine maximal Umsatzrate des Hsp90-Cochaperon Komplexes. Die auf diese Weise bestimmten  $K_{\text{Dapp}}$ -Werte sind als Näherung zu betrachten.

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} \cdot \frac{c}{c + K_{\text{Dapp}}} \quad \text{Gl. 6}$$

- $k_{\text{cat}}$  = spezifische Aktivität in  $\text{min}^{-1}$   
 $V_{\text{max}}$  = maximale Umsatzrate in  $\text{min}^{-1}$   
 $c$  = Konzentration an Cochaperon bzw. Modulator  
 $K_{\text{Dapp}}$  = apparente Affinität

### 2.2.13 Förster-Resonanz-Energie-Transfer

Werden Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, so gehen deren Elektronen in einen angeregten Zustand über. Bei der Relaxation der Elektronen in den Grundzustand wird ein Photon freigesetzt. Die Wellenlänge des Emissionslichts entspricht der Energiedifferenz zwischen angeregtem und Grundzustand. Das Emissionslicht zeigt eine Rotverschiebung aufgrund von Energieverlust des angeregten Zustandes durch Vibrationsenergie oder Interaktion mit Molekülen des Lösungsmittels. Wird die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffes strahlungslos auf einen weiteren Fluoreszenzfarbstoff übertragen, so spricht man von Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET). Dazu müssen folgende Bedingungen erfüllt werden: zunächst muss die Emissionsspektrum des Donorfarbstoffs mit dem Anregungsspektrum des Akzeptorfarbstoffes überlappen. Damit ein Energietransfer stattfinden kann, müssen die Dipolmomente von Donor und Akzeptor parallel orientiert sein. Letztens müssen sich die Farbstoffe innerhalb eines bestimmten Abstandsbereichs aufhalten, um einen Transfer zu gewährleisten. Die Energietransfereffizienz kann mit Gleichung 7 beschrieben werden.

$$E_{\text{T}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{Gl. 7}$$

- $E_{\text{T}}$  = übertragenen Energie  
 $R_0$  = Försterradius  
 $r$  = Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff

Der Förster-Radius ist für jedes Donor-Akzeptor Farbstoffpaar charakteristisch und gibt an, bei welchem Abstand 50 % der Energie übertragen werden. In dieser Arbeit für die Bestimmung der Konformationsänderungen ein bereits von Martin Hessling etabliertes FRET-System verwendet (Hessling *et al.*, 2009). Hierzu wurden an Position 61 bzw. 385 des Hefe Hsp90 Cysteine durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt und mittels Maleimidchemie an eine Donor- bzw. Akzeptorfarbstoff gekoppelt. Nach Mischen von Donor- und

Akzeptor- gelabeltem Hsp90 entstehen Heterodimere, in denen die Farbstoffe im geeignetem Abstand für FRET-Messungen sind.

### **2.2.13.1 FRET-Spektren**

Um nachzuweisen, dass bei den Hsp90-Varianten ein Energietransfer stattfindet und ob Nukleotide den Gleichgewichtszustand von offenem Hsp90 mit niedriger FRET-Effizienz in den geschlossenen Zustand mit hoher FRET-Effizienz beeinflussen, wurden Fluoreszenzspektren an einem FluoroMax-2 Fluoreszenzspektrophotometer (Jobin Yvon Spex, München) aufgenommen. Die Konzentration von Donor- und Akzeptor gelabeltem Hsp90 betrug jeweils 200 nM in Messpuffer (40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Die Spektren wurden in einer Quarzküvette der Schichtdicke 1 cm in einem Gesamtvolumen von 150 µl bei einer Temperatur von 30 °C aufgenommen. Der Donorfarbstoff wurde dabei bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und die Emission über einen Wellenlängenbereich von 500 bis 600 nm gemessen. Die Bandbreite der Anregung betrug 3 nm, die der Emission 5 nm. Es wurden jeweils fünf Spektren gemessen und anschließend gemittelt. Die Nukleotide ATP, ATPγS und AMP-PNP (Roche, Mannheim) wurden mit einer Konzentration von je 2 mM eingesetzt, dabei wurde der FRET-Heterokomplex 20 min mit dem entsprechenden Nukleotid vorinkubiert.

### **2.2.13.2 Kinetische Analyse Nukleotid-induzierter Konformationsänderungen**

Die durch die Nukleotide verursachten Konformationsänderungen konnten anhand der Distanzänderung der Fluoreszenzlabel und der damit verbundenen Änderung der Fluoreszenzintensität kinetisch betrachtet werden. Dazu wurde zunächst ein FRET-Heterokomplex aus 200 nM Q385C Atto488 gelabelter und 200 nM D61C Atto550 gelabelter Hsp90-Variante durch Mischen und 10 minütiger Inkubation hergestellt. Anschließend wurden an einem Fluoreszenzspektrophotometer (FluoroMax-2,-3 oder -4, Horiba Jobin Yvon, München) Kinetiken nach Zugabe von 2 mM Nukleotid aufgenommen. Die Kinetiken wurden in einer Quarzküvette der Schichtdicke 1 cm in einem Gesamtvolumen von 150 µl bei einer Temperatur von 30 °C aufgenommen. Der Donorfarbstoff wurde dabei bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und die Emission des Akzeptorfarbstoffes bei einer Wellenlänge von 575 nm gemessen. Die Bandbreite der Anregung betrug 3 nm, die der Emission 5 nm.

Die Auswertung der kinetischen Messungen erfolgte durch Angleich der experimentellen Daten an einen einfach exponentiellen Kurvenverlauf mit Origin 8G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) (Gleichung 8).

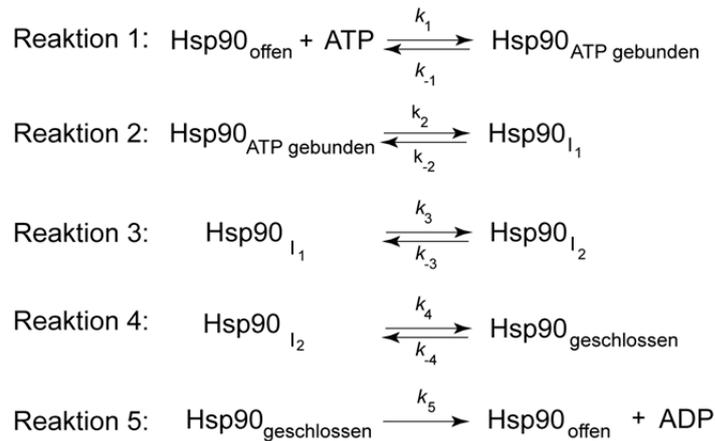
$$y(t) = y_0 + A_i \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Gl. 8}$$

$y(t)$  = Fluoreszenzsignal zur Zeit  $t$   
 $y_0$  = Fluoreszenzsignal zur Zeit  $t = 0$  s  
 $A_i$  = Amplitude der Signaländerung  
 $k$  =  $k_{\text{obs}}$  apparente Rate der Signaländerung (in  $\text{s}^{-1}$ )

### 2.2.13.3 Stopped-flow Analyse Nukleotid-induzierter Konformationsänderungen

Um auch die schnellen Phasen der Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen zu detektieren, wurden schnelle Mischexperimente an einem SX18-MV Sequential *stopped-flow* Spektrofluorimeter (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) durchgeführt. Um die Bewegungen als Trajektorien der unterschiedlichen Domänen aufzunehmen wurde die Fluoreszenzänderung verschiedener FRET-Heterokomplexe (NN, NM, MM) beobachtet. Dazu wurde zunächst ein FRET-Heterokomplex der verschiedenen Hsp90-Varianten aus Atto488 (Donor) gelabeltem und Atto 550 (Akzeptor) gelabeltem Protein durch Mischen und 10 minütige Inkubation hergestellt. Anschließend wurde die Reaktion durch Verdünnen einer 11fach Konzentrierten ATP $\gamma$ S-Lösung mit zehn Volumenteilen des FRET-Heterokomplexes in Messpuffer (40 mM Hepes, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gestartet. Die Proteinkonzentration nach Mischung betrug 400 nM und die ATP $\gamma$ S Konzentration 2 mM. Dabei wurde die Fluoreszenzänderung oberhalb von 570 nm nach Anregung bei 490 nm bei einer Temperatur von 30 °C beobachtet. Die Bandbreite des Anregungslichts betrug 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Alle Kinetiken wurden fünfmal gemessen und mindestens drei gemittelt.

Für die Auswertung wurden die Kinetiken der unterschiedlichen Trajektorien (NN, NM, MM) sowie die Hydrolyseaktivität der Hsp90-Variante von ATP und ATP $\gamma$ S schließlich mit Hilfe des Programms Berkeley Madonna (Version 8.3.1) global an ein fünf-Zustands-Modell (**Abbildung 2-1**) angepasst. Dieses Fünf-Zustands-Modell war für Hefe Hsp90 Wildtyp ausreichend, um die stattfindenden Konformationsänderungen nach Nukleotidzugabe zu beschreiben und diese mit der Hydrolysefunktion zu korrelieren (Hessling *et al.*, 2009). Die Hydrolyseaktivität wird aus dem Modell als Abnahme an ATP-Konzentration in Abhängigkeit der Reaktionszeit abgeleitet.



**Abbildung 2-1: Fünf-Zustands-Modell der Hsp90 Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen.** Gezeigt ist das kinetische Modell, das der globalen Analyse der verschiedenen Trajektorien (NN, NM, MM) mit Hilfe des Programms Berkeley Madonna zu Grunde gelegt wurde. Der Zyklus beginnt mit Bindung des Nukleotids (mit Ratenkonstanten von  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ) an Hsp90. Der Nukleotid-gebundene Zustand ( $\text{Hsp90}_{\text{ATP gebunden}}$ ) vollzieht konformationelle Umstrukturierungen (mit den entsprechenden Ratenkonstanten  $k_2$ ,  $k_{-2}$ ) zum ersten Intermediat  $\text{I}_1$  und weiter (mit Ratenkonstanten  $k_3$ ,  $k_{-3}$ ) zum zweiten Intermediat  $\text{I}_2$ .  $\text{I}_2$  geht schließlich (mit Ratenkonstanten von  $k_4$ ,  $k_{-4}$ ) in den geschlossenen Zustand über. In diesem Zustand findet die Nukleotidhydrolyse statt und die Rückgewinnung des offenen Zustandes unter ADP Freisetzung.

#### 2.2.13.4 Stabilität der N-terminalen Dimerisierung von Hsp90

Hsp90 bildet Dimere durch Dimerisierung der C-terminalen Domäne. Während der Konformationsänderung bei der ATP-Hydrolyse findet auch eine transiente Dimerisierung der N-terminale Domäne statt. Diese stabilisiert das Hsp90 Dimer. Das Ausmaß der N-terminalen Dimerisierung insbesondere in Gegenwart der verschiedenen Nukleotide kann anhand von Chase Experimenten von FRET-Heterokomplexen mit ungelabeltem Protein analysiert werden. Dazu wurde zunächst ein FRET-Heterokomplex aus 200 nM Q385C Atto488 gelabelter und 200 nM D61C Atto 550 gelabelter Hsp90-Variante durch Mischen und 10 minütiger Inkubation hergestellt. Dieser Heterokomplex wurde mit 2 mM Nukleotid (AMP-PNP, ATP $\gamma$ S oder ATP, Roche, Mannheim) versetzt und weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden an einem Fluoreszenzspektrophotometer (FluoroMax-2,-3 oder -4, Horiba Jobin Yvon, München) Kinetiken nach Zugabe von 10fach Überschuss an ungelabelter Hsp90-Variante (4  $\mu$ M) aufgenommen. Die Kinetiken wurden in einer Quarzküvette der Schichtdicke 1 cm in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu$ l bei einer Temperatur von 30 °C aufgenommen. Der Donorfarbstoff wurde dabei bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und die Emission des Akzeptorfarbstoffes bei einer Wellenlänge von 575 nm gemessen. Die Bandbreite der Anregung betrug 3 nm, die der Emission 5 nm. Die Auswertung der kinetischen Messungen erfolgte durch Angleich der experimentellen Daten an einen einfach

exponentiellen Kurvenverlauf mit Origin 8G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) (Gleichung 9).

$$y(t) = y_0 + A_i(1 - e^{-1/t_{1/2} \cdot t}) \quad \text{Gl. 9}$$

$y(t)$  = Fluoreszenzsignal zur Zeit  $t$   
 $y_0$  = Fluoreszenzsignal zur Zeit  $t = 0$  min  
 $A_i$  = Amplitude der Signaländerung  
 $t_{1/2}$  = Halbwertszeit der Reaktion in min

### 2.2.14 Analytische Ultrazentrifugation

Bei der analytischen Ultrazentrifugation werden Proteine in Lösung der Zentrifugalkraft ausgesetzt und dabei ihr Sedimentationsverhalten beobachtet. In dieser Arbeit wurden Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente genutzt, in welchen eine ausreichende Zentrifugalkraft angewendet wird, sodass die Moleküle sich zum Boden der Messzelle bewegen. Der Sedimentationsvorgang wird dabei von drei Faktoren beeinflusst. Dazu gehören die Gravitationskraft, die Auftriebskraft und die hydrodynamische Reibung, die auch von der Form des Moleküls abhängig ist. Vom Gleichgewicht dieser Kräfte kann die Svedberg Gleichung (Gleichung 10) abgeleitet werden. Dabei entspricht der Sedimentationskoeffizient der Sedimentationsgeschwindigkeit im Verhältnis zum Zentrifugalfeld.

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r} = \frac{M \cdot D \cdot (1 - \bar{V}\rho)}{R \cdot T} \quad \text{Gl. 10}$$

$s$  = Sedimentationskoeffizient (s)  
 $v$  = beobachtete Radialgeschwindigkeit in m/s  
 $\omega$  = Winkelgeschwindigkeit des Rotors in m/s<sup>2</sup>  
 $\omega^2 r$  = Zentrifugalfeld  
 $M$  = Molekularmasse in g/mol  
 $\bar{V}$  = partielles spezifisches Volumen in cm<sup>3</sup>/g  
 $\rho$  = Dichte des Lösungsmittels in g/cm<sup>3</sup>  
 $D$  = Diffusionskoeffizient in m<sup>2</sup>/s  
 $R$  = allg. Gaskonstante (8.314472 J/K mol),  
 $T$  = absolute Temperatur in K

In dieser Arbeit wurden Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente genutzt, um den Konformationszustand des Hsp90 zu detektieren. Da Hsp90 in der geschlossenen Form wesentlich kompakter ist, nimmt der Sedimentationskoeffizient im Vergleich zum offenen Zustand zu. Des Weiteren wurden Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente genutzt, um die Bindung von Cochaperonen (Aha1 und Sba1/p23) an Hsp90 zu detektieren. Die

Massenzunahme führt ebenfalls zu einer Erhöhung des Sedimentationskoeffizienten. Zur Analyse des Hsp90 Konformationszustandes wurden 500 nM Q385C Atto 488 gelabeltes yHsp90 verwendet. Für die Analyse der Aha1 Bindung wurde 500 nM 5,6-FAM gelabeltes Aha1 in Gegenwart von 2  $\mu$ M Hsp90-Varianten und 2 mM Nukleotide oder 500 nM Fluorescein gelabeltes Sba1/p23 verwendet. Die Bindung von Sba1/p23 an Hsp90 wurde durch analytische Ultrazentrifugation von 500 nM Fluorescein markiertem Sba1/p23 in Gegenwart von 1,5  $\mu$ M Hsp90 und je 2 mM Nukleotid charakterisiert. Die Messungen wurden in einer Beckman XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ausgestattet mit einem Aviv AU-FDS Fluoreszenzdetektor (Aviv Biomedical Inc., Lakewood, NJ, USA) in Standard Zweisektor Mittelstücken in einem Ti50 Rotor bei 42 000 rpm bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Es wurden Scans bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm aufgenommen und die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs oberhalb von 510 nm (*cut-off*) in Intervallen von 90 Sekunden gemessen.

Die Ultrazentrifugationsexperimente wurden durch Subtraktion benachbarter Scans und Umwandlung der Differenzen in  $\Delta c/\Delta t$  Plots nach der von Stafford beschriebenen Methode (Stafford, 1992) analysiert. Die Plots korrelieren mit den Plots des SEDVIEW dc/dt Programms (Hayes und Stafford, 2010). Die Daten der Plots wurden mit Hilfe des Programms Origin 8G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) an bi-Gauß-Funktionen, die auf Basis der Gauß-Funktion von Origin erstellt wurden, angepasst, um die  $s_{20}$ -Werte zu erhalten.

### **2.2.15 Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)**

Um die Bindung von kleinen Molekülen an die N-terminale Domäne von Hsp90 nachzuweisen, wurde ITC an einem MicroCal VP-ITC Kalorimeter (Microcal Inc., Northampton, MA, USA) durchgeführt. Für die Bindung des Modulators wurde der Ligand aus der Spritze in die Messkammer, die die N-terminale Domäne von Hsp90 enthielt, titriert. Die Konzentration des Modulators betrug 300  $\mu$ M und die Konzentration der N-Domäne von yHsp90 20  $\mu$ M. Beide Interaktoren wurden in einem Puffer aus 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> gelöst. Es wurden 40 Injektionen von je 7  $\mu$ l bei einer Messtemperatur von 25 °C durchgeführt, um das Protein in der Zelle vollständig zu sättigen. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der von MicroCal zur Verfügung gestellte Origin Software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) durchgeführt.

### 2.2.16 Small angle X-ray scattering (SAXS)

SAXS Daten von Lösungen von Wildtyp Hsp90 und der  $\Delta 8$ -, L18R-, E33A-, R346S- und R380A-Varianten wurden in Abwesenheit von Nukleotid und in Gegenwart von je 4 mM ATP und ATP $\gamma$ S an einem hauseigenem SAXS Gerät (SAXSess mc2, Anton Paar, Graz, Österreich) von Dr. Tobias Madl aufgenommen. Das Gerät ist mit einer Kratky Kamera, einer abgedichteten Röntgenröhre und einem zweidimensionalen Princeton Instruments PI•SCX:4300 (Roper Scientific®) CCD Detektor ausgestattet. Die Streuprofile wurden mit einer Expositionsdauer von 60 min (360 Frames, jeder 60 Sekunden) für mehrere Hsp90 Konzentrationen von 0,8-3,3 mg/ml aufgenommen, die Konzentration der Nukleotide betrug jeweils 4 mM. Strahlungsschäden wurden ausgeschlossen, indem individuelle Frames der 60 min Expositionsdauer verglichen wurden und keine Änderung festgestellt werden konnte. Ein Bereich von  $0.012 < s < 0.63 \text{ \AA}^{-1}$  wurde abgedeckt ( $s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ ), wobei  $2\theta$  der Streuwinkel ist und  $\lambda = 1.5 \text{ \AA}$  die Wellenlänge der Röntgenstrahlung.

Alle Daten wurden mit dem ATSAS Software Paket (Version 2.5) von Dr. Tobias Madl analysiert. Die Daten wurden mit der SAXSQuant Software (Version 3.9) prozessiert und mit dem Programm GNOM (Svergun, 1992) entschmiert. Die Vorwärtsstreuung  $I(0)$ , der Gyrationradius  $R_g$ , die Maximale Dimension  $D_{\max}$  und die zwischenatomare Abstands Verteilungsfunktion  $P(R)$  wurden mit dem Programm GNOM (Svergun, 1992) berechnet. Die Masse der gelösten Substanzen wurde durch Vergleich der Intensitäten der Vorwärtsstreuung mit der einer Referenzlösung von humanem Serumalbumin (Molekulargewicht 69 kDa) ermittelt.

### 2.2.17 Screening nach Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen

Mit Hilfe des bereits etablierten FRET-Systems des  $\gamma$ Hsp90 (Hessling *et al.*, 2009) wurde ein fluoreszenzbasierter Screening Assay etabliert, um nach niedermolekularen Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen zu suchen. Dieser Screen fand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gunter Fischer der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle/Saale) statt. Es wurde eine dort vorhandene Substanzbibliothek von 10 000 Substanzen vor Ort gescreent.

Dazu wurde zunächst ein FRET-Heterokomplex aus je 100 nM Q385C Atto488 markiertem und D61C Atto550 markiertem  $\gamma$ Hsp90 durch Mischen und 10 minütiger Inkubation hergestellt. Der Screen selbst wurde anschließend im 96-Well Format in 70  $\mu$ l Ansätzen

durchgeführt. Die Endkonzentrationen betragen 150 nM Hsp90, 50 µg/ml an Testsubstanz in einem Puffer aus 40 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> in Gegenwart von 1% DMSO. Als Kontrollen dienten DMSO und 100 µM Radicicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die Messungen wurden durch Zugabe von 1 mM AMP-PNP (Roche, Mannheim) gestartet. Die Messungen wurden an einem *EnVision Xcite* Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) bei einer Messtemperatur von 20 °C durchgeführt. Es wurde die Akzeptorfluoreszenz mit einem Photometric 570/8 Emissionsfilter (CWL= 570 nm, Bandbreite 8 nm) nach Anregung bei 490 nm (FITC 485/14, CWL = 485 nm Bandbreite 14 nm) 20 Minuten lang beobachtet. Die Auswertung erfolgte qualitativ mit Hilfe der Wallac Envision Manager Software (Version 1.12), durch Übereinanderlegen der Fluoreszenzkinetiken. Substanzen, die die Fluoreszenzkinetiken inhibierten oder beschleunigten, wurden einer zweiten Screening Runde unterzogen. Substanzen, die als Modulatoren bestätigt werden konnten, wurden für das *Rescreening* mittels ATPase Assay in betracht gezogen.

## 2.2.18 *In vivo* Assays

### 2.2.18.1 Plasmid *Shuffling*

Die Charakterisierung verschiedener Hsp90-Varianten auf ihre Funktion *in vivo* wurde in *S. cerevisiae* durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein etabliertes Plasmid *Shuffling* System angewendet (Nathan und Lindquist, 1995), um Hefen herzustellen, die nur eine bestimmte Hsp90-Variante exprimieren. *ECU 82α*-Hefen, in denen beide genomischen Vertreter des Hsp90 deletiert wurden, enthalten für ihre Lebensfähigkeit ein Plasmid, das für Hsp90 codiert, mit einem URA-Marker (Nathan *et al.*, 1997). Diese Hefen wurden mit p423GPD Plasmiden codierend für die verschiedenen Hsp90-Varianten nach 2.2.5 transformiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien auf -Leu/-His Medium ausgestrichen und 3 Tage bei 30 °C bebrütet. Schließlich wurden die Klone auf -Leu/-His Medium, das 0,1% FOA enthält überführt und weitere 3 – 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Um die Bildung des toxischen 5-Fluoro-Uracil durch die 5'-Phosphat Decarboxylase zu verhindern, verlieren die Hefen das Plasmid mit dem URA-Marker, das dieses Enzym in seinem Auxotrophiemarker codiert. Überleben können nur Hefezellen, die eine funktionsfähige Variante des Hsp90 enthalten. Hefen mit einer funktionslosen Hsp90-Variante oder einem leeren p423GPD-Plasmid wachsen nicht.

### 2.2.18.2 Temperatur-Sensitivität

Von Hefen, die eine funktionsfähige Variante des Hsp90 tragen, kann der Einfluss der Temperatur auf das Hefewachstum untersucht werden. Dazu wurde eine stationäre ÜNK photometrisch auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt, die als Ausgangspunkt für fünf weitere 5fach Verdünnungen diente. Aus diesen wurden je 3 µl auf -Leu/-His Platten pipettiert und zunächst das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen (24 °C, 30 °C, 37 °C) für 1-3 Tage beobachtet.

Um die maximale Wachstumstemperatur der Hefen, die die verschiedenen Hsp90-Varianten exprimieren, exakter zu bestimmen, wurde ein Temperaturgradient von 30 °C bis 42 °C untersucht. Dazu wurden ausschließlich Hefekulturen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 auf -Leu/-His Platten pipettiert. Mit diesen Platten erfolgte eine 24stündige Inkubation auf einem Thermoblock (TGGE Maxi, Biometra) mit einstellbarem Temperaturgradienten.

### 2.2.18.3 Toleranz gegenüber UV und Radicol-Stress

Als nächstes wurde die Auswirkung von UV-Stress auf das Wachstum der Hefen mit Hsp90 Mutanten betrachtet. Dazu wurden die -Leu/-His Platten nach dem Ausplattieren einer UV Strahlung von 80 und 120 J/m<sup>2</sup> ausgesetzt, bevor sie für 1-3 Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

Um die Auswirkung des Hsp90 Inhibitors auf die Hefezellen, die die verschiedenen Hsp90 Varianten exprimieren, zu untersuchen wurden, stationäre Hefen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt, mit 120 µM Radicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt und erneut über Nacht bei 30 °C inkubiert. Das Ausplattieren der in Radicol gewachsenen Kulturen erfolgte ohne vorherige Verdünnung vor der Herstellung der Verdünnungsreihe. Da Radicol gelöst in DMSO vorlag, wurde ebenso eine Kontrolle mit DMSO angefertigt. So konnte ausgeschlossen werden das mögliche Effekte nicht auf Radicol, sondern DMSO zurückzuführen sind.

### 2.2.18.4 Test auf *client*-Prozessierung: v-Src

V-Src ist ein Substrat von Hsp90 und für eine korrekte Faltung auf Hsp90 angewiesen (Falsone *et al.*, 2004; Oppermann *et al.*, 1981; Xu und Lindquist, 1993). In seinem korrekt gefalteten, funktionellen Zustand ist v-Src jedoch tödlich für die Hefezellen (Xu und

Lindquist, 1993). Denn bei v-Src handelt sich um eine virale Kinase, die in der Hefezelle zu unspezifischen Phosphorylierungen des Hefe-Proteoms führt. Somit kann mit diesem Assay untersucht werden, ob die Hsp90 Mutanten *in vivo* noch in der Lage sind v-Src zu einem nativen Zustand zu verhelfen. Dazu wurden die Hefezellen der verschiedenen Hsp90-Varianten zunächst mit einem Plasmid, das für v-Src codiert, transformiert. Das v-Src Gen befindet sich hinter einem durch Galactose induzierbaren Promotor. Um anschließend die Glucose vollständig zu entfernen, wurden ÜNK einzelner Kolonien 72 Stunden in Raffinosehaltigem Selektionsmedium inkubiert. Dies ist notwendig, da ein aktivierter Glucosestoffwechsel zu einer Inhibierung des Galactose Promoters führt. Schließlich wurden die Kulturen auf eine OD600 von 0,5 angeglichen und fünf 5fach Verdünnungen hergestellt. Davon wurden je 3 ml auf Glucose und Galactose haltigem Selektionsmedium plattiert und 1 – 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### 2.2.18.5 Test auf *client*-Prozessierung: GR

SDS-Puffer 82 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 % SDS (w/v), pH 7,5

Z-Puffer 100 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,0, 15 mM KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>

Um zu testen, ob die gefundenen Hsp90-Modulatoren die Prozessierung der Hsp90-*clients* beeinflussen wurde ein GR-Assay mit  $\beta$ -Galactosidase als Reporter gen in *S. cerevisiae* verwendet. Der Glucocorticoidrezeptor (GR) ist ebenfalls ein Substrat von Hsp90 (Smith und Toft, 1993.). In seinem korrekt gefalteten, funktionellen Zustand kann der GR an das Hormon 21-Hydroxyprogesteron binden. Für den GR-Assay wurden BY4741-Hefen mit einem Plasmid codierend für den humanen GR transformiert (p413GPD human GR) sowie mit einem Plasmid (pUC $\Delta$ SS-26X) codierend für das  $\beta$ -Galactosidase Gen hinter einem *hormon response element* (HRE). Durch Bindung des GR- Hormon-Komplexes an das HRE wird die Expression von  $\beta$ -Galactosidase aktiviert. Dieses Enzym setzt ONPG zum gelben o-Nitrophenol um, welches durch Absorptionsmessung detektiert werden kann.

Um den Einfluss der Modulatoren auf die GR-Prozessierung zu bestimmen wurden Hefen 10  $\mu$ l einer ÜNK in 200  $\mu$ l frischem Selektionsmedium mit verschiedenen Konzentrationen an Hsp90 Modulator (Endkonzentration zwischen 5 und 50  $\mu$ M) gelöst in DMSO versetzt. Als Kontrollen wurden DMSO allein und 10  $\mu$ M Radicicol verwendet. Die Kulturen wurden zur Aktivierung der GR-abhängigen Transkription mit 10 mM Hormon

11-Deoxycorticosteron (DOC, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt und über Nacht unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Um festzustellen, ob sich alle über Nacht Hefekulturen in der gleichen Wachstumphase befinden, wurden deren OD<sub>600</sub> im TECAN Sunrise Absorbance reader (Tecan, Mainz) bestimmt. Schließlich wurden 50 µl der Hefekulturen in eine neue 96 Well Platte überführt und zentrifugiert (4 000 rpm; 3 min) (Hettich Zentrifuge 420R, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen und zum Pellett 150 µl SDS Puffer gegeben und die Zellen durch 15 minütiges Schütteln bei Raumtemperatur (700 rpm) aufgeschlossen. Die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität wurde schließlich durch Zugabe von 50 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer) und Messung der Absorption bei 405 nm im Tecan Sunrise Absorbance Reader (Tecan, Mainz). Es wurden 40 Zyklen im Intervall von 30 Sekunden gemessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch lineare Regression mit Hilfe von Microsoft Excel. Zur Korrektur unterschiedlicher Zellmengen wurden die ermittelten Steigungen durch die OD<sub>600</sub> der jeweiligen Proben dividiert. Die Aktivitäten wurden relativ zur DMSO-Kontrolle normiert. Von allen Proben wurden Triplikate angefertigt, die schließlich gemittelt wurden.



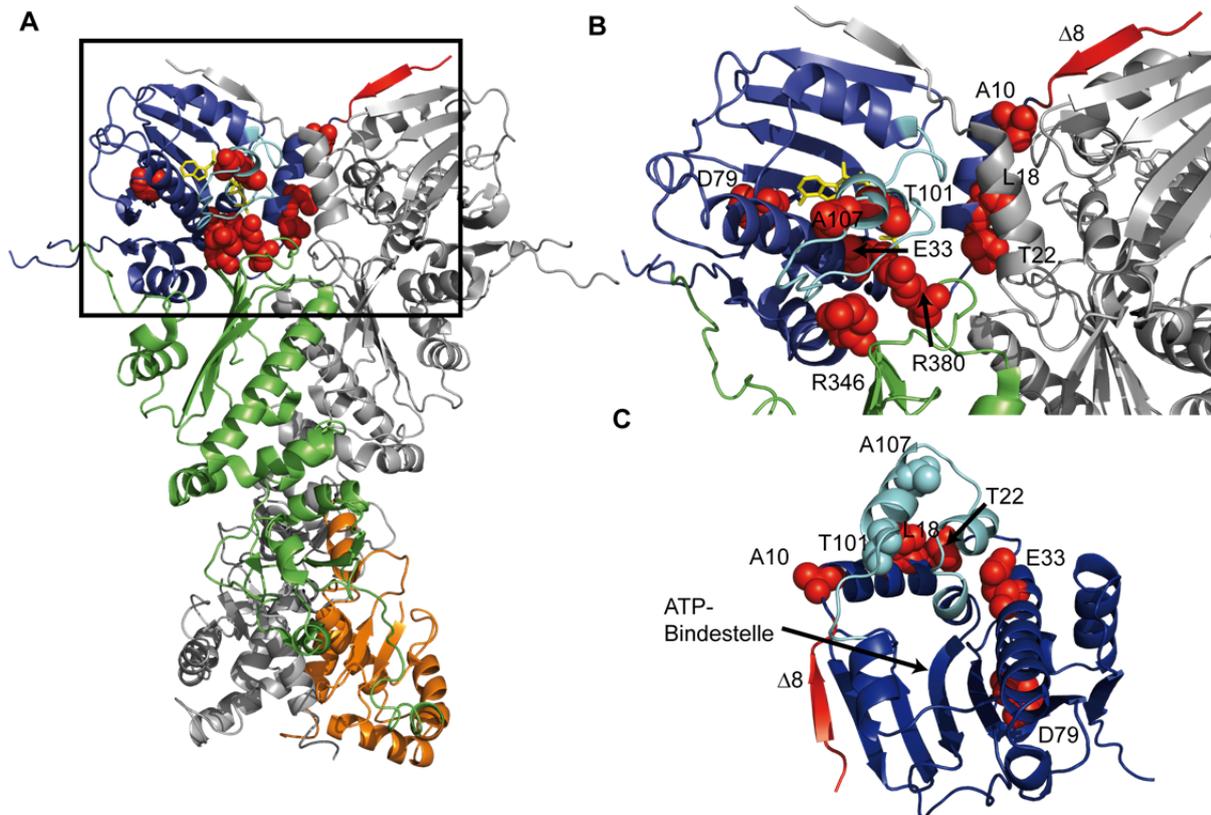
### 3 Ergebnisse & Diskussion

#### 3.1 Analyse ausgewählter Hsp90-Varianten

Um Intermediatzustände des Hsp90 ATPase Zykluses zu populieren und diese näher charakterisieren zu können, wurden Varianten von Hsp90 gewählt, die eine veränderte Hsp90 Aktivität aufweisen. Da für die ATP Hydrolyse in Hsp90 die Konformationsänderungen ratenlimitierend sind und nicht die Bindung oder Hydrolyse des ATP (Hessling *et al.*, 2009; Weikl *et al.*, 2000), wurde angenommen, dass Hsp90-Varianten, die einer verringerte Hydrolyseaktivität besitzen, Intermediate vor den ratenlimitierenden Konformationsänderungen anreichern. Eine weitere Ursache für eine verringerte ATPase Aktivität einer Hsp90-Variante kann auch eine Behinderung des Hydrolyseschrittes sein, ohne dass die zuvor stattfindenden Konformationsänderungen beeinflusst werden. Dies würde schließlich in einer Akkumulation eines geschlossenen Zustandes vor dem Hydrolyseschritt führen. Eine Beschleunigung der ATPase Aktivität kann dazu führen, dass Intermediate weniger populiert werden, insbesondere  $I_1$  vor dem ratenlimitierenden Schritt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass, wie im Falle der Stimulation durch Cochaperon Aha1, ein Intermediat „übersprungen“ wird (Hessling *et al.*, 2009).

Für die Analyse wurden Mutationen in wichtigen Elementen der Hsp90 N- und M-Domäne gewählt (**Abbildung 3-1A**), wie das *lid*-Segment, das sich nach ATP-Bindung über die Nukleotidbindetasche legt. Die daraufhin freigelegten hydrophoben Bereiche stabilisieren den geschlossenen Zustand. Die Mutationen T101I und A107N befinden sich beide im *lid* (**Abbildung 3-1B, C**), aber die Effekte der Mutationen auf die ATP Hydrolyse unterscheiden sich: A107N beschleunigt die ATP-Hydrolyse durch Stabilisierung des N-terminal dimerisierten Zustandes (Prodromou *et al.*, 2000). T101I hingegen wirkt inhibierend auf die ATPase Aktivität durch Stabilisierung des *lids* im offenen Zustand (Prodromou *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2009). T101I wurde zusammen mit T22I und weiteren Mutationen in einem Hefe-Screen für Temperatur-sensitive Hsp90 Punktmutationen beschrieben (Nathan und Lindquist, 1995). T22 wird im offenen Zustand vom *lid* bedeckt (**Abbildung 3-1C**) und die Mutation zu einem Ile führt zu einer beschleunigten ATPase Aktivität, durch Begünstigen der Freisetzung des *lids* von seiner Position im offenen Zustand (Prodromou *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2009). Die Position L18 wird im offenen Zustand des Hsp90 ebenfalls vom ATP-*lid* bedeckt (**Abbildung 3-1C**) und befindet sich im N-terminal dimerisierten Zustand in der Kontaktfläche zwischen den beiden N-Domänen (**Abbildung 3-1B**).

Eine Mutation von L18 zu einem Arg wirkt sich als ATPase-inhibierende Mutation aus, indem es die N-terminale Dimerisierung destabilisiert (Vaughan *et al.*, 2009).



**Abbildung 3-1: Lokalisation der gewählten yHsp90-Mutationen.** Die gewählten Mutationen (rot) sind (A und B) in der geschlossenen Kristallstruktur von yHsp90 (pdb 2CG9) und (B) in der Kristallstruktur der offenen der isolierten N-Domäne (pdb 1AH6) im Kugel Modell dargestellt. In den Volllängenstrukturen ist je ein Monomer des Hsp90 Dimers in grau gezeigt, in der anderen Untereinheit ist die N-Domäne in blau, die M-Domäne in grün und die C-Domäne in orange gefärbt. Das lid-Segment ist in cyan gefärbt. Die Strukturen wurden mit dem Programm PyMOL erstellt.

Mutationen in der Nukleotidbindetasche beeinträchtigen die Funktion des Hsp90 stark und wurden deshalb miteinbezogen. Eine Mutation der konservierten Aminosäure D79, die einen direkten Kontakt zur Adeninbase des gebundenen ATP eingeht (Prodromou *et al.*, 1997a), zu einem Asn führt zum Verlust der Fähigkeit des Proteins ATP zu binden und führt zu einer Verlust der Lebensfähigkeit von Hefen (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998). Eine Mutation der Aminosäure E33 zu Ala hingegen lässt noch Nukleotidbindung zu, eine Hydrolyse kann jedoch nicht mehr stattfinden und dies geht ebenfalls mit einem Verlust der Lebensfähigkeit von einher (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998).

Hsp90 ist eine „split ATPase“, da für eine effiziente ATP Hydrolyse die Beteiligung von Resten aus der M-Domäne notwendig sind. Aus diesem Grund wurden auch Reste der „oberen“ M-Domäne in diese Studie integriert. So hilft R380, das sich im katalytischen loop

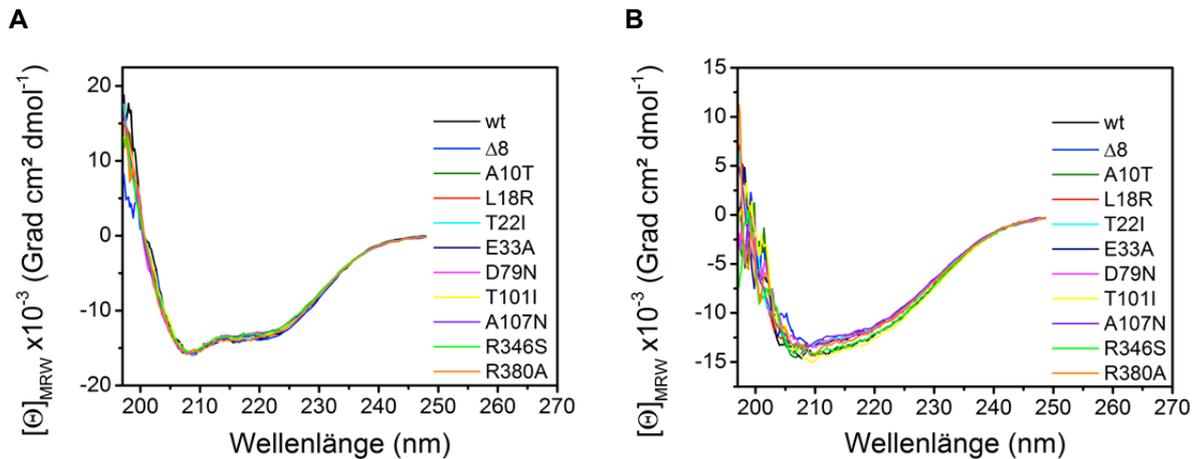
der M-Domäne befindet (**Abbildung 3-1B**), bei der Orientierung der  $\gamma$ -Phosphats für die Hydrolyse und eine Mutation dieser Aminosäure führt zu einem starken Verlust der ATP-Hydrolyseaktivität *in vitro* und der Lebensfähigkeit von Hefen (Ali *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2003). Neuere Studien sehen die Funktion dieser Aminosäure mehr in der Stabilisierung des geschlossenen Zustandes als in der direkten Beteiligung an der Hydrolyse (Cunningham *et al.*, 2012).

