

Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Die ATP-Hydrolyse des molekularen Chaperons Hsp90
und ihre Regulation durch Co-Chaperone**

Klaus Richter

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

Vorsitzender

Univ-Prof. Dr. H. Kessler

Prüfer der Dissertation

1. Univ-Prof. Dr. J. Buchner
2. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
3. Univ-Prof. Dr. S. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 28.01.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht

und durch die Fakultät für Chemie am 02.04.2003 angenommen.

1. Einleitung	9
1.1 Proteinfaltung in vitro	9
1.2 Katalysierte Proteinfaltung in vivo	11
1.3 Molekulare Chaperone	12
1.4 Hsp90 als "aktives" Chaperon	15
1.4.1 Nukleotidbindung und -hydrolyse durch Hsp90	15
1.4.2 Struktur von Hsp90.....	17
1.4.3 Die ATP-Hydrolyse homologer Proteine	18
1.4.4 Interaktion von Hsp90 mit nicht-nativen Proteinen	20
1.5 Das eukaryontische Hsp90-System.....	21
1.5.1 Das Protein Hop/Sti1	22
1.5.2 Die großen Peptidyl-prolyl- <i>cis/trans</i> Isomerasen.....	23
1.5.3 Das Protein p23/Sba1	25
1.5.4 Das Protein Cdc37	26
1.5.5 Weitere Partnerproteine von Hsp90	27
1.6 Hsp90 in vivo	27
1.6.1 Phylogenie des Hsp90-Systems.....	28
1.6.2 HtpG bei Prokaryonten.....	30
1.6.3 Hsp90-System bei <i>S. cerevisiae</i>	31
1.6.4 Hsp90 bei Eukaryonten	33
1.6.5 Die eukaryontischen Partnerproteine des Hsp90-Systems	34
1.6.6 Natürliche Hsp90-Inhibitoren.....	35
1.7 Hsp90- Substrate	36
1.7.1 Die Aktivierung von Glucocorticoidrezeptoren	37
1.7.2 Die Aktivierung von Kinasen durch Hsp90	39
2. Problemstellung	41
3. Material und Methoden	43
3.1 Materialien	43
3.1.1 Chemikalien.....	43
3.1.2 Größenstandards und Kits	44
3.1.3 Proteine und Antikörper	44
3.1.4 Chromatographiematerialien	45
3.1.5 Sonstige Materialien	46

3.1.6	Geräte.....	47
3.1.7	Computerprogramme	49
3.2	Verwendete Organismen und ihre Kultivierung.....	50
3.2.1	Stämme.....	50
3.2.2	Medien	51
3.2.3	Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i>	54
3.2.4	Anzucht und Aufbewahrung von <i>S. cerevisiae</i>	54
3.3	Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	54
3.3.1	Plasmide.....	54
3.3.2	Oligonukleotide.....	57
3.3.3	Molekularbiologische Lösungen.....	58
3.3.4	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	61
3.3.5	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	62
3.3.6	Plasmid Cracking.....	62
3.3.7	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese.....	62
3.3.8	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	63
3.3.9	Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten.....	63
3.3.10	DNA-Sequenzanalyse.....	63
3.3.11	Transformation von <i>E.coli</i>	63
3.3.12	Lithiumacetat-Methode zur Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	64
3.3.13	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> durch Elektroporation	64
3.3.14	PCR-Amplifikation.....	65
3.3.15	DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme	66
3.3.16	Dephosphorylierung von DNA-Enden	66
3.3.17	Ligieren von DNA-Fragmenten.....	67
3.4	Methoden zur Proteinreinigung	67
3.4.1	Ionenaustauschchromatographie.....	67
3.4.2	Gelfiltrationschromatographie	68
3.4.3	Affinitätschromatographie	68
3.4.4	Hydroxyapatit-Chromatographie	69
3.4.5	Proteinpräzipitation.....	69
3.4.6	Aufkonzentrierung von Proteinen.....	69
3.4.7	Veränderung der Pufferzusammensetzung	70
3.4.8	Standardreinigung von Hsp90 aus <i>S. cerevisiae</i>	70

3.4.9	Standardreinigung His ₆ -getaggtter Proteine	71
3.4.10	Standardreinigung von Citratsynthase	72
3.5	Proteinanalytische Arbeitstechniken	73
3.5.1	Lösungen für proteinchemische Methoden	73
3.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	75
3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976).....	75
3.5.4	Native Gelelektrophorese	75
3.5.5	Färbung nach Fairbanks (Fairbanks <i>et al.</i> , 1971).....	76
3.5.6	Silberfärbung (Heukeshoven & Dernick, 1988).....	76
3.5.7	Immunoblotting (Western Blot)	77
3.5.8	Protein-Sequenzblot zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen.....	78
3.5.9	Chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd	78
3.5.10	Analytische Gelfiltration.....	79
3.5.11	Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation.....	81
3.5.12	Interaktionsanalyse durch Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC).....	81
3.5.13	Kristallisation von Proteinen.....	82
3.6	Spektroskopische Methoden	83
3.6.1	UV-Absorptionsspektroskopie und Bestimmung der Proteinkonzentration	83
3.6.2	Fluoreszenzspektroskopie.....	84
3.6.3	CD-Spektroskopie	87
3.6.4	Surface Plasmon Resonance Spektroskopie (SPR)	90
3.7	Aktivitätstests für Proteine	92
3.7.1	ATPase-Aktivitätstest mit EnzCheck	92
3.7.2	ATPase-Aktivitätstest mit ATP-regenerierendem System	93
3.7.3	Einfluss von Chaperonen auf die thermische Aggregation der Citratsynthase	96
3.7.4	Einfluss von Chaperonen auf die thermische Inaktivierung der Citratsynthase...	96
3.7.5	Einfluss von Chaperonen auf die Aggregation der Insulin B-Kette.....	98
4.	Ergebnisse und Diskussion	99
4.1	Die Domänenstruktur von Hsp90.....	99
4.1.1	Identifizierung von Domänen anhand eines Hydrophathieblottes	99
4.1.2	Reinigung der rekombinanten Proteine	101
4.1.3	Untersuchung der Struktur der gereinigten Fragmente	102
4.1.4	Stabilitätsuntersuchung der Hsp90-Fragmente.....	103

4.1.5	Untersuchung der Quartärstruktur der Hsp90 – Fragmente.....	106
4.1.6	Nukleotidbindung an Hsp90-Fragmente.....	111
4.1.7	Magnesium- und ADP-Bindung an N210 sind kooperativ.....	113
4.1.8	Identifikation der substratbindenden Domäne.....	115
4.1.9	Diskussion zur strukturellen Organisation von Hsp90.....	119
4.2	Untersuchung der ATPase-Aktivität von Hsp90.....	126
4.2.1	Die ATPase-Aktivität der Hsp90-Fragmente.....	126
4.2.2	Einfluss der Quartärstruktur auf die ATP-Hydrolyse.....	127
4.2.3	Bildung von Hsp90-Heterodimeren mit C-terminalen Fragmenten.....	128
4.2.4	Bildung von Hsp90-Heterodimeren mit inaktiven Punktmutanten.....	131
4.2.5	Untersuchung zur Dynamik der Dimerbildung bei Hsp90.....	133
4.2.6	Erzeugung von Mutanten zur Klärung des Aktivierungsmechanismus.....	134
4.2.7	Untersuchung der Struktur und Stabilität der Mutanten.....	135
4.2.8	Einfluss der Mutationen auf die Nukleotidbindung.....	137
4.2.9	Einfluss der N-terminalen Deletionen auf die ATP-Hydrolyse.....	140
4.2.10	Heterodimerbildung der Deletionskonstrukte mit Hsp90.....	141
4.2.11	Kristallisation von $\Delta 24$ -N210.....	143
4.2.12	$\Delta 8$ -Hsp90 bildet Homodimere mit höherer Affinität.....	145
4.2.13	$\Delta 8$ -Hsp90 kann durch Bildung von Heterodimeren stark stimuliert werden.....	147
4.2.14	<i>In vivo</i> Effekte der beschriebenen Fragmente.....	148
4.2.15	Diskussion zur Hydrolysereaktion bei Hsp90.....	151
4.3	Die Interaktion der Cochaperone Sti1, Cpr6 und Sba1 mit Hsp90.....	156
4.3.1	Die Bindung von Sti1 und Cpr6 an Hsp90 ist hochaffin und dynamisch.....	156
4.3.2	Die Quartärstruktur des Hsp90•Sti1-Komplexes.....	159
4.3.3	Die Inhibition von Hsp90 durch Sti1 ist KCl-abhängig.....	161
4.3.4	Sti1 ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor.....	162
4.3.5	Nukleotidbindung an den Sti1-Hsp90-Komplex.....	163
4.3.6	Die C-terminale Sti1-Bindestelle von Hsp90.....	165
4.3.7	Weitere Bindestellen zwischen Sti1 und Hsp90.....	167
4.3.8	Die N-terminale Sti1-Bindestelle von Hsp90.....	169
4.3.9	Die Inhibition von $\Delta 8$ -Hsp90 ist erschwert.....	170
4.3.10	ATP verringert die Bindung von Sti1 an $\Delta 8$ -Hsp90.....	171
4.3.11	Die Bindung von Sba1 erfordert alle drei Domänen von Hsp90.....	173

4.3.12	Sba1 inhibiert die ATPase-Aktivität von $\Delta 8$ -Hsp90	174
4.3.13	Sba1 bindet ATP-spezifisch an $\Delta 8$ -Hsp90	175
4.3.14	Diskussion zur Interaktion von Sba1, Cpr6 und Sti1 mit Hsp90	176
5.	Zusammenfassung	183
6.	Literaturverzeichnis	187
7.	Abkürzungen	206
8.	Veröffentlichungen.....	209

1. Einleitung

1.1 Proteinfaltung *in vitro*

Proteinfaltung ist der Prozess, bei dem sich aus der linearen Abfolge von Aminosäuren eine definierte dreidimensionale Struktur ergibt, die die Grundvoraussetzung für die Aktivität jedes Proteins ist (Dill *et al.*, 1995). Dieser Prozess, der aufgrund der Vielzahl gleichzeitig ausgebildeter Interaktionen kooperativ verläuft (Go & Taketomi, 1978; Kortemme *et al.*, 1998), ist nach wie vor nicht vollständig verstanden. So ist es bisher nur begrenzt möglich, aus der Primärstruktur eines Proteins die korrekte Faltung zu ermitteln, oder die Funktion des Proteins vorherzusagen (Fersht & Daggett, 2002). Auch der zeitliche Ablauf des Faltungsvorganges ist in weiten Zügen noch unklar. Über die Jahre wurde jedoch ein Konsensusmodell entwickelt, das für die meisten bisher analysierten Proteine zutrifft. Eine Grundüberlegung dazu war, dass es einem Protein alleine zeitlich nicht möglich ist alle Konformationen auszuprobieren, zu denen die Aminosäurekette fähig wäre (Levinthal, 1968), so dass gerichtete Faltungswege postuliert wurden. Auf diesen führt der Faltungsvorgang über die Ausbildung von Faltungskernen (Fersht, 1997) und einem schnellen hydrophoben Kollaps zu einer Struktur, die bereits eine partiell ausgebildete Sekundärstruktur besitzt. Dieser Prozess ist vor allem entropisch getrieben, da eine Ansammlung der hydrophoben Reste im Inneren des Moleküls eine Abschirmung dieser Gruppen durch geordnete Wassermoleküle nicht mehr erforderlich macht (Baldwin, 1989; Baldwin, 2002). Im Weiteren werden dann die hydrophoben Reste im Inneren geordnet, was zu einem fast vollständigen Wasserausschluss im Inneren des Proteins führt (Creighton, 1990). Damit verbunden ist auch die vollständige Ausbildung der Tertiärstruktur. Der Weg, den das individuelle Protein bis zu diesem Punkt durchläuft, ist nicht klar definiert, sondern eine Folge statistischer Ereignisse. Die Ursache dafür liegt darin, dass auch der vollständig entfaltete Zustand nicht definierbar ist, sondern einem Ensemble verschiedener Strukturen entspricht, die sich in ihrem Energiegehalt nicht wesentlich unterscheiden (Shortle, 1996). Diese Strukturen können durchaus noch Reststruktur aufweisen (Neri *et al.*, 1992; Shortle & Ackerman, 2001). Auf dem Weg der Strukturfindung bewegt sich das Polypeptid auf parallelen Wegen zu energieärmeren Zuständen, um schließlich in einem Energieminimum seine Struktur zu finden (Dill *et al.*, 1995; Veitshans *et al.*, 1997; Wolynes *et al.*, 1996). Veranschaulicht wird dieser Prozess

durch einen Trichter, bei dem der Rand den verschiedenen höherenergetischen entfalteten Zuständen entspricht, die Innenwand der Energie-Potential-Fläche ΔG während des Faltungsweges und der Auslauf dem Energieminimum eines gefalteten Zustandes (Dill & Chan, 1997; Gruebele, 2002).

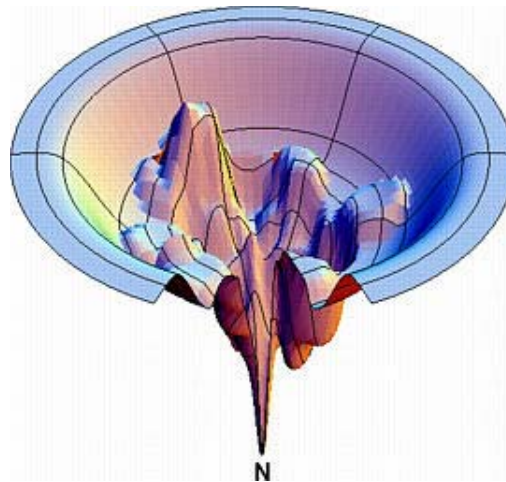


Abbildung 1-1: Faltungstrichter nach Dill & Chan (1997)

Die Faltung erfolgt demnach entlang eines Gradienten, der durch die Zustandsfunktion ΔG gebildet wird. Der native Faltungszustand befindet sich in einem definierten Zustand mit minimaler Energie, während der entfaltete Zustand durch eine Vielzahl energetisch sehr ähnlicher Zustände am Rand des Trichters beschrieben wird.

Nach wie vor ist nicht verallgemeinernd geklärt, ob dieses Minimum tatsächlich dem globalen Energieminimum entspricht (Anfinsen, 1973) oder durch ein kinetisch zugängliches lokales Minimum gebildet wird (Creighton, 1990). Diese Betrachtungen entsprechen nahezu vollständig den Beobachtungen, die durch die Untersuchung relativ kleiner Proteine erhalten wurden. Bei Proteinen, die aufgrund ihrer Größe aus mehreren Domänen bestehen, bilden diese häufig eigenständige Faltungseinheiten, so dass der Faltungsprozess in den einzelnen Domänen parallel abläuft. Die Faltung von Domänen bildet dann die Grundlage für eine spätere Domänenassoziation und für die Ausbildung einer Quartärstruktur, die durch die Assemblierung mit weiteren Proteinen erreicht werden kann (Jaenicke & Rudolph, 1986).

Die Untersuchung der Proteinfaltung *in vitro* basiert auf der Annahme, dass die dreidimensionale Struktur eines Proteins durch die Aminosäuresequenz vollständig determiniert ist. Dieses Dogma der Proteinfaltung wurde seit Anfinsens bahnbrechenden Experimenten mit RNase A (Anfinsen *et al.*, 1961) durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt (Creighton, 1975; Wetlaufer, 1973), bei denen es gelang, aus einem vollständig entfalteten Polypeptid wieder ein funktionelles Protein zu erhalten. Dennoch wurde festgestellt, dass die vollständige Rückfaltung eines Proteins in den meisten Fällen nicht möglich ist, sondern

Konkurrenzreaktionen die Ausbeute erheblich reduzieren. Nicht zuletzt die relativ geringe Energiedifferenz zwischen entfaltetem Zustand und gefaltetem Zustand (4-60 kJ/mol) ist dafür verantwortlich (Fersht & Daggett, 2002). Besonders in der ersten Faltungsphase, die dadurch gekennzeichnet ist, dass hydrophobe Oberflächen noch exponiert werden, kommt es häufig zur Missfaltung oder Aggregation der Polypeptidkette (Jaenicke & Rudolph, 1986). Die Aggregation stellt in den meisten Fällen einen irreversiblen Vorgang dar, so dass die beteiligten Proteine vermutlich nicht mehr zurückgewonnen werden können.

1.2 Katalysierte Proteinfaltung in vivo

Die unkontrollierte Aggregation von Proteinen ist für die lebende Zelle in vielerlei Hinsicht fatal. Sie führt neben dem Verlust von aktiven Proteinen zur Störung zellulärer Vorgänge, weshalb die Aggregationsanfälligkeit spezifischer Proteine auch als Ursache für eine Reihe neurodegenerativer Krankheiten vermutet wird. Die bei der Alzheimerschen Krankheit (Wetzel, 1997) und bei Prionerkrankungen (Prusiner, 1997) gefundenen Eiweißablagerungen im Gehirn von Säugern werden durch Proteinaggregate gebildet, die vermutlich zum Absterben der umliegenden Neuronen führen.

Bei einer zellulären Proteinkonzentration von bis zu 200 mg/ml (Morimoto et al., 1994) und einer Neusynthese von 60000 Proteinen pro Minute (Lorimer, 1996) ist schwerlich die Aggregation zu vermeiden, weshalb in der Zelle mehrere Mechanismen Anwendung finden, die auf Faltungshelfer-Proteinen beruhen (Hartl, 1996). Ein erster Ansatz ist es, die Konzentration von instabilen Faltungsintermediaten, die sich während des Faltungsvorganges bilden, möglichst gering zu halten. Hierzu ist es besonders hilfreich, langsam ablaufende Faltungsreaktionen zu beschleunigen, auch wenn diese meist erst gegen Ende des Faltungsvorganges auftreten (Gething & Sambrook, 1992). Für zwei dieser Reaktionen, die Bildung korrekter Disulfidbrücken (Darby *et al.*, 1994) und die Isomerisierung der Prolyl-Peptidbindung (Brandts *et al.*, 1975), haben sich evolutiv Faltungskatalysatoren durchgesetzt, die diese Reaktionen um ein Vielfaches beschleunigen (Bardwell, 1997; Schmid, 1997b). Während die Disulfidverbrückung von Proteinen im innerzellulären Bereich keine Rolle spielt, finden sich eine ganze Reihe intrazellulärer Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen), die sich durch einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus auszeichnen. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, binden die PPIasen ihre Substrate in einem

Übergangszustand, der einer teilweise rotierten $C_{Xaa}-N_{Prolin}$ Bindung entspricht, und senken dadurch die hohe Aktivierungsenergie für die Rotation um diese Bindung (Fischer, 1994a). Trotz dieser Gemeinsamkeit unterscheiden sich die PPIasen erheblich in Größe, Struktur und Substratspezifität. Aufgrund der strukturellen Unterschiede unterteilt man die PPIasen deshalb in die Klassen der Cyclophiline, der FK506-bindenden Proteine (FKBPs) und der Parvuline. Die Bedeutung dieser Proteine wird auch dadurch hervorgehoben, dass sich mit den Substanzen Rapamycin, Cyclosporin, und FK506 natürliche makrozyklische Inhibitoren finden, die selektiv die PPIase-Aktivität inhibieren (Fischer, 1994b) und therapeutisch als Immunsuppressiva eingesetzt werden.

1.3 Molekulare Chaperone

Neben den Faltungskatalysatoren existieren Proteine, die spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen interagieren und somit direkt in Konkurrenz zu Aggregationsreaktionen treten (Buchner, 1996; Walter & Buchner, 2002). Diese Proteine werden als molekulare Chaperone bezeichnet. Homologieuntersuchungen zeigen, dass sich die meisten molekularen Chaperone in eine von fünf Klassen gliedern lassen, die nahezu ubiquitär zu finden sind. Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie bei ihren Substraten hydrophobe Oberflächen erkennen und dass sie unter zellulären Stressbedingungen, zum Beispiel Hitzestress, von der Zelle überexprimiert werden (Ellis, 1987).

Dem aktiven Faltungshelfer am nächsten kommt dabei die Klasse der Hsp60-Proteine, der auch das *E. coli* Protein GroEL und das humane CCT angehören. Diese Proteine bilden hocholigomere Komplexe, in denen sie die aggregationsanfälligen Proteine isolieren, und in einer ATP-abhängigen Reaktion die Faltungsfindung unterstützen. Die Affinität von GroEL zu den hydrophoben Substratproteinen ist dabei durch die Bindung von ADP und ATP beeinflussbar (Fenton & Horwich, 1997). So ist eine Bindung von Substraten an den nukleotidfreien Ring sehr stark, die Bindung von ATP und des Co-Chaperons GroES führt dann jedoch zu einer Konformationsänderung in deren Zusammenhang die Bindestellen für Substrate nicht mehr zugänglich sind (Xu *et al.*, 1997). Das nicht-native Protein findet sich in einem Hohlraum im Inneren des GroEL/GroES-Systems wieder und kann hier bis zu seiner Freisetzung, die durch die Hydrolyse des ATP eingeleitet wird (Rye *et al.*, 1997), zu seiner

nativen Struktur finden. Strukturelle Untersuchungen haben dabei viel zum Verständnis dieser molekularen Maschine beigetragen (Braig *et al.*, 1994; Chen & Sigler, 1999; Xu *et al.*, 1997).

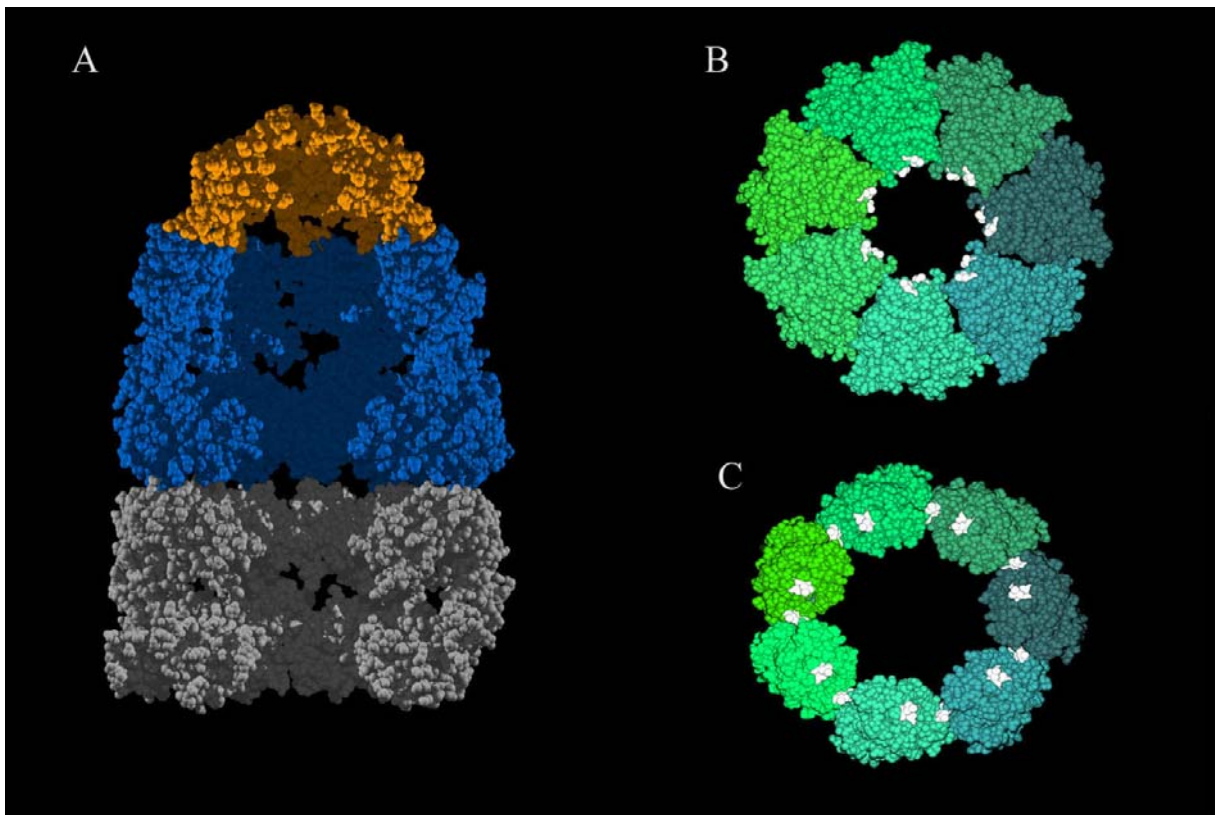


Abbildung 1-2: Kristallstrukturen von GroEL

GroEL bildet eine oligomere Struktur, bestehend aus 14 GroEL-Untereinheiten und 7 Untereinheiten GroES (pdb accession number 1AON). Der offen dargestellte Komplex ist in Abbildung A zu sehen, wobei die unteren Ringe (grau und blau) von GroEL gebildet werden, der obere von GroES (orange). Abbildung B zeigt den Blick von oben auf den Ring aus sieben GroEL-Untereinheiten im nukleotidfreien Zustand, Abbildung C zeigt denselben Blick nach Bindung von Nukleotid und GroES. Die Vergrößerung des inneren Hohlraumes und die Bewegung der hydrophoben Interaktionsstelle für Substrate (weiß markierte Aminosäuren) ist deutlich zu erkennen (Xu *et al.*, 1997).

Die umfangreichste Klasse der Chaperone wird von den Hsp70 Proteinen gebildet. Proteine dieser Klasse wurden, mit Ausnahme einiger Archaeenarten, in allen Organismen nachgewiesen. Allein in *S. cerevisiae* wurden 14 verschiedene Gene identifiziert (Craig & Yan, 1999), und Vertreter dieser Klasse werden auch in den größeren zellulären Kompartimenten gefunden. Hsp70-Proteine bestehen aus einer nukleotidbindenden Domäne und einer proteinbindenden Domäne, die sich in ihren Aktivitäten gegenseitig beeinflussen (Bukau & Horwich, 1998). Die Kristallstruktur der substratbindenden Domäne zeigt, dass die Geometrie dieser Bindestelle vor allem für hydrophobe lineare Peptidsequenzen geschaffen

ist (Zhu *et al.*, 1996). Für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wurde nachgewiesen, dass die Anwesenheit von Hsp70-Proteinen erforderlich ist. Dazu gehören die Translokation von Proteinen durch Membranen (Ungermann *et al.*, 1994), die Rückfaltung von aggregierten Proteinen (Goloubinoff *et al.*, 1999) und eine Beteiligung an der Umordnung des Cytoskeletts (Liang & MacRae, 1997). Die Aktivität von Hsp70 wird dabei von den Co-Chaperonen Hsp40 und GrpE reguliert, die den ATP-Umsatz kontrollieren und für die Rückfaltung von Proteinen *in vitro* essentiell sind (Liberek *et al.*, 1991; Schroder *et al.*, 1993; Wall *et al.*, 1994).

Andere Chaperone, besonders solche der Klasse der “kleinen Hitzeschockproteine”, sind vor allem dafür erforderlich, Aggregationsprozesse zu vermeiden oder zu kontrollieren (Horwitz, 1992; Jakob & Buchner, 1994). Dazu binden diese Proteine spezifisch an entfaltete Proteine und bilden lösliche hocholigomere Komplexe mit ihren Substratproteinen (Ehrnsperger *et al.*, 1997a; Haslbeck *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1998). Eine Rückfaltung der Substrate in die aktive Form konnte für das *E. coli*-System demonstriert werden. Dazu sind jedoch weitere Chaperone (vor allem Hsp70 und Hsp40) erforderlich (Ehrnsperger *et al.*, 1997b; Lee & Vierling, 2000). Zur Klasse der “kleinen Hitzeschockproteine” gehört auch das α -Kristallin der Augenlinse, das benötigt wird, um die Stabilität der nahezu kristallinen Proteinlösung in der Linse für die gesamte Lebensdauer des Organismus zu garantieren. Auch die Proteine IbpA und IbpB, die bei *E. coli* in *inclusion bodies* gefunden wurden, werden den “kleinen Hitzeschockproteinen” zugerechnet.

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

Die fünfte Klasse der Chaperone wird von den Hsp90-Proteinen gebildet. Diese Chaperone haben neben einer grundsätzlichen Fähigkeit nicht-native Proteine zu stabilisieren die Aufgabe erworben, die Reifung komplexer Proteine zu ermöglichen. Viele dieser Substrate sind in die Signaltransduktion der Zelle involviert, wie Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren

oder Steroidhormonrezeptoren (Pratt, 1997). Hsp90-Proteine treten als Dimere auf und verfügen über eine ATPase-Aktivität, die für ihre Funktionalität essentiell ist (Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998). Strukturell unterteilt man Hsp90 in eine N-terminale ATP-Bindestelle (Prodromou *et al.*, 1997a) und eine C-terminale Dimerisierungsstelle, wobei die Funktion der mittleren Domäne noch unbekannt ist, ebenso wie die Bindestelle für die Substrate. Hsp90-Proteine mit konserviertem Aufbau finden sich darüberhinaus in Eubakterien, in Mitochondrien, im endoplasmatischen Retikulum und in Chloroplasten.

1.4 Hsp90 als "aktives" Chaperon

1.4.1 Nukleotidbindung und -hydrolyse durch Hsp90

Bei der Untersuchung der einzelnen Chaperone bezüglich ihrer Funktion spielte die Frage, ob es sich bei dem Protein um ein aktives – d.h. ATP hydrolysierendes – oder ein passives Chaperon handelt, zunächst eine große Rolle (Beissinger & Buchner, 1998). Für Hsp90 blieb diese Frage lange Zeit unbeantwortet. Versuche, eine ATP-Bindung nachzuweisen, oder ein bekanntes nukleotidbindendes Sequenzmotiv zu identifizieren, scheiterten (Jakob *et al.*, 1996). Erst die Lösung der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von Hsp90 brachte Klarheit in dieser Frage (Prodromou *et al.*, 1997b; Stebbins *et al.*, 1997). Hier war ein neues, bisher nur von der GyraseB bekanntes nukleotidbindendes Motiv identifiziert worden (Bergerat *et al.*, 1997; Wigley *et al.*, 1991). Mittlerweile ist eine ganze Klasse von Proteinen bekannt, die dieses Motiv zur Bindung von ATP verwenden.

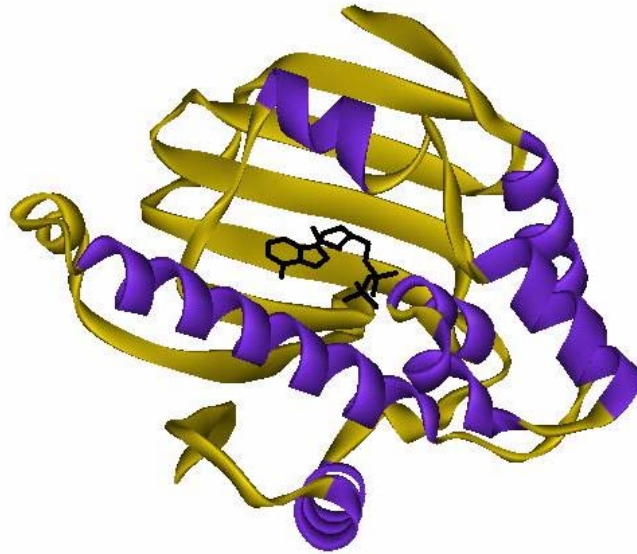


Abbildung 1-3: Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von Hsp90 in Komplex mit ADP

Das ADP (schwarz) wird bei Hsp90 in einer ungewöhnlich geknickten Konformation gebunden (pdb accession number 1BYQ), wobei das Nukleotid fast vollständig in einer Tasche eingeschlossen wird, die durch α -Helices (blau) gebildet wird (Prodromou *et al.*, 1997a).

Bei diesen Proteinen wird das ATP-Molekül in einer Spalte gebunden, so dass lediglich das γ -Phosphat dem Lösungsmittel exponiert wird (Prodromou *et al.*, 1997a). Die Riboseeinheit und das Adenin werden dabei oberhalb des β -Faltblattes von α -Helices umschlossen und im Inneren des Proteins verborgen (siehe Abbildung 1-3). Diese ungewöhnliche Konformation ist auch der Grund, warum bisher angewandte Methoden, wie das Markieren von Nukleotiden mit Fluoreszenzfarbstoffen, bei Hsp90 negative Ergebnisse produzierten. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung der bekannten ATP-Analoga relativ schwach ist. Die Bindekonstante für ATP beträgt etwa 400 μM (Scheibel *et al.*, 1997), die für ADP etwa 30 μM (Prodromou *et al.*, 1997a).

Auch die Frage, ob das gebundene Nukleotid hydrolysiert wird, konnte schlussendlich bejaht werden. Die Hydrolyserate von Hsp90 ist dabei jedoch so gering, dass sie in ersten Versuchen von Verunreinigungen in der Präparation maskiert wurde. Der Umsatz unter vollständiger Sättigung mit Nukleotiden liegt im Falle der Hsp90-Proteine aus *S. cerevisiae* und *E. coli* bei ca. 0,5 ATP pro Minute. Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass auch das humane Hsp90 eine ATPase-Funktion besitzt deren Hydrolyserate nochmals um den Faktor zehn geringer (McLaughlin *et al.*, 2002; Owen *et al.*, 2002).

1.4.2 Struktur von Hsp90

Trotz der erheblichen Unterschiede in der Hydrolyserate, ist Hsp90 ein strukturell hochkonserviertes Protein. Sequenzanalysen und Experimente mit Proteasen legen einen Aufbau aus mindestens zwei Domänen nahe, die durch einen hydrophilen Linker verbunden sind. Während die Bedeutung der N-terminalen Domäne durch erfolgreiche Kristallisation und nachgewiesene Nukleotidbindung nahezu geklärt erscheint, werden der C-terminalen Domäne eine Reihe von Funktionen zugewiesen, die teilweise noch nicht funktionell verstanden werden. Als gesichert gilt die Existenz einer Dimerisierungsstelle im C-terminalen Bereich (Meng *et al.*, 1996; Minami *et al.*, 1994; Nemoto *et al.*, 1995).

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass durch die ATP-Bindung Konformationsänderungen im Protein induziert werden, die zu einer deutlichen Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche führen (Csermely *et al.*, 1993; Grenert *et al.*, 1997). Dies legt nahe, dass größere Regionen an der Umsetzung der ATP-Hydrolyse beteiligt sind als lediglich die ATP-Bindestelle. Ähnliches konnte auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, bei denen Hsp90 nach Zugabe von ATP und unter Hitzestress eine Konformation annahm, bei der die beiden N-Termini offensichtlich in direkten Kontakt getreten waren (Maruya *et al.*, 1999).

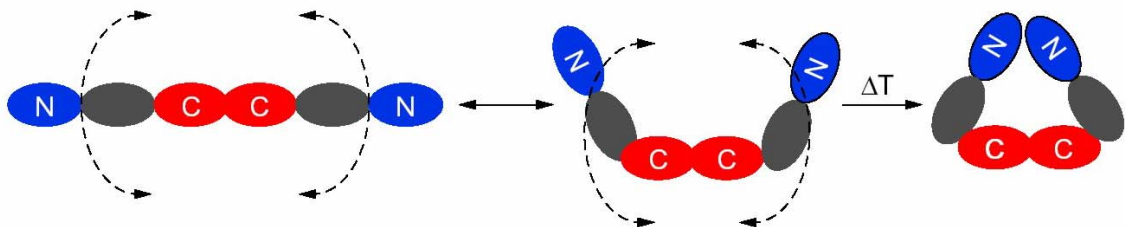


Abbildung 1-4: Bewegung der Domänen im dimeren Hsp90-Protein.

Diese Bewegung wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen beobachtet, bei denen eine kurze Hitzebehandlung bei 42 °C zu einer Dimerisierung der N-Termini geführt hatte (Maruya *et al.*, 1999). Die Gliederung in drei Domänen beruht auf den elektronenmikroskopischen Beobachtungen. Die Abbildung ist entnommen aus (Buchner, 1999).

Die Bedeutung C-terminaler Bereiche für die ATP-Hydrolyse wurde jedoch erst durch die Fragmentierung von Hsp90 offensichtlich. Dabei ergab sich, dass die Hydrolyserate der isolierten N-terminalen Domäne nur etwa ein zwanzigstel des Volllängenproteins (Weickl *et al.*, 2000) betrug. Durch biochemische Untersuchungen konnte schließlich gezeigt werden,

dass die C-terminalen Bereiche für eine effiziente ATP-Hydrolyse benötigt werden und dass sie während der ATP-Hydrolyse an essentiellen Konformationsänderungen beteiligt sind (Prodromou *et al.*, 2000; Weikl *et al.*, 2000), die die Assoziation der N-Termini miteinschließen. So kommt es unter Einbeziehung der C-terminalen Domäne zu einer Lageveränderung der Domänen, bei der das ATP-Molekül im Protein eingeschlossen und dem freien Austausch mit dem Lösungsmittel entzogen wird (Weikl *et al.*, 2000). Die Bedeutung dieser Konformationsänderungen blieb dabei noch unklar.

1.4.3 Die ATP-Hydrolyse homologer Proteine

Bisher sind mehrere Proteine bekannt, die neben einer strukturell verwandten ATP-Bindestelle auch einen ähnlichen dimeren Aufbau besitzen wie Hsp90. Dies sind die DNA-GyraseB aus *E. coli* und das DNA-Reparatur-Protein MutL mit seinem eukaryontischen Homologen hMLH1, sowie die bakteriellen Histidinkinasen CheA und EnvZ (Bilwes *et al.*, 1999; Dutta & Inouye, 2000; Tanaka *et al.*, 1998). Diese Proteine bilden zusammen die Familie der sogenannten GHKL-ATPasen. Bei den Proteinen GyraseB und MutL konnten die Kristallstrukturen größerer Fragmente gelöst werden, so dass hier mehr Informationen über den ATPase-Mechanismus verfügbar sind (Ban *et al.*, 1999; Ban & Yang, 1998; Brino *et al.*, 2000). Aufgrund der Homologie dieser Proteine zu Hsp90, wären Befunde über die Bedeutung der ATP-Hydrolyse bei diesen Proteinen eventuell auch auf Hsp90 übertragbar. So wurde bei beiden Proteinen beobachtet, dass die N-Termini im nukleotidfreien Zustand isoliert, d.h. monomer, vorliegen. Eine Dimerisierung erfolgt im nukleotidfreien Zustand nur über die C-Termini. Die Bindung von ATP oder ATP-Analoga führt dann jedoch zu einer zusätzlichen Dimerisierung der N-Termini. So läßt sich anhand der Kristallstrukturen der Protein•AMP-PNP-Komplexe bei beiden Proteinen die Art und Weise erkennen, wie es zur Assoziation der N-Termini kommt (Ban & Yang, 1998; Brino *et al.*, 2000). Dazu werden bei beiden Proteinen die N-terminalen Aminosäuren zwischen den beiden Domänen ausgetauscht

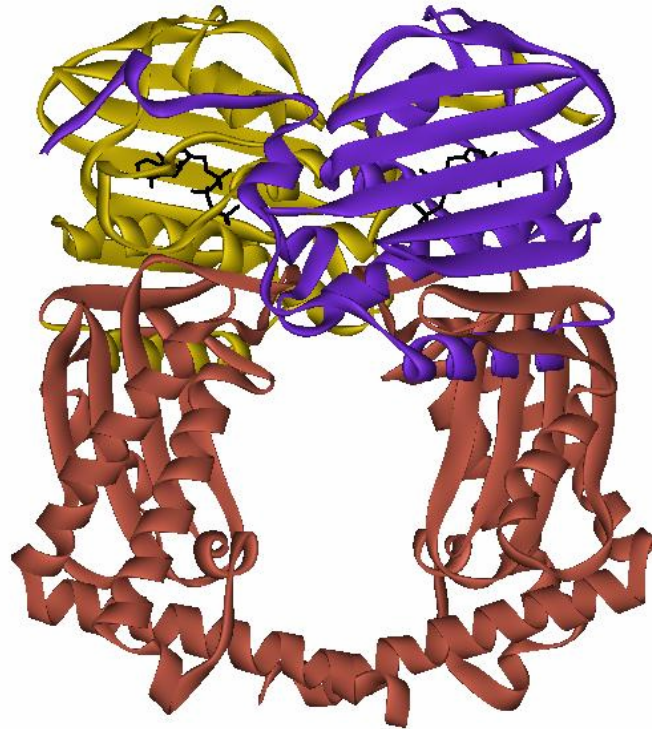


Abbildung 1-5: Kristallstruktur einer 40 kDa-Domäne der Gyrase in Komplex mit AMP-PNP

Der Komplex zeigt die N-terminal dimerisierte Konformation von GyraseB (pdb accession number 1ET1). Deutlich zu erkennen sind die N-terminalen Aminosäuren, die zwischen den Untereinheiten ausgetauscht werden. Dabei sind die Bereiche, die Homologie zur Hsp90-Struktur aufweisen blau und gelb gefärbt, die zusätzlichen Bereiche rot.

An der N-terminalen Dimerisierung ist bei beiden Proteinen auch die Mitteldomäne beteiligt. So wird in beiden Fällen das γ -Phosphat des Nucleotids von einem Lysinrest der benachbarten Domäne komplexiert, was eventuell als Voraussetzung für die Dimerisierung betrachtet werden kann. Dies könnte erklären, warum bei Hsp90 die Verwendung einer monomeren N-terminalen Domäne nicht genügt, um das ATP-Molekül effektiv im Protein zu „trappen“, sondern die Anwesenheit C-terminaler Bereiche dafür erforderlich ist (Weikl *et al.*, 2000). Auch weiterführende mechanistische Betrachtungen wurden anhand dieser Proteine bereits angestellt. Für die humane Topoisomerase II wird als Modell postuliert, dass bei Interaktion der beiden N-Termini zunächst nur ein ATP hydrolysiert wird, das zweite ATP dann zum „Rücksetzen“ des Enzyms in den nukleotidfreien Ausgangszustand verwendet wird (Skouboe *et al.*, 2002). Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass das humane Protein hMLH1 in einem streng heterodimeren Komplex mit dem Protein hPMS2 vorliegt und damit die bisher bekannte symmetrische Anordnung der GHKL-ATPasen hier nicht zutrifft (Guarne *et al.*, 2001).

Auch Informationen über die Bedeutung der ATP-Hydrolyse für den Mechanismus von Hsp90 lassen sich eventuell durch die Homologie der Proteine gewinnen. GyraseB und MutL prozessieren unter ATP-Verbrauch aktiv einen DNA-Strang. Dabei wird die Hydrolyseaktivität von GyraseB und anderer Klasse-II-Topoisomerasen durch die Anwesenheit freier DNA erheblich gesteigert (Gardiner *et al.*, 1998). Die Art und Weise, wie die Hydrolyse des N-terminal gebundenen ATPs die Prozessierung des DNA-Strangs beeinflusst, ist jedoch bei beiden Proteinen noch nicht verstanden (Kampranis *et al.*, 1999). Auch die Bedeutung der N-terminalen Dimerisierung für die Funktion dieser Proteine ist unklar. Inwieweit funktionelle Homologie über die ATP-Bindung hinaus zwischen den Proteinen MutL, Hsp90 und GyraseB besteht, ist nicht klar, da die Sequenzidentität ausserhalb der nukleotidbindenden Domäne gering ist (< 20%) und es sich bei den Hsp90-Substraten natürlich um Polypeptide handelt.

1.4.4 Interaktion von Hsp90 mit nicht-nativen Proteinen

Hsp90 bildet mit vielen seiner Substrate stabile Chaperon•Substrat-Komplexe. Zahlreiche Hinweise für die Chaperonaktivität von Hsp90 stammen deshalb aus der Isolierung von Komplexen mit Hsp90-Substraten, wie Glucocorticoidrezeptoren (Catelli *et al.*, 1985b) und Tyrosinkinase (Brugge *et al.*, 1981). Daneben konnte jedoch auch *in vitro* eine Chaperonaktivität nachgewiesen werden. Chaperonassays, wie sie zuvor schon bei Hsp70 und GroEL erfolgreich angewandt wurden, demonstrierten, dass auch Hsp90 in der Lage ist, die Aggregation denaturierter oder destabilisierter Proteine zu verhindern (Miyata & Yahara, 1992; Wiech *et al.*, 1992). Als Substrate dienten hierbei nicht die bereits bekannten *in vivo* Substrate, da deren Reinigung aufgrund ihrer inherenten Instabilität nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Stattdessen wurden Modellsubstrate verwendet, wie Citratsynthase, Luciferase (Schumacher *et al.*, 1994), β -Galaktosidase und Insulin (Scheibel *et al.*, 1998). Diese Untersuchungen wurden weiter ausgedehnt, um die Spezifität von Hsp90 zu verstehen. So ergaben Untersuchungen mit Citratsynthase, dass die Interaktion mit Hsp90 einen teilweise strukturierten, nativ-ähnlichen Zustand erfordert (Jakob *et al.*, 1995a). An Hsp90 gebundene nicht-native Substrate können dann unter Verwendung des Hsp70-Systems wieder zurückgefaltet werden (Freeman & Morimoto, 1996; Schumacher *et al.*, 1996). *In vivo* Daten zeigen darüberhinaus, dass Hsp90 nicht wesentlich an der *de novo* Faltung von Polypeptiden beteiligt ist (Nathan *et al.*, 1997).

Weiterführende Untersuchungen sollten die Substratbindestelle von Hsp90 identifizieren. So führte die Untersuchung der Interaktion von Hsp90 mit einem basischen *helix-loop-helix* Motiv zur Identifikation einer Bindestelle (Shaknovich *et al.*, 1992; Shue & Kohtz, 1994). Weitere Untersuchungen ließen dann jedoch zwei Bindestellen vermuten: eine N-terminale für Peptide und entfaltete Substrate und eine C-terminale für teilweise strukturierte Substrate (Minami *et al.*, 2001; Scheibel *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1997). Jüngste Daten zeigen jedoch, dass diese Ergebnisse nicht grundsätzlich anwendbar sind, da weitere Studien zur Identifikation dreier Bindestellen geführt haben (Johnson *et al.*, 2000), die jedoch nicht von allen Substraten wahrgenommen werden. Darüberhinaus wurde spekuliert, dass eine hitzeinduzierte Oligomerisierung von Hsp90 erheblich zur Steigerung der Chaperonaktivität beiträgt (Chadli *et al.*, 1999; Yonehara *et al.*, 1996).

Auch die Interaktion mit dem Glucocorticoidrezeptor wurde ausgenutzt, um die Substratbindestelle von Hsp90 zu identifizieren. Dazu wurden zahlreiche Hsp90 Mutanten und Mutanten des Glucocorticoidrezeptors erzeugt und so Interaktionsflächen lokalisiert. Diese werden vermutlich von der hormonbindenden Domäne des Rezeptors (Scherrer *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1998) und einer C-terminal gelegenen Bindestelle von Hsp90 gebildet (Jibard *et al.*, 1999). Die Problematik, die sich durch das Arbeiten mit Modellsubstraten *in vitro* ergibt, konnte erst kürzlich durch die erfolgreiche Reinigung der hormonbindenden Domäne des Glucocorticoidrezeptors umgangen werden. Unter Verwendung dieser Domäne war es möglich, die extrem geringe ATPase-Aktivität von humanem Hsp90 auf das 200fache zu steigern (McLaughlin *et al.*, 2002). Die Affinität der Interaktion zwischen den beiden Proteinen war dabei jedoch so schwach, dass eine stabile Komplexbildung, wie sie *in vivo* beobachtet wird, kaum möglich ist. Dennoch verdeutlichen diese Daten, dass, ähnlich wie bei der GyraseB, auch bei Hsp90 die Hydrolyserate von der Interaktion mit Substraten abhängt.

1.5 Das eukaryontische Hsp90-System

Während das bakterielle Hsp90 scheinbar seine Funktion alleine erfüllen kann, wurden für alle cytosolischen eukaryontischen Hsp90-Systeme eine Reihe akzessorischer Proteine nachgewiesen. Die Identifizierung dieser Proteine erfolgte meist durch Untersuchungen von Hsp90•Substrat-Komplexen, bei denen dann weitere Proteine als Bestandteil der Komplexe identifiziert wurden. Diese Proteine werden allgemein als Partnerproteine bezeichnet. Ihre Anwesenheit in den Komplexen gewährleistet in vielen Fällen die stabile Bindung des Substrates. Auch diese Proteine sind im Reich der Eukaryonten erstaunlich hoch konserviert,

so dass jedem identifizierten humanen Partnerprotein ein homologes in *S. cerevisiae* zugeordnet werden kann. Im Allgemeinen wird deshalb davon ausgegangen, dass die Rolle dieser Partnerproteine auch funktionell konserviert ist.

1.5.1 Das Protein Hop/Sti1

Das Protein Hop wurde als Bestandteil von Hsp70•Hsp90-Komplexen mit dem Substrat Progesteronrezeptor identifiziert und zunächst aufgrund seiner Größe als p60 beschrieben (Smith *et al.*, 1993). Seine Funktion besteht vermutlich darin, Hsp90 und Hsp70 zu verbinden, um so den Transfer des Substrates zwischen den beiden Chaperonsystemen zu ermöglichen. Sequenzanalysen deuten darauf hin, dass Hop zu einem Großteil aus *Tetratricopeptiderepeat* (TPR)-Motiven besteht, die häufig die spezifische Interaktion von Proteinen bewirken. TPR-Motive bestehen aus einer degenerierten 34 Aminosäuren langen Sequenz, wobei in der Regel drei dieser Motive zu einer TPR-Domäne zusammengefasst werden (Sikorski *et al.*, 1990). Insgesamt finden sich bei Hop neun TPR-Motive, die sich in drei Domänen (TPRI, TPRIIa, TPRIIb) gliedern lassen (Owens-Grillo *et al.*, 1996; Scheufler *et al.*, 2000).

Für das humane System wurden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, die eine direkte Bindung von Hop an Hsp90 zeigten und demonstrierten, welche Domänen von Hop für die Interaktion mit Hsp70 bzw. Hsp90 verantwortlich sind. So ist die TPRI für die Bindung an Hsp70 notwendig, während die TPRIIa für die Bindung an Hsp90 erforderlich ist (Scheufler *et al.*, 2000). Die Bindung erfolgt jeweils über die letzten sieben bis zehn C-terminalen Aminosäuren von hHsp90 bzw. hHsp70 (Brinker *et al.*, 2002; Ramsey *et al.*, 2000), auch wenn weitere Bindestellen vermutet werden (Carrello *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1998; Prodromou *et al.*, 1999; Ramsey *et al.*, 2000). Sowohl für den Komplex mit Hsp70, als auch für den Komplex mit Hsp90 existieren Kristallstrukturen, die die Einbettung der C-terminalen Peptide in die α -helikale Struktur der TPR-Motive zeigen (Scheufler *et al.*, 2000). Für TPRIIb ist jedoch noch keine Funktion bekannt.

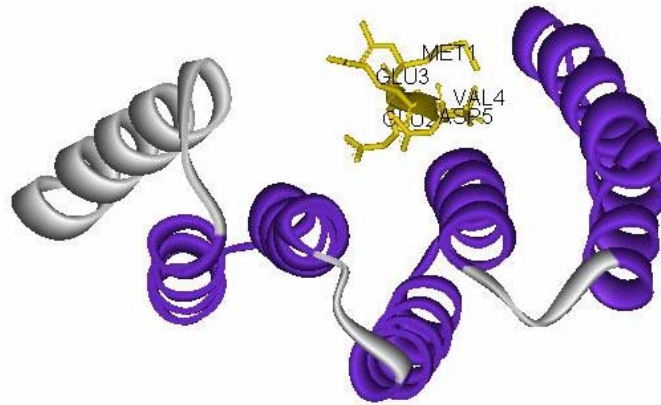


Abbildung 1-6: Kristallstruktur der TPRIIa von Hop in Komplex mit einem Hsp90-Peptid

Die Kristallstruktur zeigt die Bindung der C-terminalen Aminosäuren von Hsp90 mit der Sequenz MEEVD an die mittlere TPR-Domäne von Hop (Scheufler *et al.*, 2000). Ein Großteil der gerichteten Interaktionen wird dabei von dem endständigen Aspartatrest zu konservierten Resten in der TPR-Domäne ausgebildet (pdb accession number 1ELR).

Im Hefesystem konnte die Interaktion von Sti1/Hop mit Hsp90 ebenfalls demonstriert werden. Biophysikalische Daten zeigen dabei, dass die Bildung von Komplexen mit einer äquimolaren Stöchiometrie erfolgt. Im Zuge dieser Untersuchungen ergab sich darüber hinaus, dass Sti1 ein effizienter Inhibitor der ATPase-Aktivität von Hefe-Hsp90 ist, indem es den Zugang zur Nukleotidbindestelle blockiert (Prodromou *et al.*, 1999). Beim humanen System scheint diese Beobachtung nur teilweise zuzutreffen, da hier kein Einfluss auf die Grundaktivität von hHsp90 gefunden werden konnte. Wird jedoch die Aktivität von humanem Hsp90 durch die Anwesenheit eines Substrates stimuliert, so kann diese wieder durch Hop inhibiert werden (McLaughlin *et al.*, 2002). Sowohl im humanen, als auch im Hefesystem konnte eine Bindung bei nanomolaren Konzentrationen detektiert werden (Mayr *et al.*, 2000; McLaughlin *et al.*, 2002; Prodromou *et al.*, 1999).