Ein genetischer Screen in *A. thaliana* für Suppressoren eines Phänotyp, der aufgrund der Deletion des *rar1* Gens entsteht, führte zur Identifikation zweier Hsp90 Punktmutationen, die die Notwendigkeit des Cochaperons Rar1 für die *client*-Prozessierung durch Modifikation des Hsp90 Konformationszyklus umgehen (Hubert *et al.*, 2009). Bei den Mutationen handelt es sich mit A10T um eine Mutation in der N-Domäne, die zur Beschleunigung der ATPase Aktivität führte. Die zweite Punktmutation wurde mit R346S in der M-Domäne gefunden. Sie wirkt sich, durch Destabilisierung des geschlossenen Zustandes, negativ auf die ATPase Aktivität aus (Hubert *et al.*, 2009). Die Autoren vermuteten, dass durch beide Mutationen Intermediate des Hsp90-Konformationszyklus angereichert werden, weshalb diese Mutationen in die Studie integriert wurden.

Zuletzt wurde noch eine Variante von Hsp90 gewählt, in der die ersten acht Aminosäuren deletiert wurden ( $\Delta 8$ ). Frühere Studien zeigten, dass sich die Deletion dieser Aminosäuren positiv auf die ATPase Aktivität des Hsp90 auswirkt und in Gegenwart von ATP eine verstärkte N-terminale Dimersierung des Hsp90 verursacht (Richter *et al.*, 2002).

### 3.1.1 Einfluss der Mutationen auf Struktur und Funktion von Hsp90

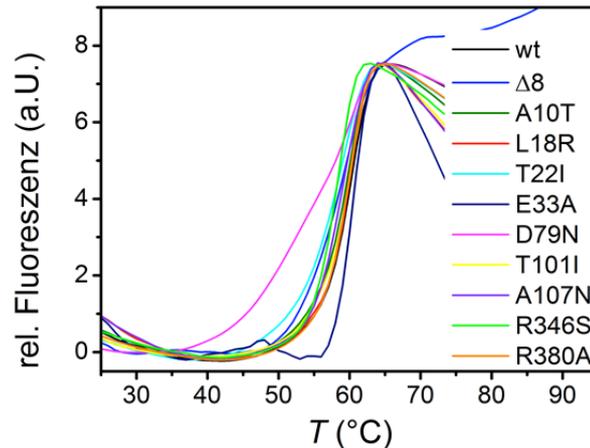
Die verschiedenen Hsp90-Varianten wurden mittels ortsgerechter Mutagenese erzeugt und anschließend für die *in vitro* Charakterisierung, wie in 2.2.7 beschrieben exprimiert und bis zur Bandenreinheit gereinigt. Um auszuschließen, dass die Veränderungen in der Funktion von Hsp90 aus einer Destabilisierung des Proteins resultieren, wurden Fern-UV-CD-Spektren der verschiedenen Hsp90-Varianten aufgenommen.



**Abbildung 3-2: Fern-UV-CD-Spektren der yHsp90-Varianten.** Gezeigt sind die Fern-UV-CD-Spektren der Hsp90-Varianten bei (A) 20 °C und (B) 95 °C. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0,2 mg/ml in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5. Die Spektren wurden in einer Küvette der Schichtdicke 1 mm von 197 bis 260 nm gemessen.

Wie **Abbildung 3-2A** zeigt, weisen alle Hsp90-Varianten vergleichbare Nah-UV-CD-Spektren auf. Sie zeigen die typischen Minima bei 208 und 222 nm für die überwiegend  $\alpha$ -helikale Faltung des Hsp90. Eine Abweichung in der Sekundärstruktur durch die Punktmutation konnte somit ausgeschlossen werden. Die Fern-UV-CD-Spektren, die bei einer Temperatur von 95 °C aufgenommen wurden zeigen, dass der Verlust an Sekundärstruktur von Hsp90 bei Erhöhung der Temperatur sehr gering ist (**Abbildung 3-2B**). Aus diesem Grund konnten zur Analyse der thermischen Stabilität der verschiedenen Hsp90-Varianten keine thermisch-induzierten Entfaltungsübergänge mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie aufgenommen werden. Weder bei 210 nm noch bei 222 nm konnte eine Veränderung des CD-Signals während der thermischen Entfaltung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der thermischen Denaturierung eines Proteins findet eine Exposition hydrophober Flächen statt, die im gefalteten Zustand verborgen sind. Im Thermofluor Assay wird dies sichtbar gemacht, indem der Fluoreszenzfarbstoff *Sypro-Orange* an diese exponierte hydrophobe Flächen bindet und dabei seine Fluoreszenzeigenschaften verändert. Auf diese Weise wurden die Hsp90-Varianten auf ihre thermische Stabilität hin untersucht. **Abbildung 3-3** zeigt die Veränderung der *Sypro-Orange* Fluoreszenz in Gegenwart der verschiedenen Hsp90-Varianten beim Erhitzen.



**Abbildung 3-3: Thermische Stabilität der yHsp90-Varianten.** Gezeigt ist die Veränderung der *Sypro-Orange* Fluoreszenz bei einer Anregung von 475 nm und einer Emission von 590 nm mit steigender Temperatur in Gegenwart von 5  $\mu$ g der yHsp90-Varianten. Gemessen wurde in einem Messpuffer von 40 mM HEPES/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Die nach 2.2.11 ermittelten Schmelztemperaturen sind in **Tabelle 3-1** zusammengefasst.

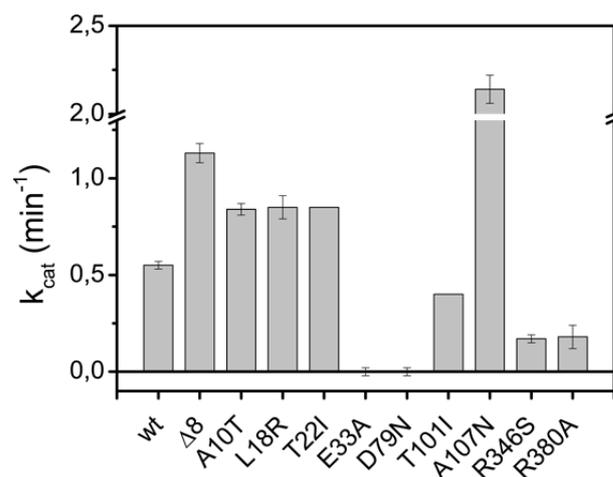
Alle Hsp90-Varianten zeigen eine vergleichbare Stabilität anhand der aus dem Thermo-flour Assay bestimmten Schmelztemperaturen von 57,7 °C bis 59,3 °C, sodass die Veränderungen in der Funktion bei einer Messtemperatur von 30 °C nicht auf einen Stabilitätsunterschied der Mutanten zurückgeführt werden kann. Die Entfaltung der D79N-Variante ist weniger kooperativ als die der übrigen Varianten und zeigt einen asymmetrischen Übergang. Die Auswertung mit Hilfe des Wendepunktes liefert eine Schmelztemperatur von 59,0 °C, wird die Schmelztemperatur anhand der Halbmaximalen Fluoreszenzintensität bestimmt ergibt sich 55 °C. Selbst unter Berücksichtigung des geringeren Schmelzpunktes von 55 °C ist diese Variante bei einer Temperatur von 30 °C von ausreichender Stabilität.

**Tabelle 3-1: Schmelzpunkte der Hsp90-Varianten.**

Hsp90-Variante	$T_m$ (°C)
wt	59,1 $\pm$ 0,1
$\Delta$ 8	58,0 $\pm$ 0,1
A10T	59,1 $\pm$ 0,1
L18R	59,1 $\pm$ 0,1
T22I	58,0 $\pm$ 0,1
E33A	59,3 $\pm$ 0,3
D79N	59,0 $\pm$ 0,1
T101I	59,8 $\pm$ 0,3
A107N	58,1 $\pm$ 0,1
R346S	57,7 $\pm$ 0,3
R380A	59,0 $\pm$ 0,1

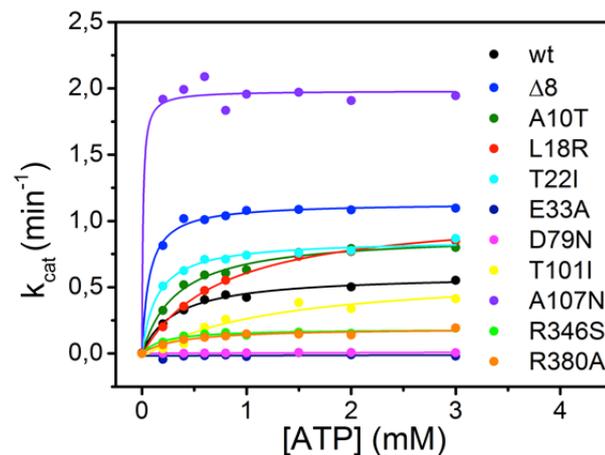
Gezeigt sind die Schmelztemperaturen der yHsp90-Varianten, die durch Bestimmung des Wendepunktes der Schmelzkurve anhand der 2. Ableitung bestimmt wurden. Angegeben sind die Standardabweichungen aus Triplikaten der Messung.

Um den Einfluss der einzelnen Mutationen auf die Funktion von Hsp90 zu ermitteln, wurde zunächst unter identischen Bedingungen die ATPase Aktivität der einzelnen Hsp90-Varianten gemessen. Wie **Abbildung 3-4** zeigt, besitzen alle Hsp90-Varianten eine gegenüber dem Wildtypprotein veränderte ATPase Aktivität. A107N sowie  $\Delta 8$  Hsp90 besitzen mit Umsatzraten von  $2,14 \text{ min}^{-1}$  und  $1,13 \text{ min}^{-1}$  die höchsten ATPase Aktivitäten. Die Varianten A10T ( $0,84 \text{ min}^{-1}$ ) L18R ( $0,85 \text{ min}^{-1}$ ) und T22I ( $0,85 \text{ min}^{-1}$ ) haben in Vergleich zum Wildtypprotein ( $0,55 \text{ min}^{-1}$ ) leicht erhöhte Aktivitäten. Die Variante T101I ( $0,4 \text{ min}^{-1}$ ) mit einer Mutation im *lid*-Segment besitzt eine etwas verminderte Umsatzrate. Die beiden Mutation im oberen Bereich der M-Domäne von Hsp90 wirken sich negativ auf die Hydrolyseaktivität von Hsp90 aus. Beide besitzen mit  $0,17 \text{ min}^{-1}$  (R346S) und  $0,18 \text{ min}^{-1}$  (R380A) vergleichbare Restaktivitäten. Am stärksten beeinträchtigt sind die Hsp90-Varianten E33A sowie D79N. Beide zeigen in diesem Assay keine detektierbare Aktivität ( $<1 \%$ ), was mit den Erwartungen aus früheren Analysen dieser Varianten übereinstimmt (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998). Die Ergebnisse stimmen weitgehend mit der Erwartung der aus der Literatur bekannten Wirkung der Mutationen einher (3.1). Einzig die L18R-Variante, die als inhibierend für die ATPase Aktivität beschrieben wurde (Vaughan *et al.*, 2009), zeigte hier jedoch eine stimulierende Wirkung auf die ATPase Aktivität. Der Grund hierfür könnte in den unterschiedlich gewählten Salzbedingungen im regenerierenden ATPase Assay liegen.



**Abbildung 3-4: ATPase Aktivitäten der verschiedenen Hsp90-Varianten.** Die ATPase Aktivitäten der verschiedenen yHsp90-Varianten wurden mit einem regenerierenden ATPase Assay gemessen (2.2.12). Die Umsatzzahlen ( $k_{\text{cat}}$ ) wurden durch lineare Regression erhalten. Die Proteinkonzentrationen betragen jeweils  $3 \mu\text{M}$  in  $40 \text{ mM}$  HEPES/KOH pH 7,5,  $150 \text{ mM}$  KCl,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ . Die Messungen wurden in Gegenwart von  $2 \text{ mM}$  ATP bei einer Temperatur von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Um auszuschließen, dass die veränderten Aktivitäten auf eine verringerte Affinität zum Substrat ATP zurückzuführen sind, wurde eine Michaelis-Menten Analyse der Enzymaktivität durchgeführt und die Umsatzrate der Hsp90-Varianten unter verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt (**Abbildung 3-5**). Die meisten Varianten besitzen Affinitäten für ATP im mikromolaren Bereich (**Tabelle 3-2**), lediglich die Variante T101I zeigt mit von 1,2 mM eine deutlich verringerte apparente Affinität.



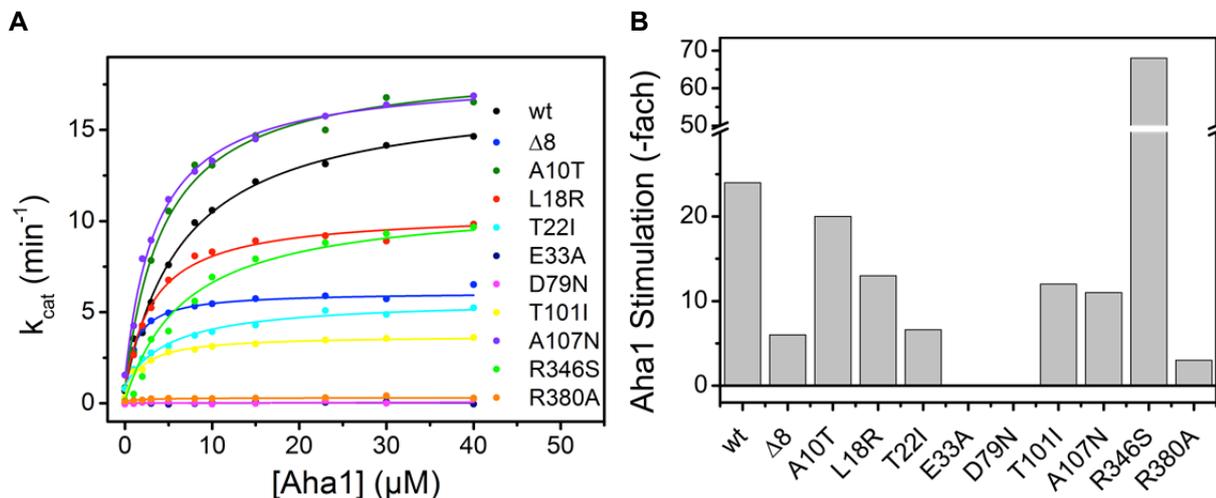
**Abbildung 3-5: Michaelis-Menten Analyse der verschiedenen Hsp90-Varianten.** Die ATPase Aktivitäten der verschiedenen  $\gamma$ Hsp90-Varianten wurden in Gegenwart verschiedener ATP Konzentrationen mit einem regenerierenden ATPase Assay gemessen (2.2.12). Die Umsatzzahlen ( $k_{\text{cat}}$ ) wurden durch lineare Regression erhalten. Die Proteinkonzentrationen betragen jeweils  $3 \mu\text{M}$  in  $40 \text{ mM}$  Hepes/KOH pH 7,5,  $150 \text{ mM}$  KCl,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ . Die Messungen wurden bei einer Temperatur von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Durch nicht-lineare Regression wurden anschließend die apparenten Affinitäten ( $K_{\text{Dapp}}$ ) für das Substrat ATP sowie die maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) erhalten. Diese sind in **Tabelle 3-2** zusammengefasst.

**Tabelle 3-2: Michaelis-Menten Analyse der Hsp90-Varianten.**

Hsp90-Variante	$K_{\text{Dapp}}$ (mM)	$V_{\text{max}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
wt	0,32	0,59
$\Delta 8$	0,07	1,13
A10T	0,33	0,9
L18R	0,77	1,09
T22I	0,14	0,85
E33A	-	<0,001
D79N	-	<0,001
T101I	1,2	0,64
A107N	0,01	1,98
R346S	0,20	0,19
R380A	0,36	0,19

Angegeben sind die durch nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten erhaltenen apparenten Affinitäten ( $K_{\text{Dapp}}$ ) der  $\gamma$ Hsp90-Varianten für das Substrat ATP, sowie die maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ).

Eine gestörte Hydrolyseaktivität kann durch Veränderung des Hydrolysevorganges selbst entstehen oder durch Verlangsamung der ratenlimitierenden konformationellen Änderungen. Das Cochaperon Aha1 kann die Hydrolyseaktivität von Hsp90 beschleunigen, indem es unfavorisierte Konformationsänderungen begünstigt (Hessling *et al.*, 2009; Koulov *et al.*, 2010; Retzlaff *et al.*, 2010). Störungen, die aus einer Veränderung des Hydrolysevorganges entstehen, können durch dieses Cochaperon nicht beschleunigt werden. Alle Hsp90-Varianten wurden auf Stimulierbarkeit untersucht. Dazu wurde die ATPase Aktivität in Gegenwart verschiedener Aha1 Konzentrationen bei konstanter Hsp90 und ATP Menge ermittelt (**Abbildung 3-6**). Die apparente Affinität wurde durch nicht-lineare Regression nach 2.2.12.2 ermittelt und die daraus erhaltenen Daten sind in **Tabelle 3-3** zusammengefasst.



**Abbildung 3-6: Stimulation der Hsp90-Varianten durch das Cochaperon Aha1.** Die Umsatzraten der  $\gamma$ Hsp90-Varianten in Gegenwart verschiedener  $\gamma$ Aha1 Konzentrationen wurden mittels eines regenerativen ATPase Assays gemessen. Die Hsp90 Konzentration betrug jeweils 1  $\mu$ M in Gegenwart von 2 mM ATP. Die Messungen wurden in 40 mM HEPES/KOH pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Durch nicht-lineare Regression nach 2.2.12.1 werden die apparenten Affinitäten ( $K_{Dapp}$ ) für Aha1 ermittelt sowie die maximale Umsatzrate ( $V_{max}$ ). Die maximale Stimulation wird als Quotient der maximalen Umsatzrate und Umsatzrate in Abwesenheit von Aha1 erhalten.

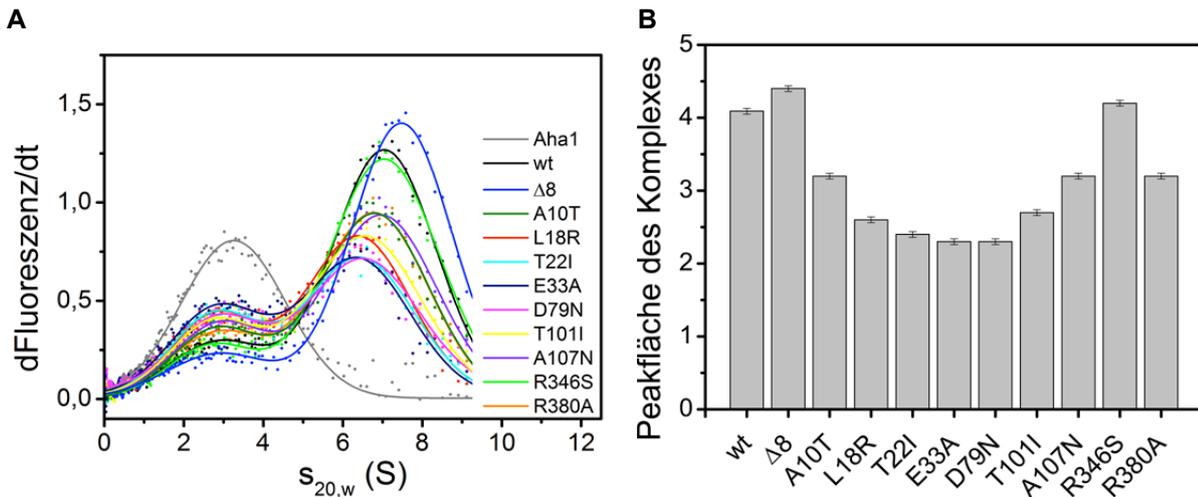
Tabelle 3-3: Stimulation der Hsp90-Varianten durch das Cochaperon Aha1.

Hsp90-Variante	$K_{Dapp}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Stimulation (x-fach)
wt	$6,8 \pm 0,7$	16	25
$\Delta 8$	$1,3 \pm 0,1$	5	6
A10T	$4,5 \pm 0,6$	18	20
L18R	$3,3 \pm 0,3$	10	13
T22I	$5,3 \pm 0,9$	5	7
E33A	-	-	0
D79N	-	-	0
T101I	$2,0 \pm 0,3$	3	12
A107N	$3,7 \pm 0,4$	17	11
R346S	$7,0 \pm 1$	11	68
R380A	$2,1 \pm 0,7$	0,2	3

Angegeben sind die durch nicht-lineare Regression erhaltenen apparenten Affinitäten ( $K_{Dapp}$ ) der yHsp90-Varianten für Aha1, die maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) in Gegenwart von Aha1, sowie die maximale Stimulation der ATPase Aktivität der yHsp90-Variante.

Lediglich die ATPase Aktivitäten der E33A und D79N Hsp90-Varianten konnten durch das Cochaperon Aha1 nicht stimuliert werden. Beide sind jedoch in der Lage Aha1 zu binden, was durch Untersuchung der Interaktion mittels analytischer Ultrazentrifugation gezeigt wurde (**Abbildung 3-7**). Die ATPase Aktivität der D79N-Variante kann nicht stimuliert werden, da es kein Nukleotid bindet (Panaretou *et al.*, 1998). Die Beteiligung des Restes E33A an der Hydrolysefunktion des Hsp90 wird bestätigt, da eine Beschleunigung der Konformationsänderungen keine Verbesserung der Hydrolysefunktion bewirkt.

Bemerkenswert ist, dass die R346S-Variante durch Aha1 nahezu auf Wildtyp Aktivität stimuliert werden kann. Dies spricht dafür, dass diese Variante konformationell beeinträchtigt ist und zwar an dem Schritt, der durch Aha1 beschleunigt wird. Die R380A-Variante, ebenfalls in der M-Domäne lokalisiert, lässt sich jedoch nur bis zur dreifachen Aktivität stimulieren. Dies legt nahe, dass die Defizienz in der Hydrolyseaktivität zu einem gewissen Anteil auf die Beeinträchtigung der Konformationsänderungen zurückzuführen ist. Die Tatsache, dass keine volle Stimulation, wie bei R346S erreicht wird, schließt eine Beteiligung von R380 an der Hydrolyse des ATP selbst nicht aus. Die Varianten mit bereits intrinsisch beschleunigter ATPase Aktivität ( $\Delta 8$ , A10T, L18R, T22I und A107N) können alle durch Aha1 in ihrer ATPase Aktivität weiter beschleunigt werden, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Der Grund hierfür liegt nicht in einer unterschiedlichen Affinität für das Cochaperon (**Abbildung 3-7**, **Tabelle 3-3**), sondern ist vielmehr in dem unterschiedlichen Einfluss der Mutation auf die konformationellen Änderungen des Hsp90 zu sehen.

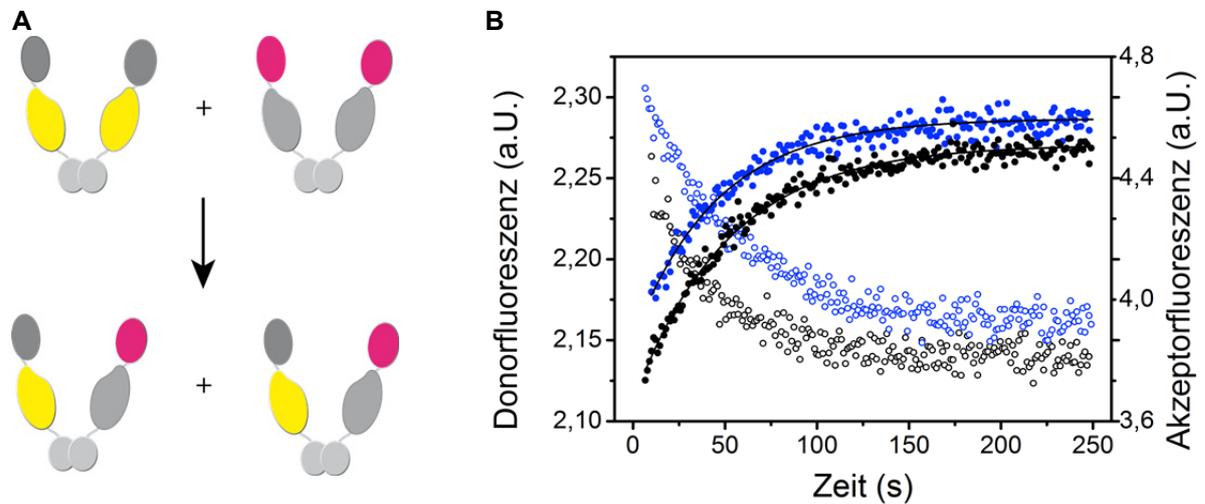


**Abbildung 3-7: Bindung des Cochaperons Aha1 an die Hsp90-Varianten.** (A) Die Komplexbildung von 500 nM FAM markiertem  $\gamma$ Aha1 an 3  $\mu$ M der verschiedenen  $\gamma$ Hsp90-Varianten wurde mit analytischer Fluoreszenz-ultrazentrifugation untersucht. (B) Durch Anpassen einer bi-Gauß-Funktion an die  $dC/dt$  Plots ermittelte Peakfläche des Aha1-Hsp90-Komplexes.

### 3.1.2 Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen von Hsp90

Bindet ein Nukleotid an Hsp90, so werden große Konformationsänderungen im Hsp90 Dimer induziert. Diese können über ein bereits etabliertes Hefe Hsp90 FRET-System verfolgt werden (Hessling *et al.*, 2009). Dazu sind in den verschiedenen Hsp90-Varianten ortsspezifisch D61 oder Q385 durch ein Cys ersetzt und anschließend mit einem Donor- und Akzeptorfarbstoff mittels Maleimidchemie gekoppelt (2.2.9). Durch Mischen von Donor und Akzeptor gelabeltem Hsp90 bilden sich aufgrund des dynamischen C-terminalen Dimerisierungsverhalten Heterodimere aus, in denen Donor- und Akzeptorfarbstoff nahe genug sind, sodass FRET stattfinden kann (**Abbildung 3-8A**). Dieser Vorgang des Subunit-Exchange kann beobachtet werden, indem der Donorfarbstoff bei 490 nm angeregt wird und gleichzeitig die Emission des Donor- und Akzeptorfarbstoffs bei 520 nm und 575 nm gemessen wird (2.2.13.2). Dies ist exemplarisch in **Abbildung 3-8B** für Wildtyp Hsp90 und die A10T-Variante gezeigt. Alle Hsp90-Varianten waren in der Lage Heterodimere auszubilden (Daten nicht gezeigt) und die kinetischen Ratenkonstanten des Subunit-Exchange liegen in identischen Zeitbereichen (**Tabelle 3-4**). Lediglich die Bildung des FRET-Heterokomplexes der A107N-Variante ist wesentlich langsamer als die der übrigen Varianten, was auf ein verändertes Dimerisierungsverhalten dieser Variante in Abwesenheit von Nukleotid hinweist. Ausgehend von diesen Heterodimeren kann der Einfluss auf die Konformationsänderungen

in den verschiedenen Hsp90-Varianten in Gegenwart unterschiedlicher Nukleotide untersucht werden.



**Abbildung 3-8: Bildung des Hsp90 FRET-Heterokomplexes.** (A) Schematische Darstellung des Subunit-Exchange: werden 385C Atto488 (gelbe Domäne) gelabelte und 61C Atto550 (magenta Domäne) gelabelte  $\gamma$ Hsp90 Homodimere gemischt entstehen FRET-fähige Heterokomplexe. (B) Gezeigt sind die Änderungen der Donor- (offene Kreise) und Akzeptorfluoreszenz (gefüllte Kreise) des Hsp90 Wildtypproteins (schwarz) und der A10T-Variante (blau). Dazu wurde von 400 nM FRET-Heterokomplex nach Anregung des Donors bei 490 nm die Donorfluoreszenz bei 520 nm und gleichzeitig die Akzeptorfluoreszenz bei 575 nm aufgenommen. Die Messungen wurden in 40 mM Hepes/KOH pH7,5, 150 mM KCl und 5 mM  $MgCl_2$  bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Die apparenten Ratenkonstanten wurden durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion an die Änderung des Akzeptorsignals (schwarze Linie) erhalten.

**Tabelle 3-4: apparente Ratenkonstanten ( $k_{se}$ ) des Subunit-Exchange der Hsp90-Varianten.**

Hsp90-Variante	$k_{se}$ ( $s^{-1}$ )
wt	0,02
$\Delta 8$	0,01
A10T	0,02
L18R	0,03
T22I	0,02
E33A	0,01
D79N	0,02
A107N	0,007
R346S	0,03
R380A	0,03

Die apparenten Ratenkonstanten des Subunit-Exchanges ( $k_{se}$ ) der  $\gamma$ Hsp90-Varianten wurde durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion an die Änderungen des Akzeptorsignals nach Anregung des Donorfluorophors während der Reaktion erhalten.

### 3.1.2.1 Gleichgewichtszustände (FRET-Spektren)

Wie bereits gezeigt wurde, induzieren das nicht hydrolysierbare ATP Analogon AMP-PNP und das langsam hydrolysierbare ATP $\gamma$ S strukturelle Änderungen in Hsp90 und verschieben das Gleichgewicht zum geschlossenen Zustand von Hsp90 (Hessling *et al.*, 2009; Mickler *et al.*, 2009; Shiau *et al.*, 2006). In diesem Zustand ist der Abstand der Fluorophore im Heterokomplex geringer, was zu einer Erhöhung des Akzeptorsignals und gleichzeitig zu einer Verringerung des Donorsignals führt. ATP selbst führt jedoch zu keiner Verschiebung der Gleichgewichtslage, sodass das Fluoreszenzspektrum des Heterokomplexes keine Veränderung aufweist. Die Heterokomplexe der Hsp90-Varianten wurden ebenfalls mit Hilfe von Fluoreszenzspektren in Gegenwart der verschiedenen Nukleotide untersucht, um die strukturellen Veränderungen zu detektieren. Die nach 2.2.13.1 aufgenommenen Fluoreszenzspektren der Hsp90-Varianten in Abwesenheit und Gegenwart von ATP, ATP $\gamma$ S sowie AMP-PNP sind in **Abbildung 3-9** gezeigt.

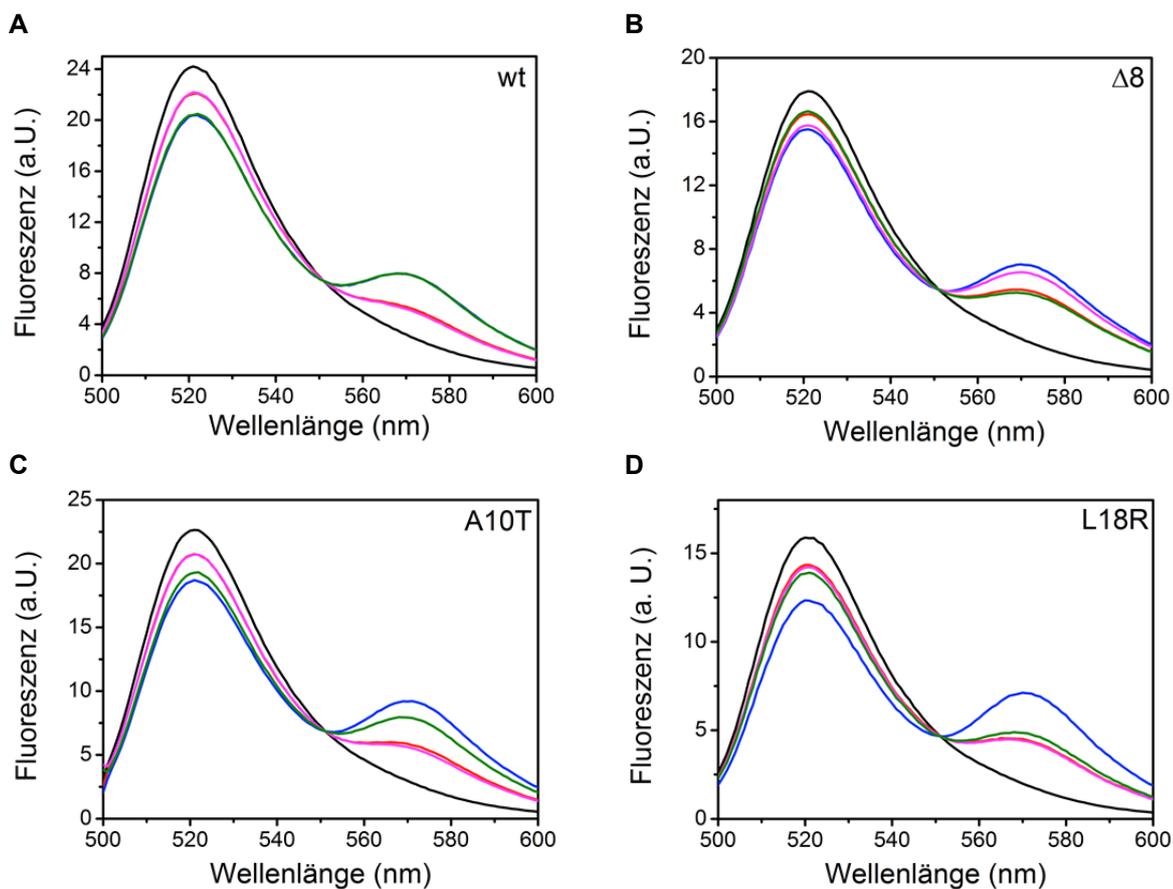
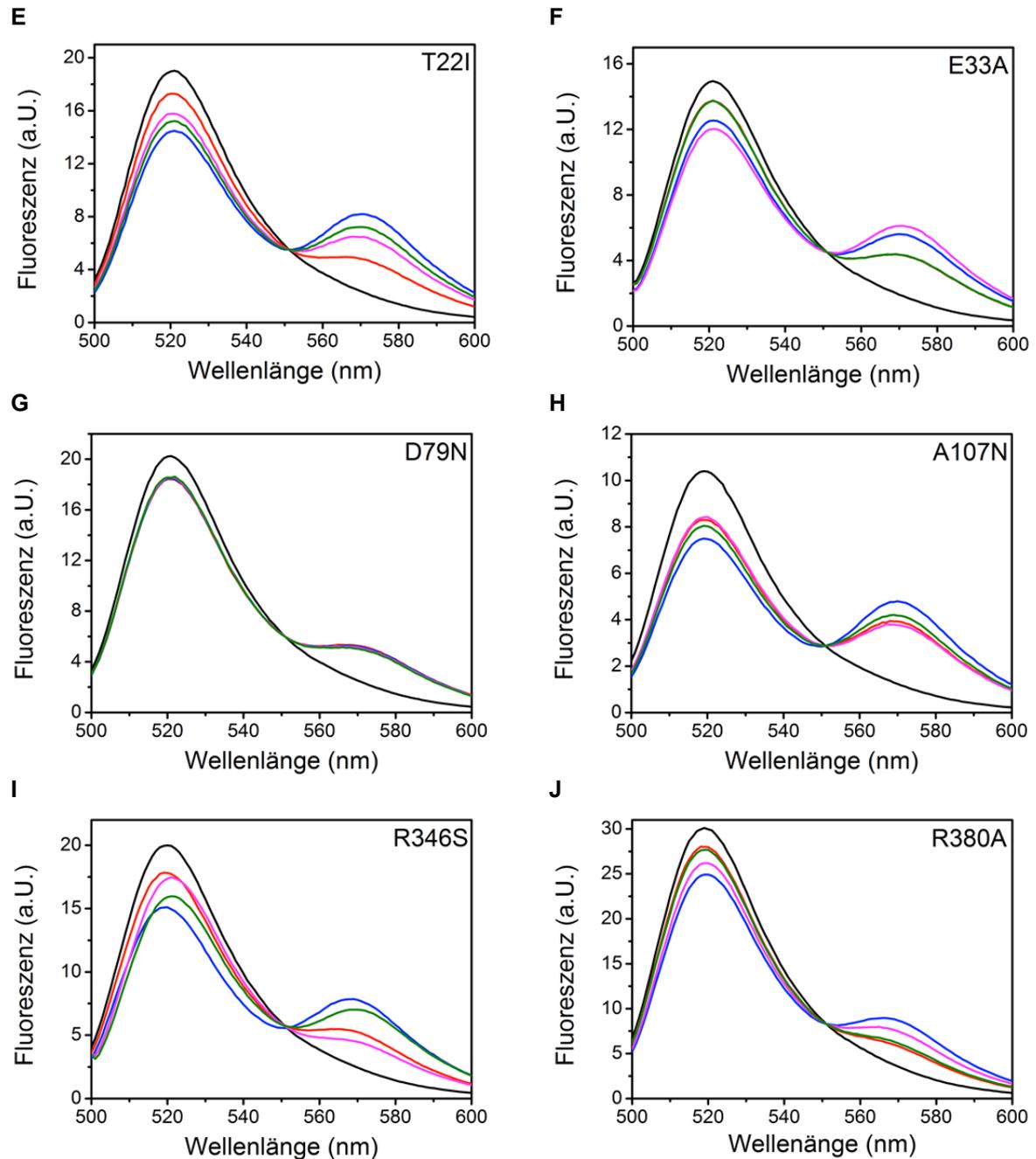


Abbildung 3-9 Teil I



**Abbildung 3-9: FRET-Spektren der Hsp90-Varianten in Gegenwart und Abwesenheit verschiedener Nukleotide.** Gezeigt sind die durch Anregung der Donorfluoreszenz (490 nm) erhaltenen Fluoreszenzemissionspektren im Bereich von 500 bis 600 nm. Dazu wurden Spektren von 200 nM 385C Atto488 gelabelter yHsp90-Variante allein (schwarz), zusammen mit 200 nM 61C Atto 550 gelabelter yHsp90-Variante (rot) sowie nach Vorinkubation des FRET-Heterokomplexes mit je 2 mM (magenta) ATP, (blau) ATP $\gamma$ S oder (grün) AMP-PNP aufgenommen. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 30 °C in 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt.

Für Wildtyp Hsp90 ist deutlich zu sehen (**Abbildung 3-9A**), dass die Akzeptorfluoreszenz in Gegenwart von AMP-PNP und ATP $\gamma$ S im Vergleich zum FRET-Heterokomplex ohne Nukleotid oder in Gegenwart von ATP deutlich zunimmt. Dies zeigt, dass sowohl

ATP $\gamma$ S als auch AMP-PNP in gleichem Ausmaß die Lage des Gleichgewichts hin zu geschlossenen Zuständen verschieben, wohingegen das Gleichgewicht in Gegenwart von ATP im offenen Zustand liegt. Dies stimmt mit bisherigen Ergebnissen überein (Hessling *et al.*, 2009). Die untersuchten Hsp90-Varianten reagierten deutlich unterschiedlich auf die Gegenwart der verschiedenen Nukleotide, was auf Unterschiede in den Gleichgewichtszuständen der verschiedenen Varianten zurückzuführen ist.

Der größte Unterschied war in Gegenwart von AMP-PNP festzustellen. Die Hsp90-Varianten  $\Delta$ 8, E33A und R380A zeigten keine Veränderung des Spektrums im Vergleich zur Abwesenheit von Nukleotid. Die Hsp90-Varianten L18R und A107N reagierten ebenfalls nur mit einer geringen Erhöhung der Akzeptorfluoreszenz. Dies lässt darauf schließen, dass AMP-PNP in diesen Varianten keine sichtbare Verschiebung des Gleichgewichts zu geschlossenen Zuständen induziert. Die übrigen Varianten zeigten eine Verschiebung der Gleichgewichtslage, jedoch in keinem Fall so effektiv, wie dies beim Wildtyp Protein der Fall ist.

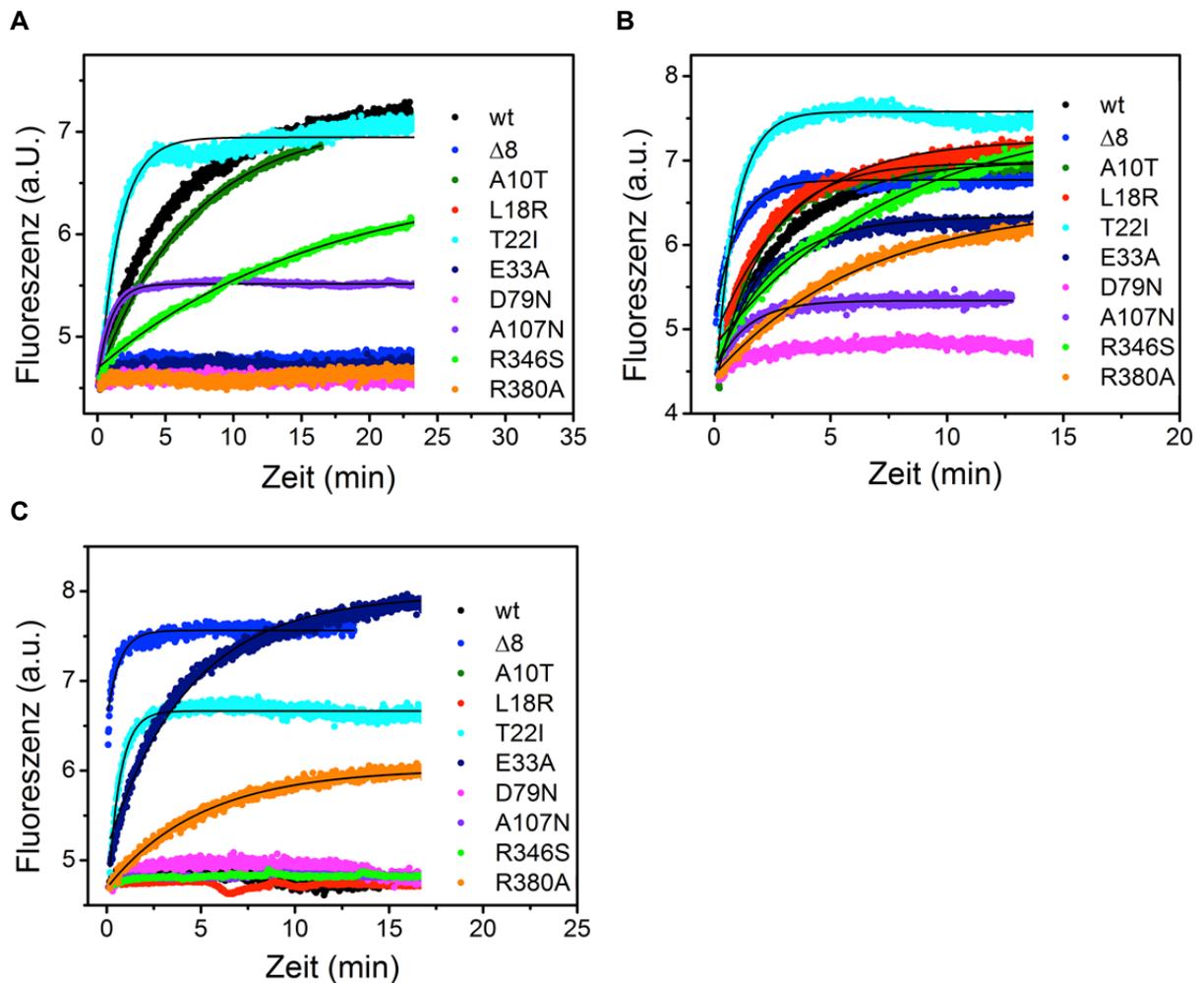
ATP $\gamma$ S könnte in allen Varianten (außer D79N) die Lage des Gleichgewichts zu geschlosseneren Zuständen verschieben. Es eignet sich somit wesentlich besser für die Analyse der Hsp90 Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen als AMP-PNP.

Auf ATP reagieren die verschiedenen Hsp90-Varianten äußerst unterschiedlich. Im Falle der Varianten A10T, L18R, A107N und R346S liegt das Gleichgewicht wie beim Wildtyp im offenen Konformationszustand und die Fluoreszenzspektren entsprechen denen in Abwesenheit von Nukleotid. Die Varianten  $\Delta$ 8, T22I, E33A und R380A zeigen eine unterschiedlich ausgeprägte Erhöhung der Akzeptorfluoreszenz im Vergleich zum nukleotidfreien Zustand, was auf eine Gleichgewichtsverschiebung zu geschlosseneren Zuständen hinweist. Sowohl ATPase-defiziente Mutationen (E33A, R346S und R380A) als auch solche mit höherer ATPase Aktivität ( $\Delta$ 8, T22I) können die Gleichgewichtslage der konformationellen Zustände in Gegenwart von ATP hin zu geschlosseneren Zuständen verschieben.

Als Kontrolle diente die D79N-Variante, die nicht in der Lage ist Nukleotide zu binden (Panaretou *et al.*, 1998). Sie weist in Gegenwart der getesteten Nukleotide identische Spektren wie in deren Abwesenheit auf (**Abbildung 3-9G**).

### 3.1.2.2 Kinetische Analyse der Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen

Um die in den Fluoreszenzspektren sichtbaren Veränderungen der Struktur und Gleichgewichtslage von Hsp90 zu bestätigen, wurden die Konformationsänderungen auch kinetisch betrachtet. Hierzu wurde die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz als Konsequenz der Nukleotidbindung in manuellen Mischexperimenten untersucht. Die erhaltenen Kinetiken sind in **Abbildung 3-10** gezeigt.



**Abbildung 3-10: Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen der  $\gamma$ Hsp90-Varianten.** Gezeigt sind die Änderungen der Akzeptorfluoreszenz nach Zugabe von (A) 2 mM AMP-PNP, (B) 2 mM ATP $\gamma$ S oder 2 mM ATP. Der Donorfluorophor wurde bei 490 nm angeregt und die Akzeptorfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 575 nm detektiert. Die Messungen wurden mit je 200 nM 385C Atto488 gelabeltem Hsp90 und 61C Atto550 gelabeltem Protein in 40 mM Hepes/KOH pH 7,5 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> bei einer Temperatur von 30 °C gemessen. Die apparenten Ratenkonstanten wurden durch Anpassung an monoexponentielle Kinetiken bestimmt und sind in **Tabelle 3-5** zusammengefasst.

Obwohl es sich beim konformationellen Zyklus um eine komplexe Kinetik mit mehreren *on pathway* Intermediaten handelt (Hessling *et al.*, 2009), wurden apparente Ratenkonstanten ( $k_{app}$ ) der Gleichgewichtseinstellung durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion

ermittelt, um die Geschwindigkeiten der Gleichgewichtseinstellung der verschiedenen Hsp90-Varianten zu ermitteln. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in **Tabelle 3-5** zusammengefasst. Wie schon die FRET-Spektren zeigten, induziert AMP-PNP lediglich in A10T, T22I, A107N und der R346S-Variante sichtbare Konformationsänderungen (**Abbildung 3-10A**), die in den meisten Fällen auch deutlich langsamer sind, als die durch ATP $\gamma$ S-induzierten Konformationsänderungen (**Tabelle 3-5**).

ATP $\gamma$ S induziert in allen Hsp90-Varianten, in denen die Gleichgewichtslage verändert werden konnte, messbare konformationelle Änderungen. In allen Varianten mit beschleunigter ATPase Aktivität waren die Konformationsänderungen ebenfalls beschleunigt. In den Varianten R346S und R380A, die beide eine geringe Restaktivität an ATP Hydrolyse zeigen, waren die Konformationsänderungen, die durch ATP $\gamma$ S induziert wurden langsamer, was verdeutlicht, dass die inhibitorische Wirkung der Mutation zumindest teilweise aus der Verlangsamung der Konformationsänderungen resultiert und nicht nur durch die Beeinträchtigung des finalen Hydrolyseschrittes. Dies geht einher mit der Tatsache, dass beide Varianten durch Aha1 stimuliert werden können.

In den Hsp90-Varianten  $\Delta$ 8, T22I, E33A und R380A, in denen die FRET-Spektren in Gegenwart von ATP eine Verschiebung der Gleichgewichtslage zeigten, konnten ATP-induzierte Fluoreszenzkinetiken aufgenommen werden und diese bestätigen die Akkumulation von stärker geschlossenen Zuständen in diesen Varianten. Auch hier zeigen die Varianten mit beschleunigter ATPase Aktivität schnellere Ratenkonstanten als dies bei den inhibitorisch wirkenden Varianten der Fall ist.

**Tabelle 3-5: apparente Ratenkonstanten ( $k_{app}$ ) der Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen.**

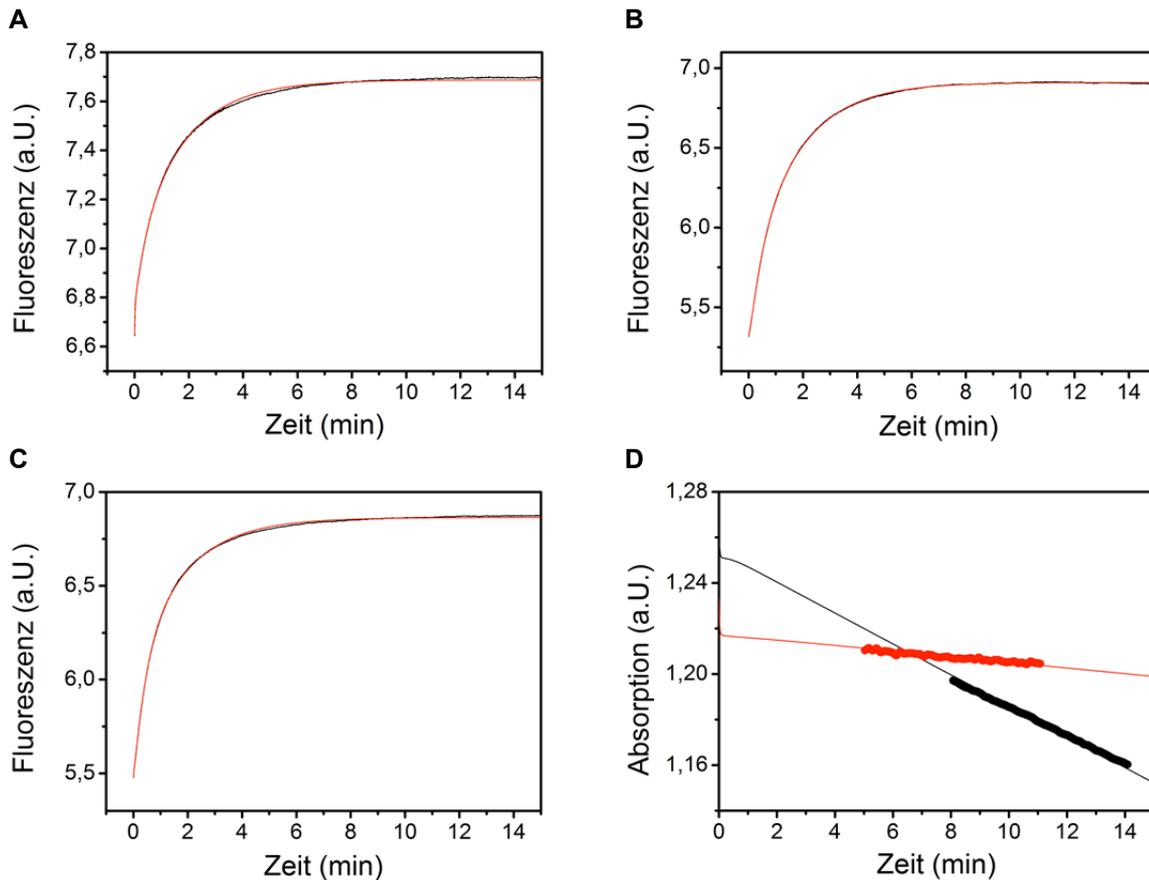
Hsp90-Variante	$k_{app}$ (AMP-PNP) ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{app}$ (ATP $\gamma$ S) ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{app}$ (ATP) ( $\text{min}^{-1}$ )
wt	0,18	0,33	-
$\Delta$ 8	-	1,05	1,53
A10T	0,14	0,46	-
L18R	-	0,30	-
T22I	0,66	1,14	1,59
E33A	-	0,41	0,23
D79N	-	-	-
A107N	1,0	0,72	-
R346S	0,06	0,13	-
R380A	-	0,15	0,20

Die durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion an die Änderung der Akzeptorfluoreszenz nach Anregung des Donorfluorophors der FRET-Heterokomplexe der Hsp90-Varianten erhaltenen apparenten Ratenkonstanten der Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen sind hier zusammengefasst.

### 3.1.3 Globale Analyse der Konformationsänderungen der Hsp90-Varianten

Betrachtet man die Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen der Trajektorien verschiedener Domänen von Hsp90, so ist es möglich für Wildtyp Hsp90 die Kinetiken genauer zu analysieren. Die Signale der Fluoreszenzkinetiken der einzelnen Trajektorien zeigten Intermediat Akkumulationen in vergleichbaren Zeitrahmen, unterscheiden sich jedoch aufgrund der alternativen Reaktionstrajektorie, die dabei beobachtet wird. Mit Hilfe des Berkeley Madonna Software Paketes konnte ein Fünf-Zustands Modell entwickelt werden, das ausreicht, die stattfindenden Fluoreszenzkinetiken der einzelnen Trajektorien zu beschreiben. Da diese für die Hydrolyse ratenlimitierend sind und nicht die Hydrolyse des ATP selbst, konnte die ATP Hydrolyse ebenfalls in das Modell miteinbezogen werden. Als Endergebnis der globalen Analyse steht ein Modell, das beschreibt, zu welchem Anteil die einzelnen Intermediate populierte werden. Da die Ratenkonstanten der Konformationsänderungen für E33A und R380A Hsp90 in den manuellen Mischexperimenten bei einer Temperatur von 30 °C bereits sehr langsam waren, wurden die Fluoreszenzkinetiken, die aus den ATP $\gamma$ S-induzierten Umstrukturierungen resultieren, in schnellen Mischexperimenten (*stopped-flow*) ebenfalls bei 30 °C aufgenommen. Die Messung mit Hilfe der *stopped-flow*-Technik ist notwendig, um die schnellen Phasen zu Beginn der Konformationsänderungen aufzulösen. Zunächst wurde erneut Wildtyp Hsp90 untersucht, um zu überprüfen, ob das Modell für 30 °C ebenfalls angewendet werden kann.

Wie **Abbildung 3-11** zeigt, konnte mit dem etablierten fünf-Zustands-Modell auch die Konformationsänderungen von Hsp90 bei 30 °C beschrieben werden. Die aus dem Modell abgeleiteten Ratenkonstanten zeigen, dass auch bei einer Messtemperatur von 30 °C der ratenlimitierende Schritt die Konformationsänderung hin zum I<sub>1</sub> dargestellt (**Tabelle 3-6**). Die aus dem Modell errechneten Hydrolyseraten für ATP und ATP $\gamma$ S stimmen sehr gut mit den praktisch ermittelten Raten überein (**Abbildung 3-11D**). Auch aus diesem Grund ist die sich aus der Analyse der Konformationsänderungen mit Hilfe des Modells ergebende Populationsverteilung vergleichbar zu der des Hsp90 bei einer Messtemperatur von 15 °C (**Abbildung 3-12**).

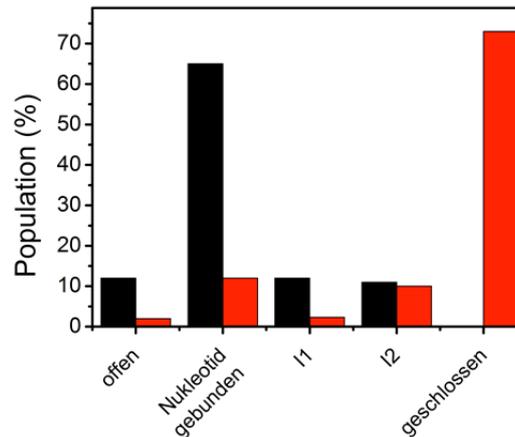


**Abbildung 3-11: Globale Analyse der Konformationsänderungen des Wildtyp yHsp90 nach Fünf-Zustands-Modell.** Gezeigt sind die bei 30 °C erhaltenen ATPγS-induzierten Konformationsänderungen der (A) N-N, (B) M-N und (C) M-M-Trajektorien (schwarz) sowie die aus dem Modell erhaltenen Fitkurven (rot). Die Trajektorien wurden als Fluoreszenzkinetiken nach Anregung des Donorfluorophors (490 nm) und Aufzeichnung der Fluoreszenz des Akzeptorfluorophors (575 nm) in der anderen Hsp90 Untereinheit erhalten. (D) Die aus dem Modell ermittelten ATP (schwarz) und ATPγS Hydrolyseraten (dünne Linien) stimmen mit den gemessenen Raten (dicke Linien) überein.

**Tabelle 3-6: Ratenkonstanten der Konformationsänderungen des yHsp90 bei 30 °C.**

Reaktion	Vorwärts (min <sup>-1</sup> )		Rückwärts (min <sup>-1</sup> )	
offen-gebunden	$k_1$	40	$k_{-1}$	7
gebunden-I <sub>1</sub>	$k_2$	0,7	$k_{-2}$	0,6
I <sub>1</sub> -I <sub>2</sub>	$k_3$	3	$k_{-3}$	$4 \times 10^{-7}$
I <sub>2</sub> -geschlossen	$k_4$	4	$k_{-4}$	0,4
geschlossen-offen	$k_5(\text{ATP}\gamma\text{S})$	0,03	$k_{-5}$	0,003
	$k_5(\text{ATP})$	>20		

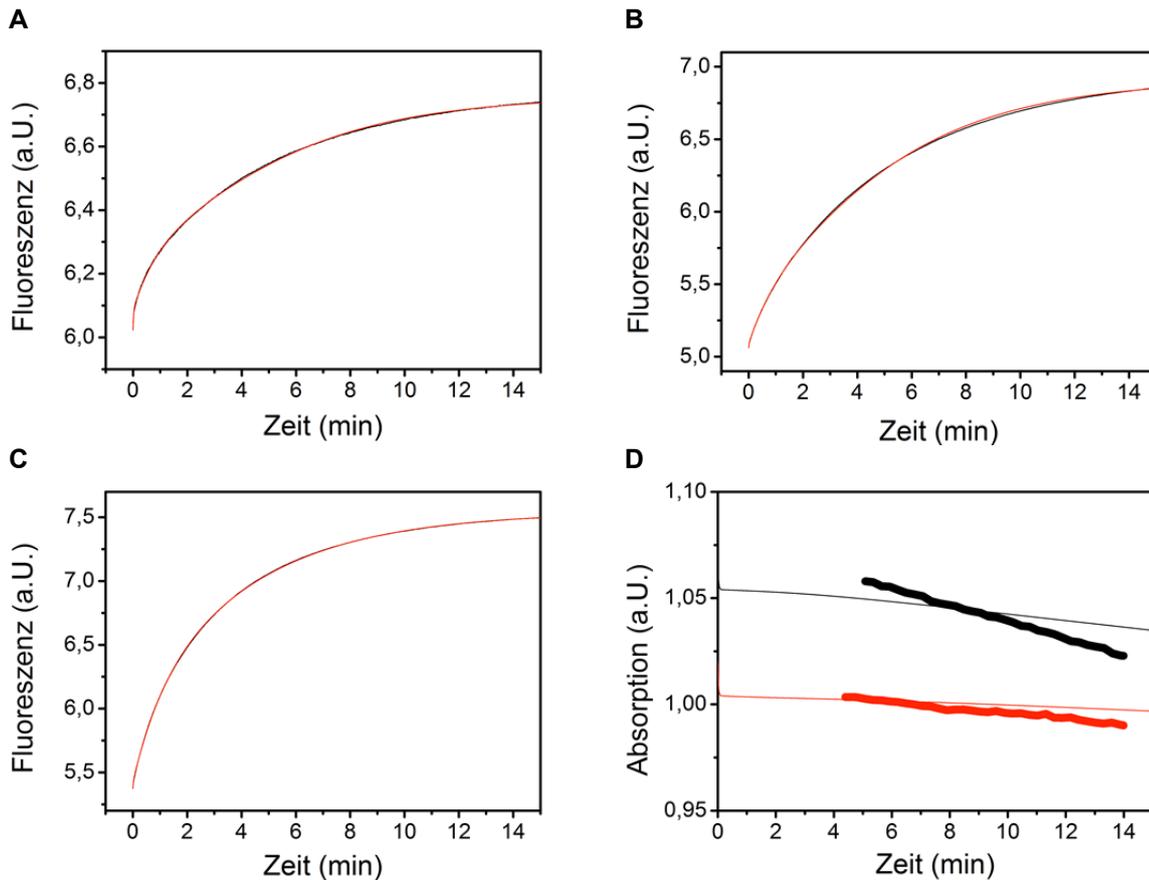
Angegeben sind die durch globale Analyse der ATPγS-induzierten Fluoreszenzkinetiken der Trajektorien der Domänen des Hsp90 mittels eines Fünf-Zustands-Modells mit Hilfe des Berkeley Madonna Software Pakets erhaltenen Ratenkonstanten der einzelnen Schritte.



**Abbildung 3-12: Population der Hsp90 Zustände.** Die aus der globalen Analyse der ATP $\gamma$ S-induzierten Konformationsänderungen des Hsp90 bei 30 °C nach dem Fünf-Zustands-Modell erhaltenen Verteilungen der Zustände im Gleichgewichtszustand in Gegenwart von ATP (schwarz) und ATP $\gamma$ S (rot).

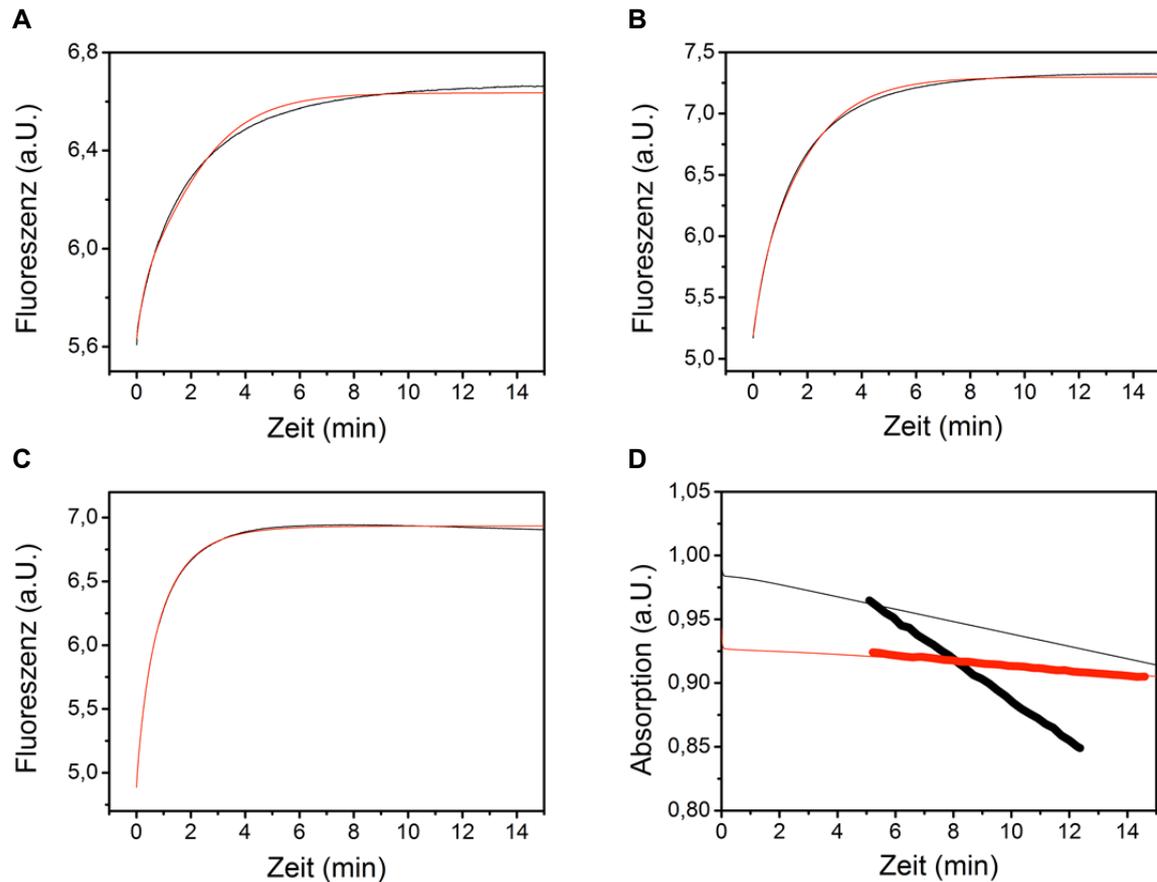
Die verschiedenen Hsp90-Varianten wurden ebenso einer globalen Analyse unterzogen, wie das Hsp90 Wildtypprotein. Sie zeigen jedoch deutliche Abweichungen vom Fünf-Zustands-Modell, das die Konformationsänderungen und die damit gekoppelten Nukleotidhydrolysen beschreibt. Bei keiner der analysierten Hsp90-Varianten konnte mit dem Modell eine zufriedenstellende Beschreibung der gemessenen Konformationsänderungen und eine gleichzeitige Übereinstimmung mit den daraus resultierenden Nukleotidhydrolyseraten erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Analyse nach dem Fünf-Zustands-Modell ist exemplarisch an einer Variante mit deutlich verlangsamten Konformationsänderungen und einer niedrigen ATPase Aktivität (R346S), sowie einer Variante mit beschleunigten Konformationsänderungen und ATPase Aktivität gezeigt (A10T).

Wie sich schon in den manuellen Mischexperiment zeigte, besitzt die Hsp90-Variante R346S deutlich verlangsamte ATP $\gamma$ S-induzierte Konformationsänderungen. Das zur Anpassung an die Konformationsänderungen verwendete Fünf-Zustands-Modell war nicht ausreichend, um die Konformationsänderungen und die daraus resultierenden Nukleotidhydrolyseraten zufriedenstellend zu beschreiben (**Abbildung 3-13**). Insbesondere die aus den Konformationsänderungen resultierende ATP Hydrolyserate war zu gering, um die tatsächlich bestimmte Hydrolyserate zu beschreiben (**Abbildung 3-13D**).



**Abbildung 3-13: Globale Analyse der Konformationsänderungen der R346S yHsp90-Variante nach Fünf-Zustands-Modell.** Gezeigt sind die bei 30 °C erhaltenen ATP $\gamma$ S-induzierten Konformationsänderungen der (A) N-N, (B) M-N und (C) M-M- Trajektorien (schwarz) sowie die aus dem Modell erhaltenen Fitkurven (rot). Die Trajektorien wurden als Fluoreszenzkinetiken nach Anregung des Donorfluorophors (490 nm) und Aufzeichnung der Fluoreszenz des Akzeptorfluorophors (575 nm) in der anderen Hsp90 Untereinheit erhalten. (D) Die aus dem Modell ermittelten ATP (schwarz) und ATP $\gamma$ S Hydrolyseraten (dünne Linien) weichen von den gemessenen Raten (dicke Linien) ab.

Auch Hsp90-Varianten, die, wie die A10T-Variante, eine beschleunigte ATP Hydrolyse-  
rate und beschleunigte ATP $\gamma$ S-induzierte Konformationsänderungen zeigen, konnten mit  
dem Fünf-Zustands Modell nicht ausreichend beschrieben werden. In diesem Fall war die  
Diskrepanz aus tatsächlicher Hydrolyse-  
rate und aus den Konformationsänderungen anhand  
des Modells Ermittelter besonders groß (**Abbildung 3-14D**).

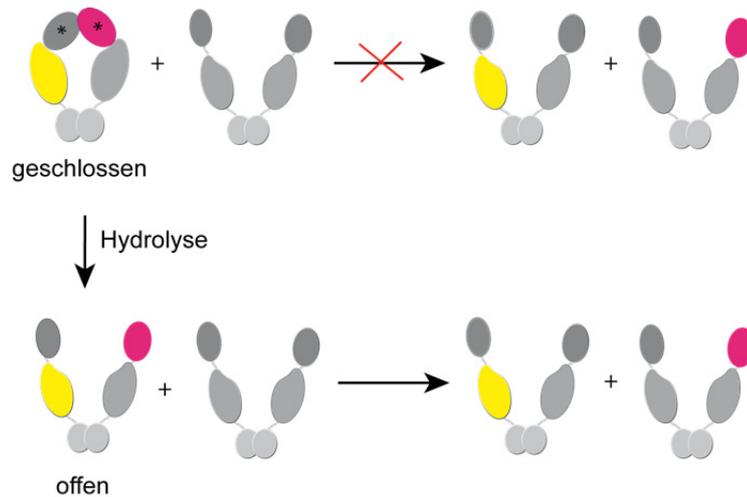


**Abbildung 3-14: Globale Analyse der Konformationsänderungen der A10T yHsp90-Variante nach Fünf-Zustands-Modell.** Gezeigt sind die bei 30 °C erhaltenen ATP $\gamma$ S-induzierten Konformationsänderungen der (A) N-N, (B) M-N und (C) M-M- Trajektorien (schwarz) sowie die aus dem Modell erhaltenen Fitkurven (rot). Die Trajektorien wurden als Fluoreszenzkinetiken nach Anregung des Donorfluorophors (490 nm) und Aufzeichnung der Fluoreszenz des Akzeptorfluorophors (575 nm) in der anderen Hsp90 Untereinheit erhalten. (D) Die aus dem Modell ermittelten ATP (schwarz) und ATP $\gamma$ S Hydrolyseraten (dünne Linien) weichen von den gemessenen Raten (dicke Linien) ab.

Da die ATP $\gamma$ S-induzierten Konformationsänderungen der Hsp90-Varianten mit Hilfe des Fünf-Zustands-Modells unter Berücksichtigung der gemessenen Nukleotid-Hydrolyseraten nicht ausreichend beschrieben werden konnten, konnten für die Hsp90-Varianten mit Hilfe der globalen Analyse keine Gleichgewichtspopulationen der einzelnen Zustände während des Konformationszyklus abgeleitet werden. Aus diesem Grund musste die Charakterisierung der Zustände anhand anderer Methoden erfolgen.

### 3.1.4 N-terminale Dimerisierung der Hsp90-Varianten

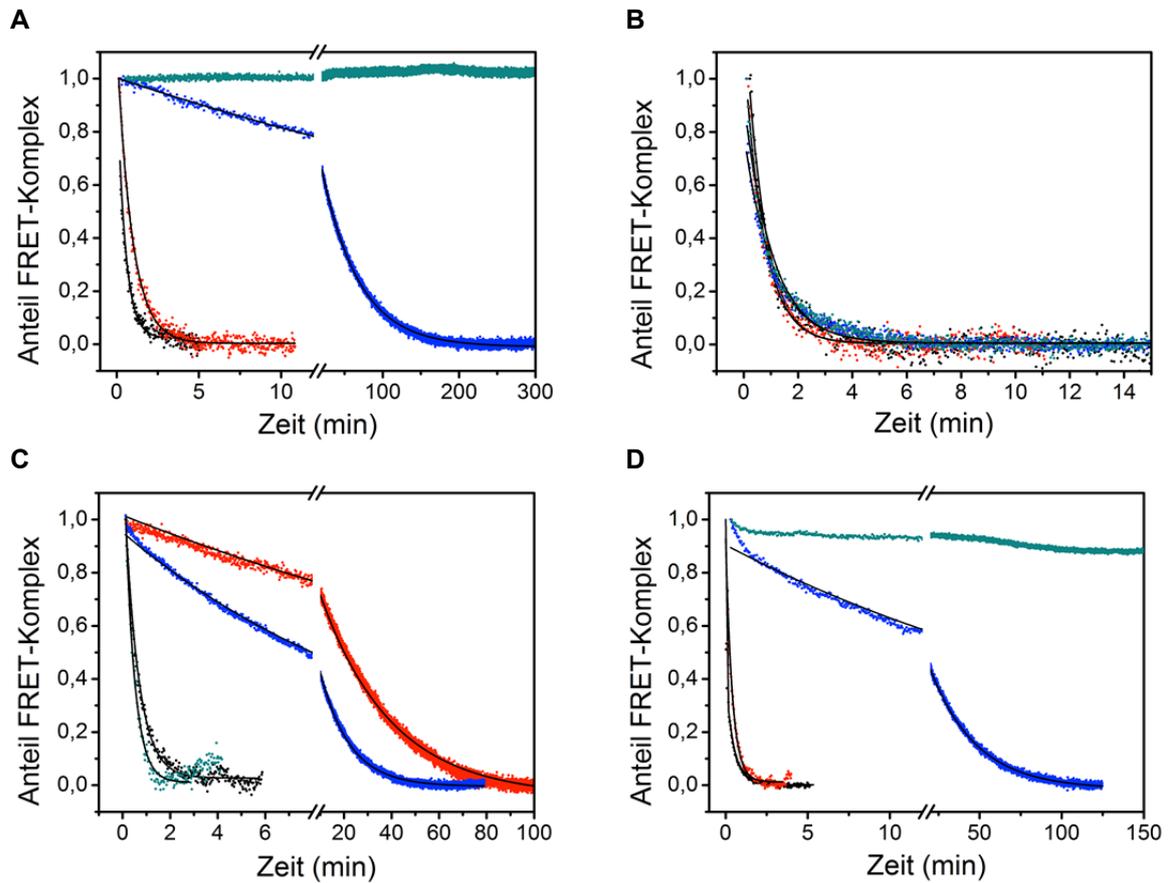
Um dennoch eine Charakterisierung der Gleichgewichtszustände der verschiedenen Hsp90-Varianten zu erhalten, wurde zunächst die N-terminale Assoziation der  $\gamma$ Hsp90-Varianten in Gegenwart verschiedener Nukleotide untersucht. Eine schematische Darstellung des Experiments ist in **Abbildung 3-15** gezeigt.



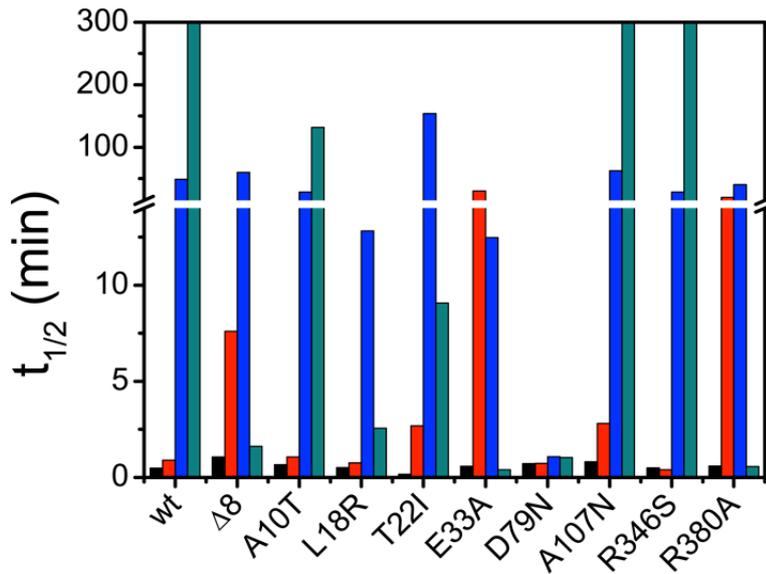
**Abbildung 3-15: Schematische Darstellung der Chase Experimente.** Sind Hsp90 FRET-Heterokomplexe nach Nukleotidbindung N-terminal assoziiert, so wird durch Zugabe von ungelabeltem Hsp90 der geschlossene FRET-Heterokomplex nicht zerstört. Ist die N-terminale Assoziation schwächer, oder findet durch Nukleotidhydrolyse eine Auflösung der N-terminalen Dimerisierung statt, so wird der FRET-Heterokomplex durch den Überschuss an ungelabeltem Hsp90 zerstört. Dies kann durch Messung der Abnahme an Akzeptorfluoreszenz nach Anregung der Donorfluoreszenz beobachtet werden.

Es wurden FRET-Heterokomplexe mit den unterschiedlichen Nukleotiden inkubiert und anschließend ein zehnfacher Überschuss an ungelabeltem Protein zugegeben. In Abwesenheit von Nukleotiden findet aufgrund der dynamischen C-terminalen Dimerisierung von Hsp90 eine schnelle Zerstörung der FRET-Heterokomplexe statt, die anhand der Abnahme an Akzeptorfluoreszenz beobachtet werden kann. Ist Hsp90 auch N-terminal dimerisiert, was beispielsweise in Gegenwart des Cochaperons Aha1 der Fall ist, ist dieser Prozess deutlich verlangsamt (Retzlaff *et al.*, 2010). Von Wildtyp Hsp90 ist bekannt, dass sobald der vollständig geschlossene Zustand durch AMP-PNP induziert wird, keine messbare Dissoziation mehr stattfinden kann und das Fluoreszenzsignal bleibt konstant (Hessling *et al.*, 2009) (**Abbildung 3-15A**). Auf diese Weise kann für die Hsp90-Varianten eine Aussage über den N-terminalen Dimerisierungszustand in Gegenwart verschiedener Nukleotide gemacht werden. Für Wildtyp Hsp90 (**Abbildung 3-16A**), die D79N- (**Abbildung 3-16B**), E33A-Variante (**Abbildung 3-16C**) und R346S-Variante (**Abbildung 3-16D**) sind die gemessenen

Abnahmen an Akzeptorfluoreszenz nach Zugabe von Überschuss an ungelabeltem Hsp90 in Gegenwart der verschiedenen Nukleotide gezeigt. Die durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion ermittelten Halbwertszeiten der FRET-Heterokomplexe für alle Hsp90-Varianten sind graphisch in **Abbildung 3-17** dargestellt und **Tabelle 3-7** zusammengefasst.



**Abbildung 3-16: Stabilität des FRET-Komplexes in Gegenwart unterschiedlicher Nukleotide.** Abnahme der Akzeptorfluoreszenz für (A) Wildtyp yHsp90, (B) D79N, (C) E33A (D) R346S nach Zugabe von zehnfach Überschuss (4  $\mu$ M) an unmarkierter yHsp90-Variante zu 400 nM FRET-Heterokomplex in (schwarz) Abwesenheit von Nukleotid und Gegenwart von 2 mM (rot) ATP, (blau) ATP $\gamma$ S und (cyan) AMP-PNP. Durch Anpassen der Abnahme an Akzeptorfluoreszenz an monoexponentielle Funktion wurden die Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) ermittelt und für die verschiedenen Hsp90-Varianten in (D) zusammengefasst.



**Abbildung 3-17: Halbwertszeiten des FRET-Komplexes.** Gezeigt sind die durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion an die Abnahme an Akzeptorfluoreszenz bestimmten Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) für die verschiedenen Hsp90-Varianten.

Wie die Fluoreszenzspektren und die kinetische Analyse der Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen zeigten, induziert AMP-PNP im Falle der  $\Delta 8$ , D79N, E33A L18R und R380A Hsp90-Variante keine sichtbaren Konformationsänderungen. Dies spiegelt sich in Halbwertszeiten des FRET-Komplexes wider, die denen in Abwesenheit von Nukleotid vergleichbar sind. Nur im Falle der A107N und R346S Hsp90-Varianten war AMP-PNP in der Lage, einen vergleichbar starken geschlossenen Zustand zu erzeugen, so dass über Stunden keine Dissoziation des FRET-Komplexes festzustellen war (**Abbildung 3-16D**). ATP $\gamma$ S induzierte in allen Hsp90-Varianten, bis auf die D79N-Variante, einen N-terminal dimerisierten Zustand, der in einer deutlichen Stabilisierung des FRET-Komplexes und langen Halbwertszeiten resultierte. Auch in der E33A-Variante, die keine detektierbare ATP Hydrolyserate besitzt, findet in Gegenwart von ATP $\gamma$ S eine Dissoziation des FRET-Heterokomplexes statt. Dies scheint auf einer verstärkten Rückreaktion im konformationellen Zyklus zu beruhen, da eine Hydrolyse des ATP $\gamma$ S ausgeschlossen werden kann. ATP induziert in der  $\Delta 8$ , T22I, E33A und R380A Hsp90-Variante deutlich sichtbare Konformationsänderungen, was auf eine deutlich stärkere Population geschlossener Zustände in Gegenwart von ATP hinweist, im Gegensatz zu Wildtyp Hsp90. Dies wird in der langsameren Dissoziation der FRET-Heterokomplexe dieser Varianten bestätigt. In Gegenwart von ATP werden N-terminal dimerisierte Zustände deutlich stärker populiert, als dies bei Wildtyp der Fall ist. Die Heterokomplexe der  $\Delta 8$  und T22I-Variante besitzen eine deutlich geringere Halbwerts-

zeit (8 und 3 Minuten) als die E33A und R380A-Variante (30 und 20 Minuten). Hier ist die Dissoziation durch die intakte ATP-Hydrolyse der  $\Delta 8$  und T22I-Variante beschleunigt.