1.5.2 Die großen Peptidyl-prolyl-*cis/trans* Isomerasen

Ebenfalls im Komplex mit GR wurde eine weitere Klasse von Proteinen gefunden: die großen PPIasen FKBP51, FKBP52 und Cyp40. Diese Proteine sind strukturell und funktionell verwandt mit den Peptidyl-prolyl-*cis/trans* Isomerasen der Klassen der *FK506-binding Proteins* (FKBPs) beziehungsweise der Cyclophiline (siehe Kapitel 1.2). Sie teilen mit diesen

Proteinen jeweils die PPIase-Domäne, besitzen zusätzlich jedoch noch eine TPR-Domäne. Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, dass diese Proteine selbst Chaperone sind, da sie die Aggregation denaturierter Proteine verhindern können (Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996). Die Bindung nicht nativer Substrate erfolgt am C-Terminus von FKBP52 (Pirkl *et al.*, 2001) in der Nähe der TPR-Domäne.

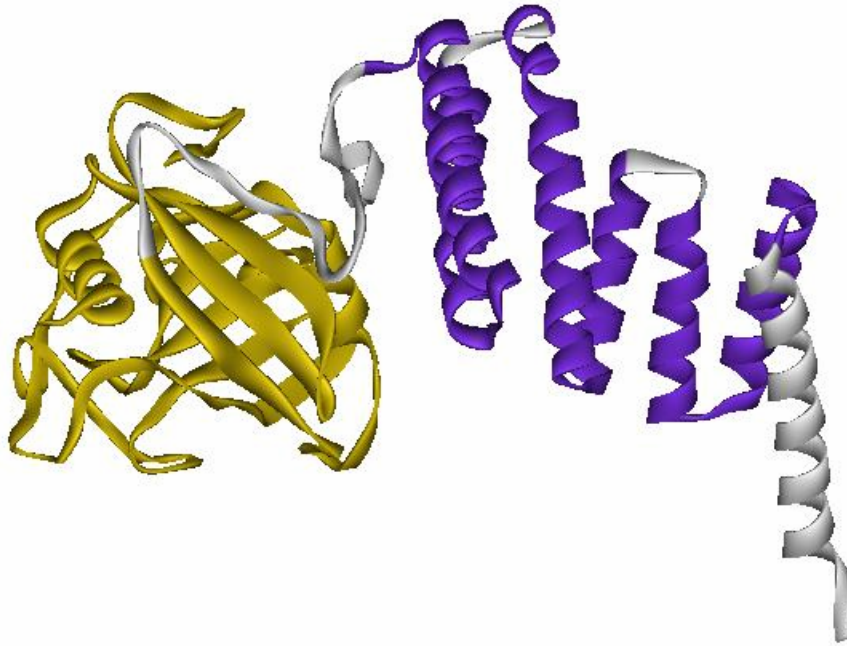


Abbildung 1-7: Kristallstruktur der humanen PPIase Cyclophilin 40 (Taylor *et al.*, 2001)

Die Kristallstruktur zeigt die PPIase-Domäne (gelb) und darauf folgend die TPR-Domäne (blau). Der Aufbau der Proteine FKBP51 und FKBP52 ist vermutlich entsprechend (pdb accession number 1IHG).

Die Bindung an Hsp90 erfolgt ähnlich wie bei Sti1/Hop über die TPR-Domäne. Biochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Bindung aller PPIasen und die Bindung von Hop mit ähnlicher Affinität und in Konkurrenz zueinander erfolgt (Owens-Grillo *et al.*, 1995; Owens-Grillo *et al.*, 1996; Prodromou *et al.*, 1999). Die Funktion der PPIasen in den Hsp90-Komplexen ist nicht geklärt, es wird jedoch vermutet, dass ihre Beteiligung substratspezifisch ist. Auch die spätere Lokalisation des Hsp90•Substrat Komplexes ist vermutlich von der jeweiligen PPIase abhängig. So konnte für FKBP52 gezeigt werden, dass sein Auftreten im Hsp90•Substrat-Komplex die Lokalisation im Zellkern begünstigt (Czar *et al.*, 1995).

Im Hefesystem wurde von den großen PPIasen lediglich die Klasse der Cylophiline nachgewiesen, die in den zwei homologen Varianten Cpr6 und Cpr7 auftritt. Diese beiden Proteine sind zu 45% sequenzidentisch, unterscheiden sich jedoch bezüglich ihrer PPIase-Aktivität und Chaperon-Eigenschaften erheblich (Mayr *et al.*, 2000). Die Komplexbildung mit Hefe-Hsp90 konnte im nanomolaren Bereich nachgewiesen werden und die Stöchiometrie der Wechselwirkung erfolgt wie bei Hop/Sti1 auch hier äquimolar (Prodromou *et al.*, 1999).

1.5.3 Das Protein p23/Sba1

Das Protein p23 wurde als weitere Komponente der Hsp90•PPIase•Substrat-Komplexe gefunden und zunächst als saures Phosphoprotein beschrieben (Johnson *et al.*, 1994). Auch für dieses Protein konnte eine eigenständige Chaperonaktivität demonstriert werden (Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996), die von einem unstrukturierten Bereich im C-terminalen Teil des Proteins ausgeübt wird (Weaver *et al.*, 2000; Weikl *et al.*, 1999). Der N-terminale Teil von p23 konnte kristallisiert und seine Struktur bis zu einer Auflösung von 2.5 Å gelöst werden. Hierbei zeigte sich p23 als ein Protein, das vollständig aus β -Faltblättern besteht und dabei eine erstaunliche strukturelle Homologie zu kleinen Hitzeschockproteinen zeigt (Weaver *et al.*, 2000). Auch eine geringe Sequenzhomologie ist nachweisbar, so dass eventuell eine phylogenetische Verwandtschaft zwischen diesen beiden Chaperonen besteht (Garcia-Ranea *et al.*, 2002).

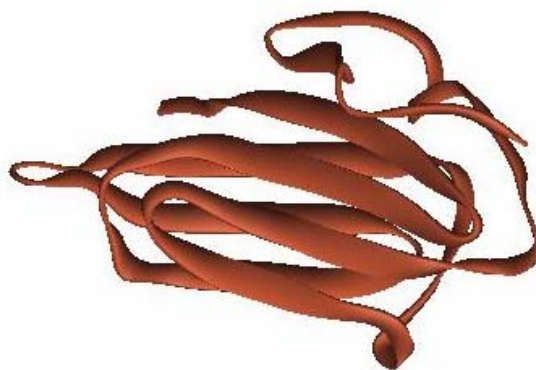


Abbildung 1-8: Kristallstruktur vom N-Terminus des humanen p23

Die Kristallstruktur von humanem p23 (pdb accession number 1EJF). 35 Aminosäuren vom unstrukturierten C-terminalen Bereich sind nicht im Protein enthalten. Die im Kristall eigentlich vorhandene Disulfidverbrückung zwischen jeweils zwei p23-Molekülen wurde entfernt, da es sich vermutlich um eine nicht-physiologische Disulfidbrücke handelt (Weaver *et al.*, 2000).

Untersuchungen zur Komplexbildung von p23 mit Hsp90 verdeutlichten, dass seine Bindung an Hsp90-Komplexe nur bei Anwesenheit von ATP erfolgt (Johnson *et al.*, 1996; Johnson & Toft, 1995; Prodromou *et al.*, 2000). Ähnlich wie für Hop und die großen PPIasen konnte auch für p23 die direkte Bindung an Hsp90 demonstriert werden. Sie erfolgt nur an dimere Hsp90-Konstrukte und erfordert die Sättigung von Hsp90 mit ATP (Chadli *et al.*, 2000). Es wird daher vermutet, dass die Bindung von Sba1 an einen N-terminal dimerisierten Zustand erfolgt (Prodromou *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2002). Eine Beeinflussung der ATPase von Hefe-Hsp90 konnte zunächst nicht gezeigt werden (Young & Hartl, 2000). Jüngste Daten deuten jedoch darauf hin, dass sowohl die ATPase von humanem Hsp90, als auch die ATPase von Hefe-Hsp90 durch die Komplexbildung mit p23/Sba1 inhibiert werden (Panaretou *et al.*, 2002b). Die Stöchiometrie der Hsp90•Sba1-Komplexe ist nicht geklärt.

1.5.4 Das Protein Cdc37

Neben Steroidhormonrezeptoren wurden auch zahlreiche humane Kinasen als Hsp90-Substrate identifiziert. Die Untersuchung dieser Hsp90•Kinase-Komplexe durch Co-immunopräzipitationsstudien führte in nahezu allen Fällen zur Identifizierung des Proteins Cdc37, das in diesen Komplexen als Cofaktor von Hsp90 auftritt (Brugge *et al.*, 1981; Perdeu *et al.*, 1997; Whitelaw *et al.*, 1991). Die Tatsache, dass Cdc37 ausschließlich in Komplexen mit Kinasen gefunden wird, hat dazu geführt, Cdc37 als Kinase-spezifisches Partnerprotein einzustufen (Kimura *et al.*, 1997). Ob die Bindung von Cdc37 an die Kinase oder an den Hsp90•Kinase-Komplex erfolgt ist dabei noch nicht geklärt (Hartson *et al.*, 2000; Silverstein *et al.*, 1998). Im Hefesystem dagegen konnte für Cdc37 mittlerweile die direkte Bindung an Hsp90 nachgewiesen werden, wenn diese mit einer Dissoziationskonstante von 100 μ M auch scheinbar sehr schwach ist. Darüberhinaus inhibiert auch dieses Protein bei hohen Konzentrationen die ATPase-Aktivität von Hefe-Hsp90 (Siligardi *et al.*, 2002).

Mit dem Protein Harc wurde kürzlich ein zu Cdc37-homologes Protein identifiziert (Scholz *et al.*, 2001), das zwar mit Hsp90 assoziieren kann, nicht aber mit den Kinasen Src und Raf. Seine Funktion ist in weiten Zügen ebenfalls noch unklar.

1.5.5 Weitere Partnerproteine von Hsp90

Als weiteres Partnerprotein von Hsp90 in humanen Zellen ist die Proteinphosphatase PP5 bekannt, die ebenfalls in Komplexen mit Glucocorticoidrezeptoren identifiziert wurde (Chen *et al.*, 1996b). Sie besitzt neben einer Phosphatasedomäne eine TPR-Domäne, die wie bei Hop und den großen PPIasen für die Interaktion mit Hsp90 verantwortlich ist. Auch hier erfolgt die Interaktion in Konkurrenz zu den anderen TPR-Proteinen (Prodromou *et al.*, 1999). Für Ppt1, das homologe Protein aus Hefe, steht dieser Nachweis noch aus.

Ein weiteres identifiziertes Partnerprotein von eukaryontischem Hsp90 ist CHIP (Connell *et al.*, 2001). Dieses Protein scheint, wenn es von Hsp90 rekrutiert wird, die Degradation von Hsp90-gebundenen Substraten über den *Ubiquitin-Proteasome-Pathway* einzuleiten (Murata *et al.*, 2001). Darüberhinaus wird auch über eine direkte Interaktion von Hsp90 mit dem Proteasom berichtet (Eleuteri *et al.*, 2002; Minami *et al.*, 2000; Montel *et al.*, 1999).

Weitere mögliche Partnerproteine sind nur im Hefesystem bekannt. Hier wurden durch genetische *Screens* die Proteine Cns1, Ssf1 und Hch1 identifiziert. Diese sind in der Lage, temperatursensitive Hsp90-Mutanten bei nicht-permissiven Bedingungen zu stabilisieren (Nathan *et al.*, 1999). Cns1 besitzt eine TPR-Domäne mit starker Homologie zu Sti1, welche die Bindung an Hsp90 vermitteln könnte (Dolinski *et al.*, 1998). Untersuchungen an *Drosophila* legen eine Interaktion von Cns1-Homologen mit Hsp90 nahe (Crevel *et al.*, 2001). Über Struktur und Funktion von Ssf1 ist bisher nichts bekannt. Für das Hefesystem wurde kürzlich ein weiteres Partnerprotein identifiziert, das Homologie zu Hch1 aufweist und die ATPase von Hefe-Hsp90 auf das achtfache stimulieren kann. Dieses Protein wurde als *Activator of Hsp90-ATPase* (Aha1) bezeichnet. Seine Funktion und sein Einfluss auf die Bindung von Substraten konnten noch nicht geklärt werden (Panaretou *et al.*, 2002a). Eine ähnliche Aktivität, wenn auch mit sehr viel schwächerer Affinität, wurde auch für Hch1 gezeigt. Für die humanen Homologen dieser Hefepoteine ist eine Beteiligung am Hsp90-System bisher nicht beschrieben.

1.6 Hsp90 in vivo

Die Betrachtung eines Proteins in seiner natürlichen Umgebung, der Zelle, liefert Hinweise auf seine Funktion, die durch biochemische Analysen und funktionelle Assays *in vitro* nicht zu erbringen sind. Hsp90 ist ein nahezu ubiquitäres Protein, das in den meisten Fällen in hohem Maße exprimiert ist. So stellt Hsp90 ca. 1% des löslichen Proteins im eukaryontischen

Cytoplasma dar (Lai *et al.*, 1984; Welch & Feramisco, 1982) und ist damit eines der am stärksten exprimierten Proteine mit einer zellulären Konzentration von 10 μM bis 150 μM (Nollen & Morimoto, 2002).

1.6.1 Phylogenie des Hsp90-Systems

Etwa 120 Sequenzen für Proteine der Hsp90-Familie sind heute zugänglich. Dabei werden Hsp90-Proteine in allen Eukaryonten und in den meisten Bakterien gefunden. Keine archaeller sind bisher bekannt, trotz der Vielzahl sequenzierter Archaeengenome. Basierend auf Sequenzanalysen lassen sich eukaryontische und prokaryontische Hsp90-Vertreter leicht unterscheiden.

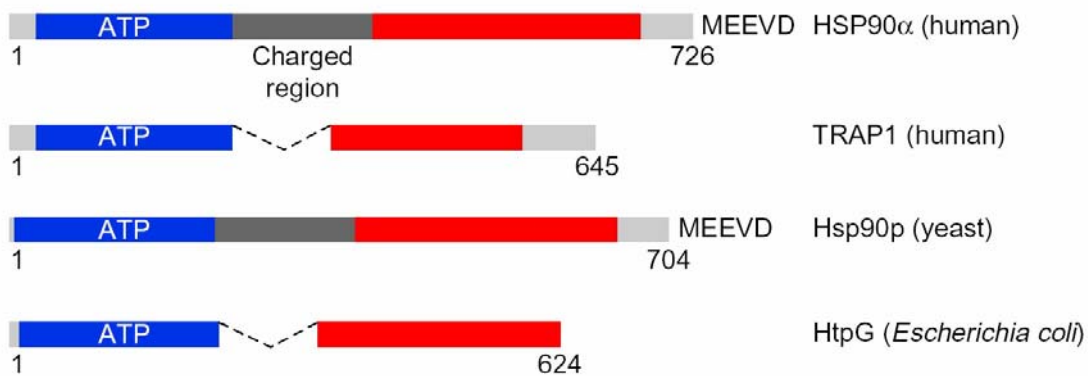


Abbildung 1-9: Domänenanordnung bei Hsp90-Vertretern verschiedener Herkunft

Vergleich der cytosolischen Hsp90-Proteine von Mensch, Hefe und *E. coli*. Darüberhinaus abgebildet ist das Hsp90 aus Mitochondrien (TRAP-1). Die Abbildung ist entnommen aus (Buchner, 1999).

So besitzen prokaryontische Hsp90-Proteine nur einen etwa acht Aminosäuren langen hydrophilen Linkerbereich zwischen der N-terminalen ATP-Bindestelle und der C-terminalen Domäne. Dieser Linkerbereich ist bei den cytosolischen Vertretern der Eukaryonten bis zu 90 Aminosäuren lang und besteht fast ausschließlich aus geladenen Resten. Darüberhinaus besitzen eukaryontische Hsp90-Proteine eine etwa 60 Aminosäure lange Extension am C-Terminus des Proteins, die der Bindung von Partnerproteinen dient. Nur bei höheren Eukaryonten wurden bisher Hsp90-Proteine gefunden, die in den zellulären Organellen lokalisiert sind. Das Protein TRAP-1 ist ein bisher bei *A. thaliana*, *D. dictyostelium*, *D. melanogaster* und *H. sapiens* gefundenes Protein der Hsp90-Familie, das in die Mitochondrien importiert wird und strukturell den prokaryontischen Hsp90-Proteinen ähnelt (Cechetto &

Gupta, 2000; Chen *et al.*, 1996a; Felts *et al.*, 2000; Song *et al.*, 1995). Das Protein Grp94 wird bei Vertebraten und Pflanzen in das endoplasmatische Retikulum sezerniert und zeichnet sich deshalb durch eine zusätzliche N-terminale Signalsequenz und die C-terminale ER-Retentionssequenz KDEL aus. Darüberhinaus wurde ein pflanzliches Hsp90-Protein in Chloroplasten nachgewiesen (Schmitz *et al.*, 1996). Es wurde versucht, die Verwandtschaft zwischen den einzelnen Hsp90-Proteinen mit Hilfe von auf Aminosäuresequenzenvergleichenden Stammbäumen zu klären (Emelyanov, 2002; Gupta, 1995).

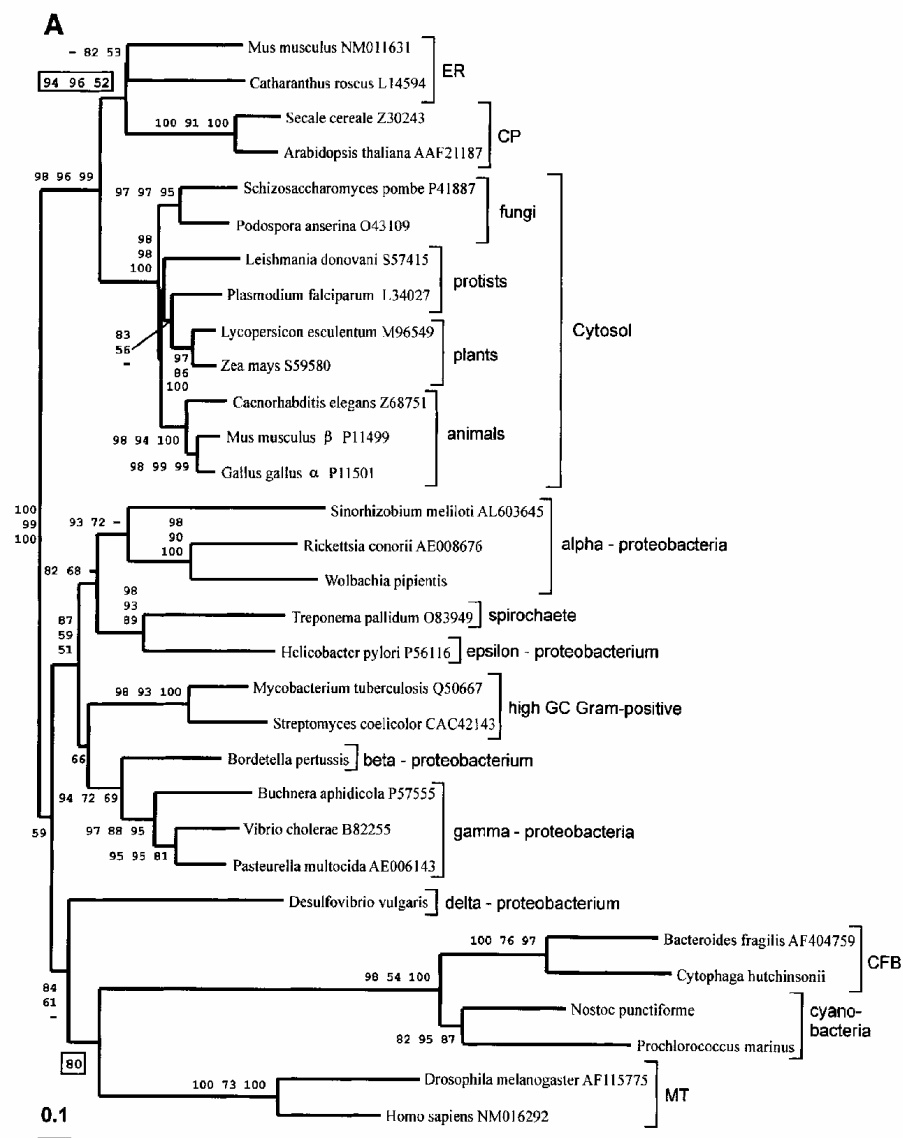


Abbildung 1-10: Exemplarischer phylogenetischer Stammbaum basierend auf Hsp90-Sequenzen

Dieser Stammbaum veranschaulicht die phylogenetische Verwandtschaft der cytosolischen eukaryontischen Vertreter (Cytosol) mit den Hsp90-Homologen aus Chloroplasten (CP) und endoplasmatischem Retikulum (ER). Andererseits zeigt sich auch die Verwandtschaft der mitochondrialen Hsp90-Proteine (MT) mit den HspG-Homologen aus Cyanobakterien und weiteren Vertretern der Bakterien (aus Emelyanov, 2002).

Die Anzahl der Hsp90-codierenden Gene, die in einem Organismus gefunden werden ist nicht konstant. So ist bei Prokaryonten Hsp90 nur einmal im Genom codiert. Bisher ist kein Hsp90 bei thermophilen Bakterien gefunden worden. Ob es hier nie existiert hat, oder sekundär wieder verloren wurde, ist nicht klar. Letzteres wird für das Fehlen des Hsp90-Gens bei Archaeen vermutet (Gupta & Golding, 1996).

Die Verdoppelung von genomcodierten Hsp90-Sequenzen ist dagegen im Verlauf der Evolution mehrfach aufgetreten. So wird bei *S. cerevisiae* Hsp90 durch zwei Gene repräsentiert, deren Produkte nahezu identisch sind. Bei *C. elegans* und bei *D. melanogaster* tritt dagegen nur eine Version von Hsp90 auf, bei *A. thaliana* vier (Krishna & Gloor, 2001), während bei allen Vertebraten erneut zwei cytosolische Hsp90-Vertreter gefunden werden. Letztere werden in eine *alpha*- und ein *beta*-Gruppe unterteilt und sind innerhalb der Gruppe nahezu vollständig konserviert. Die Entstehung der Hsp90-Proteine in den zellulären Kompartimenten lässt sich basierend auf den phylogenetischen Stammbäumen erahnen. Die starke Verwandtschaft des mitochondrialen Proteins mit den prokaryontischen Vertretern legt nahe, dass dieses Hsp90 evolutiv früh entstanden ist und die Eukaryonten, die es nicht besitzen, es sekundär verloren haben. Dagegen scheinen die Hsp90-Vertreter in Chloroplasten und im endoplasmatischen Retikulum stark verwandt mit den eukaryontischen Hsp90-Proteinen, so dass zu vermuten ist, dass diese Proteine durch Genverdopplung entstanden sind (Emelyanov, 2002; Gupta & Golding, 1996) und offensichtlich für die komplexer werdenden zellulären Anforderungen in höheren Eukaryonten benötigt werden.

1.6.2 HtpG bei Prokaryonten

Das *E. coli*-Gen für Hsp90 wurde als stark überexprimiertes Protein bei Hitzeschock gefunden und trägt deshalb den Namen *High Temperature Protein G* (Bardwell & Craig, 1987; Cowing *et al.*, 1985). Während HtpG bereits unter normalen Wachstumsbedingungen einen großen Teil am Gesamtprotein ausmacht (0,35%), nimmt sein Expressionslevel durch Hitzestress um mehr als das Zehnfache zu (Heitzer *et al.*, 1990). Auch chemischer Stress, oxidativer Stress und Stress durch Säuren führen zur deutlichen Steigerung der Expression (Heyde & Portalier, 1990). Zumindest im Fall der hitzeinduzierten Expression sind die Mechanismen, die den Expressionslevel kontrollieren, teilweise verstanden. So steht das HtpG-Gen unter direkter positiver Kontrolle des hitze-induzierten Transkriptionsfaktors σ^{32} (Zhou *et al.*, 1988). Damit ist HtpG in *E. coli* ähnlich reguliert wie die molekularen Chaperone GroEL und DnaK.

Ähnliches wurde auch für die anderen prokaryontischen Vertreter beobachtet (Schulz *et al.*, 1997).

Die Deletion von HtpG ist bei *E. coli* und den meisten bisher untersuchten Prokaryonten nicht lethal, sondern verursacht lediglich einen leichten temperatursensitiven Phänotyp. Kulturexperimente mit HtpG-deletierten und HtpG-exprimierenden Stämmen haben jedoch belegt, dass die Deletion von HtpG einen eindeutigen evolutiven Nachteil mit sich bringt, der mit steigender Temperatur stärker wird (Bardwell & Craig, 1988). Lediglich bei Cyanobakterien konnte beobachtet werden, dass die Entwicklung von Thermotoleranz (Tanaka & Nakamoto, 1999), die Akklimatisierung an Kälte (Hossain & Nakamoto, 2002) und die Toleranz gegenüber oxidativem Stress (Hossain & Nakamoto, 2003) auf die Funktionalität von HtpG angewiesen ist.

Substrate oder Interaktionspartner von HtpG sind bisher kaum bekannt. Nur für den Hitzeschocktranskriptionsfaktor σ^{32} wird eine Komplexbildung mit HtpG vermutet (Nadeau *et al.*, 1993).

1.6.3 Hsp90-System bei *S. cerevisiae*

Im Gegensatz zu Prokaryonten sind die eukaryontischen Hsp90-Vertreter grundsätzlich essentielle Proteine. Zwei eukaryontenspezifische Merkmale wurden basierend auf den Aminosäuresequenzen gefunden: ein längerer Linker zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne sowie 40 Aminosäure lange C-terminale Sequenz, die unter anderem die Bindestelle für einige Partnerproteine enthält. Die Bedeutung dieser Sequenzen wurde zumindest bei *S. cerevisiae* als nicht-essentiell identifiziert (Louvion *et al.*, 1996).

Bei *S. cerevisiae* finden sich zwei Hsp90-homologe Proteine – Hsp82 und Hsc82 – die in ihrer Expression unterschiedlich reguliert werden, ansonsten aber weitgehend identisch sind (97,4% Sequenzidentität). So ist Hsc82 ein konstitutiv exprimierter Vertreter der Hsp90-Familie, während Hsp82 – ähnlich wie das prokaryontische HtpG – unter Kontrolle des Hitzeschocktranskriptionsfaktors HSF exprimiert wird.

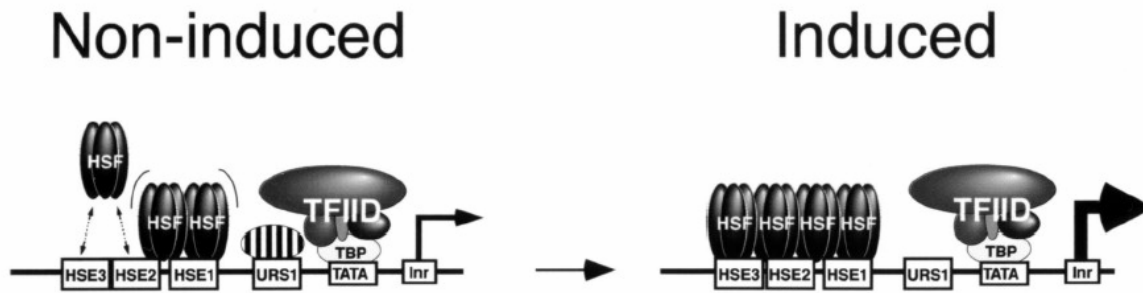


Abbildung 1-11: Regulation der Expression von Hsp82

Hsp82 steht unter mehrfacher Kontrolle des Hitzeschocktranskriptionsfaktors. Dieses Protein bindet vermutlich zwölfmal an den Promotor von Hsp82 und führt dadurch zur starken Expression dieses Hsp90-Vertreters bei Hitzestress. Die negativ-regulierenden Proteine, die die URS1-Sequenz binden, sind unbekannt. Die Abbildung ist entnommen aus (Erkine *et al.*, 1999)

Die Promotorregion des Hsp82-Gens, die vier Bindesequenzen für den HSF besitzt, macht diese Abhängigkeit deutlich. Von den vier *heat shock element*-(HSE)-Sequenzen wird besonders bei Bindung von HSF an die HSE1 eine starke Expression beobachtet. Die reprimierenden Faktoren sind noch nicht bekannt (Erkine *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu ist der Promotor von Hsc82 konstitutiv und nicht durch Hitze induzierbar. Nur ein *knock-out* Stamm, dem beide Vertreter fehlen, zeigt kein Wachstum mehr (Borkovich *et al.*, 1989). Erstaunlicherweise kann die Hsp90-Funktion nicht von HtpG, aber von anderen eukaryontischen Hsp90-Vertretern kompensiert werden. *S. cerevisiae* zeigt sich sehr tolerant gegenüber Veränderungen am Expressionslevel von Hsp90, so dass Mutanten, die nur ein Zwanzigstel der normalen Menge an Hsp90 exprimieren, lebensfähig sind (Picard *et al.*, 1990; Xu & Lindquist, 1993).

Für einige zelluläre Prozesse konnte bisher bei *S. cerevisiae* eine eindeutige Beteiligung von Hsp90 nachgewiesen werden. So ist zum Beispiel die Signaltransduktionskaskade, die ausgehend von der Stimulierung durch den α -Faktor eine Kopplungsbereitschaft der Hefen einleitet (STE20→STE11→STE7) bei Inhibition von Hsp90 unterbrochen (Louvion *et al.*, 1998), so dass die Kopplungsfähigkeit der Hefen verloren geht. Eine direkte Interaktion von Hsp90 mit STE11 konnte unter *in vivo* Bedingungen ebenfalls demonstriert werden (Abbas-Terki *et al.*, 2000). Weitere phänotypische Beobachtungen, die auf einer Disruption von Hsp90 beruhen, sind fehlerhafte Verdoppelung der Spindelpolkörperchen (Zarzov *et al.*, 1997), gesteigerte Aktivität des Hitzeschockfaktors HSF (Duina *et al.*, 1998a; Harris *et al.*,

2001), fehlende Salz- und Hitzetoleranz (Imai & Yahara, 2000), sowie Einflüsse auf die Telomerlänge (Grandin & Charbonneau, 2001).

1.6.4 Hsp90 bei Eukaryonten

Für alle weiteren untersuchten eukaryontischen Vertreter, wie *C. elegans* (Birnby et al., 2000) oder *D. melanogaster* (Cutforth & Rubin, 1994; van der Straten et al., 1997; Yue et al., 1999) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das oder die Hsp90-Genprodukte essentielle Funktionen wahrnehmen. Bei Vertebraten ist bereits die Deletion eines der beiden Hsp90-Gene lethal, wie am Beispiel des Hsp90 β von *M. musculus* gezeigt wurde. Hier treten bei homozygot-mutierten Embryonen lethale Fehler bei der Placentaentwicklung auf (Voss et al., 2000). Auch im Falle der Vertebraten sind die beiden Hsp90-Gene unterschiedlich reguliert. Für Hsp90 β ist bei Vertebraten bekannt, dass es durch Hitzestress kaum induzierbar ist, sondern in seinem Expressionslevel von Wachstumsfaktoren reguliert wird (Hansen et al., 1991; Ripley et al., 1999). Die Expression von Hsp90 α dagegen erfolgt unter Kontrolle des Hitzeschockfaktors HSF (Zhang et al., 1999). Zusätzlich wurde eine weitere, exotische Hsp90-Variante beschrieben, der die N-terminale Domäne fehlt (Grammatikakis et al., 2002). Im Falle von *D. melanogaster* wurde darüberhinaus demonstriert, dass Veränderungen in der Expressionsmenge, wie sie bei heterozygoten Deletionen auftreten, den Phänotyp der Fruchtfliege stark beeinträchtigen können (Rutherford & Lindquist, 1998). Da dabei eine ganze Reihe verschiedener Phänotypen zu beobachten war, wird vermutet, dass Hsp90 an sehr vielen Signaltransduktionswegen als molekulares Chaperon beteiligt ist. Interessanterweise wurde beobachtet, dass Phänotypen, die zunächst nur bei partieller Inhibierung des Hsp90-Systems auftraten, sich stabil manifestierten, wenn einige Replikationsrunden auf diesen Phänotyp selektiert wurde. Dies könnte zeigen, dass Hsp90 in der Lage ist, auftretende Mutationen zunächst abzupuffern und somit die Evolution bestimmter Phänotypen zu ermöglichen. Das molekulare Chaperon Hsp90 könnte dabei die veränderten Proteine zunächst in ihrer Funktion stabilisieren und ihnen somit die Möglichkeit geben, durch die Akkumulierung weiterer unabhängiger Mutationen einen stabilen Phänotypen auszubilden (Rutherford & Lindquist, 1998). Ähnliches wurde auch für pflanzliches Hsp90 an *A. thaliana* demonstriert, bei denen ebenfalls eine partielle Inaktivierung von Hsp90 genügte, um eine Reihe unterschiedlicher Phänotypen zu generieren (Queitsch et al., 2002).

Bei höheren Eukaryonten treten wie zuvor beschrieben neben den cytosolischen Vertretern weitere Hsp90-homologe Proteine auf. Ihre Funktion ist größtenteils noch unklar. Lediglich für Grp94 konnte bisher *in vivo* eine Funktion nachgewiesen werden. Mäuse, denen dieses Protein fehlt, sind zwar lebensfähig, sind aber nicht in der Lage angeborene Immunantwort (innate immunity) zu zeigen (Randow & Seed, 2001). Dies zeigt eine Bedeutung von Grp94 speziell in der Antikörperproduktion. Hier wird vermutet, dass Grp94 zusammen mit BIP, dem Hsp70-homologen Protein aus dem endoplasmatischen Retikulum, an der Reifung der Antikörper im endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist.

1.6.5 Die eukaryontischen Partnerproteine des Hsp90-Systems

Die Sequenzhomologie der Partnerproteine ist deutlich geringer ausgeprägt als die von Hsp90. Während für Sti1 und die PPIasen noch eine eindeutige Zuordnung möglich ist, ist die Sequenzhomologie von Sba1 mit p23 bereits sehr klein. Im Falle von Cdc37 beschränkt sich die Sequenzhomologie lediglich auf 25 hochkonservierte Aminosäuren am N-Terminus des Proteins, während die restlichen 400 Aminosäuren kaum Verwandtschaft erkennen lassen. Somit ist es hier kaum möglich zu postulieren, dass diese Proteine identische Funktionen erfüllen. Darüberhinaus zeigen sich auch bei den Partnerproteinen genomische Verdopplungen. So konnte neben p23 ein zweites homologes Protein, tsp23, identifiziert werden, wobei die Expression der beiden Proteine gewebsspezifisch erfolgt (Freeman *et al.*, 2000).

Über Phänotypen, die durch die Deletion von Partnerproteinen des Hsp90-Systems entstehen ist noch nicht viel bekannt. In *S. cerevisiae* wurden alle Partnerproteine deletiert und dabei zeigten lediglich Cns1 und Cpr7 mehr als einen hitze-sensitiven Phänotyp. Der *knock-out* von Cpr7 verlangsamte bereits unter permissiven Bedingungen erheblich das Wachstum von *S. cerevisiae* (Duina *et al.*, 1998b), und Cns1 gilt als essentielles Protein (Dolinski *et al.*, 1998; Marsh *et al.*, 1998). Auch doppel-*knock-outs* wurden untersucht und dabei die Kombinationen Hsc82/Cdc37, Hsc82/Cpr7, Cpr7/Sti1 und Hsp82/Sti1 als lethal identifiziert (Chang *et al.*, 1997; Duina *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997). Lediglich Cdc37 wurde an höheren Eukaryonten untersucht. Dabei wurden in *D. melanogaster* eine Reihe von verschiedenen Phänotypen gefunden, die auch durch Mutationen im Gen für Hsp83 verursacht werden konnten (Cutforth & Rubin, 1994; Lange *et al.*, 2002).

1.6.6 Natürliche Hsp90-Inhibitoren

Ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle des Hsp90-Systems ist darin zu sehen, dass einige Pilze Sekundärmetaboliten produzieren, die als hochspezifische Hsp90-Inhibitoren wirken (Whitesell *et al.*, 1994). So finden sich in Aktinomyceten die Substanzen Geldanamycin, Herbimycin, Macbecin und andere Vertreter der sogenannten Benzoquinon-Ansamycine. Diese heterozyklischen Substanzen binden mit hoher Affinität an die ATP-Bindestelle von Hsp90 und blockieren damit die ATPase-Aktivität (Scheibel *et al.*, 1998). Die Art der Bindung konnte durch die Kristallisation von Geldanamycin•Hsp90 Komplexen geklärt werden (Stebbins *et al.*, 1997).

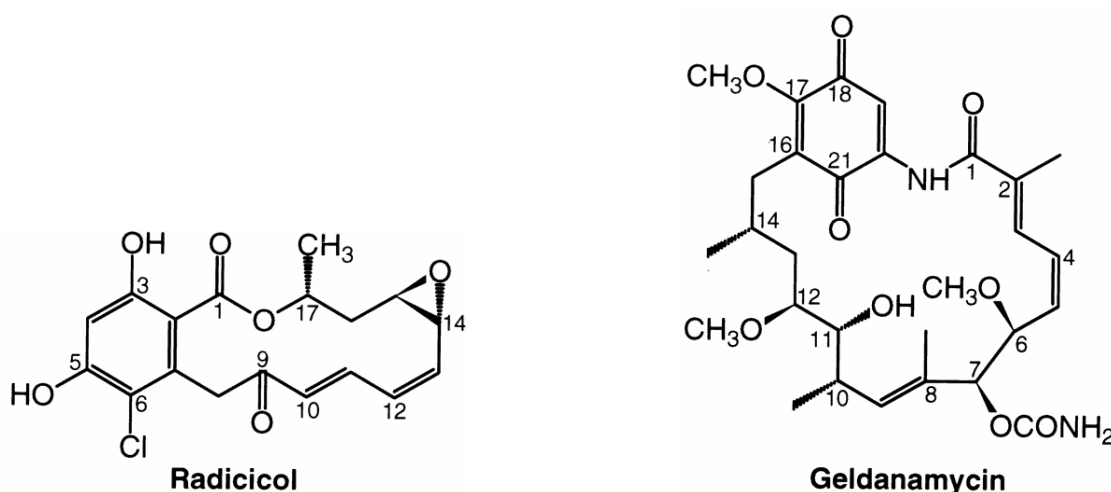


Abbildung 1-12: Chemische Strukturen von Radicicol und Geldanamycin.

Einer weiteren Klasse von Hsp90-spezifischen Inhibitoren wird Radicicol zugeordnet, das von *Streptomyces* gebildet wird. Es bindet mit einer Affinität von 9 nM, und damit etwa 100mal stärker als Geldanamycin, ebenfalls an die ATP-Bindestelle und blockiert damit alle ATP-abhängigen Vorgänge von Hsp90 (Roe *et al.*, 1999). Die natürlichen Funktionen dieser Inhibitoren sind nicht bekannt, genauso wenig die Art und Weise wie sich die Produzenten gegen die potentiell schädlichen Einflüsse schützen. Für die Untersuchung Hsp90-abhängiger Prozesse hatte die Entdeckung von Geldanamycin und Radicicol eine entscheidende Bedeutung, da mit ihrer Hilfe wichtige Impulse bei der Identifikation von Hsp90-Substraten erfolgten. So führt die Zugabe von Geldanamycin zum Medium zu einem schnellen Abbau vieler Hsp90-abhängiger Proteine. Da für viele der Hsp90-abhängigen Proteine eine Wirkung als Onkogene nachgewiesen wurde, wird eine therapeutische Wirkung dieser Substanzen gegenwärtig erprobt (Neckers, 2002).

1.7 Hsp90- Substrate

Zahlreiche Studien beschäftigten sich damit, Hsp90-abhängige Substrate zu identifizieren und das komplexe Zusammenspiel der Partnerproteine mit Hsp90 zu verstehen, das erforderlich ist, um diese Substrate zu prozessieren. Besonders für die Identifizierung von Substraten erwies sich die Verwendung von Geldanamycin und Radicolol als spezifische Hsp90-Inhibitoren als sehr hilfreich. So wurde beobachtet, dass nach dem Zusatz der Inhibitoren in vielen Fällen ein rascher Abbau der Substratproteine stattfindet. Dieser Assay konnte somit verwendet werden, um die Abhängigkeit eines Proteins von der Hsp90-Maschinerie zu belegen. Die dadurch identifizierten Substratproteine werden in mehrere Gruppen eingeteilt, die untereinander keine strukturelle oder sequenzielle Homologie aufweisen.

Transcription factors:	Others:
<ul style="list-style-type: none"> - 12(S)-HETE receptor - all vertebrate steroid receptors (GR, MR, ER, PR, AR) - cytoplasmic v-erbA - Hap1 - HSF-1 - p53 - PAS family members: Dioxin receptor (=AhR), Sim and HIF-1α - water mold <i>Achlya</i> steroid (antheridiol) receptor 	<ul style="list-style-type: none"> - ANP receptor - Apaf-1 - apoB - calcineurin (Cna2; catalytic subunit) - calmodulin - calponin - Ctf13/Skp1 component of CBF3 - cytoskeleton: actin, tubulin, myosin - DNA polymerase α - eNOS, nNOS (?) - free $\beta\gamma$ subunit of G protein - Gα_0, Gα_{12} - GERP95 - macromolecular aminoacyl-tRNA synthetase complex - Macrophage scavenger receptor - Mdm2 - nascent CFTR - proteasome - reovirus protein $\sigma 1$ - reverse transcriptase of hepatitis B virus - SV40 large T-antigen - telomerase - thrombin receptor (PAR-1) - Vaccinia core protein 4a
Kinases:	
<ul style="list-style-type: none"> - Akt/PKB - Bcr-Abl - casein kinase IIα catalytic subunit - Cdk9 - c-Mos - death domain kinase RIP - eEF-2 kinase - eIF2-α kinases HRI, Gcn2, PKR - ErbB2 - IκB kinases α and β - insulin receptor - KSR - MEK - Mik1 - MOK, MAK, MRK - Nucleophosmin-Anaplastic Lymphoma Kinase - PDK1 - Pim-1 - Plk1 - pp60v-src, c-src - src related tyrosine kinases: yes, fps, fes, fgr, and lck - Raf-1, B-Raf, Ste11 - Wee1, Swe1 	

Tabelle 1-1: Hsp90-abhängige Substrate.

Die Tabelle ist entnommen von <http://www.picard.ch/DP/Hsp90interactors.pdf>. Diese Tabelle wird dort ständig aktualisiert.

Diskriminatoren für die Hsp90-Spezifität sind nach wie vor unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass die Substrate in einer strukturierten Form gebunden werden und dadurch in einer ansonsten energetisch ungünstigen Konformation stabilisiert werden. Dies ermöglicht den Substraten die Durchführung weiterer Reaktionen, wie zum Beispiel die Bindung des Glucocorticoidhormons an die offene Bindetasche des GR (Pratt & Toft, 1997) oder die Stabilisierung der Src-Kinase an der Plasmamembran (Xu *et al.*, 1999). Auch bei anderen Substraten, wie der Reversen Transkriptase aus dem *duck*-HepatitisB-Virus ist bekannt, dass ihre Aktivierung durch mehrere Konformationsänderungen erfolgt, in deren Folge eine RNA, die sogenannte ϵ -RNA, in das Protein eingebaut wird (Hu & Seeger, 1996). Für die meisten Substrate scheint dabei zu gelten, dass nur die inaktiven Proteine eine Wechselwirkung mit Hsp90 eingehen, und diese Wechselwirkung dann nach erfolgter Aktivierung aufgelöst wird. Auch die strukturellen Voraussetzungen für die Assemblierung mit Hsp90 konnten trotz der Vielzahl bekannter Substrate bisher nicht geklärt werden. Es wird derzeit vermutet, dass ein besonderer Faltungszustand für die Assoziation mit Hsp90 verantwortlich ist (Jakob und Buchner, 1994; Buchner, 1996)

1.7.1 Die Aktivierung von Glucocorticoidrezeptoren

Da Glucocorticoidrezeptoren die am besten untersuchten Hsp90 Substrate darstellen, sind die Schritte, die zu ihrer Aktivierung als Transkriptionsfaktoren führen, auch am weitesten aufgeklärt. Glucocorticoidrezeptoren liegen als cytosolische Proteine vor, sind jedoch für sich alleine nicht in der Lage Hormon zu binden. So scheint die Bindetasche des freien Rezeptors in einer Konformation vorzuliegen, die die Hormonbindung nicht zuläßt. Dagegen war schon lange bekannt, dass Glucocorticoidrezeptoren in cytosolischen Multiproteinkomplexen vorliegen (Catelli *et al.*, 1985a), in denen auch Hsp90 auftritt (Ziemiecki *et al.*, 1986). Erst durch die Assemblierung mit Hsp90 zu einem Rezeptor•Hsp90-Komplex wird die Hormonbindung ermöglicht (Denis & Gustafsson, 1989). *In vitro* Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Hsp90 nicht in der Lage ist an einen isolierten Rezeptor zu binden, sondern eine Abfolge von Reaktionen durchlaufen werden muß, um diesen Komplex zu formen (Scherrer *et al.*, 1990). Diesen Prozess, der die Entstehung und den Zerfall des reifen Steroidrezeptor-Komplexes beschreibt, nennt man den Chaperonzyklus von Hsp90 (Smith, 1995; Picard, 1997).

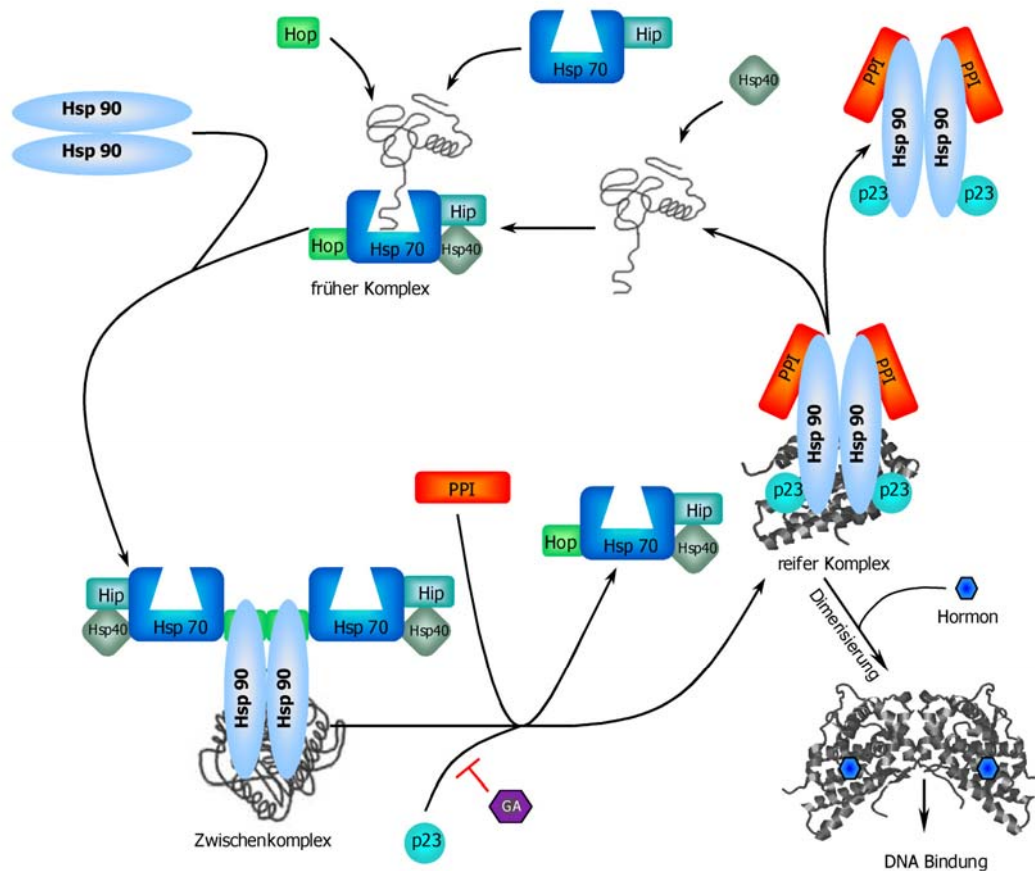


Abbildung 1-13: Chaperonzyklus von Hsp90

Um die Aktivierung von Steroid Hormon Rezeptoren zu erreichen wird dieser Zyklus durchlaufen. Durch das geordnete Bilden und Auflösen von Proteinkomplexen entsteht schließlich der reife Komplex. Findet hier Hormonbindung statt, so kommt es zur Aktivierung des Rezeptors als Transkriptionsfaktor, findet keine Bindung statt, so wird der Zyklus nochmals durchlaufen. (Darstellung des Zyklus nach Otmar Hainzl)

Dazu liegt der Rezeptor zunächst in einem Komplex vor, der die beiden Chaperone Hsp70 und Hsp40 enthält, wobei der erste Kontakt nach jüngsten Daten zwischen Hsp40 und dem Rezeptor hergestellt wird (Hernandez *et al.*, 2002). Dieser Komplex wird als der „frühe Komplex“ bezeichnet. Unter Verwendung des Adaptorproteins Hop (Chen *et al.*, 1996c; Johnson *et al.*, 1998) kommt es zum Kontakt des „frühen Komplexes“ mit Hsp90 und zur Bindung von Hsp90 an die hormonbindende Domäne des Rezeptors (Housley *et al.*, 1990). In diesem „intermediären Komplex“, der als Grundgerüst das dimere Hsp90 enthält, ist die Stöchiometrie bezüglich des Rezeptors noch nicht geklärt. Vermutlich finden sich zwei Hop und zwei Hsp70-Moleküle in diesem Komplex. Wieviele Substrate vorliegen ist unklar. Dieser „intermediäre Komplex“ wird unter Bildung eines „späten Komplexes“ aufgelöst, bei

dem statt Hop, Hsp70 und Hsp40 die Proteine p23 und eine der großen PPIasen gebunden sind (Johnson & Toft, 1994). Sowohl im intermediären, als auch im späten Komplex ist der Rezeptor in der Lage Hormon zu binden. Nach der Hormonbindung kommt es zur Loslösung von der Chaperonmaschinerie, zur Dimerisierung des Rezeptors, zum Eintritt in den Zellkern und zur Bindung an die regulatorischen Sequenzen der DNA. Ein hormonbesetzter Rezeptor hat dabei vermutlich nur noch eine geringe Affinität für die Beladungsmaschinerie des Hsp90-Komplexes (Pratt, 1997; Smith, 1993). Die gesamte Dauer eines Chaperonzyklus wird auf einige Minuten geschätzt, was hohe Anforderungen an die Dynamik der Komplexbildung stellt (Smith, 1993).

Die Rolle der ATP-Hydrolyse während des Zyklusses ist sowohl im Falle von Hsp70, als auch bei Hsp90 noch unklar, auch wenn gezeigt werden konnte, dass Hsp70 wohl mehrere Hydrolysezyklen durchläuft (Morishima *et al.*, 2001). Biochemische Daten und Co-Immunopräzipitationen lassen vermuten, dass die Komplexe, die p23 enthalten, auch ATP gebunden haben, so dass eine ATP-Hydrolyse durch Hsp90 erst bei gebundenem Substrat erfolgen würde. Unter Verwendung zweier Punktmutanten für humanes Hsp90, von denen eine kein ATP hydrolysieren (E46A-Hsp90) und die andere kein ATP binden kann (D92N-Hsp90) konnten zumindest Hinweise auf die Bedeutung der ATP-Bindung und Hydrolyse erhalten werden. So ist weder ATP-Bindung noch Hydrolyse erforderlich, um Hsp90•Rezeptor-Komplexe zu bilden, eine Aktivierung des Rezeptors für die Hormonbindung erfordert dagegen die Hydrolyse des ATP (Grenert *et al.*, 1999).

1.7.2 Die Aktivierung von Kinasen durch Hsp90

Die Suche nach Hsp90-Substraten hat zu einer Vielzahl von Kinasen geführt, die in stabilen Komplexen mit Hsp90 vorliegen. Zunächst war dies lediglich für Src-Kinase beobachtet worden (Brugge *et al.*, 1981). Mittlerweile ist dies auch für andere Tyrosinkinase wie Fes, Fgr, Fps, Ros, Yes und Lck sowie die Threoninkinase Raf, Gag-Mil, Cdk4, CKII und eIF2 α nachgewiesen (Neckers *et al.*, 1999).

Die Bedeutung und das Zustandekommen dieser Heterokomplexe ist weniger gut verstanden, als dies bei Steroidrezeptoren der Fall ist. Hier konnte bisher kein schlüssiger Weg für die Assemblierung der Komplexe aufgezeigt werden, auch wenn es vereinzelte Hinweise gibt, dass Hop auch hier an der Beladung von Hsp90 beteiligt ist (Stancato *et al.*, 1997). Sicher ist allerdings, dass in den späten Komplexen neben Hsp90 das Protein Cdc37 vorliegt, das bei allen bisher untersuchten Hsp90-abhängigen Kinasen gefunden wurde. Es wird spekuliert,

dass Cdc37 im Falle der Kinasekomplexe eine ähnliche Rolle übernimmt wie die PPIasen im Falle der Steroidrezeptoren (Pratt *et al.*, 1999). In einigen Fällen wurde berichtet, dass die gebildeten Komplexe nicht nur eine Kinase enthalten, sondern unter Verwendung mehrerer Kinasen zu Multiprotein-Komplexen assemblieren (Stewart *et al.*, 1999). Welche Funktion diese Komplexe haben ist noch nicht geklärt.

Im Falle der Src-Kinase wird vermutet, dass Hsp90 die Aufgabe hat, eine „naive“ Src-Kinase im Zytoplasma zu stabilisieren und auf dem Weg zur Plasmamembran zu begleiten (Bijlmakers & Marsh, 2000). Hier erfolgt dann die Assoziation mit der Plasmamembran über einen Myristoylsäure-Linker, die Aktivierung der Kinase und die Dissoziation von Hsp90. Die einmal gereifte Src-Kinase scheint nicht auf die Wechselwirkung mit Hsp90 angewiesen zu sein (Brugge *et al.*, 1983). Auch wird beobachtet, dass nur solche Kinasen nach Geldanamycin-Zugabe abgebaut werden, die noch keine Aktivität erlangt haben (Uehara *et al.*, 1989). Während der Aktivierung der Kinasen ist die Rolle, die die ATP-Hydrolyse durch Hsp90 spielt, völlig unklar.

2. Problemstellung

Der Nachweis, dass Hsp90 ein „aktives“ Chaperon ist, wurde durch die Identifikation der N-terminalen ATP-Bindestelle erbracht. Die Beobachtung, dass die ATP-Hydrolyse durch Hsp90 *in vivo* ein entscheidendes Kriterium für die Erfüllung seiner Funktionen ist, legt nahe, dass ein grundlegendes Verständnis der Aufgaben von Hsp90 im zellulären Kontext nicht zu erlangen ist, ohne die Reaktionen zu verstehen, die zur Hydrolyse des ATP führen.

Im Zuge dieser Arbeit galt es Einblick in den Mechanismus der ATP Hydrolyse zu gewinnen, um zu verstehen, was die Voraussetzungen und die Limitierungen der Hydrolysereaktion darstellen. Dazu sollten zunächst auf der Basis von Fragmenten Bereiche ermittelt werden, die für die Hydrolyse essentiell sind. Speziell galt es dabei, die Bedeutung der dimeren Konformation von Hsp90 für die ATP-Hydrolyse zu untersuchen, und im Weiteren zu versuchen, die ATP-Hydrolyse mechanistisch, wenn möglich auch anhand von strukturellen Untersuchungen, zu verstehen. Dabei war es eine zentrale Frage, welche Rolle Konformationsänderungen von Hsp90 im Verlauf der Hydrolysereaktion spielen. Deshalb sollten mit Hilfe einer sinnvollen Fragmentierungsstrategie Hsp90-Fragmente erzeugt werden, die eine Beantwortung dieser Fragestellungen zulassen. Darüberhinaus sollte anhand der gereinigten Hsp90-Fragmente unter Verwendung eines geeigneten Chaperonassays versucht werden, die Bindestelle für nicht-native Proteine von Hsp90 zu lokalisieren.

Im Weiteren galt es, den Einfluss von Hsp90-Partnerproteinen auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 zu verstehen. So erfordert die Prozessierung von Substraten durch Hsp90 die koordinierte Assoziation von Partnerproteinen mit dem Hsp90-Komplex. Viele dieser Reaktionen laufen auch in Abwesenheit des Substrats ab, und zumindest im Falle des Proteins Sti1 konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität von Hsp90 in einem Hsp90•Sti1-Komplex inhibiert wird. Unter Zuhilfenahme der erzeugten Fragmente sollten zunächst Bindestellen für die Partnerproteine Cpr6, Sti1 und Sba1 ermittelt werden. Darüberhinaus sollte die mechanistische Analyse der ATP-Hydrolyse verwendet werden, um zu verstehen, unter welchen Voraussetzungen die Partnerproteine, die die ATP-Hydrolyse von Hsp90 beeinflussen, mit Hsp90 assemblieren und wie ihre Assemblierung koordiniert wird. Basierend auf diesen Daten war es das Ziel, ein Modell zu entwickeln, das beschreibt, wie die Hydrolyse von ATP durch Hsp90 in den bestehenden Chaperonzyklus eingefügt werden kann.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung (38% mit 2% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Adenosyl-imidodiphosphat (AMP-PNP)	Roche, Mannheim, Deutschland
Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Dinatriumsalz	Roche, Mannheim, Deutschland
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Dinatriumsalz	Roche, Mannheim, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roche, Mannheim, Deutschland
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bacto Pepton	Difco, Detroit, USA
Bacto Trypthon	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
<i>Complete</i> Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, USA
Dithiothreit	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ECL+plus Western Blotting Detektion System	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ethanol, p.a.	Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Glyzerin, 99%	ICN, Irvine, USA
Guanidin Hydrochlorid, p.a.	ICN, Irvine, USA
Lachssperma DNA	Sigma, St. Louis, USA
2-Mercaptoethanol, reinst	Sigma, St. Louis, USA
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)	ICN, Irvine, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ponceau S	Sigma, St. Louis, USA
Silbernitrat, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN, Irvine, USA
Yeast Nitrogene Base	Difco, Detroit ,USA

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und hatten, falls nicht eigens erwähnt, den Reinheitsgrad p.a.. Zur Herstellung der Pufferlösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

3.1.2 Größenstandards und Kits

BiaCore amine coupling kit	BiaCore Inc., Uppsala, Schweden
BstEII-geschnittene λ -DNA	New England Biolabs, Beverly, USA
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
High-Range-Molekulargewichtsstandard (HMW für SDS-PAGE)	BioRad Laboratories, München
Low-Range-Molekulargewichtsstandard (LMW für SDS-PAGE)	BioRad Laboratories, München
QIAquick, Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rainbow markers für SDS-PAGE	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
EnzChek ATPase-Assay Kit	Molecular Probes Inc., Leiden, Niederlande
Eichproteine für HPLC	Roche, Mannheim, Deutschland

3.1.3 Proteine und Antikörper

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim, Deutschland
Pwo-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
T4-Ligase	Promega, Madison, USA

polyklonales Serum gegen Hsp82 (Hase)	Dr. J. Pineda Antikörper Service, Berlin, Deutschland
polyklonales Serum gegen Cpr6 (Hase)	Dr. J. Pineda Antikörper Service, Berlin, Deutschland
polyklonales Serum gegen Sba1 (Hase)	Dr. J. Pineda Antikörper Service, Berlin, Deutschland
polyklonales Serum gegen Sti1 (Hase)	Dr. J. Pineda Antikörper Service, Berlin, Deutschland
monoklonaler IgG-POD Konjugat gegen Hasen-IgG (Schaf)	Sigma, St. Louis, USA
monoklonaler IgG-Antikörper gegen Penta-Histidin (Maus)	Qiagen, Hilden, Deutschland
monoklonales IgG-POD Konjugat gegen Maus-IgG (Schaf)	Sigma, St. Louis, USA

3.1.4 Chromatographiematerialien

DEAE-Sephacel	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Q-Sepharose	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
S-Sepharose	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Hydroxyapatit	BioRad, München, Deutschland
Ni-NTA-Superflow	Qiagen, Hilde, Deutschland
Chelating Sepharose	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Resource-S	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Resource-Q	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Superdex 75 Prep Grade	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden

Superdex 200 Prep Grade	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Superdex 200 HR	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ceramic Hydroxyapatite CHT-5	Biorad, München, Deutschland

3.1.5 Sonstige Materialien

Centricon 3, Centricon 10, Centricon 30	Amicon, Witten, Deutschland
Centriprep 10, Centriprep 30	Amicon, Witten, Deutschland
Dialyseschläuche Spectra/Por 6000-8000 Da	Spectrum, Houston, USA
Polyacrylamid-Fertiggele (4 - 12%)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Polyacrylamid-Fertiggele (10 - 20%)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Sterilfilter 0,2 µm	Zefa, München, Deutschland
PE-Röhrchen (50/15 ml)	Greiner & Söhne, Nürtingen, Deutschland
pH-Indikatorstreifen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Röntgenfilme X-OMAT AR	Eastman Kodak, Rochester, USA
Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
Immobilon-NC(Nitrocellulose)-Membran	Millipore, Bedford, USA
Immobilon-P(PVDF) Membran	Millipore, Bedford, USA
Einmalküvetten 1,5 ml halbmikro	Zefa, München, Deutschland
Ultrafiltrationsmembranen YM3, YM10, YM30	Millipore, Bedford, USA
Quarzglas Suprasil Küvetten	Starna GmbH, Pfungstadt, Deutschland

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

3.1.6 Geräte

Spektrophotometer

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

Novaspec II visible (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

J-715 Spektropolarimeter mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

FluoroMax II mit thermostatisierbarem Küvettenhalter (Spex, Edison, USA)

Pharmacia Biochrom 4060 UV-visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

FluoroMax-3 mit thermostatisierbarem Küvettenhalter (Spex, Edison, USA)

Stopped-flow Instrument

Pbp 05-109 SpectraKinetik Monochromator (Applied Photophysics, Surrey, UK)

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

Surface-plasmon resonance Instrument

BiaCore X (BiaCore, Uppsala, Schweden)

Microcalorimeter

VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal Incorporated, Northampton, USA)

ThermoVac (MicroCal Incorporated, Northampton, USA)

Gelelektrophorese- und Blotapparaturen

RHU10X (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Hofer Mighty Small II Gelelektrophoreseeinheit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Fast Blot B44 Apparatur (Biometra, Göttingen, Deutschland)

Spannungsquellen

LKB-GPS 200/400 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

EPS 3500, 301 und 1001 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Waagen

Analysenwaage BP 121 S (Satorius, Göttingen, Deutschland)

Halbmikrowaage BL 310 (Satorius, Göttingen, Deutschland)

Zentrifugen

Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Rotina 46 R Kühlzentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Avanti J 25 mit JA-10 und JA-25.50-Rotoren (Beckman, Wien, Österreich)

Beckman XL-I Analytical ultracentrifuge (Beckman, Wien, Österreich)

Chromatographieanlagen

GradiFrac System (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

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

HighLoad System (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Super-Loop 50 ml (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Super-Loop 150 ml (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

PU-1580 HPLC Pump (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

LG-980-02S Gradient Unit (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

FP-1520 Fluorescence Detector (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

UV-1575 UV-VIS Detector (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

Weitere Geräte

Varioklav Dampfsterilisator EP-Z	H+P, Oberschleißheim, Deutschland
Equibio EASYJECT plus	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Kulturschüttler Certomat S	Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Magnetrührer Heidolph MR 2000	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Digitalthermometer mit Thermofühler	Keithley, Cleveland, USA
Metallthermoblock TB 1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Eppendorf-Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Reagenzglasroller	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Thermocycler Primus	MWG, Ebersberg, Deutschland
Ultraschallaufschlussgerät Sonifier B-12	Branson, Danbury, USA

Ultraschallbad Sonesorex RK 100H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Umluftinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Zellaufschlussgerät Basic Z	Constant Systems, Warwick, England
Wasserbad Haake F6-K	Haake, Karlsruhe, Deutschland

3.1.7 Computerprogramme

Adobe Photoshop 6.0	Adobe Inc., San Jose, USA
Adobe Reader 5.0	Adobe Inc., San Jose, USA
CDNN Spectra Deconvolution 2.1	http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de
Microsoft Office 7.0	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Sigma Plot 2001	SPSS, Chicago, USA
ProtParamTool	ExPasy (http://expasy.hcuge.ch/)
ProtScale Tool	ExPasy (http://expasy.hcuge.ch/)
Corel Photo Paint8.0	Corel Corporation Ltd., Ontario, Kanada
Primer Design 1.02	S & E Software, Madison, USA
Borwin	Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland
Scientist	MicroMath Research, St. Louis, USA
ViewerLite 5.0	Accelrys Inc., San Diego, USA
RasMol 2.7.2.1	RasWin Molecular Graphics, Bellport, USA
Origin	OriginLab Corp., Northampton, USA

3.2 Verwendete Organismen und ihre Kultivierung

3.2.1 Stämme

In folgender Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme zusammengestellt:

Stamm	Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>araD</i> 139Δ(<i>ara leu</i>) 7697Δ <i>lacX74 galU galK</i> <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr⁻ hsdRMS-</i> <i>mcrBC</i>) <i>rpsL decR</i> 380 Δ <i>lacZ</i> ΔM15 <i>endA1 nupG recA1</i>	(Jessee, 1986)
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (r _R ⁻ m _R ⁻) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1</i> <i>galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	(Bolivar & Backman, 1979; Roulland-Dussoix & Boyer, 1969)
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Nal ^S Str ^S <i>rif^S, lac⁻ ara⁻ gal⁻</i> <i>mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺</i>	(Villarejo & Zabin, 1974)
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Δ(<i>mcrA</i>) 183 Δ (<i>mcrCB-</i> <i>hsdSMR-mrr</i>) 173 <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 lac[F⁻proAB</i> <i>lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)] Su⁻</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus	F ⁻ <i>omp T lon</i> (r _B -m _B -)	Stratagene, La Jolla, USA

In folgender Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme zusammengestellt:

Stamm	Geno-/Phänotyp	Herkunft/Referenz
ECUalpha pep4	<i>can1-100 ade2-1 his3-11,15</i> <i>leu2-3,12 trp1-1 ura3-1</i> hsc82::LEU2 hsp82::LEU2 pep::HIS (p2umGPD/hsp82)	Debbie Nathan
ECU82 α	α <i>can1-100 ade2-1 his3-11,15</i> <i>leu2-3,12 trp1-1 ura3-1</i> hsc82::LEU2 hsp82::LEU2 (pKAT6)	Debbie Nathan
G170D α	α <i>can1-100 ade2-1 his3-11,15</i> <i>leu2-3,12 trp1-1 ura3-1</i> hsc82::LEU2 hsp82::LEU2 (pTGpd/T1-101)	Debbie Nathan

3.2.2 Medien

Folgende Medien wurden für die Anzucht von Bakterien verwendet.

LB ₀ :	Bacto Trypton	10 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	5 g
	10 M NaOH	350 μ l
	H ₂ O	ad 1 l

Für Platten: 15 g Bacto Agar

M9-Medium:	Na ₂ HPO ₄ •H ₂ O	6 g
	KH ₂ PO ₄	3 g
	NaCl	0,5 g
	Glucose oder ¹³ C ₆ -Glucose	2 g
	NH ₄ Cl oder ¹⁵ NH ₄ Cl	1 g
	H ₂ O oder 70% D ₂ O	ad 1 l
	→ autoklavieren	
	+ 1 M MgSO ₄ (steril)	2 ml
	+ 1 M CaCl ₂ (steril)	0,1 ml

Für *E. coli* verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml (LB-Medium) bzw. 40 µg/ml (M9-Medium)
Kanamycin	35 µg/ml (Plasmid pET28) bzw. 50 µg/ml (Plasmid M15)
Chloramphenicol	50 µg/ml

Folgende Medien wurden für die Anzucht von Hefestämmen verwendet:

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

CSM:	YNB	6,7 g
	Selektiv-Aminosäuren-Mix	1,4 g
	Glucose	20 g
	1 M NaOH	1 ml
	H ₂ O	ad 1 l
	Für Platten: 20 g Bacto Agar	

Selektiv-Aminosäure-Mix	Adenin	0,5 g
	Alanin	2,0 g
	Arginin	2,0 g
	Asparagin	2,0 g
	Aspartat	2,0 g
	Cystein	2,0 g
	Glutamin	2,0 g
	Glutamat	2,0 g
	Glycin	2,0 g
	Histidin	2,0 g
	Inositol	2,0 g
	Isoleucin	2,0 g
	Leucin	10,0 g
	Lysin	2,0 g
	Methionin	2,0 g
	<i>para</i> -Aminobenzoensäure	0,2 g
	Phenylalanin	2,0 g
	Prolin	2,0 g
	Serin	2,0 g
	Threonin	2,0 g
Tryptophan	2,0 g	
Uracil	2,0 g	
Valin	2,0 g	

5`-FOA – Platten: zusätzlich 0,1% 5`-Fluor-orothsäure

3.2.3 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*

Ausstrichkulturen von *E. coli* auf Agarplatten wurden für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert und zur Lagerung im Kühlschrank unter Luftabschluss aufbewahrt. Die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen in LB-Medium erfolgte unter Zugabe entsprechender Antibiotika zur Selektion auf das jeweilige Plasmid. Hierbei wurden kleinere Volumina von einer Einzelkolonie, größere Volumina aus Übernachtskulturen angeimpft. Volumina bis zu 10 ml wurden im Reagenzglasroller inkubiert, Kulturen über 10 ml im Umluftschüttelinkubator. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei 600 nm beobachtet. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von eins etwa 8×10^8 Zellen/ml (Sambrook et al., 1989).

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 300 µl 50%igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.4 Anzucht und Aufbewahrung von *S. cerevisiae*

Ausstrichkulturen von *S. cerevisiae* wurden auf YPD oder CSM-Platten 2-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Anzucht in Flüssigmedien erfolgte bei kleineren Volumina im Reagenzglasroller und bei größeren Volumina im Umluftschüttelinkubator bei 30 °C. Kleinere Volumina wurden hierbei aus Einzelkolonien, größere Volumina aus stationären Übernachtskulturen angeimpft. Das Wachstum der Zellen wurde photometrisch bei 595 nm verfolgt. Dabei entspricht eine OD₅₉₅ von eins etwa 2×10^7 Zellen/ml (Walker, 1998).

Die Hefestämme wurden für kurze Zeit als stationäre Flüssigkulturen bei 4 °C gelagert. Alternativ wurden 700 µl einer exponentiell wachsenden Flüssigkultur mit 300 µl 50%igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.3.1 Plasmide

Folgende Plasmide wurden in dieser Doktorarbeit verwendet, beziehungsweise in dieser Doktorarbeit hergestellt:

	Vektor	Plasmid	Herkunft/Referenz
1	pET11a – Hsp82	Hsp82 in <i>E. coli</i> unter T7-Promotor, Amp ^R	In dieser Arbeit erstellt
2	pET11a – N210	AS 1-210 von Hsp82	(Scheibel <i>et al.</i> , 1998)
3	pET11a – 262C	AS 262-709 von Hsp82	(Scheibel <i>et al.</i> , 1998)
4	pET11a – Δ8 – N210	AS 9-210 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
5	pET11a – Δ12 – N210	AS 13-210 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
6	pET11a – Δ16 – N210	AS 17-210 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
7	pET11a – Δ24 – N210	AS 25-210 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
8	pET11a – Δ8 – Hsp82	AS 9-709 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
9	pET11a – D79N – N210	AS 1-210 mit D79N-Mutation	In dieser Arbeit erstellt
10	pET11a – E33A – N210	AS 1-210 mit E33A-Mutation	In dieser Arbeit erstellt
11	pET11a – N409	AS 1-409 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
12	pET28b – Hsp82	Hsp82 mit N-term His-Tag unter T7-Promotor, Kan ^R	In dieser Arbeit erstellt
13	pET28b – Δ8 – Hsp82	AS 9-709 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
14	pET28b – Δ16 – Hsp82	AS 17-709 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
15	pET28b – Δ24 – Hsp82	AS 25-709 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
16	pET28b – N599	AS 1-599 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
17	pET28b – Δ8 – N210	AS 9-210 von Hsp82	In dieser Arbeit erstellt
18	pQE30 – 527C	AS 527-709 von Hsp82 unter T5-Promotor mit N-term. His-Tag, Amp ^R	Paul Muschler
19	pQE30 – N599	AS 1-599 von Hsp82	Paul Muschler
20	pQE30 – N527	AS 1-529 von Hsp82	Paul Muschler
21	pQE30 – D79N – Hsp82	Hsp82 mit D79N-Mutation	Paul Muschler
22	pQE30 – E33A – Hsp82	Hsp82 mit E33A-Mutation	Paul Muschler

23	pQE60 – 262-527	AS 262-527 von Hsp82 mit C-term. His-Tag, Amp ^R	In dieser Arbeit erstellt
24	p2HGal – Hsp82	Hsp82 in 2 μ -Plasmid unter Gal-Kontrolle, HIS	In dieser Arbeit erstellt
25	p2HGal – N210	AS 1-210 in p2HGal	In dieser Arbeit erstellt
26	p2HGal – N529	AS 1-529 in p2HGal	In dieser Arbeit erstellt
27	p2HGal – 262C	AS 262-709 in p2HGal	In dieser Arbeit erstellt
28	p2HGal – 527C	AS 527-709 in p2HGal	In dieser Arbeit erstellt
29	p2HGal – 262-527	AS 262-527 in p2HGal	In dieser Arbeit erstellt
30	p2HGal – Δ 8 – Hsp82	AS 9-709 in p2HGal	In dieser Arbeit erstellt
31	p2HGal – Δ 16 – Hsp82	AS 17-709 in p2HGal	In dieser Arbeit erstellt
32	p2HGal – Δ 24 – Hsp82	AS 25-709 in p2HGal	In dieser Arbeit erstellt
33	p2HGal – His – Hsp82	Hsp82 in p2HGal mit N-term His-Tag aus pET28	In dieser Arbeit erstellt
34	p2HGal – His – Δ 8 – Hsp82	AS 9-709 in p2HGal, mut10, His-Tag	In dieser Arbeit erstellt
35	p2HGal – His – Δ 16 – Hsp82	AS 17-709 in p2HGal, His-Tag	In dieser Arbeit erstellt
36	p2HGal – His – Δ 24 – Hsp82	AS 25-709 in p2HGal, His-Tag	In dieser Arbeit erstellt
37	pBAD-CS	Citratsynthase unter Arabinose-Promotor in <i>E. Coli</i> , Amp ^R	Martin Haslbeck
38	pT-GroE	GroEL, GroES Überexpression unter T7-Promotor, Cm ^R	Ischi
39	pRSET – Sti1	Sti1 Expression unter T7-Promotor mit N-term. His-Tag, Amp ^R	Carolin Wiedig
40	pRSET – Cpr6	Cpr6 Expression unter T7-Promotor mit N-	(Prodromou <i>et al.</i> , 1999)

		term. His-Tag, Amp ^R	
41	pRSET – Cpr7	Cpr7 Expression unter T7-Promotor mit N-term. His-Tag, Amp ^R	Chris Prodromou
42	pET11a – Sba1	Sba1 Expression unter T7-Promotor, Amp ^R	Tina Weigl
43	pET28b – Sba1	Sba1 Expression unter T7-Promotor, N-term. His-Tag, Kan ^R	Martin Haslbeck

3.3.2 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden in dieser Doktorarbeit verwendet. Grüne Schnittstellen sind zur Klonierung in den p2HGal-Vektor, rote für die Klonierung in die Vektoren pET11a oder pET28b gedacht.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Hsp82--Nneu	GATCACTAGTCATATGGCTAGTGAACTTTTGAATT...
Hsp82--C210	CTAGGCGGCCGCGGATCCTCATCAGGTGACGACTAA...
Hsp82--C272	CTAGGCGGCCGCGGATCCTCATCACTTGTTTAGTTC...
Hsp82--C409	CTAGGCGGCCGCGGATCCTCATCAAGCAATTTTCGTT...
Hsp82--C588	CTAGGCGGCCGCGGATCCTCATCAGTTAGCAGACCA...
Hsp82--C618	CTAGGCGGCCGCGGATCCTCATCATTTTTGGAGAAAT...
Hsp82--262N	GATCACTAGTCATATGGAAGAAGTTCAAGAGATAGA...
Hsp82--336N	GATCACTAGTCATATGAAGAAGAAGAATAATATCAA...
Hsp82--589N	GATCACTAGTCATATGGAAGAATCATGAAGGCTC
N599 - BamHI	GATCGGATCCTCATCTCAAGGCTTGAGCCTTCATG
Hsp90 – 24 NdeI	GATCCATATGTCTAACAAGGAAATTTTCTTGAGAGA...
Delta12-hsp82	GATCCGATCCATATGACTCAGTTGATGAGTTTGATC...
Delta16-hsp82	GATCCGATCCATATGAGTTTGATCATCAACACCGTC...
His82-p2HGal	GATCACTAGTAGGAGATATAACCATGGGCAGCAG

Delta8-p2HGal	GATCACTAGTCATATGCAAGCTGAAATTACTCAGTT...
Deleta16-p2HGal	GATCACTAGTCATATGAGTTTGATCATCAACACCGTCTA...
Delta24-p2HGal	GATCACTAGTATGTCTAACAAGGAAATTTTCTTGAG...
N530-p2HGal	GATCGCGGCCGCTCATCATTCGAAATCTTTAGTAAT...
530C-p2HGal	GATCACTAGTATGGATTTTGAATTGGAAGAACTGA...
Asp79Asn – 1	GGAAATCAGAACTCTGGTATTGG
Asp79Asn – 2	CCAATACCAGAGTTTCTGATTTC
Glu33Ala – 1	GAAATTTTCTTGAGAGCTCTGATATCTAATG
Glu33Ala – 2	CATTAGATATCAGAGCTCTCAAGAAAATTC

Zur Sequenzierung wurden die folgenden Primer verwendet

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Universe Primer	GTAAAACGACGGCCAGT
Reverse Primer	CACACAGGAAACAGCTAT
pQE-for	TTTGCTTTGTGAGCGGA
pQE-rev	GAGGTCATTACTGGAT
pET11a -- N	TTATTGCTCAGCGGTGGC
pET11a -- C	ATCTCGATCCCGCGAAATT
pAS2-for	TACCCATACGATGTTCC
pAS2-rev	ATCATAAATCATAAGAAATTC
T7 Promotor Primer	TAATACGACTCACTATAGGG

3.3.3 Molekularbiologische Lösungen

TAE (50×):	Tris/Acetat pH 8,0	2 M
	EDTA pH 8,0	50 mM

Gelauftragspuffer (10×):	Glycerin	50% (v/v)
	EDTA (pH 8,0)	10 mM
	Bromphenolblau	0,2% (w/v)
	Xylencyanol	0,2% (w/v)
1%ige Agarose-Lsg:	Agarose	1 g
	TAE (1×)	100 ml
	Ethidiumbromid-Lsg	1 µl
Ethidiumbromid-Lsg:	Ethidiumbromid (Sigma. St. Louis, USA)	0,04% (w/v)
GET:	Glucose	50 mM
	Tris/Cl (pH 7,0)	25 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	250 µg/ml
Lyselösung:	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (w/v)
Ammoniumacetatlösung:		7,5 M, pH 5,4
Cracking Buffer (2×):	NaOH 5 M	2 ml
	SDS 10% (w/v)	2,5 ml
	Saccharose	10 g
	Bromphenol Blau	0,4% (w/v)
	H ₂ O	ad 50 ml
TE 10.1:	Tris/Cl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM

Glasmilch-Suspension:	Silica-Matrix (SIGMA) gewaschen mit 2× 1 g	
	10 ml PBS	
	NaJ 3M	10 ml
	bei 4 °C, im Dunkeln lagern	
New-Wash-Lösung:	NaCl	50 mM
	Tris/Cl (pH 7,5)	10 mM
	EDTA	2,5 mM
	EtOH	50%
	bei -20 °C lagern	
dNTP-Mix:	dATP	10 mM
	dGTP	10 mM
	dCTP	10 mM
	dTTP	10 mM
Lösung A:	3 M NaAc (pH 5,5)	13 ml
	1 M CaCl ₂	100 ml
	2,8 M MnCl ₂	25 ml
	H ₂ O	862 ml
	sterilfiltriert	
Lösung A - Glycerin:	Glycerin (87%)	69 ml
	Lösung A	331 ml
Suspensions Puffer:	Tris/Cl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
	Lyticase	4,5 U/μl
	Triton X-100	2% (v/v)

Lyse Puffer:	SDS	1% (v/v)
	NaCl	100 mM
	Tris/Cl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
Glass Beads (425-600 μm):	5 h in HNO_3 konz. waschen; mit H_2O spülen und bei 180 °C trocknen	
Puffer 1:	Tris/Cl (pH 7,4)	10 mM
	EDTA	2 mM
Puffer 2:	PEG 3350	35% (w/v)
	Ethylenglycol	5 % (v/v)

Zur Anzucht von Mikroorganismen und zu molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.3.4 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurden 5 ml logarithmisch wachsende Hefe-Zellen 5 min bei 4000 Upm abzentrifugiert, das Zellsediment in 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 200 μl Lyse Puffer resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (CIA) und 300 μl Glassperlen (Durchmesser 0,45 mm). Die Suspension wurde 5-10 min heftig gemischt, wobei die Gefäße immer wieder auf Eis gekühlt wurden, um sicherzustellen, dass die Lösung sich nicht erwärmt. Nach Zugabe von 200 μl TE 10.1 wurde bei 14000 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die genomische DNA mit 1 ml absolutem Ethanol gefällt. Im Anschluss wurde die genomische DNA bei 18000 Upm sedimentiert, mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 μl TE 10.1-RNase aufgenommen.

3.3.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde aus 3 ml ÜN-Kulturen durch ein modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse gewonnen (Li & Schweizer, 1993). Hierfür wurde die frische *E. coli* Übernachtskultur in einem ERG bei 14000 Upm abzentrifugiert und das Zellsediment in 200 µl GET resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Lyselösung wurde 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300 µl 7,5 M Ammoniumacetatlösung zugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 14000 Upm für 5 min wurden Zellproteine und andere zelluläre Bestandteile abgetrennt. Aus dem plasmidhaltigen Überstand wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 500 µl kaltem Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 14000 Upm präzipitiert. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde mit 1 ml absolutem EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE 10.1 resuspendiert. Die Lagerung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C.

Alternativ wurde Plasmid-DNA mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, Mannheim, Deutschland) unter Befolgung der Herstellerangaben isoliert.

3.3.6 Plasmid Cracking

Mit der *Plasmid Cracking* Methode kann schnell eine große Anzahl von *E. coli*-Kolonien auf die Anwesenheit von Plasmiden getestet werden. Die Kolonien wurden dazu mit dem Zahnstocher direkt von der Agar-Platte gepickt und in ein ERG gestichen, 50 µl 10 mM EDTA (pH 8,0) wurden zugesetzt und die Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl 2× Cracking Buffer zugegeben, gemischt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 5 min unter Verwendung eines Vortexers heftig gemischt und 10-25 µl der Suspension direkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Anhand der Plasmidgröße lässt sich dabei auch ein eventuell vorhandenes Insert identifizieren.

3.3.7 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Sowohl die analytische, als auch die präparative Auftrennung von DNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen, denen 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von etwa 120 mA durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mittels eines UV-Leuchtschirm detektiert. Als Längenstandard diente *BstEII* geschnittene λ-DNA.

3.3.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die benötigten DNA-Banden wurden mit dem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mit 3 Volumina 6 M NaJ versetzt und 10 min bei 55 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Glasmilch-Suspension und 5 min Inkubation auf Eis wurde die nun an Glasmilch gebundene DNA 30 s bei 14000 Upm abzentrifugiert. Die an Glasmilch adsorbierte DNA wurde zweimal mit 750 µl New Wash-Lösung gewaschen und anschließend 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Zugabe von 40 µl H₂O und 2 min Inkubation bei 55 °C wurde die DNA von der Glasmilch abgelöst und nach kurzer Zentrifugation in ein neues ERG überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Alternativ wurde der kommerziell erhältliche *QIAquick Gel Extraction Kit* entsprechend der Produktbeschreibung verwendet.

3.3.9 Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

Alle Arten von DNA-Fragmenten wurden mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim, Deutschland) entsprechend der Herstellerangabe gereinigt.

3.3.10 DNA-Sequenzanalyse

Alle molekularbiologisch veränderten Vektoren und DNA-Fragmente wurden vor ihrer Weiterverwendung sequenziert. Dazu wurden 17,5 µl Plasmid-DNA mit 2,5 µl Primerlösung (5 µM) versetzt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GenArt (Regensburg, Deutschland).

3.3.11 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden die zu transformierenden Stämme nach Sambrook *et al.* (1989) kompetent gemacht (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde eine frische 100 ml *E. coli*-Flüssigkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 mit 2 ml 1 M MgCl₂ versetzt und 10 min weiter inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 60 min auf Eis gekühlt, 5 min bei 4 °C abzentrifugiert, das Sediment in 20 ml Lösung A resuspendiert und weitere 60 min auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C wurde das Sediment in 2 ml Lösung A - Glycerin aufgenommen und die Zellen in Aliquots zu je 200 µl aliquotiert. Diese Aliquots

wurden entweder direkt mit Plasmid-DNA transformiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden je $200\text{ }\mu\text{l}$ kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA vermischt und 15-30 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend einem einminütigen Hitzeschritt bei 42 °C unterzogen, wieder auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von $800\text{ }\mu\text{l}$ LB₀ 30 min bei 37 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgossen, das Bakteriensediment im verbliebenen Medium resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

3.3.12 Lithiumacetat-Methode zur Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA wurden 100 ml frische, exponentiell wachsende Flüssigkulturen ($2\text{-}3 \times 10^7$ Zellen/ml) 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 5 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min , RT, 3000 Upm). wurde das Sediment zweimal in 5 ml $0,1\text{ M}$ LiAc/TE 10.1 gewaschen. Die kompetenten Zellen wurden schließlich in 1 ml $0,1\text{ M}$ LiAc/TE 10.1 resuspendiert und innerhalb der nächsten 5 h verarbeitet.

Proben von $50\text{ }\mu\text{l}$ kompetenten Hefezellen wurden mit $1\text{-}5\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurde die Proben-DNA mit den kompetenten Zellen vermischt, $5\text{ }\mu\text{l}$ Lachssperma-DNA (Carrier-DNA; Sigma, St. Louis, USA) und $300\text{ }\mu\text{l}$ Puffer 2 (40% PEG 4 000 in $0,1\text{ M}$ LiAc/TE 10.1) zugesetzt. Diese Mischung wurde 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 min auf 42 °C erhitzt, sofort wieder abgekühlt, 1 ml steriles Wasser zugegeben und 5 min bei RT und 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Sediment im verbleibenden Restmedium resuspendiert und auf CSM-Selektionsplatten ausgestrichen.

3.3.13 Transformation von *S. cerevisiae* durch Elektroporation

Zur Durchführung der Elektroporation wurde das Gerät EquiBioTM EASYJECT PLUSTM verwendet. Für die Transformation wurden frische, exponentiell wachsende Zellen ($1\text{-}3 \times 10^7$ pro ml) 5 min bei 4 °C pelletiert. Das Sediment wurde zweimal in $0,5\text{ Volumina}$ 1 M D-Sorbit, 1 mM MgCl₂ gewaschen und in $0,01\text{ Volumina}$ 1 M D-Sorbit, 1 mM MgCl₂ resuspendiert. Für die Elektroporation wurden $40\text{ }\mu\text{l}$ dieser Zellsuspension mit 100 ng Plasmid-DNA gemischt und in einer Elektroporationsküvette (2 mm) 5 min auf Eis gekühlt.

Die Elektroporation erfolgt bei 1000 V - 412 Ω - 40 μ F bei einer Pulsdauer von 12 ms. Nach dem Elektroporationspuls wurden die Zellen sofort in 1 ml YPD aufgenommen. Die Suspension wurde 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und die resuspendierten Hefen auf CSM-Selektionsplatten ausgestrichen.

3.3.14 PCR-Amplifikation

Mit der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wurden gezielt DNA-Bereiche aus dem Hefegenom oder aus plasmidcodierten cDNAs amplifiziert. Diese wurden in der Folge für die Klonierung in verschiedene Plasmide verwendet. Um die Fehlerrate bei der PCR zu minimieren wurden Polymerasen mit 3`-5` Exonukleaseaktivität (*proof reading*-Aktivität; *Pwo*-DNA-Polymerase) verwendet.

Bei der Wahl der für die PCR verwendeten Primer wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperaturen beider Primer etwa gleich hoch waren (ungefähr 70-75 °C). Die Auswahl der Primer und die Berechnung der Schmelztemperaturen wurde mit Hilfe des Computerprogramms Primer Design 1.02 durchgeführt. Zur gerichteten Klonierung wurden an den Enden der Primer Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angebracht.

In der Regel wurden die PCR-Amplifikationen in folgendem Standardansatz durchgeführt. Dazu wurden ultradünnwandigen PCR-Reaktionsgefäße verwendet.

Template DNA	1 μ l (ca. 50 ng)
10 x Reaktionspuffer	10 μ l
dNTP-Mix	2 μ l
Primer (50 pmol/ μ l)	je 1 μ l
Polymerase (5 U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O	85 μ l

Grundsätzlich wurde die sogenannte *hot start* Methode verwendet. Hierbei wurde die DNA-Polymerase erst zugegeben, wenn der Ansatz bereits auf 95 °C erhitzt war. Die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte wurde auf diese Art vermindert und die Ausbeute an PCR-Produkten erhöht.

Die PCR-Amplifikationen wurden im Thermocycler Primus durchgeführt. Die Einstellungen des Thermocyclers wurden je nach Primerpaar und verwendeter DNA-Polymerase variiert. In der Regel wurden 35 Zyklen durchlaufen, wobei folgende Standardbedingungen verwendet wurden:

Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	60 °C	30 s
Synthese	72 °C	etwa 1,5 min pro 1 kB Insertgröße

3.3.15 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Sowohl zur analytischen Kontrolle eines Plasmids, als auch zur präparativen Gewinnung von geschnittenen DNA-Fragmenten wurden Restriktionsverdau durchgeführt. Je nach Zielsetzung wurden unterschiedliche Ansatzvolumina gewählt. Für die analytische Spaltung wurden 10 µl Plasmid-DNA mit 3 Units (meist 0,3 µl) des jeweiligen Restriktionsenzym versetzt. Die Spaltung erfolgte unter Zusatz von 0,1 Ansatzvolumina des entsprechenden, vom Hersteller beigefügten 10× Restriktionspuffers. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gewählt. Im Anschluss wurde die Spaltung durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 3.3.7) verifiziert.

Für die präparative Spaltung von DNA wurden etwa 30 µl Plasmid-DNA oder gereinigte PCR-DNA mit 20 Einheiten des Restriktionsenzym und 0,1 Ansatzvolumina 10x Restriktionspuffer versetzt und das gewünschte Spaltprodukt nach Ablauf der Inkubationszeit gereinigt.

3.3.16 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um das Religieren von geschnittenen Plasmiden (Vektoren) auszuschließen, wurden diese im Anschluss an den Restriktionsverdau mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Hierfür wurde eine Unit (meist 4 µl) Alkalische Phosphatase und 0,1 Ansatzvolumina 10x Phosphatase-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde 60 min bei 37 °C inkubiert und das DNA-Fragment anschließend mit Hilfe des *PCR Produkt Purification Kits* gereinigt.

3.3.17 Ligieren von DNA-Fragmenten

In der Regel wurde 500 ng Fragment-DNA mit 200 ng Vektor-DNA ligiert. Dazu wurde eine Unit (meist 1 μ l) T4-DNA-Ligase und 0,1 Ansatzvolumina T4-Ligasepuffer zugegeben und ÜN bei 4 °C inkubiert.

3.4 Methoden zur Proteinreinigung

Die unten beschriebenen chromatographischen Methoden fanden bei den durchgeführten Proteinreinigungen Anwendung. Der Reinigungserfolg wurde nach jedem Schritt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5.2) kontrolliert.

3.4.1 Ionenaustauschchromatographie

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf der Anziehung unterschiedlich geladener Teilchen. Proteine tragen aufgrund ihrer geladenen Seitenketten positive oder negative Nettoladungen, weshalb es ihnen möglich ist, an ein entgegengesetzt geladenes Trägermaterial zu binden. Die Elution erfolgt in der Regel durch Erhöhung der Ionenstärke im Laufpuffer. Dadurch werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmaterial abgeschwächt und die gebundenen Proteine dissoziieren von der Matrix ab. Sowohl das Säulenmaterial, als auch der Laufpuffer werden abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins gewählt, da die Nettoladung eines Proteins bedingt ist durch den pK-Wert und die Lage seiner ionisierbaren Gruppen sowie den pH-Wert des Laufpuffers.

Je nach Art der geladenen Gruppen unterscheidet man zwischen Kationenaustauschern, die negativ geladene Gruppen an der Oberfläche des Trägermaterials aufweisen oder Anionenaustauschern, die positive Ladungen besitzen. Zur Reinigung der Proteine fanden in dieser Doktorarbeit die Trägermaterialien DEAE-Sepharcel, Q-Sepharose und S-Sepharose Anwendung, sowie die Fertigsäulen Resource-Q und Resource-S.

3.4.2 Gelfiltrationschromatographie

Proteine lassen sich mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie nach ihrem hydrodynamischen Radius auftrennen. Die Matrix dieser Säulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk definierter Porengröße. Proteine, deren Durchmesser größer ist als die Porengröße, sind nicht in der Lage, in die Poren des Trägermaterials einzudringen und eluieren daher gemeinsam im Ausschlussvolumen. Kleinere Partikel können dagegen in die Gelporen eindringen und wandern daher langsamer durch die Säule als die größeren Moleküle (Lottspeich und Zorbas, 1998). Der Trennbereich einer Gelfiltrationssäule wird folglich durch die Porengröße bestimmt. Zur Durchführung werden üblicherweise Puffer mit höherer Ionenstärke verwendet, um ionische Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix zu unterdrücken.

Zur Reinigung der Proteine wurden hierbei Fertigsäulen der Typen Superdex 75 Prep Grade und Superdex 200 Prep Grade verwendet, je nachdem welcher Trennbereich aufgrund der Proteingröße erforderlich war.

3.4.3 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen matrixgebundenen Bindungspartner. Die Wechselwirkung mit dem Liganden wird genutzt, um diesen Adsorbenten selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Adsorbenten wird entweder durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung erreicht oder durch einen Konformationswechsel – aufgrund einer Änderung des pH-Werts oder der Ionenstärke – erreicht. Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Bei der hierbei verwendeten Ni-NTA-Affinitätschromatographie wird die Adsorption eines His₆-Tags, der über die Aminosäuresequenz mit dem Protein verknüpft ist, an eine Ni-haltige Matrix genutzt. Das Ni-Ion ist dabei über einen NTA-Anker an die Matrix adsorbiert, die durch das Material *Chelating Sepharose* gebildet wird. Die Elution erfolgt durch die Zugabe höherer Konzentrationen an Imidazol zum Laufpuffer; dieses konkurriert mit dem His₆-Tag um die Bindung an die Matrix.

3.4.4 Hydroxyapatit-Chromatographie

Hydroxyapatit ist eine kristalline Form von Calciumphosphat mit der Zusammensetzung $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Da Proteine reversibel an die Kristalloberfläche adsorbieren können, eignet sich Hydroxyapatit zur Reinigung von Proteinen. Das Trennprinzip beruht darauf, dass sowohl Amino- als auch Carboxygruppen mit der Oberfläche der Hydroxyapatitkristalle interagieren. Die Aminogruppen treten mit ihren positiven Ladungen in eine elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Kristalloberfläche. Die Carboxygruppen mit ihrer negativen Ladung werden dagegen einerseits elektrostatisch abgestoßen und andererseits von den Calciumionen komplexiert (Lottspeich & Zorbas, 1998)(Lottspeich & Zorbas, 1998). Somit verhalten sich basische und saure Proteine ganz sehr unterschiedlich. Saure Komponenten desorbieren mit Phosphatpuffern höherer Molarität (Lottspeich & Zorbas, 1998). Basische Komponenten können durch Zugabe von CaCl_2 oder MgCl_2 leicht eluiert werden, da die negativen Oberflächenladungen der Kristalle von den zweiwertigen Kationen neutralisiert werden.

Zur Reinigung der Proteine wurden Fertigsäulen des Typs *Ceramic Hydroxyapatite* CHT-5 (BioRad, München, Deutschland) verwendet.

3.4.5 Proteinpräzipitation

Bei dieser Methode kommt es unter Einsatz von präzipitierenden Substanzen zu einem reversiblen Ausfällen der in der Lösung vorliegenden Proteine. Die älteste und am häufigsten verwendete Methode zur Fällung von Proteinen, ist die Zugabe von Ammoniumsulfat. Der Anstieg der NH_4SO_4 -Konzentration in der Lösung führt zu einer Verringerung des freien Wassers, wodurch die Wasserhülle des Proteins verkleinert wird und hydrophobe Bereiche präsentiert werden. Dies hat letztendlich eine reversible Präzipitation der Proteine zur Folge. Je hydrophober Proteine sind, desto weniger Ammoniumsulfat ist in der Regel für ihre Fällung notwendig. Somit kann eine Trennung der Proteine durch selektives Aussalzen erreicht werden kann.

3.4.6 Aufkonzentrierung von Proteinen

Zum Aufkonzentrieren von Proteinlösungen mit weniger als 5 ml Volumen eignen sich Centricon-Mikrokonzentratoren. Die Lösung wird dabei durch Zentrifugation (500-1000 g, 4 °C) eingengt. Dabei wird die Pufferlösung nach dem Prinzip der Ultrafiltration durch eine

Membran mit definierter Ausschlußgröße getrieben, wobei die Proteine oberhalb der Membran aufkonzentriert werden. Je nach Größe des Proteins wurden dabei Centricon-Microkonzentratoren mit Ausschlußgrößen 3 kDa, 10 kDa oder 30 kDa verwendet. Für größere Volumina wurden entweder Centriprep-Konzentratoren benutzt, die nach dem gleichen Prinzip funktionieren, oder Amicon-Zellen, bei denen die Proteinlösung unter Druck von etwa 2 bar durch eine Membran getrieben wird, die eine definierte Ausschlußgröße aufweist.

3.4.7 Veränderung der Pufferzusammensetzung

Zur Veränderung der Pufferbedingungen wurde gegen das 100-1000fache des entsprechenden Ausgangsvolumens bei 4 °C dialysiert. Der Pufferaustausch erfolgte die semipermeable Membran eines Dialyseschlauches. Alternativ wurde die Proteinlösung mehrmals aufkonzentriert und unter Verwendung des neuen Puffers wieder verdünnt.

3.4.8 Standardreinigung von Hsp90 aus *S. cerevisiae*

Lösungen

Puffer 1:	40 mM HEPES, pH 7,5 / 20 mM KCl
Puffer 2:	40 mM HEPES, pH 7,5 / 500 mM KCl
Puffer 3:	100 mM Phosphat, pH 5,5
Puffer 4:	20 mM Phosphat, pH 6,8
Puffer 5:	400 mM Phosphat, pH 6,8
Puffer 6:	40 mM Hepes, pH 7,5 / 300 mM KCl
Puffer 7:	40 mM HEPES, pH 7,5 / 20 mM KCl

Durchführung

Zur Reinigung von Hsp90 wurde eine ÜN-Kultur des Hefestammes ECU α pep4 in 200 ml YPD bei 30 °C geschüttelt. Diese Kultur wurde verwendet, um 6 Liter YPD anzuzüchten. Die Ernte erfolgte am nächsten Morgen bei einer OD₆₀₀ von etwa 7. Die Hefen wurden bei 5000 Upm abzentrifugiert und in 200 ml Puffer 1 resuspendiert. Um proteolytischen Abbau zu

verhindern, wurde eine *Complete*-Proteaseinhibitor Tablette zugesetzt. Der Aufschluss erfolgte durch Prallstrahlverfahren im Zellaufschlussgerät, wobei zweimal aufgeschlossen wurde mit zwischenzeitlicher Ultraschallbehandlung. Die löslichen Bestandteile des Lysats wurden durch Zentrifugation (16000 Upm, 30 min) isoliert. Der Überstand wurde auf eine DEAE-Sepharose-Säule appliziert (1 ml/min), mit Puffer 1 gewaschen, bis kein Protein mehr von der Säule eluierte und anschließend im linearen KCl-Gradienten eluiert. Dazu wurde Puffer 2 verwendet, der die Endkonzentration an KCl enthält. Die Hsp90-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer 3 dialysiert. Die Proteinlösung wurde anschließend auf eine Superose-S Säule aufgetragen. Hierbei sollte keine Bindung von Hsp90 an die Matrix erfolgen, aber durch die Adsorption von Verunreinigungen dennoch ein deutlicher Reinigungserfolg erzielt werden. Der Durchlauf wird dazu fraktioniert und die Hsp90-enthaltenden Fraktionen vereinigt. Die Proteinlösung wird über Nacht gegen Puffer 4 dialysiert. In Puffer 4 erfolgt der Auftrag auf eine Hydroxyapatit-Säule (CHT5, BioRad). Hsp90 bindet bei niedrigen Phosphatkonzentrationen an diese Matrix, so dass die Elution durch einen linearen Phosphatgradienten bis Puffer 5 erfolgte. Die Fraktionen, die Hsp90 enthielten wurden vereinigt und bis zu einer Konzentration von 8 mg/ml aufkonzentriert. Als finaler Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltrationschromatographie angeschlossen. Hierzu wurden 5 ml der konzentrierten Proteinlösung auf eine Superdex 200 PrepGrade (Bettvolumen etwa 320 ml) appliziert. Puffer 6 wurde als Laufpuffer verwendet. Die Elution erfolgte nach etwa 150 ml. Die Hsp90-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer 7 dialysiert. Die gereinigte Proteinlösung wurde auf 4,5 mg/ml aufkonzentriert und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.4.9 Standardreinigung His₆-getaggtter Proteine

Lösungen

Puffer 1:	40 mM Phosphat, pH 7,5, 300 mM KCl, 6 mM Imidazol
Puffer 2:	40 mM Phosphat, pH 7,5, 300 mM KCl, 300 mM Imidazol
Puffer 3:	40 mM HEPES, pH 7,5, 20 mM KCl
Puffer 4:	40 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM KCl
Puffer 5:	40 mM HEPES, pH 7,5, 300 mM KCl
Puffer 6:	40 mM HEPES, pH 7,5, 20 mM KCl

Durchführung

Alle His₆-getaggtten Proteine wurden nach einem ähnlichen Reinigungsschema gereinigt, das nach der Affinitätschromatographie eine Anionenaustauschchromatographie und abschließend eine Gelfiltrationschromatographie enthielt. Die Reinigung ist hier am Beispiel von Hsp90 beschrieben, das auf dem Plasmid pET28b-Hsp82 vorliegt.

Während der Anzucht des transformierten Bakterienstammes BL21 (DE3) cod⁺ in 10 Liter LB_{Kan} erfolgte die Induktion mit 1,5 mM IPTG bei einer OD₅₉₅ von etwa 0.7. Die Expression erfolgte bei 37 °C für 4 Stunden. Im Anschluß wurden die Zellen geerntet, in Puffer 1 resuspendiert und im Zellaufschlussgerät disruptiert. Das Zellysat wurde auf eine in Puffer 1 äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen, mit 20 mM Imidazolpuffer (gemischt aus Puffer 1 und Puffer 2) gewaschen und mit Puffer 2 eluiert. Die im das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Im Weiteren wurden die gepoolten Fraktionen gegen den Auftragspuffer für den Anionenaustauscher (Puffer 3) dialysiert. Die Proteinlösung wurde auf eine Resource Q-Säule aufgetragen, die zuvor in Puffer 3 äquilibriert worden war. Die Säulenmatrix wurde gewaschen und das Protein im linearen Salzgradienten, der aus Puffer 3 und Puffer 4 gemischt wurde, eluiert. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und auf eine Gelfiltrationsäule aufgetragen. Je nach der zu erwartenden Größe des Proteins wurde entweder eine Superdex 200 Prep Grade oder eine Superdex 75 Prep Grade verwendet. Als Laufpuffer wurde Puffer 5 benutzt. Die gereinigten Proteinfractionen wurden vereinigt. Abschließend wurde das Protein gegen Puffer 6 dialysiert, aufkonzentriert und in Aliquots zu 50 µl bzw. 100 µl bei –80 °C eingefrohren.

3.4.10 Standardreinigung von Citratsynthase

Lösungen

Puffer 1:	50 mM Tris, pH 8,0 / 20 mM KCl
Puffer 2:	50 mM Tris, pH 8,0 / 500 mM KCl
Puffer 3:	50 mM Tris, pH 8,0 / 20 mM KCl
Puffer 4:	50 mM Tris, pH 8,0 / 500 mM KCl
Puffer 5:	50 mM Tris, pH 8,0 / 300 mM KCl
Puffer 6:	50 mM Tris, pH 8,0 / 1 mM EDTA

Durchführung

Citratsynthase wurde aus einem Bakterienstamm gereinigt, der das Plasmid pBAD-CS für die arabinoseinduzierte Expression von Citratsynthase enthält. Darüberhinaus liegt im Bakterienstamm als weiteres Plasmid pT-GroE vor, das unter dem T7-Promotor eine starke Überexpression von GroEL und GroES ermöglicht. Die Anwesenheit dieses Chaperonsystems erhöht die Ausbeuten an nativ gefalteter Citratsynthase erheblich.

Die Anzucht erfolgte in 10 Litern LB_{Amp}. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,7 wurde durch Zugabe von 1,5 mM IPTG das GroE-System induziert und zeitgleich durch Zugabe von 2 mM Arabinose die Citratsynthase. Die Expression erfolgt für vier Stunden bei 25 °C. Die Zellen wurden in Puffer 1 resuspendiert und Zellaufschlussgerät disruptiert. Nach Zentrifugation wurde das klare Lysat auf eine DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte im linearen Salzgradienten bis Puffer 2. Da eine eindeutige Zuordnung der Citratsynthase-enthaltenden Fraktionen anhand der SDS-PAGE nicht erfolgen konnte, wurden mit jeder Fraktion Aktivitätstests (siehe Kapitel 3.7.4) durchgeführt. Diejenigen Fraktionen die ein positives Signal ergaben, wurden vereinigt und über Nacht gegen Puffer 3 dialysiert. Die Proteinlösung wurde auf eine Resource-Q-Säule aufgetragen und nach ausreichendem Waschen die Proteine im linearen Salzgradienten bis Puffer 4 eluiert. Die Citratsynthase-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und auf eine Superdex 75 PrepGrade-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Der Lauf erfolgte in Puffer 5. Die Citratsynthase-Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer 6 dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels UV-Absorptionsspektroskopie auf 15 µM eingestellt und die Proteinlösung in Aliquots zu 100 µl bei -80 °C gelagert.