**Tabelle 3-7: Halbwertszeiten des FRET-Komplexes in Gegenwart unterschiedlicher Nukleotide.**

Hsp90-Variante	$t_{1/2}$ (ohne) (min)	$t_{1/2}$ (AMP-PNP) (min)	$t_{1/2}$ (ATP $\gamma$ S) (min)	$t_{1/2}$ (ATP) (min)
wt	0,5	> 300	49	0,9
$\Delta 8$	1	2	60	8
A10T	0,6	132	29	1
L18R	0,5	3	13	0,8
T22I	0,2	9	154	3
E33A	0,6	0,4	12	30
D79N	0,7	1	1	0,7
A107N	0,8	> 300	62	3
R346S	0,5	> 300	28	0,4
R380A	0,6	0,6	40	20

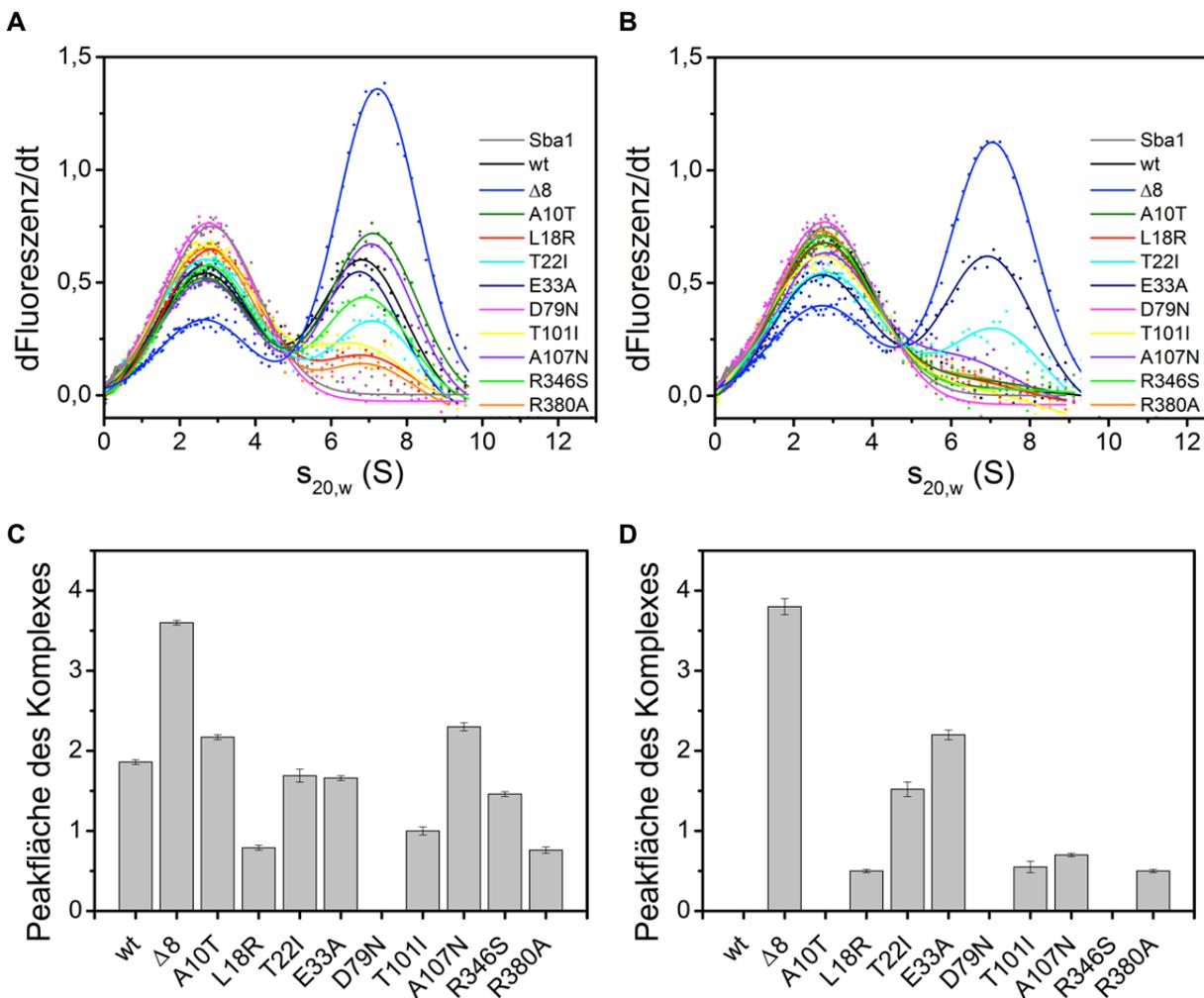
Gezeigt sind die Halbwertszeiten des FRET-Komplexes in Abwesenheit und Gegenwart von 2 mM unterschiedlicher Nukleotide nach Zugabe an zehnfachem Überschuss an ungelabelter Hsp90-Variante. Die Halbwertszeiten wurden durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion an die Abnahme des Akzeptorfluoreszenzsignals ermittelt.

### 3.1.5 Bindung der Cochaperone Aha1 und Sba1/p23

Die Hsp90 Cochaperone Aha1 und Sba1/p23 sind dafür bekannt, dass ihre Bindung sensitiv für den konformationellen Zustand von Hsp90 ist. So erfolgt Bindung von Sba1/p23 nur an den geschlossenen Zustand von Hsp90, weshalb die Bindung nur in Gegenwart von Nukleotidanaloga, die den geschlossenen Zustand in Hsp90 induzieren, detektiert werden kann (Johnson und Toft, 1994). Das Cochaperon Aha1 bindet ebenfalls bevorzugt an den geschlossenen Zustand von Hsp90. Bei der Bindung bleibt die Nukleotidbindestelle jedoch zugänglich (Li *et al.*, 2013). Dies ermöglicht Aha1 im Gegensatz zu Sba1/p23 an geschlossene Hsp90 Konformationen vor dem finalen geschlossenen Zustand zu binden. Die verschiedenen Hsp90-Varianten sollen nun in Gegenwart von ATP und ATP $\gamma$ S auf ihre Eigenschaften, diese Konformations-sensitiven Cochaperone Aha1 und Sba1/p23, zu binden untersucht werden. Dazu wurde die Komplexbildung fluoreszenzmarkierter Cochaperone in Gegenwart der verschiedenen Hsp90-Varianten und Nukleotide mittels analytischer Fluoreszenz-ultrazentrifugation untersucht.

In Gegenwart von ATP $\gamma$ S zeigt die D79N-Variante (wie erwartet aufgrund ihrer fehlenden Fähigkeit Nukleotid zu binden) keine Sba1/p23 Interaktion (**Abbildung 3-18A, C**). Die Varianten R380A, T101I sowie L18R zeigen deutlich beeinträchtigte Interaktion mit

Sba1/p23 was darauf hinweist, dass diese Varianten in Gegenwart von ATP $\gamma$ S den geschlossenen Zustand, der die Sba1/p23 Interaktion ermöglicht, kaum einnehmen. Die Variante  $\Delta$ 8 hingegen scheint diesen Zustand noch stärker anzunehmen als Wildtyp Hsp90, da die Affinität von Sba1/p23 für diese Variante deutlich größer ist als für das Wildtypprotein. Die übrigen Varianten zeigen ein dem Wildtypprotein vergleichbares Sba1/p23-Bindevverhalten in Gegenwart von ATP $\gamma$ S und nehmen ähnlich stark wie Wildtyp Hsp90 den geschlossenen Zustand ein.



**Abbildung 3-18: Bindung des Cochaperons Sba1/p23 an die yHsp90-Varianten.** Die Komplexbildung von 500 nM Fluorescein markiertem Sba1/p23 an 1,5  $\mu$ M der verschiedenen yHsp90-Varianten in Gegenwart von 2 mM (A) ATP $\gamma$ S oder (B) ATP wurde mit analytischer Fluoreszenz-ultrazentrifugation untersucht. Durch Anpassen einer bi-Gauß-Funktion an die dc/dt Plots ermittelte Peakfläche des Sba1/p23-Hsp90-Komplexes in Gegenwart von 2 mM (C) ATP $\gamma$ S oder (D) ATP sowie aus dem Fit resultierenden Standardfehler.

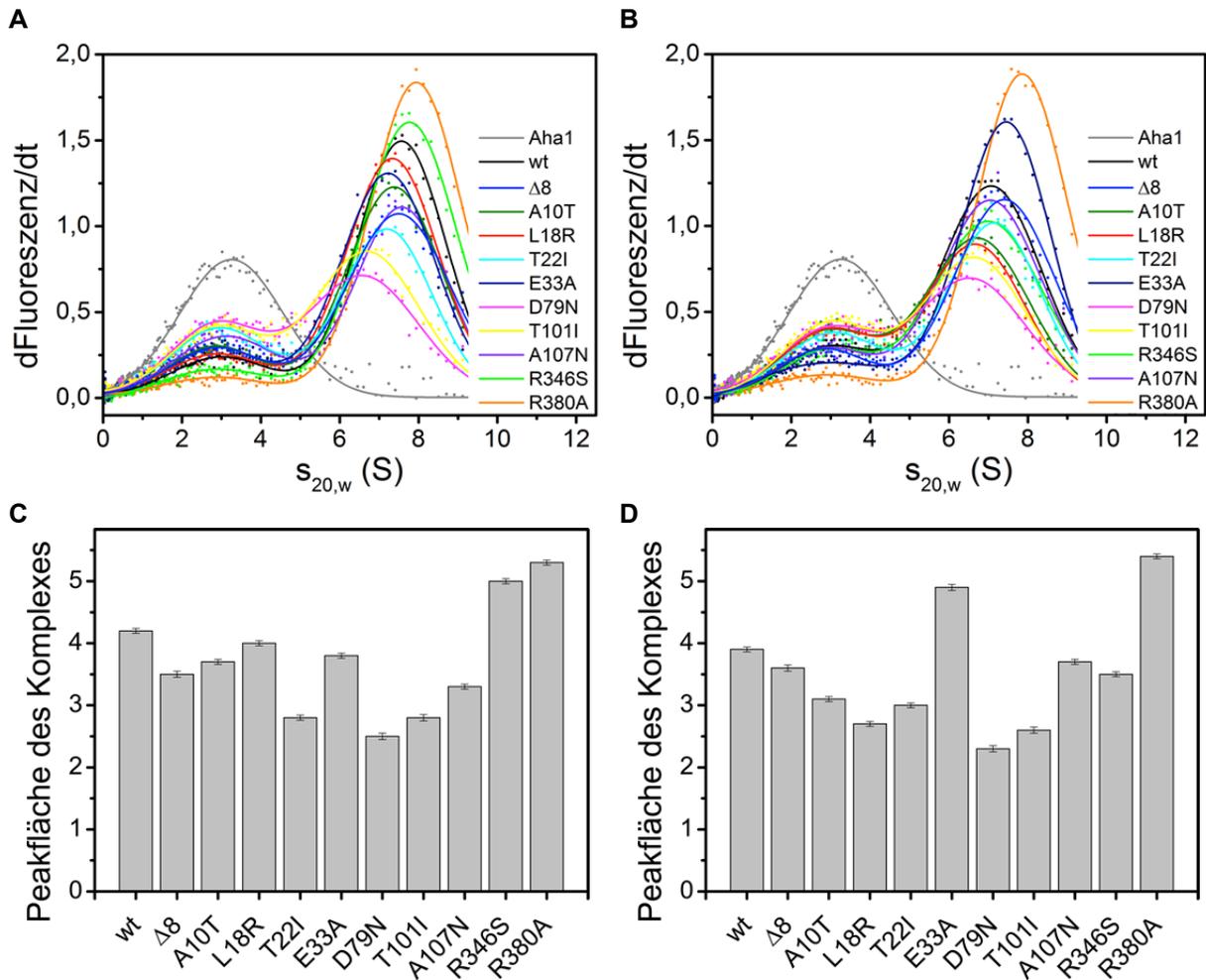
In Gegenwart von ATP ist insbesondere für die Hsp90-Varianten  $\Delta$ 8 und E33A eine deutliche Population des geschlossenen Zustandes aufgrund der verstärkten Interaktion mit

Sba/p23 zu sehen (**Abbildung 3-18B, D**). Für die Variante T22I ist dies auch zu erkennen, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß, als dies für die anderen beiden Varianten der Fall ist. Für die weiteren Hsp90-Varianten ist keine veränderte Sba1/p23 Bindung in Gegenwart von ATP zu bemerken, was auf eine geringe Population des geschlossenen Zustandes schließen lässt.

Insbesondere für die R380A-Variante ist es verwunderlich, dass sie, obwohl in den vorhergehenden Analysen in Gegenwart von ATP $\gamma$ S und ATP deutliche Konformationsänderungen und eine Verschiebung des Gleichgewichts zu geschlosseneren Zuständen zu detektieren sind, keine Sba1/p23 Bindung in Gegenwart von zu sehen ist. Somit ist diese Variante nicht in der Lage, den vollständig geschlossenen, Sba1/p23-bindefähigen Zustand einzunehmen.

Des Weiteren wurde die Interaktion der Hsp90-Varianten mit dem 5(6)-FAM-makiertem Aha1 in der analytischen Fluoreszenz-ultrazentrifuge untersucht (**Abbildung 3-19**). Die D79N-Variante zeigt hier eine Nukleotid-unabhängige Bindung für Aha1, was sehr gut mit ihrer fehlenden Fähigkeit Nukleotid zu binden übereinstimmt. Sie dient als Referenzbeispiel für offenes Hsp90. Die T101I-Variante zeigt ebenfalls eine verringerte Affinität für Aha1, bei gleichzeitigem Fehlen von Sba1/p23-Bindung. Diese Variante nimmt auch in Gegenwart von ATP $\gamma$ S eher offene Zustände ein. Alle übrigen Varianten zeigen eine höhere Affinität für Aha1 in Gegenwart von ATP $\gamma$ S, in guter Übereinstimmung mit der Induktion geschlossener Zustände durch dieses Nukleotid. Insbesondere die starke Affinität der R380A-Variante für Aha1 bei gleichzeitigem Fehlen von Sba1/p23-Bindefähigkeit zeigt, dass diese Variante geschlossene Zustände vor dem finalen geschlossenen Zustand einnimmt.

Dies gilt für die R380A-Variante auch im Falle von ATP. Auch in Gegenwart dieses Nukleotids zeigt sie eine deutlich erhöhte Affinität für Aha1 im Vergleich zum Wildtypprotein bei gleichzeitigem Fehlen von Sba1/p23-Bindung. Diese Variante ist nicht in der Lage, den finalen geschlossenen Zustand einzunehmen, sondern vielmehr geschlossene Zustände unmittelbar zuvor. Die E33A-Variante zeigt in Gegenwart von ATP ebenfalls eine deutlich verstärkte Affinität für Aha1, sie ist im Gegensatz zur R380A-Variante Sba1/p23 zu binden. Somit nimmt die E33A-Variante verstärkt den finalen geschlossenen Zustand ein. Die übrigen Hsp90-Varianten zeigen keine derart deutlichen Präferenzen



**Abbildung 3-19: Bindung des Cochaperons Aha1 an die yHsp90-Varianten.** Die Komplexbildung von 500 nM 5(6)-FAM markiertem Aha1 an 3  $\mu$ M der verschiedenen yHsp90-Varianten in Gegenwart von 2 mM (A) ATP $\gamma$ S oder (B) ATP wurde mit analytischer Fluoreszenz-ultrazentrifugation untersucht. Durch Anpassen einer bi-Gauß-Funktion an die dc/dt Plots ermittelte Peakfläche des Aha1-Hsp90-Komplexes in Gegenwart von 2 mM (C) ATP $\gamma$ S oder (D) ATP sowie aus dem Fit resultierende Standardfehler.

### 3.1.6 Small angle X-ray scattering (SAXS)

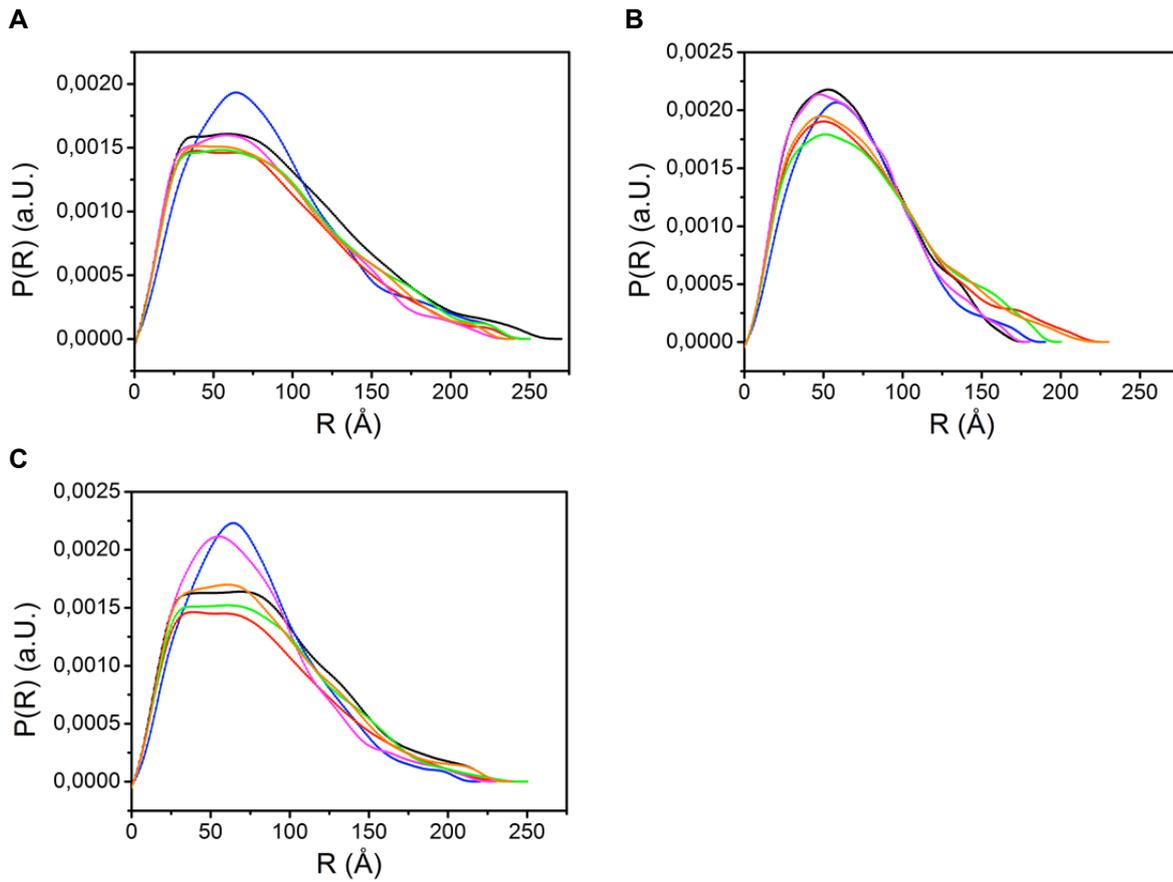
Die FRET Studien legen nahe, dass die verschiedenen Hsp90-Varianten unterschiedliche Zustände des Hsp90 Konformationszyklus anhäufen. Frühere Studien zeigten bereits, dass die strukturellen Unterschiede zwischen offenem und geschlossenem Zustand groß genug sind, um diese mittels SAXS unterscheiden zu können (Cunningham *et al.*, 2012; Krukenberg *et al.*, 2008). Das Hsp90 Wildtypprotein sowie die Varianten  $\Delta 8$ , L18R, E33A, R380A und R346S wurden jeweils in Abwesenheit und in Gegenwart der Nukleotide ATP und ATP $\gamma$ S in Kooperation mit Dr. Tobias Madl vom Arbeitskreis Prof. Dr. Sattler mittels SAXS vermessen. Dazu wurden von Dr. Madl Streuintensitätskurven aufgenommen und

durch Fourier-Transformation in interatomare Wahrscheinlichkeitsprofile (P(R)) überführt, die Informationen über die Gesamtform des Moleküls enthalten (**Abbildung 3-20**).

In Abwesenheit von Nukleotiden zeigt Wildtyp Hsp90 eine breite Verteilung an Distanzen in den P(R)-Kurven (**Abbildung 3-20A**), die der sehr ausgedehnten und offenen Konformation des Hsp90 entsprechen, die es in Abwesenheit von Nukleotiden einnimmt (Shiau *et al.*, 2006). Dies stimmt mit bisherigen SAXS Messungen sowohl für die konstitutiv exprimierte Variante des Hefe Hsp90 (Cunningham *et al.*, 2012) als auch *E. coli* HtpG überein (Krukenberg *et al.*, 2008). Die übrigen Varianten nehmen eine dem Wildtypprotein vergleichbare Konformation ein. Einzig die  $\Delta 8$ -Variante zeigt eine Verschmälerung der P(R)-Kurve, was einem kompakteren Zustand als Wildtyp entspricht.

In Gegenwart von sättigender Konzentration an ATP $\gamma$ S findet im Wildtypprotein eine Verschiebung des Gleichgewichtes hin zum geschlossenen Zustand statt, die sich in einer deutlichen Verschmälerung der P(R)-Kurve wider spiegelt (**Abbildung 3-20B**). Bei der  $\Delta 8$ -Variante, die bereits in Abwesenheit von Nukleotid eine kompaktere Struktur einnimmt, findet ebenfalls eine Gleichgewichtsverschiebung statt und die P(R)-Kurve verschmälert sich weiter. Die E33A-Variante zeigt eine dem Wildtypprotein vergleichbare Strukturänderung im SAXS, allein die R346S- und insbesondere die R380A- und L18R-Variante weisen eine deutlich weniger kompakte Struktur als das Wildtypprotein in Gegenwart von ATP $\gamma$ S auf. Die R346S-Variante zeigte zwar kaum verringerte Affinität für Sba1/p23 in Gegenwart von ATP $\gamma$ S in der analytischen Ultrazentrifugation (**Abbildung 3-18A**), was auf das Vorhandensein eines geschlossenen Zustandes hinweist. Die R380A- und L18R-Varianten hingegen zeigten kaum N-terminale Assoziation oder Interaktion mit Sba1/p23, was auf darauf hindeutete, dass sie nicht in der Lage sind, den geschlossenen Zustand einzunehmen. Die breite P(R)-Kurven dieser Varianten können diese Vermutung bestätigen.

In Gegenwart von ATP zeigen die Hsp90-Varianten den größten Unterschied in ihren P(R)-Kurven (**Abbildung 3-20C**). E33A und  $\Delta 8$  nehmen besonders deutlich eine kompakte Struktur ein. Sie populieren in Gegenwart von ATP geschlossene Zustände, was gut mit den Ergebnissen der FRET-Experimente übereinstimmt und mit der Tatsache, dass beide Varianten in der Lage sind, Sba1/p23 zu binden. L18R, R346S und R380A zeigen eine dem Wildtypprotein ähnliche breite Distribution der Abstände. Es gibt keine Anzeichen einer Verschiebung der Gleichgewichtslage in Übereinstimmung mit den FRET-Experimenten.



**Abbildung 3-20: SAXS Analyse der yHsp90-Varianten.** P(R)-Kurven von (schwarz) Wildtyp yHsp90, der (blau)  $\Delta 8$ -, (rot) L18R-, (magenta) E33A, (grün) R346S und (orange) R380A-Variante in (A) Abwesenheit von Nukleotid, sowie in Gegenwart von 4 mM (B) ATP $\gamma$ S oder (C) ATP.

## 3.2 Einfluss der Mutationen auf *in vivo* Funktionalität von Hsp90

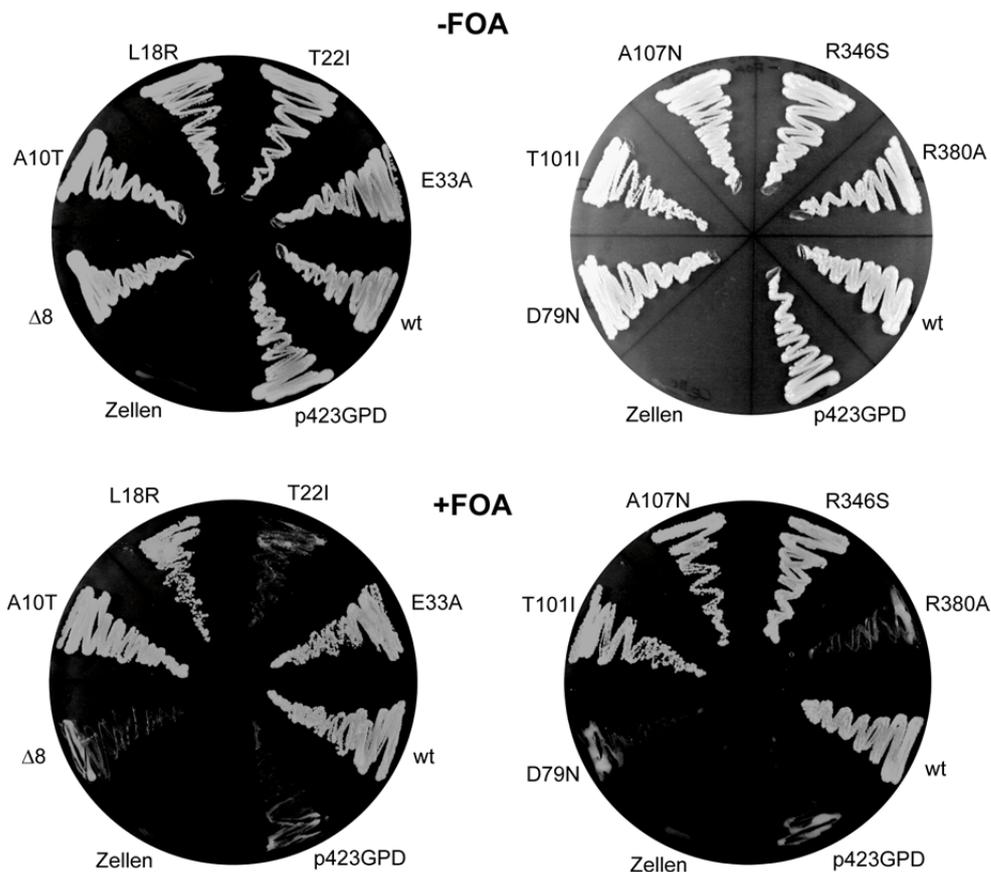
Die *in vitro* Analysen zeigten, dass die verschiedenen yHsp90-Varianten Intermediate des Hsp90 Konformationszyklus während der ATP Hydrolyse in unterschiedlichem Ausmaß akkumulieren, insbesondere die  $\Delta 8$ , T22I, E33A und R380A-Varianten. Da ATP das natürliche Substrat ist, sollten die Populationsverteilungen der Hsp90-Varianten in Gegenwart von ATP auch *in vivo* vorgefunden werden. Wie sich die einzelnen Hsp90-Varianten als einzige Hsp90 Quelle *in vivo* verhalten, soll im Folgenden näher untersucht werden. Hierbei ist neben der generellen Funktionalität, also ob Hefen mit der Hsp90-Variante leben können, ebenso interessant wie die Toleranz dieser Hefen gegenüber verschiedenen Stressoren. Desweiteren soll anhand ausgewählter Hsp90 *clients* untersucht werden, inwieweit die Hsp90-Varianten in der Lage sind die Prozessierung der *clients* zu unterstützen.

### 3.2.1 Lebensfähigkeit

Da Hsp90 in Hefen essentiell ist, muss in Hefen mindestens eine funktionelle Hsp90-Variante vorhanden sein. Ob die *in vitro* untersuchten yHsp90-Varianten *in vivo* die essentielle Funktion des Hsp90 übernehmen können, wurde über ein etabliertes *Shuffling* System untersucht (Nathan *et al.*, 1997). Im verwendeten Hefestamm sind beide genomischen Vertreter des Hsp90 Gens deletiert. Damit der Hefestamm lebensfähig ist, besitzt er ein *HSP82*-Gen auf einem URA-Plasmid. Die Expression des Gens erfolgt konstitutiv unter Kontrolle des GPD-Promotors. Dieses Plasmid kann mittels Gegenselektion auf 5'-FOA-Platten gegen ein Anderes ausgetauscht werden, solange die auf dem anderen Plasmid kodierte Hsp90-Variante die Lebensfähigkeit sicherstellen kann. Falls es sich hierbei jedoch um eine dysfunktionale Hsp90-Variante handelt, wirkt das *Shuffling* lethal. Hefen des Stammes *ECU82 $\alpha$*  wurden mit Plasmiden aller Hsp90-Varianten transformiert und zunächst auf Platten ohne FOA inkubiert. Anschließend wurden die Hefestämme auf FOA-haltige Platten überführt.

Wie **Abbildung 3-21** zeigt, war kein Wachstumsunterschied der Hefen auf FOA-freien Platten zu erkennen. Auf den FOA-haltigen Platten konnten nur Hefen mit einer funktionellen Hsp90-Variante leben.  $\Delta 8$ , D79N sowie R380A sind die einzigen Hsp90-Varianten, die den Hefen keine Lebensfähigkeit verleihen können. Dies stimmt mit bisherigen Experimenten überein (Meyer *et al.*, 2004; Obermann *et al.*, 1998; Richter, 2003), obwohl andere

Hefestämme und Vektoren verwendet wurden. Die T22I Hsp90-Variante zeigt hier bereits bei der Inkubation bei 30 °C einen sehr starken temperatur-sensitiven Phänotyp, da nur einzelne Hefekolonien wuchsen. Dieser wurde bereits von Nathan und Lindquist berichtet (Nathan und Lindquist, 1995). Überraschender Weise unterstützte die E33A-Variante die Lebensfähigkeit der Hefenzellen. Dies ist besonders erstaunlich, da sowohl bei Obermann und Kollegen (Obermann *et al.*, 1998), wie auch bei Panaretou und Kollegen (Panaretou *et al.*, 1998) diese Hsp90-Variante zur Lethalität der verwendeten Hefen führte. Da diese Hsp90-Variante keine ATPase Aktivität besitzt wurde von beiden Arbeitsgruppen geschlossen, dass diese essentiell für die *in vivo* Funktionalität des Hsp90 ist. Bei dem hier verwendeten Hefestamm und *Shuffling*-Plasmid können Hefen mit der E33A-Variante leben.

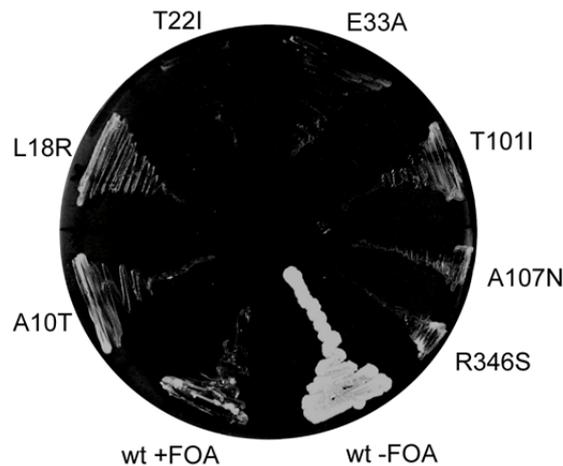


**Abbildung 3-21: *In vivo* Funktionalität der Hsp90-Varianten.** Hefen, die die verschiedenen  $\gamma$ Hsp90-Varianten auf einem HIS-Plasmid konstitutiv exprimieren, wachsen auf Platten ohne FOA, da das URA-Plasmid mit *HSP82* noch vorhanden ist. Auf Platten mit FOA geht das URA-Plasmid mit *HSP82* verloren und die  $\gamma$ Hsp90-Varianten sind die einzige Hsp90 Quellen in den Hefen.  $\Delta 8$ , D79N und R380A als einzige Hsp90-Varianten können Hefen keine Lebensfähigkeit verleihen.

Um auszuschließen, dass lebende Hefen auf den FOA-haltigen Platten fälschlicherweise das Ursprungs URA-Plasmid mit dem Wildtyp Hsp82 Gen nicht verloren haben, wurden die lebenden Hefen der FOA-haltigen Platten nochmals auf -URA-Platten überführt. Wie

**Abbildung 3-22** zeigt, konnten alle Hefen nicht mehr auf –URA-Platten wachsen, das Wildtyp *hsp82* Gen ist also nicht mehr in den Hefen vorhanden. Desweiteren wurde aus den Hefen, die die E33A-Hsp90-Variante enthalten das Plasmid nach 2.2.2 präpariert und durch Sequenzierung ausgeschlossen, dass eine spontane Rückmutation stattfand.

Die übrigen Hsp90-Varianten können die essentielle Funktion von Hsp90 übernehmen.



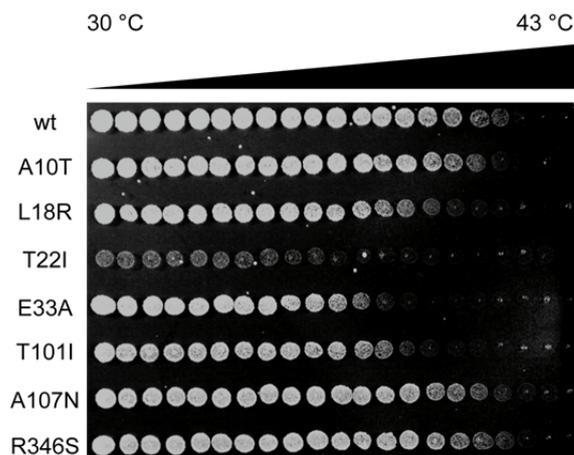
**Abbildung 3-22: Konrolle des FOA-Shufflings.** Zur Kontrolle, ob die Hefen während des FOA-Shufflings das URA-Plasmid mit dem Wildtyp *HSP82* Gen verloren haben, wurden die Hefen von den FOA-haltigen Selektionsplatten auf -URA-Selektionsplatten überführt. Nur Hefen vor dem FOA-Shuffling können leben.

### 3.2.2 Toleranz gegenüber Stress

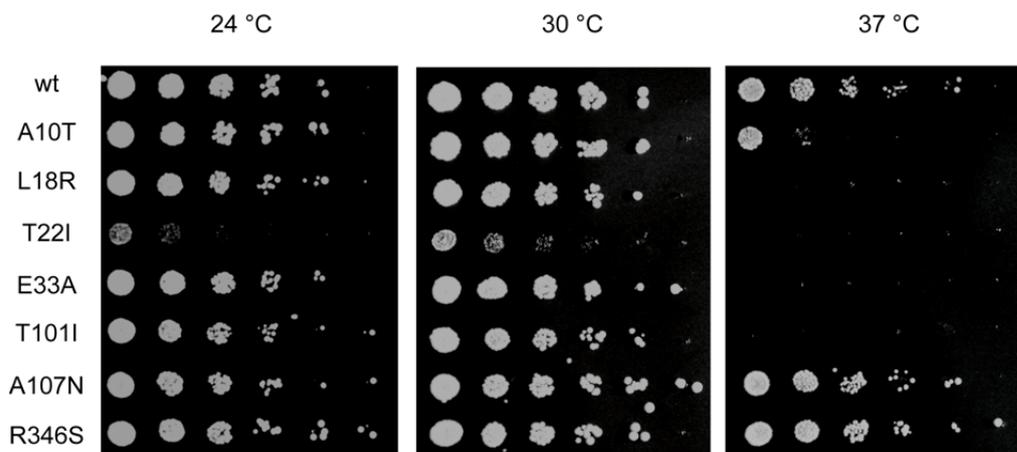
Hsp90 ist ein Hitzeschockprotein und dessen Expression wird als Antwort auf verschiedenste Arten von Stress hochreguliert (Finkelstein *et al.*, 1982). Hsp90 hilft Zellen somit auf Stress zu reagieren und diesen zu tolerieren. Um herauszufinden, wie wichtig der Einfluss des konformationellen Zyklus auf die Antwort auf verschiedenen Stressoren ist, wurden die Hefen, die die Hsp90-Varianten als einzige Hsp90 Quelle besitzen, verschiedenen Stressoren ausgesetzt, um herauszufinden wie tolerant sie diesen gegenüber sind.

Zunächst wurden die Hefen auf einem Temperaturgradient inkubiert, um die maximale Temperatur zu ermitteln, bei der die Hefen mit den verschiedenen Hsp90-Varianten in der Lage sind zu leben. Zudem wurden Verdünnungen der Hefen unter verschiedenen Temperaturen inkubiert und ihr Wachstumsverhalten analysiert (**Abbildung 3-23**).

A



B

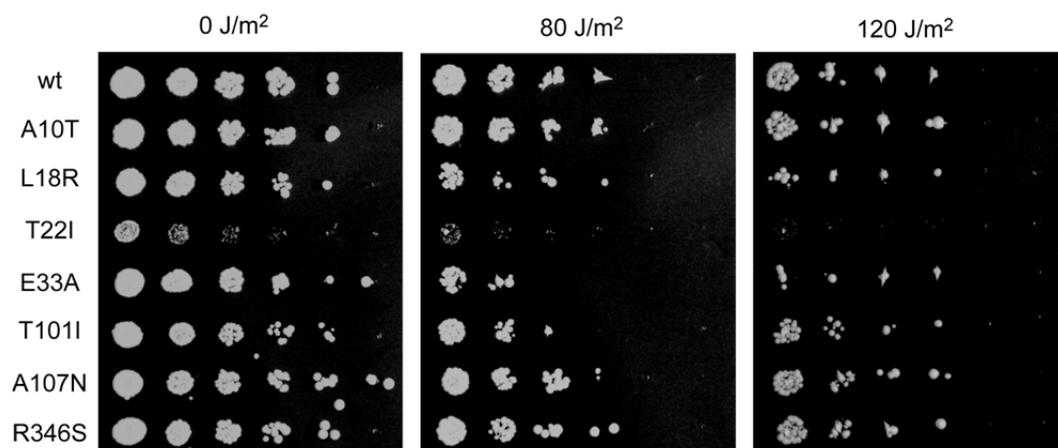


**Abbildung 3-23: Temperatursensitivität der Hsp90-Varianten.** Hefestämme, die die verschiedenen yHsp90-Varianten als jeweils einziges Hsp90 enthalten, wurden (A) mit gleicher Zelldichte auf eine entsprechende Selektionsplatte gespottet und bei einem Temperaturgradienten 30-43 °C für 48 Stunden inkubiert. (B) Von denselben Hefestämmen wurden 5-fach Verdünnungen gespottet und bei 24 °C, 30 °C sowie 37 °C für 48 Stunden inkubiert.

Wie **Abbildung 3-23A** zeigt, wachsen Hefen mit wildtypischem Hsp90 bis zu einer maximalen Temperatur von etwa 40 °C. Den stärksten Temperatur-sensitiven Effekt zeigt die T22I-Variante, wie bereits von Nathan und Lindquist berichtet (Nathan und Lindquist, 1995). Sie berichteten ebenfalls den Temperatur-sensitiven Effekt der T101I-Variante, der hier mit einer maximalen Wachstumstemperatur von etwa 36 °C zu sehen ist. Die E33A-Variante zeigt neben der T22I-Variante den stärksten Effekt mit einer maximalen Wachstumstemperatur von etwa 34 °C, bei 37 °C zeigt sie kein Wachstum. Die L18R-Variante verleiht den Hefen ebenfalls eine Temperatursensitivität, denn sie zeigt bei 37 °C ebenfalls kein Wachstum. Wie die Analyse der thermische Stabilität der Hsp90-Varianten zeigt, kann die Temperatursensitivität nicht auf eine mangelnde Stabilität der Varianten zurückgeführt werden. In ihrer ATPase Aktivität unterscheiden sich die sensitiven Hsp90-Varianten eben-

falls. E33A besitzt keine detektierbare *in vitro* Hydrolyseaktivität, T101I zeigt eine verringerte Aktivität. Die Varianten L18R sowie T22I zeigen bei 30 °C sogar eine höhere ATPase Rate als Wildtyp Hsp90. Die Variante R346S, die eine geringe ATPase Rate aufweist, führt hingegen zu keiner Temperatursensitivität. Auch hierin kann kein gemeinsamer Grund für eine Temperatursensitivität gefunden werden. Die Gründe hierfür müssen weiter untersucht werden. Sie können auch in einer veränderten Interaktion mit Cochaperonen resultieren oder in einer veränderten Prozessierung der *client*-Proteine.

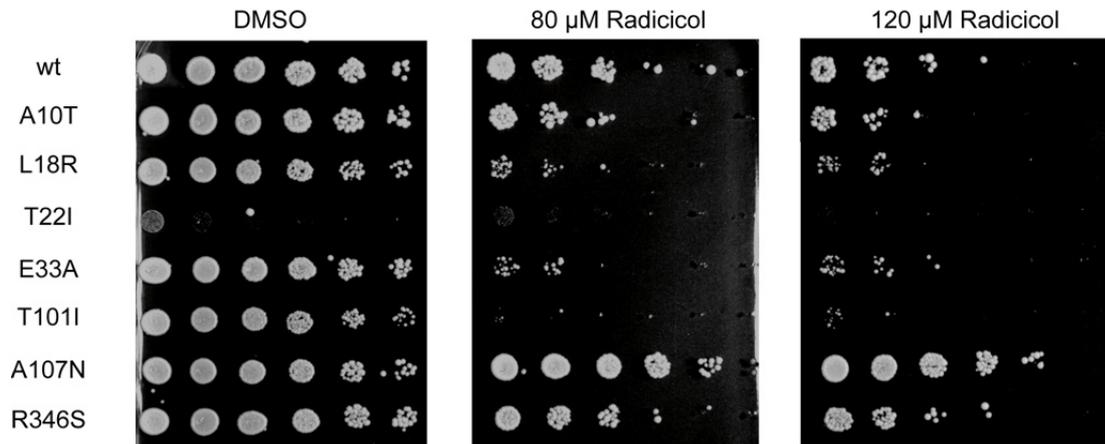
Neue Studien bringen Hsp90 Funktion mit Prozessen wie Transkription, DNA-Reparatur und Erhaltung von DNA Länge an Telomeren in Verbindung (Echtenkamp *et al.*, 2011; Toogun *et al.*, 2008). Um zu untersuchen, ob die Hsp90-Varianten sich unterschiedlich in Gegenwart von UV-Stress verhalten, wurden die Hefezellen der verschiedenen Hsp90-Varianten definierten UV-Dosen ausgesetzt und anschließend auf ihr Wachstum untersucht. Wie **Abbildung 3-24** zeigt, sind insbesondere Hefen, die die E33A und T101I Hsp90-Varianten exprimieren, sensitiv gegenüber UV-Stress. Obwohl die Hefezellen mit der T22I-Variante aufgrund ihres Temperatur-sensitiven Phänotyps ein schlechtes Wachstum bei der Inkubationstemperatur von 30 °C zeigen, ist eine deutliche Sensitivität gegenüber UV-Stress erkennbar.



**Abbildung 3-24: Sensitivität gegenüber UV-Stress der Hsp90-Varianten.** Von Hefestämmen, die die verschiedenen  $\gamma$ Hsp90-Varianten exprimieren, wurden fünf 5-fach Verdünnungen von Hefelösungen gleicher optischer Dichte auf entsprechenden Selektionsplatten gespottet und anschließend UV-Strahlung von 80 J/m<sup>2</sup> und 120 J/m<sup>2</sup> ausgesetzt. Anschließend wurden die Platten 48 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Radicicol ist ein bekannter spezifischer Inhibitor der Hsp90 ATPase Aktivität. Werden Hefezellen in Gegenwart von Radicolol inkubiert führt die Hsp90 Inhibition zu einem verschlechtertem Wachstum. Ob sich die Hsp90-Varianten in ihrer Hsp90 Sensitivität

unterscheiden, wurde anhand Inkubation der Hefezellen, die die verschiedenen Hsp90-Varianten exprimieren, in Gegenwart von Radicicol untersucht. Wie **Abbildung 3-25** zeigt, sind vor allem Hefen der T101I-Variante vermehrt sensitiv gegenüber Radicicol im Vergleich zu Hefen, die das Wildtyp Hsp90 exprimieren. Dies geht mit Ergebnissen von Piper und Kollegen einher (Piper *et al.*, 2003).



**Abbildung 3-25: Sensitivität gegenüber Radicicol der Hsp90-Varianten.** Von Hefestämmen, die die verschiedenen  $\gamma$ Hsp90-Varianten als jeweils einiges Hsp90 enthalten, wurden Kulturen gleicher optischer Dichte über Nacht mit Radicicol bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen sowie fünf 5-fach Verdünnungen auf entsprechenden Selektionsplatten gespottet und die Platten 48 Stunden bei 30 °C inkubiert.

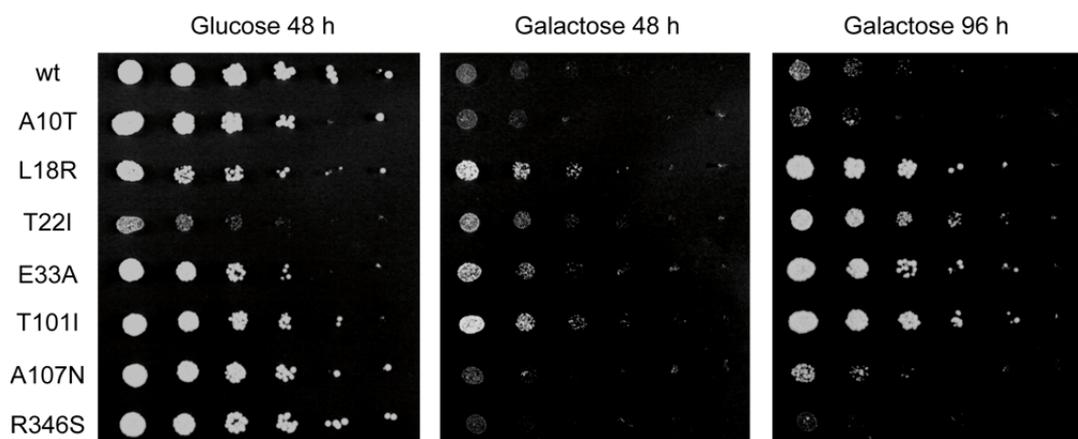
Hefen, die die L18R oder E33A Hsp90-Variante exprimieren, zeigen ebenfalls ein deutlich sensitiveres Verhalten auf Radicicol Inhibition im Vergleich zu Hefen mit der Wildtyp Hsp90-Variante. Wiederum folgt die Sensitivität gegenüber diesem Stressor keiner klaren Regel. Es ist sowohl eine Variante ohne detektierbare Hsp90 Restaktivität (E33A) betroffen als auch Varianten mit höherer (L18R) als auch niedriger ATPase Aktivität (T101I). Die Bestimmung der Affinität für das Substrat ATP zeigte für die L18R und T101I-Variante eine Verschlechterung der Affinität, jedoch lagen die Affinitäten immer noch im mikromolaren Bereich (**Tabelle 3-2**) und lassen keine Begründung zu, dass ATP schlechter gebunden wird und somit eine Radicicol Bindung bevorzugt sei. Hefen, die die Hsp90-Variante A10T oder R346S exprimieren, verhalten sich in Gegenwart von Radicicol wie Hefen mit Wildtyp Hsp90.

Allein Hefen, die die A107N Hsp90-Variante exprimieren, zeigen eine deutliche Radicicol Resistenz. Die Charakterisierung der Abweichungen in der Hsp90 Nukleotidbindetasche des Radicicol produzierenden Pilzes *H. fuscoatra* zeigten bereits, dass Punktmutationen in Hefe Hsp90 (L34I und I35V) zu einer Radicicolresistenz *in vivo* aufgrund einer verschlech-

terten Affinität für Radicicol führen (Prodromou *et al.*, 2009). Für die A107N-Mutationsvariante wurde bereits in humanem Hsp90 (A116N) eine Geldanamycin resistente Wirkung *in vivo* gezeigt, diese wurde allein durch die erhöhte ATPase Aktivität begründet (Zurawska *et al.*, 2010). Da im Falle der Hefe Hsp90 A107N-Variante die Affinität für ATP deutlich höher ist als für das Wildtypprotein (**Tabelle 3-2**), liegt der Grund für die Radicicol Resistenz in einer favorisierten ATP statt Radicicol Bindung.

### 3.2.3 Prozessierung von v-Src als ausgewählter Hsp90 client

Um den Einfluss des gestörten ATP-Hydrolysezyklus auf die *client*-Prozessierung zu untersuchen, wurde v-Src als Modell-*client* verwendet. In Hefezellen, die die unterschiedlichen Hsp90-Varianten als einzige Hsp90-Quelle enthielten, wurde ein Plasmid, das für v-Src codiert, eingebracht. Expression dieses Hsp90 clients kann durch Plattieren der Zellen auf Galactose-haltigem Selektionsmedium induziert werden. Wird dieser *client* durch die Hsp90-Variante prozessiert, wirkt die Aktivierung der v-Src Kinase durch Hyperphosphorylierung zytoplasmatischer Proteine toxisch für die Zellen (Mimnaugh *et al.*, 1995; Xu und Lindquist, 1993). Die Hsp90-Varianten L18R, E33A und T101I zeigen deutlich stärkeres Wachstum nach Induktion der v-Src Expression, was auf eine deutlich verschlechterte Prozessierung von v-Src verweist. Trotz ihres Temperatur-sensitiven Phänotyps ist auch bei der T22I-Variante nach 96 Stunden ein im Vergleich zum Wildtypprotein-haltigen Hefezellen deutlich vermehrtes Wachstum zu beobachten. Auch diese Hsp90-Variante resultiert in einer schlechteren Aktivierung der v-Src-Kinase.



**Abbildung 3-26: Einfluss der Hsp90-Varianten auf *client*-Prozessierung.** Von Hefekulturen, die die verschiedenen yHsp90-Varianten als einzige Hsp90-Quelle enthielten und ein durch Galactose induzierbares-Plasmid, das für die v-Src Kinase codiert, wurden Kulturen gleicher optischer Dichte hergestellt. Diese wurden mit jeweils fünf fünf-fach- Verdünnungen auf Glucose und Galactose-haltigem Selektionsmedium plattiert und ihr Wachstum bei 30 °C beobachtet.

### 3.3 Diskussion der Hsp90 Konformationsanalyse

Um die Relevanz der Intermediatzustände und deren Population während der ATP-induzierten Umstrukturierungen in Hsp90 zu untersuchen, wurden verschiedene Mutationen in den N- und M-Domänen von Hsp90 eingeführt. Sie wurden auf ihren Einfluss auf die Struktur und Funktion von Hsp90 hin untersucht. Insbesondere wurde die Anreicherung von geschlossenen Zuständen während der Konformationsänderungen mittels FRET-Studien analysiert. Anhand der Konformations-sensitiven Cochaperone Aha1 und Sba1/p23 wurden die populierte Zustände genauer charakterisiert. Für alle gewählten Varianten wurde auch im Hinblick auf ihren veränderten Konformationszyklus ihre *in vivo* Funktion bestimmt.

Alle gewählten Hsp90-Varianten zeigten Veränderungen der Hsp90 ATPase Aktivität. Es wurden sowohl stimulierende Mutationen ( $\Delta 8$ , A107N, A10T, T22I und L18R) untersucht als auch auf die ATPase Aktivität inhibierend wirkende Mutationen (T101I, R346S und R380A). Den Hsp90-Varianten D79N und E33A fehlt sogar jegliche *in vitro* detektierbare Hydrolyseaktivität. Der Grund hierfür wird für D79N klar in der fehlenden Nukleotidbindefähigkeit (Panaretou *et al.*, 1998) und für E33A in der essentiellen Rolle des Glu33 an der ATP-Hydrolyse gesehen (Obermann *et al.*, 1998). R380A und R346S befinden sich beide in der oberen M-Domäne angrenzend zur N-Domäne. Arg380 ist teil des katalytischen *loops* und eine Mutation zu Ala führt zu einer sehr starken Beeinträchtigung der ATPase Aktivität, die jedoch noch gering durch Aha1 stimuliert werden konnte. Dies spricht dafür, dass die Mutation zum einen durch eine gestörte Änderung der Konformation, die durch Aha1 kompensiert werden kann, beeinträchtigt ist, sowie durch eine weitere Komponente, die Aha1 nicht kompensieren kann. Dies können zum einen Konformationsänderungen sein, die durch Aha1 nicht induziert werden, aber auch eine Beeinträchtigung des finalen Hydrolyseschrittes an sich. R346S hingegen besitzt eine vergleichbare ATPase Aktivität wie R380A, diese kann jedoch sehr viel stärker (68-fach) durch Aha1 stimuliert werden, was vermuten lässt, dass insbesondere die durch Aha1 induzierbare Konformationsänderung beeinträchtigt ist.

Die Analyse der bei den Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen vermehrt eingenommenen Zustände mittels Fluoreszenzspektroskopie und FRET-Studien zeigte, dass einige Hsp90-Varianten, deren ATPase Aktivität beeinflusst war, eine stärkere Population von geschlossenen Zuständen auch in Gegenwart von ATP zeigen. Dies gilt für  $\Delta 8$ , T22I, und A107N, deren Hydrolyseaktivität beschleunigt ist, und ebenso für die Hsp90-Varianten

E33A und R380A, deren Hydrolyseaktivität negativ beeinträchtigt ist. Für die übrigen charakterisierten Hsp90-Varianten A107N, A10T, L18R und R346S, konnte keine starke Veränderung der Population der Konformationszustände in Gegenwart von ATP detektiert werden. Die Veränderungen in den Konformationsänderungen der Hsp90-Varianten konnte nicht anhand veränderter Ratenkonstanten der Konformationsänderungen anhand des Fünf-Zustands-Modell beschrieben werden. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die Konformationszyklen stärker durch die Mutation beeinträchtigt sind und Intermediate gar nicht populiert werden, bzw. ein weiteres Intermediat auftritt. Über die Analyse der N-terminalen Dimerisation der Hsp90-Varianten und die Bindung der Konformations-sensitiven Cochaperone konnte dennoch ein Eindruck über den Gleichgewichtszustand im Konformationszyklus der Varianten gewonnen werden.

Überraschender Weise konnte für die R346S-Variante in Gegenwart von ATP keine vermehrte Population von geschlossenen Zuständen gefunden werden. Dabei weist sie geringe Hydrolyseaktivität auf. Die Tatsache, dass Aha1 zu einer sehr guten Stimulation führt zeigt, dass hauptsächlich die Konformationsänderungen, die durch Aha1 induziert werden verlangsamt sind, nämlich die Bildung des I<sub>1</sub> (Hessling *et al.*, 2009) (**Abbildung 3-27**). Dies führt zu einer vermehrten Anreicherung des offenen und ATP-gebundenen Zustandes. Hier sind die N-terminalen Domänen noch nicht assoziiert, was sich in den FRET-Spektren zeigt sowie im schnellen Zerfall des FRET-Heterokomplexes. Auch die Konformations-sensitiven Cochaperone Aha1 und Sba1/p23 zeigten eine dem Wildtyp Hsp90 vergleichbare Bindung und unterstreichen die offene Konformation der R346S-Variante. Auch die SAXS Analysen konnten strukturell bestätigen, dass in Gegenwart von ATP die R346S-Variante vorwiegend in offenen Zuständen wie in Abwesenheit von Nukleotid vorliegt. Dass diese Variante in der Lage ist, den geschlossenen Zustand zu erreichen, wird in Gegenwart von ATP $\gamma$ S deutlich. Hier ist das Gleichgewicht in den geschlossenen Zustand verschoben. Die N-Termini sind assoziiert, was sich in einer großen Halbwertszeit in der Dissoziation des FRET-Heterokomplexes zeigt und in der Bindung des Konformations-sensitiven Cochaperons Sba1/p23. Dass dies nicht so effizient ist wie beim Wildtyp Protein, ergibt sich aus den SAXS Experimenten. R346S zeigt auch in Gegenwart von ATP $\gamma$ S noch eine etwas breitere Distribution an zwischenatomaren Abständen, was für eine weniger kompakte Struktur spricht.

Die R380A Hsp90-Variante weist eine der R346S vergleichbare Restaktivität an ATP Hydrolyse. Sie unterscheidet sich jedoch in der fehlenden Stimulierbarkeit durch Aha1, was

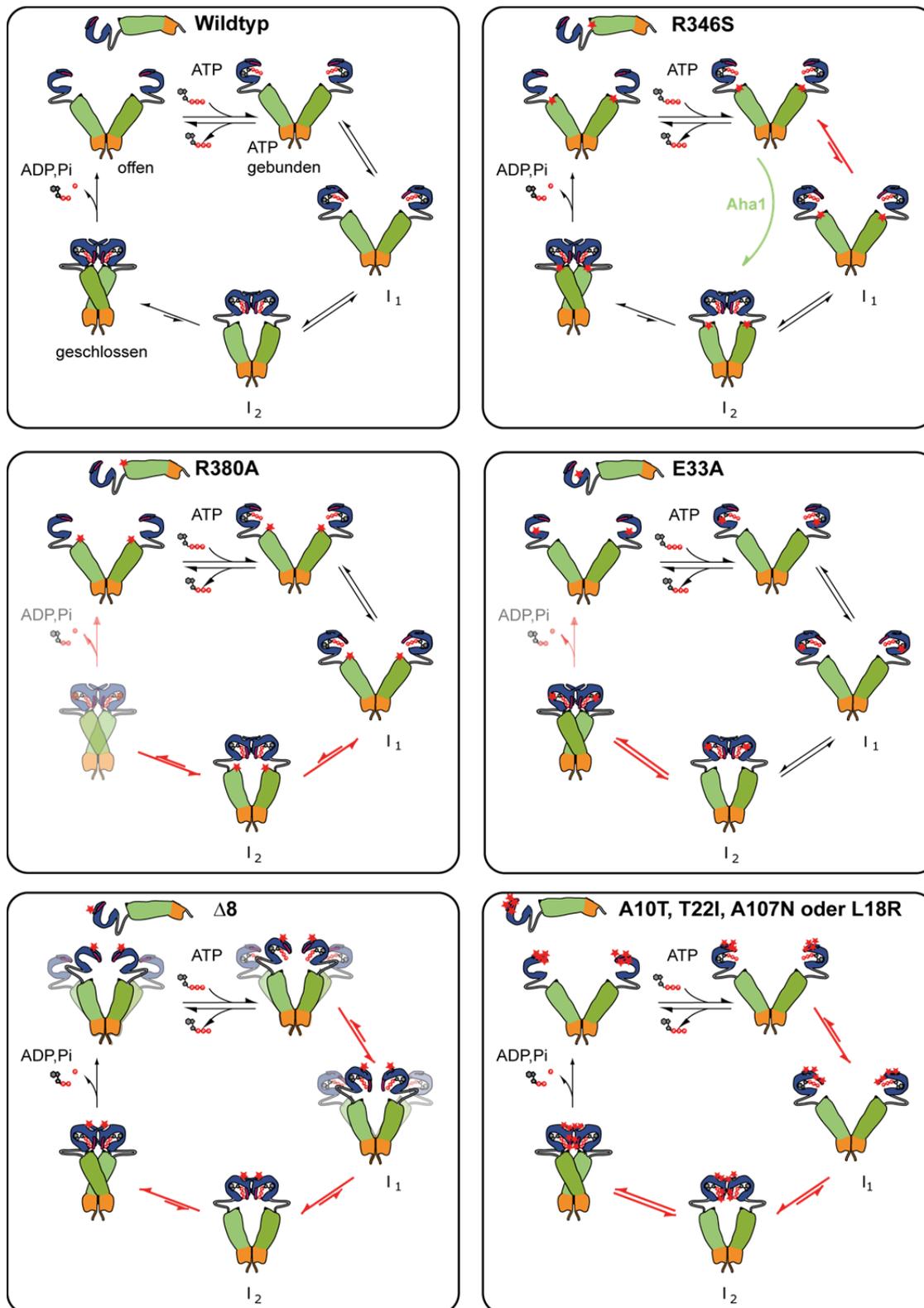
auf eine Beeinträchtigung anderer Konformationsänderungen oder auf Beteiligung des Restes an effizienter Hydrolyse hinweist. Ein weiterer Unterschied dieser beiden Varianten fand sich durch FRET-Analysen, da die R380A-Variante im Gegensatz zur R346S-Variante in Gegenwart von ATP geschlossene Zustände populiert. Diese sind auch N-terminal dimerisiert, was sich in deutlich verlangsamten Zerfall des FRET-Heterokomplexes zeigt. Jedoch unterscheidet sich der Konformationszustand vom finalen geschlossenen Zustand, da die R380A-Variante nicht Sba1/p23 binden kann, jedoch die Affinität für Aha1 deutlich erhöht ist. R380A ist also nicht in der Lage den geschlossenen Zustand einzunehmen und weder ATP $\gamma$ S noch AMP-PNP können Sba1/p23 Bindung herbeizuführen (**Abbildung 3-27**). Die strukturelle Analyse der Konformation der R380A-Variante mittels SAXS bestätigte die Ergebnisse der FRET-Studien. Der kompakte Zustand induziert durch ATP und ATP $\gamma$ S unterscheidet sich vom geschlossenen Zustand des Wildtyp Hsp90 in Gegenwart von ATP $\gamma$ S. Cunningham und Kollegen konnten in Gegenwart von AMP-PNP keine Veränderung des Apo-Zustandes hin zu einem kompakteren Zustand in SAXS Experimenten feststellen. Dies führte zur Annahme, dass Arg380 entscheidend an der Stabilisierung des geschlossenen Zustandes beteiligt ist und dies die Ursache für die verringerte ATPase Aktivität ist (Cunningham *et al.*, 2012). Die Experimente mit ATP und ATP $\gamma$ S zeigen jedoch, dass die R380A-Variante Konformationsänderungen eingehen kann, wenn auch nicht so effizient wie das Wildtyp Protein.

Der finale Schritt im Hsp90-Konformationszyklus, die Hydrolyse des ATP ist in der Hsp90-Variante E33A verhindert. Die Konsequenz hieraus ist die vermehrte Akkumulation des finalen geschlossenen Zustandes (**Abbildung 3-27**). Dies erklärt die in Gegenwart von ATP erhöhte FRET-Effizienz des Heterokomplexes. Ein weiterer Anhaltspunkt ist in der verlangsamten Dissoziation des Heterokomplexes in den Chase Experimenten zu sehen, die die starke N-terminale Assoziation verdeutlichen. Die verstärkte Bindung von Sba1/p23 in Ultrazentrifugationsexperimenten ist ein guter Indikator für den geschlossenen Zustand. ATP scheint die E33A-Variante jedoch nicht im geschlossenen Zustand zu arretieren, wie dies in Gegenwart von AMP-PNP und ATP $\gamma$ S für Wildtyp Hsp90 der Fall ist (Hessling *et al.*, 2009). Der FRET-Heterokomplex der E33A-Variante kann durch Zugabe von Überschuss an ungelabeltem Protein dissoziiert werden. Ob die Ursache hierfür nun in den unterschiedlichen Nukleotiden der Fall ist oder in verstärkten Rückwärtsraten den Konformationsänderungen verursacht durch die Mutation im Hsp90 bleibt hierbei ungeklärt. Strukturell zeigten SAXS-Experimente mit der E33A-Variante ebenfalls die verstärkte Anwesenheit von kom-

pakten Strukturen in Gegenwart von ATP, was einen enormen Unterschied im Vergleich zum Wildtypprotein darstellt.

Die  $\Delta 8$ -Variante mit ihrer beschleunigten ATP-Hydrolyse zeigte in SAXS Experimenten sogar in Abwesenheit von Nukleotid in Kontrast zu den übrigen Hsp90-Varianten eine kompaktere Struktur (**Abbildung 3-27**). Dass die N-terminale Domäne eine veränderte Struktur bei Deletion von N-terminalen Aminosäuren zeigt, wurde bereits durch Lösung der Kristallstruktur von  $\Delta 24$  N210 gezeigt (Richter *et al.*, 2006). Dass dies jedoch einen Einfluss auf die Konformation des Gesamtproteins in Abwesenheit des Nukleotids hat, war nicht zu erwarten. Die N-Termini sind in dieser kompakten Struktur jedoch nur schwach assoziiert, was sich in einem schnellen Zerfall des FRET-Heterokomplexes in Chase Experimenten zeigt. Die Anwesenheit von ATP führt zu weiteren strukturellen Änderungen, die in den FRET Studien zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zu geschlossenen Zuständen führen. Dies wird durch die Stabilisierung des FRET-Heterokomplexes in Chase Experimenten verdeutlicht, was auf eine verstärkte N-terminale Dimerisierung hinweist. Dies stimmt mit früheren Ergebnissen aus HPLC-SEC-Experimenten überein (Richter *et al.*, 2002). Die verstärkte Bindung des Sba1/p23 in Gegenwart von ATP ist ein weiterer wichtiger Anhaltspunkt für die vermehrte Population des geschlossenen Zustandes. Die insgesamt stärkere Ausprägung von geschlossenen Zuständen konnte auch in Gegenwart von ATP $\gamma$ S gefunden werden.

Die beiden Hsp90-Varianten T22I und A107N zeigten ebenfalls eine vermehrte Population des geschlossenen Zustandes in Gegenwart von ATP, jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die vorher diskutierten Varianten. Beide Varianten besitzen erhöhte ATP-Hydrolyseraten und beschleunigte ATP $\gamma$ S-induzierte Konformationsänderungen, die der Grund für die erhöhte Aktivität sind (**Abbildung 3-27**). Beide zeigen zudem eine stabilisierte N-terminale Dimerisation in FRET-Heterokomplexen in Gegenwart von ATP und leicht erhöhte Affinität für ATP, die auf vermehrte Population von geschlossenen Zuständen wie auch dem finalen geschlossenen Zustand hinweisen. In Gegenwart von ATP $\gamma$ S sind auch beide Varianten in der Lage den vollständig geschlossenen Zustand einzugehen, was durch Sba1/p23 Bindung detektiert werden konnte. Somit sind viele Schritte des konformationellen Zyklus betroffen. Aufgrund der Tatsache, dass die ATP $\gamma$ S induzierten Kinetiken in der globalen Analyse nicht mit den Hydrolyseraten der Nukleotide mit Hilfe des Fünf-Zustands-Modells vereinbart werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein zusätzliches Intermediat, das im Rahmen dieser Studie nicht detektiert werden konnte, populiert wird.



**Abbildung 3-27: Einfluss der Hsp90 Mutationen auf die Konformationsänderungen.** Die Position der Mutationen ist mit einem roten Stern markiert, beeinträchtigte Schritte mit roten Pfeilen versehen. In R346S ist vor allem der Schritt vor dem ersten Intermediat (I<sub>1</sub>) blockiert, weshalb diese Variante sehr gut durch Aha1 stimulierbar ist. In der R380A-Variante hingegen wird vor allem das zweite Intermediat (I<sub>2</sub>) akkumuliert und der geschlossene Zustand wird kaum eingenommen. E33A besitzt kaum detektierbare ATPase Aktivität und es wird vor allem der geschlossene Zustand akkumuliert. In Δ8 ist bereits der offenen Zustand kompakter und die Konformationsänderungen zum geschlossenen Zustand sind begünstigt. In den Varianten A10T, T22I, A107N und L18R sind geschlossenen Zustände akkumuliert, zusätzliche Intermediate können nicht ausgeschlossen werden.

Die L18R-Variante besitzt eine erhöhte ATPase Aktivität. In den FRET-Studien zeigte sie vergleichbar dem Wildtypprotein keine verstärkte Population an geschlossenen Zuständen und die apparente Ratenkonstanten der Konformationsänderungen in Gegenwart von ATP $\gamma$ S sind denen des Wildtypproteins vergleichbar. Dass die N-terminale Assoziation in Gegenwart von ATP $\gamma$ S jedoch geringer ist als im Wildtypprotein zeigte sich in der beschleunigten Dissoziation des FRET-Heterokomplexes in Chase Experimenten. Die geringe Population an geschlossenen Zuständen wurde auch durch die verringerte Affinität für Sba1/p23 in UZ Experimenten bestätigt. SAXS zeigte für diese Variante in Gegenwart von ATP $\gamma$ S ebenfalls einen geringeren kompakten Zustand als dies für das Wildtyp Protein der Fall ist. Dass L18R-Variante jedoch den geschlossenen Zustand durchlaufen kann, zeigt die Tatsache, dass sie eine größere ATPase Aktivität als das Wildtypprotein besitzt. Scheinbar ist der geschlossene Zustand destabilisiert, wird aber noch ausreichend eingenommen, um ATP Hydrolyse zu ermöglichen.

Die D79N-Variante diente in allen FRET-Experimenten als Kontrolle, da sie nicht in der Lage ist, Nukleotid zu binden (Panaretou *et al.*, 1998). Keines der verwendeten Nukleotide konnte aus diesem Grund Konformationsänderungen induzieren. Die verwendeten Cochaperone wiesen auch in Gegenwart von Nukleotiden ein identisches Bindungsmuster wie in deren Abwesenheit auf.

Die *in vivo* Analyse der Hsp90-Varianten zeigte, dass sich die veränderte Population der Zustände des Hsp90-Konformationszyklus auf die *in vivo* Funktion des Hsp90 auswirken, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Die stärkste Auswirkung zeigte sich in den Varianten, die nicht mehr in der Lage waren, einen Konformationszustand einzunehmen. Sowohl  $\Delta 8$ , das nicht in der Lage ist, den vollständig geöffneten Zustand einzunehmen, wie auch R380A, das nicht in der Lage ist, den geschlossenen Zustand einzunehmen, führen zu einem Verlust der Lebensfähigkeit der Hefen. Dabei scheint die tatsächliche Hydrolyse des ATP eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die E33A-Variante, die *in vitro* keine detektierbare Hydrolyseaktivität zeigte, die Lebensfähigkeit von Hefen unterstützt. Sie unterscheidet sich von den lethalen Varianten  $\Delta 8$ , R380A und D79N dadurch, dass sie in der Lage ist, alle notwendigen Konformationszustände einzunehmen. Die konformationelle Beeinträchtigung der R346S-Variante wird durch die Stimulierbarkeit durch Aha1 kompensiert. Dies zeigt sich *in vivo* in der Lebensfähigkeit der Hefen, die diese Variante exprimieren, sowie in der Tatsache, dass selbst unter Stressbedingungen kein Phänotyp detektiert werden konnte.

Die übrigen Varianten (L18R, T22I, E33A, T101I und A107N), die prinzipiell in der Lage sind alle Konformationszustände einzunehmen, aber Gegenwart von ATP eine veränderte Gleichgewichtspopulation im Vergleich zum Wildtypprotein besitzen, zeigen alle einen Temperatur-sensitiven Phänotyp. Keine dieser Varianten war in der Lage, bei einer Temperatur von 37 °C zu wachsen, was Hefen mit Wildtyp Hsp90 hingegen können. Zudem reagieren diese Varianten sensitiver auf Stressoren, bei denen Hsp90 an der Stressantwort beteiligt ist. Dies ist ein Hinweis, dass die Hsp90-Maschinerie in ihrer Effizienz gestört ist. Dabei ist dies unabhängig von der Tatsache, wieviel ATP hydrolysiert wird, da sowohl Varianten mit erhöhter ATPase Aktivität (L18R, T22I und A107N) von diesem Phänotyp betroffen sind als auch Varianten mit verringerter Hydrolyseaktivität (T101I) und Varianten mit nicht detektierbarer ATPase Aktivität (E33A). Ein weiterer Anhaltspunkt für die Störung der Effizienz der Hsp90 Maschinerie zeigte sich in der verschlechterten Prozessierung des *clients* v-Src. Alle Varianten mit gestörten Populationen zeigen verschlechterte *client*-Prozessierung. Die veränderte Population an Zuständen kann zur Folge haben, dass sowohl die zur *client*-Übertragung notwendigen offenen Zustände von Hsp90 oder die zur Prozessierung des *clients* notwendigen geschlossenen Zuständen nicht in ausreichendem Maß eingenommen werden können. Beides spiegelt sich in der verschlechterten Prozessierung des *clients* wider. Auch hierbei ist die ATP-Hydrolyserate nicht von übergeordneter Rolle, da wiederum sowohl Varianten mit erhöhter ATPase Aktivität (L18R, T22I und A107N) von diesem Phänotyp betroffen sind, als auch Varianten mit verringerter Hydrolyseaktivität (T101I) und eine Variante mit nicht detektierbarer ATPase Aktivität (E33A).

Die Analyse der Hsp90-Varianten mit abweichender ATPase Aktivität zeigte, dass Intermediate des Konformationszyklus sowohl in Varianten mit beschleunigter als auch inhibierter ATPase Aktivität angehäuft werden können. Für die essentielle Chaperonfunktion von Hsp90 ist vor allem die Fähigkeit, alle Zustände des Konformationszyklus in einem ausreichendem Maß einnehmen zu können, von entscheidender Rolle. Wieviel ATP hierbei umgesetzt wird schein nicht relevant zu sein.

### 3.4 Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen

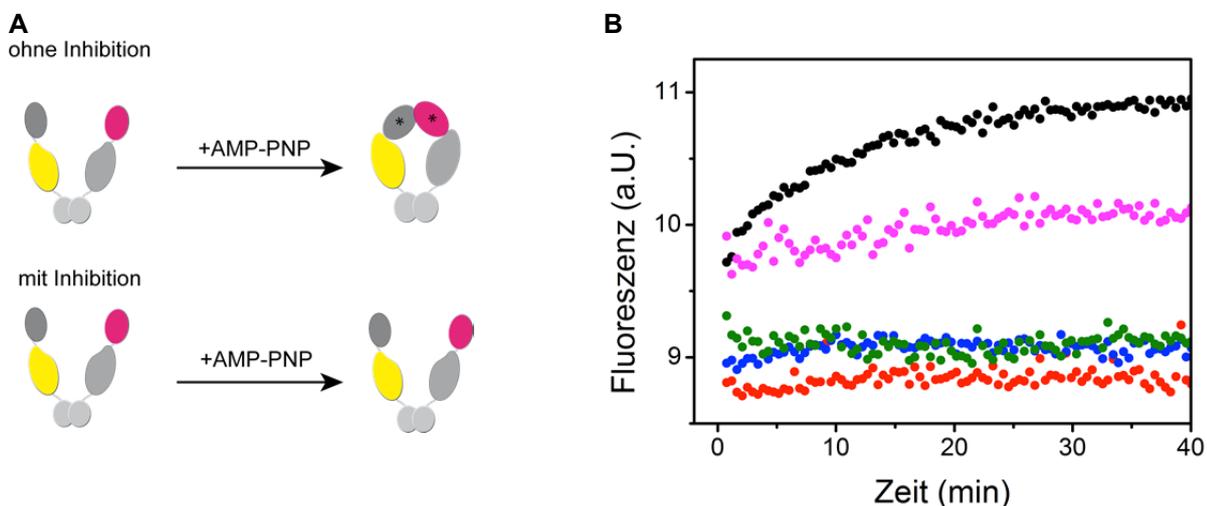
#### 3.4.1 FRET-basierter *Screen* nach niedermolekularen Modulatoren von yHsp90

Hsp90 ist wichtiger Angriffspunkt in der Tumorbekämpfung, da dessen Inhibition zur Degradation von *client*-Proteinen, die Schlüsselrollen in der Krebszelle spielen, durch das Proteasom führt (Neckers, 2002). Die Suche nach neuen Inhibitoren für Hsp90 wurde durch die Lösung der Kristallstruktur von Hsp90 erleichtert, da dies das rationale Design von Inhibitoren ermöglichte (Chiosis *et al.*, 2001). Initiale chemische Leitstrukturen für Hsp90 Inhibitoren wurden in den letzten Jahren durch Hochdurchsatz-, Fragment-basierte oder virtuelle *Screens* identifiziert (Biamonte *et al.*, 2010; Janin, 2010).

Auf Basis des von Martin Hessling entwickelten FRET-Systems für yHsp90 können die Konformationsänderungen, die mit der ATP Hydrolyse verbunden, sind sichtbar gemacht werden (Hessling *et al.*, 2009). Auf Basis dieses Assay sollte ein Fluoreszenz-basierter *Screen* etabliert werden, um Substanzbibliotheken nach Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen zu suchen. Das Funktionsprinzip des *Screens* ist schematisch in **Abbildung 3-28A** dargestellt. ATP induziert in yHsp90 keine sichtbaren Konformationsänderungen, da das konformationelle Gleichgewicht in Gegenwart von ATP im offenen Zustand bleibt (Hessling *et al.*, 2009; Mickler *et al.*, 2009), weshalb zur Induktion der Konformationsänderungen das nicht hydrolysierbare Analogon AMP-PNP verwendet wurde. Bindet dies an einen FRET-Heterokomplex aus Q385C Atto488 markiertem und D61C Atto550 markiertem yHsp90 verringert sich durch die Konformationsänderungen im Hsp90 Dimer der Abstand der an den Monomeren angebrachten Fluoreszenzfarbstoffe. Dies kann durch FRET sichtbar gemacht werden, indem das Donorfluorophor angeregt wird, strahlungsloser Energietransfer auf das Akzeptorfluorophor stattfindet und die steigende Akzeptorfluoreszenz gemessen wird. Werden die Konformationsänderungen durch kleine Moleküle inhibiert, wie dies für kompetitive Inhibitoren der Nukleotidbindestelle (z.B. für Radicol) der Fall ist, erfolgt keine Konformationsänderung und somit auch keine Änderung der Akzeptorfluoreszenz (Hessling *et al.*, 2009).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gunter Fischer der Max Plank Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle/Saale wurde der Fluoreszenz-basierte Assay optimiert, um möglichst effizient (geringer Protein- und Nukleotidverbrauch) die dort vorhandene Substanzbibliothek an 10 000 verschiedenen Substanzen nach Hsp90 Modulatoren zu durchsuchen. Dabei wurden im 96-Well Format je 150 nM FRET-Komplex

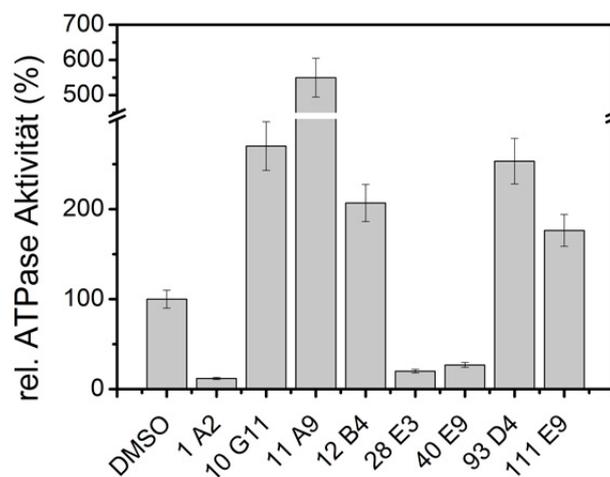
mit den in DMSO vorgelösten Substanzen versetzt (Endkonzentration 50 µg/ml) und die Fluoreszenzkinetiken mit 1 mM AMP-PNP gestartet. Dabei wurde die Fluoreszenzänderung in einem *EnVision Xcite* Multilabel Plate Reader im 96-Well Format über 20 Minuten beobachtet (2.2.17). Als Positivkontrolle diente der bekannte Hsp90 Inhibitor Radicicol und als Negativkontrolle DMSO alleine, da darin gelöst die Substanzen vorlagen. In **Abbildung 3-28B** sind exemplarisch Messdaten von drei potentiellen Hits, sowie von Radicicol und DMSO gezeigt. Ist lediglich DMSO im Screening Ansatz vorhanden, so induziert AMP-PNP Konformationsänderungen und es ist ein Anstieg der Akzeptorfluoreszenz zu beobachten. Durch die Positivkontrolle Radicicol werden die Konformationsänderungen und somit der Anstieg an Akzeptorfluoreszenz unterdrückt. Anhand des qualitativen Vergleichs der Akzeptorfluoreszenzänderungen wurden Substanzen, die wie Radicicol zu einer deutlichen Inhibition führen, oder Substanzen, die die Konformationsänderungen deutlich beschleunigen, als potentielle Hits für weitere Charakterisierung eingestuft. Substanzen, die eine wesentlich geringere Fluoreszenzintensität verursachten, wurden als unbrauchbar eingestuft, da sie mit den Fluoreszenzlabeln eine Reaktion eingehen, oder das Fluoreszenzsignal quentschen.