3.5 Proteinanalytische Arbeitstechniken

3.5.1 Lösungen für proteinchemische Methoden

Laufpuffer (10x):	Tris	0,25 M
	Glycin	2 M
	SDS	1% (w/v)

5x-Laemmli Auftragspuffer	SDS	10% (w/v)
	Glycerin	50% (w/v)
	Tris	300 mM
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
	2-Mercaptoethanol	5% (v/v)
Nativ-Auftragspuffer	Glycerin	50% (w/v)
	Tris	300 mM
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
Transferpuffer:	Glycin	36 g
	Tris	7,6 g
	Methanol	500 ml
	SDS	0,3% (w/v)
	H ₂ O	ad 2,5 l
TBS (-T):	Tris	6 g
	NaCl	20 g
	H ₂ O	ad 2,5 l
	→ mit HCl pH 7,6 einstellen	
	(Tween-20	2,5 ml)
PBS (-T):	NaCl	5,84 g
	Na ₂ HPO ₄	11,5 g
	NaH ₂ PO ₄	2,96 g
	H ₂ O	ad 1 l
	(Tween-20	1 ml)

Stripping Puffer:	SDS	2%
	Tris/Cl (pH 6,7)	62,5 mM
	2-Mercaptoethanol	100 mM

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) wurden mit dem Puffersystem von Fling und Gregerson zur Analyse von Proteinextrakten und Zellaufschlüssen durchgeführt (Fling & Gregerson, 1986).

Die Auftrennung erfolgt auf vertikalen 7 x 9 x 0,075 cm großen SDS-PAGE-Gelen in einer SDS-PAGE-Elektrophoreseapparatur 45 min bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA je Gel. Die Proteinlösungen wurden vor der Elektrophorese mit 0,2 Volumen 5x Laemmli-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt.

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurde je nach Größe entweder LMW-Standard oder HMW-Standard mit auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung eines Farbstoffes vor allem an basische und aromatische Aminosäuren in Proteinen. Aus der Bindung resultiert eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm (rot-violett) nach 595 nm (blau). Die kommerziell erhältliche Färbelösung (Coomassie Protein Assay Reagent; Pierce, Rockford, USA) wurde vor Gebrauch 1:1 mit H₂O bidest. verdünnt. Je 1 ml dieser Lösung wurden mit 100 µl Probe versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration kann dann über eine BSA-Eichgerade ermittelt werden. Dabei wird angenommen, dass der Farbstoff mit dem untersuchten Protein in der gleicher Effizienz wechselwirkt wie mit BSA.

3.5.4 Native Gelelektrophorese

Native Gelelektrophorese wurde zur Analyse des Oligomerisierungsgrades von Proteinen eingesetzt. Da die elektrophoretische Mobilität eines Makromoleküls aber nicht nur von seiner Größe, sondern auch von seiner Nettoladung abhängig ist, können mit dieser Methode

nur qualitative Aussagen gemacht werden (Goldberg, 1989). Es wurden 4-12%ige Gradientengele (Invitrogen, Groningen, Niederlande) verwendet. Die Proben wurden mit 0,2 Volumina Nativ-Auftragspuffer versetzt und bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA unter thermostatisierten Bedingungen aufgetrennt.

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

SDS-Polyacrylamidgele wurden hierbei in Lösung A gefärbt und nachfolgend schrittweise in den Lösungen B, C und D entfärbt. Durch kurzes Aufkochen der Gele konnten die Inkubationszeiten in den verschiedenen Lösungen abweichend von der Originalvorschrift auf etwa 1 min verkürzt werden (Fairbanks *et al.*, 1971: 2 h Färben, je 1 h Entfärben).

Verwendete Lösungen:

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

3.5.6 Silberfärbung (Heukeshoven & Dernick, 1988)

Die Silberfärbung wurde nach der Vorschrift von Heukeshoven und Dernick durchgeführt. Sie repräsentiert eine sehr empfindliche Färbemethode mit einer Nachweisgrenze von 10 ng Protein.

Verwendete Lösungen:

Fixierer 1:	30% (v/v) techn. Ethanol, 10% (v/v) techn. Essigsäure
Fixierer 2:	2 ml 25 % (v/v) Glutaraldehyd, 0,1 g Natriumdithiosulfat ad 100 ml mit 0,4 M Natriumacetat, 0,5% techn. Essigsäure, 30% techn. Ethanol,
Färbelösung:	6 mM Silbernitratlösung, 25 µl 37% (w/v) Formaldehyd add 100 ml mit H ₂ O bidest
Entwickler:	7.5 g Natriumcarbonat, 120 µl 37% (w/v) Formaldehyd ad 300 ml mit H ₂ O bidest
Stopplösung:	50 mM EDTA, pH 7,5

Die Silberfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Inkubation 20 min in Fixierer 1
- Inkubation 30 min in Fixierer 2
- 3 x 5 min mit H₂O bidest waschen
- Inkubation 30 min in Färbelösung
- Entwickeln bis die Proteinbanden gut sichtbar sind, dann Abstoppen

3.5.7 Immunoblotting (Western Blot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer *Semi Dry* Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen, Deutschland) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Für den Übertragungsvorgang wurde ein Stapel aus 3× Whatman 3MM Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, SDS-PAGE-Gel, 3× Whatman 3MM Filterpapier in die Blot-Apparatur eingespannt. Alle Komponenten wurden vorher 10 min in Transferpuffer eingelegt. Die Übertragung erfolgte 1 h bei 1,5 mA/cm² SDS-PAGE-Gel (72 mA je Gel). Der Transfer wurde durch transiente Färbung mit Ponceau S (1 min färben, mehrmaliges Waschen mit H₂O) überprüft.

Um unspezifische Bindestellen abzudecken wurde die Nitrocellulose-Membran mit den transferierten Proteinen mind. 30 min in PBS-T mit 1% Magermilchpulver inkubiert. Die Membran wurde dann mit primärem Antikörper in PBS-T/1% Magermilchpulver überschichtet und 60 min inkubiert. Die verwendete Konzentration des primären Antikörpers richtet sich nach dem Antikörpertyp und wurde individuell eingestellt. Die Membranen wurden anschließend 3× 5 min mit PBS-T gewaschen. Nun wurde der primäre Antikörper 60 min mit einem sekundären Antikörper (meist Kaninchen-antiMaus-IgG-Antikörper-Peroxidase-Konjugat, Sigma, St. Louis, USA; 1:4000 verdünnt) komplexiert.

Nach mehreren Waschschritten wurde dieses Antikörper-Enzym-Konjugat mittels ECL nachgewiesen. Bei dieser Reaktion katalysiert die Peroxidase in Anwesenheit von H₂O₂ die Oxidation von zyklischem Diacylhydrazin-Luminol, wobei Licht freigesetzt wird (Chemolumineszenz). Jede Nitrocellulose-Membran wurde dazu mit 2 ml einer 1:1 Mischung aus H₂O₂-Lsg. (ECL2) und Luminol (ECL1) überschichtet, zwischen Plastikfolien gelegt und ein bis 60 min exponiert. Die Lichtreaktion wurde auf Röntgenfilmen (X-Omat, Kodak, Rochester, USA) detektiert.

Verwendete Lösungen:

ECL1: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM Paracoumarinsäure, 100 mM Tris/Cl, pH 8,5

ECL2: 5,4 mM H₂O₂, 100 mM Tris/Cl, pH 8,5

3.5.8 Protein-Sequenzblot zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen

Zur N-terminalen Proteinsequenzierung wurde das vorgereinigte Protein zunächst mit Hilfe eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt. Eine Immobilon-Membran (PVDF) wurde eine Minute in 100% Methanol und anschließend für 20 min in Boratpuffer (s.u.) inkubiert. Die Blotbedingungen entsprachen denen des Immuno-Blots, wobei ein Transferpuffer ohne SDS verwendet wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran für 2 bis 5 Minuten in Färbelösung geschwenkt und anschließend entfärbt.

Verwendete Lösungen:

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

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

Entfärber: 30% Methanol, 10% Essigsäure

Zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen wurden die Banden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und bis zur Sequenzierreaktion bei -20 °C gelagert.

Die Durchführung der Sequenzierreaktion erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Deutzman (Universität Regensburg) nach dem automatisierten Edman-Abbau (Edman & Begg, 1967).

3.5.9 Chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd

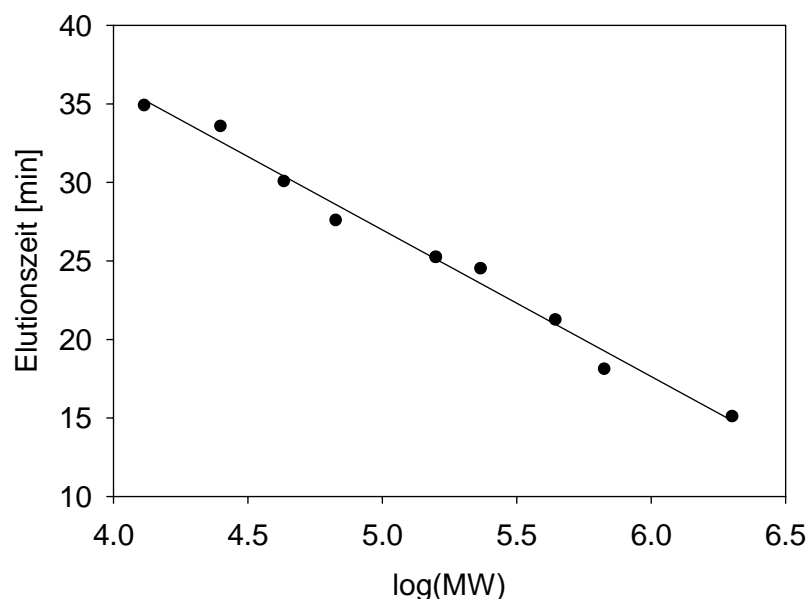
Oligomerisierungsgrade und Wechselwirkungen zwischen Proteinen wurden durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd untersucht. (Jaenicke & Rudolph, 1989). Dabei wurden jeweils etwa 5 µg Protein mit Glutaraldehyd quervernetzt. Dazu wurden 20 µl Proteinlösung mit 1,6 µl Glutaraldehyd (1:10 in HEPES-Puffer) vermischt, etwa 3-5 Minuten inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 5 µl 1M Tris, pH 8,5 gestoppt. Nach Zugabe von 6 µl 5x Laemmli-Puffer wurden die erhaltenen Komplexe über SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden üblicherweise vorgegossene Gradientengele verwendet (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

3.5.10 Analytische Gelfiltration

Gelfiltrationschromatographie beruht auf der Trennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße. Diese Methode kann im analytischen Maßstab angewandt werden, um eine Aussage über die Molekülgröße unter nativ-ähnlichen Bedingungen zu erhalten.

Bestimmung der Molekülgröße durch HPLC-Gelfiltration

Analytische Gelfiltration wurde verwendet, um Aussagen über den Assoziationsgrad der gereinigten Proteine treffen zu können, wenn vermutet wird, dass eine Homodimerisierung oder Homooligomerisierung stattfindet. Diese Molekülgröße korreliert jedoch nur im Falle globulärer Proteine mit dem Molekulargewicht, da weitere Parameter wie hydrodynamischer Radius und Molekülform ebenfalls einen Einfluss auf das Laufverhalten haben. Zur Durchführung wurde ein Jasco-System mit UV- und Fluoreszenzdetektion verwendet. Die Analyse der Proteine erfolgte auf einer Superdex 200 HR-Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min bei Raumtemperatur. Die Elutionszeit wurde benutzt, um eine Information über den Oligomerisierungszustand zu erhalten. Dazu wurde die Elutionszeit mit einer Reihe von Standardproteinen verglichen und über eine Ausgleichsgerade die ungefähre Molekülgröße berechnet. Folgende Eichgerade wurde dazu verwendet:



Für die Berechnung der Molekülgröße aus der Elutionszeit ergab sich aus der Eichgerade folgender Zusammenhang:

$$M = 10 \frac{75,69 \text{ min} - \text{Elutionszeit}}{9,73 \text{ min}}$$

Bestimmung von Dissoziationskonstanten für dimere Proteine

Im Falle dimerer Assoziationsformen wurden die Affinität des Homodimers durch Gelfiltrations-HPLC ermittelt. Dazu wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen aufgetragen, um eine Aussage zu erhalten, wie stark die dimere Spezies populiert ist. Die Abhängigkeit der Retentionszeit von der applizierten Proteinkonzentration wurde entsprechend eines Monomer-Dimer-Überganges ausgewertet. Dabei wurde angenommen, dass aufgrund einer schnellen Gleichgewichtseinstellung zwischen monomeren und dimeren Assoziationsformen zu jedem Zeitpunkt ein Gleichgewichtszustand vorliegt. Es wurde folgende Formel verwendet:

$$RT = \left(-\frac{K_D}{4 \cdot c_t} + \frac{K_D}{4 \cdot c_t} \cdot \sqrt{\frac{1}{c_t^2} + \frac{8}{K_D \cdot c_t}} \right) \cdot (RT_{\text{Monomer}} - RT_{\text{Dimer}}) + RT_{\text{Dimer}}$$

Der erhaltene K_D -Wert beruht jedoch auf der Annahme, dass das applizierte Protein unverdünnt die Säule passiert. Eine Näherungsrechnung, die darauf abzielt die Proteinkonzentration am Peakmaximum aus der Peakfläche und Peakhöhe zu berechnen, ergibt dass das Protein sich etwa um den Faktor sieben durch den Säulenlauf verdünnt und nicht wesentlich an unspezifisch mit dem Säulenmaterial interagiert. Der ermittelte K_D -Wert wird somit durch den Faktor sieben dividiert, um den Näherungswert für die Dissoziationskonstante zu erhalten.

3.5.11 Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation

Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation eignet sich zur exakten Bestimmung von Molekulargewichten unter nativen Bedingungen, da bei dieser Methode die Form der Proteine und deren hydrodynamischer Radius keine Rolle spielen (Laue & Stafford, III, 1999).

Zur Messung wurden 150 µl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von etwa 0,2 mg/ml in einer Ultrazentrifugations-Messzelle eingeschlossen. Als Referenz dienten 200 µl des zugehörigen Puffers. Die Proteinprobe und die Referenz wurden in einer Beckman *XL-I analytical ultracentrifuge* rotiert. Die Geschwindigkeit wurde dem zu erwartenden Molekulargewicht angepasst. Während des Laufes sedimentiert das Protein zum Zellenboden, wird jedoch aufgrund der relativ geringen Geschwindigkeit nicht vollständig pelletiert. Es stellt sich ein Konzentrationsgradient ein, der durch das entgegengesetzte Wirken von Sedimentation und Diffusion gebildet wird. Die Detektion des Gradienten erfolgt über ein integriertes UV-Spektrometer und eine Interferenzoptik. Die Zentrifugation erfolgte solange, bis über 12 Stunden keine Veränderung des Konzentrationsgradienten in der Messzelle mehr stattfand. Die Analyse des Konzentrationsgradienten liefert das exakte Molekulargewicht unter der Voraussetzung, dass nur eine Spezies in der Messzelle vorliegt. Um proteolytische Prozesse während der Laufzeit auszuschließen, wurde die Probe vor und nach dem Lauf durch analytische Gelfiltration analysiert. Zur Auswertung des UZ-Laufes wurde das mitgelieferte Softwarepaket zu Origin verwendet, das im Wesentlichen auf folgender Formel beruht.

$$c = c_0 \cdot e^{\frac{\omega^2}{2 \cdot R \cdot T} \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho) \cdot \frac{M}{1000000} \cdot (r^2 - r_0^2)} + \text{Baseline}$$

Näherungsweise wurde für die Dichte der Lösung $\rho = 1,01$ g/ml angenommen und für das spezifische Volumen des Proteins ein aus den Aminosäuren errechneter Wert. Dieser lag zumeist in der Größenordnung von 0,73 ml/g.

3.5.12 Interaktionsanalyse durch Isothermische Titrationskalorimetrie (ITC)

Kalorimetrie beruht auf der Detektion von Wärmeunterschieden, die durch thermodynamische Prozesse verursacht werden. Die Bindung zweier Substanzen aneinander ist häufig mit der Entstehung von Wärme oder der Absorption von Wärme verbunden. Somit kann die Analyse

der Wechselwirkung zweier Substanzen durch kalorimetrische Methoden erfolgen kann (Jelesarov & Bosshard, 1999).

ITC wurde verwendet, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden oder zwischen zwei Proteinen thermodynamisch zu analysieren. Dazu wurden üblicherweise 2 ml einer etwa 20 μM Proteinlösung in der Messzelle temperiert und eine etwa 200 μM Lösung des anderen Proteins bzw. des Liganden in der Injektionsspritze vorgelegt. Die Injektionsspritze wurde in die Messzelle eingeführt. Nach Abschluss der Temperierungsphase wurde das Experiment gestartet und dabei 30-40 Injektionen des Liganden in die Messzelle vorgenommen. Die Analyse der dabei entstandenen Bindungsisotherme erfolgte mit Hilfe der Instrumentensoftware. Dieser liegen im Wesentlichen folgende Gleichungen zugrunde:

$$Q_i = V_0 \cdot \Delta H \cdot \frac{1}{2} \left((L_i + M_i + K_D) - \sqrt{(L_i + M_i + K_D)^2 - 4 \cdot L_i \cdot M_i} \right)$$

$$dQ = Q_i + dV \cdot \frac{Q_i + Q_{i-1}}{2 \cdot V_0} - Q_{i-1}$$

Dabei ergeben sich die Werte M_i und L_i aus den jeweiligen Konzentrationen der beiden Bindungspartner bei der i-ten Injektion, wie sie aus dem Experimentverlauf errechnet werden können. Der Wert dV entspricht dem Injektionsvolumen der i-ten Injektion und V_0 dem Zellvolumen. Der Wert dQ ergibt sich somit als die Wärme, die bei der i-ten Injektion aufgrund der Bindungsreaktion freigesetzt wird.

Dieses Experiment wurde je nach den Erfordernissen der jeweiligen Wechselwirkung modifiziert. So erfordern insbesondere schwach affine Bindungen deutlich höhere Ligandenkonzentrationen als in obigem Standardprotokoll vorgesehen. Die jeweiligen Konzentrationen sind deshalb bei der Darstellung der Experimente erwähnt.

3.5.13 Kristallisation von Proteinen

Kristallisationsversuche der einzelnen Fragmente wurden mit Hilfe des Hampton Screens 1 und 2 unternommen. Dazu wurden jeweils 2 μl des Proteins bei unterschiedlichen Konzentrationen und 2 μl des Puffers nach der *sitting drop* Methode gemischt und über einem

Reservoir von Puffer luftdicht eingeschlossen. Die Kristallisation erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur.

Die Vermessung der Kristalle und die Berechnung der Struktur wurden in Martinsried von Rainer Friedrich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

3.6 Spektroskopische Methoden

Bei allen spektroskopischen Untersuchungen wurden die aufgenommenen Spektren gegen entsprechende Pufferspektren als Referenz korrigiert. Diese Referenzen enthielten den Dialysepuffer, gegen den das verwendete Protein zuletzt dialysiert worden war.

3.6.1 UV-Absorptionsspektroskopie und Bestimmung der Proteinkonzentration

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

Aminosäure	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Tryptophan	280	5600
Tyrosin	274	1400
Phenylalanin	257	200
Disulfidbrücke	250	300
Peptidbindung	190	~7000

Die UV-Absorptionsspektroskopie wurde vor allem verwendet, um die Konzentration von Proteinlösungen zu bestimmen. Dazu kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei bekanntem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{ nm}, 0,1\%}$ die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm errechnet werden.

$$c = \frac{A}{\epsilon_{280\text{ nm}, 0,1\%} \cdot d}$$

Dabei entspricht A der Absorption bei 280 nm, $\epsilon_{280\text{ nm}, 0,1\%}$ dem molaren Extinktionskoeffizienten, c der Proteinkonzentration in mol/l und d der Schichtdicke der Küvette in Zentimetern. Der Extinktionskoeffizient lässt sich für Proteine aus der Aminosäurezusammensetzung ermitteln. Dazu wurde das Programmpaket ProtParam verwendet. Dieses führt die Berechnung basierend auf der Methode nach Wetlaufer (Wetlaufer, 1962) automatisch durch. Nach diesem Verfahren wird $\epsilon_{280\text{ nm}, 0,1\%}$ aus den bekannten Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bestimmt, wobei der Beitrag der Aminosäuren Phanylalanin und Cystin vernachlässigt wird.

$$\epsilon_{280\text{ nm}, 0,1\%} = \frac{\text{Anz}_{\text{Trp}} \cdot \epsilon_{280\text{ nm}, \text{Trp}} + \text{Anz}_{\text{Tyr}} \cdot \epsilon_{280\text{ nm}, \text{Tyr}}}{M}$$

Dabei entsprechen die Koeffizienten Anz_{Trp} und Anz_{Tyr} der Anzahl der jeweiligen Aminosäure im Protein. Die molaren Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin ergeben sich bei 280 nm in wässriger Lösung zu $5600\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ bzw. $1340\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

In allen UV-Absorptionsexperimenten wurden Quarzglas Suprasil Küvetten (Starna GmbH, Pfunderstadt, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1-10 mm verwendet.

3.6.2 Fluoreszenzspektroskopie

Durch Licht einer entsprechenden Wellenlänge werden Elektronen von ihrem Grundzustand in einen angeregten Zustand angehoben. Bei der Rückkehr der angeregten Elektronen in den energieärmeren Grundzustand wird die dabei freiwerdende Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung abgegeben. Gleichzeitig wird Schwingungsenergie dissipiert,

so dass die Quanten der emittierten Strahlung längerwellig bzw. energieärmer sind, als die der absorbierten Strahlung (Stoke'sche Verschiebung). Das unterschiedliche Ausmaß an Energiedissipation führt zu einem kontinuierlichen Emissionsspektrum.

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind aufgrund ihres delokalisierten π -Elektronensystems für die sogenannte „intrinsische Fluoreszenz“ der Proteine verantwortlich. Dabei wird das Fluoreszenzverhalten von Proteinen, die alle drei aromatischen Aminosäuren enthalten, von Tryptophan dominiert.

Zwei Gründe sind für die intensive Fluoreszenz von Tryptophan verantwortlich: Tryptophan absorbiert von den drei aromatischen Aminosäuren am stärksten Lichtquanten. Zusätzlich ist es durch Energietransfer möglich, dass Tryptophan durch das Emissionslicht von Tyrosinen und Phenylalaninen angeregt wird. Dies erfolgt aufgrund der Überlappung der Tyrosin- und Phenylalanin-Emissionsspektren mit dem Tryptophan-Anregungsspektrum (Cantor & Schimmel, 1980; Schmid, 1997a). Daher ergeben sich relative Empfindlichkeiten für die Fluoreszenz zu etwa:

$$\text{Trp} : \text{Tyr} : \text{Phe} = 1100 : 200 : 8 \quad (\text{Schmid, 1997b})$$

Bestimmung der Proteinstabilität durch Denaturierungsübergänge

Die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren ist stark durch ihre molekulare Umgebung im Protein bzw. im Lösungsmittel bestimmt. In nativen Proteinen liegt das Emissionsmaximum der Tryptophane bei etwa 320 nm. Dies entspricht der Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz von freiem Tryptophan in hydrophober Umgebung. Durch die Denaturierung werden die Tryptophanreste dem hydrophilen Lösungsmittel exponiert. Das Maximum eines Tryptophanspektrums in wässriger Umgebung liegt bei 353 nm, so dass es im denaturierten Zustand meistens zu einer deutlichen Verschiebung des Emissionsmaximums zu höheren Wellenlängen kommt. Fluoreszenzmessungen können aufgrund dieser Sensitivität gegenüber lokalen Veränderungen zur Untersuchung der Proteinstabilität verwendet werden. Wegen der starken Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Temperatur sind thermisch induzierte Entfaltungsübergänge nur bedingt quantitativ auswertbar, chemisch induzierte Entfaltungsübergänge lassen sich jedoch sehr gut verfolgen.

Chemische Denaturierungsübergänge wurden verwendet, um die Stabilität von Proteinen und Proteinfragmenten zu untersuchen. Dazu wurden die Proteine mit unterschiedlichen

Konzentrationen an Denaturierungsmittel versetzt und über Nacht inkubiert. Harnstoff, oder auch Guanidiniumchlorid, wurden verwendet, um die Tertiär und Sekundärstruktur von Proteinen zu destabilisieren. Nach Ablauf der Faltungs/Entfaltungsphase wurden die einzelnen Proben im Fluoreszenzspektrometer FluoriMax 2 vermessen. Die Anregungswellenlänge lag dabei in der Regel bei 280 nm, die Spalte wurden auf 5 nm beziehungsweise 7 nm eingestellt. Alle Messungen wurden in Quarzglas Suprasil Fluoreszenzküvetten durchgeführt.

Durch den Vergleich der nativen Spektren bei niedriger Harnstoffkonzentration und der denaturierten Spektren bei hoher Harnstoffkonzentration konnte eine Emissionswellenlänge ermittelt werden, bei der der induzierte Denaturierungsübergang am deutlichsten verfolgt werden kann. Diese Datenpunkte wurden gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen. Aus dem Verlauf der Denaturierungskurve kann die Stabilisierungsenergie des Proteins berechnet werden, unter der Voraussetzung, dass der beobachtete Übergang reversibel ist. Folgende Formel gilt für das Zwei-Zustandsmodell der Entfaltung. Bei diesem Modell dürfen bei keiner Harnstoffkonzentration Intermediate populierte sein.

$$F = \left(F_n + m_n \cdot c + (F_d + m_d \cdot c) \cdot e^{-\frac{m \cdot c - \Delta G}{R \cdot T}} \right) \cdot \frac{1}{1 + e^{-\frac{m \cdot c - \Delta G}{R \cdot T}}}$$

Dabei bilden die Werte F_n , m_n , F_d und m_d die beiden Grundlinien des Übergangs, der Wert m ist der sogenannte Kooperativitätsfaktor des Übergangs und c ist die Konzentration an Denaturierungsmittel. Der Parameter ΔG steht für die Stabilisierungsenergie, R ist die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur.

Fluoreszenztitrationen

Die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz bei Bindung eines Liganden kann dazu verwendet werden, die Affinität der Wechselwirkung zu bestimmen. Zur Durchführung wurden 2,5 ml einer 1 μ M Proteinlösung in einer rührbaren Küvette auf 25 °C temperiert. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden soweit optimiert, dass der Unterschied zwischen unligiertem und ligiertem Protein maximal ist. Bei diesen so bestimmten Wellenlängen wurde im Anschluss die Messung durchgeführt. Dazu wurden kleine Aliquots des Liganden zur Proteinlösung gegeben und einige Datenpunkte aufgenommen. Dies wurde

solange wiederholt, bis keine Veränderung der Fluoreszenz mehr auftrat. Die resultierende Bindungsisotherme wurde nach untenstehender Formel ausgewertet:

$$F = F_{ML} + (F_M - F_{ML}) \cdot \frac{K_D}{K_D + c}$$

Dabei stellt F_{ML} die Fluoreszenz des ligierten Makromoleküls dar und F_M die des unligierten. Für die exakte Auswertung wurde darüberhinaus ein Verdünnungsfaktor berücksichtigt, der die Abnahme der Fluoreszenz bei steigendem Volumen berücksichtigt.

Bei der Fluoreszenztitration mit Nukleotiden wurde als Anregungswellenlänge 295 nm verwendet, um Effekte, die aufgrund der starken UV-Absorption von ADP und ATP auftreten zu minimieren. Eine Korrektur für *inneren Filtereffekt* wurde ebenfalls benutzt.

Kinetische Interaktionsanalyse mit Fluoreszenzdetektion

Stopped-Flow-Techniken erlauben die Untersuchung chemischer und biochemischer Prozesse in Echtzeit. Dazu werden die Lösungen von Makromolekül und Ligand instrumentell gemischt und anschließend die Bindungsreaktion mit Hilfe von Fluoreszenzänderungen beobachtet. Die Totzeit dieser Experimente liegt bei ungefähr 2 ms. Die Auswertung der Kurven erfolgte durch einfach exponentielle Datenanalyse, da die beobachteten Kurven ausnahmslos diesem Modell entsprachen. Alle Messungen wurden von Prof. Dr. Jochen Reinstein am Max-Planck Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund durchgeführt.

3.6.3 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD) ist die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle, links- und rechts-circular-polarisiertes Licht gleicher Wellenlänge unterschiedlich stark zu absorbieren. Die optische Aktivität von Proteinen tritt in Form von asymmetrischen Kohlenstoffatomen und/oder aromatischen Aminosäuren auf. Proteine weisen Circulardichroismus auf, da sie sich aus einer großen Anzahl von optisch aktiven Aminosäuren zusammensetzen und darüberhinaus Sekundärstrukturen ausbilden.

Die Elliptizität Θ (in Grad) wird als quantitatives Maß für die Größe des Circular dichroismus verwendet. Die Berechnung der molaren Elliptizität, d.h. der Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren Θ_{MRW} , erfolgt nach folgender Formel (Schmid, 1997a):

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

Dabei ist Θ die gemessene Elliptizität, M das Molekulargewicht des Proteins, c die Proteinkonzentration, d die Schichtdicke der Küvette in Zentimeter und N_{AS} die Anzahl der Aminosäuren im Protein.

Fern-UV und Nah-UV CD-Spektroskopie

CD-Spektroskopie kann angewandt werden, um eine Aussage über die Strukturbildung eines Proteins zu erhalten. Dazu unterscheidet man je nach Wellenlängenbereich zwei Verfahren, die unterschiedliche Aussagen über die Struktur erlauben. Die Nah-UV-Region umfasst den Bereich zwischen 250 nm und 300 nm. In diesem Bereich sind asymmetrisch angeordnete aromatische Aminosäuren für das Signal verantwortlich. Die Umgebung dieser Aminosäuren ist von der Tertiärstruktur des Proteins abhängig. Ein Signal in diesem Bereich stellt einen „Fingerabdruck“ des Proteins dar (Schmid, 1997a). Denaturierte Proteine hingegen weisen in diesem Bereich kein Signal auf, da ihre aromatischen Aminosäuren nicht mehr in asymmetrischer Umgebung vorliegen.

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

Eine Zusammenfassung der Messparameter für die CD-Messungen (in J-715, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) findet sich in folgender Liste.

Messparameter	Fern-UV	Nah-UV
Startwellenlänge	250 nm	300 nm
Endwellenlänge	195 nm	250 nm
Auflösung	0,2 nm	0,2 nm
Geschwindigkeit	10 nm/min	10 nm/min
Response	1,0 s	1,0 s
Akkumulation	16	10
Schichtdicke	0,1 cm	0,5 cm
Proteinkonzentration	0,15mg/ml	0,5mg/ml

Innerhalb gewisser Genauigkeitsgrenzen lässt sich aus dem Fern-UV CD-Spektrum eine Aussage über prozentuale Sekundärstrukturanteile im Protein machen. Dazu wurde das Programm CDNN (*CD deconvolution based on neuronal networks*) verwendet. Dieses Programm verwendet Beispielspektren von Proteinen mit bekannter Struktur und erhält so charakteristische spektroskopische Merkmale für die einzelnen Sekundärstrukturklassen. Unter Verwendung dieser Ergebnisse ermittelt das Programm dann aus dem gemessenen Spektrum die Zusammensetzung der Sekundärstruktur des strukturell unbekanntes Proteins.

Thermischer Denaturierungsübergang mit CD-Spektroskopie

Da die molare Elliptizität nicht von der Temperatur der Lösung abhängig ist, lässt sich CD-Spektroskopie sehr gut zur Messung der thermischen Stabilität von Proteinen einsetzen. Die Messungen wurden in einer 0,1 cm Küvette mit einem thermostatisierbaren Küvettenhalter mit Hilfe der PTC343 Peltier-Temperiereinheit (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden dabei von 20 °C bis 90 °C mit einer Heizrate von 30 °C/h aufgeheizt und wieder abgekühlt. Dabei wurde die Entfaltung durch Aufzeichnung der Elliptizität bei 220 nm kontinuierlich verfolgt. Weiterhin wurde in 20 °C-Schritten ein Fern-UV-CD-Spektrum aufgenommen. Um ein Verdampfen des Lösungsmittels während des Aufheizvorganges zu verhindern, wurde eine verschließbare Küvette verwendet. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 150 µg/ml eingesetzt. Als Kontrolle wurden Thermoübergänge mit Dialysepuffer anstelle des Proteins vermessen. Generell wurde in

Phosphatpuffer gemessen, da andere Puffer, wie Hepes oder Tris, eine deutliche Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes zeigen.

Sofern die temperaturinduzierten Entfaltungsübergänge reversibel waren, wurde mit Hilfe folgender Formel eine Aussage über die thermodynamischen Parameter des Proteins getroffen:

$$\Theta = \Theta_n + m_n \cdot T - (\Theta_n + m_n \cdot T - \Theta_d + m_d \cdot T) \cdot \frac{1}{1 + e^{-\frac{1}{R \cdot T} \left(\Delta H_M \cdot \left(1 - \frac{T}{T_M} \right) - \Delta C_p \cdot \left(T_M - T + T \cdot \ln \frac{T}{T_M} \right) \right)}}$$

Dabei werden die beiden Grundlinien des Übergangs von den Parametern Θ_n , m_n , Θ_d , und m_d bestimmt. T_M ist die Temperatur am Übergangsmittelpunkt, ΔH_M ist die Änderung der Enthalpie am Übergangsmittelpunkt und ΔC_p die Änderung der Wärmekapazität der Lösung durch den Entfaltungsvorgang.

3.6.4 Surface Plasmon Resonance Spektroskopie (SPR)

Die *Surface Plasmon Resonance Spektroskopie* (SPR) wurde verwendet, um Interaktionen zwischen Proteinen zu analysieren und zu quantifizieren. Die Messmethode der SPR beruht darauf, dass eine Goldfolie bei Bestrahlung durch eine weisse Lichtquelle die eingestrahnten Photonen zwar zunächst absorbiert, diese dann aber in Form von emittierten Photonen wieder abgibt. Diese werden als Plasmonen bezeichnet. Die dabei auftretenden Gesetze sind denen der Totalreflexion sehr ähnlich, so dass im Normalzustand der Winkel des eingestrahnten Lichtstrahles dem des abgegebenen Lichtstrahles entsprechen würde. Durch Veränderungen an der Goldfolie, wie zum Beispiel durch eine Veränderung des Brechungsindex der einbettenden Lösung wird der Plasmonenstrahl in seinem Ausfallwinkel beeinflusst. Diese Methode kann demnach verwendet werden, um die Assoziation von Makromolekülen auf der Goldfläche zu analysieren. Das Messsignal wird in *Resonance Units* (RU) quantifiziert und ist proportional zur Masse der auf der Chipoberfläche gebundenen Proteine (Malmqvist, 1993).

Zur experimentellen Durchführung wird die Goldfolie mit einer Matrix beschichtet, die eine stabile Kopplung von Analyten ermöglicht. Die verwendete Dextranmatrix gewährleistet zusätzlich eine ständige Hydratisierung der eingebetteten Moleküle. Diese Dextranmatrix ist im Falle der verwendeten CM5-Chips mit Carboxygruppen derivatisiert, so dass eine

kovalente Kopplung von Proteinen ermöglicht wird. Die dazu erforderlichen Chemikalien wurden dem *BiaCore amine coupling kit* entnommen. Im Wesentlichen beruht die Kopplung zunächst auf einer Aktivierung der Carboxygruppen durch 50 mM N-hydroxy-succinimid (NHS) und 200 mM 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid-HCl (EDC) gefolgt von einer kovalenten Reaktion zwischen den freien Aminen des Proteins und den aktivierten Gruppen auf der Chipoberfläche. Nach erfolgreicher Kopplung sollte ein SPR-Signal zu beobachten sein das etwa 1000 RU höher ist als zu Beginn der Kopplung.

Direkte Bestimmung der Affinität

Zur Messung der Interaktion zwischen dem gekoppelten Analyten und dem Liganden wird der Ligand in unterschiedlichen Konzentrationen über die Chipoberfläche gespült, so dass bei einer Bindung eine Signalzunahme zu beobachten ist. Da sich die Veränderung des Resonanzwinkels nahezu proportional zu der Massenänderung auf der Chipoberfläche verhält, lässt sich aus der Signaländerung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen eine Bindungskurve ermitteln, die durch standardmäßige Adsorptionsisothermen analysiert werden kann. Die beschriebene Adsorptionsisotherme lässt sich nach folgender Gleichung auswerten, um eine Bindekonstante für das Makromolekül an die Chipoberfläche zu erhalten.

$$RU = RU_{\max} - RU_{\max} \cdot \frac{K_D}{K_D + c}$$

Indirekte Bestimmung der Affinität

Die direkte Bindekonstante ist eine apparente Bindekonstante, die auch eventuelle Effekte durch die Affinität des Liganden gegenüber der Chipmatrix, oder artifizielle Effekte durch die Immobilisierung des einen Bindungspartners mit einschließt. Deshalb bietet sich eine indirekte Titration an, die eine Analyse der Interaktion in der Lösung erlaubt und dabei die Chipoberfläche nur als Sensor zur Bestimmung des freien Liganden verwendet. Dazu wird der Injektionslösung neben dem Liganden auch der Analyt zugesetzt, der auf der Chipoberfläche immobilisiert vorliegt. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer Konkurrenzreaktion zwischen der Bindung an die Chipoberfläche und der Bindung an den löslichen Analyten und somit zu einer Verringerung des Resonanzsignals. Bei Verwendung von unterschiedlichen

Konzentrationen an löslichem Analyten ergibt sich somit eine Kurve, die ausgehend von der ursprünglichen Bindung abnimmt, bis schließlich keine Veränderung im SPR-Signal mehr zu beobachten ist. Die Auswertung dieser Kurve erfolgt nach folgender Formel:

$$RU = RU_{\max} + (RU_{\min} - RU_{\max}) \cdot \left(\frac{L_t + c + K_D}{2 \cdot L_t} - \sqrt{\left(\frac{L_t + c + K_D}{2 \cdot L_t} \right)^2 - \frac{c}{L_t}} \right)$$

Dabei ist L_t die Konzentration des Liganden, die konstant jeder Injektion zugesetzt wird und c die variable Konzentration des löslichen Analyten, der gegen die Bindung an die Chipoberfläche konkurriert. RU_{\min} sollte im optimalen Fall Null ergeben, was eine komplette Inhibition der Bindung an den Chip demonstrieren würde. Aufgrund unspezifischer Effekte, die durch die relativ hohen Proteinkonzentrationen verursacht werden, ergibt sich hier jedoch meist ein kleiner Restwert.

3.7 Aktivitätstests für Proteine

3.7.1 ATPase-Aktivitätstest mit EnzCheck

Der verwendete EnzCheck ATPase-Assay von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) beruht auf dem Nachweis von Orthophosphat (P_i), das bei der ATP Hydrolyse durch eine ATPase freigesetzt wird. P_i wird detektiert, indem das Enzym Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) das Substrat MESG (2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurinribosid) an der Riboseeinheit phosphoryliert. Dadurch wird die Hydrolyse des Purinnukleosids eingeleitet, die zur irreversiblen Abspaltung des Purinderivates von der Riboseeinheit führt. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 330 nm für MESG zu 360 nm für das Purinderivat. Somit kann die ATP-Hydrolyse über die Aufzeichnung der OD bei 360 nm verfolgt werden.

Für die Messung in 120 μ l UV-Küvetten wurden 150 μ l Ansätze hergestellt:

- 30 μ l MESG-Substrat
- 1,5 μ l PNP
- (116,1 - x) μ l physiologischer Puffer
- x μ l Protein

Es wurden verschiedene Mengen an Protein eingesetzt, um eine Konzentrationsabhängigkeit der ATP-Hydrolyse durch die Proteine zu überprüfen. Die Küvetten wurden während der gesamten Messung auf 37 °C temperiert. Die Messung wurde durch Zugabe von 2,4 µl 100 mM ATP-Stammlösung gestartet und die Extinktion bei 360 nm für einen Zeitraum von 45 Minuten aufgezeichnet. Aus der Steigung der erhaltenen Gerade lässt sich die Aktivität mit Hilfe einer auf unterschiedlichen Phosphatmengen beruhenden Eichgerade bestimmen.

Die Berechnung der spezifischen ATPase-Aktivität folgte folgender Formel, wobei der Wert 0,009435 einer exemplarischen Eichgerade entnommen ist:

$$v_{spez} = \frac{m}{0,009435 \frac{1}{\mu M} \cdot c_{ATPase}}$$

3.7.2 ATPase-Aktivitätstest mit ATP-regenerierendem System

Um Effekte zu vermeiden, die darauf beruhen, dass sich im Verlauf des ATPase-Assays größere Konzentrationen ADP bilden und damit Produktinhibition eintritt, wurden schließlich die meisten Daten mit einem Assay erzeugt, der ein ATP-regenerierendes System verwendet (Ali *et al.*, 1993). Dazu wurde ein gekoppelter enzymatischer Assay benutzt, bei dem das entstehende ADP sofort unter Verwendung von Phosphoenolpyruvat und NADH, sowie der Enzyme Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase wieder in ATP verwandelt wird. Die Abnahme der NADH-Konzentration lässt sich dabei spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 340nm verfolgen.

Folgender Prämix wurde hergestellt:

8500 µl	Puffer (inklusive MgCl ₂)
240 µl	100 mM Phosphoenolpyruvat
35 µl	50 mM NADH
12 µl	Pyruvatkinase-Suspension (Roche Diagnostics)
44 µl	Lactatdehydrogenase-Suspension (Roche Diagnostics)

Von diesem Prämix wurden 90 µl für jeden 120 µl Assay eingesetzt. Der Rest konnte für eine Variation der Proteinkonzentrationen verwendet werden. Die Assays wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 37 °C im Spektrometer inkubiert und nach Feststellung einer stabilen Baseline (etwa 10 Minuten) mit 2,4 µl einer 100 mM ATP-Lösung gestartet.

Bestimmung der spezifischen Aktivität eines Proteins

Um eine statistisch signifikante Aussage über die spezifische Aktivität des Proteins zu erhalten, wurden unterschiedliche Konzentrationen des Proteins im ATP-regenerierenden ATPase-Assay eingesetzt. Die Auswertung der Steigung erfolgte unter Verwendung des differentiellen molaren Extinktionskoeffizienten von NADH und NAD⁺ bei 340 nm von $-6200 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

$$v_{\text{spez}} = \frac{m}{d \cdot \left(-6200 \frac{1}{\text{cm}\cdot\text{M}}\right) \cdot c_{\text{ATPase}}}$$

Bestimmung von K_M - und k_{cat} -Werten

K_M -Werte für ATP wurden bestimmt, indem unter ansonsten identischen Bedingungen die Konzentration von ATP variiert wurde und die Veränderung der spezifischen Aktivität des Proteins beobachtet wurde. Die Berechnung der K_M -Werte ergab sich nach Michaelis-Menten aus folgender Formel.

$$v_{\text{spez}} = k_{\text{cat}} \cdot \frac{c}{c + K_M}$$

Bestimmung von apparenten K_D -Werten

Für die Partnerproteine, die die ATPase-Aktivität beeinflussen, konnten apparente K_D -Werte bestimmt werden. Dazu wurde bei gleichbleibender ATPase-Konzentration gemessen und die Aktivität in Abhängigkeit einer sich verändernden Konzentration an Partnerprotein beobachtet. Die resultierende Abhängigkeit wurde nach untenstehender Formel interpretiert,

die eine äquimolare Stöchiometrie der Komplexbildung zugrunde legt. Da dies nicht für alle Partnerproteine nachgewiesen ist, ist die Auswertung in einigen Fällen (v.a. bei Sba1) nur als Näherung zu betrachten.

$$v = v_M + (v_{ML} - v_M) \cdot \frac{M_t + L_t + K_D - \sqrt{(M_t + L_t + K_D)^2 - 4 \cdot M_t \cdot L_t}}{2 \cdot M_t}$$

Dabei stellen v_M und v_{ML} die spezifischen Aktivitäten von Hsp90 bzw des Hsp90-Partnerprotein-Komplexes dar. Die eingesetzten Konzentrationen sind M_t und L_t . Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich aus dem Kurvenverlauf durch nicht-lineare Datenanalyse.

Bildung von Heterodimeren

Die Bildung von Heterodimeren aus verschiedenen Hsp90-Konstrukten führt teilweise zu einer Veränderung der ATPase-Aktivität der aktiven Untereinheit. Dies kann nach einem statistischen Modell ausgewertet werden, das eine Aussage ermöglicht, ob die Bildung von Heterodimeren gleichwahrscheinlich ist, wie die Bildung der einzelnen Homodimere. Dies erfolgt nach folgender Formel.

$$v = v_{Hsp90} \cdot \frac{n \cdot c_{Hsp90}}{n \cdot c_{Hsp90} + c_{Frag}} + v_{Hetero} \cdot \frac{c_{Frag}}{n \cdot c_{Hsp90} + c_{Frag}}$$

Dabei ergeben sich aus den bekannten Konzentrationen von Hsp90 und dem kompetitiven Hsp90-Fragment die Aktivitäten von Hsp90 und dem gebildeten Heterodimer aus Hsp90 und Fragment, sowie eine Wahrscheinlichkeitsaussage in Form des Faktors n. Ist dieser Faktor 1, so ist die Bildung des Heterodimers gleichwahrscheinlich, ist der Faktor größer als 1, so ist die Bildung des Heterodimers weniger wahrscheinlich, als die Bildung des Hsp90-Homodimers.

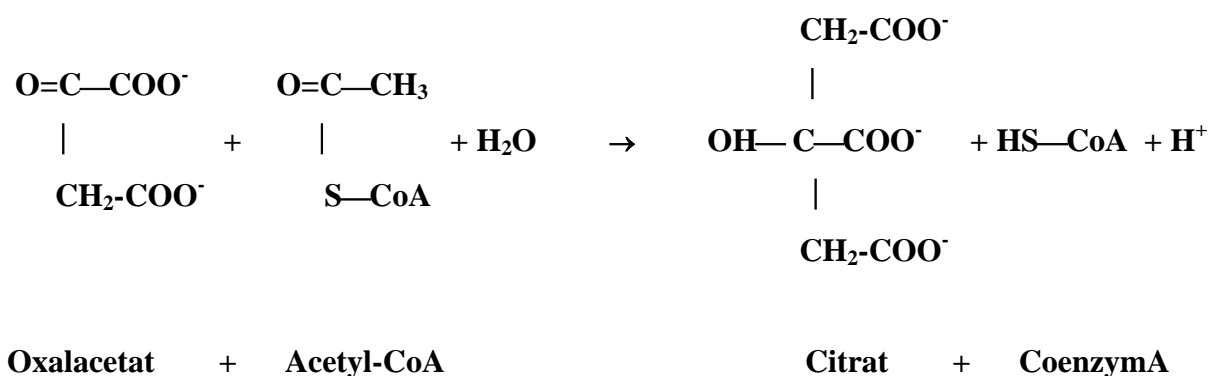
3.7.3 Einfluss von Chaperonen auf die thermische Aggregation der Citratsynthase

Citratsynthase aus Schweineherz ist ein Enzym der mitochondrialen Matrix und liegt nativ als Homodimer aus Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 49 kDa vor. Das Protein ist thermisch labil und verliert seine Aktivität bei 43 °C innerhalb weniger Minuten, gefolgt von Aggregation.

Bei einer Denaturierungstemperatur von 43 °C wurde die Aggregation von Citratsynthase durch Detektion der Lichtstreuung bei 360 nm verfolgt. Die Messung erfolgte in einem SpeX FluoroMax II. Dazu wurden sowohl die Anregungswellenlänge, als auch die Emissionswellenlänge bei 360 nm verwendet. Der Spalt für das Anregungslicht wurde auf 3 nm, der für das Emmissionslicht auf 5 nm gesetzt. Eingesetzt wurden standardmäßig 150 nM Citratsynthase. Um den Einfluss von Chaperonen auf die Aggregation zu untersuchen, wurden diese dem Aggregationsansatz in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Aggregation wurde über etwa 30 Minuten aufgezeichnet.

3.7.4 Einfluss von Chaperonen auf die thermische Inaktivierung der Citratsynthase

Citratsynthase katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat, Acetyl-CoA und Wasser zu Citrat und Coenzym A. Diese Reaktion stellt eine Aldolkondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citryl-CoA dar, der sich die Hydrolyse von Citryl-CoA zu Citrat und CoA-SH anschließt.



Die freien SH-Gruppen am Coenzym A, die bei dieser Reaktion entstehen, werden im Aktivitätstest mit DTNB (5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure), einem Thiolnachweisreagenz, nachgewiesen. Die durch die Thiobenzole entstehende Gelbfärbung wird im Photometer bei 412 nm gemessen (Srere *et al.*, 1963).

Sowohl die thermische Inaktivierung von CS als auch ihre Reaktivierung kann von Chaperonen beeinflusst werden, wobei hier die Einflüsse auf die Reaktivierung nicht untersucht wurden. Der Vorteil gegenüber der Aggregationsmessung beruht auf der Möglichkeit die einfach-exponentiellen Inaktivierungskinetiken mathematisch auszuwerten und dadurch eine quantitative Aussage zu erhalten. Für die Inaktivierung wurde CS (15 μM Stammlösung) 1:100 im Testansatz verdünnt und bei 43°C inkubiert. Um den Einfluss verschiedener Hsp90-Konstrukte auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung zu untersuchen, wurde Hsp90 oder Hsp90-Fragmente in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden 20 μl entnommen und sofort in den Aktivitätstest eingesetzt. Die Inaktivierung fand, wenn nicht anders vermerkt, in 40 mM Hepes, pH 7,5 statt. Folgende Reagenzien wurden für den Aktivitätstest in Halbmikroplastikküvetten vorgelegt und auf 25 °C temperiert:

- 0,93 ml 50 mM TE-Puffer pH 8,0
- 0,01 ml 10 mM DTNB (in TE-Puffer pH 8,0)
- 0,01 ml 10 mM Oxalacetat (in 50 mM Tris/Base)
- 0,03 ml 5 mM Acetyl-CoA (in TE-Puffer pH 8,0)

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

$$v_{spez} = \frac{\frac{\Delta E}{t} \cdot V_0}{13600 \frac{1}{\text{cm} \cdot \text{M}} \cdot d \cdot V \cdot c}$$

Dabei ist V_0 das Assayvolumen in Millilitern (1 ml), d die Schichtdicke der Küvette (normalerweise 1 cm), V das zugegebene Volumen aus dem Inaktivierungsansatz (normalerweise 20 μl) und c die Konzentration der Citratsynthase im Inaktivierungsansatz (normalerweise 150 nM). Zur Interpretation der Werte wurde die Aktivität nativer CS zum Zeitpunkt Null gleich 100% gesetzt. Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung erfolgte durch nicht-lineare Datenanalyse mit Hilfe des Programmes SCIENTIST (MicroMath). Dazu wurde eine Formel verwendet, die von einem einfach-exponentiellen Zeitverlauf der Inaktivierung ausgeht.

$$v_{spez,t} = v_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

3.7.5 Einfluss von Chaperonen auf die Aggregation der Insulin B-Kette

Insulin ist ein Peptidhormon, welches im prozessierten Zustand aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren besteht. Diese sind über zwei Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Die Zugabe von Reduktionsmitteln wie DTT führt zur Reduktion der Disulfidbrücke, was zu einer spontanen Aggregation der B-Kette führt (Sanger, 1949). Die Aggregation der B-Kette kann durch Messung der Absorption der Lösung bei 360nm in einem UV/VIS-Spektrophotometer verfolgt werden, da mit zunehmender Lichtstreuung die Lichtdurchlässigkeit der Lösung verringert wird.

Zur Bestimmung der Chaperon-Aktivitäten wurde die Absorptionszunahme bei 360 nm in einem UV/VIS-Spektrometer mit temperierbarem Küvettenhalter bei 25 °C gemessen. Insulin wurde zu ca. 10 mg/ml bei leicht saurem pH-Wert gelöst. Nach Zentrifugation konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Insulin ($A_{280 \text{ nm}, 0,1\%} / 10 \text{ mm} = 1,06$) die exakte Proteinkonzentration der Insulinlösung bestimmt werden. Die Experimente wurden in 120 µl UV-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Standardmäßig wurde 40 mM HEPES, pH 7,5 als Assaypuffer verwendet. Die Messtemperatur lag bei 25 °C. Es wurden jeweils 45 µM Insulin und verschiedene Konzentrationen an Hsp90 beziehungsweise Hsp90-Fragmenten in den Küvetten vorinkubiert. Die Messung wurde durch Zugabe von DTT (Endkonzentration: 20 mM) gestartet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die Domänenstruktur von Hsp90

4.1.1 Identifizierung von Domänen anhand eines Hydropathieblottes

Das Protein Hsp90 ist aus 709 Aminosäuren aufgebaut. Die Funktionen von Hsp90 umfassen ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse, die Interaktion mit Partnerproteinen und die Bindung von Substraten. Da es nur sehr schwer möglich ist, all diese Funktionen durch eine Untersuchung des Volllängenproteins zu lokalisieren und mechanistisch zu verstehen, wurde als strategisches Vorgehen eine Fragmentierung von Hsp90 angestrebt. Dieser Ansatz war bereits von Thomas Scheibel verfolgt worden und hatte zur Identifizierung zweier stabiler Domänen der Größe 24 kDa (N210) und 50 kDa (262C) geführt (Scheibel *et al.*, 1998). Besonders bei der 447 Aminosäuren langen C-terminalen Domäne war eine weitere Unterteilung angestrebt. Dazu wurde zunächst, basierend auf der Aminosäuresequenz, ein Hydropathieblot von Hsp90 angefertigt (Abbildung 4-1), mit dem Aufschlüsse über das Vorhandensein hydrophiler Bereiche erhalten werden sollten. Solche Bereiche bilden häufig Linkerregionen zwischen individuellen Domänen.