**Abbildung 3-28: Screening Assay für Modulatoren der yHsp90 Konformationsänderungen.** (A) Funktionsprinzip des Screens: Schematische Darstellung eines FRET-Heterokomplexes aus Q385C Atto488 (gelbe Domäne) und D61C Atto550 (magenta Domäne) markiertem yHsp90. Nach Zugabe von AMP-PNP finden Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen im Hsp90 statt und die Domänen samt Fluoreszenzfarbstoff verringern ihre Distanz. Wird der Donorfarbstoff angeregt, so kann während der Konformationsänderungen durch FRET eine Erhöhung der Akzeptorfluoreszenz detektiert werden. Im Falle einer Inhibition der Konformationsänderungen findet keine Annäherung der Fluorophore statt und das Akzeptorfluoreszenzsignal bleibt konstant. (B) Exemplarische Messdaten des Screens für (schwarz) Negativkontrolle DMSO, (rot) Radicicol als Positivkontrolle sowie drei exemplarische Messkurven verschiedener potentieller Hits (magenta, blau, grün).

Auf diese Weise wurden 84 Substanzen als potentielle Modulatoren eingestuft. Wenn sich die Substanzen inhibierend oder aktivierend auf Hsp90 Konformationsänderungen

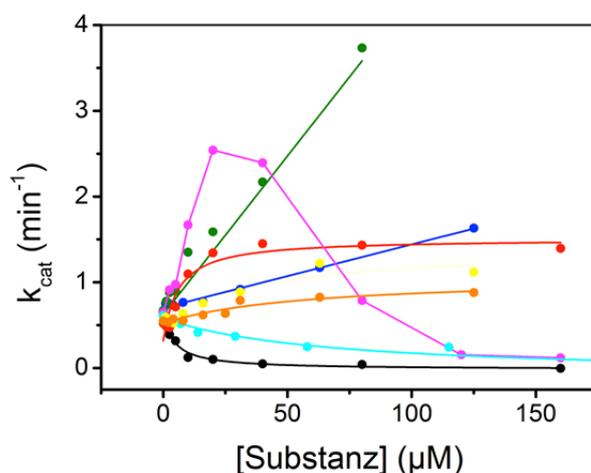
auswirken, sollten die Substanzen auch die ATPase Aktivität beeinflussen, da die Konformationsänderungen ratenlimitierend sind (Hessling *et al.*, 2009; Weikl *et al.*, 2000). So wurden die potentiellen Hits als nächstes auf ihren Einfluss auf die Hsp90 ATPase Aktivität in einem regenerativen Enzym Assay getestet (2.2.12). Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass die Modulatoren das regenerative Enzymsystem nicht beeinflussen. In Abwesenheit von ATPase fand in Gegenwart der Substanzen kein Umsatz von ATP bzw NADH statt (Daten nicht gezeigt.). Des Weiteren war das Enzymsystem auch in Gegenwart der Modulatoren in der Lage ADP zu ATP umzusetzen, was zu einer durch Absorptionsmessung detektierbaren Abnahme der NADH-Menge führte (Daten nicht gezeigt.). Als Kontrolle diente wiederum DMSO. Auf die Aktivität in Gegenwart von DMSO wurden alle Messungen der potentiellen Hits normiert. Die meisten der aus dem Fluoreszenz basierten *Screen* als potentielle Hits eingestuft Substanzen zeigten keinen Einfluss auf die Hsp90 ATPase Aktivität (Daten nicht gezeigt). Lediglich acht Substanzen beeinflussten die ATPase Aktivität von  $\gamma$ Hsp90 (**Abbildung 3-29**). Dabei zeigte sich, dass fünf Substanzen die ATPase Aktivität zwei bis fünffach stimulieren und drei Substanzen die ATPase Aktivität nahezu vollständig inhibieren.



**Abbildung 3-29: Effekt der potentiellen Modulatoren auf die Hsp90 ATPase Aktivität.** Die relative ATPase Aktivität von  $\gamma$ Hsp90 in Gegenwart von 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $\sim 125 \mu\text{M}$ ) der potentiellen Modulatoren. Die ATPase Aktivität wurde relativ zur DMSO Kontrolle bestimmt. Die Messungen wurden mit Hilfe des regenerativen ATPase Assay mit 2 mM ATP in 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt (2.2.12).

Die durch den regenerativen ATPase Assay als Hits bestätigten Substanzen wurden nun genauer auf ihre Bindungsaffinität bezüglich Hsp90 untersucht. Hierzu wurde die apparente Affinität der Substanzen mit Hilfe des regenerativen ATPase Assays nach 2.2.12.2 bestimmt.

Die Umsatzraten an ATP ( $k_{\text{cat}}$ ) in Abhängigkeit der Substanzkonzentration sind graphisch in **Abbildung 3-30** gezeigt. Aus den Daten konnten für die Substanzen 1 A2, 12 B4, 40 E9 93 D4 und 111 E9 mittels nicht-linearer Regression apparente Affinitäten der Modulatoren abgeschätzt werden. Da für 10 G4 und 11 A9 kein Plateau erreicht werden konnte, wurde die apparente Affinität größer als die Halbmaximale getestete Konzentration abgeschätzt. Für 28 E3 wurde die apparente Affinität aus als die Konzentration angegeben, die die Halbmaximale Stimulation verursacht. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3-8** zusammengefasst.



**Abbildung 3-30: Apparente Affinitäten der Hsp90 Modulatoren.** Gezeigt sind die Umsatzraten an ATP ( $k_{\text{cat}}$ ) von yHsp90 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von (schwarz) 1 A2, (blau) 10 G11, (grün) 11 A9, (rot) 12 B4, (magenta) 28 E3, (cyan) 40 E9, (gelb) 93 D4 und (orange) 111 E9. Alle Messungen wurden mit Hilfe eines regenerativen ATPase Assays bei 30 °C und 2 mM ATP durchgeführt. Dabei wurde ein Messpuffer aus 40 mM HEPES/KOH pH 7,5, 150 mM KCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. Apparente Affinitäten wurden für 1 A2, 12 B4, 40 E9 93 D4 und 111 E9 durch nicht-lineare Regression nach 2.2.12.2 bestimmt und die Ergebnisse sind in **Tabelle 3-8** zusammengefasst.

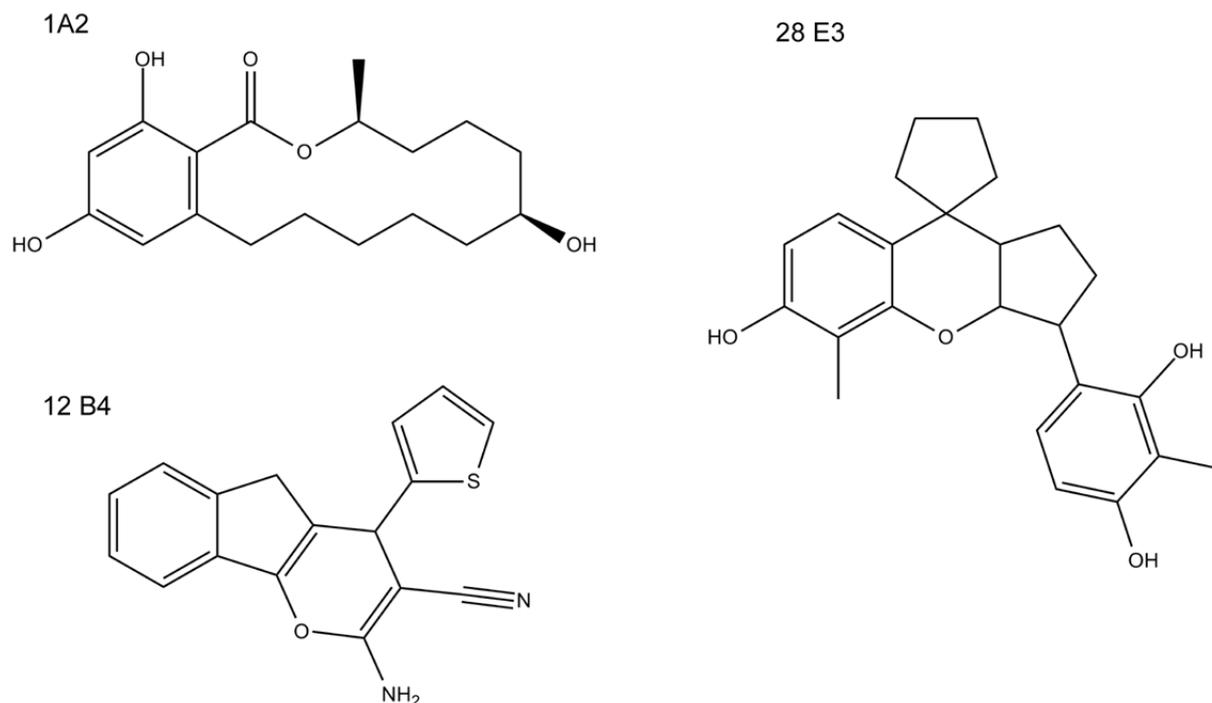
**Tabelle 3-8: Eigenschaften der Hsp90 Modulatoren.**

Substanz	$K_{\text{Dapp}}$ ( $\mu\text{M}$ )	rel. Aktivität (%)
1 % DMSO	-	100
1 A2	$4 \pm 0,8$	0
10 G4	$> 50$	246
11 A9	$> 40$	500
12 B4	$6 \pm 1,5$	280
28 E3	$\sim 10$	17
40 E9	$66 \pm 4$	8
93 D4	$38 \pm 2$	203
111 E9	$58 \pm 4$	158

Tabellarische Zusammenfassung der Abschätzung der apparenten Affinität ( $K_{\text{Dapp}}$ ) der Hsp90 Modulatoren mit Hilfe des regenerativen ATPase Assay. Die relative Aktivität bezieht sich auf die ATPase Aktivität des yHsp90 in Gegenwart der Modulatoren relativ zur Aktivität des yHsp90 in Gegenwart von 1 % DMSO.

Die beiden Substanzen 10 G4 und 11 A9 stimulieren die ATPase Aktivität mit einer relativen Aktivität von 246 % und 500 % sehr gut, jedoch konnte keine Sättigung der Beschleunigung erreicht werden. Deshalb wurden die apparenten Affinitäten mit Werten von  $> 50$  und  $> 40 \mu\text{M}$  abgeschätzt. Die Substanz 28 E3 zeigt einen äußerst ungewöhnlichen Effekt auf die Hsp90 ATPase Aktivität. In geringen Konzentrationen (bis  $25 \mu\text{M}$ ) stimuliert sie die ATPase Aktivität, bei größeren Konzentrationen findet jedoch eine Inhibition statt. Ihre Affinität für Hsp90 konnte ebenfalls nur abgeschätzt werden (mit etwa  $10 \mu\text{M}$ ). Der Aktivator, der die beste Affinität für Hsp90 zeigte, ist 12 B4. Er stimuliert die ATPase Aktivität 2,8fach und bindet Hsp90 mit einer apparenten Affinität von  $6 \mu\text{M}$ . Die Inhibitoren 1 A2 und 40 E9 zeigen apparente Affinitäten von  $4$  und  $66 \mu\text{M}$  für Hsp90. 1 A2 ist hierbei mit einer vollständigen Inhibition der potentere Inhibitor im Vergleich zu 40 E9. Die beiden weiteren Aktivatoren 93 D4 und 11 E9 zeigten mit apparenten Affinitäten von  $38 \mu\text{M}$  und  $58 \mu\text{M}$  ebenfalls nur eine geringe Affinität für Hsp90. Für eine weitere Charakterisierung des Wirkungsmechanismus wurden nur Modulatoren berücksichtigt, die eine sehr gute Affinität im regenerativen ATPase Assay zeigten. Dazu gehören der Inhibitor 1 A2, der Aktivator 12 B4 sowie die Substanz 28 E3, die sowohl aktivierend als auch inhibierend wirkt.

**Abbildung 3-31** zeigt die chemischen Strukturformeln der für die nähere Charakterisierung ihres Wirkungsmechanismus gewählten Substanzen. Bei 1 A2 handelt es sich um ein Derivat des bekannten Hsp90 Inhibitors Radicol. Der Aktivator 12 B4 und die Substanz 28 E3 gehören keiner Substanzklasse an, die bereits als Modulatoren der Hsp90 ATPase Aktivität beschrieben sind.



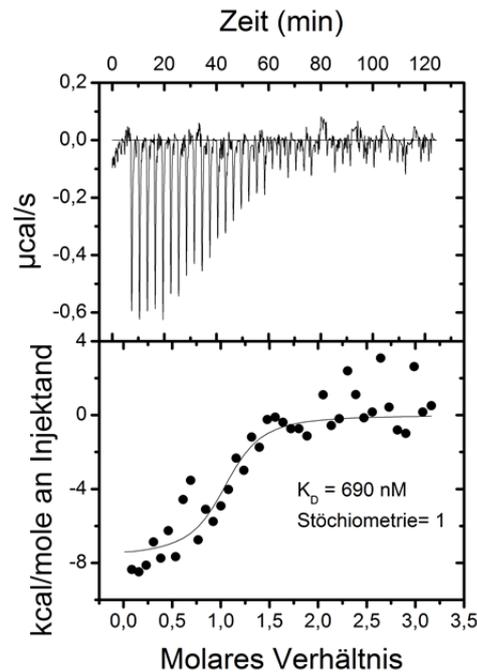
**Abbildung 3-31: Strukturen der Hsp90 gefundenen Modulatoren.** Die chemischen Strukturformeln der Modulatoren 1 A2, 12 B4 und 28 E3 der Hsp90 Konformationsänderungen, die für nähere Charakterisierung des Wirkungsmechanismus gewählt wurden. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm ChemDraw Ultra 12.0 gezeichnet.

### 3.4.2 Charakterisierung der Hsp90 Modulatoren

#### 3.4.2.1 1 A2 bindet in die Nukleotidbindetasche

Die Struktur von 1 A2 zeigt, dass es sich um ein Derivat von Radicol handelt. Radicol bindet an die N-terminale Nukleotidbindetasche von Hsp90 und kompetitiert mit ATP um die Bindestelle (Roe *et al.*, 1999). Es liegt somit die Vermutung nahe, dass 1 A2 nach demselben Mechanismus als Hsp90 Inhibitor wirkt, da für diverse Zearalenone-Derivate gezeigt wurde, dass sie an Hsp90 binden (Ugele *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde die Bindung von 1 A2 an die N-Domäne von  $\gamma$ Hsp90 mit isothermischer Titrationskalorimetrie gemessen. Dabei wurde 1 A2 als Ligand aus der Spritze in die Messkammer mit  $\gamma$ Hsp90 N-Domäne bis zur Sättigung titriert (**Abbildung 3-32**). 1 A2 bindet mit einer Dissoziationskonstante von 690 nM an die N-Domäne von Hsp90. Es wurde dabei eine Stöchiometrie von 1 vorgefunden, was bestätigt, dass ein Molekül Ligand an ein Molekül  $\gamma$ Hsp90 N-Domäne bindet. Die durch diese direkte Methode der Interaktionsmessung bestimmte Dissoziationskonstante ist deutlich geringer als die aus dem regenerativen ATPase Assay abgeschätzte Affinität. Dies liegt daran, dass im regenerativen Assay 1 A2 mit ATP um die Bindestelle an der N-Domäne konkurriert, was zu einer Ungenauigkeit in der Bestimmung führt. Das

Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass 1 A2 als kompetitiver Inhibitor an die N-Domäne von Hsp90 bindet.

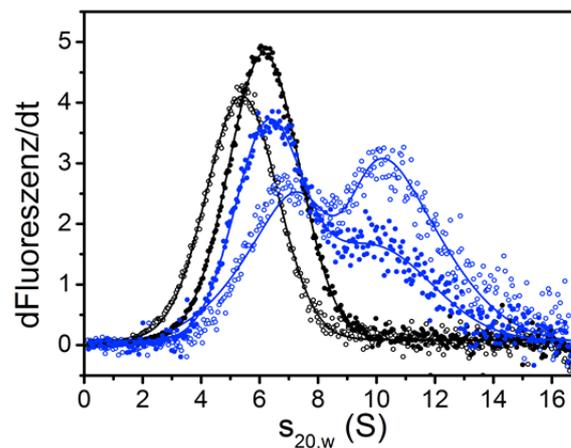


**Abbildung 3-32: Bindung von 1 A2 an die N-Domäne von yHsp90.** Die Bindung des Modulators 1 A2 an die N-Domäne von yHsp90 wurde mit ITC bestimmt. Hierzu wurde 1 A2 als Ligand ( $300 \mu\text{M}$ ) aus der Spritze in die Messkammer mit  $20 \mu\text{M}$  yHsp90 N210 bis zur Sättigung titriert. Die Messung wurde in  $40 \text{ mM}$  Hepes/KOH pH 7,5,  $150 \text{ mM}$  KCl,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  und  $1 \%$  DMSO bei einer Temperatur von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt.

### 3.4.2.2 28 E3 inhibiert durch Bildung löslicher Oligomere

Der inhibierende Effekt von 28 E3 bei Konzentrationen größer  $25 \mu\text{M}$  kann mehrere Ursachen haben. Zum einen wäre eine kompetitive Inhibition vergleichbar wie bei Radicol und Geldanamycin denkbar. Die aktivierende Wirkung in geringen Konzentrationen widerspricht jedoch dieser Annahme, da die ATP-Bindung nicht behindert wird. 28 E3 könnte auch zu einer Dissoziation des Hsp90 Dimers führen. Die Bildung eines Dimers ist eine essentielle Voraussetzung für eine effiziente Hydrolyse (Weigl *et al.*, 2000). Ob 28 E3 zu einer Dissoziation des Hsp90 Dimers führt, wurde mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugation mit Fluoreszenzdetektion untersucht. Dazu wurde Q385C Atto 488 markiertes yHsp90 in An- und Abwesenheit des Modulators analytischer Ultrazentrifugation unterzogen. Die daraus resultierenden  $d\text{Fluoreszenz}/dt$  Plots sind in **Abbildung 3-33** gezeigt.

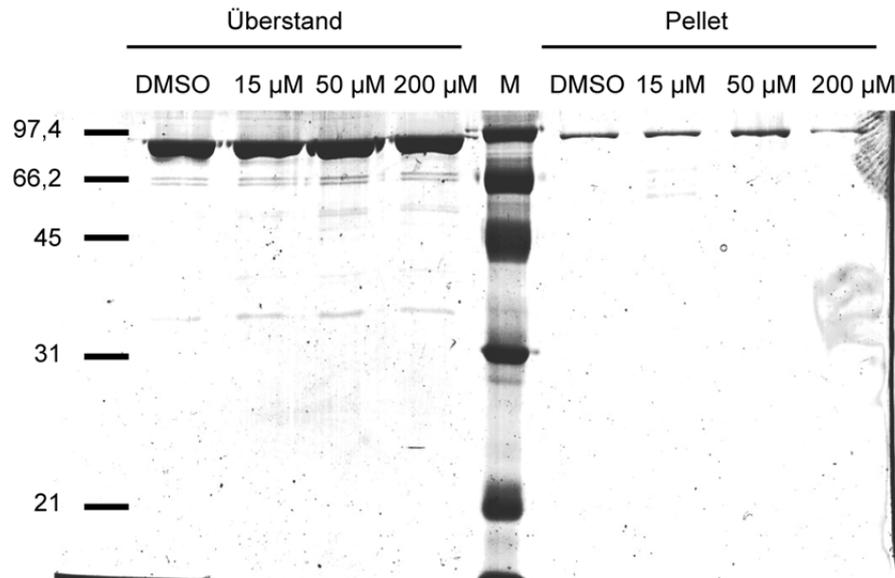
In Abwesenheit des Modulators entspricht der Peak bei 5,4 S einem offenem Hsp90 Dimer. Nach Nukleotidbindung nimmt es einen kompakteren Zustand ein und das Dimer zeigt einen Peak bei 6 S. In Gegenwart des Modulators 28E3 in hohen Konzentrationen entsteht ein neuer Peak im dFluoreszenz/dt-Plot, der mit einem Sedimentationskoeffizienten von 10 S einem Hsp90 Tetramer entspricht. In Abwesenheit des Nukleotids ist die Bildung dieses tetrameren Hsp90 noch stärker ausgeprägt als in dessen Anwesenheit. Hsp90 wird durch die hohen Konzentrationen an 28 E3, die zur Inhibition der ATPase Funktion führen, nicht in Monomere dissoziiert, sondern es wird ein tetramerer Zustand ausgebildet. Da in dem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf eine klare tetramere Spezies detektiert wird, spricht dies gegen eine unspezifische Aggregation und Präzipitation von Hsp90.



**Abbildung 3-33: Oligomerisationszustand von Hsp90 in Gegenwart von 28 E3.** Sedimentationsgeschwindigkeitslauf von 500 nM Q385C Atto 488 markiertem  $\gamma$ Hsp90 in (schwarz) Abwesenheit und (blau) Gegenwart von 160  $\mu$ M 28 E3. Die Experimente wurden sowohl in (offene Kreise) Abwesenheit von Nukleotid und in (gefüllte Kreise) Gegenwart von 2 mM AMP-PNP durchgeführt.

Um zu zeigen, dass es sich bei der tetrameren Hsp90 Spezies um eine lösliche Variante handelt, wurde Hsp90 mit unterschiedlichen Konzentrationen an 28 E3 inkubiert und anschließend die lösliche und unlösliche Fraktion durch Zentrifugation geteilt und anschließend mit einem 12,5 %igem SDS-Gel untersucht. Das erhaltene Gel ist in **Abbildung 3-34** abgebildet. Im Überstand aller Proben ist eine vergleichbare Menge an Hsp90 zu erkennen. In der Pelletfraktion ist eine geringe Menge Hsp90 zu detektieren, da die Pelletfraktion nicht gewaschen wurde und Proteine gerne geringfügig von Gefäßwänden adsorbiert werden. Die Menge an Hsp90 bleibt auch bei steigenden Konzentrationen an 28 E3 konstant bis hin zu einer maximalen Menge von 200  $\mu$ M. Würde eine Inhibition der ATPase Aktivität durch Präzipitation verursacht, müsste hier nahezu die gesamte Hsp90 Menge in der Pelletfraktion

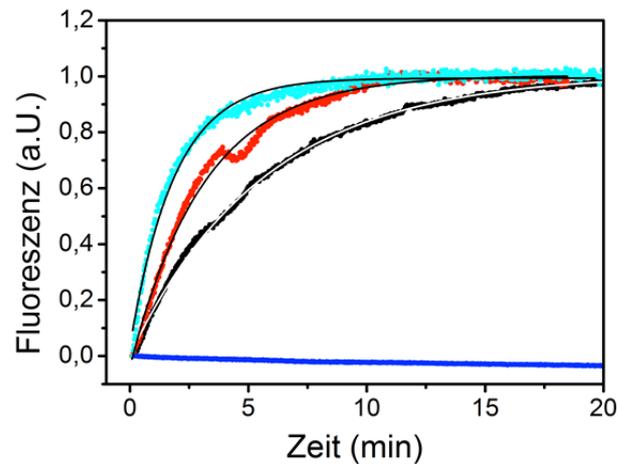
vorhanden sein. Dies ist nicht der Fall und somit bilden die durch 28 E3 induzierten Hsp90 Tetramere eine lösliche Spezies.



**Abbildung 3-34: Löslichkeit der 28 E3 induzierten Oligomere.** Je 4 µg yHsp90 Wildtyp wurde in Gegenwart von 15, 50 und 200 µM 28 E3 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die lösliche und unlösliche Fraktion durch Zentrifugation (10 min, 14 000 rpm) getrennt und auf ein 12,5 % SDS Gel aufgetragen. Als Proteinstandard (M) diente der *low molecular weight* Standard von BioRad. Links sind die Größen des Proteinstandards in kDa angegeben.

### 3.4.2.3 Einfluss der Modulatoren auf die Konformation von yHsp90

Die Substanzen 12 B4 und 28 E3 können die Hsp90 ATPase Aktivität stimulieren. Beide Substanzen sind nicht in der Lage, in den FRET-Heterokomplexen sichtbare Konformationsänderungen vergleichbar zu den mit nicht hydrolysierbaren ATP Analoga beobachteten zu induzieren und das Gleichgewicht zu geschlossenen Zuständen hin zu verschieben (Daten nicht gezeigt). Um genauer zu untersuchen, wie die beiden Modulatoren die Konformationsänderungen beschleunigen wurden die AMP-PMP induzierten Konformationsänderungen fluorenszenzspektroskopisch kinetisch genauer betrachtet. Dazu wurden FRET-Heterokomplexe mit den Hsp90 Modulatoren vorinkubiert und anschließend die Konformationsänderung durch Zugabe von AMP-PNP gestartet. Die dabei stattfindenden Konformationsänderungen wurden anhand der Änderung der Akzeptorfluoreszenz nach Anregung der Donorfluoreszenz beobachtet (2.2.13.2). Die daraus erhaltenen Kinetiken sind in **Abbildung 3-35** gezeigt.



**Abbildung 3-35: Einfluss der Modulatoren auf AMP-PNP induzierte Konformationsänderungen.** Es wurden AMP-PNP induzierte Fluoreszenzkinetiken eines FRET-Heterokomplexes aus 400 nM Q385C Atto 488 und D61C Atto550 markierter yHsp90-Variante gemessen, die jeweils mit (rot) 100  $\mu\text{M}$  12 B4, (cyan) 13  $\mu\text{M}$  28 E3 und (blau) 100  $\mu\text{M}$  28 E3 vorinkubiert wurden. Als Referenz diente DMSO. Die Kinetiken wurden durch Zugabe von 2 mM AMP-PNP gestartet und bei einer Temperatur von 15  $^{\circ}\text{C}$  aufgenommen. Die Kinetiken wurden durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion gefittet (2.2.13.2) und die daraus erhaltenen apparenten Ratenkonstanten in **Tabelle 3-9** zusammengefasst.

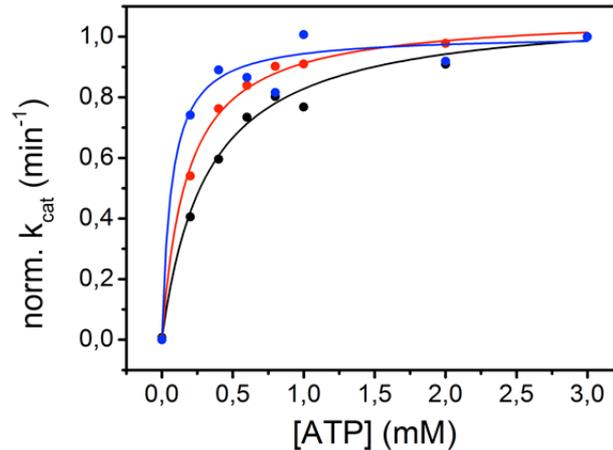
In Gegenwart des Aktivators 12 B4 beträgt die Ratenkonstante der Konformationsänderungen  $0,33 \text{ min}^{-1}$ . Dies ist etwa um Faktor 2 schneller als in Abwesenheit des Modulators ( $0,18 \text{ min}^{-1}$ ). Somit ist die Beschleunigung der Konformationsänderung in derselben Größenordnung wie die Beschleunigung der ATPase Aktivität (3.4.1). Der Modulator 28 E3 führt in stimulierender Konzentration zu einer etwa 3fachen Beschleunigung. In hoher Konzentration kann keine Änderung der Fluoreszenz beobachtet werden und bestätigt die inhibierende Wirkung.

**Tabelle 3-9: Apparente Ratenkonstanten der Konformationsänderungen in Anwesenheit der Modulatoren.**

Substanz	$k_{\text{app}}(\text{min}^{-1})$
1 % DMSO	0,18
100 $\mu\text{M}$ 12 B4	0,33
13 $\mu\text{M}$ 28 E3	0,56

Apparente Ratenkonstante  $k_{\text{app}}$  der AMP-PNP induzierten Konformationsänderung in Gegenwart der Modulatoren erhalten durch Anpassen einer monoexponentiellen Funktion.

Ob die Anwesenheit der Modulatoren die apparente Affinität von Hsp90 zum Substrat ATP beeinflusst, wurde mit Hilfe variierender Konzentrationen an Substrat im ATPase Assay getestet. Dazu wurde die Umsatzrate an ATP von Hsp90 in Gegenwart von 12 B4 und 28 E3 unter variierenden Substratkonzentrationen gemessen. Die Resultate sind in **Abbildung 3-36** gezeigt.



**Abbildung 3-36: Apparente Affinität für ATP von Hsp90 in Gegenwart der Modulatoren.** Gemessen wurde die Umsatzrate an ATP von  $\gamma$ Hsp90 in Gegenwart von (schwarz) DMSO sowie jeweils 25  $\mu$ M (rot) 12 B4 und (blau) 28E3 unter variierten ATP-Konzentrationen. Die Messungen mittels eines regenerativen ATPase Assay bei einer Temperatur von 30 °C gemessen. Durch nicht-lineare Regression nach 2.2.12.2 wurde die apparente Affinität für ATP bestimmt. Sie sind in **Tabelle 3-10** zusammengefasst.

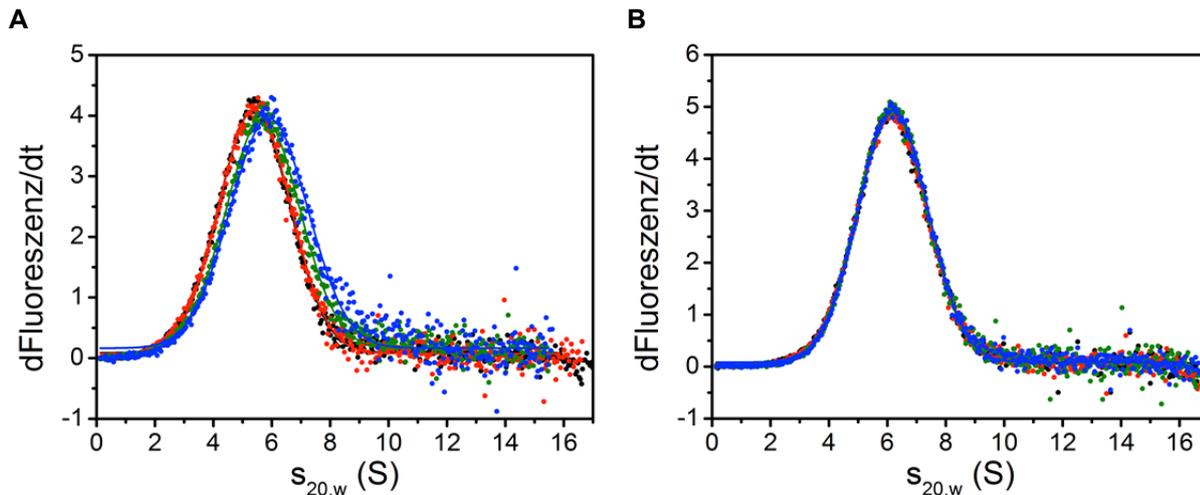
**Tabelle 3-10: Affinitäten für ATP von Hsp90 in Anwesenheit der Modulatoren.**

Substanz	$K_{Dapp}$ (mM)
1 % DMSO	$0,32 \pm 0,05$
25 $\mu$ M 12 B4	$0,18 \pm 0,02$
25 $\mu$ M 28 E3	$0,07 \pm 0,02$

Apparente Dissoziationskonstanten ( $K_{Dapp}$ ) ermittelt durch nicht-lineare Regression der ATP Umsatzraten von  $\gamma$ Hsp90 in Gegenwart der Modulatoren in Abhängigkeit unterschiedlicher ATP Mengen.

In Abwesenheit der Modulatoren ergibt sich Hsp90 eine Affinität von 0,32 mM für ATP. In Gegenwart aktivierender Konzentrationen der Modulatoren 12 B4 und 28 E3 ist die Affinität mit 0,18 mM und 0,07 mM erhöht. Dies lässt schließen, dass die Modulatoren die Affinität für das Substrat erhöhen, indem sie Konformationen stabilisieren, die eine stärkere Affinität für das Substrat besitzen, als der offene Zustand des Hsp90.

Obwohl in FRET-Kinetiken keine Induktion des geschlossenen Zustandes durch die Substanzen allein detektiert werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Konformation von Hsp90 dennoch durch die Modulatoren beeinträchtigt wird. Deshalb wurde ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf mit Q385C Atto 488 markiertem Hsp90 in Anwesenheit von aktivierenden Konzentrationen an 28 E3 durchgeführt. Die daraus erhaltenen dFluoreszenz/dt- Plots sind in **Abbildung 3-37** gezeigt.



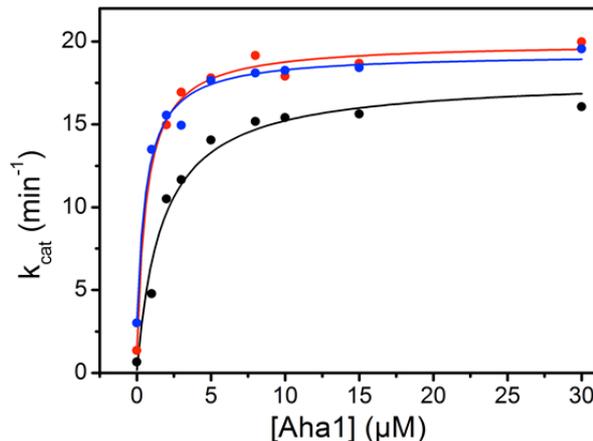
**Abbildung 3-37: Konformation von Hsp90 in Gegenwart der 28 E3 Modulatoren.** Je 500 nM von Q385C Atto 488 markiertem  $\gamma$ Hsp90 wurden analytischer Ultrazentrifugation mit Fluoreszenzdetektion unterzogen. Es wurde das Sedimentationsverhalten von Hsp90 in Gegenwart von (schwarz) 0  $\mu$ M, (rot) 5  $\mu$ M, (grün) 20  $\mu$ M, und (blau) 40  $\mu$ M 28 E3 in (A) Abwesenheit von Nukleotid und (B) 2 mM AMP-PNP beobachtet.

Hsp90 befindet sich in Abwesenheit von Nukleotiden im offenen Zustand (5 S). Hier kann in Gegenwart von 28 E3 eine konformationelle Umstrukturierung zu einem etwas kompakteren Zustand beobachtet werden, da mit steigender Konzentration an Modulator der S-Wert zunimmt (**Abbildung 3-37A**). Liegt Hsp90 bereits im geschlossenen Zustand vor, induziert durch AMP-PNP, so ist keine Veränderung in An- und Abwesenheit des Modulators zu erkennen (**Abbildung 3-37B**). Dies bestätigt die Vermutung, dass der Modulator 28 E3 konformationelle Umstrukturierungen innerhalb des Hsp90 Dimers verursacht, die zu einer Kompaktierung führen. Hsp90 ist aber noch in einer offenen Form und kann das Substrat ATP mit höherer Affinität als offenen Zustand ohne Modulator binden.

#### 3.4.2.4 Einfluss der Hsp90 Modulatoren auf Aha1 und Sba1/p23 Interaktion

Um weitere Einblicke in den Funktionsmechanismus der Hsp90 Modulatoren 12 B4 und 28 E3 zu erhalten, wurden auch Cochaperone eingesetzt, die die Konformationsänderungen und die ATPase Aktivität von Hsp90 beeinflussen. Aha1 ist ein Cochaperon, das die Konformationsänderungen von Hsp90 beschleunigt, indem es die ratenlimitierende konformationelle Transition zum ersten Intermediat erleichtert und die N-Domänen näher bringt (Hessling *et al.*, 2009; Retzlaff *et al.*, 2010). Würden die Hsp90 Modulatoren den identischen Schritt beschleunigen, so wären sie in Gegenwart von Aha1 wirkungslos. Des Weiteren kann eine apparente Affinität der Modulatoren in Gegenwart von Aha1 abgeschätzt

werden und so eine potentielle kompetitive Bindung und somit eine überlappende Bindestelle detektiert werden. Hierfür wurde wiederum der regenerative ATPase Assay genutzt. Die daraus erhaltenen ATP Umsatzraten in Gegenwart der Modulatoren in Abhängigkeit verschiedener Aha1 Konzentrationen sind in **Abbildung 3-38** gezeigt.



**Abbildung 3-38: Einfluss der Modulatoren auf Aha1 Stimulation der  $\gamma$  Hsp90 ATPase Aktivität.** Umsatzrate an ATP in Gegenwart von (schwarz) DMSO, (rot) 80  $\mu\text{M}$  12 B4 und (blau) 20  $\mu\text{M}$  28 E3 in Abhängigkeit verschiedener  $\gamma$ Aha1 Mengen. Die Umsatzraten wurden mittels regenerativen ATPase Assay (2.2.12) in einem Puffer aus 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 20 mM KCl und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  bei einer Messtemperatur von 30 °C bestimmt. Die durch nicht-lineare Regression der Daten (2.2.12.2) ermittelten apparenten Affinitäten von Aha1 in Anwesenheit der Modulatoren sind in **Tabelle 3-11** zusammengefasst.

**Tabelle 3-11: Stimulation von  $\gamma$ Hsp90 durch Aha1 in Gegenwart von 12 B4 und 28 E3.**

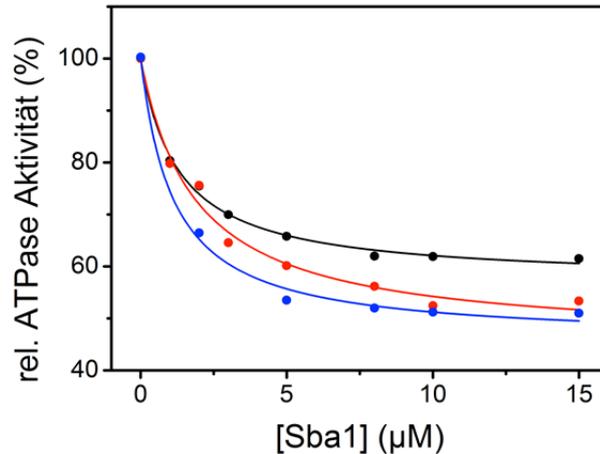
Substanz	$K_{Dapp}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
1 % DMSO	$1,7 \pm 0,4$	16
80 $\mu\text{M}$ 12 B4	$0,7 \pm 0,1$	20
20 $\mu\text{M}$ 28 E3	$0,6 \pm 0,1$	20

Die durch nicht-lineare Regression der ATP Umsatzraten in Gegenwart der Modulatoren in Abhängigkeit der Aha1 Konzentration (2.2.12.2) ermittelten apparenten Affinitäten von Aha1 ( $K_{Dapp}$ ) sind mit dem aus dem Fit erhaltenen Fehler angegeben sowie die maximalen Umsatzraten an ATP ( $V_{max}$ ).

Wie **Abbildung 3-38** zeigt, kann für Hsp90 in Gegenwart von 12 B4 mit  $20 \text{ min}^{-1}$  ein größerer maximaler Umsatz an ATP durch Aha1 Stimulation erreicht werden als in Abwesenheit von 12 B4 ( $16 \text{ min}^{-1}$ ). Dies zeigt, dass 12 B4 einen anderen Schritt der Konformationsänderungen als Aha1 beschleunigt. Des Weiteren ist die apparente Affinität von Aha1 in Gegenwart von 12 B4 mit  $0,6 \mu\text{M}$  leicht erhöht im Vergleich zur DMSO Kontrolle ( $1,7 \mu\text{M}$ ), was zum Einen kompetitive Bindestellen von Modulator und Aha1 ausschließt und zum Anderen eine erhöhte Affinität von Aha1 zeigt. Aha1 bindet an die M- und N-Domäne von Hsp90 und führt zu einer Annäherung der N-Domänen (Retzlaff *et al.*, 2010). Ein vergleich-

bares Bild zeigt sich für 28 E3. Hsp90 kann ebenfalls mit einer maximalen Umsatzrate von  $20 \text{ min}^{-1}$  stärker stimuliert werden, weshalb auch dieser Modulator einen anderen Schritt des Konformationszyklus beschleunigt als Aha1. Wiederum ist die apparente Affinität von Aha1 in Gegenwart des Modulators ( $0,6 \mu\text{M}$ ) leicht erhöht, weshalb eine kompetitive Bindestelle mit Aha1 ausgeschlossen werden kann. Die Tatsache, dass in Gegenwart der Modulatoren die apparente Affinität von Aha1 erhöht ist, könnte darin begründet sein, dass Hsp90 in Gegenwart der Modulatoren eine veränderte Konformation einnimmt oder erleichtert eintritt, die eine verbesserte Bindemöglichkeit für Aha1 darstellt. Die Beschleunigung der Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen legt bereits nahe, dass konformationelle Umstrukturierungen in Gegenwart der Modulatoren deutlich erleichtert sind.

Ein weiteres Cochaperon, das bei der Aufklärung des Wirkungsmechanismus verwendet wurde ist Sba1/p23. Es bindet nur an den geschlossenen Zustand von Hsp90. Stabilisieren die Substanzen den geschlossenen Zustand, so sollte die Inhibition durch Sba1/p23 verstärkt sein. Eine überlappende Bindestelle zwischen den Modulatoren und Sba1/p23 sollte in einer Verringerung der Affinität von Sba1/p23 sichtbar werden. Die Umsatzraten an ATP von Hsp90 in Gegenwart aktivierender Konzentration an Modulator mit variierenden Konzentrationen an Sba1/p23 sind in **Abbildung 3-39** gezeigt. Die daraus resultierenden apparenten Affinitäten sind in **Tabelle 3-12** zusammengefasst. In Gegenwart beider Modulatoren ist Sba1/p23 effektiver in der Lage, die ATPase Aktivität von Hsp90 zu inhibieren. Dies zeigt wiederum, dass Hsp90 leichter geschlossene Zustände in Gegenwart der Modulatoren einnimmt. Die Affinität von Sba1/p23 zu Hsp90 bleibt in Gegenwart der Modulatoren unverändert.



**Abbildung 3-39: Einfluss der Modulatoren auf Sba1/p23 Inhibition der Hsp90 ATPase Aktivität.** Relative ATPase Aktivitäten von  $\gamma$ Hsp90 (schwarz) DMSO von (rot) 80  $\mu$ M 12 B4 und (blau) 25  $\mu$ M 28 E3. Die Messungen wurden mit einem regenerativem enzymatischen Assay in 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> mit 2 mM ATP bei einer Messtemperatur von 30 °C durchgeführt. Die ATPase Aktivitäten wurden auf die Startaktivität in Abwesenheit von Sba1/p23 relativiert.

**Tabelle 3-12: Inhibition der ATPase Aktivität von Hsp90 durch Sba1/p23 in Gegenwart der Modulatoren.**

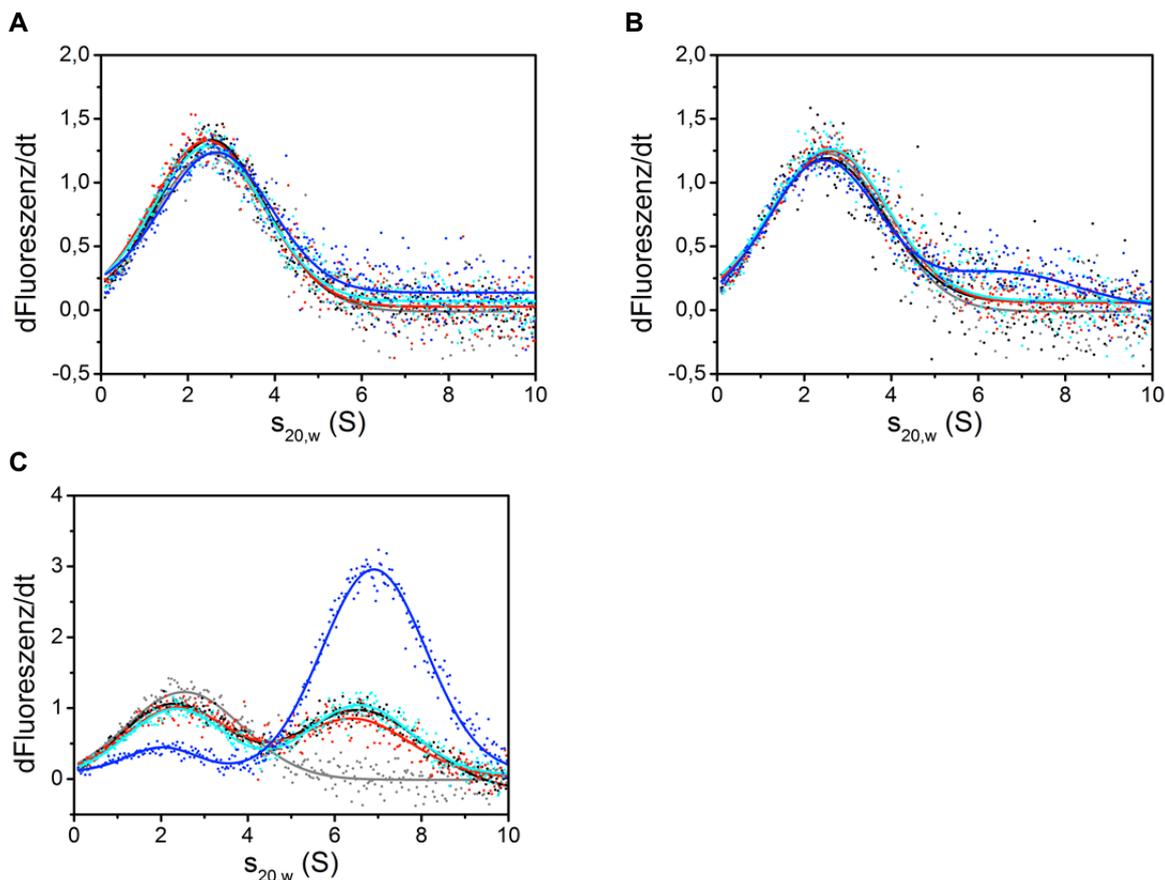
Substanz	$K_{Dapp}$ ( $\mu$ M)	rel. ATPase Aktivität
1 % DMSO	$1,3 \pm 0,1$	60
80 $\mu$ M 12 B4	$1,9 \pm 0,4$	53
25 $\mu$ M 28 E3	$1,2 \pm 0,2$	51

Die durch nicht-lineare Regression der ATP Umsatzraten in Gegenwart der Modulatoren in Abhängigkeit der Sba1/p23 Konzentration (2.2.12.2) ermittelten apparenten Affinitäten von Sba1/p23 ( $K_{Dapp}$ ) sind mit dem aus dem Fit erhaltenen Fehler angegeben. Zudem ist die ATPase Aktivität bei sättigenden Sba1/p23 Konzentrationen relativ zum Wert ohne Sba1/p23.

Um weitere Hinweise für die Stabilisierung des geschlossenen Zustandes zu detektieren wurde die Bindung des Konformations-sensitiven Cochaperons Sba1/p23 in Gegenwart der Modulatoren und verschiedenen Nukleotiden untersucht. Eine Stabilisierung des geschlossenen Zustandes sollte zu einer verstärkten Bindung führen. Hierfür wurde in Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen die Bindung von Fluorescein markiertem Sba1/p23 an Hsp90 mittels analytischer Ultrazentrifugation mit Fluoreszenzdetektion verfolgt (**Abbildung 3-40**).

Sba1/p23 bindet nur an den geschlossenen Zustand von Hsp90. In Abwesenheit von Nukleotiden (**Abbildung 3-40A**) findet keine Bindung von Sba1/p23 an Hsp90 statt, was die bisherigen Ergebnisse, dass die Modulatoren alleine nicht in der Lage sind, den geschlossenen Zustand des Hsp90 zu induzieren, bestätigt. In Gegenwart von ATP ist in Abwesenheit der Modulatoren ebenfalls keine Sba1/p23 Bindung detektierbar (**Abbildung 3-40B**), da Hsp90 überwiegend in offenen Zuständen vorliegt und so keine ausreichende Komplexbil-

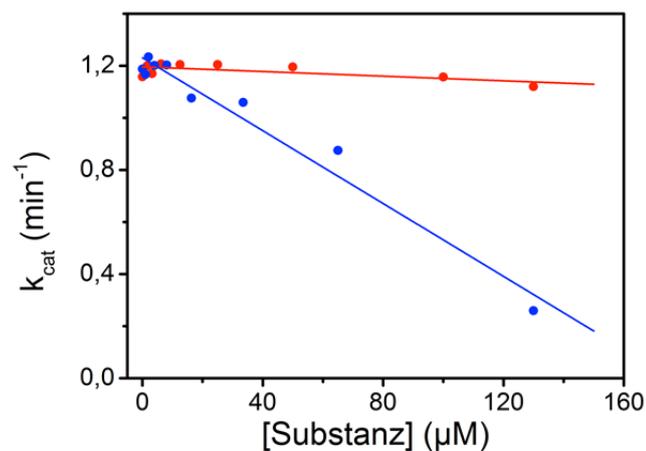
dung für die Detektion stattfindet. In Gegenwart des Modulators 12 B4 ist ebenfalls keine Detektion der Sba1/p23 Bindung zu sehen, was dafür spricht, dass 12 B4 Zustände vor dem geschlossenen induziert bzw. stabilisiert. In Gegenwart von 80  $\mu\text{M}$  28 E3 hingegen ist eine Spezies bei 7 S zu sehen, die im Sedimentationsverhalten einem Komplex von Sba1/p23 und Hsp90 entspricht. So stabilisiert 28 E3 zumindest in Konzentrationen um 80  $\mu\text{M}$  den geschlossenen Zustand des Hsp90 was zu einer verstärkten Sba1/p23 Bindung führt. In Gegenwart von ATP $\gamma$ S ist sowohl in An- und Abwesenheit der Modulatoren Sba1/p23 Bindung detektierbar (**Abbildung 3-40C**), da durch das Nukleotidanalogen der geschlossene Zustand induziert wird. In Gegenwart von 12 B4 findet keine verstärkte Sba1/p23 Bindung statt, aber in Gegenwart von 80  $\mu\text{M}$  28E3 bestätigt sich Ergebnis was schon in Gegenwart von ATP zu sehen war, dass von 28 E3 der geschlossenen Zustand stabilisiert wird.



**Abbildung 3-40: Sba1/p23 Interaktion mit yHsp90 in Gegenwart der Hsp90 Modulatoren.** dFluoreszenz/dt Plots der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe von Fluorescein markiertem Sba1/p23 und Hsp90 (A) ohne Nukleotid, (B) mit 2 mM ATP oder (C) ATP $\gamma$ S. (grau) Sba1/p23-Fluorescein allein, in Gegenwart von Hsp90 mit (schwarz) DMSO, (rot) 80  $\mu\text{M}$  12 B4, (Cyan) 25  $\mu\text{M}$  28 E3 oder (blau) 80  $\mu\text{M}$  28 E3.

### 3.4.2.5 Mechanismus der Aktivierung von Hsp90

Die Ergebnisse der bisherigen Experimente lassen vermuten, dass durch die Modulatoren eine partielle Umstrukturierung des Hsp90 stattfindet und dass durch 28 E3 der geschlossene Zustand von Hsp90 stabilisiert wird. 12 B4 erleichtert ebenfalls die Nukleotid-induzierten Umstrukturierungen in Hsp90, stabilisiert aber eher partiell geschlossene Zustände vor dem geschlossenen Zustand. Um diese Vermutungen zu bestätigen, wurde eine Hsp90-Variante gewählt, in der die ersten acht Aminosäuren deletiert wurden und die bereits in Abwesenheit von Nukleotid eine deutlich kompaktere Struktur besitzt (3.1.6). In Gegenwart von Nukleotiden wird bei dieser Variante der geschlossene Zustand deutlich favorisiert (Richter *et al.*, 2002). Der Einfluss der Modulatoren auf diese intrinsisch geschlossene Hsp90-Variante wurde ebenfalls mit Hilfe des regenerativen Enzym Assays untersucht (2.2.12). Die daraus erhaltenen Umsatzraten an ATP in Abhängigkeit der Modulatorkonzentration sind in **Abbildung 3-41** gezeigt.



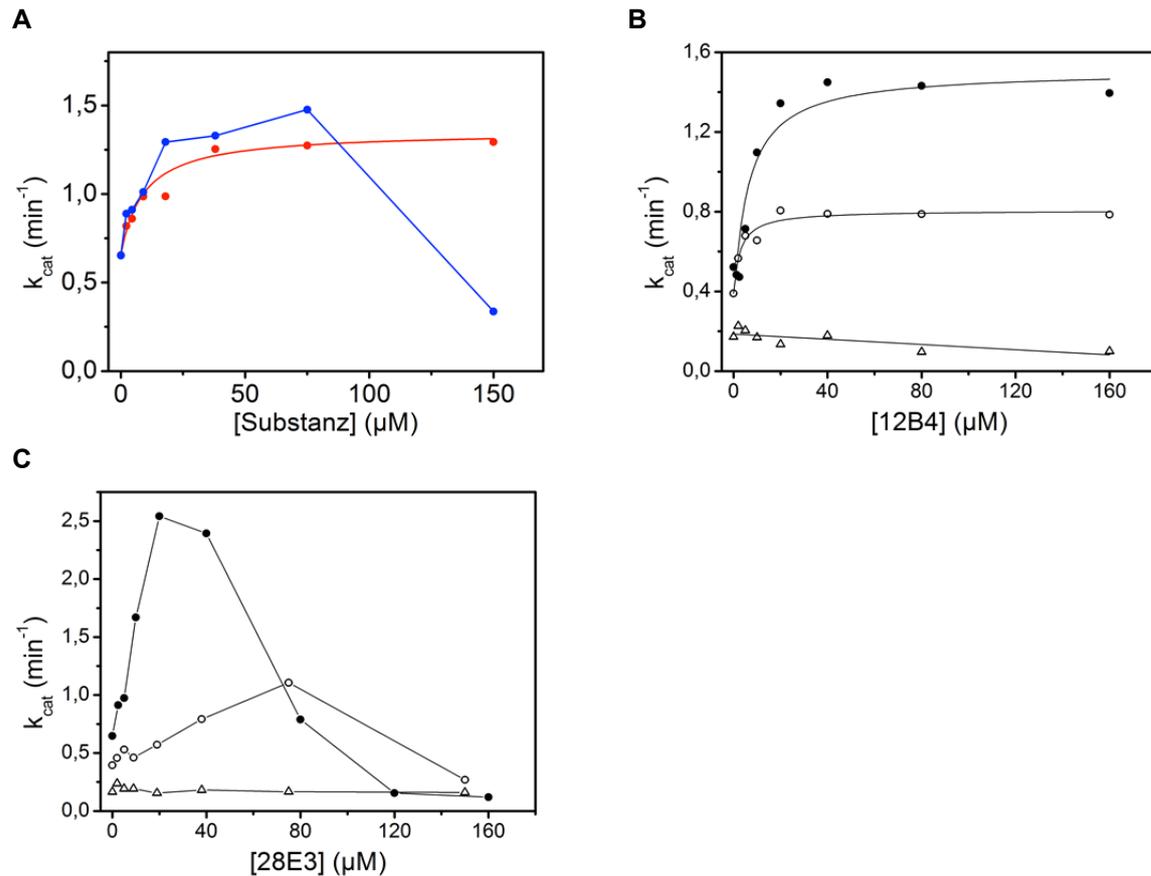
**Abbildung 3-41: Stimulation der  $\Delta 8$  yHsp90-Variante durch die Modulatoren.** Umsatzraten an ATP von  $\Delta 8$  Hsp90 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an (rot) 12 B4 und (blau) 28 E3. Die Umsatzraten wurden mit einem regenerativen ATPase Assay in 40 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM KCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> bei einer Messtemperatur von 30 °C bestimmt.

Wie **Abbildung 3-41** zeigt ist keiner der beiden Modulatoren in der Lage, die  $\Delta 8$  Hsp90 Variante zu stimulieren. In dieser intrinsisch geschlosseneren Variante haben die Konformationsänderungen, die durch die Modulatoren beschleunigt werden, schon stattgefunden und sind nicht mehr ratenlimitierend. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Modulatoren Konformationsänderungen vor dem geschlossenen Zustand beschleunigen.

### 3.4.2.6 Bindestelle der Hsp90 Modulatoren

Durch die bisherigen Experimente konnten bereits überlappende Bindestellen mit den Cochaperonen Aha1 und Sba1/p23 ausgeschlossen werden. Für eine genauere Bestimmung der Bindestelle der Modulatoren an Hsp90 konnte keine direkte Methode der Bindungsbestimmung benutzt werden. Da 12 B4 und 28 E3 sehr hydrophob sind und in wässrigen Lösungen bei Konzentrationen  $>200 \mu\text{M}$  präzipitieren, eigneten sie sich nicht für ITC. Mit den maximal erreichbaren Konzentrationen konnte keine Bindung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Um dennoch einzugrenzen, welche Domäne von Hsp90 die relevante Binde-domäne für die Modulatoren ist, wurden verschiedene Deletionskonstrukte von Hsp90 im ATPase Assay auf ihre Stimulierbarkeit durch die Modulatoren getestet. Zum einen wurde ein Konstrukt getestet, in dem die C-Domäne deletiert wurde ( $\Delta\text{C yHsp90}$ ), um herauszufinden, ob die Modulatoren an die C-Domäne binden. Um die ATPase Funktion in diesem Konstrukt aufrecht zu erhalten, ist dieses Konstrukt mittels C-terminaler Cysteine kovalent über eine Disulfidbrücke dimerisiert (Wegele *et al.*, 2003). Zwei Hsp90 Konstrukte, in denen unterschiedlich lange Stücke des *linker* zwischen der N- und M-Domäne deletiert wurden ( $\Delta\text{L yHsp90}$ ), wurden ebenfalls auf ihre Stimulierbarkeit durch die Modulatoren getestet. Die aus dem regenerativen ATPase Assay erhaltenen ATP Umsatzraten für die Hsp90-Konstrukte sind in **Abbildung 3-42** gezeigt.

Wie **Abbildung 3-42A** zeigt, ist 12 B4 in der Lage, die ATPase Aktivität von  $\Delta\text{C yHsp90}$  mit einer apparenten Affinität von  $9 \mu\text{M}$  zu stimulieren. Dies ist der Affinität zum Volllängenprotein vergleichbar, womit die C-Domäne als Bindestelle für 12 B4 ausgeschlossen werden kann. 28 E3 ist ebenfalls in der Lage  $\Delta\text{C yHsp90}$  zu stimulieren. Die Inhibition setzt im Vergleich zum Wildtypprotein erst bei höheren Konzentrationen an 28 E3 ein. In diesem Fall kann eine Beteiligung der C-Domäne nicht vollständig ausgeschlossen werden, jedoch stellt sie nicht die alleinige Bindestelle für 28 E3 dar, da in diesem Fall keine Modulation durch 28 E3 zu erwarten wäre.

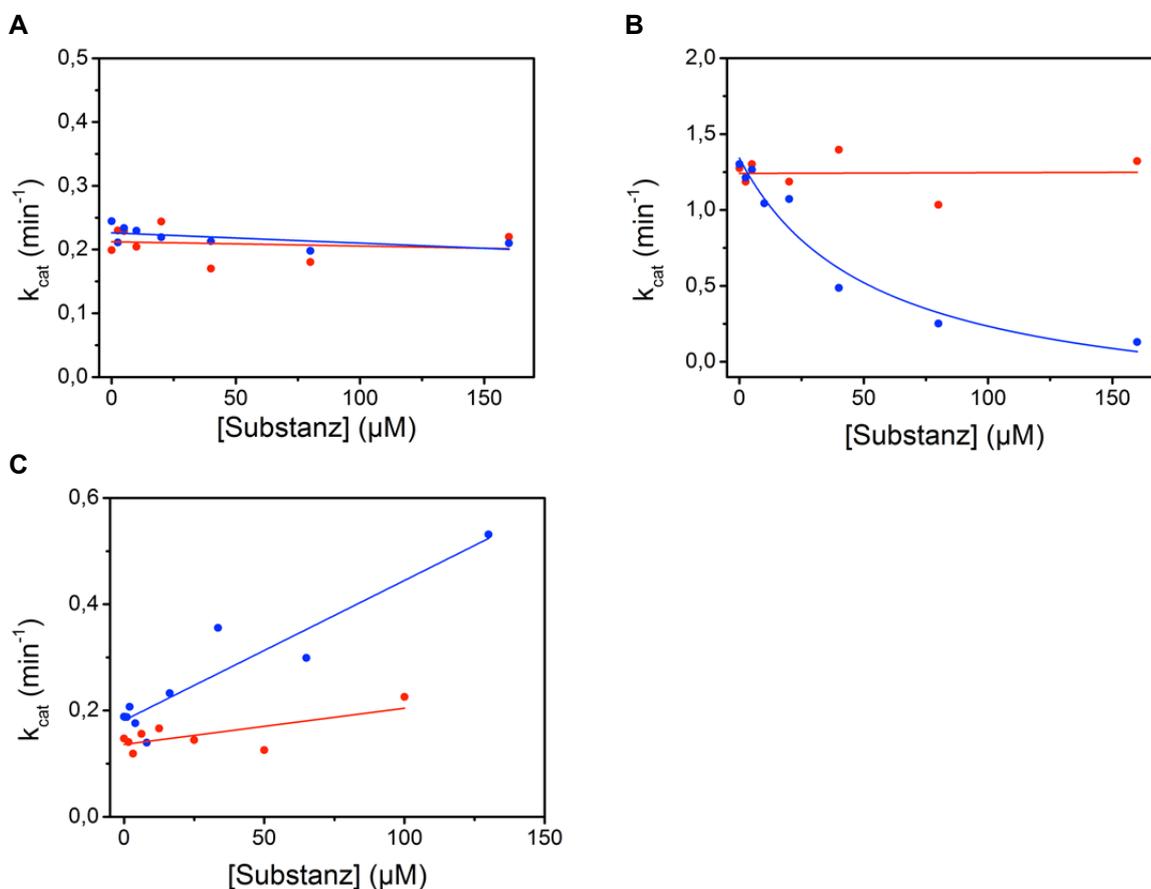


**Abbildung 3-42: Einfluss der Modulatoren auf yHsp90 Deletionskonstrukte.** Es wurde (A) eine yHsp90 Variante ohne C-Domäne auf ihre Stimulierbarkeit durch die Modulatoren (rot) 12 B4 und (blau) 28 E3 untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss von (B) 12 B4 und (C) 28 E3 auf eine Variante mit einer Deletion der Aminosäuren 211-263 ( $\Delta\text{L 211-263}$  yHsp90, offene Kreise) sowie der Aminosäuren 211-266 (offene Dreiecke) getestet. Zum Vergleich ist in (B) und (C) der Einfluss auf das Wildtypprotein dargestellt (gefüllte Kreise). Die Umsatzraten ( $k_{cat}$ ) wurden mit Hilfe des ATPase Assay mit regenerativem Enzymsystem (2.2.12) bei einer Temperatur von 30 °C ermittelt.

12 B4 ist zudem in der Lage,  $\Delta\text{L 211-263}$  Hsp90 zu stimulieren und zwar mit einer Affinität vergleichbar dem Wildtypprotein (**Abbildung 3-42B**). Die maximale Umsatzrate unter sättigenden Bedingungen von 12 B4 ist geringer als beim Wildtypprotein und  $\Delta\text{L 211-266}$  Hsp90 kann schließlich nicht mehr stimuliert werden. Dies ist in der konformationellen Restriktion begründet, die durch die *linker* Deletion stattfindet. Hsp90 ist in seinen Konformationsänderungen limitiert, so dass keine effiziente ATP Hydrolyse mehr stattfinden kann (Hainzl *et al.*, 2009). Diese konformationelle Restriktion kann auch durch den Modulator 12 B4 nicht kompensiert werden. Ein ähnliches Bild zeigt sich für den Modulator 28 E3 (**Abbildung 3-42C**). Er stimuliert ebenfalls  $\Delta\text{L 211-263}$  Hsp90, jedoch nicht  $\Delta\text{L 211-266}$  Hsp90. Auch er kann die konformationelle Restriktion nicht kompensieren und eine effiziente ATP Hydrolyse wieder herstellen.

### 3.4.2.7 Spezifität der identifizierten Hsp90 Modulatoren

Um herauszufinden, wie spezifisch die Aktivierung durch die Modulatoren ist, wurde eine weitere ATPase aus *S. cerevisiae* Ssa1 (Hsp70, Protein wurde von Alina Röhl zur Verfügung gestellt) auf ihre Stimulierbarkeit durch die Modulatoren getestet. Des Weiteren wurde auch die humane Hsp90  $\beta$  Variante sowie Hsp90 aus *C. elegans* (DAF-21, Protein wurde von Veronika Haslbeck zur Verfügung gestellt) auf ihre Stimulation durch die Modulatoren getestet. Die Stimulation wurde in einem regenerativen ATPase Assay untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3-43** gezeigt.



**Abbildung 3-43: Spezifität der Hsp90 Modulatoren.** Die Spezifität der Hsp90 Modulatoren wurde an einer weiteren ATPase aus *S. cerevisiae* (A) Ssa1, sowie an den Hsp90 Homologen (B) DAF-21 (Hsp90 aus *C. elegans*) und (C) humanem Hsp90  $\beta$  im regenerativen ATPase Assay getestet. Die Messungen wurden in 40 mM HEPES/KOH pH 7,5, 150 mM KCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> bei einer Messtemperatur von 30 °C (SSA1, DAF-21) bzw. 37 °C (hHsp90  $\beta$ ) durchgeführt.

Ssa1 aus Hefe wird durch die Modulatoren nicht beeinflusst, was auf einen spezifischen Effekt in Hefe selbst deutet (**Abbildung 3-43A**). Betrachtet man die Modulation von Hsp90 Homologen aus anderen Spezies, so zeigt sich, dass die Modulation nicht auf andere Hsp90 Homologe übertragbar ist. So kann keiner der Modulatoren DAF-21 aktivieren, der inhibito-

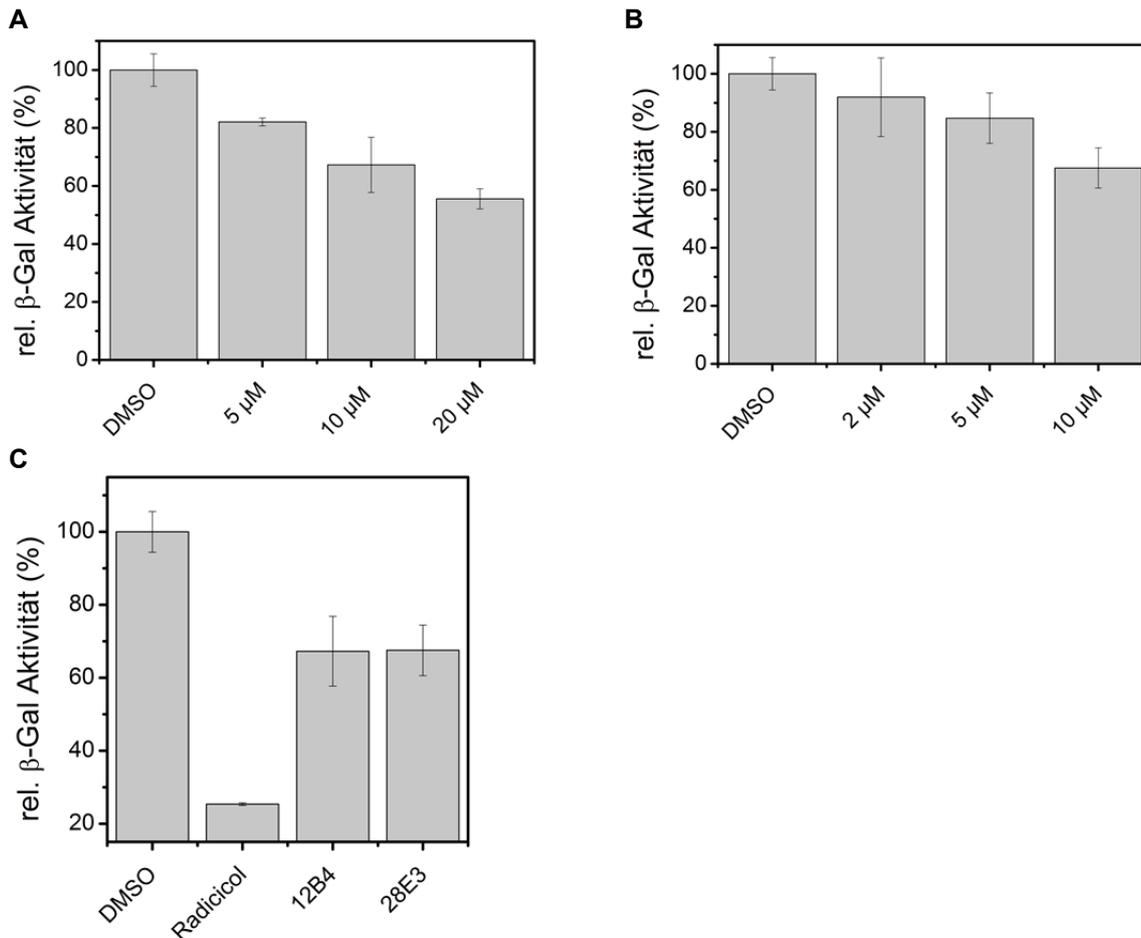
---

rische Effekt von 28 E3 bleibt hier erhalten (**Abbildung 3-43B**). Humanes Hsp90  $\beta$ , das bereits eine intrinsisch schlechtere ATP Hydrolyseaktivität als die Hefevariante besitzt, kann durch die Modulatoren zwar stimuliert werden, am besten durch 28 E3, aber die Affinität der Substanzen ist sehr gering, so dass bei Konzentrationen bis 100 bzw. 130  $\mu\text{M}$  keine Sättigung der Modulation erreicht werden kann.

So ist die Stimulation der ATPase Aktivität durch die Modulatoren im Rahmen der getesteten Proteine spezifisch für Hsp90 aus *S. cerevisiae*.

#### 3.4.2.8 Einfluss der Hsp90 Modulatoren auf *client*-Prozessierung *in vivo*

Hsp90 stellt aufgrund seines Spektrums an *client*-Proteinen einen wichtigen Angriffspunkt in der Krebstherapie dar. Es ist an der Prozessierung und Reifung vieler Onkogene beteiligt (Whitesell und Lindquist, 2005). Wird Hsp90 inhibiert so führt dies zum Abbau der *client*-Proteine durch das Proteasom (Neckers, 2002). Da die Auswirkung der Stimulation von Hsp90 durch niedermolekulare Substanzen auf die Prozessierung von Hsp90 *clients* bisher unbekannt ist, sollte dies anhand eines  $\beta$ -Galactosidase Reporterassay für den Glucocorticoidrezeptor (GR) als exemplarisches *client*-Protein getestet werden. Derartige Reporterassays wurden bereits genutzt, um die Aktivität von Hsp90 *clients* zu untersuchen (Johnson und Craig, 2000). In Hefenzellen wird der humane GR von einem eingebrachten Plasmid exprimiert. Wird dieser durch Hsp90 in der Hefe korrekt prozessiert, so wird nach Induktion mit Hormon das Reporterprotein  $\beta$ -Galactosidase exprimiert. Deren Aktivität kann durch Umsetzung des ONPG mittels einer Farbreaktion spektroskopisch bestimmt werden. Um den Einfluss der Modulatoren auf die Prozessierung von GR zu bestimmen, wurden Hefen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Modulator versetzt. Die Konzentrationen wurden hierbei derart gewählt, dass das Wachstum der Hefen nicht beeinträchtigt war (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der abschließenden Bestimmung der  $\beta$ -Galactoseaktivität sind in **Abbildung 3-44** gezeigt.



**Abbildung 3-44: Einfluss der Modulatoren auf GR Prozessierung.** Die Prozessierung des humanen Hsp90 GR wurde *in vivo* in *S. cerevisiae* Zellen anhand eine  $\beta$ -Galactosidase GR-Assay nach 2.2.18.5 bestimmt. *S. cerevisiae* wurde dazu (A) unterschiedlichen Konzentrationen an 12 B4 oder (B) 28 E3 ausgesetzt. (C)  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in Gegenwart von je 10  $\mu$ M Radicicol, 12 B4 oder 28 E3.

Beide Modulatoren sind in der Lage in Hefe die Prozessierung des *clients* GR negativ zu beeinflussen. 12B4 führt (**Abbildung 3-44A**) bei einer Konzentration 20  $\mu$ M zu einer Reduktion der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität auf 60 % gegenüber Hefen, die nur mit DMSO als Kontrolle behandelt wurden. Im Falle von 28 E3 (**Abbildung 3-44B**) konnte eine Konzentration bis 10  $\mu$ M eingesetzt werden, wobei eine Reduktion der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität auf 70 % festgestellt werden konnte. Im Falle beider Modulatoren ist eine Konzentrationsabhängigkeit des Effekts auf die *client*-Prozessierung von den Modulatoren festzustellen, was auf einen spezifischen Effekt der Modulatoren auf die *client*-Prozessierung darstellt.

Werden Hefezellen identischen Konzentrationen an 12 B4 oder 28 E3 ausgesetzt, so erkennt man, dass beide gleich stark in der Lage sind die GR Prozessierung zu reduzieren. Im Vergleich dazu fällt die Repression der GR Reifung durch den bekannten Inhibitor der Hsp90 ATPase Aktivität mit einer  $\beta$ -Galactosidase Aktivität von 20 % im Vergleich zur

DMSO Kontrolle wesentlich stärker aus. Die Affinität des Hsp90 für Radicicol ist mit 19 nM (Roe *et al.*, 1999) auch wesentlich stärker ist als für die Modulatoren, worin die größere Effizienz von Radicicol begründet werden kann. Es kann somit keine Aussage getroffen werden, ob Inhibition der ATPase Aktivität eine bessere Strategie ist als Aktivierung. Aber es wird deutlich, dass auch Aktivierung der Hsp90 Konformationsänderungen und ATPase Aktivität zu einer verringerten *client*-Prozessierung in *S. cerevisiae* führen und dies eine denkbare Strategie zur Tumorbekämpfung darstellt.

### 3.5 Diskussion der Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen

Um neue Modulatoren für die Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen des Hsp90 zu finden, sollte, basierend auf das in  $\gamma$ Hsp90 etablierte FRET-System (Hessling *et al.*, 2009), ein *Screening* Assay etabliert werden, der sich für das Testen größerer Substanzbibliotheken eignet. Das Durchsuchen einer Substanzbibliothek sollte neue Modulatoren liefern, die nach Verifikation ihrer Eigenschaft als Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen auf ihren Wirkungsmechanismus hin näher charakterisiert werden sollen.

Der Fluoreszenz-basierte *Screen* lieferte 84 Substanzen, die als potentielle Modulatoren der Konformationsänderungen in Frage kamen. Da die Konformationsänderungen den ratenlimitierenden Schritt in der ATP Hydrolyse darstellen (Hessling *et al.*, 2009; Weikl *et al.*, 2000), wurde der Einfluss der Substanzen auf die ATPase Funktion des Hsp90 als Werkzeug zur Verifikation der Hits benutzt. Mit Hilfe eines ATPase Assays mit regenerativen Enzymsystem (um Produktinhibition durch entstehendes ADP zu verhindern) konnten lediglich für 8 Substanzen bestätigt werden, dass sie die ATP Hydrolyse von Hsp90 beeinflussen. Von diesen Substanzen wurden fünf aufgrund ihrer geringen Affinität zu Hsp90 ( $K_{Dapp} > 30 \mu\text{M}$ ) für eine weitere Charakterisierung ausgeschlossen. Zur Charakterisierung des Wirkungsmechanismus verblieb zum Einen der Inhibitor 1 A2, der eine gute Affinität zeigte und die ATPase Aktivität nahezu vollständig inhibieren konnte. Die weitere zur Charakterisierung in Betracht gezogene Substanz 12 B4 war in der Lage, die Hsp90 ATPase Aktivität 2,8fach zu stimulieren und zeigte mit einem  $K_{Dapp}$  von  $6 \mu\text{M}$  gute Bindungseigenschaften. Die Substanz 28 E3 gefunden wirkte in geringen Konzentrationen bis zu fünffach stimulierend auf die Hsp90 ATPase Aktivität inhibitorisch. Ihre Affinität wurde mit etwa  $10 \mu\text{M}$  abgeschätzt.

Aufgrund seiner Struktur konnte 1 A2 der Klasse der Resorcinol-Derivate zugeordnet werden, die bereits für ihre inhibitorische Wirkung auf die Hsp90 ATPase Aktivität bekannt sind (Workman *et al.*, 2007). Der Wirkungsmechanismus des bekanntesten Vertreter Radicol ist die kompetitive Bindung in die Nukleotidbindetasche (Roe *et al.*, 1999). Für 1 A2 wurde ebenfalls eine Bindung an die N-Domäne von Hsp90 mittels ITC mit einem  $K_D$  von  $690 \text{ nM}$  bestimmt, wobei ein Molekül pro Protein bindet. Dadurch wurde gezeigt, dass derselbe Wirkungsmechanismus wie bei Radicol zugrunde liegt. Einige Vertreter dieser

Gruppe befinden sich bereits in klinischen Studien und betonen die Bedeutung der Resorcinol-Derivate als Krebstherapeutika (Jhaveri *et al.*, 2012).

Mit 1 A2 und 28 E3 wurden Substanzen gefunden, die in der Lage sind, die ATPase Aktivität von Hsp90 zu beschleunigen. Mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) und Tamoxifen wurden bereits erste Aktivatoren der Hsp90 ATPase Aktivität beschrieben (Zhao *et al.*, 2010). Sie wurden im Rahmen einer Dockingstudie entdeckt, in der für neue Bindepartner dieser Östrogenblocker gesucht wurde (Zhao *et al.*, 2010). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass 4-OHT mit einer Affinität von 60 -100  $\mu\text{M}$  an Hsp90 bindet und die ATPase Aktivität zweifach stimuliert, der Wirkungsmechanismus bleibt ungeklärt (Zhao *et al.*, 2010).

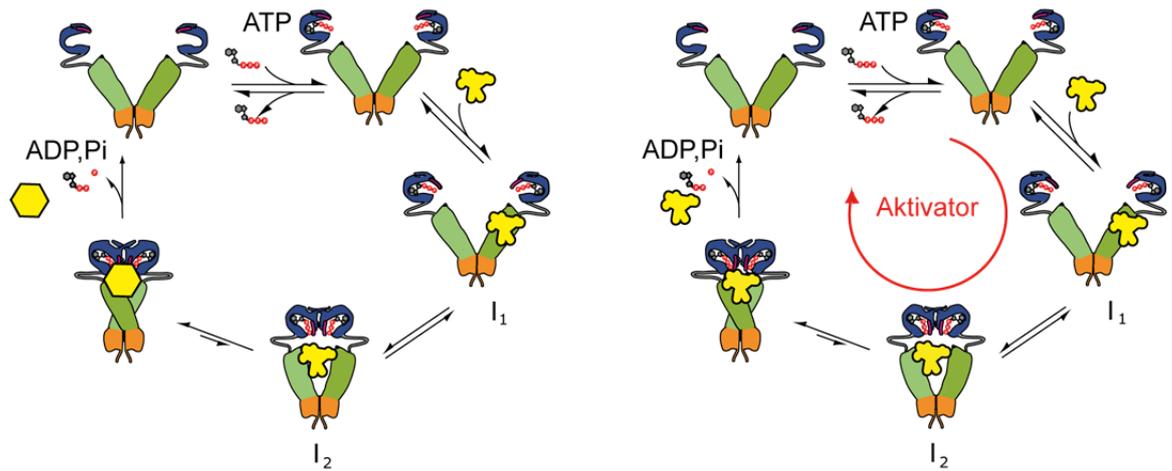
Die Analyse der AMP-PNP induzierten Konformationsänderungen detektiert durch das FRET-System zeigte eine Beschleunigung in derselben Größenordnung, wie die Beschleunigung der ATPase Aktivität. Dies korreliert mit der Tatsache, dass die Konformationsänderungen innerhalb des Hsp90 für die Funktion ratenlimitierend sind (Hessling *et al.*, 2009; Weikl *et al.*, 2000). Die Enzymaktivität wird durch Beschleunigung der Konformationsänderungen erzeugt. In Gegenwart des Cochaperons Aha1, das die ATPase Aktivität durch erleichterte Transition zum ersten Intermediat und eine damit verbundene Annäherung der N-Domänen beschleunigt (Hessling *et al.*, 2009; Retzlaff *et al.*, 2010), kann die Aktivität von Hsp90 noch stärker stimuliert werden. Von den Aktivatoren werden somit andere konformationelle Schritte beschleunigt als von Aha1.