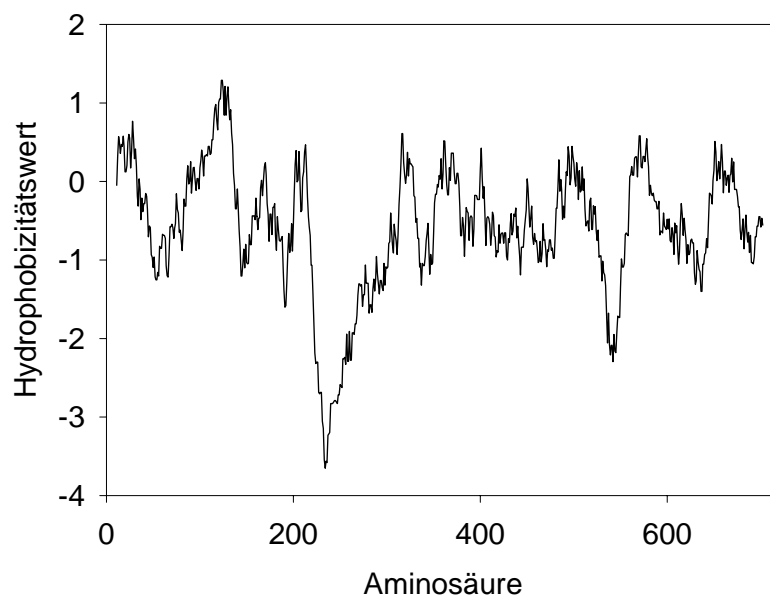


Abbildung 4-1: Hydropathieblot von Hsp90

Die Berechnung der Hydrophobizitätswerte erfolgte mit Hilfe des Programmes Expasy-ProtScale nach Kyte & Doolittle bei einer Fenstergröße von 21 Aminosäuren. Dabei beschreibt ein Wert von -4 einen Proteinteil mit maximaler Hydrophilie, ein Wert von 4 einen Proteinteil mit maximaler Hydrophobie (Kyte & Doolittle, 1982).

Deutlich zu erkennen sind ausgedehnte hydrophile Bereiche, von denen die beiden prominentesten zwischen den Aminosäuren 210 und 260 bzw. zwischen 525 und 535 liegen. Da der erste Linker bereits den Fragmenten N210 und 262C zu Grunde lag (Scheibel *et al.*, 1998), wurden für die vorliegende Arbeit die Fragmente 1–529 (N529), 1–599 (N599), 262–529 und 527–709 (527C) geplant. Die cDNAs der Fragmente N529, N599 und 527C wurden dazu in den Vektor pQE30 kloniert, das Fragment 262-527 in den Vektor pQE60. Da die Klonierung der Fragmente N529 und N599 in den pQE30-Vektor mit den Schnittstellen *Bam*HI und *Sph*I ohne Stop-Codon erfolgte, sind die beiden betreffenden Fragmente C-terminal um die Aminosäuren GSACELGTRVDLEPSLIS verlängert. Hsp90 und nochmals N599 wurden in den Vektor pET28b kloniert. Dieses N599-Fragment trug somit keine Extension. Demnach wurden die folgenden Hsp90-Fragmente erhalten (Abbildung 4-2), die im Weiteren gereinigt und bezüglich ihrer Funktionalität charakterisiert wurden.

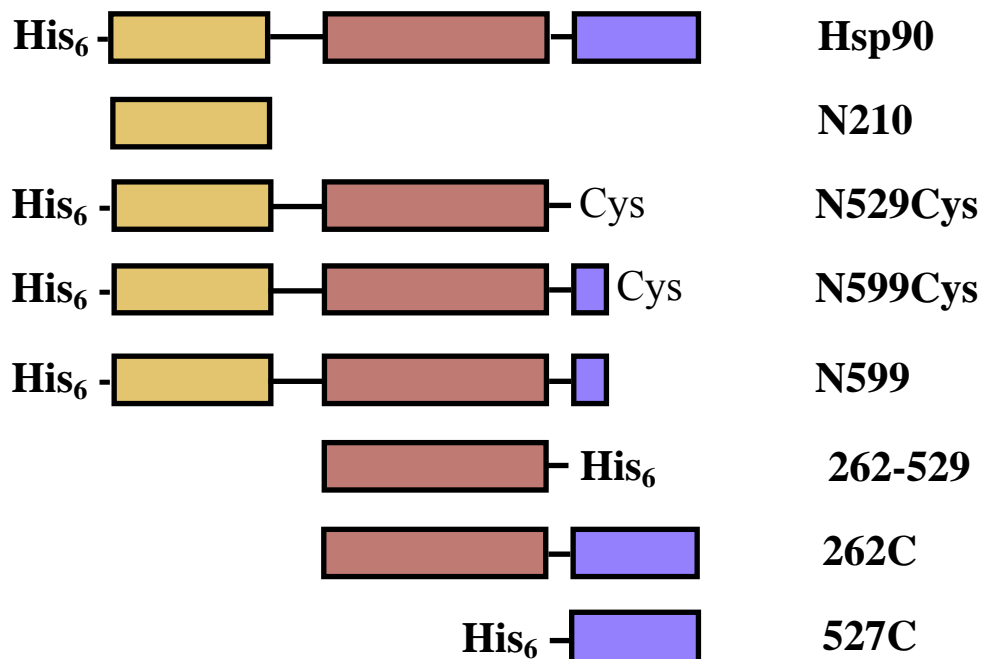


Abbildung 4-2: Planung von Hsp90-Fragmenten

Die drei Hsp90-Domänen wurden anhand des Hydrophathieblots identifiziert. Dabei entspricht die erste Domäne (gelb) der ATP-Bindestelle, die zweite Domäne (rot) der Mitteldomäne und die dritte Domäne, beginnend ab Aminosäure 527, der C-terminalen Domäne (violett). Die Fragmente N599Cys und N529Cys haben die im Text beschriebene Aminosäureextension am C-Terminus, während das Fragment N599 diese nicht trägt.

4.1.2 Reinigung der rekombinanten Proteine

Die Hsp90-Fragmente wurden entsprechend der Vorschrift zur Reinigung His₆-getaggtter Proteine gereinigt (siehe Kapitel 3.4.9). Die erhaltenen Proteinmengen und die Endkonzentrationen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst:

Fragment	Vektor	Proteinmenge [mg/g Zellen]	Konzentration der finalen Chargen
Hsp90	pET28b – Hsp82	7,5 mg	5.4 mg/ml
N210	pET11a – N210	15 mg	8.9 mg/ml
262C	pET11a – 262C	15 mg	10 mg/ml
N529Cys	pQE30 – N529	10 mg	4.5 mg/ml
N599Cys	pQE30 – N599	0,8 mg	1.1 mg/ml
262-529	pQE60 – 262-529	0,9 mg	3.0 mg/ml
527C	pQE60 – 527C	0,25 mg	2.7 mg/ml

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Proteinreinigungen der Hsp90-Fragmente

Zur Kontrolle der Hsp90-Fragmente wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, bei der alle gereinigten Hsp90-Fragmente aufgetragen wurden (Abbildung 4-3).

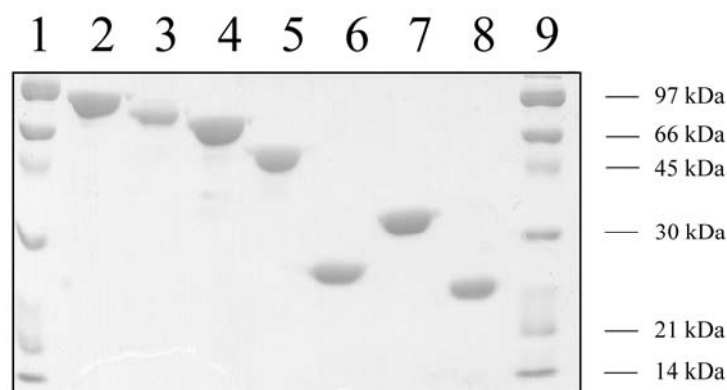


Abbildung 4-3: SDS-Gel zum Vergleich der verschiedenen Hsp90-Fragmente

Aufgetragen wurden die gereinigten Proteine Hsp90 (Spur 2), 599Cys (3), 529Cys (4), 262C (5), N210 (6), 262-529 (7) und 527C (8). Spur 1 und 9 enthält den LMW-Standard.

4.1.3 Untersuchung der Struktur der gereinigten Fragmente

Die künstliche Fragmentierung von Proteinen kann zum Verlust der Proteinstruktur führen. Um zu demonstrieren, dass die hier verwendeten Fragmente strukturiert sind, wurden Fern-UV CD-Spektren aufgenommen, da CD-Spektroskopie hervorragend geeignet ist, um Sekundärstrukturmerkmale von Proteinen zu analysieren (siehe Kapitel 3.6.3). Exemplarisch sind in Abbildung 4-4 die Spektren der drei isolierten Domänen dargestellt.

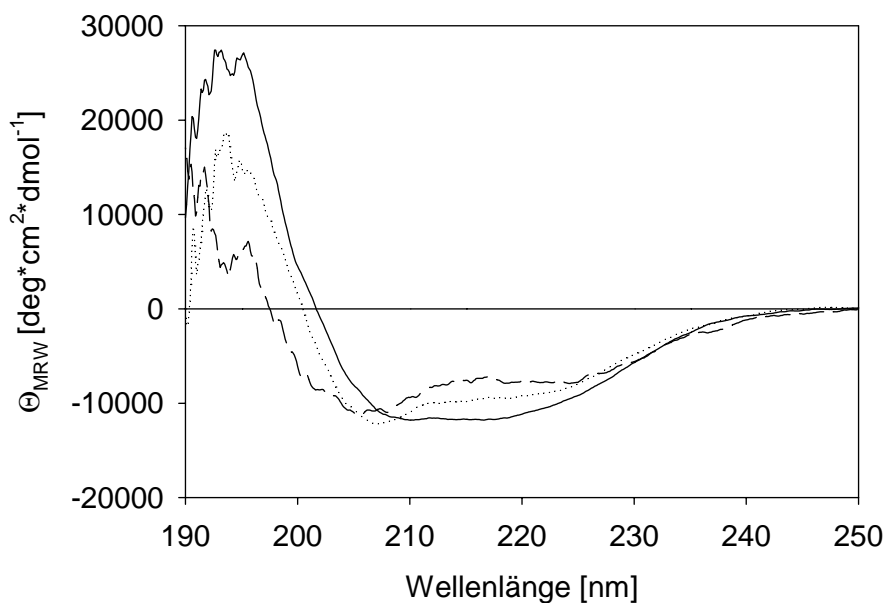


Abbildung 4-4: CD-Spektren der drei isolierten Hsp90-Domänen

CD-Spektren wurden in 40mM Phosphat pH 8,0 bei einer Proteinkonzentration von 0,15 mg/ml und 25 °C aufgenommen. Dargestellt sind die Spektren für N210 (—), 262-529 (·····) und 527C (- - - -).

Die Spektren zeigen in allen drei Fällen strukturierte Proteine. Basierend auf der molaren Elliptizität lässt sich eine Aussage über den Sekundärstrukturgehalt des jeweiligen Fragmentes treffen. Dazu wurde das Programm CDNN verwendet (siehe Kapitel 3.6.3), das auf Grundlage von Beispielspektren den Sekundärstrukturgehalt berechnet. Alle drei untersuchten Hsp90-Fragmente enthalten demnach eine Mischung aus α -Helices und β -Faltblättern. Dabei zeigte sich in der N-terminalen ATP-Bindedomäne der größte α -helikale Anteil mit etwa 36%, bei der C-terminalen Domäne der kleinste mit etwa 27%. Der Anteil an

Random-coil betrug bei allen drei Proteinen etwa 30%. Diese Werte demonstrieren, dass alle drei Proteine eine gut ausgebildete Sekundärstruktur besitzen.

4.1.4 Stabilitätsuntersuchung der Hsp90-Fragmente

Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass die einzelnen Hsp90-Fragmente eine definierte Struktur aufweisen, bestand dennoch die Möglichkeit, dass die Fragmente durch das Entfernen angrenzender Bereiche in ihrer Stabilität beeinträchtigt sein könnten. Um Informationen darüber zu erhalten, wurden Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Fragmente zunächst einer „chemischen“ Denaturierung unterzogen (siehe Kapitel 3.6.2). Als Denaturierungsmittel wurde Harnstoff verwendet. Die Detektion des Entfaltungsüberganges erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 328 nm. Exemplarisch sind in Abbildung 4-5 die Übergänge der isolierten Domänen dargestellt.

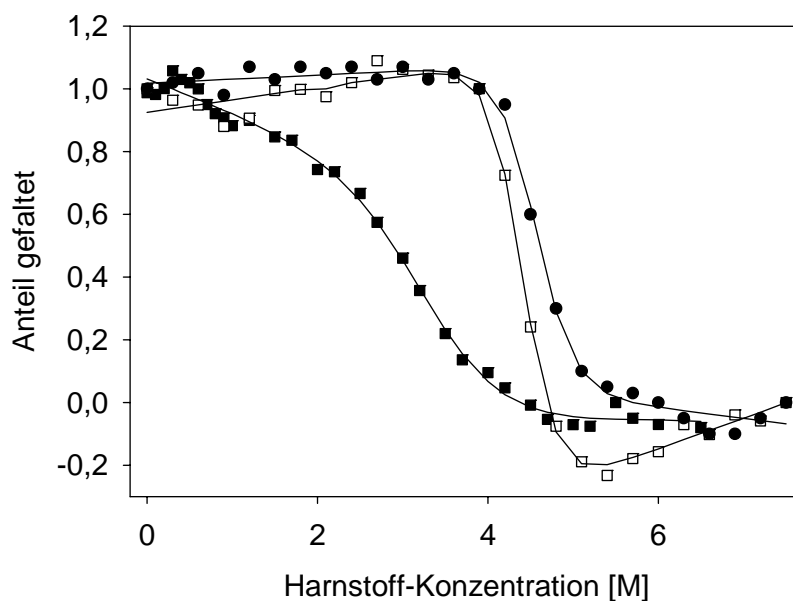


Abbildung 4-5: Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge der isolierten Domänen

Die Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergänge wurden fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Die Anregungswellenlänge lag bei 280 nm, die Emissionswellenlänge bei 328 nm. Die Auswertung der Entfaltungsübergänge erfolgte, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben. Die Übergänge sind für die isolierten Domänen N210 (●), 262-529 (□) und 527C (■) dargestellt.

Alle drei Domänen zeigten dabei einen Verlust von Struktur bei erhöhter Harnstoffkonzentration, wobei die Fragmente sich als unterschiedlich stabil erwiesen. Während die N-terminale und die Mitteldomäne bei einer Harnstoffkonzentration von etwa 4,7 M denaturieren, ist die C-terminale Domäne deutlich instabiler. Hier erfolgt die Denaturierung zum einen schon ab einer Harnstoffkonzentration von 2,5 M mit einem Übergangsmittelpunkt bei etwa 3,2 M, zum anderen ist der Entfaltungsübergang deutlich weniger kooperativ. Beides ist ein Zeichen für eine geringere Stabilität der C-terminalen Domäne im Vergleich zu den beiden anderen Hsp90-Fragmenten. Dies wird auch an den Werten für die Stabilisierungsenergie, die unter Annahme eines Zweizustandsmodells erhalten werden, deutlich. Die Werte liegen im Einzelnen bei 58 kJ/mol für die Mitteldomäne, 51 kJ/mol für die N-terminale Domäne und 17 kJ/mol für die C-terminale Domäne. Die Daten für die anderen Hsp90-Fragmente sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Zusätzlich zur Stabilität gegenüber „chemischen“ Denaturierungsmitteln wurde die thermische Stabilität der einzelnen Fragmente getestet, da einige der angestrebten Untersuchungen bei erhöhter Temperatur (bis 43 °C) durchgeführt werden sollten. Da die Fluoreszenzintensität selbst temperaturabhängig ist, wurde die thermische Stabilität der Proteine mittels CD-Spektroskopie untersucht (siehe Kapitel 3.6.3). Dazu wurden die Elliptizität bei 220 nm gemessen und die Veränderung der Sekundärstruktur bei einer konstanten Heizrate von 30 °C/Stunde verfolgt. Die Denaturierung war in allen Fällen irreversibel, weshalb eine quantitative thermodynamische Auswertung nicht durchgeführt wurde.

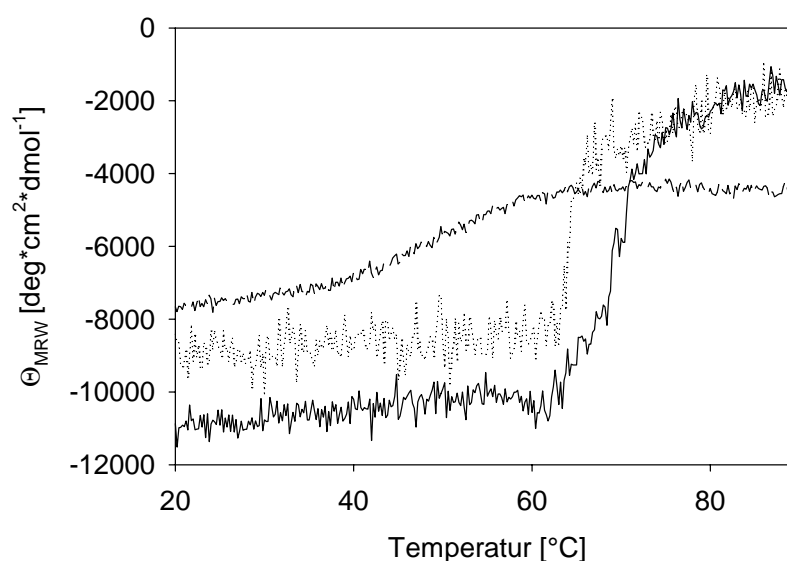


Abbildung 4-6: Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge der isolierten Domänen

Die Übergänge wurden bei einer Wellenlänge von 220 nm aufgezeichnet. Verwendet wurde für die CD-Spektroskopie 0,15 mg/ml Protein in 40 mM Phosphat, pH 7,0. Gezeigt sind die thermischen Entfaltungsübergänge der isolierten Domänen für N210 (—), 262-529 (·····) und 527C (- - - -).

Für alle Fragmente war ein definierter Entfaltungsübergang zu beobachten. Die Temperatur des Übergangsmittelpunktes lag dabei je nach Fragment zwischen 65 °C und 50 °C. Während das N-terminale Fragment und die Mitteldomäne nach dem Entfaltungsübergang keine Struktur mehr aufweisen, scheint das C-terminale Fragment noch einen Anteil an Sekundärstruktur zu besitzen, wie aus dem erhöhten Wert für die molare Elliptizität bei 80 °C zu entnehmen ist. Die Daten der Stabilitätsuntersuchung der Hsp90-Fragmente sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Fragment	Übergangsmittelpunkt des Harnstoffübergangs [M]	Übergangsmittelpunkt des thermischen Übergangs [°C]
Hsp90	5,0 ± 0.1	62 ± 2
N210	4,6 ± 0.2	67 ± 2
262C	4,2 ± 0.2	62 ± 2
N529Cys	4,7 ± 0.1	64 ± 2
262-529	4,3 ± 0.2	62 ± 2
527C	3,2 ± 0.3	50 ± 4

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen der Hsp90-Fragmente

Die Untersuchung der Struktur und Stabilität der Fragmente zeigte, dass die Fragmentierung von Hsp90, basierend auf dem Hydropathieplot (Abbildung 4-1), zu gut definierten Fragmenten geführt hatte. Die Tatsache, dass die Fragmente eine definierte Struktur besitzen, ließ weitere, insbesondere funktionelle Untersuchungen zu. Dazu wurde – basierend auf obigen Daten – davon ausgegangen, dass Experimente bei 37 °C (z.B. ATPase-Assays) problemlos durchgeführt werden können.

4.1.5 Untersuchung der Quartärstruktur der Hsp90 – Fragmente

Hsp90 ist ein dimeres Protein, wobei die Dimerisierungsstelle am C-Terminus lokalisiert ist (Minami *et al.*, 1994). Um dies anhand der isolierten Fragmente zu quantifizieren, wurde die Quartärstruktur der einzelnen Fragmente untersucht. Diese Analyse erfolgte zunächst über Größenausschlusschromatographie. Dazu wurden 5 µg jedes Fragments auf eine Superdex 200 HR-Säule aufgetragen und die Elutionszeit mit Hilfe von Fluoreszenzdetektion bestimmt (Abbildung 4-7).

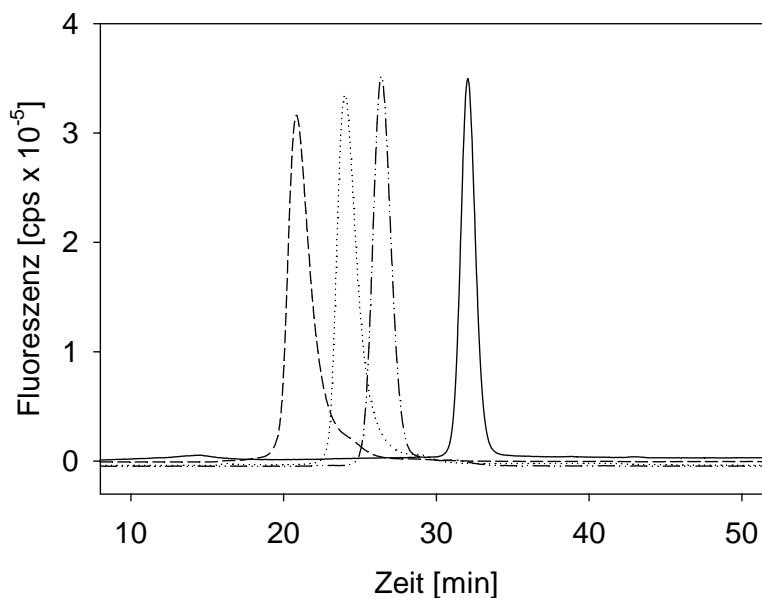


Abbildung 4-7: Gel-filtration von Hsp90-Fragmenten

Das Laufverhalten der Proteine wurde über Fluoreszenzdetektion verfolgt. Dazu wurde eine Anregungswellenlänge von 280 nm und eine Emissionswellenlänge von 328 nm verwendet. Der Laufpuffer war 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl. Gezeigt sind die Läufe von N210 (—), N599Cys (·····), Hsp90 (---) und N529Cys (- · - · -). Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Alle Fragmente, mit der Ausnahme von 527C, eluierten als symmetrische Peaks, was darauf hindeutet, dass sie eine definierte Quartärstruktur aufweisen. 527C interagiert so stark mit der Säulenmatrix, dass mit diesem Fragment dieses Experiment nicht erfolgreich durchgeführt werden konnten. Basierend auf den Elutionszeiten lässt sich unter Verwendung einer Eichgerade (siehe Kapitel 3.5.10) eine Abschätzung des Oligomerisierungsgrades der Fragmente vornehmen, auch wenn die dabei erhaltenen Werte von Parametern wie der Proteingröße und der Proteinform stark beeinflusst werden. Diese Abschätzung ist in Tabelle 4-3 dargestellt.

Um eine exakte Aussage über die Quartärstruktur der Hsp90-Fragmente zu erhalten, wurde zusätzlich Gleichgewichtszentrifugation für die Bestimmung des nativen Molekulargewichtes verwendet (siehe Kapitel 3.5.11). Die analytische Ultrazentrifugation wurde üblicherweise über 48 Stunden bei 4 °C durchgeführt. Exemplarisch dargestellt ist in Abbildung 4-8 der Gleichgewichtslauf von 527C, das mit einem nativen Molekulargewicht von 49 kDa als dimere Spezies identifiziert werden konnte.

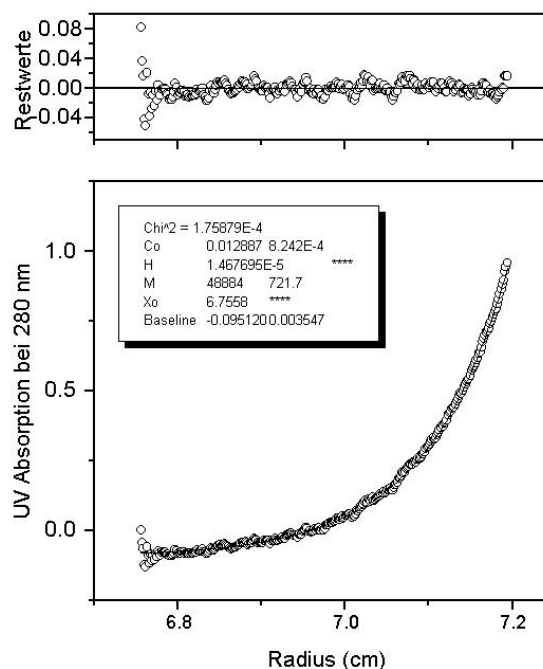


Abbildung 4-8: Gleichgewichts-Ultrazentrifugation von 527C

Die Detektion des Proteins erfolgte in diesem Fall über UV-Absorption bei 280 nm. Die Laufgeschwindigkeit war 15000 Upm bei 4 °C und es wurde ein Ti60-Rotor verwendet. Als Puffer wurde 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl benutzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets Origin. Im unteren Teil der Abbildung ist der Konzentrationsgradient gezeigt, im oberen Teil sieht man die Abweichung der Messwerte von der Kurve, die durch die Datenanalyse erzeugt wurde.

Ähnliche Läufe wurden auch mit allen anderen Fragmenten durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4-3, zusammen mit den Daten aus den Gelfiltrationsläufen, aufgetragen:

Fragment	Errechnete Molekülmasse [Da]	Elutionszeit SEC-HPLC [min]	Molekulargewicht nach Gelfiltration [Da]	Molekulargewicht nach UZ-Lauf [Da]
Hsp90	81406	20.85	432670	154500 ± 700
N210	23697	32.04	30619	24073 ± 63
262C	51681	24.01	204836	93584 ± 210
N529Cys	62483	26.41	116950	66026 ± 621
N599Cys	70531	25.28	151705	n.d.
262-529	33434	27.85	82603	35050 ± 3080
527C	21721	-	-	48884 ± 721

Tabelle 4-3: Ergebnisse der Untersuchung der Quartärstruktur der Hsp90-Fragmente

Die Dimerisierungsstelle von Hsp90 wurde im C-terminalen Bereich vermutet (Minami *et al.*, 1994). Dies ist auch anhand der gereinigten Fragmente zu erkennen. So zeigen nur die Fragmente eine dimere Assoziationsform, die C-terminale Bereiche von Hsp90 enthalten, nicht jedoch solche, denen die letzten 110 Aminosäuren (N599Cys) fehlen. Erstaunlich ist jedoch die erhebliche Diskrepanz zwischen den beiden Bestimmungsmethoden für das native Molekulargewicht. Nachdem davon auszugehen ist, dass die Bestimmung mit Hilfe der Ultrazentrifugation aufgrund der Methodik zu den exakteren Werten geführt hat, liegt der Grund sicherlich an einem ungewöhnlichen Laufverhalten von Hsp90 auf der Gelfiltrationssäule. Dies ist auf Grundlage der bekannten Daten zur Struktur von Hsp90 auch zu erwarten. So erscheint Hsp90 bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen als stark elongiertes Sphäroid (Maruya *et al.*, 1999). Basierend auf den Daten zum Oligomerisierungsverhalten ist davon auszugehen, dass die Fragmentierung von Hsp90 erfolgreich verlaufen ist, und die daraus resultierenden Fragmente nicht nur eine definierte Struktur besitzen, sondern auch die Assoziationsfähigkeit der Fragmente ihrer Funktion im Volllängenprotein entspricht.

Im Weiteren wurde versucht, die Dimerisierungskonstante von Hsp90 zu bestimmen. Die Ergebnisse der Gleichgewichtsläufe mit Hsp90 erwiesen sich als unabhängig von der Proteinkonzentration im Bereich von 1,2 μM bis 10 μM . Daher wurde davon ausgegangen, dass die Bindekonstante von Hsp90 unterhalb der verwendeten Konzentrationen liegt. Da zu erwarten war, dass die Fragmente im monomeren Zustand ein anderes Laufverhalten aufweisen als im dimeren Zustand, wurde das Prinzip der Größenausschlusschromatographie verwendet, um die Bindekonstanten zu bestimmen. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen von Hsp90 auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und ihr Laufverhalten analysiert (Abbildung 4-9).

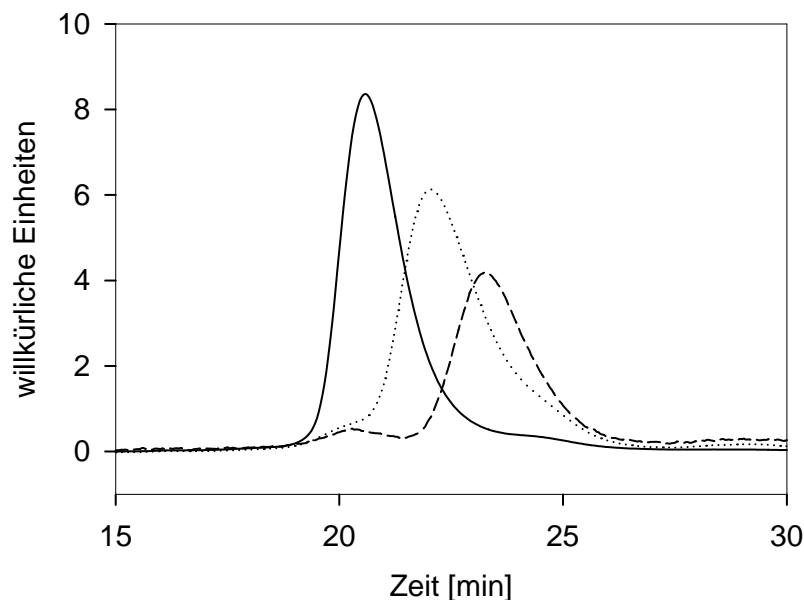


Abbildung 4-9: Gelfiltration von Hsp90-Proben verschiedener Konzentrationen

Die Konzentrationen der einzelnen Proben waren 1 μM Hsp90 (—), 30 nM Hsp90 (····) und 5 nM Hsp90 (- - -). Die Amplitude wurde durch die Proteinkonzentration dividiert, so dass vergleichbare Peakhöhen entstanden. Die Laufgeschwindigkeit war 0,5 ml/min, der Laufpuffer 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl.

Hsp90 eluiert bei allen getesteten Konzentrationen als ein Peak, der sich bei niedrigen Proteinkonzentrationen zu längeren Elutionszeiten hin verschiebt. Dies lässt Schlüsse über die Beschaffenheit des Hsp90-Dimers zu. Eine Interpretationsmöglichkeit würde ein dynamisches Monomer/Dimer-Gleichgewicht für Hsp90 voraussetzen, das im Verlauf des Experiments mehrfach assembliert und dissoziiert, so dass sich keine Trennung der Spezies ausbilden kann. Demzufolge wäre die Elutionszeit ein Maß für den Assoziationsgrad bei der jeweiligen Proteinkonzentration. Um den Übergang von der monomeren in die dimere Spezies zu analysieren, wurde die Retentionszeit gegen den Logarithmus der Proteinkonzentration

aufgetragen. Diese Auftragung ergibt einen Kurvenverlauf, der, ausgehend von einem monomeren Zustand bei niedrigen Proteinkonzentrationen, einen Übergangsbereich zeigt, bei dem monomere und dimere Spezies populierte sind. Bei hohen Proteinkonzentrationen liegen schließlich nur noch dimere Assoziationsformen vor (Abbildung 4-10).

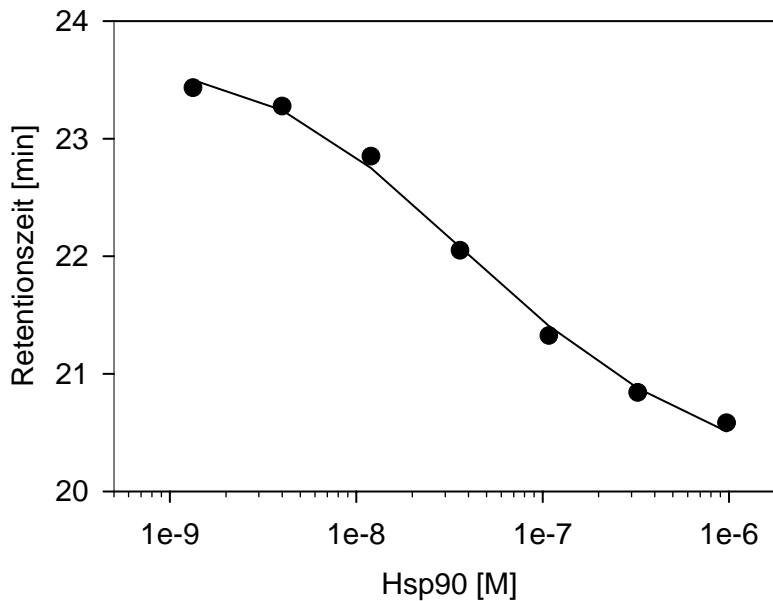


Abbildung 4-10: Monomer/Dimer-Übergang für Hsp90

Die Auftragung der Retentionszeit gegenüber dem Logarithmus der Proteinkonzentration liefert einen Monomer/Dimer-Übergang, der durch ein entsprechendes Modell (siehe Kapitel 3.5.10) ausgewertet werden kann. Die Konzentrationen wurden bereits durch den dort erwähnten Verdünnungsfaktor dividiert.

Die Datenanalyse, der ein einfacher Monomer/Dimer-Übergang zugrunde liegt, ergab, dass der Kurvenverlauf sich gut zu diesem Modell fitten lässt. Die Konzentration am Übergangsmittelpunkt wurde nach Verdünnungskorrektur (siehe Kapitel 3.5.10) mit etwa 60 nM ermittelt. Diese Konzentration ist deutlich geringer als die Konzentrationen, die bei der analytischen Ultrazentrifugation eingesetzt wurden und liegt so niedrig, dass die Detektionsmöglichkeiten der analytischen Ultrazentrifugation nicht ausreichen, um diese Daten zu verifizieren.

Eine ähnliche Analyse wurde mit den Fragmenten 262C, N529Cys und N599Cys durchgeführt (Abbildung 4-11).

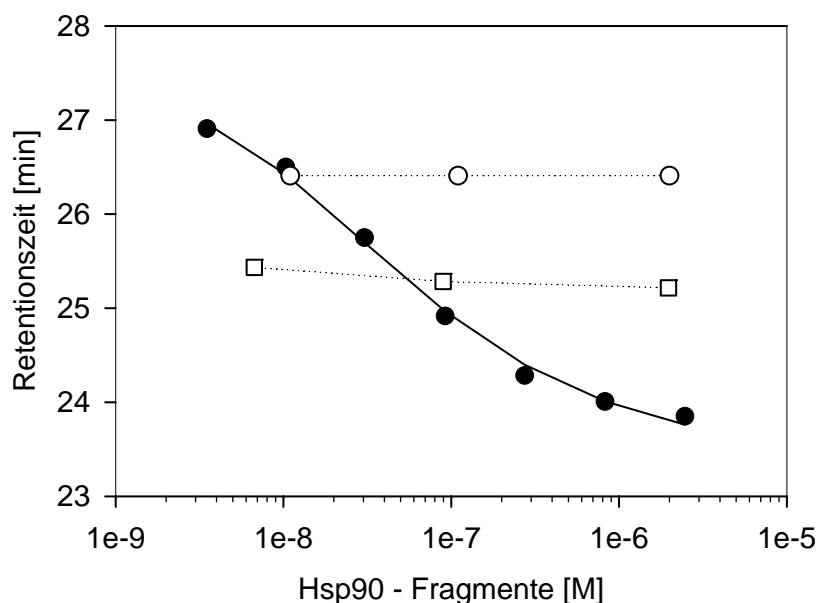


Abbildung 4-11: Monomer/Dimer-Übergang der Hsp90-Fragmente

Analog zu Abbildung 4-10 wurde hier mit den Hsp90-Fragmenten 262C (●), N529Cys (○) und N599Cys (□) verfahren. Der Übergang des C-terminalen Fragmentes wurde entsprechend ausgewertet.

Dabei stellte sich heraus, dass die Dimerisierungskonstante von 262C mit 80 nM in etwa der von Vollängen-Hsp90 entspricht. Für die beiden monomeren Fragmente N529Cys und N599Cys konnte, wie zu erwarten, kein Übergang detektiert werden. Somit kann, basierend auf diesen Daten gefolgert werden, dass die Dimerisierung von Hsp90 C-terminal erfolgt und die N-terminalen Domänen nicht wesentlich zur Dimerisierung beitragen.

4.1.6 Nukleotidbindung an Hsp90-Fragmente

Die N-terminale Domäne war bereits als ATP-Bindestelle von Hsp90 identifiziert worden (Prodromou *et al.*, 1997a). Um zu untersuchen, ob auch weitere Regionen an der Bindung beteiligt sind, wurden Bindekonstanten der Fragmente N210 und N529Cys mit der von Vollängen-Hsp90 verglichen. Die Ermittlung der Bindekonstanten erfolgte durch isothermische Titrationskalorimetrie (ITC). Diese Technik erlaubt es, sämtliche thermodynamischen Daten aus einem Experiment zu erhalten. Da eine thermische Reaktion wie die Hydrolyse von ATP die kalorimetrische Untersuchung stören würde, wurde das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP verwendet.

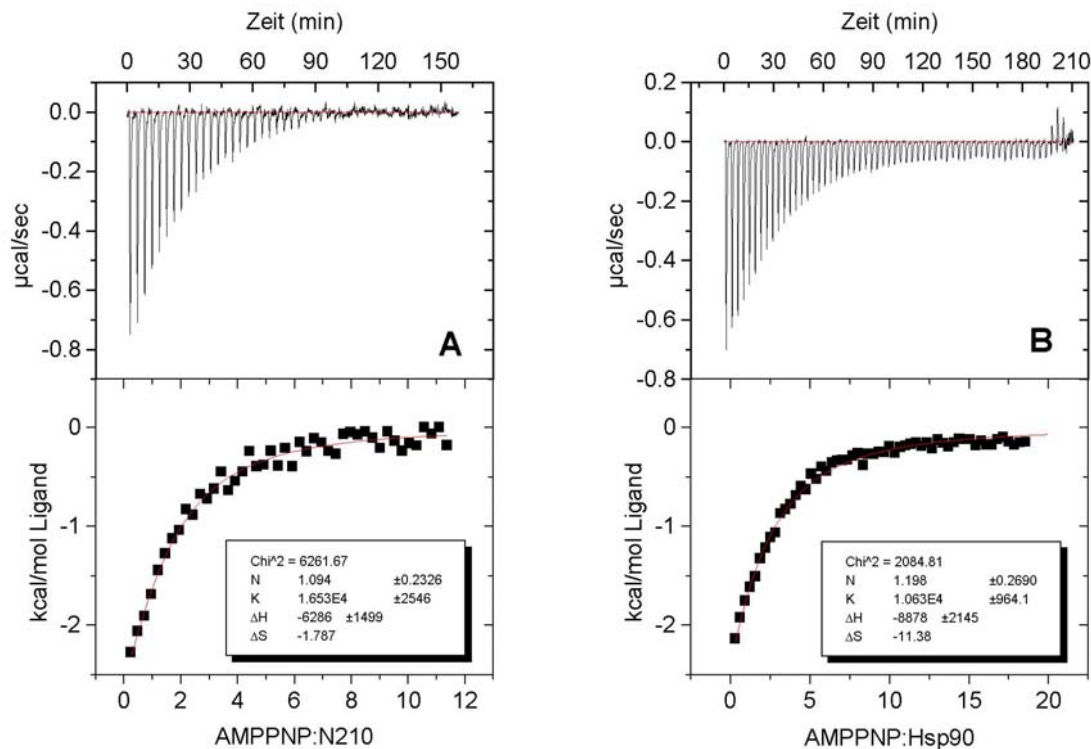


Abbildung 4-12: Bindung von AMP-PNP an N-terminale Hsp90-Fragmente

Die Affinität von AMP-PNP zu N210 (A) und Hsp90 (B) wurde durch Isothermische Titrationskalorimetrie bestimmt. Die Proteinkonzentrationen betragen 15 μM . Es erfolgten 40 Injektionen zu je 7 μl von einer 4 mM AMP-PNP Lösung in die Proteinlösung. Die Auswertung mit Hilfe des Programmes Origin wurde unter der Annahme durchgeführt, dass eine Bindestelle pro Monomer existiert (siehe Kapitel 3.5.12).

In Abbildung 4-12 ist die Titration von Hsp90 beziehungsweise der isolierten N-terminalen Domäne mit AMP-PNP dargestellt. Die erhaltenen Bindungskonstanten liegen bei 60 μM für N210 und 82 μM für Vollängen-Hsp90 und sind somit nahezu identisch. Darüberhinaus reagieren beide Proteine in einer deutlich exothermen Reaktion mit AMP-PNP, wobei die Bindungsenthalpien in ähnlicher Größenordnung liegen. Die thermodynamischen Daten (siehe auch Tabelle 4-4) deuten somit darauf hin, dass eine Beteiligung weiterer Domänen an der ATP-Bindung nicht stattfindet, da dies eine deutlichere Veränderung an den Parametern zur Folge hätte.

Um einen weiteren Einblick in die Nukleotidbindung der Fragmente zu erhalten, wurden *Stopped-flow*-Untersuchungen mit Hsp90 und N210 durchgeführt. Dazu wurde das fluoreszenzmarkierte ATP Analogon MABA-ATP verwendet. Die Bindungskinetiken wurden bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen durchgeführt, so dass es möglich war, sowohl

k_{on} -, als auch k_{off} -Werte zu erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind zusammen mit den thermodynamischen Daten in Tabelle 4-4 dargestellt.

Fragment	$K_D(\text{AMP-PNP})$ [μM]	$\Delta H(\text{AMP-PNP})$ [kcal/mol]	k_{on} [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	$K_D(\text{MABA-ATP})$ [μM]
Hsp90	82 ± 16	-9225 ± 2400	$0,13 \pm 0,06$	$2 \pm 0,6$	15
N529Cys	73 ± 14	-10280 ± 2808	n.d.	n.d.	n.d.
N210	60 ± 10	-6286 ± 1499	$0,15 \pm 0,06$	$2 \pm 0,6$	14

Tabelle 4-4: Thermodynamische und kinetische Parameter der Nukleotidbindung

Die Daten in Tabelle 4-4 zeigen, dass auch die Kinetik der Bindungsreaktion nicht durch weitere Domänen beeinflusst wird. Die Unterschiede in den K_D -Werten für MABA-ATP und für AMP-PNP lassen sich auf die unterschiedliche Struktur der Liganden zurückführen. Dies ist nachvollziehbar, da sich die Bindungsaffinität von AMP-PNP auch von der von ADP unterscheidet.

4.1.7 Magnesium- und ADP-Bindung an N210 sind kooperativ

Um zu untersuchen, ob die Bindung des Magnesiumions ebenfalls in der N-terminalen Domäne erfolgt, wurde versucht, die Kooperativität zwischen ADP- und Magnesiumbindung an dieses Fragment zu ermitteln. Dazu wurde die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz der N-terminalen Domäne verwendet, die bei Bindung von ADP erfolgt (Abbildung 4-13). Zunächst wurde die Bindekonstante für ADP unter Normalbedingungen (40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl_2) ermittelt. Die dadurch erhaltene Bindekonstante für ADP liegt bei 11 μM .

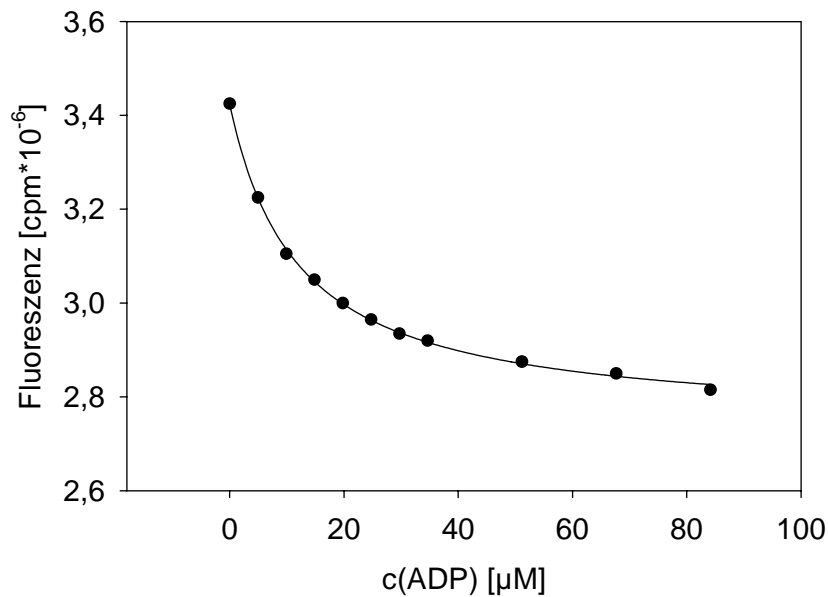


Abbildung 4-13: Fluoreszenztitration von N210 mit ADP

Die Messung wurde in 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl und 5 mM MgCl₂ bei 25 °C durchgeführt. Es wurden 2 μl Aliquots einer 6,25 mM ADP-Lösung zugegeben und die resultierende Bindungsisotherme wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben ausgewertet.

Dieser experimentelle Ansatz wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen ADP- und Magnesiumbindung zu verstehen. Dazu wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen an ADP vorgelegt. Dies führte noch nicht zu einer Veränderung der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins. Im Weiteren wurde die Bindekonstante für Magnesium durch Titration ermittelt (Abbildung 4-14A) und die Abhängigkeit dieser von der vorgelegten ADP-Konzentration bestimmt (Abbildung 4-14B).

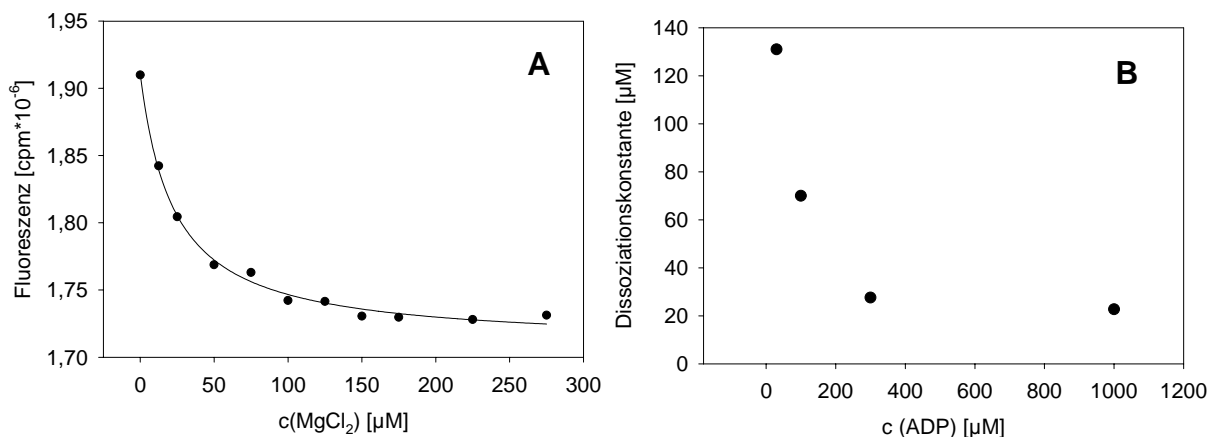


Abbildung 4-14: Einfluss der ADP-Konzentration auf die Affinität des Magnesiums

- A) Gezeigt ist die Fluoreszenztitration mit Magnesiumchlorid bei einer ADP-Konzentration von 1 mM in 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl bei 25 °C. Die Proteinkonzentration liegt bei 1 μM.
- B) Die Abhängigkeit der Bindekonstante für Magnesium zu N210 von der vorgelegten ADP-Konzentration wurde dargestellt. Die Existenz einer Abhängigkeit zeigt, dass eine kooperative Bindung zwischen Magnesium und ADP erfolgt.

Dabei ist deutlich zu beobachten, dass bei niedrigen ADP-Konzentrationen die Bindung für Magnesium sehr schwach ist. Die beobachtete Verringerung der Bindekonstante für Magnesium bei ansteigender ADP-Konzentrationen lässt den Schluss zu, dass die Bindung von ADP und Magnesium an die Domäne N210 kooperativ verläuft. Vermutlich ist dabei die Bindung so kooperativ, dass in Abwesenheit von Mg²⁺ kein ADP gebunden wird und in Abwesenheit von ADP kein Mg²⁺. Durch diese Untersuchung konnte demonstriert werden, dass die isolierte N-terminale Domäne in der Lage ist, neben ATP auch das zugehörige Magnesiumion zu binden.

4.1.8 Identifikation der substratbindenden Domäne

Sowohl die Hydrolyse von ATP, als auch die Assoziation von Hsp90 mit Partnerproteinen ist nach dem momentanen Kenntnisstand ausschließlich für die Prozessierung von Hsp90-abhängigen Substraten notwendig. Als molekulares Chaperon stellt dies vermutlich die Aufgabe von Hsp90 im zellulären Kontext dar. Die Untersuchung dieser Funktion ist jedoch dadurch erschwert, dass bisher kein natürliches Hsp90-Substrat in ausreichenden Mengen

gereinigt werden konnte. Die Identifizierung der Substratbindestelle erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des etablierten Modellsubstrats Citratsynthase.

4.1.8.1 Einfluss von Hsp90-Fragmenten auf die Aggregation der Citratsynthase

Um festzustellen, welche der gereinigten Hsp90-Konstrukte in der Lage sind, die Aggregation thermisch entfaltender Citratsynthase zu unterdrücken, wurde zunächst der Einfluss von Hsp90 selbst untersucht (Abbildung 4-15). Die Identifikation einer Substratbindestelle im molekularen Chaperon Hsp90 ist bisher nicht eindeutig erfolgt (siehe Kapitel 1.4.4)

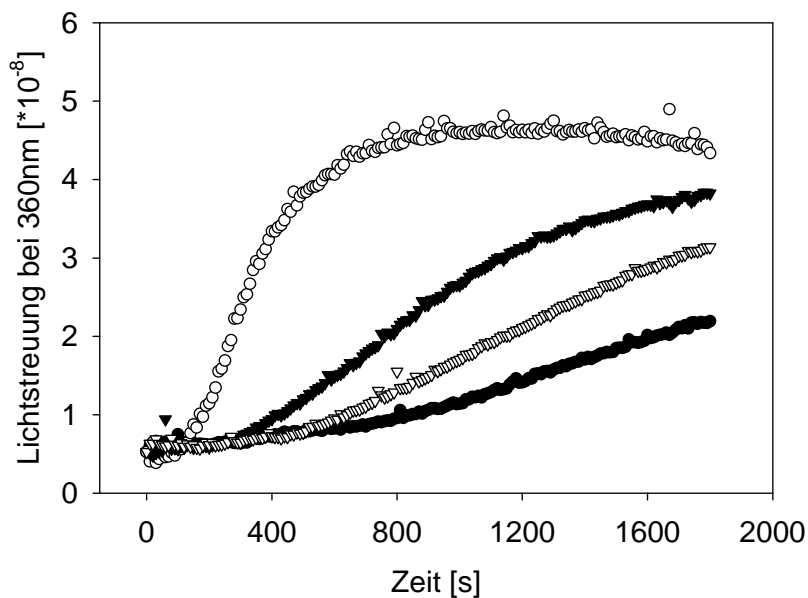


Abbildung 4-15: Einfluss von Hsp90 auf die Aggregation der Citratsynthase

Die Untersuchung des Einflusses von Hsp90 auf die Aggregation der Citratsynthase wurde bei 43 °C in 40 mM HEPES, pH 7,5, 20 mM KCl durchgeführt. Die Konzentration der Citratsynthase betrug 150 nM, die von Hsp90 entweder 0 nM (□), 300 nM (▼), 600 nM (▽) oder 1200 nM (●).

Die Unterdrückung der Aggregation ist stark abhängig von der Hsp90-Konzentration. Ab einer Konzentration von 1,2 µM ist diese als nahezu vollständig zu betrachten. Diese Konzentration wurde in der Folge gewählt, um den Einfluss der verschiedenen Hsp90-Fragmente zu untersuchen.

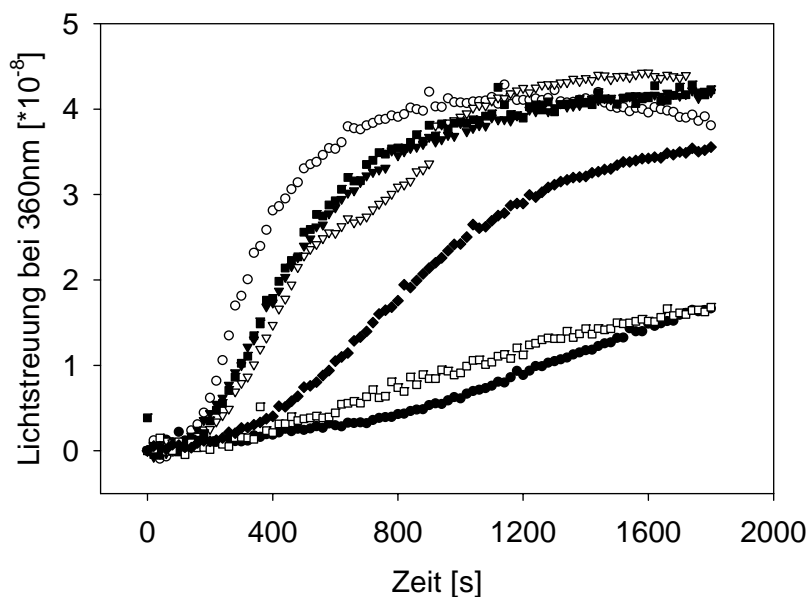


Abbildung 4-16: Einfluss der Hsp90-Fragmente auf die Aggregation der Citratsynthase

Die Aggregation der Citratsynthase erfolgte entweder spontan (○), oder in Anwesenheit von jeweils 1,2 μM Hsp90 (□), 262C (●), 527C (◆), N210 (■), N529Cys (▼) und 262-527 (∇).