Beide Substanzen waren nicht in der Lage große Umstrukturierungen innerhalb des Hsp90, also eine Verschiebung des Gleichgewichts in den geschlossenen Zustand von sich aus zu induzieren. Hsp90 wird von beiden Substanzen aber dahingehend verändert, dass die Affinität für ATP in Gegenwart der Modulatoren steigt. Die aktivierende Wirkung wird vielmehr also eine Erleichterung der Konformationsänderungen vor dem geschlossenen Zustand verursacht. Dies zeigte sich, durch analytische Ultrazentrifugation, wo 28 E3 eine detektierbare Kompaktierung des offenen Hsp90 in Abwesenheit von Nukleotiden verursachte. Zudem stieg in Gegenwart von Nukleotiden und Aktivatoren die Affinität für das Konformations-sensitive Cochaperon Sba1/p23, das nur an den geschlossenen Zustand bindet. Geschlossenen Zustände scheinen in Gegenwart von Nukleotiden besser erreicht oder stabilisiert zu werden. Dies konnte experimentell bestätigt werden, indem eine in Gegenwart von ATP bereits intrinsisch geschlossen vorliegende Variante des Hsp90  $\Delta 8$  (Richter *et al.*, 2002) durch beide Modulatoren nicht mehr stimuliert werden konnte. Es bleibt jedoch bislang unbekannt, welcher Schritt im Nukleotid-induzierten Konformationszyklus durch die

Modulatoren beschleunigt wird. Als Bindestellen für die Modulatoren konnten überlappende Bindestellen mit den Cochaperonen Aha1 und Sba1/p23 ausgeschlossen werden, sowie aus Fragmentstudien konnte die C-Domäne von Hsp90 als Ort der Modulatorbindung ausgeschlossen werden. Um künftige Bindungsstudien mit den Modulatoren zu ermöglichen, wäre es sinnvoll die Modulatoren zu Derivatisieren, mit dem Ziel ihre Wasserlöslichkeit zu optimieren. Dies würde Interaktionsstudien mittels ITC ermöglichen. Darüberhinaus könnte die Bindestelle über Interaktionsmessung mit Hsp90 Fragmenten weiter eingegrenzt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der stimulierende Effekt spezifisch für die Hsp90 ATPase Aktivität ist, da Ssa1 (eine weiteren ATPase aus *S. cerevisiae*) durch die Modulatoren nicht stimuliert werden konnte. Der stimulatorische Effekt war auch nur teilweise auf Homologe von Hsp90 aus Mensch oder *C. elegans* übertragbar. Zwar konnte humanes Hsp90  $\beta$  noch stimuliert werden, die Affinität war jedoch sehr gering. Für weitere Studien, ob Aktivatoren Tumorsuppressorfunktion im Humansystem besitzen, könnten die Modulatoren als Leitstrukturen dienen, um Aktivatoren für humanes Hsp90  $\beta$  mit besserer Affinität zu synthetisieren.

Durch einen  $\beta$ -Galactosidase Reporterassay für die Reifung des Hsp90 *clients* GR in *S. cerevisiae* konnte erstmals gezeigt werden, dass sich eine Aktivierung von Hsp90 durch niedermolekulare Substanzen negativ auf die *client*-Prozessierung auswirkt. Durch die Substanzen wird die Aktivität von Hsp90 unkontrolliert konstitutiv beschleunigt, was sich negativ auf die *client*-Prozessierung auswirkt (**Abbildung 3-45**). Der Grund hierfür könnte darin begründet sein, dass dem *client*-Protein für die Prozessierung keine ausreichende Verweildauer an Hsp90 zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung von Hsp90 durch natürliche Aktivatoren des Hsp90 Konformationszyklus, die Cochaperone Aha1 und Cpr6, stark reguliert und auf die Bedürfnisse der *clients* angepasst.



**Abbildung 3-45: Einfluss der Aktivatoren auf Hsp90-Zyklus.** (A) In Abwesenheit des Aktivators bindet Hsp90 im offenen Zustand ATP und das *client*-Protein (gelb) wird an Hsp90 übergeben. Nach ATP Hydrolyse wird der prozessierte *client* freigesetzt. (Zur Vereinfachung wurden die an der Prozessierung des clients beteiligten Cochaperone in diesem Schema nicht berücksichtigt). (B) In Anwesenheit des Aktivators sind die nach ATP-Bindung stattfindenden Konformationsänderungen beschleunigt, was die *client*-Prozessierung negativ beeinflussen kann.



## 4 Zusammenfassung

In Eukaryoten ist das essentielle molekulare Chaperon Hsp90 bei der Reifung und Prozessierung einer Vielzahl von *client*-Proteinen beteiligt. Der Reaktionszyklus, der für die *client*-Reifung verantwortlich ist, wird durch ATP Hydrolyse angetrieben und ist an große Konformationsänderungen innerhalb des Dimers gekoppelt. Hsp90 bindet ATP im offenen Zustand und passiert mindestens zwei Intermediatzustände bis es schließlich den geschlossenen Zustand erreicht, in dem die ATP Hydrolyse stattfindet. Die Relevanz dieser Konformationszustände für die Funktion des Hsp90 und die Kopplung mit der *client*-Prozessierung ist noch unklar.

Durch die biochemische Charakterisierung verschiedener Mutationen in der N- und M-Domäne von Hsp90, die die ATP Hydrolyse beeinflussen, konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sowohl Hsp90-Varianten mit inhibierter als auch Varianten mit beschleunigter ATPase Aktivität eine veränderte Population der Konformationszustände aufweisen. Eine Variante mit beschleunigter ATPase Aktivität ( $\Delta 8$ ) populierte kaum den offenen Zustand und eine Variante mit verringerter ATPase Aktivität (R380A) war nicht in der Lage, den geschlossenen Zustand einzunehmen. Die Mutation E33A führte zu einer nicht detektierbaren ATPase Aktivität und resultierte in einer starken Anhäufung des geschlossenen Zustandes.

Die Relevanz der Konformationsänderungen für die Funktion von Hsp90 wurde dadurch demonstriert, dass Varianten, die nicht in der Lage sind den geschlossenen oder offenen Zustand einzunehmen, zum Verlust der essentiellen Funktion *in vivo* führten. Ein nahezu vollständiger Verlust der ATP Hydrolyseaktivität hingegen kann im Gegensatz dazu anscheinend toleriert werden. Eine veränderte Population der Konformationszustände geht mit einer verminderten Aktivierung von *client*-Proteinen, einer Überempfindlichkeit von Hsp90 gegenüber Inhibition sowie einer gestörten DNA-Reparatur einher.

Da viele Onkogene zu den *client*-Proteinen von Hsp90 gehören und eine Inhibition von Hsp90 zu deren proteasomalen Abbau führt, ist Hsp90 zu einem wichtigen Angriffspunkt in der Krebstherapie geworden.

Die Etablierung einer FRET-basierten *Screening* Methode nach Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen führte zur Identifikation von zwei neuen Aktivatoren der Hsp90 ATPase Aktivität. Eine Substanz wirkte zusätzlich inhibitorisch bei Anwendung in hoher Konzentration. Die Analyse des Mechanismus der Modulatoren zeigte, dass sie die Konfor-

mationsänderungen vor dem geschlossenen Zustand beschleunigen und dass er sich von dem des aktivierenden Cochaperon Aha1 unterscheidet. Die Stimulation der Hsp90 ATPase Aktivität durch niedermolekulare Substanzen in *S. cerevisiae* führte zu einer verminderten *client*-Prozessierung Dies zeigt, dass Stimulation von Hsp90 einen möglichen neuen Weg in der Bekämpfung von Krebs darstellt.

## 5 Summary

In eukaryotes, the essential molecular chaperone Hsp90 is required for the maturation of a set of diverse client proteins. The reaction cycle of Hsp90, responsible for substrate activation, is driven by ATP hydrolysis coupled to conformational changes within the dimer. Hsp90 binds ATP in an open conformation and passes at least two intermediate states to reach the final closed state, in which hydrolysis occurs. The relevance of these conformational states of Hsp90 and the coupling to client maturation remains unclear.

The biochemical characterization of different mutations influencing the ATP hydrolysis rate located in the N- and M-domain of Hsp90 *in vitro* showed that both ATPase activating and inhibiting mutations result in an alteration of the population of the conformational states. One variant with accelerated ATPase activity ( $\Delta 8$ ) showed almost no population of the open state while another variant with reduced ATPase activity (R380A) was unable to adopt the closed state. The mutation E33A resulted in an undetectable low ATPase activity and a strong accumulation of the closed state.

The relevance of the conformational states for the function of the Hsp90 chaperone in contrast to ATP hydrolysis was demonstrated as variants unable to adopt the open or closed conformation, disrupted the essential *in vivo* function. In contrast, an almost complete loss of ATP hydrolysis could be tolerated. Alteration of the population of the conformational states negatively affected Hsp90 activity *in vivo* including reduced client activation, hypersensitivity to Hsp90 inhibition and disruption of DNA repair processes.

As many oncogenes are client proteins and Hsp90 inhibition leads to their proteasomal degradation, Hsp90 became an interesting molecular target for anti-cancer drugs.

A FRET-based assay was used to screen for modulators of the Hsp90 conformational changes. This led to the identification of two novel activators of the Hsp90 ATPase activity. One of these substances showed additional inhibitory effect when utilized at higher concentrations. The analysis of the activation mechanism revealed that the substances enhance the conformational rearrangements preceding the closed state and that its influence is distinct from the activating cochaperone Aha1. The stimulation of the Hsp90 ATPase activity by these substances in *S. cerevisiae* lead to reduced client activation suggesting Hsp90 activation as novel strategy in cancer treatment.

## **6 Publikationsliste**

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits publiziert:

Zierer, B.K. und Buchner, J. (2012). Hsp90 Chaperones. eLS. John Wiley & Sons.

Im Rahmen dieser Arbeit entstand außerdem folgende Publikation, die nicht Teil der Dissertation ist:

Eckl, J.M., Rutz, D.A., Haslbeck, V., Zierer, B.K., Reinstein, J. und Richter, K. (2013). Cdc37 (Cell division cycle 37) restricts Hsp90 (Heat shock protein 90) motility by interaction with N- and middle domain binding sites. *J Biol Chem*.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Å	Angström = 0.1 nm = 10 <sup>-10</sup> m
a.U.	<i>arbitrary Units</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Amp	Ampicillin
AMP-PNP	Adenylyl- Imidodiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	ATP Hydrolyse
ATP <sub>γ</sub> S	Adenosine 5'-(3-thiotriphosphate)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
Da	Dalton
CD	Circulardichroismus
Cm	Chloramphenicol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
<i>DpnI</i>	Restriktionsendonuklease I aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DOC	11-Deoxycorticosteron
DTT	1,4-Dithiothreitol
ε	molarer Extinktionskoeffizient
dYT	<i>double Yeast-Tryptone</i> Medium
EDTA	<i>N,N,N',N'</i> -Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
F	Fluoreszenz
(5)6-FAM	5-(and-6)- Carboxyfluorescein
FOA	5-Fluoro-Rotsäure
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
GR	Glucocorticoidrezeptor
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Hsp(s)	Hitzeschockprotein(e)
sHsp	<i>small heat shock protein</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
k <sub>cat</sub>	spezifische ATPase Aktivität in min <sup>-1</sup>
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante

$K_{Dapp}$	apparente Affinität
$k$	Apparente Rate der Signaländerung
LDH	Lactatdehydrogenase
Ni-NTA	Nickel-Nitrolotriessigsäure
$OD_{600}$	optische Dichte bei 600 nm
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
p.A.	pro Analysis
Pi	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
PBS-Puffer	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat- gepufferte Saline)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymeraseket- tenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pET	<i>plasmid for expression by T7-polymerase</i>
PK	Pyruvatkinase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PNK	Polynukleotidkinase
$[\Theta]_{MRW}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure- rest
$[\Theta]$	Molare Elliptizität
$R$	allgemeine Gaskonstante
<i>RNAse</i>	Ribonuklease
rpm	<i>revolution per minute</i> (Umdrehung pro Mi- nute)
RT	Raumtemperatur
$S_{20,w}$	Sedimentationskoeffizient nicht diffusions- korrigiert bei 20 °C in wässriger Lösung
S	Svedberg
SAXS	<i>small angle light scattering</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHR	Steroidhormonrezeptor
T4-PNK	Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4
$T_m$	Übergangsmittelpunkt thermisch induzierter Entfaltung
$t_{1/2}$	Halbwertszeit der Reaktion
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin

U	Unit (Enzymmenge, die unter Standardbedingungen einen Umsatz von 1 $\mu\text{mol}$ Substrat pro min erzeugt)
ÜNK	Übernachtskultur
(v/v)	Volumen pro Volumen
$V_{\text{max}}$	maximale Umsatzrate in $\text{min}^{-1}$
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewicht pro Volumen
yHsp90	Hsp90 aus <i>S. cerevisiae</i>



## 8 Referenzen

- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K. und Wittinghofer, A. (1997). Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol* 4, 686-689.
- Ali, M.M., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C. und Pearl, L.H. (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440, 1013-1017.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *181*, 223-230.
- Banerji, U., O'Donnell, A., Scurr, M., Pacey, S., Stapleton, S., Asad, Y., Simmons, L., Maloney, A., Raynaud, F., Campbell, M., *et al.* (2005). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 23, 4152-4161.
- Basso, A.D., Solit, D.B., Chiosis, G., Giri, B., Tschlis, P. und Rosen, N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 277, 39858-39866.
- Becker, B., Multhoff, G., Farkas, B., Wild, P.J., Landthaler, M., Stolz, W. und Vogt, T. (2004). Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp Dermatol* 13, 27-32.
- Biamonte, M.A., Van de Water, R., Arndt, J.W., Scannevin, R.H., Perret, D. und Lee, W.C. (2010). Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials. *J Med Chem* 53, 3-17.
- Bourne, H.R. (1997). G proteins. The arginine finger strikes again. *Nature* 389, 673-674.
- Burlison, J.A., Neckers, L., Smith, A.B., Maxwell, A. und Blagg, B.S. (2006). Novobiocin: redesigning a DNA gyrase inhibitor for selective inhibition of hsp90. *J Am Chem Soc* 128, 15529-15536.
- Caplan, A.J., Mandal, A.K. und Theodoraki, M.A. (2007). Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol* 17, 87-92.
- Catlett, M.G. und Kaplan, K.B. (2006). Sgt1p is a unique co-chaperone that acts as a client adaptor to link Hsp90 to Skp1p. *J Biol Chem* 281, 33739-33748.
- Chant, I.D., Rose, P.E. und Morris, A.G. (1995). Analysis of heat-shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry. *Br J Haematol* 90, 163-168.
- Chen, G., Cao, P. und Goeddel, D.V. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9, 401-410.

- Chen, M.X. und Cohen, P.T. (1997). Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett* 400, 136-140.
- Chen, M.X., McPartlin, A.E., Brown, L., Chen, Y.H., Barker, H.M. und Cohen, P.T. (1994). A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J* 13, 4278-4290.
- Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R.A., Honore, B. und Smith, D.F. (1996). Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70. *10*, 682-693.
- Chen, S. und Smith, D.F. (1998). Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* 273, 35194-35200.
- Chiosis, G., Timaul, M.N., Lucas, B., Munster, P.N., Zheng, F.F., Sepp-Lorenzino, L. und Rosen, N. (2001). A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. *Chem Biol* 8, 289-299.
- Ciocca, D.R., Clark, G.M., Tandon, A.K., Fuqua, S.A., Welch, W.J. und McGuire, W.L. (1993). Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85, 570-574.
- Conroy, S.E., Sasieni, P.D., Fentiman, I. und Latchman, D.S. (1998). Autoantibodies to the 90kDa heat shock protein and poor survival in breast cancer patients. *34*, 942-943.
- Cunningham, C.N., Southworth, D.R., Krukenberg, K.A. und Agard, D.A. (2012). The conserved arginine 380 of Hsp90 is not a catalytic residue, but stabilizes the closed conformation required for ATP hydrolysis. *Protein Sci* 21, 1162-1171.
- Daggett, V. und Fersht, A. (2003). The present view of the mechanism of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 497-502.
- Das, A.K., Cohen, P.W. und Barford, D. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 17, 1192-1199.
- DeBoer, C., Meulman, P.A., Wnuk, R.J. und Peterson, D.H. (1970). Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 23, 442-447.
- Delmotte, P. und Delmotte-Plaque, J. (1953). A new antifungal substance of fungal origin. *Nature* 171, 344.
- Dill, K.A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K.M., Yee, D.P., Thomas, P.D. und Chan, H.S. (1995). Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Sci* 4, 561-602.
- Dill, K.A. und Chan, H.S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* 4, 10-19.

- Dill, K.A. und MacCallum, J.L. (2012). The protein-folding problem, 50 years on. *338*, 1042-1046.
- Dolinski, K.J., Cardenas, M.E. und Heitman, J. (1998). CNS1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol Cell Biol* *18*, 7344-7352.
- Duina, A.A., Marsh, J.A. und Gaber, R.F. (1996). Identification of two CyP-40-like cyclophilins in *Saccharomyces cerevisiae*, one of which is required for normal growth. *12*, 943-952.
- Dutta, R. und Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* *25*, 24-28.
- Echtenkamp, F.J., Zelin, E., Oxelmark, E., Woo, J.I., Andrews, B.J., Garabedian, M. und Freeman, B.C. (2011). Global functional map of the p23 molecular chaperone reveals an extensive cellular network. *Mol Cell* *43*, 229-241.
- Eckert, K., Saliou, J.M., Monlezun, L., Vigouroux, A., Atmane, N., Caillat, C., Quevillon-Cheruel, S., Masion, K., Nicaise, M., Lazereg, S., *et al.* (2010). The Pih1-Tah1 cochaperone complex inhibits Hsp90 molecular chaperone ATPase activity. *J Biol Chem* *285*, 31304-31312.
- Eckl, J.M., Rutz, D.A., Haslbeck, V., Zierer, B.K., Reinstein, J. und Richter, K. (2013). Cdc37 (Cell division cycle 37) restricts Hsp90 (Heat shock protein 90) motility by interaction with N- and middle domain binding sites. *J Biol Chem*.
- Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* *328*, 378-379.
- Ellis, R.J. (2006). Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci* *31*, 395-401.
- Ellis, R.J. (2007). Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Adv Exp Med Biol* *594*, 1-13.
- Ellis, R.J. und Minton, A.P. (2006). Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem* *387*, 485-497.
- Falsone, S.F., Leptihn, S., Osterauer, A., Haslbeck, M. und Buchner, J. (2004). Oncogenic mutations reduce the stability of SRC kinase. *J Mol Biol* *344*, 281-291.
- Finkelstein, D.B., Strausberg, S. und McAlister, L. (1982). Alterations of transcription during heat shock of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *257*, 8405-8411.
- Freedman, R.B., Hirst, T.R. und Tuite, M.F. (1994). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* *19*, 331-336.

- Garcia-Ranea, J.A., Mirey, G., Camonis, J. und Valencia, A. (2002). p23 and HSP20/alpha-crystallin proteins define a conserved sequence domain present in other eukaryotic protein families. *FEBS Lett* 529, 162-167.
- Gill, S.C. und von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Goebel, M. und Yanagida, M. (1991). The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem Sci* 16, 173-177.
- Goetz, M.P., Toft, D., Reid, J., Ames, M., Stensgard, B., Safgren, S., Adjei, A.A., Sloan, J., Atherton, P., Vasile, V., *et al.* (2005). Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 23, 1078-1087.
- Grem, J.L., Morrison, G., Guo, X.D., Agnew, E., Takimoto, C.H., Thomas, R., Szabo, E., Grochow, L., Grollman, F., Hamilton, J.M., *et al.* (2005). Phase I and pharmacologic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 23, 1885-1893.
- Grenert, J.P., Sullivan, W.P., Fadden, P., Haystead, T.A., Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H.J., Schulte, T.W., Sausville, E., *et al.* (1997). The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem* 272, 23843-23850.
- Hagn, F., Lagleder, S., Retzlaff, M., Rohrberg, J., Demmer, O., Richter, K., Buchner, J. und Kessler, H. (2011). Structural analysis of the interaction between Hsp90 and the tumor suppressor protein p53. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1086-1093.
- Hainzl, O., Lapina, M.C., Buchner, J. und Richter, K. (2009). The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *J Biol Chem* 284, 22559-22567.
- Hainzl, O., Wegele, H., Richter, K. und Buchner, J. (2004). Cns1 is an activator of the Ssa1 ATPase activity. *J Biol Chem* 279, 23267-23273.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hartl, F.U. und Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16, 574-581.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D. und Buchner, J. (2005). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 842-846.
- Hayes, D.B. und Stafford, W.F. (2010). SEDVIEW, real-time sedimentation analysis. *Macromol Biosci* 10, 731-735.
- Hessling, M., Richter, K. und Buchner, J. (2009). Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 16, 287-293.

- Holmes, J.L., Sharp, S.Y., Hobbs, S. und Workman, P. (2008). Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* 68, 1188-1197.
- Hong, D.S., Banerji, U., Tavana, B., George, G.C., Aaron, J. und Kurzrock, R. (2013). Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): lessons learned and future directions. *Cancer Treat Rev* 39, 375-387.
- Hubert, D.A., He, Y., McNulty, B.C., Tornero, P. und Dangl, J.L. (2009). Specific Arabidopsis HSP90.2 alleles recapitulate RAR1 cochaperone function in plant NB-LRR disease resistance protein regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9556-9563.
- Janin, Y.L. (2010). ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, second season. *Drug Discov Today* 15, 342-353.
- Jhaveri, K., Taldone, T., Modi, S. und Chiosis, G. (2012). Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochim Biophys Acta* 1823, 742-755.
- Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D. und Toft, D.O. (1998). Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem* 273, 3679-3686.
- Johnson, J.L. und Craig, E.A. (2000). A role for the Hsp40 Ydj1 in repression of basal steroid receptor activity in yeast. *Mol Cell Biol* 20, 3027-3036.
- Johnson, J.L. und Toft, D.O. (1994). A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J Biol Chem* 269, 24989-24993.
- Johnson, J.L. und Toft, D.O. (1995). Binding of p23 and hsp90 during assembly with the progesterone receptor. *J Biol Chem* 270, 670-678.
- Kim, S., Schilke, B., Craig, E.A. und Horwich, A.L. (1998). Folding in vivo of a newly translated yeast cytosolic enzyme is mediated by the SSA class of cytosolic yeast Hsp70 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12860-12865.
- Kimura, E., Enns, R.E., Alcaraz, J.E., Arboleda, J., Slamon, D.J. und Howell, S.B. (1993). Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kD heat-shock protein HSP-60. *J Clin Oncol* 11, 891-898.
- Kitagawa, K., Skowyra, D., Elledge, S.J., Harper, J.W. und Hieter, P. (1999). SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol Cell* 4, 21-33.
- Koulov, A.V., Lapointe, P., Lu, B., Razvi, A., Coppinger, J., Dong, M.Q., Matteson, J., Laister, R., Arrowsmith, C., Yates, J.R., 3rd, *et al.* (2010). Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. *Mol Biol Cell* 21, 871-884.

- Krukenberg, K.A., Forster, F., Rice, L.M., Sali, A. und Agard, D.A. (2008). Multiple conformations of *E. coli* Hsp90 in solution: insights into the conformational dynamics of Hsp90. *16*, 755-765.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D. und Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* *275*, 416-420.
- Lee, C.T., Graf, C., Mayer, F.J., Richter, S.M. und Mayer, M.P. (2012). Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1. *EMBO J* *31*, 1518-1528.
- Lee, Y.T., Jacob, J., Michowski, W., Nowotny, M., Kuznicki, J. und Chazin, W.J. (2004). Human Sgt1 binds HSP90 through the CHORD-Sgt1 domain and not the tetratricopeptide repeat domain. *J Biol Chem* *279*, 16511-16517.
- Li, J., Richter, K. und Buchner, J. (2011). Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 61-66.
- Li, J., Richter, K., Reinstein, J. und Buchner, J. (2013). Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 co-chaperone cycle. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 326-331.
- Lotz, G.P., Lin, H., Harst, A. und Obermann, W.M. (2003). Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *J Biol Chem* *278*, 17228-17235.
- Louvion, J.F., Warth, R. und Picard, D. (1996). Two eukaryote-specific regions of Hsp82 are dispensable for its viability and signal transduction functions in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 13937-13942.
- Marcu, M.G., Chadli, A., Bouhouche, I., Catelli, M. und Neckers, L.M. (2000a). The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J Biol Chem* *275*, 37181-37186.
- Marcu, M.G., Schulte, T.W. und Neckers, L. (2000b). Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *J Natl Cancer Inst* *92*, 242-248.
- Marsh, J.A., Kalton, H.M. und Gaber, R.F. (1998). Cns1 is an essential protein associated with the hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin 40-dependent functions in *cpr7Delta* cells. *Mol Cell Biol* *18*, 7353-7359.
- Mayr, C., Richter, K., Lilie, H. und Buchner, J. (2000). Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90-associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae*, differ in their functional properties. *J Biol Chem* *275*, 34140-34146.
- McLaughlin, S.H., Smith, H.W. und Jackson, S.E. (2002). Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. *J Mol Biol* *315*, 787-798.

- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (2003). Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol Cell* 11, 647-658.
- Meyer, P., Prodromou, C., Liao, C., Hu, B., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Vlastic, I., Panaretou, B., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (2004). Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J* 23, 1402-1410.
- Mickler, M., Hessling, M., Ratzke, C., Buchner, J. und Hugel, T. (2009). The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol* 16, 281-286.
- Mimnaugh, E.G., Worland, P.J., Whitesell, L. und Neckers, L.M. (1995). Possible role for serine/threonine phosphorylation in the regulation of the heteroprotein complex between the hsp90 stress protein and the pp60v-src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 270, 28654-28659.
- Mollapour, M. und Neckers, L. (2012). Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta* 1823, 648-655.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I. und Massie, B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 7146-7159.
- Mosser, D.D. und Morimoto, R.I. (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23, 2907-2918.
- Muller, L., Schaupp, A., Walerych, D., Wegele, H. und Buchner, J. (2004). Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. *J Biol Chem* 279, 48846-48854.
- Mulligan, V.K. und Chakrabarty, A. (2013). Protein misfolding in the late-onset neurodegenerative diseases: Common themes and the unique case of amyotrophic lateral sclerosis. *Proteins*.
- Nathan, D.F. und Lindquist, S. (1995). Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol Cell Biol* 15, 3917-3925.
- Nathan, D.F., Vos, M.H. und Lindquist, S. (1997). In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12949-12956.
- Neckers, L. (2002). Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8, S55-61.
- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M., Takagi, T. und Yokoyama, K. (1995). Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem* 233, 1-8.

- Obermann, W.M., Sonderrmann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P. und Hartl, F.U. (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 143, 901-910.
- Oppermann, H., Levinson, W. und Bishop, J.M. (1981). A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 1067-1071.
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J* 17, 4829-4836.
- Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J.K., Singh, S., Millson, S.H., Clarke, P.A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., *et al.* (2002). Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell* 10, 1307-1318.
- Park, S.J., Borin, B.N., Martinez-Yamout, M.A. und Dyson, H.J. (2011). The client protein p53 adopts a molten globule-like state in the presence of Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 18, 537-541.
- Pick, E., Kluger, Y., Giltneane, J.M., Moeder, C., Camp, R.L., Rimm, D.L. und Kluger, H.M. (2007). High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* 67, 2932-2937.
- Piper, P.W., Millson, S.H., Mollapour, M., Panaretou, B., Siligardi, G., Pearl, L.H. und Prodromou, C. (2003). Sensitivity to Hsp90-targeting drugs can arise with mutation to the Hsp90 chaperone, cochaperones and plasma membrane ATP binding cassette transporters of yeast. *Eur J Biochem* 270, 4689-4695.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Morishima, Y. und Murphy, P.J. (2004). Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40, 41-58.
- Pratt, W.B., Morishima, Y., Murphy, M. und Harrell, M. (2006). Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 111-138.
- Pratt, W.B. und Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. 228, 111-133.
- Prodromou, C., Nuttall, J.M., Millson, S.H., Roe, S.M., Sim, T.S., Tan, D., Workman, P., Pearl, L.H. und Piper, P.W. (2009). Structural basis of the radicicol resistance displayed by a fungal hsp90. *ACS Chem Biol* 4, 289-297.
- Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Roe, S.M., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J* 19, 4383-4392.
- Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1997a). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90, 65-75.

- 
- Prodromou, C., Roe, S.M., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1997b). A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nat Struct Biol* 4, 477-482.
- Ratzke, C., Mickler, M., Hellenkamp, B., Buchner, J. und Hugel, T. (2010). Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16101-16106.
- Retzlaff, M., Hagn, F., Mitschke, L., Hessling, M., Gugel, F., Kessler, H., Richter, K. und Buchner, J. (2010). Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. *Mol Cell* 37, 344-354.
- Retzlaff, M., Stahl, M., Eberl, H.C., Lagleder, S., Beck, J., Kessler, H. und Buchner, J. (2009). Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Rep* 10, 1147-1153.
- Richter, K. (2003). Die ATP-Hydrolyse des molekularen Chaperon Hsp90 und ihre Regulation durch Co-Chaperone.
- Richter, K., Haslbeck, M. und Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 40, 253-266.
- Richter, K., Meinschmidt, B. und Buchner, J. (2008). Hsp90: From Dispensable Heat Shock Protein to Global Player. In *Protein Folding Handbook* (Wiley-VCH Verlag).
- Richter, K., Moser, S., Hagn, F., Friedrich, R., Hainzl, O., Heller, M., Schlee, S., Kessler, H., Reinstein, J. und Buchner, J. (2006). Intrinsic inhibition of the Hsp90 ATPase activity. *J Biol Chem* 281, 11301-11311.
- Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O. und Buchner, J. (2001). Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. *J Biol Chem* 276, 33689-33696.
- Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O., Reinstein, J. und Buchner, J. (2003). Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the atpase cycle. *J Biol Chem* 278, 10328-10333.
- Richter, K., Reinstein, J. und Buchner, J. (2002). N-terminal residues regulate the catalytic efficiency of the Hsp90 ATPase cycle. *J Biol Chem* 277, 44905-44910.
- Richter, K., Walter, S. und Buchner, J. (2004). The Co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of Hsp90 to the progression of the chaperone cycle. *J Mol Biol* 342, 1403-1413.
- Roe, S.M., Ali, M.M., Meyer, P., Vaughan, C.K., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C. und Pearl, L.H. (2004). The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell* 116, 87-98.

- Roe, S.M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. und Pearl, L.H. (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* 42, 260-266.
- Scheibel, T. und Buchner, J. (2006). Protein aggregation as a cause for disease. *Handb Exp Pharmacol*, 199-219.
- Scheibel, T., Siegmund, H.I., Jaenicke, R., Ganz, P., Lilie, H. und Buchner, J. (1999). The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1297-1302.
- Schmid, A.B., Lagleder, S., Grawert, M.A., Rohl, A., Hagn, F., Wandinger, S.K., Cox, M.B., Demmer, O., Richter, K., Groll, M., *et al.* (2012). The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop. *EMBO J* 31, 1506-1517.
- Schmid, F.X. (1993). Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22, 123-142.
- Shiau, A.K., Harris, S.F., Southworth, D.R. und Agard, D.A. (2006). Structural Analysis of *E. coli* hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* 127, 329-340.
- Siligardi, G., Hu, B., Panaretou, B., Piper, P.W., Pearl, L.H. und Prodromou, C. (2004). Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. *J Biol Chem* 279, 51989-51998.
- Siligardi, G., Panaretou, B., Meyer, P., Singh, S., Woolfson, D.N., Piper, P.W., Pearl, L.H. und Prodromou, C. (2002). Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J Biol Chem* 277, 20151-20159.
- Silverstein, A.M., Grammatikakis, N., Cochran, B.H., Chinkers, M. und Pratt, W.B. (1998). p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J Biol Chem* 273, 20090-20095.
- Smith, D.F., Schowalter, D.B., Kost, S.L. und Toft, D.O. (1990). Reconstitution of progesterone receptor with heat shock proteins. *4*, 1704-1711.
- Smith, D.F. und Toft, D.O. (1993). Steroid receptors and their associated proteins. *7*, 4-11.
- Soroka, J., Wandinger, S.K., Mausbacher, N., Schreiber, T., Richter, K., Daub, H. und Buchner, J. (2012). Conformational switching of the molecular chaperone Hsp90 via regulated phosphorylation. *Mol Cell* 45, 517-528.
- Stafford, W.F., 3rd (1992). Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal Biochem* 203, 295-301.
- Street, T.O., Lavery, L.A. und Agard, D.A. (2011). Substrate binding drives large-scale conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. *Mol Cell* 42, 96-105.

- Svergun, D.I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Cryst*, 495-503.
- Taipale, M., Jarosz, D.F. und Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 515-528.
- Toogun, O.A., Dezwaan, D.C. und Freeman, B.C. (2008). The hsp90 molecular chaperone modulates multiple telomerase activities. *Mol Cell Biol* 28, 457-467.
- Tsutsumi, S., Mollapour, M., Graf, C., Lee, C.T., Scroggins, B.T., Xu, W., Haslerova, L., Hessling, M., Konstantinova, A.A., Trepel, J.B., *et al.* (2009). Hsp90 charged-linker truncation reverses the functional consequences of weakened hydrophobic contacts in the N domain. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1141-1147.
- Tsutsumi, S., Scroggins, B., Koga, F., Lee, M.J., Trepel, J., Felts, S., Carreras, C. und Neckers, L. (2008). A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. *Oncogene* 27, 2478-2487.
- Uehara, Y., Murakami, Y., Mizuno, S. und Kawai, S. (1988). Inhibition of transforming activity of tyrosine kinase oncogenes by herbimycin A. *Virology* 164, 294-298.
- Ugele, M., Sasse, F., Knapp, S., Fedorov, O., Zubriene, A., Matulis, D. und Maier, M.E. (2009). Propionate analogues of zearalenone bind to Hsp90. *Chembiochem* 10, 2203-2212.
- Vanden Berghe, T., Kalai, M., van Loo, G., Declercq, W. und Vandenabeele, P. (2003). Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. *J Biol Chem* 278, 5622-5629.
- Vaughan, C.K., Mollapour, M., Smith, J.R., Truman, A., Hu, B., Good, V.M., Panaretou, B., Neckers, L., Clarke, P.A., Workman, P., *et al.* (2008). Hsp90-dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Mol Cell* 31, 886-895.
- Vaughan, C.K., Piper, P.W., Pearl, L.H. und Prodromou, C. (2009). A common conformationally coupled ATPase mechanism for yeast and human cytoplasmic HSP90s. *FEBS J* 276, 199-209.
- Walerych, D., Kudla, G., Gutkowska, M., Wawrzynow, B., Muller, L., King, F.W., Helwak, A., Boros, J., Zyllicz, A. und Zyllicz, M. (2004). Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 279, 48836-48845.
- Walter, S. und Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *41*, 1098-1113.
- Wandinger, S.K., Suhre, M.H., Wegele, H. und Buchner, J. (2006). The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J* 25, 367-376.

- Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D.M., Koulov, A.V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., *et al.* (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127, 803-815.
- Weaver, A.J., Sullivan, W.P., Felts, S.J., Owen, B.A. und Toft, D.O. (2000). Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone. *J Biol Chem* 275, 23045-23052.
- Wegele, H., Muschler, P., Bunck, M., Reinstein, J. und Buchner, J. (2003). Dissection of the contribution of individual domains to the ATPase mechanism of Hsp90. *J Biol Chem* 278, 39303-39310.
- Weibezahn, J., Schlieker, C., Tessarz, P., Mogk, A. und Bukau, B. (2005). Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation. *Biol Chem* 386, 739-744.
- Weikl, T., Abelmann, K. und Buchner, J. (1999). An unstructured C-terminal region of the Hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. *J Mol Biol* 293, 685-691.
- Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J. und Buchner, J. (2000). C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. *J Mol Biol* 303, 583-592.
- Whitesell, L. und Lindquist, S.L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 761-772.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. und Neckers, L.M. (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8324-8328.
- Williams, J.C., Weijland, A., Gonfloni, S., Thompson, A., Courtneidge, S.A., Superti-Furga, G. und Wierenga, R.K. (1997). The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J Mol Biol* 274, 757-775.
- Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. und Rosen, N. (2007). Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci* 1113, 202-216.
- Xu, W., Harrison, S.C. und Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.
- Xu, Y. und Lindquist, S. (1993). Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7074-7078.
- Xu, Y., Singer, M.A. und Lindquist, S. (1999). Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 109-114.

- 
- Yang, J., Roe, S.M., Cliff, M.J., Williams, M.A., Ladbury, J.E., Cohen, P.T. und Barford, D. (2005). Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *EMBO J* 24, 1-10.
- Yu, X.M., Shen, G., Neckers, L., Blake, H., Holzbeierlein, J., Cronk, B. und Blagg, B.S. (2005). Hsp90 inhibitors identified from a library of novobiocin analogues. *J Am Chem Soc* 127, 12778-12779.
- Zhang, M., Kadota, Y., Prodromou, C., Shirasu, K. und Pearl, L.H. (2010). Structural basis for assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD protein complexes: implications for chaperoning of NLR innate immunity receptors. *Mol Cell* 39, 269-281.
- Zhao, R., Kakihara, Y., Gribun, A., Huen, J., Yang, G., Khanna, M., Costanzo, M., Brost, R.L., Boone, C., Hughes, T.R., *et al.* (2008). Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J Cell Biol* 180, 563-578.
- Zhao, R., Leung, E., Gruner, S., Schapira, M. und Houry, W.A. (2010). Tamoxifen enhances the Hsp90 molecular chaperone ATPase activity. *PLoS One* 5, e9934.
- Zierer, B.K. und Buchner, J. (2012). Hsp90 Chaperones. eLS. John Wiley & Sons.
- Zuehlke, A. und Johnson, J.L. (2010). Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* 93, 211-217.
- Zurawska, A., Urbanski, J., Matulienė, J., Baraniak, J., Klejman, M.P., Filipek, S., Matulis, D. und Bieganski, P. (2010). Mutations that increase both Hsp90 ATPase activity in vitro and Hsp90 drug resistance in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1803, 575-583.
- Zwanzig, R., Szabo, A. und Bagchi, B. (1992). Levinthal's paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 20-22.



## ***Danksagung***

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2009 bis Juni 2013 am Lehrstuhl für Biotechnologie an der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner möchte ich mich herzlich für die Überlassung dieses Themas bedanken, für das Vertrauen in meine Arbeit und die Freiheit bei der Bearbeitung dieses umfangreichen Themenkomplexes. Durch seine zahlreichen guten Ratschläge, nicht nur wissenschaftlicher Art, und seine stete Hilfsbereitschaft hat er erheblichen Anteil an dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Gunter Fischer für die Möglichkeit an der Max Plank Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung nach Modulatoren der Hsp90 Konformationsänderungen zu *screenen*. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Matthias Weiwad, danke ich für die Unterstützung während meiner Halle Aufenthalte.

Vielen Dank auch an meine Kollegen des Lehrstuhls Biotechnologie insbesondere denen aus Büro 2 Jirka Peschek, Christopher Stratil, Katrin Back, Christine John, Marina Daake und Franziska Toppel sowie meinen Kollegen aus Labor 9 Martin Hessling, Alexandra Rehn und Oliver Lorenz für ihren fachlichen Rat, ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit. Bei Veronika Haslbeck möchte ich mich für die angenehme Gestaltung der diversen Halle Aufenthalte bedanken. Besonderer Dank gilt Eva Herold, Katrin und Christine für die Ablenkung vom Laboralltag, bei der der ein oder andere Korken knallte.

Bei Klaus Richter möchte ich mich für das stets offene Ohr und die zahlreichen Diskussionen besonders bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich vor allem auch bei meinen Eltern und Marcus für ihre vielfältige Unterstützung.



## ***Erklärung***

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



Bettina K. Zierer

München, 19.06.2013