Wie aus Abbildung 4-16 hervorgeht, sind besonders die C-terminalen Fragmente in der Lage, die Aggregation effektiv zu unterdrücken. Die dabei beobachteten Stöchiometrien legen nahe, dass das Fragment 262C ähnlich aktiv ist, wie Hsp90 selbst, das Fragment 527C zwar noch Aktivität aufweist, diese aber deutlich geringer ist, als die Aktivität des Volllängen-Hsp90. Diese Untersuchungen wurden auch mit weiteren Hsp90-Fragmenten durchgeführt, deren Charakterisierung aufgrund nachgewiesener Defekte bei der Faltung nicht weiter verfolgt wurde (N409, 336-588). Diese Fragmente fielen durch eine besonders hohe Aktivität bei der Stabilisierung der Citratsynthase auf.

4.1.8.2 Einfluss von Hsp90 auf die thermische Inaktivierung der Citratsynthase

Aufgrund der vielen Einzelvorgänge, die letzten Endes zur Aggregation führen, ist es nahezu unmöglich, Aggregationsprozesse quantitativ zu analysieren. Somit ist auch die Rolle, die Hsp90 bei der Unterdrückung der Aggregation spielt, durch Aggregationsuntersuchungen alleine nicht zu verstehen. Deshalb wurde im Weiteren auf einen Assay zurückgegriffen, bei dem die thermische Inaktivierung der Citratsynthase verfolgt wird (siehe Kapitel 3.7.4). Die Inaktivierung erfolgt sehr früh auf dem Weg zur Aggregation des Proteins und ist

darüberhinaus ein unimolekularer Prozess, so dass eine mathematische Beschreibung durch eine einfach exponentielle Funktion erfolgen kann. Der Einfluss, den Hsp90 auf diese Inaktivierung ausübt, wurde in Abhängigkeit von der Hsp90-Konzentration bestimmt (Abbildung 4-17).

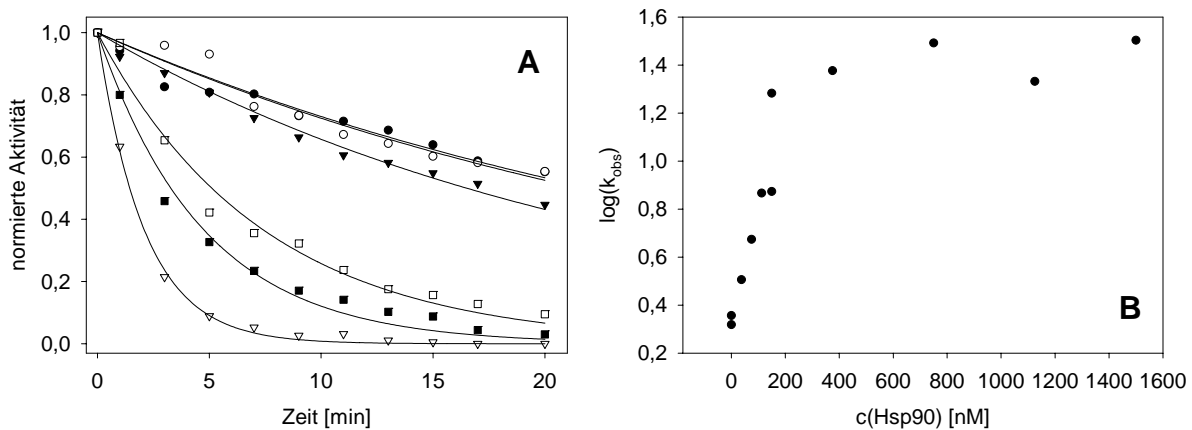


Abbildung 4-17: Einfluss von Hsp90 auf die thermische Inaktivierung der Citratsynthase

- A) Die thermische Inaktivierung wurde in 40 mM HEPES, pH 7,5 bei 43 °C verfolgt. Die Daten entsprechen dem spontanen Verlauf (▽), beziehungsweise dem Einfluss von 100 nM Hsp90 (■), 200 nM Hsp90 (□), 400 nM Hsp90 (▼), 800 nM Hsp90 (○) und 1600 nM Hsp90 (●). Die Konzentration der Citratsynthase lag bei 150 nM.
- B) Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden logarithmisch gegen die Hsp90-Konzentration aufgetragen, um den Zusammenhang zwischen der Hsp90-Konzentration und dem Einfluss auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit zu verdeutlichen.

Abbildung 4-17 zeigt, dass es durch Zugabe von Hsp90 zu einer konzentrationsabhängigen deutlicheren Verlangsamung der Inaktivierung kommt. Bei höheren Hsp90 Konzentrationen erreicht die Aktivität von Hsp90 eine Sättigung, da offensichtlich keine weitere Stabilisierung der Citratsynthase mehr möglich ist.

4.1.8.3 Einfluss der Hsp90-Fragmente auf die thermische Inaktivierung der Citratsynthase

Auch bei der thermischen Inaktivierung der Citratsynthase sollte untersucht werden, welche Hsp90-Fragmente zu einer Stabilisierung der Citratsynthase beitragen können. Dazu wurden gleiche Konzentrationen der Fragmente gewählt und ihr Einfluss auf die Inaktivierung verfolgt (Abbildung 4-18).

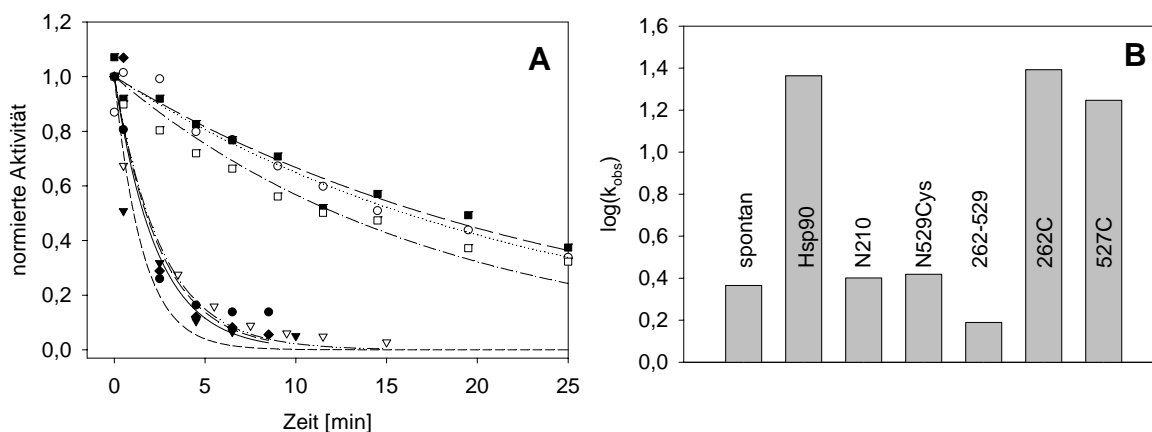


Abbildung 4-18: Einfluss der Hsp90-Fragmente auf die thermische Inaktivierung der Citratsynthase

- A) Alle Hsp90-Fragmente wurden bei gleichen Konzentrationen auf Aktivität in diesem Assay untersucht. Dazu wurde getestet, ob die spontane Inaktivierung (◆) durch die Anwesenheit von jeweils 1,2 μM der Proteine Hsp90 (■), 262C (○), 527C (□), N210 (▽), N529Cys (●) und 262-527 (▼) beeinflusst wird.
- B) Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden logarithmisch aufgetragen, um einen Vergleich zwischen den einzelnen Fragmenten und dem Volllängenprotein zu ermöglichen.

Der Einfluss, den die einzelnen Fragmente auf die thermische Inaktivierung der Citratsynthase ausüben, unterscheidet sich sehr stark. Dabei wurde deutlich, dass insbesondere die C-terminalen Fragmente die Citratsynthase stabilisieren können. In diesem Fall ist die Effizienz, mit der der isolierte C-Terminus von Hsp90 die Inaktivierung verlangsamt, nahezu genauso hoch, wie der Effekt des Volllängen-Hsp90, während N-terminale Fragmente oder die Mitteldomäne keine Aktivität zeigen. Diese prinzipielle Übereinstimmung mit den Daten für die Aggregationsuntersuchung verdeutlicht, dass zumindest im Fall des Modellsubstrates Citratsynthase die Interaktion zwischen Hsp90 und Substrat vom C-terminalen Bereich des Chaperons vermittelt wird.

4.1.9 Diskussion zur strukturellen Organisation von Hsp90

In diesem Teil der Doktorarbeit ging es zunächst darum, eine sinnvolle Fragmentierung von Hsp90 durchzuführen, die die Grundlage für weitere Fragestellungen bezüglich der ATPase-Aktivität von Hsp90 schaffen sollte (siehe Kapitel 4.2 und 4.3). Darüberhinaus sollte versucht werden, die bereits bekannten Funktionen ATP-Bindung, Dimerisierung und Substratbindung den einzelnen Fragmenten zuzuordnen und, soweit möglich, quantitativ zu analysieren. Die Fragmentierung von Hsp90 ergab, ausgehend von einem Hydrophathieplot, eine

Dreidomänenstruktur. Die einzelnen Domänen sind in *E. coli* exprimierbar und weisen eine Stabilität gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln auf, die in einem für strukturierte Proteine zu erwartenden Bereich liegt. Dieser Bereich wird im allgemeinen mit 4-60 kJ/mol angegeben (Fersht & Daggett, 2002), so dass die hier gemessenen Werte von 51 kJ/mol, 58 kJ/mol und 17 kJ/mol zumindest im Fall der ersten und zweiten Domäne sehr stabile Proteine repräsentieren. Die Untersuchung der thermischen Belastbarkeit ergab für die erste und zweite Domäne eine strukturelle Stabilität bis oberhalb 60 °C. Dabei zeigte sich, dass das C-terminale Fragment 527C am labilsten ist und bereits ab einer Temperatur von 45 °C Struktur verliert. Dennoch zeigten sich alle Fragmente als geeignet für eine funktionelle Untersuchung.

Die Nukleotidbindung an Hsp90

Die Bindung von Nukleotiden an Hsp90 war unklar, bis ESR-Messungen und die Aufklärung der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne in Komplex mit ADP eindeutig eine spezifische Bindung demonstrieren konnten (Prodromou *et al.*, 1997a; Scheibel *et al.*, 1997). Bereits zuvor war berichtet worden, dass die Bindung von ATP an Hsp90 strukturelle Veränderungen im Protein zur Folge hat (Csermely *et al.*, 1993; Grenert *et al.*, 1997). Diese strukturellen Umlagerungen führen zu einer Veränderung der Sekundärstruktur, und zu einer Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche (Csermely *et al.*, 1993). Darüberhinaus nimmt Hsp90 nach Bindung von ATP eine Konformation an, die eine Bindung des Partnerproteins p23 ermöglicht (Grenert *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 1997). Diese Änderungen sind aus der Kristallstruktur der isolierten N-terminalen Domäne nicht ersichtlich, da die Strukturen mit und ohne gebundenes Nukleotid nahezu identisch sind (Prodromou *et al.*, 1997a).

Die in dieser Arbeit erfolgte Untersuchung des Bindeverhaltens für Nukleotide ergab, dass die Bindung von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga an die N-terminale Domäne in ihrer Affinität nicht durch die Anwesenheit weiterer Domänen beeinflusst wird (Abbildung 4-12). Dies ist interessant, wurde doch durch einige Arbeiten ein starker Einfluss von ATP auf die Konformation von Hsp90 beobachtet. Neben den bereits erwähnten Studien, konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass es durch die Anwesenheit von ATP zu einer Dimerisierung der N-terminalen Bereiche von Hsp90 kommt (Maruya *et al.*, 1999). Ähnliches konnte auch bei Quervernetzungs-Experimenten beobachtet werden, bei denen AMP-PNP als Ligand verwendet wurde (Prodromou *et al.*, 2000). Diese auf die ATP-Bindung folgenden Veränderungen im Protein scheinen – basierend auf den in dieser Arbeit ermittelten Werten – energetisch so neutral zu sein, dass sie das Bindeverhalten für

Nukleotide nicht wesentlich beeinflussen. Auf Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Untersuchungen zur Bindung von MABA-ATP an Hsp90 oder Hsp90-Fragmente, lässt sich darüberhinaus sagen, dass die Bindung von Nukleotiden an Hsp90 mit der gleichen Geschwindigkeit stattfindet, wie die Bindung an die isolierte N-terminale Domäne (Tabelle 4-4). Dies zeigt, dass der Zugang zur Nukleotidbindestelle im Volllängenprotein nicht durch die zwei anderen Domänen behindert wird. In der Regel gilt, dass bei gleichen Assoziationskonstanten und bei gleicher Affinität der Bindung auch die Dissoziationskonstanten gleich groß sein müssen. Somit würde für die Bindung von AMP-PNP im Falle des hier untersuchten Hefe-Hsp90 gelten, dass eine AMP-PNP-induzierte Konformationsänderung entweder nicht stattfindet, oder so schwach ist, dass das Gleichgewicht der AMP-PNP-Bindung dadurch nicht merkbar verschoben wird. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass dies für das Hsp90 aus Vertebraten, das in der Mehrzahl der bisher durchgeführten Studien verwendet wurde (Csermely *et al.*, 1993; Grenert *et al.*, 1997; Maruya *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 1997), oder bei Verwendung von ATP als Ligand (Weikl *et al.*, 2000) nicht in dieser Form zutrifft. Eine zusätzliche C-terminale Nukleotidbindestelle, wie sie kürzlich beschrieben wurde (Garnier *et al.*, 2002; Soti *et al.*, 2002), konnte durch diese Untersuchungen nicht bestätigt werden. Diese Nukleotidbindestelle war durch spektroskopische Untersuchungen an C-terminalen Fragmenten aufgefallen und es wurde vermutet, dass diese Bindestelle im Volllängenprotein bisher durch die N-terminale maskiert war.

Eine eingehendere Untersuchung der Nukleotidbindung an die N-terminale Domäne zeigte darüber hinaus, dass auch die Bindung des Magnesiumions an dieser Domäne erfolgt. Der beobachtete Einfluss der ADP-Konzentration auf die Affinität der N-terminalen Domäne gegenüber Magnesium verdeutlicht, dass die Bindung der beiden Liganden kooperativ stattfindet (Abbildung 4-14). Ein Verständnis für das kooperative Bindeverhalten der beiden Liganden kann aus der Kristallstruktur des ADP-Komplexes der N-terminalen Domäne erhalten werden (Abbildung 4-19). Hier wird deutlich, dass sowohl die Bindung des Magnesiumions, als auch die Bindung des ADP-Moleküls unter Ausbildung direkter Interaktionen mit dem Protein erfolgt (Prodromou *et al.*, 1997a). Die hohe Kooperativität der Wechselwirkung kommt durch die direkte Interaktion zustande, die zusätzlich zwischen den beiden Liganden besteht.

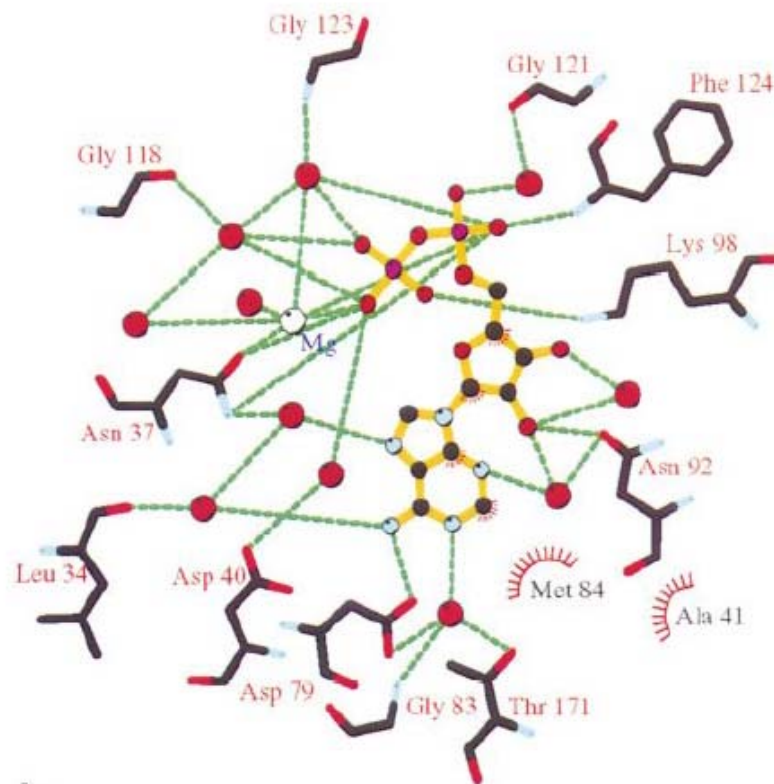


Abbildung 4-19: Bindung von ADP und Mg²⁺ an die N-terminale Domäne von Hsp90

Gezeigt ist die Bindung von ADP (gelb) und eines Magnesiumions (weiß) an die N-terminale Domäne von Hsp90. In grün dargestellt sind die spezifischen Interaktionen, die durch Wasserstoffbrücken vermittelt werden. Wassermoleküle, die sich in der Bindetasche befinden, sind rot (Prodromou *et al.*, 1997a).

Die Dimerisierung von Hsp90

In der Literatur ist Hsp90 ursprünglich als monomeres (Lanks & Kasambalides, 1979), dimeres (Jakob *et al.*, 1995b; Radanyi *et al.*, 1989) beziehungsweise oligomeres (Kelley & Schlesinger, 1982) Protein beschrieben worden. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die dimere Assoziationsform der nativen und funktionellen Form von Hsp90 entspricht, und dass die Dimerisierung von Hsp90 für die Erfüllung seiner zellulären Funktionen erforderlich ist (Minami *et al.*, 1994). Diese Studien haben auch zur Identifizierung der Dimerisierungsstelle am C-Terminus von Hsp90 geführt. Eine Deletion der 49 carboxyterminalen Aminosäuren von hHsp90 α bewirkt neben der Monomerisierung von Hsp90, auch den Verlust seiner Aktivität (Minami *et al.*, 1994). Die Art und Weise, wie es zu der beobachteten Dimerisierung kommt, ist dabei umstritten. Einige Ergebnisse legen

ein antiparalleles Dimer nahe, bei dem jeweils die C-terminale Domäne, bestehend aus 200 Aminosäuren für die Dimerisierung verwendet wird. Die Evidenzen, die für diese Orientierung sprechen, sind durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gegeben, die das Hsp90-Protein als gestrecktes Molekül zeigen (Maruya *et al.*, 1999). Daneben konnte bei humanem Hsp90 gezeigt werden, dass die erste Hälfte der C-terminalen Domäne (Aminosäuren 542-628) spezifisch mit der zweiten Hälfte (Aminosäuren 629-732) interagiert (Nemoto *et al.*, 1995), was ebenfalls auf eine antiparallele Orientierung hinweisen würde. Bei diesen Betrachtungen ist jedoch zu beachten, dass für die anderen Vertreter der Hsp90-homologen ATPasen – CheA, GyraseB und MutL – Kristallstrukturen dimerer Assoziationsformen gelöst wurden. Die Orientierung zeigt hier bei allen drei Proteinen eine parallele Assoziation der beiden Untereinheiten (Ban *et al.*, 1999; Bilwes *et al.*, 1999; Wigley *et al.*, 1991). Für Hsp90 bedarf diese Frage somit noch einer Klärung.

Weitere Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten eine Dimerisierungsstelle, die in den 170 C-terminalen Aminosäuren von Hefe-Hsp90 lokalisiert ist. Hsp90-Oligomere, wie sie teilweise auch unter nativen Bedingungen beobachtet wurden (Garnier *et al.*, 2001; Nemoto & Sato, 1998), konnten hier nicht nachgewiesen werden. Die erzielten Daten stehen somit weitgehend im Einklang mit der Literatur. Neben der Lokalisierung der Dimerisierungsstelle wurde in dieser Arbeit eine quantitative Bestimmung der Dimerisierung vorgenommen, die eine Dimerisierungskonstante von 60-80 nM für Hefe-Hsp90 ergab. Dissoziationskonstanten für Homodimere sind bisher nur für wenige Proteine bekannt, aufgrund der technischen Schwierigkeit sie zu ermitteln. Insbesondere für Fälle, bei denen die Dimerisierung durch analytische Ultrazentrifugation oder durch enzymatische Assays verfolgt werden kann, wurden solche Konstanten ermittelt (Margosiak *et al.*, 1996; Sengchanthalangsy *et al.*, 1999). Da für die Durchführung von Sedimentationsstudien in der analytischen Ultrazentrifuge mikromolare Proteinkonzentrationen erforderlich sind, liegen auch die meisten ermittelten Dimerisierungskonstanten in diesem Bereich. Für CheA, eine zu Hsp90 homologe ATPase, wurde die Dimerisierungskonstante unter Verwendung von Aktivitätstests mit 200-400 nM angegeben (Surette *et al.*, 1996). Diese ist damit etwas schwächer als die in dieser Arbeit für Hsp90 ermittelte Dimerisierungskonstanten.

Einige Untersuchungen an Hsp90 postulieren darüber hinaus die Präsenz einer zusätzlichen Dimerisierungsstelle im N-terminalen Bereich. So war bei Bindung von ATP an hHsp90 in elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Bildung einer ringförmigen Struktur zu erkennen (Maruya *et al.*, 1999). Studien unter Verwendung kovalenter chemischer Quervernetzung zeigten ebenfalls, dass unter Einfluss von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga eine

Dimerisierung der N-terminalen Domänen zu beobachten ist (Prodromou *et al.*, 2000). In dieser Arbeit ergaben sich bei der Ermittlung der Dimerisierungskonstante für Hsp90 und 262C nahezu identische Werte, so dass zumindest unter diesen Bedingungen (40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, Raumtemperatur) die N-Termini nicht wesentlich zur Dimerisierung beitragen. Die funktionelle Bedeutung der N-terminalen Dimerisierung und ihre Regulation wird in den folgenden Kapiteln ausführlicher behandelt (siehe Kapitel 4.2 und 4.3)

Die Substratbindung an Hsp90

Die in dieser Arbeit erhaltenen Fragmente von Hsp90 sollten auch dazu verwendet werden, die Bindestelle für Substrate zu identifizieren. Gerade zur Lokalisation dieser Substratbindestelle gibt es in der Literatur extrem widersprüchlich Aussagen. Erste Lokalisierungsstudien unter Verwendung des Transkriptionsfaktors MyoD führten zur Identifikation einer Bindestelle in den 194 C-terminalen Aminosäuren von Hsp90 (Shaknovich *et al.*, 1992; Shue & Kohtz, 1994). Hier erfolgte die Bindung eines nativ-ähnlichen Substrates, das unter Einfluss dieser Substratbindestelle eine Konformationsänderung durchführen konnte. Die Identifikation einer zusätzlichen N-terminalen Bindestelle erfolgte mit Hilfe der Modellsubstrate Insulin, Citratsynthase und Rhodanase (Scheibel *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1997). Dabei ergab sich bei Scheibel *et al.* eine Substratspezifität der N-terminalen Bindestelle für Peptide und nicht-strukturierte Proteine, während Young *et al.* eine C-terminale Peptidbindestelle beobachteten. Weitere Arbeiten bestätigten die Existenz einer C-terminalen Stelle, die die Aggregation von Citratsynthase unterdrücken kann und es wurden die Aminosäuren Glu651 und Glu653 von hHsp90 α identifiziert, die für die Chaperonaktivität essentiell sind (Ramsey *et al.*, 2000). Eine genauere Untersuchung der C-terminalen Domäne ergab darüber hinaus, dass ein hydrophober Bereich von Leu665 bis Leu672 für die Chaperonaktivität erforderlich ist (Yamada *et al.*, 2003). Unter Verwendung desselben Aggregationsassays wurden drei Domänen von Hsp90 als aggregationsunterdrückend identifiziert (Johnson *et al.*, 2000). Dies sind die Bereiche 1-322, 206-446 und die C-terminale Domäne 446-728. Ebenfalls in dieser Studie wurde gezeigt, dass zur Rückfaltung denaturierter Luciferase das gesamte Protein erforderlich ist.

In dieser Arbeit wurde unter Verwendung der isolierten Domänen eine C-terminale Substratbindestelle identifiziert. Diese Stelle ist sowohl in der Lage die Aggregation von Citratsynthase zu unterdrücken, als auch die Inaktivierung von Citratsynthase unter

thermischer Belastung zu verlangsamen. Die Untersuchung der Bindestelle mit Hilfe des Aggregationsassays hat sich dabei als relativ schwierig herausgestellt, da einige Hsp90-Fragmente ebenfalls in der Lage waren, die Aggregation von Citratsynthase – vermutlich durch hydrophobe Kontakte – zu verhindern. Dabei waren diese Fragmente (336-588 und N409) deutlich aktiver als Hsp90 selbst (Daten nicht gezeigt). Ähnliches wurde auch bei Verwendung des Insulinassays beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auch deshalb wurde zusätzlich der Einfluss der Hsp90-Fragmente auf die thermische Inaktivierung von Citratsynthase untersucht. Diese war bereits für das Vollängenprotein durchgeführt worden und hatte ergeben, dass Hsp90 eine Bindestelle für nativ-ähnliche Substrate besitzt (Jakob *et al.*, 1995a). Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Auch bei Jakob *et al.* (1995), war bereits aufgefallen, dass der Einfluss von Hsp90 bei steigenden Konzentrationen eine Sättigung erreicht. Eine Interpretation dieses Verhaltens kann auf vielfältige Art und Weise erfolgen. Die Beobachtung in dieser Arbeit, dass der Einfluss von Hsp90 auf die Inaktivierung der Citratsynthase durch die Anwesenheit geringer Konzentrationen KCl vollständig inhibiert wird (Daten nicht gezeigt), könnte bedeuten, dass Citratsynthase Hsp90-abhängige und Hsp90-unabhängige Entfaltungswege durchlaufen kann. Dies würde dazu führen, dass bei starker Verlangsamung der Hsp90-abhängigen Entfaltungswege durch die Anwesenheit von Hsp90, die Hsp90-unabhängigen Entfaltungswege durchlaufen werden und somit der Einfluss von Hsp90 nicht mehr feststellbar ist.

Die Vielzahl der Untersuchungen zu diesem Thema verdeutlicht, dass eine endgültige Klärung der Interaktion von Hsp90 mit Substraten vermutlich einer systematischen Untersuchung der Chaperonaktivität unter Verwendung mehrerer Substrate bedarf. Im Idealfall sollten dies „natürliche Substrate“ sein. Die Reinigung der hormonbindenden Domäne des Glucocorticoidrezeptors (McLaughlin *et al.*, 2002) zeigt, dass eine Verwendung natürlicher Substrate zur Aufklärung der Funktion von Hsp90 *in vitro* möglich ist.

4.2 Untersuchung der ATPase-Aktivität von Hsp90

4.2.1 Die ATPase-Aktivität der Hsp90-Fragmente

Hsp90 verfügt über eine schwache ATPase-Aktivität mit einem Umsatz von einem ATP alle ein bis zwei Minuten (Panaretou *et al.*, 1998; Prodromou *et al.*, 1999; Weikl *et al.*, 2000). Die Hydrolyserate der isolierten N-terminalen Domäne ist nochmals um den Faktor 20 gegenüber dem Volllängenprotein reduziert (Prodromou *et al.*, 2000; Weikl *et al.*, 2000). Dies demonstriert, dass C-terminale Bereiche während der Hydrolysereaktion eine wichtige Rolle einnehmen. Um dies zu untersuchen, wurde die ATPase-Aktivität derjenigen Konstrukte aus Abbildung 4-2 ermittelt, die die ATP-Bindestelle enthalten. Die beobachteten Aktivitäten sind in Abbildung 4-20 dargestellt.

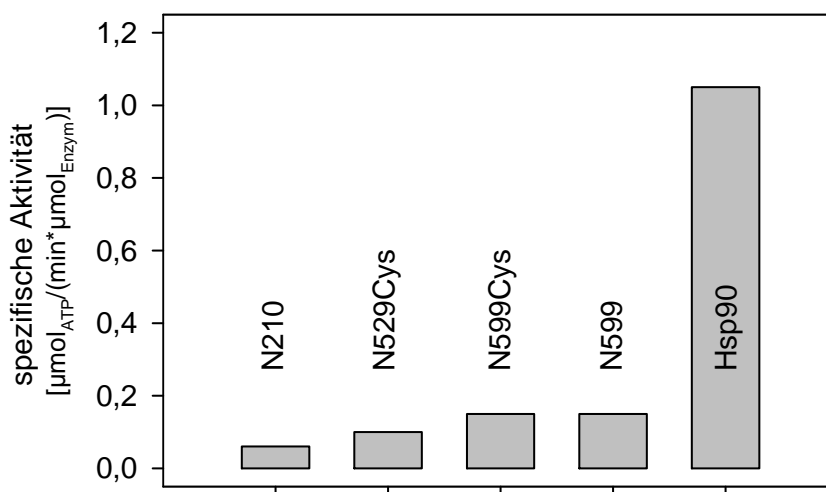


Abbildung 4-20: ATPase-Aktivität der C-terminalen Deletionsmutanten von Hsp90

Die ATPase-Aktivität wurde mit Hilfe des ATP-regenerierenden Assays ermittelt (siehe Kapitel 3.7.2). In diesem Assay wird das durch die Hydrolysereaktion entstandene ADP wieder in ATP umwandelt. Somit wird Produktinhibition vermieden. Als Puffersystem wurde 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 2 mM ATP eingesetzt. Alle Assays wurden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Hsp90 und N599Cys wurden mit einer Konzentration von 2 µM eingesetzt, die anderen Proteine mit Konzentration von 30 µM.

Die Tatsache, dass alle untersuchten Fragmente eine deutlich geringere Aktivität aufweisen als wt-Hsp90, demonstriert die Bedeutung C-terminal gelegener Bereiche für die ATPase-Aktivität von Hsp90. Interessant dabei ist die Korrelation zwischen dem

Oligomerisierungsgrad der Fragmente und ihrer ATPase-Aktivität. So konnte gezeigt werden, dass bei vergleichbaren Konzentrationen alle hier verwendeten C-terminal verkürzten Konstrukte als Monomere vorliegen (Tabelle 4-3).

4.2.2 Einfluss der Quartärstruktur auf die ATP-Hydrolyse

Um den Einfluss der Dimerisierung auf die ATPase-Aktivität zu untersuchen, wurde die Aktivität sämtlicher Fragmente, einschließlich des Volllängen-Hsp90, in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bestimmt (Abbildung 4-21).

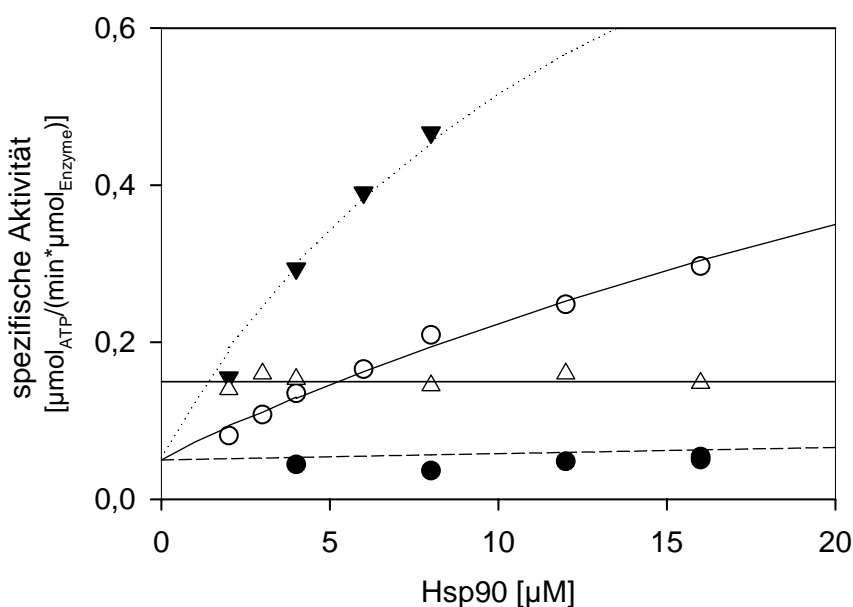


Abbildung 4-21: Abhängigkeit der ATPase-Aktivität der Fragmente von der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsabhängigkeit der ATPase-Aktivität wurde für die Fragmente N210 (●), N529Cys (○), N599Cys (▼) und N599 (Δ) sowie für wt-Hsp90 untersucht. Die Aktivität von wt-Hsp90 erwies sich dabei als konzentrationsunabhängig (Daten nicht gezeigt). Für die Datenanalyse wurde angenommen, dass die maximale Geschwindigkeit der Fragmente N529Cys und N599Cys die des Hsp90-Dimers ist ($1,2 \mu\text{M}_{\text{ATP}}/\text{min} \cdot \mu\text{M}_{\text{Hsp90}}$). Damit ergibt sich für N599Cys eine Dimerisierungskonstante von etwa $15 \mu\text{M}$, für N529Cys eine von etwa $70 \mu\text{M}$.

Die ermittelten Daten zeigen, dass die spezifischen ATPase-Aktivitäten der Fragmente N210 und N599, sowie des wt-Proteins (Daten nicht gezeigt) unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration sind. Die spezifischen ATPase-Aktivitäten der Fragmente N529Cys und N599Cys dagegen nehmen mit steigender Proteinkonzentration deutlich zu. Die ermittelten

Konzentrationsabhängigkeiten der Fragmente N529Cys und N599Cys deuten darauf hin, dass diese Fragmente in der Tat in der Lage sind zu dimerisieren, wenn auch erst bei sehr hohen Proteinkonzentrationen. Darüberhinaus ergibt sich, dass diese Dimerisierung zu einer Steigerung der ATPase-Aktivität führt, was eine Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten erfordert. Dabei ist der Effekt bei N599Cys deutlich stärker als bei N529Cys. Basierend auf diesen Daten konnte jedoch nicht ermittelt werden konnte, ob die Ursache dafür eine höhere spezifische Aktivität der dimeren Form ist, oder ob die Dimerisierung von N599Cys bereits bei niedrigeren Proteinkonzentrationen erfolgt. Die vermuteten Dimerisierungskonstanten liegen dabei jedoch so hoch, dass die zuvor durchgeführte SEC-HPLC Analyse und auch die analytische Ultrazentrifugation keine Dimerisierung zeigen konnten. Die Unabhängigkeit der wt-Hsp90 ATPase-Aktivität von der Proteinkonzentration korreliert ebenfalls mit der SEC-HPLC Analyse, da alle Konzentrationen, die zur Ermittlung der ATPase-Aktivität verwendet wurden, deutlich oberhalb der Bindekonstante liegen und Hsp90 somit immer im dimeren Zustand vorlag.

Sowohl N529Cys als auch N599Cys besitzen aufgrund der verwendeten Klonierungsstrategie eine Extension am C-Terminus, die auch einen Cysteinrest enthält. Da die spezifische ATPase-Aktivität von N599 nicht von der Proteinkonzentration abhängt, liegt nahe, dass die zuvor beschriebene Konzentrationsabhängigkeit vor allem durch die zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus von N529Cys und N599Cys verursacht wurde. Dennoch zeigen die vorherigen Daten wichtige Züge des Reaktionsmechanismus der Hsp90-ATPase auf, nämlich die Notwendigkeit einer Assoziation der beiden Untereinheiten für die Aktivität der ATPase. Da die größten Teile der C-terminalen Dimerisierungsstelle bei N529Cys und N599Cys fehlen, entspricht die beobachtete Assoziation sicherlich nicht der bereits bekannten C-terminalen Dimerisierungsstelle.

4.2.3 Bildung von Hsp90-Heterodimeren mit C-terminalen Fragmenten

Die Beobachtung, dass die ATPase-Aktivität von N529Cys und N599Cys konzentrationsabhängig ist, legt nahe, dass es während der Hydrolyse zu einer Interaktion der beiden Untereinheiten kommen muss. Es ist zu vermuten, dass im wt-Protein die C-terminale Dimerisierung eine Voraussetzung für diese Assoziation darstellt. Die Lokalisierung der beiden Interaktionsstellen in unterschiedlichen Fragmenten ermöglicht es, ATPase inaktive, C-terminale Fragmente zu verwenden, um Heterodimere mit Vollängen-Hsp90 zu bilden. Ob diese Heterodimerisierung möglich ist, wurde zunächst durch Quervernetzungs-Experimente

getestet (siehe Kapitel 3.5.9). Dazu wurden steigende Mengen 527C mit Hsp90 inkubiert und die dabei entstehenden Spezies durch Glutaraldehyd irreversibel quervernetzt. Anschließend erfolgte eine Auftrennung durch SDS-PAGE und eine Identifizierung der Coomassie Blue-gefärbten Proteinbanden (Abbildung 4-22).

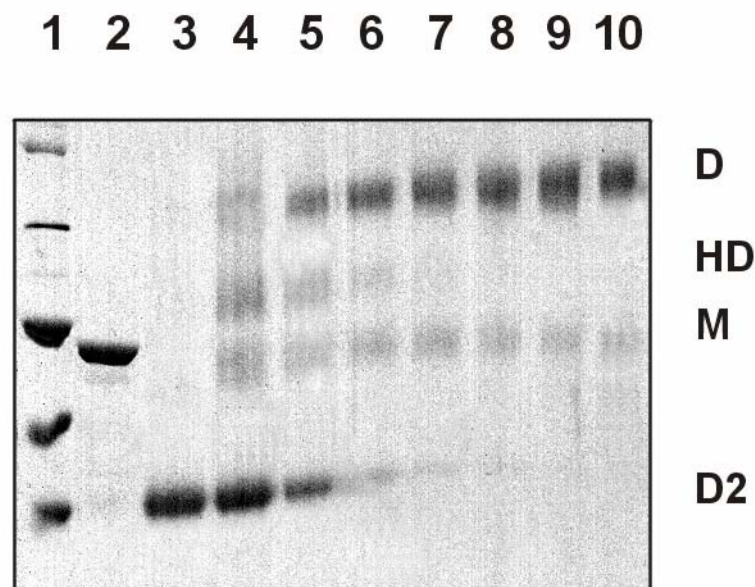


Abbildung 4-22: Quervernetzung der Heterodimere aus 527C und wt-Hsp90

Das Crosslinking wurde in 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt (zur Durchführung siehe Kapitel 3.5.9). Die Proben wurden zuvor für etwa 5 Minuten vorinkubiert. Folgende Ansätze wurden auf ein 4-12%iges Gradientengel aufgetragen. D: Hsp90-Dimer, M: Hsp90-Monomer, D2: Dimer von 527C, HD: Heterodimer aus Hsp90 und 527C

Spur 1: LMW-Standard

Spur 2: Hsp90

Spur 3: 527C alleine quervernetzt

Spur 10: Hsp90 alleine quervernetzt

Spur 4 - Spur 9: Zugabe von 527C zu Hsp90 mit den Konzentrationsverhältnissen 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4

Die quantitative Auswertung der Proteinbanden (Daten nicht gezeigt) zeigt, dass die Quervernetzung nur einen Anteil von etwa 30% Heterodimeren ergibt, obwohl ein achtfacher Überschuss an 527C verwendet wurde. Bei einer gleichaffinen Bildung von Heterodimeren und Homodimeren wäre hier eine nahezu vollständige Bildung von Heterodimeren zu erwarten. Da die chemische Quervernetzung auf die Zugänglichkeit geeigneter Lysinreste angewiesen ist, könnte dies aber auch lediglich auf eine schlechtere Quervernetzungseffizienz von 527C hinweisen, so dass eine quantitative Auswertung nicht sinnvoll erscheint. Die Möglichkeit Heterodimere zu bilden, wurde im Anschluss ausgenutzt, um den Einfluss der

Heterodimer-Bildung auf die ATPase-Aktivität zu untersuchen. Dazu wurden steigende Mengen an 527C zu konstanten Mengen Hsp90 gegeben und die ATPase-Aktivität bestimmt (Abbildung 4-23).

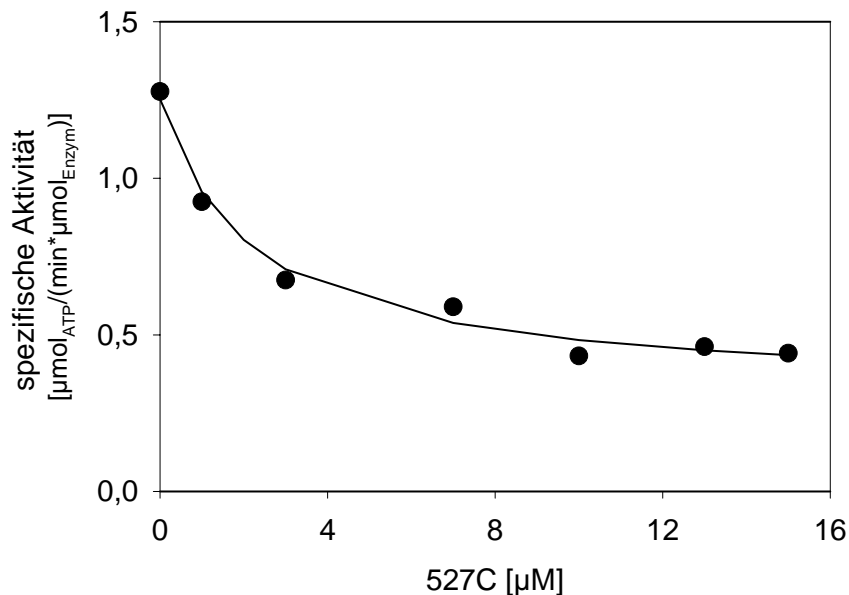


Abbildung 4-23: Einfluss von 527C auf die ATPase-Aktivität von Hsp90

Steigende Mengen an 527C wurden dem ATPase-Assay zugesetzt, wobei die Hsp90-Konzentration immer bei 4 μM lag. Die beschriebene spezifische Aktivität bezieht sich dabei auf den Anteil an wt-Hsp90. Die Auswertung erfolgte nach dem in Kapitel 3.7.2 beschriebenen statistischen Modell.

Durch die Zugabe von 527C ist eine deutliche Abnahme der ATPase-Aktivität zu beobachten. Die Aktivität des Heterodimers bestehend aus Hsp90 und 527C ist somit gegenüber dem halben Hsp90-Dimer – das Dimer besitzt zwei aktive Zentren, während das Heterodimer nur eines besitzt – um den Faktor 2,5 reduziert. Die Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Konzentration an 527C wurde nach einem statistischen Modell gefittet, das eine stochastische Verteilung der einzelnen Untereinheiten zu Homodimeren und Heterodimeren annimmt (Kapitel 3.7.2). Dabei ergab sich, dass die Heterodimerbildung genauso wahrscheinlich ist, wie die Bildung von Homodimeren ($n = 1,3$). Dies deutet darauf hin, dass die Bindungsaffinitäten in 527C ähnlich sind wie in wt-Hsp90 und die Bildung aller dimerer Konstrukte mit einem ähnlichen K_D -Wert erfolgt. Dieses Resultat zeigt, dass auch unter ATP-Sättigung die N-terminalen ATP-Bindestellen nicht wesentlich zur Stabilisierung des Dimers beitragen.

Um zu testen, ob die Mitteldomäne ausreichend ist für eine Stimulierung der ATPase-Aktivität, wurde das Experiment analog auch mit 262C durchgeführt (Abbildung 4-24).

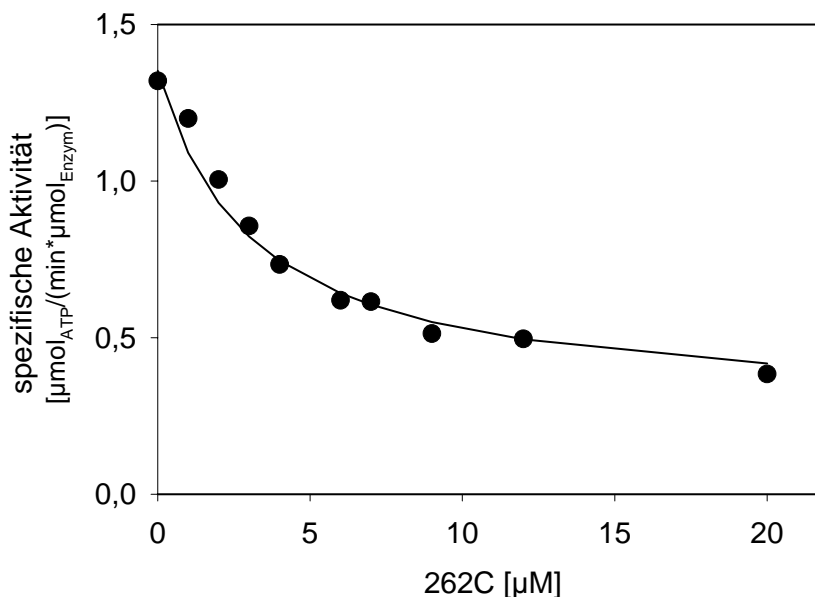


Abbildung 4-24: Einfluss von 262C auf die ATPase-Aktivität von Hsp90.

Steigende Mengen 262C wurden dem ATPase-Assay zugesetzt, wobei die Konzentration von Hsp90 immer bei 4 µM lag. Die beschriebene spezifische Aktivität bezieht sich dabei auf den Anteil an wt-Hsp90. Die Auswertung erfolgte nach dem in Material und Methoden beschriebenen statistischen Modell (siehe Kapitel 3.7.2).

Das Ergebnis dieses Experimentes war analog der Abbildung 4-23. Die Daten zeigen, dass für eine effiziente Hydrolysereaktion die Anwesenheit beider ATP-Bindestellen im dimeren Protein erforderlich ist. Eine derartige Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit kann nur dadurch erklärt werden, dass Konformationsänderungen, wie sie während des ATPase-Zyklus geschehen, die Interaktion der beiden Untereinheiten einschließen. Es wird vermutet, dass die Interaktion im N-terminalen Bereich erfolgt, da die Deletion einer ATP-Bindestelle bereits genügt, um ein inhibitorisches Protein zu generieren.

4.2.4 Bildung von Hsp90-Heterodimeren mit inaktiven Punktmutanten

Die Vermutung, dass die N-terminalen Domänen für die Assoziation verantwortlich sein könnten, wirft die Frage auf, ob die Bindung von ATP an die N-terminalen Domänen ebenfalls einen Einfluss auf die N-terminale Assoziation und die Hydrolyse zeigt. Deshalb wurden Heterodimere mit Punktmutanten von Hsp90 gebildet, die entweder kein ATP binden

können (D79N-Hsp90), oder aufgrund einer Mutation im aktiven Zentrum kein ATP hydrolysieren können (E33A-Hsp90).

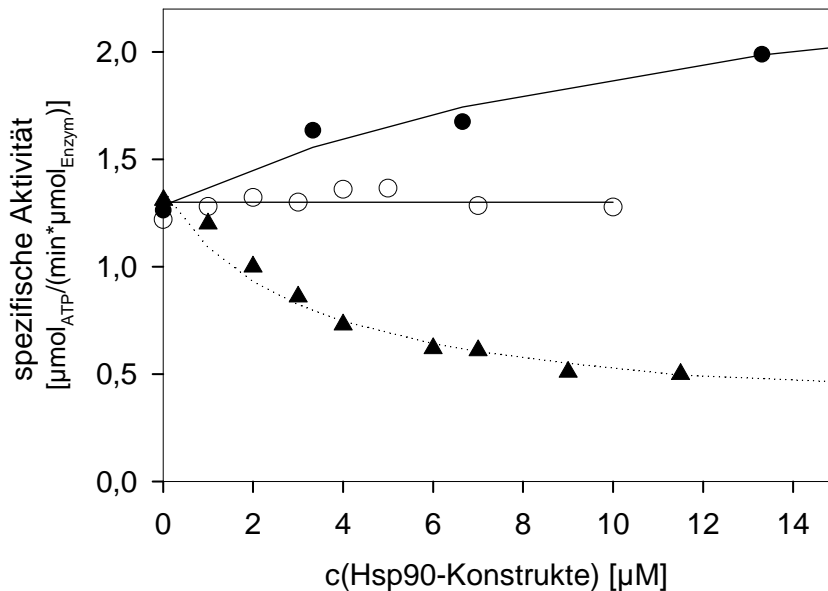


Abbildung 4-25: Einfluss von inaktiven Punktmutanten auf die ATPase-Aktivität von Hsp90

Die ATPase-inaktiven Punktmutanten D79N-Hsp90 (○) und E33A-Hsp90 (●) wurden zu Hsp90 titriert und ihr Einfluss auf die ATPase-Aktivität bestimmt. Zum Vergleich ist nochmals der Einfluss von 262C gezeigt (▲). Die wt-Hsp90-Konzentration betrug jeweils 4 µM. Die spezifische Aktivität ist dabei bezogen auf die Konzentration an wt-Hsp90.

Die Bildung der Heterodimere mit D79N-Hsp90 führt zu keiner Veränderung der ATPase-Aktivität (Abbildung 4-25). Dies legt nahe, dass die Aktivität der hydrolysierenden wt-Untereinheit durch die Mutation in ihrem Assoziationspartner nicht beeinträchtigt wird. D79N-Hsp90 kann auch ohne gebundenes ATP die andere Untereinheit stimulieren. Die Anwesenheit von E33A-Hsp90 führt dagegen sogar zu einer leichten Steigerung der ATPase-Aktivität in der wt-Untereinheit. In beiden Fällen kann somit gefolgert werden, dass die Hydrolyse von ATP zwar die Existenz zweier N-terminaler Domänen im dimeren Protein erfordert, nicht jedoch die gleichzeitige Hydrolyse oder die Bindung zweier ATP Moleküle. Dies könnte darauf hindeuten, dass bereits der Kontakt der beiden N-terminalen Domänen zu einer Stimulierung der Aktivität führt, die Hydrolysereaktion dann jedoch in jeder der Untereinheiten individuell erfolgt.

4.2.5 Untersuchung zur Dynamik der Dimerbildung bei Hsp90

Die Änderung der ATPase-Aktivität durch die Zugabe C-terminaler Fragmente und die damit verbundene Bildung von Heterodimeren ermöglicht auch die Untersuchung der Dynamik des Hsp90-Dimers. Dazu wurde während eines ATPase-Assays mit Volllängenprotein das Fragment 262C in deutlichem Überschuss zugegeben und die Kinetik der Änderung der ATPase-Aktivität beobachtet. Dies ist in Abbildung 4-26 dargestellt.

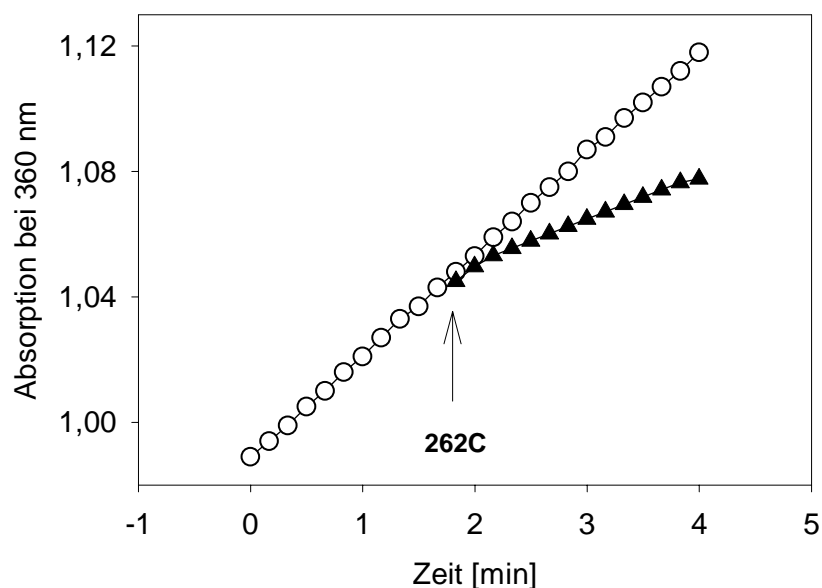


Abbildung 4-26: Bildung eines Heterodimers aus 262C und Hsp90.

Zu einem ATPase-Assay mit Hsp90 (5 μM) wurde nach zwei Minuten (Pfeil) in deutlichem Überschuss 262C (15 μM) gegeben, etwa 20 Sekunden gemischt und dann die Absorption weiter verfolgt.

Durch die Zugabe des C-terminalen Fragments kam es innerhalb kurzer Zeit zur Verringerung der ATPase-Aktivität. Die inhibitorische Wirkung des Fragmentes war nach etwa 30 Sekunden eingetreten; dies zeigt an, dass der Austausch von Untereinheiten im Hsp90-Dimer sehr dynamisch ist.

In ähnlicher Art und Weise wurde die Bildung von aktiven Heterodimeren verfolgt. Dazu wurde ein Komplex aus wt-Hsp90 und 262C vorgeformt und ein ATPase-Assay gestartet. Die durch 262C reduzierte Aktivität des wt-Hsp90 wurde durch Zugabe von D79N-Hsp90 wieder aktiviert, weil sich somit aktive Heterodimere aus D79N-Hsp90 und Hsp90 vermehrt bilden (Abbildung 4-27) konnten.

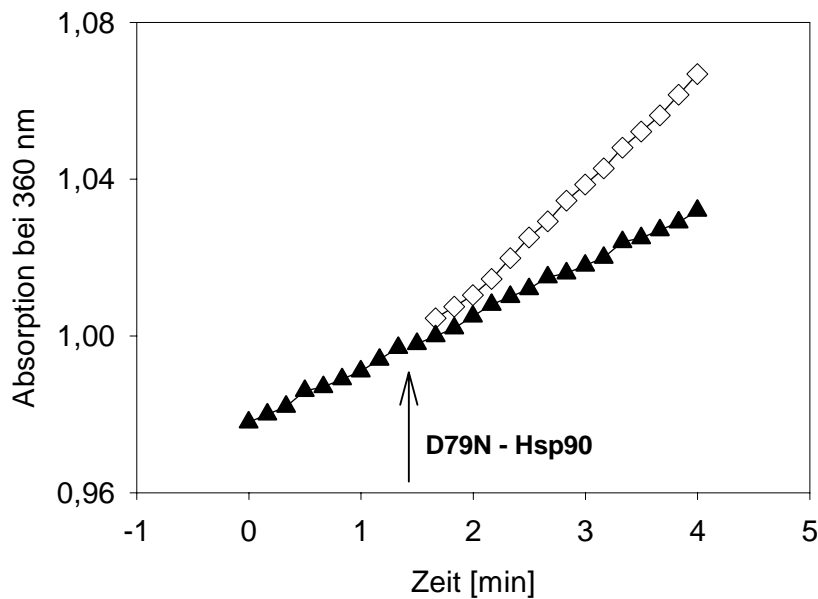


Abbildung 4-27: Bildung von Heterodimeren aus D79N-Hsp90 und Hsp90

Hsp90 und 262C wurden vorgelegt und die Kinetik nach Zugabe von D79N-Hsp90 verfolgt. Die Konzentration von Hsp90 lag bei $4 \mu\text{M}$, die von 262C bei $6 \mu\text{M}$. Es wurden $12 \mu\text{M}$ D79N-Hsp90 zugegeben. Auch hier war der Austausch von Untereinheiten bereits nach 30 Sekunden abgeschlossen.

In beiden Fällen kam es zu einem schnellen Austausch von Untereinheiten, wie an der Veränderung der ATPase-Aktivität beobachtet werden kann. Diese Untersuchung zeigt, dass das Hsp90 Dimer nicht statisch ist, sondern zu einer Assoziation und Dissoziation fähig ist, die im selben Zeitfenster wie die Hydrolyse liegt.

4.2.6 Erzeugung von Mutanten zur Klärung des Aktivierungsmechanismus

Der Mechanismus der N-terminalen Dimerisierung von Hsp90 ist völlig unklar, da keine der bisher beschriebenen Kristallstrukturen eine Dimerisierung der N-Terminalen Domänen zeigt. Von zwei Hsp90-homologen Proteinen – MutL und GyraseB – existieren jedoch Kristallstrukturen in ihren AMP-PNP komplexierten Zuständen (Ban *et al.*, 1999; Brino *et al.*, 2000). In beiden Fällen zeigen die Proteine eine Dimerisierung, die von den N-terminalen Aminosäuren vermittelt wird. Dabei werden im Fall von GyraseB der erste Strang des β -Faltblattes und die darauf folgende α -Helix zwischen den beiden N-terminalen Domänen

ausgetauscht. Bei MutL sind die Strukturveränderungen analog. Um zu testen, ob dieser Mechanismus auch auf Hsp90 übertragbar ist, wurden entsprechende Deletionsmutanten für Hsp90 erzeugt. Die Lage dieser Mutationen ist in Abbildung 4-28 verdeutlicht.

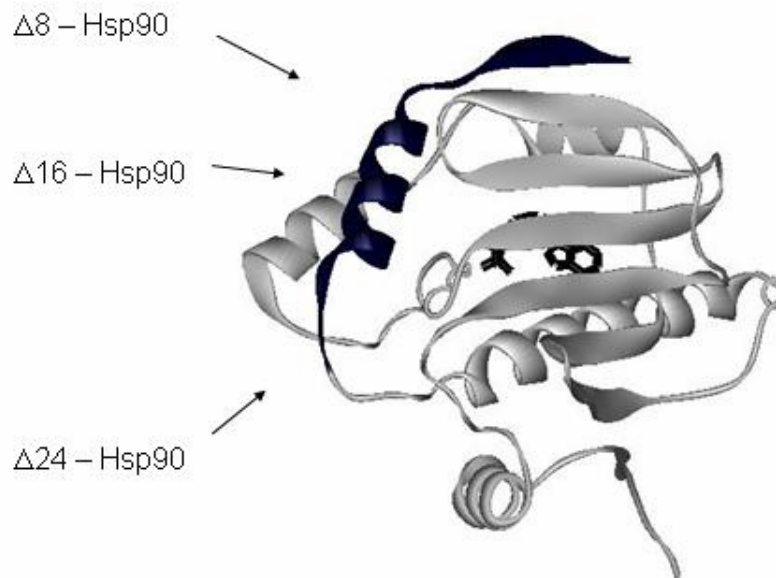


Abbildung 4-28: Lage der N-terminalen Deletionsmutanten

Die Deletionen wurden so geplant, dass bei einer Mutante nur der erste Strang des β -Faltblattes fehlt ($\Delta 8$ -Hsp90), bei einer weiteren zusätzlich die erste α -Helix ($\Delta 24$ -Hsp90) und bei der dritten Mutante die halbe α -Helix noch vorhanden ist ($\Delta 16$ -Hsp90). Die Lage der Mutationen ist in Abbildung 4-28 dargestellt. Diese Mutationen wurden durch PCR erzeugt und die entsprechenden cDNAs analog zu Hsp90 in den Vektor pET28b kloniert.

4.2.7 Untersuchung der Struktur und Stabilität der Mutanten

Zunächst galt es zu zeigen, dass die Mutationen nicht zu einer grundsätzlichen Veränderung der Struktur geführt haben. Die Untersuchungen zur Stabilität und Struktur wurde an isolierten N-terminalen Domänen durchgeführt, da die Abwesenheit des unveränderten Teils von Hsp90 eine genauere Analyse erlaubt. Dazu wurden die cDNA-Sequenzen für die Proteine $\Delta 16$ -N210 und $\Delta 24$ -N210 in den Vektor pET11a kloniert, die Proteine im

Bakterienstamm BL21 (DE3) exprimiert und nach einem drei Säulenschema gereinigt (vgl. Kapitel 3.4.8.) Die strukturelle Untersuchung der mutierten Proteine erfolgte im Vergleich zu dem Protein N210. Zur Bestimmung der Sekundärstruktur der drei Proteine wurden Fern-UV CD-Spektren aufgenommen (Abbildung 4-29).

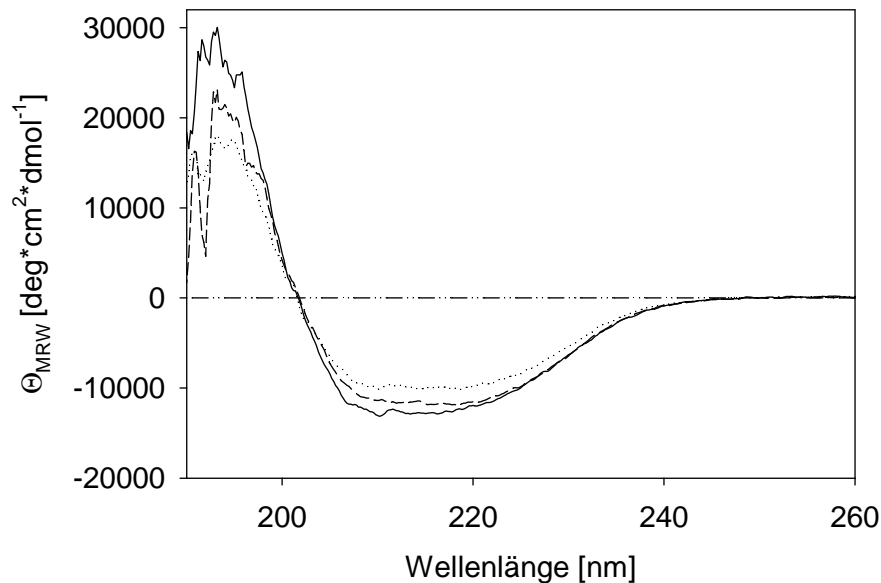


Abbildung 4-29: Fern-UV CD-Spektren der Deletionsmutanten

Die Spektren der Proteine N210 (—), Δ16-N210 (- - - -) und Δ24-N210 (.....) wurden jeweils bei einer Proteinkonzentration von 0,15 mg/ml in 40 mM Phosphat, pH 7,0 aufgenommen. Die Temperatur betrug 20 °C.

Die gemessenen Spektren demonstrieren die Ähnlichkeit der Proteine. Die beobachteten geringen Unterschiede lassen sich vermutlich dadurch erklären, dass die Sekundärstruktur durch die Mutationen leicht verändert wird.

Um zu untersuchen, ob durch die Mutationen die Stabilität der betreffenden Domäne beeinflusst wurde, wurden GdmCl-induzierte Entfaltungsübergänge durchgeführt (Abbildung 4-30). Die Analyse des Faltungszustandes erfolgte über Fluoreszenzspektroskopie.

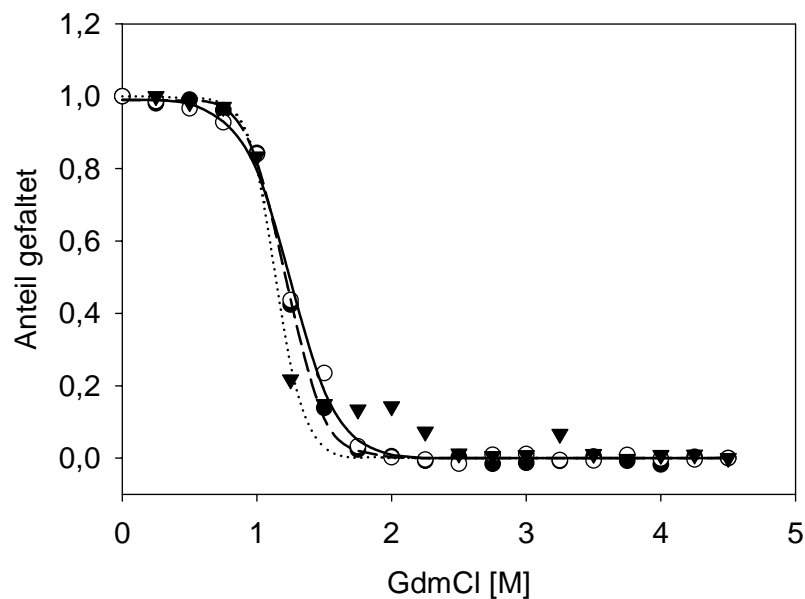


Abbildung 4-30: GdmCl-induzierte Entfaltungsübergänge der N-terminalen Deletionsmutanten

Die Entfaltung der isolierten N-terminalen Domänen N210 (○), Δ 16-N210 (▼) und Δ 24-N210 (●) wurde durch Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Die Datenanalyse erfolgte wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben. Als Puffer wurde 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl verwendet.

Die durchgeführten Entfaltungsübergänge zeigen, dass die Stabilität der drei Proteine nahezu identisch ist. Die Mutationen im N-terminalen Bereich der ATP-Bindestelle haben somit keinen negativen Einfluss auf Struktur und Stabilität der N-terminalen Domäne.

4.2.8 Einfluss der Mutationen auf die Nukleotidbindung

Auch wenn die Struktur der N-terminalen Domäne nicht durch die Deletionen beeinflusst ist, so ist es dennoch möglich, dass die ATP-Bindung durch die Veränderungen im Protein modifiziert wurde. Daher wurde im Folgenden die Nukleotidbindung untersucht. Dazu wurden zunächst, wie bereits für N210 beschrieben (Abbildung 4-13), die Bindekonstanten für ADP mit Hilfe der Änderung der intrinsischen Fluoreszenz gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-31 dargestellt.

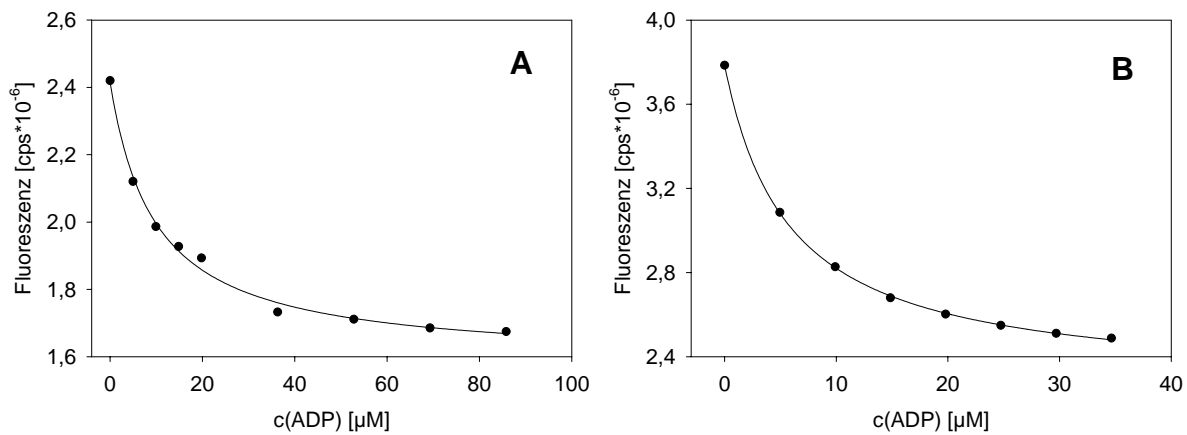


Abbildung 4-31: ADP-Bindung an die isolierten Domänen der N-terminalen Deletionsmutanten

Die Aufnahme der Titrationskurven erfolgte in 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂ bei 25 °C. Die Durchführung erfolgte, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben.

A) 1 µM Δ16-N210 wurde mit ADP titriert.

B) 1 µM Δ24-N210 wurde mit ADP titriert.

Basierend auf den Fluoreszenztitrationsen wurde für Δ16-N210 eine Bindekonstante von 10 µM ± 3 µM und für Δ24-N210 8 µM ± 2 µM bestimmt. Beide liegen somit im Bereich der zuvor ermittelten Bindekonstante für N210 (Kapitel 4.1.7) und zeigen, dass die Deletion der N-terminalen Aminosäuren die Affinität für Nukleotide nicht stark beeinflusst hat.

Um zu zeigen, dass neben der ADP-Bindung auch die Bindung von Magnesium in ähnlicher Weise wie bei N210 funktioniert, wurde für das Protein Δ24-N210 die Kooperativität zwischen Magnesiumbindung und ADP-Bindung untersucht. Diese Bindung erfordert eine Beteiligung weit entfernter Aminosäuren des Proteins (siehe Abbildung 4-19) und ist somit gut geeignet, die strukturelle Integrität der N-terminalen Domäne zu demonstrieren. Diese Untersuchung, die zuvor schon für das Protein N210 durchgeführt worden war (siehe Abbildung 4-14), führte im Falle von Δ24-N210 zu sehr ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde im Weiteren davon ausgegangen, dass die nukleotidbindenden Bereiche der N-terminalen Domäne durch die Deletion nicht beeinflusst worden sind.

Auch die Kinetik der Nukleotidbindung wurde untersucht. Unter Verwendung von MABA-ATP (siehe Kapitel 3.6.2) wurden sowohl k_{on-} , als auch k_{off-} -Werte für die Nukleotidbindung ermittelt (Ergebnisse siehe Tabelle 4-5). Diese zeigten eine leicht erhöhte Dissoziationsgeschwindigkeit gegenüber N210 (6 s⁻¹ im Vergleich zu 2,5 s⁻¹), während die Assoziationsgeschwindigkeit für die drei Proteine nahezu identisch war. Mit Hilfe dieses

Ansatzes wurden auch die gereinigten Volllängenproteine untersucht. Dies ist in Abbildung 4-32 dargestellt.

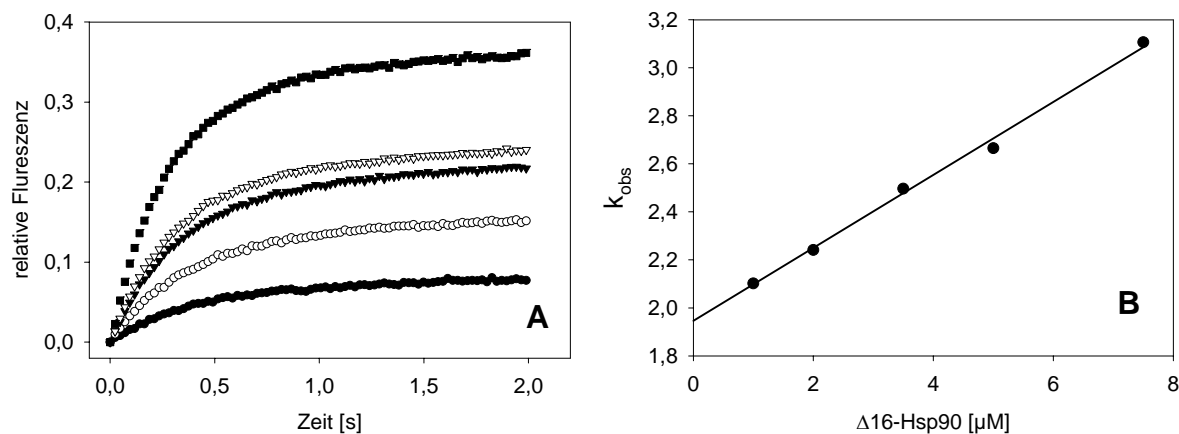


Abbildung 4-32: Kinetik der Bindung von MABA-ATP an $\Delta 16$ -Hsp90.

Um die Assoziationskonstanten für MABA-ATP zu ermitteln, wurden unterschiedliche Konzentrationen von MABA-ATP mit $\Delta 16$ -Hsp90 gemischt. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurden in der Folge verwendet, um die Assoziationskonstante zu berechnen.

- A) Darstellung der einzelnen Kinetiken. Die verwendeten Konzentrationen an MABA-ATP waren 1 μM (●), 2 μM (○), 3,5 μM (▼), 5 μM (▽) und 10 μM (■).
 B) Bestimmung von k_{off} aus den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten. Die Steigung der Geraden entspricht dabei dem Wert für k_{off} der y-Achsenabschnitt k_{on} .

Sowohl die Assoziations-, als auch die Dissoziationsgeschwindigkeiten der Proteine Hsp90, $\Delta 16$ -Hsp90 und $\Delta 24$ -Hsp90 waren vergleichbar, was darauf hindeutet, dass diese drei Proteine in der Tat eine nahezu identische Nukleotidbindung aufweisen. Für $\Delta 8$ -Hsp90 wurde jedoch eine Dissoziationskonstante ermittelt, die um den Faktor 4 langsamer war, als die der übrigen Proteine. Daraus ergab sich eine etwa um den Faktor vier festere Bindung des MABA-ATP an diese Mutante. Die zur Nukleotidbindung ermittelten Werte sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Fragment	K_D [μM] (Fluoreszenztitration)	k_{on} [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [μM] (stopped-flow)
N210	11 ± 2	$0,22 \pm 0,04$	$2,5 \pm 0,4$	11,4
$\Delta 16$ -N210	10 ± 3	$0,19 \pm 0,03$	$5,8 \pm 1,4$	30,5
$\Delta 24$ -N210	8 ± 2	$0,21 \pm 0,04$	$6,0 \pm 1,6$	28,6
Hsp90	n.d.	$0,13 \pm 0,05$	$2,0 \pm 0,6$	15
$\Delta 8$ -Hsp90	n.d.	$0,19 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,2$	3,2
$\Delta 16$ -Hsp90	n.d.	$0,24 \pm 0,07$	$2,1 \pm 0,6$	8,8
$\Delta 24$ -Hsp90	n.d.	$0,26 \pm 0,07$	$2,9 \pm 0,6$	11,1

Tabelle 4-5: Zusammenfassung der Daten zur Nukleotidbindung an die Deletionsmutanten

Die Untersuchung der Nukleotidbindungseigenschaften der N-terminalen Deletionsmutanten zeigt somit, dass alle Proteine in der Lage sind, Nukleotide mit ähnlicher Affinität zu binden. Dabei unterscheiden sich die N-terminalen Fragmente nicht stark von den Volllängenproteinen. Eventuelle Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit können somit nicht auf eine unterschiedlich starke Nukleotidbindung zurückgeführt werden, solange bei ATP-Konzentrationen gearbeitet wird, die deutlich oberhalb der Bindekonstanten liegen.

4.2.9 Einfluss der N-terminalen Deletionen auf die ATP-Hydrolyse

Der Nachweis, dass alle hier untersuchten Volllängen-Hsp90 in der Lage sind Nukleotide zu binden, deutet darauf hin, dass Defekte in der ATP-Hydrolyse eine mechanistische Ursache haben. Um dies zu untersuchen, wurden ATPase-Assays der Volllängenproteine durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4-33 dargestellt.

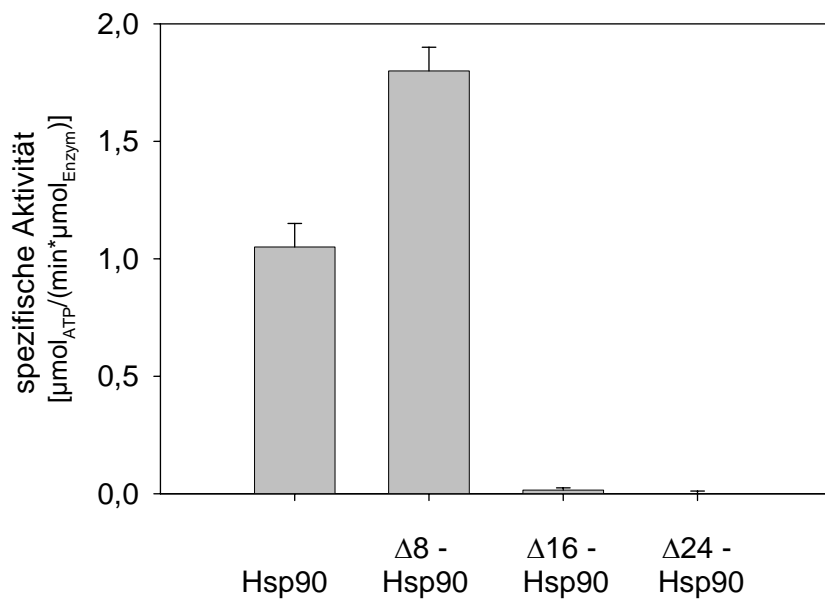


Abbildung 4-33: ATPase-Aktivitäten der Volllängenproteine der N-terminalen Deletionsmutanten

Die ATPase-Assays wurden bei Proteinkonzentrationen von 3 µM (Hsp90 und Δ8-Hsp90), sowie 30 µM (Δ16-Hsp90 und Δ24-Hsp90) durchgeführt. Als Puffer wurde 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂ verwendet. Die Messtemperatur betrug 37 °C.

Dabei wurde beobachtet, dass Δ8-Hsp90 eine etwa um den Faktor 1,5 gesteigerte Hydrolyserate aufweist, während die Deletionsmutanten Δ16-Hsp90 bzw. Δ24-Hsp90 keine ATPase-Aktivität mehr besitzen.

4.2.10 Heterodimerbildung der Deletionskonstrukte mit Hsp90

Die Beobachtung, dass die Mutanten Δ16-Hsp90 und Δ24-Hsp90 keine ATPase-Aktivität aufweisen, ermöglicht Untersuchungen von Heterodimeren analog der mit den Fragmenten 527C und 262C durchgeführten Experimente (vgl. Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24). Dazu wurden zu konstanten Konzentrationen von Hsp90 unterschiedliche Konzentrationen an Δ16-Hsp90 oder Δ24-Hsp90 gegeben und die ATPase-Aktivität von Hsp90 gemessen.

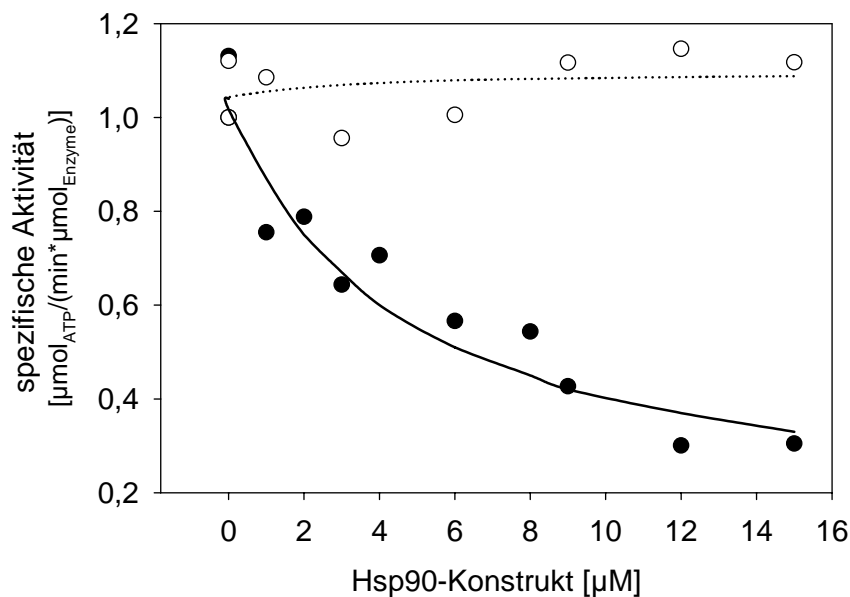


Abbildung 4-34: Einfluss von $\Delta 16$ -Hsp90 und $\Delta 24$ -Hsp90 auf die ATPase-Aktivität von Hsp90

$\Delta 16$ -Hsp90 (○) und $\Delta 24$ -Hsp90 (●) wurden in steigenden Konzentrationen eingesetzt. Die Auswertung entsprechend dem statistischen Modell (siehe 3.7.2) ergab gleiche Wahrscheinlichkeiten für die Bildung von Heterodimeren und Homodimeren im Falle von $\Delta 24$ -Hsp90. Für $\Delta 16$ -Hsp90 konnte diese Berechnung nicht durchgeführt werden, da keine Veränderung der ATPase-Aktivität erfolgt war.

Der Kurvenverlauf in Abbildung 4-34 zeigt deutlich, dass die ATPase-Aktivität mit steigenden Mengen $\Delta 24$ -Hsp90 abnimmt. Die Beobachtung, dass $\Delta 24$ -Hsp90 als Inhibitor der Hsp90-ATPase wirkt, deutet an, dass Heterodimere aus $\Delta 24$ -Hsp90 und Hsp90 gebildet werden, die keine, oder zumindest eine deutlich geringere ATPase-Aktivität aufweisen. Dies legt nahe, dass eine gegenseitige Stimulierung zwischen den beiden N-terminalen Domänen hier nicht mehr erfolgen kann. Durch die Deletion der ersten 24 Aminosäuren wurde somit ein Bereich entfernt, der an dieser Stimulierung beteiligt ist. Eine genaue Bestimmung der Ursache für dieses Verhalten kann basierend auf diesen Daten jedoch noch nicht erfolgen. Einerseits könnte die Wechselwirkung zwischen den beiden N-terminalen Domänen durch diese 24 Aminosäuren vermittelt werden, andererseits ist es jedoch auch möglich, dass aufgrund der Deletion strukturelle Änderungen in der Domäne dazu führen, dass die Stimulierung der ATPase-Aktivität nicht mehr vermittelt werden kann. Eine genauere Analyse bedarf deshalb der Kristallstruktur der Deletionsmutanten.

Die Mutante $\Delta 16$ -Hsp90 zeigt dagegen auch bei hohen Konzentrationen kaum Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit des wt-Hsp90. Somit ist diese Mutante nach wie vor in der Lage, wt-Hsp90 Untereinheiten in Heterodimeren zu aktivieren. Um zu untersuchen, ob es bei

diesen Heterodimeren auch zur Hydrolyse des an $\Delta 16$ -Hsp90 gebundenen ATPs kommt, wurden weitere Experimente mit den Punktmutanten D79N-Hsp90 und E33A-Hsp90 durchgeführt. Weder die Heterodimere $\Delta 16$ -Hsp90/E33A-Hsp90 noch $\Delta 16$ -Hsp90/D79N-Hsp90 zeigten dabei ATPase-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass bei der Bildung von Heterodimeren der Art $\Delta 16$ -Hsp90/wt-Hsp90 ein Dimer entsteht, das ATP hydrolysieren kann, diese Reaktion aber nur in der Untereinheit erfolgt, die durch das wt-Hsp90 gebildet wird. Somit liegt nahe, dass die ersten 16 Aminosäuren zwar nicht zur Dimerisierung essentiell sind, für die Aktivierung der Hydrolyse jedoch unabdingbar sind. Demzufolge dienen die ersten 16 Aminosäuren vermutlich dazu, die Hydrolyse in der eigenen Untereinheit einzuleiten.

4.2.11 Kristallisation von $\Delta 24$ -N210

Um strukturelle Details der Deletionsmutanten zu klären, wurde versucht die Proteine $\Delta 24$ -N210 und $\Delta 16$ -N210 zu kristallisieren. Während für $\Delta 16$ -N210 nach Versuchen mit Hampton-Screens (siehe 3.5.13) keine Kristalle beobachtet werden konnten, wurde für $\Delta 24$ -N210 bereits nach drei Tagen unter mehreren Bedingungen Kristallbildung gefunden (Hampton 1-6, 1-15, 1-18, 1-21, 2-26). Die weitere Optimierung der Kristallisationsbedingungen durch Feinscreening und Additivscreening führte zu folgendem Kristallisationsansatz:

2 μ l 100 mM HEPES, pH 7.5
28% PEG8000
2 μ l $\Delta 24$ -N210 (20 mg/ml)
0.4 μ l 0,1 M BaCl₂

Die Aufklärung der Kristallstruktur erfolgte durch Rainer Friedrich (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert Huber), Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried. Die Auflösung lag bei 2,4 Å. Zur Strukturlösung mit CNS (<http://cns.csb.yale.edu/v1.1/>) wurde die bekannte Struktur von N210 (1BYQ) als Patterson-Suchmodell verwendet. Die veränderten Aminosäuren wurden durch Inspektion der Elektronendichte mit MAIN (<http://www-bmb.ijs.si/doc/>) angepasst. Durch den Vergleich der Kristallstruktur von N210 mit der Struktur von $\Delta 24$ -N210 sollte es möglich sein, die Bereiche zu identifizieren, die sich durch die Mutation verändert haben.

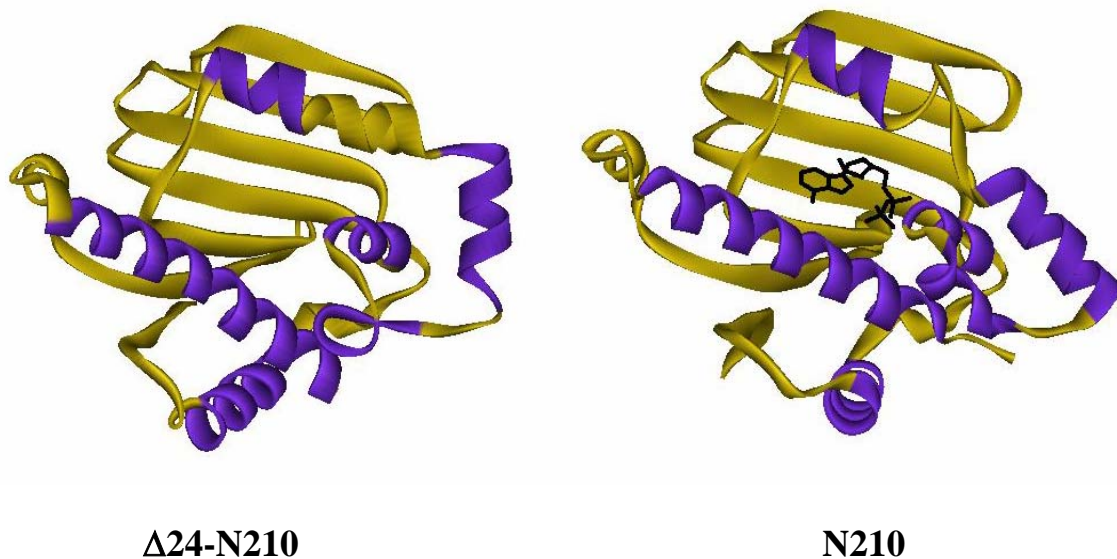


Abbildung 4-35: Vergleich der Strukturen von Δ24-N210 und N210

Die Kristallstruktur von Δ24-N210 wurde mit der bekannten Kristallstruktur der N-terminalen Domäne (Prodromou *et al.*, 1997a) verglichen (pdb accession number 1BYQ). Um zu erkennen, ob die Mutation zu weiteren Veränderungen im Protein geführt hat, wurden aus der Struktur von N210 die ersten 24 Aminosäuren entfernt. Zur Verdeutlichung ist die Färbung der Sekundärstruktur von N210 auf Δ24-N210 so übertragen, dass dieselben Aminosäuren gefärbt sind. In der Kristallstruktur von N210 ist zusätzlich das gebundene ADP sichtbar.

Der Struktur in Abbildung 4-35 ist dabei zu entnehmen, dass große Teile des Proteins übereinstimmen mit der bereits bekannten Struktur von N210. Dies gilt insbesondere für das gesamte β-Faltblatt. In diesem Bereich sind die beiden Strukturen vollständig deckungsgleich. Zwei Bereiche heben sich jedoch durch eine Veränderung der Tertiärstruktur gegenüber N210 hervor. Dabei ist besonders der ausgedehnte Loop zwischen den Aminosäuren 80 und 120 mit seinen drei α-Helices von Bedeutung. Hier erfolgte eine Umlagerung der Helices, die normalerweise in direkter Nachbarschaft zu den deletierten 24 Aminosäuren liegen. Diese Umordnung könnte, neben der eventuellen Bedeutung der ersten 24 Aminosäuren, ein Grund dafür sein, warum die Trans-Aktivierung im dimeren Protein nicht mehr erfolgen kann. Eine Betrachtung der ATP-Bindestelle der kristallisierten Deletionsmutante verdeutlicht, dass diese Umlagerung auch durch einen Kristallkontakte in der vorliegenden Packung verursacht sein könnte. In der Kristallstruktur bilden die Aminosäuren 90-110 einen Loop, der in der leeren

ATP-Bindestelle des benachbarten Proteins zu liegen kommt (Daten nicht gezeigt). Diese Anordnung entspricht sicherlich nicht dem Verhalten des Proteins in Lösung, da bisher keine Bildung eines Dimeres beobachtet werden konnte. Auch würde dieses Verhalten bedeuten, dass eine Nukleotidbindung nicht mehr möglich wäre, was ebenfalls nicht zu beobachten ist. Es wurden Versuche unternommen, die Kristallstrukturen in Gegenwart von Nukleotiden zu lösen. Diese blieben aber erfolglos. Ein Hineindiffundieren von Nukleotiden in den Kristall führte zum Zerfallen des Kristalls, was aufgrund der Kristallpackung und der Unzugänglichkeit der Nukleotidbindestelle in dieser Kristallform auch zu erwarten war.

4.2.12 $\Delta 8$ -Hsp90 bildet Homodimere mit höherer Affinität

Um die Ursachen für die gesteigerte Aktivität von $\Delta 8$ -Hsp90 gegenüber wt-Hsp90 zu untersuchen, wurden die in Kapitel 4.2.10 beschriebenen Heterodimer-Experimente auch mit $\Delta 8$ -Hsp90 durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Inhibierung von $\Delta 8$ -Hsp90 durch das Hsp90-Fragment 262C verfolgt (Abbildung 4-36).

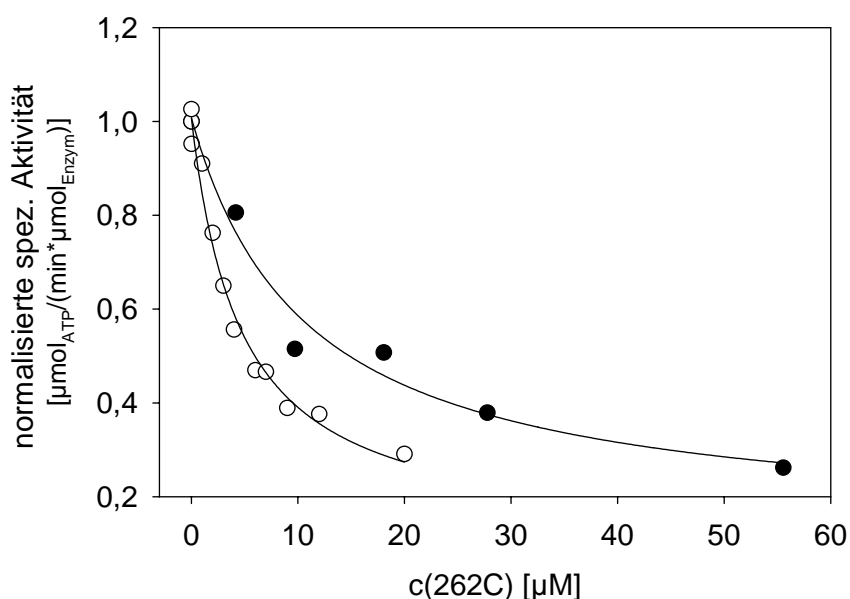


Abbildung 4-36: Vergleich der Heterodimerbildung von Hsp90 und $\Delta 8$ -Hsp90 mit 262C

Durch ATPase-Assays wurde die Bildung von Heterodimeren verfolgt. Eine inhibitorische Wirkung von 262C auf Hsp90 (○) und $\Delta 8$ -Hsp90 (●) wurde festgestellt. Eine statistische Auswertung (siehe Kapitel 3.7.2) ergab n-Werte für Hsp90 von 1,3 und für $\Delta 8$ -Hsp90 von 0,14. Dies deutet an, dass eine Heterodimerbildung mit $\Delta 8$ -Hsp90 deutlich erschwert ist.

Es ist dabei zu beobachten, dass die Inhibierung von $\Delta 8$ -Hsp90 durch 262C zwar erfolgt, der Effekt von 262C auf $\Delta 8$ -Hsp90 jedoch deutlich schwächer ist als der bei wt-Hsp90 beobachtete. Eine statistische Auswertung (siehe 3.7.2) hatte gezeigt, dass die Heterodimerbildung bei wt-Hsp90 mit ähnlicher Wahrscheinlichkeit erfolgte wie die Bildung von Homodimeren (siehe Kapitel 4.2.3). Bei der Deletionsmutante $\Delta 8$ -Hsp90 dagegen wird beobachtet, dass ein etwa siebenfacher Überschuss an 262C erforderlich ist, um die Hälfte des $\Delta 8$ -Hsp90 in Heterodimeren zu komplexieren. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von $\Delta 8$ -Hsp90-Homodimeren im Vergleich zu wt-Hsp90 Homodimeren deutlich bevorzugt ist.

Um diese These weiter zu erhärten, wurden Gelfiltrations-Experimente durchgeführt, wie sie auch in Kapitel 4.1.5 schon verwendet wurden, um das Dimerisierungsverhalten von Hsp90 zu quantifizieren. Dazu wurde die Dissoziation der Proteine Hsp90 und $\Delta 8$ -Hsp90 sowohl in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit von ATP analysiert. Die Beobachtungen sind in Abbildung 4-37 dargestellt.

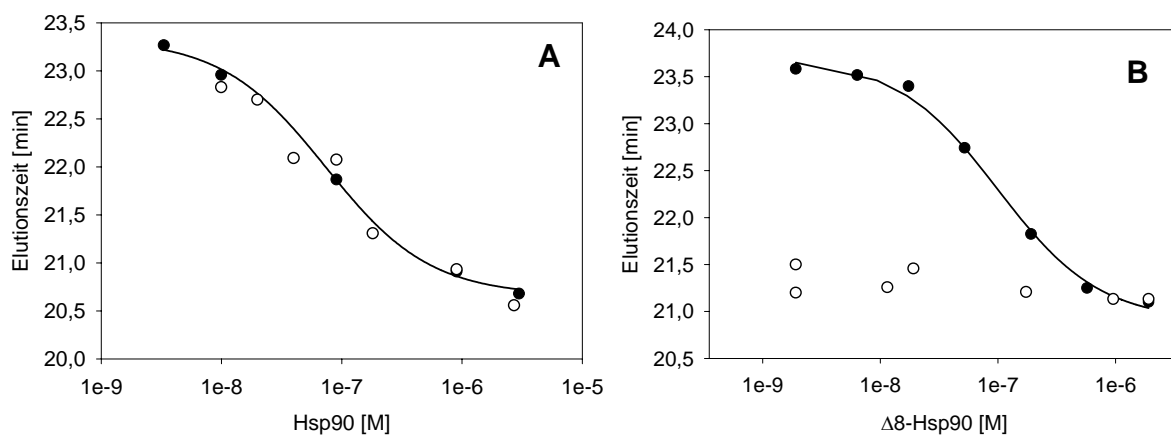


Abbildung 4-37: Monomer/Dimer-Übergänge von Hsp90 und $\Delta 8$ -Hsp90

In Anwesenheit von ATP (●) ist der Mittelpunkt der Monomer/Dimer-Übergänge für beide Proteine bei etwa gleicher Proteinkonzentration (80-100 nM) zu beobachten. Wird dem Laufpuffer zusätzlich 2 mM ATP zugesetzt (○), so ändert sich das Laufverhalten von Hsp90 nicht (A), während bei $\Delta 8$ -Hsp90 auch bei sehr geringen Konzentrationen keine Dissoziation des Dimers mehr zu beobachten ist (B). Der Laufpuffer war 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.5.10 beschrieben.

Hier zeigte sich, dass das Dimerisierungsverhalten von $\Delta 8$ -Hsp90 dem von Hsp90 entspricht, solange kein ATP vorhanden ist. Bei Anwesenheit von ATP dagegen erfolgt eine deutlich stärkere Dimerisierung. Da der einzige Unterschied zwischen den beiden Proteinen das

Fehlen von acht N-terminalen Aminosäuren ist, kann dieser Effekt nur durch eine stärkere Dimerisierung der N-terminale Domänen im Falle von $\Delta 8$ -Hsp90 verursacht worden sein. Ähnliche Untersuchungen für $\Delta 16$ -Hsp90 und $\Delta 24$ -Hsp90 ergaben, dass deren Dimerisierungsverhalten nicht durch die Anwesenheit von ATP beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt).

4.2.13 $\Delta 8$ -Hsp90 kann durch Bildung von Heterodimeren stark stimuliert werden

Auch die inaktiven Hsp90-Mutanten $\Delta 24$ -Hsp90, $\Delta 16$ -Hsp90, D79N-Hsp90 und E33A-Hsp90 wurden verwendet, um Heterodimere mit $\Delta 8$ -Hsp90 zu bilden, und deren ATPase-Aktivität zu bestimmen. Während die Untersuchungen von $\Delta 24$ -Hsp90, $\Delta 16$ -Hsp90 und D79N-Hsp90 im Wesentlichen denen von Hsp90 entsprachen (Daten nicht gezeigt), war besonders das Verhalten der Punktmutanten E33A-Hsp90 (Abbildung 4-38) interessant.

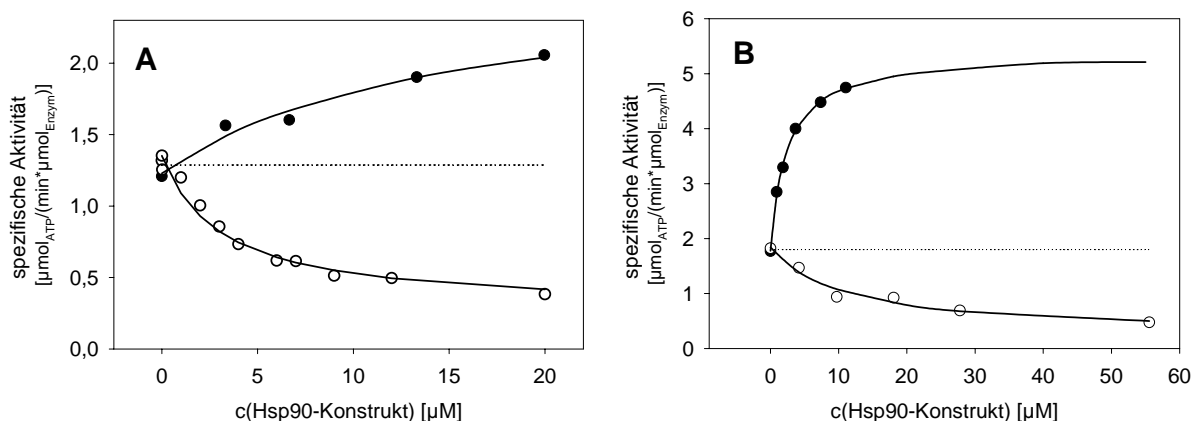


Abbildung 4-38: Vergleich der Heterodimerbildung von Hsp90 mit der von $\Delta 8$ -Hsp90

Gezeigt sind hier die Heterodimer-Experimente mit E33A-Hsp90 (●) und 262C-Hsp90 (○). Die Bildung von Heterodimeren erfolgte einerseits mit Hsp90 (A), andererseits mit $\Delta 8$ -Hsp90 (B). Dazu wurden jeweils 3 μM Hsp90 bzw. $\Delta 8$ -Hsp90 vorgelegt und bei unterschiedlichen Konzentrationen von 262C bzw. E33A-Hsp90 die ATPase-Aktivität bestimmt. Die spezifische Aktivität bezieht sich dabei auf die Konzentration des aktiven Monomers.

Wie aus Abbildung 4-38 zu entnehmen ist, führte die Punktmutante E33A-Hsp90 zu einer deutlichen Steigerung der ATPase-Aktivität von $\Delta 8$ -Hsp90. Die Punktmutante D79N-Hsp90 dagegen verhielt sich bei beiden Proteinen nahezu identisch.

4.2.14 *In vivo* Effekte der beschriebenen Fragmente

Neben der funktionellen Analyse verschiedener Hsp90-Konstrukte *in vitro*, war es auch von Interesse, die Funktionalität der Deletionsmutanten in der lebenden Hefezelle zu untersuchen. Dazu wurden die Hsp90-Fragmente $\Delta 8$ -Hsp90, $\Delta 16$ -Hsp90 und $\Delta 24$ -Hsp90 in einen Hefe-Shuttle-Vektor kloniert und der Hefestamm W303 ECU α damit transformiert (Kapitel 3.3.12). Dieser Hefestamm trägt auf einem URA-Plasmid eine Kopie des Gens HSP82, während die beiden genomischen Hsp90-Vertreter HSP82 und HSC82 durch LEU-Insertionen deletiert wurden. Nach erfolgreicher Transformation liegt neben dem bereits vorhandenen URA-Plasmid zusätzlich ein Plasmid vor, das unter der Kontrolle des Galaktose-Promotors das entsprechende Hsp90-Konstrukt exprimiert.

4.2.14.1 Überexpression der Konstrukte

Für einige Hsp90-Konstrukte und Punktmutanten war beschrieben worden, dass sich ihre Überexpression auf das Wachstum der Hefezelle toxisch auswirken würde (Obermann *et al.*, 1998; Scheibel *et al.*, 1999). Deshalb wurden alle Fragmente auf Glukose- und Galaktose-enhaltenden Platten überexprimiert und das Wachstum der Hefen mit solchen verglichen, die ein Plasmid mit wt-Hsp90 erhalten hatten. Die beiden Agarplatten sind in Abbildung 4-39 abgebildet.

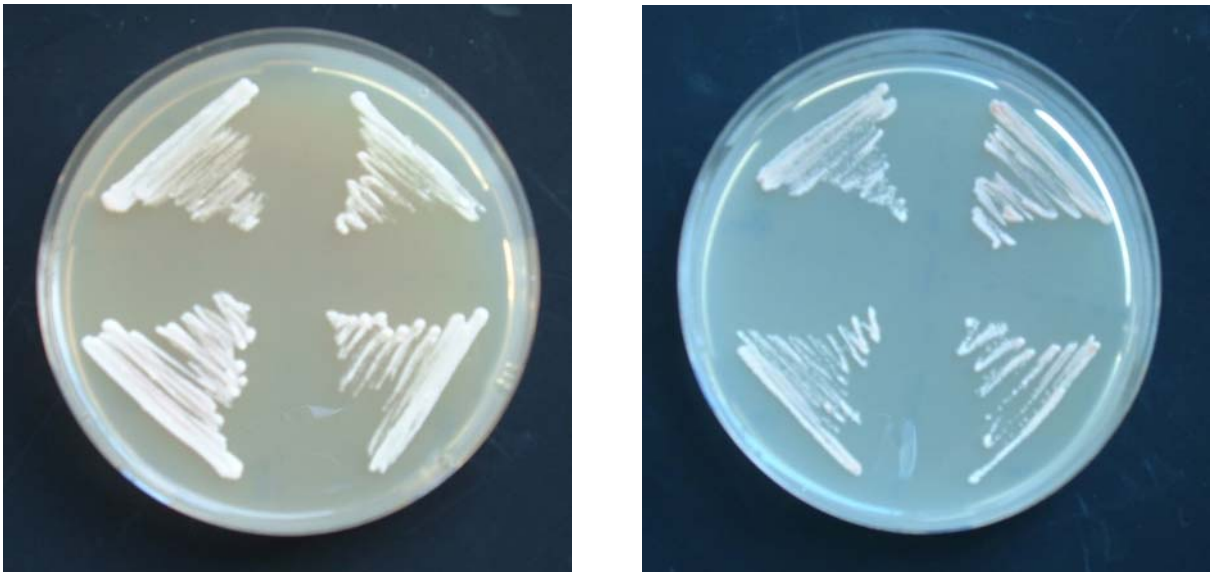


Abbildung 4-39: Test auf dominant-negativen Phänotypen der Deletionsmutanten

Die Transformanten wurden auf HIS-Glukose-CSM-Platten (links) beziehungsweise HIS-Galaktose-CSM-Platten (rechts) ausgestrichen und bei 30 °C für zwei Tage inkubiert. Gezeigt sind die Transformanten, die die Überexpressionsplasmide für Hsp90 (oben links), $\Delta 24$ -Hsp90 (oben rechts), $\Delta 16$ -Hsp90 (unten rechts) und $\Delta 8$ -Hsp90 (unten links) enthalten.

Dabei war festzustellen, dass sich keine der Deletionsmutanten unter Überexpressionsbedingungen negativ auf das Hefewachstum auswirkte, zumindest bei Verwendung des Hefestammes W303 ECU α . Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um auszuschließen, dass ein solcher Einfluss nicht unter anderen Bedingungen oder unter Verwendung eines anderen Stammes auftreten kann. Die Beobachtung, dass eine Anzucht dieser Stämme auf Galaktose-Medium erfolgen kann, ohne dass eventuell toxische Hsp90-Fragmente exprimiert werden, lässt weitere Fragestellungen zu.

4.2.14.2 Funktionalität der Konstrukte

Die entscheidende Frage bezüglich der Hsp90-Deletionskonstrukte ist jedoch, ob diese die essentielle Funktion von Hsp90 in der Hefezelle übernehmen können. Der verwendete Hefestamm W303 ECU α trägt dazu neben einer genomischen Deletion beider hefeeigener Hsp90-Vertreter das *HSP82*-Gen auf einem URA-Plasimid. 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 das auf dem anderen Plasmid kodierte Hsp90-Konstrukt die Lebensfähigkeit sicherstellen kann. Diese Analyse

wurde für die drei Deletionsmutanten durchgeführt, wobei erneut Galaktose- und Glukoseplatten verwendet wurden (Abbildung 4-40).

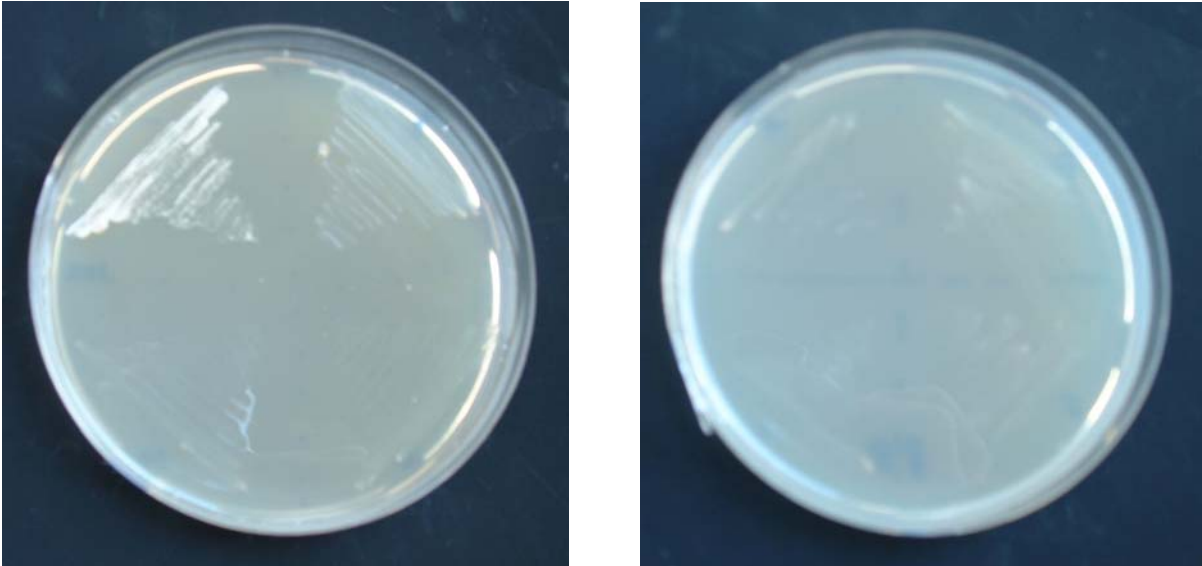


Abbildung 4-40: Test auf *in vivo* Funktionalität der Hsp90-Deletionsmutanten

Dieselben Stämme wie in wurden auf HIS-Galaktose/FOA-CSM-Platten (links) beziehungsweise HIS-Glukose/FOA-CSM-Platten (rechts) ausgestrichen und bei 30 °C für drei Tage inkubiert. Gezeigt sind die Transformanten, die die Überexpressionsplasmide für Hsp90 (oben links), $\Delta 24$ -Hsp90 (oben rechts), $\Delta 16$ -Hsp90 (unten rechts) und $\Delta 8$ -Hsp90 (unten links) enthalten.

Abbildung 4-40 zeigt, dass auf Galaktose-enthaltenden FOA-Platten nur diejenigen Hefen wachsen, die das Volllängen-Hsp90 erhalten haben, während auf Glukose-enthaltenden Platten keiner der Stämme wachsen kann, weil die Transkription der Hsp90-Konstrukte durch die Anwesenheit von Glukose reprimiert wird. Bei den N-terminalen Deletionen konnten $\Delta 24$ -Hsp90 und $\Delta 16$ -Hsp90 nicht gegen Hsp90 ausgetauscht werden. Dies war, basierend auf der Inaktivität in den ATPase-Messungen, auch zu erwarten. $\Delta 8$ -Hsp90 war erstaunlicherweise ebenfalls nicht in der Lage Hsp90 zu ersetzen. *In vitro* hatte dieses Hsp90-Konstrukt in allen Untersuchungen Ergebnisse ergeben, die mit denen von Hsp90 vergleichbar waren. Die Klärung der Ursachen dieses Ergebnisses bedarf somit weiterer Experimente, die zeigen müssen, welche der Hsp90-eigenen Eigenschaften hier betroffen sind. Möglich wären hier neben Veränderungen am zellulären Expressionslevel und der cytosolischen Proteinstabilität, die Beeinflussung der Substratumsetzung oder die veränderte Interaktion mit Partnerproteinen.

4.2.15 Diskussion zur Hydrolysereaktion bei Hsp90

Eine Hypothese zur Funktion der ATPase von Hsp90 besagt, dass die Hydrolyse von ATP dazu erforderlich ist, über Konformationsänderungen in Hsp90 die Struktur von Hsp90-Substraten so zu verändern, dass energetisch ungünstige Faltungszustände erreicht werden, die vermutlich für die Substrate alleine nicht zugänglich sind (Buchner, 1999). Dies gilt zum Beispiel für die Öffnung der Bindetasche für das hydrophobe Steroidhormon im Falle der Steroidhormrezeptoren.

Der ATPase-Zyklus von Hsp90

Die Art und Weise wie Hsp90 diese Aufgabe bewerkstelligt und wie es gelingt, die Hydrolyse von ATP an Konformationsänderungen in den Substraten zu koppeln, ist bisher nicht geklärt. Gezeigt werden konnte jedoch, dass Hsp90 selbst nach Bindung von ATP Konformationsänderungen zeigt (Csermely *et al.*, 1993; Grenert *et al.*, 1997). Diese Konformationsänderungen konnten dahingehend charakterisiert werden, dass es im Zuge der Umlagerungen zu einem Einschluss des ATP-Moleküls im Inneren des dimeren Proteins kommt (Weikl *et al.*, 2000). Durch Crosslinking-Experimente konnte demonstriert werden, dass es durch die Bindung von AMP-PNP zur Ausbildung von Kontakten zwischen den beiden N-terminalen Domänen kommt (Prodromou *et al.*, 2000). Dies war zuvor schon auf Grund elektronenmikroskopischer Aufnahmen vermutet worden, bei denen die Zugabe von ATP zu Hsp90-Dimeren die Ausbildung von O-förmigen Ringen, bestehend aus zwei Hsp90-Monomeren, zur Folge hatte (Maruya *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde ein biochemischer Ansatz zur Aufklärung des ATPase-Zyklus von Hsp90 gewählt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung der N-terminalen Domänen während der ATP-Hydrolyse ein essentieller Schritt ist. Basierend auf diesen Informationen wird ein ATPase-Zyklus postuliert, bei dem eine geordnete Folge von Konformationsänderungen durchlaufen wird, die zur Hydrolyse der ATP-Moleküle führen. Dieser ist in Abbildung 4-41 dargestellt.

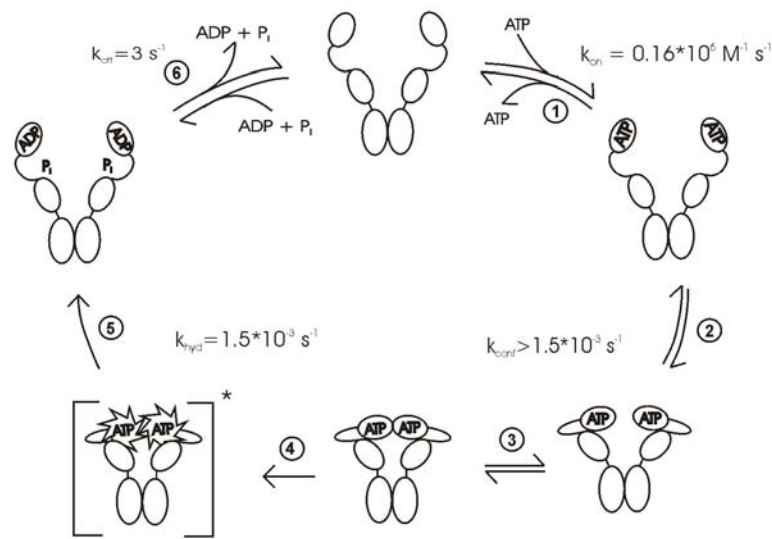


Abbildung 4-41: Postulierter ATPase-Zyklus von Hsp90

Die im Zyklus abgebildeten Geschwindigkeitskonstanten wurden von Weigl *et al.* (2000) bestimmt.

Der ATPase-Zyklus beginnt mit der Bindung von ATP, die, den kinetischen Daten (Tabelle 4-4) zufolge, sehr schnell erfolgt (Schritt 1). Es ist zu vermuten, dass die Bindung an beide N-terminalen Domänen stattfindet, da im Zuge der Bindungsstudien von Nukleotiden keine kooperativen Effekte beobachtet wurden und die thermodynamischen Parameter der Bindung nicht durch die Deletion von Bereichen beeinflusst werden, die C-terminal von der Nukleotidbindestelle liegen. Somit ist eine unabhängige Bindung zu erwarten. Die Beobachtung, dass auch die Kinetik der Bindung nicht durch die C-terminalen Domänen beeinflusst wird, legt nahe, dass Hsp90 in einem „offenen“ Zustand vorliegt.

Weigl *et al.* (2000) hatten gezeigt, dass diese Bindung an das Volllängenprotein zu einem Zustand führt, in dem ein nicht-hydrolysiertes ATP-Molekül im Inneren des Proteins eingeschlossen ist (Schritt 2). Dieser Schritt ist gefolgt von einer N-terminalen Dimerisierungsreaktion (Schritt 3), die – basierend auf den in dieser Arbeit ermittelten Daten – zu einer Aktivierung der Hydrolyseaktivität führt (Schritt 4). Nach erfolgter Aktivierung kommt es zur Hydrolyse (Schritt 5) und zur Freisetzung der gebildeten Produkte (Schritt 6).

Energetisch gesehen genügt in diesem Zyklus eine irreversible Reaktion, um zu gewährleisten, dass diese Serie von Konformationsänderungen gerichtet durchlaufen wird. Die Konformationsänderungen, die der ATP-Bindung folgen, scheinen energetisch relativ neutral zu sein. Anders wäre es nicht zu erklären, dass die Affinität von AMP-PNP an Hsp90 nahezu identisch zu der Affinität an die isolierte Domäne ist (ausführliche Diskussion in

4.1.9). Somit wird in obigem Zyklus davon ausgegangen, dass die Hydrolyse der irreversible Schritt ist und die vorangehenden Schritte durchlaufen werden müssen, um die Hydrolyse zu ermöglichen. Dies würde bedeuten, dass die Energie, die durch die ATP-Hydrolyse zugänglich wird, im Falle von Hsp90, an eine Serie von Konformationsänderungen gekoppelt wird.

Mechanistische Aspekte der N-terminalen Dimerisierung

Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für GyraseB vermutet, aber auch hier ist es noch nicht geklärt, wie diese Serie von Konformationsänderungen genutzt wird, um den DNA-Strang zu prozessieren (Kampranis *et al.*, 1999). Basierend auf den Kristallstrukturen der GyraseB ist es dagegen möglich abzuschätzen, wie die N-terminale Dimerisierung eingesetzt wird, um die Hydrolyse zu aktivieren (Brino *et al.*, 2000). Dazu werden im Falle der GyraseB die ersten 30 Aminosäuren der einen N-terminalen Domäne des Proteins genutzt, die einen Bereich zwischen den Aminosäuren 80-114 in der gegenüberliegenden Domäne binden (Abbildung 4-42). Diese Konformationsänderung scheint die Bindung von ATP in den N-terminalen Domänen zu erfordern.

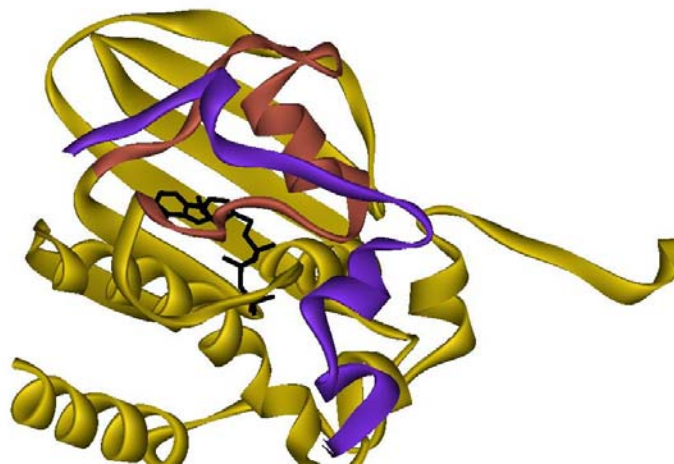


Abbildung 4-42: „Strand swapping“ am Beispiel der GyraseB.

Der hier gelb dargestellte Bereich ist homolog zu der N-terminalen Domäne von Hsp90 (Brino *et al.*, 2000). In blau dargestellt ist der Strang der zweiten Untereinheit, der im Zuge der N-terminalen Dimerisierung ausgetauscht wird. In rot dargestellt ist der Bereich der N-terminalen Domäne, der mit diesem Strang in Kontakt tritt. Die Struktur ist entnommen aus der dimeren Gyrasestruktur in Komplex mit AMP-PNP (pdb accession number 1ET1).

Ein sehr ähnlicher Mechanismus konnte in dieser Arbeit auf biochemischem Wege auch für Hsp90 postuliert werden. Basierend auf Deletionsmutanten, denen die ersten 8, 16 oder 24 Aminosäuren fehlen, konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich an der Vermittlung der Dimerisierung in erheblichem Maße beteiligt ist. Die Deletionsmutante, der die ersten 24 Aminosäuren fehlen, zeigt keine ATPase-Aktivität mehr und ist auch nicht in der Lage, die N-terminale Dimerisierung mit der gegenüberliegenden Domäne so durchzuführen, dass diese in ihrer Hydrolyseaktivität gesteigert wird (Abbildung 4-34). Die Deletionsmutante, der die ersten 16 Aminosäuren fehlen, besitzt ebenfalls keine ATPase-Aktivität mehr, kann aber die N-terminale Dimerisierung noch soweit durchführen, dass die Partnerdomäne der anderen Untereinheit eine Hydrolysereaktion einleiten kann (Abbildung 4-34). Somit ist zu vermuten, dass die ersten 16 Aminosäuren nötig sind, um die eigene Hydrolyse zu stimulieren. Diese Stimulierung scheint dann unter Verwendung der zweiten N-terminalen Domäne zu erfolgen. Die ersten acht Aminosäuren sind für keinen der oben beschriebenen Prozesse erforderlich, da die Deletionsmutante, der die ersten acht Aminosäuren fehlen, vollständig aktiv ist. Auch die leicht erhöhte Aktivität dieser Mutante ließe sich durch den „Strand swapping“-Mechanismus erklären. Die für diesen Mechanismus erforderlichen Prozesse beinhalten zunächst das Lösen von Interaktionen mit der eigenen Domäne und daran anschließend die Ausbildung von neuen Interaktionen mit der Partnerdomäne. Für den Fall, dass die ersten acht Aminosäuren stärker an die eigene Domäne gebunden sind, als nach dem Strangtausch an die Partnerdomäne, ließe sich durch deren Deletion eine gesteigerte Aktivität beobachten, da der N-terminal dimerisierte Zustand verstärkt gebildet würde.

Diese Betrachtung trifft nur zu, wenn die N-terminale Dimerisierung selbst den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Hydrolyse darstellen würde. Dafür spricht in der Tat sehr viel. So lässt sich das wt-Protein und die Deletionsmutante $\Delta 8$ -Hsp90 durch die Bildung von Heterodimeren sowohl inhibieren (durch 262C), als auch aktivieren (durch E33A-Hsp90). Eine Beeinflussung der Hydrolyserate in sowohl positiver als auch negativer Richtung zeigt, dass diese Reaktion sehr eng mit dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt verknüpft ist. Die Beschleunigung der Hydrolyserate durch E33A-Hsp90 – speziell im Falle des Heterodimers mit $\Delta 8$ -Hsp90 – ist basierend auf den hier erhaltenen Daten nicht erklärbar. Sie könnte aber bedeuten, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hydrolysereaktion bei $\Delta 8$ -Hsp90 eher die Auflösung des N-terminal dimerisierten Zustandes, als dessen Bildung ist. Darauf würde auch die erhöhte Affinität der N-terminalen Domänen

im ATP-gebundenen Zustand hindeuten, die - basierend auf den Daten in dieser Arbeit – nur bei $\Delta 8$ -Hsp90 zu beobachten ist.

Es war in dieser Arbeit nur teilweise möglich, ein strukturelles Verständnis der N-terminalen Dimerisierung zu erlangen. Die Kristallstruktur von $\Delta 24$ -N210 zeigt, dass durch diese Mutation weitere Bereiche dieser Domäne in ihrer strukturellen Integrität beeinflusst wurden (Abbildung 4-35). Die betroffenen Strukturen sind vor allem die Helices von Aminosäure 80 bis 120. Dieser Bereich ist in direkter Nachbarschaft zu den deletierten 24 Aminosäuren, so dass eine Beeinflussung eigentlich zu erwarten wäre. Dieser Bereich entspricht dem von Prodromou *et al.* (2000) postulierten „Deckel“, das verwendet wird, um die ATP-Bindestelle zu verschließen. Auch hier kann durch Vergleich mit der Gyrase-Struktur (Abbildung 4-42) oder der Struktur von MutL (Abbildung 4-43) eine Vorstellung von der Bedeutung dieses Bereiches erhalten werden. Dieser Bereich dient im N-terminal dimerisierten Zustand als Akzeptor für die Aminosäuren der anderen Domäne (Ban *et al.*, 1999).

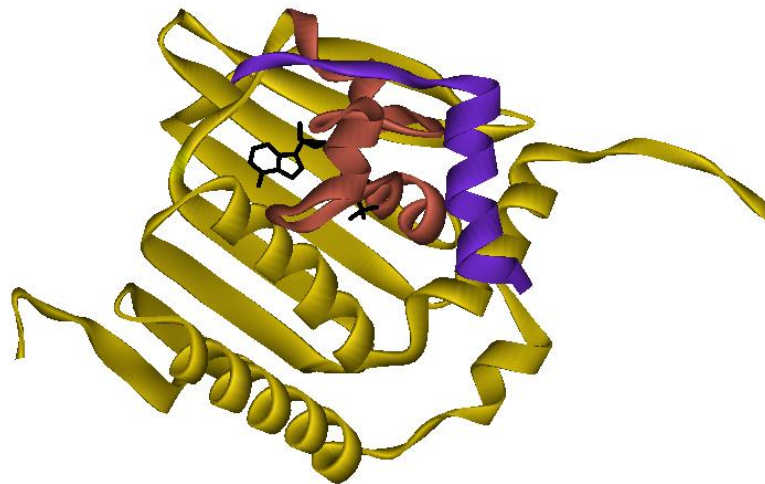


Abbildung 4-43: Bindung der N-terminalen Aminosäuren an die Partnerdomäne bei MutL

Die Kristallstruktur von MutL zeigt ebenfalls einen „strand swapping“-Mechanismus (pdb accession number 1B63). Die dabei ausgetauschten 22 Aminosäuren (blau) binden den gleichen Loopbereich wie bei GyraseB. Dieser Bereich ist wie in Abbildung 4-42 rot gefärbt. Auch hier ist die Bindung von AMP-PNP die Voraussetzung zur Bildung dieser Struktur (Ban *et al.*, 1999).

Somit kann basierend auf der Information, dass dieser Bereich bei $\Delta 24$ -N210 eventuell fehlgeordnet ist, erwartet werden, dass die N-terminal Dimerisierung durch diese Mutation

gestört ist. Genauere Aussagen bedürfen jedoch der Kristallstruktur von $\Delta 24$ -N210 in Komplex mit Nukleotid oder der Struktur von $\Delta 16$ -N210, um einen direkten Vergleich dieser unterschiedlich aktiven Spezies zu ermöglichen. Ähnliche Aussagen wären außerdem durch eine gezielte Mutagenese dieses Bereiches zu erbringen oder durch die Kristallisation eines N-terminal dimerisierten Fragmentes.

4.3 Die Interaktion der Cochaperone Sti1, Cpr6 und Sba1 mit Hsp90

Für Hefe-Hsp90 wurde *in vitro* eine Interaktion mit den Proteinen Sti1, Cpr6 und Sba1 gezeigt (Prodromou *et al.*, 1999; Prodromou *et al.*, 2000). Diese Proteine entsprechen den humanen Proteinen Hop, Cyp40 und p23. Für die ersten beiden wurde demonstriert, dass die Interaktion über eine C-terminale Bindestelle von Hsp90 erfolgt, die von den letzten Aminosäuren des Proteins (MEEVD) gebildet wird (Brinker *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1998; Scheufler *et al.*, 2000). Im Weiteren wurde festgestellt, dass Sti1 ein Inhibitor der Hsp90 ATPase ist (Prodromou *et al.*, 1999). Basierend auf den bisherigen Ergebnissen, sollte die Interaktion dieser Proteine mit Hsp90 näher untersucht werden.

4.3.1 Die Bindung von Sti1 und Cpr6 an Hsp90 ist hochaffin und dynamisch

Für eine Analyse des Bindeverhaltens von Sti1 und Cpr6 wurden zunächst die beiden Proteine gereinigt. Die Expression erfolgte von den Vektoren pRSET-Sti1 und pRSET-Cpr6 unter Kontrolle des T7-Promotors im Bakterienstamm BL21 (DE3) cop+. Die Reinigung fand zunächst über den N-terminalen His₆-Tag statt und daran anschließend über Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationschromatographie (siehe Kapitel 3.4). Um die Bindung der Proteine an Hsp90 zu analysieren, wurde *Surface Plasmon Resonance Spektroskopie* verwendet (siehe Kapitel 3.6.4). Dabei wurde Hsp90 kovalent über Lysinreste an einen CM5-Chip gekoppelt und anschließend die Bindung der beiden Partnerproteine in Abhängigkeit von ihren Konzentrationen detektiert. Die resultierenden Bindungsisothermen sind in Abbildung 4-44 dargestellt.

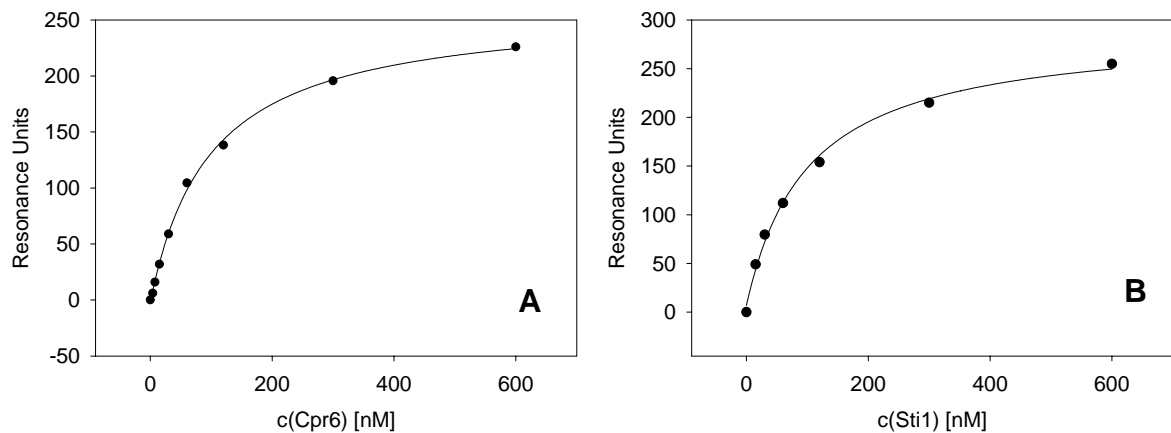


Abbildung 4-44: Direkte Bindung von Cpr6 und Sti1 an einen Hsp90-Chip

Die direkte Interaktion von Cpr6 (A) und Sti1 (B) an einen Hsp90-Chip wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen an Sti1 oder Cpr6 detektiert. Die Plateauwerte der einzelnen Injektionen wurden aufgetragen, da hier die Bindung an die Chipoberfläche im Gleichgewichtszustand ist. Aufgrund der hohen Dynamik der Interaktion war dies relativ schnell erreicht. Alle Reaktionen fanden bei 25 °C statt.

Als Ergebnis wurden Bindungskonstanten von 100 nM für die Bildung des Sti1•Hsp90-Komplexes und 98 nM für die Bildung des Cpr6•Hsp90-Komplexes erhalten. Die direkte Bindung von Proteinen an Chipoberflächen ist jedoch von einigen Artefakten beeinflusst. Diese umfassen die unspezifische Interaktion des Bindepartners an die Chipmatrix oder Kopplungseffekte, die darauf beruhen, dass nicht alle Proteine in gleicher Orientierung an die Chipoberfläche gekoppelt sind. Deshalb wurde ein Ansatz entwickelt, um die Bindung indirekt messen zu können (siehe Kapitel 3.6.4). Dazu wurden Sti1 oder Cpr6 in konstanten Konzentrationen mit Hsp90 vorinkubiert. Diese Messungen wurden für unterschiedliche Hsp90-Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 4-45).

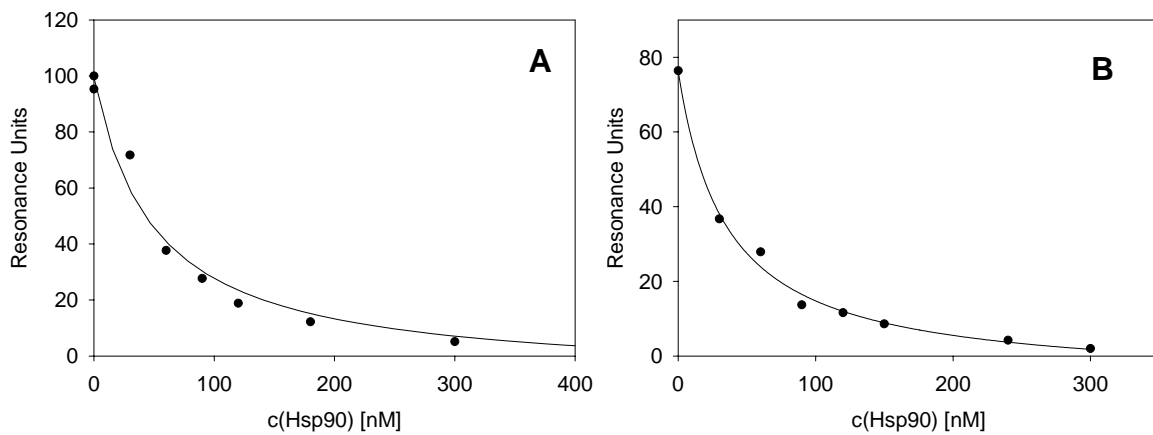


Abbildung 4-45: Indirekte Titration von Sti1 und Cpr6 mit Hsp90

Für die indirekte Titration wurden jeweils 30 nM Sti1 (A) beziehungsweise Cpr6 (B) verwendet. Unterschiedliche Konzentrationen an Hsp90 wurden zugesetzt und dadurch das Signal unterdrückt. Die Auswertung der Bindekurven erfolgte wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben.

Die ermittelten Bindekonstanten – 41 nM für die Bindung von Cpr6 und 40 nM für die Bindung von Sti1 – liegen in derselben Größenordnung, wie die Bindekonstanten, die durch direkte Titration erhalten wurden. Die Beobachtung, dass durch die Zugabe von größeren Konzentrationen Hsp90 die Bindung an die Chipoberfläche vollständig unterdrückt werden konnte, zeigt, dass die beobachtete Wechselwirkung spezifisch ist. Die erhaltenen Werte demonstrieren, dass beide Proteine hochaffin mit Hsp90 interagieren können und bestätigen dadurch die Ergebnisse von Prodromou *et al.* (1999).

Zusätzlich zu der Affinität der Interaktion liefert die Messung in Echtzeit, wie sie im SPR-Instrument stattfindet, eine Information über die Dynamik der Wechselwirkung. Einige dieser Kinetiken sind in Abbildung 4-46 gezeigt.

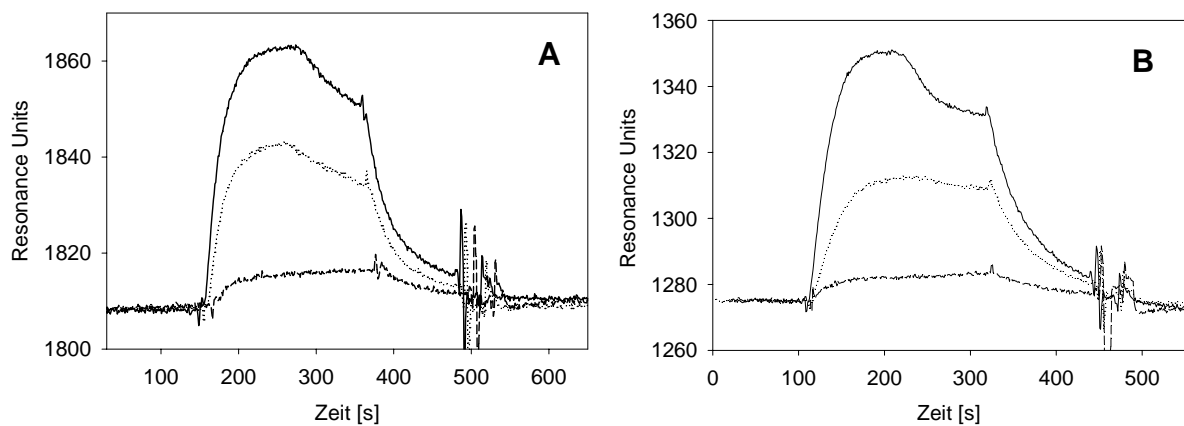


Abbildung 4-46: Kinetiken der Interaktion von Cpr6 und Sti1 mit Hsp90

Die Bindung von Cpr6 (A) und Sti1 (B) wurde durch SPR-Spektroskopie in Echtzeit beobachtet. Die obere Kurve entspricht jeweils der Bindung von 30 nM Partnerprotein (—). Unterschiedliche Mengen Hsp90 wurden zu 30 nM Cpr6 bzw. Sti1 gegeben und die Wechselwirkung mit der Hsp90-Chipoberfläche dadurch verringert. Die mittlere Kurve entspricht der Zugabe von 30 nM Hsp90 (---) und die untere der Zugabe von 300 nM Hsp90 (- - - - -). Als Laufpuffer wurde 40 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM KCl verwendet. Die Laufgeschwindigkeit lag bei 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, das Injektionsvolumen bei 35 μl . Das Abfallen des Plateauwertes nach etwa der Hälfte der Injektionszeit ist auf Diffusionsprozesse in der Probenschleife zurückzuführen.

Die Aufnahme von Bindungskurven in Echtzeit erlaubt einen Einblick in die Geschwindigkeit der Assoziations- und Dissoziationsprozesse. Die hierbei beobachteten Assoziations- und Dissoziationsphasen zeigen, dass die Wechselwirkung von Hsp90 mit den Partnerproteinen Sti1 und Cpr6 sehr dynamisch ist, da die Bindung innerhalb weniger Sekunden und die Dissoziation innerhalb weniger Minuten erfolgt. Die Dynamik der Hsp90-Partnerprotein-Wechselwirkung erwies sich während der Untersuchungen als in hohem Maße abhängig von der Salzkonzentration, wobei bei hohen Ionenstärken sehr viel schnellere Assoziations- und vor allem Dissoziationsprozesse beobachtet wurden. Die Affinität der Wechselwirkung ließ bei beiden Proteinen mit steigender Ionenstärke nach (Daten nicht gezeigt)

4.3.2 Die Quartärstruktur des Hsp90•Sti1-Komplexes.

Die Bindung von Sti1 an Hsp90 wurde durch isothermische Titrationskalorimetrie (ITC) mit einer Bindekonstante von 240 nM beschrieben und die Stöchiometrie der Komplexbildung wurde mit zwei Molekülen Sti1 an ein Hsp90-Dimer angegeben (Prodromou *et al.*, 1999). Um dies zu verifizieren, wurde ein ITC-Experiment durchgeführt. Dazu wurde Hsp90 in der Zelle vorgelegt und Sti1 als Ligand zutitriert (Abbildung 4-47).

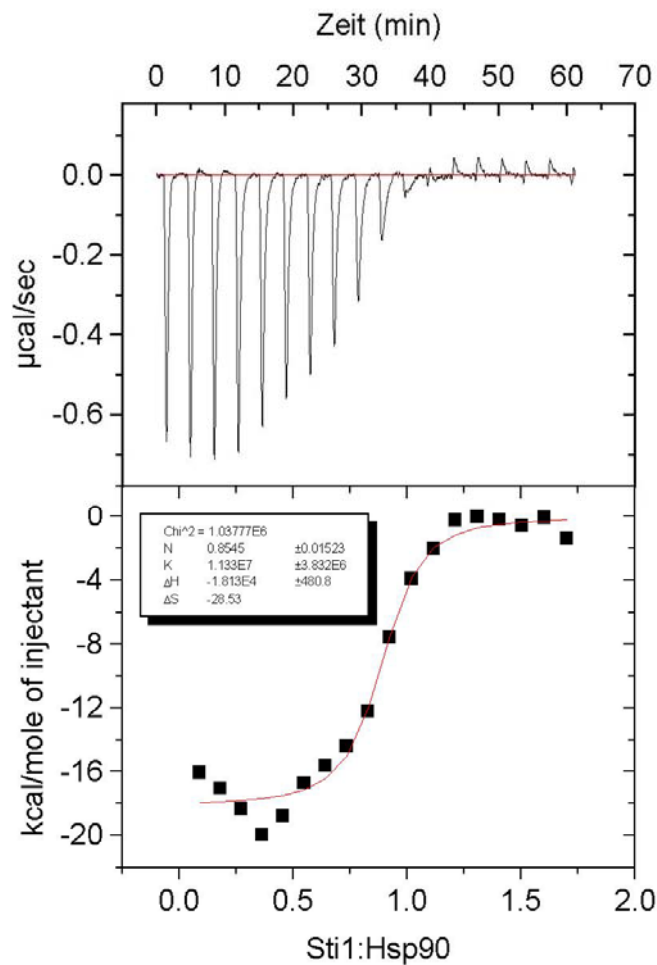


Abbildung 4-47: Titrationskalorimetrische Analyse der Interaktion zwischen Sti1 und Hsp90

Zur Durchführung des ITC-Laufes wurde Hsp90 in der Zelle mit einer Konzentration von 15 μM vorgelegt. Sti1 (200 μM) wurde in 20 Injektionen à 14 μl zugegeben. Assaypuffer war 40 mM HEPES, pH 7,5, 20 mM KCl bei einer Temperatur von 25 °C. Die Auswertung der Datenpunkte erfolgte mit Hilfe der Software Origin.

Der erhaltene Wert für die Dissoziationskonstante liegt bei 90 nM \pm 8 nM, was relativ gut den durch SPR-Techniken ermittelten Werten entspricht. Die stöchiometrische Konstante ergab sich dabei zu 0,85 \pm 0,02. Wie bereits bei Prodromou *et al.* (1999) beschrieben wurde somit auch hier eine Stöchiometrie gefunden, die einen 1:1-Komplex der beiden Proteine nahe legt.

4.3.3 Die Inhibition von Hsp90 durch Sti1 ist KCl-abhängig.

Prodromou *et al.* (1999) beschreiben, dass Sti1 ein effizienter Inhibitor der ATPase-Aktivität von Hsp90 ist und vermuten, dass diese Bindung durch eine direkte Interaktion von Sti1 mit der Nukleotidbindestelle vermittelt wird. Die beobachtete Inhibition der ATPase-Aktivität sollte in dieser Arbeit nachvollzogen werden. Um einen ersten Einblick in die Interaktion der beiden Proteine zu erhalten, wurde die Inhibition in Abhängigkeit von der Ionenstärke vermessen. Dazu wurde bei drei verschiedenen KCl-Konzentrationen die Effizienz von Sti1 als Inhibitor verglichen (Abbildung 4-48).

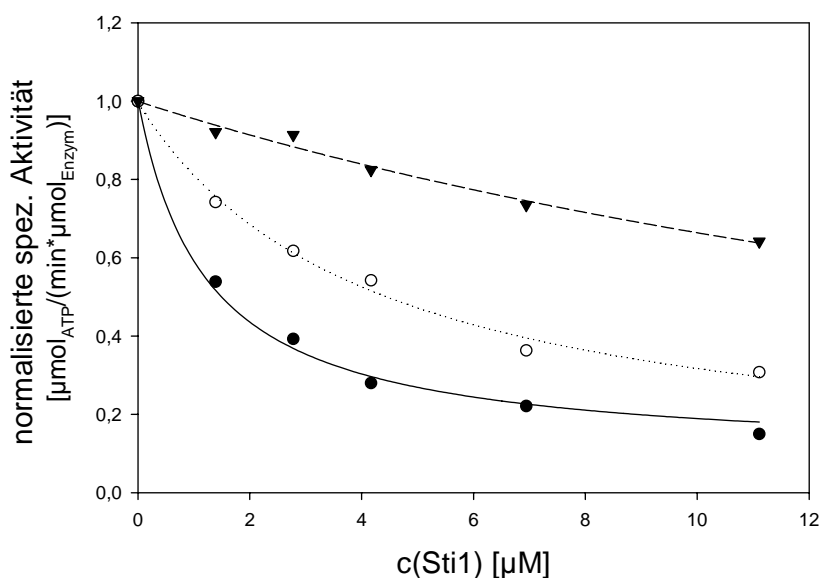


Abbildung 4-48: Abhängigkeit der Inhibition der Hsp90 ATPase von der KCl-Konzentration

Bei verschiedenen KCl-Konzentrationen wurde der Einfluss von Sti1 auf die Hsp90-ATPase getestet. Dazu wurden 80 mM (●), 150 mM (○) und 200 mM KCl (▼) in 40 mM HEPES, pH 7,5, 5 mM MgCl₂ verwendet. Die ATP-Konzentration war 2 mM, die Temperatur 37 °C. Da die Hsp90-ATPase selbst von der KCl-Konzentration abhängig ist, wurden die spezifischen Aktivitäten normiert. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben.

Abbildung 4-48 zeigt, dass der inhibierende Effekt von Sti1 mit steigenden KCl-Konzentrationen deutlich schwächer wird. Da die Inhibition bei höheren Sti1-Konzentrationen aber kein Plateau erreicht, sondern die ATPase von Hsp90 mit weiter steigenden Sti1-Konzentrationen abnimmt, scheint der beobachtete Effekt mehr auf einer schwächeren Bindung zwischen den beiden Proteinen, als auf einer reduzierten Aktivität von Sti1 zu beruhen. Der hier beobachtete Effekt der Ionenstärke entspricht somit dem Trend, der

bei den SPR-Messungen bezüglich der Salzkonzentration beobachtet wurde (Kapitel 4.3.1, Daten nicht gezeigt). Der Effekt der Ionenstärke auf die Interaktion von Sti1 und Hsp90 scheint darüber hinaus deutlich temperatursensitiv zu sein, da der KCl-Effekt auf die ATPase bei 32 °C bereits wesentlich schwächer ausfällt und die ermittelten Dissoziationskonstanten im SPR-Assay bei 25 °C auch bei hohen Salzkonzentrationen kleiner als 1 μM waren.

4.3.4 Sti1 ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor

Durch den relativ starken Einfluss von KCl auf die Interaktionsfähigkeit der beiden Proteine war es möglich die Bindekonstante von Sti1 an Hsp90 im Bereich von unter 1 μM bis zu 20 μM zu variieren. Um eine enzymatische Analyse des Inhibitionsverhaltens von Sti1 durchzuführen, wurden Bedingungen gewählt, die den für Michaelis-Menten-Kinetiken geforderten Vooraussetzungen entsprechen. Dazu sollte die Enzymkonzentration (Hsp90) deutlich geringer sein als der K_D von Enzym und Inhibitor. Aus diesem Grund wurde eine KCl-Konzentration von 200 mM gewählt, bei der die Bindekonstante von Sti1 an Hsp90 etwa 12 μM beträgt, während für Hsp90 4 μM verwendet wurden. Bei unterschiedlichen Sti1-Konzentrationen wurde dann der K_M -Wert für ATP bestimmt (Abbildung 4-49).

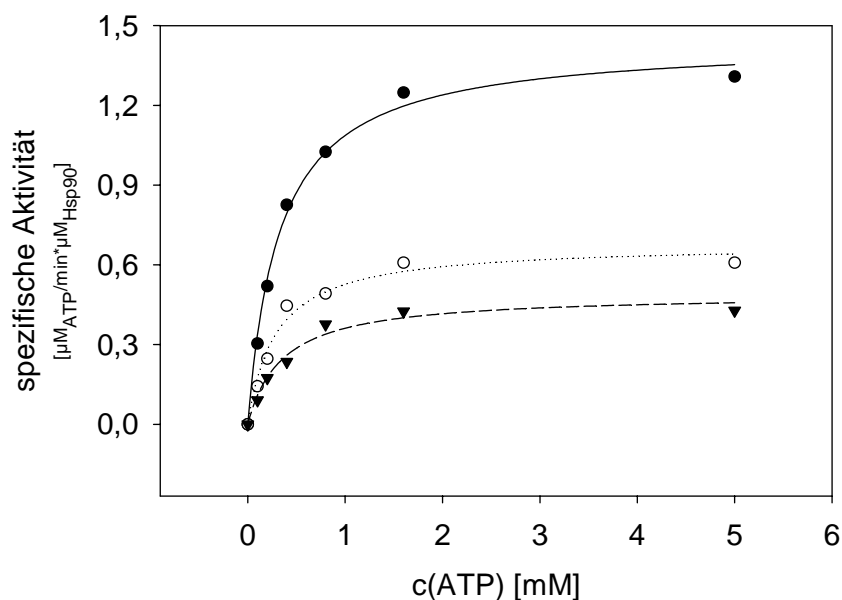


Abbildung 4-49: Bestimmung des K_M -Wertes für Hsp90 und Hsp90•Sti1-Komplexe

Unterschiedliche Sti1-Konzentrationen wurden verwendet, um den Anteil der Komplexe mit Hsp90 zu variieren. Die Hsp90-Konzentration betrug 4 μM (●), die zusätzlich zugegebenen Sti1-Konzentrationen 8 μM (○) oder 16 μM (▼). Die Bestimmung der K_M -Werte ergab Werte im Bereich von 350 μM bis 400 μM . Die Berechnung erfolgte wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben.

Die Bestimmung der K_M -Werte für ATP aus Abbildung 4-49 ergab, dass sich die für halbmaximale Aktivität notwendige ATP-Konzentration nicht wesentlich ändert. Alle bestimmten Werte liegen zwischen 350 μM und 400 μM . Deutlich zu beobachten ist dagegen der Einfluss von Sti1 auf die maximale Umsatzgeschwindigkeit von Hsp90. Sie nimmt mit steigender Sti1-Konzentration ab. Dieses Verhalten entspricht dem eines nicht-kompetitiven Inhibitors, der zwar kaum Einfluss auf die ATP-Bindung hat, dafür aber die Hydrolyserate verringert. Um dies weiter zu verifizieren, wurde im Anschluss das Nukleotidbindeverhalten des Sti1•Hsp90-Komplexes mit dem von Hsp90 verglichen.

4.3.5 Nukleotidbindung an den Sti1-Hsp90-Komplex

Die Beobachtung, dass Sti1 ein nicht-kompetitiver Inhibitor ist, wäre im Widerspruch zu den bisher bekannten Daten, nach denen Sti1 mit Geldanamycin um die Bindung an die ATP-Bindestelle konkurriert (Prodromou *et al.*, 1999). Deshalb wurden weitere Experimente durchgeführt, um diese Hypothese zu erhärten. Dazu wurde die Nukleotidbindung an den Sti1•Hsp90-Komplex untersucht. Da ITC, wie bereits zuvor angewendet (siehe Abbildung 4-12), eine Aussage über die Affinität und über die Thermodynamik der Bindereaktion ermöglicht, wurden Messungen mit AMP-PNP durchgeführt und die Bindung an Hsp90 bzw. den Sti1•Hsp90-Komplex quantifiziert.

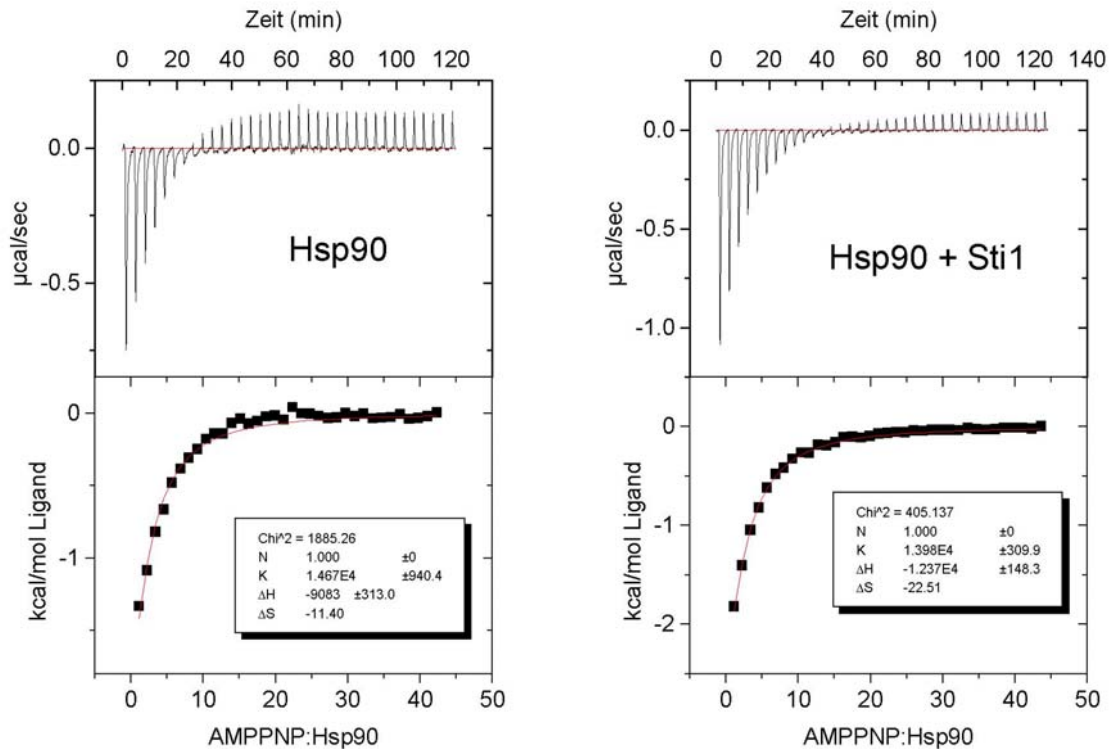


Abbildung 4-50: Untersuchung der Nukleotidbindung an den Hsp90•Sti1-Komplex

Die Bindung des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons AMP-PNP an Hsp90 (linkes Bild) und an den Hsp90•Sti1-Komplex (rechtes Bild) wurde bestimmt. Dazu wurden 15 μM Hsp90 beziehungsweise 15 μM Hsp90 und 30 μM Sti1 titriert. Es wurden 40 Injektionen á 7 μl einer 4 mM AMP-PNP-Lösung in die Proteinlösung vorgenommen. Die Auswertung der Läufe erfolgte mit Hilfe der Software Origin.

Die kalorimetrische Untersuchung zeigt, dass auch bei einem deutlichen Überschuß von Sti1 nach wie vor die Bindung von AMP-PNP möglich ist (Abbildung 4-50). Die ermittelten Bindekonstanten liegen für Hsp90 bei $68 \mu\text{M} \pm 8 \mu\text{M}$ und für den Hsp90•Sti1-Komplex bei $71 \mu\text{M} \pm 3 \mu\text{M}$. Die Auswertung der Datenpunkte verdeutlicht, dass weder die Bindungsenthalpie, noch die Affinität für AMP-PNP wesentlich verändert ist. Dieses Verhalten schließt einen Mechanismus, bei dem Sti1 mit ATP um die Bindung an die N-terminale Bindestelle konkurriert, aus. Um weitere Daten zum Nukleotidbindeverhalten des Hsp90•Sti1-Komplexes zu erhalten, wurde auch eine kinetische Untersuchung durchgeführt. Dazu wurde ein Hsp90•Sti1-Komplex vorgeformt und die Kinetik der Nukleotidbindung durch *Stopped-flow*-Techniken verfolgt, wie dies zuvor für Hsp90 beschrieben wurde (Kapitel 4.2.8). Es wurden die k_{on} - und k_{off} -Werte für die Bindung ermittelt (Abbildung 4-51).

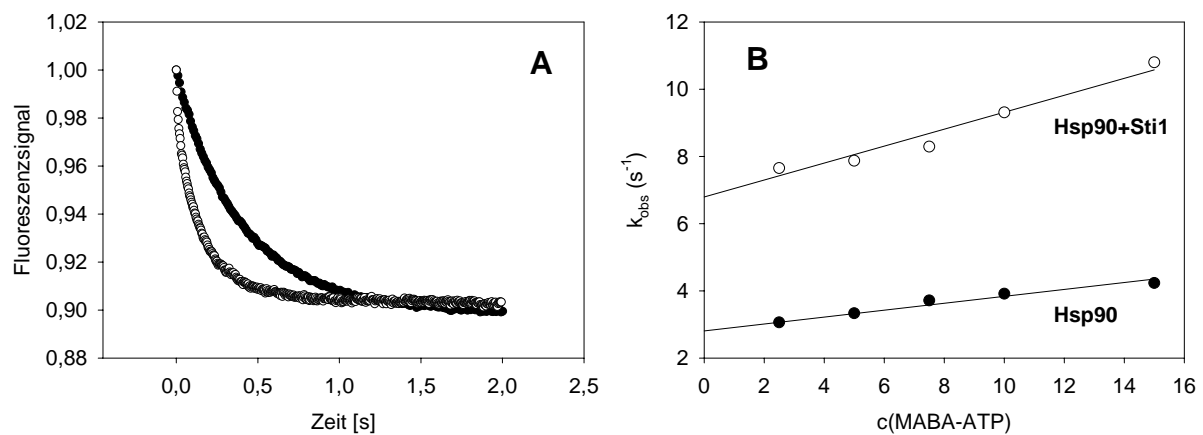


Abbildung 4-51: Kinetische Analyse der Nukleotidbindung an Hsp90 und an den Hsp90•Sti1-Komplex

Die Ermittlung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten erfolgte für Hsp90 und für den Hsp90•Sti1-Komplex. Als Puffer wurde 40 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ verwendet.

- A) Zunächst wurden die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von MABA-ATP für 2,5 μM Hsp90 alleine (●) und in Komplex mit 5 μM Sti1 (○) bestimmt.
- B) Eine systematische Variation der MABA-ATP-Konzentration ergab die Assoziationskonstanten, die den Steigungen der Geraden entnommen werden können.

Die Auswertung der Daten aus Abbildung 4-51 ergab, dass die Kinetik der Bindung durch die Komplexierung von Hsp90 mit Sti1 schneller wird, genauso wie die Kinetik der Dissoziation. Ein Einfluss auf die Affinität der Nukleotidbindung ist auch hier nicht zu beobachten. Die beschleunigte Kinetik der Nukleotidbindung könnte darauf hindeuten, dass Hsp90 von seinem Inhibitor Sti1 in einem „offenen“ Zustand gehalten wird. Diese Daten bestätigen somit erneut die Vorstellung von Sti1 als einem nicht-kompetitiven Inhibitor von Hsp90.

4.3.6 Die C-terminale Sti1-Bindestelle von Hsp90

Nicht-kompetitive Inhibition erfordert, dass essentielle Schritte während des Hydrolyse-Zyklus nicht oder verlangsamt ablaufen. Da große Teile des ATPase-Zyklus von Hsp90 aus der Bewegung von Domänen bestehen, ist die Lokalisierung von Sti1-Bindestellen in Hsp90 von entscheidender Bedeutung, um den Mechanismus der Inhibition zu verstehen. Im humanen System erfolgt ein Großteil der Bindung an die C-terminal gelegenen Aminosäuren (Chen *et al.*, 1998; Scheufler *et al.*, 2000). Dieser Bereich, der im Wesentlichen die Aminosäuren MEEVD umfasst, ist bei Eukaryonten konserviert. Für die Untersuchungen wurde eine Hsp90-Mutante konstruiert, der diese C-terminalen Aminosäuren fehlen. Das Protein wurde freundlicherweise von Otmar Hainzl zur Verfügung gestellt. Diese

Deletionsmutante Δ MEEVD-Hsp90 wurde eingesetzt, um den Einfluss von Sti1 auf die ATPase-Aktivität zu untersuchen.

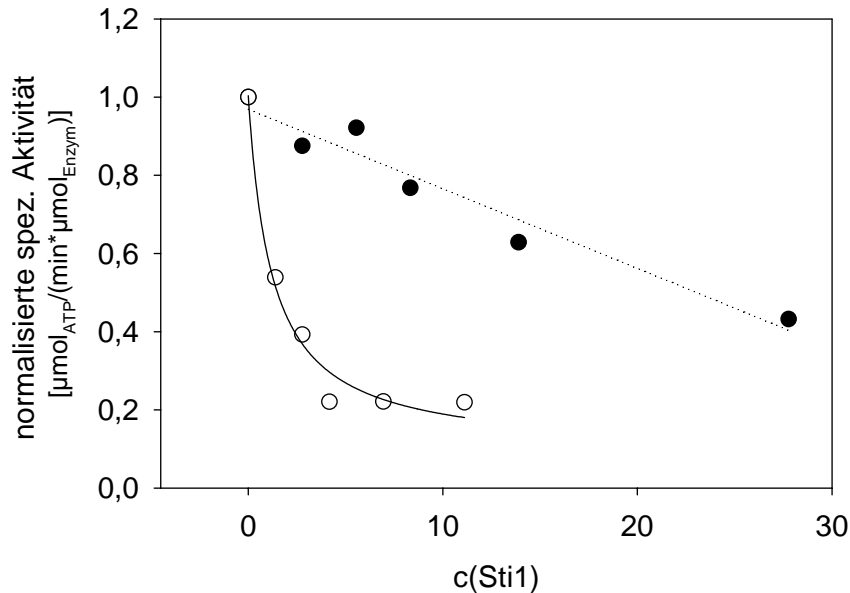


Abbildung 4-52: Vergleich der Inhibition von Hsp90 und Δ MEEVD-Hsp90 durch Sti1

Unter gleichen Bedingungen wurde der Einfluss von Sti1 auf die Proteine Hsp90 (○) und Δ MEEVD-Hsp90 (●) bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug 4 μ M.

Durch die Deletion der letzten fünf Aminosäuren von Hsp90 verringert sich die Affinität von Hsp90 für Sti1. Dies ist aus der deutlich geringeren Effizienz von Sti1 als Inhibitor der ATPase-Aktivität zu erkennen (Abbildung 4-52). Der K_D -Wert für die Bindung von Sti1 an Hsp90 ändert sich durch die Deletion der fünf C-terminalen Aminosäuren von Hsp90 von $< 1 \mu$ M auf $> 20 \mu$ M. Parallel zu diesen Experimenten wurde mit Hilfe des SPR-Assays versucht, die Bindung der beschriebenen Deletionsmutante an Sti1 mit der von Hsp90 zu vergleichen. Dazu wurden bei einer konstanten Sti1-Konzentration von 100 nM verschiedene Konzentrationen an Hsp90 bzw. der Deletionsmutante getestet. Bei starker Interaktion sollte, wie zuvor beschrieben (Abbildung 4-45), die Wechselwirkung von Sti1 mit dem Chip inhibiert werden.

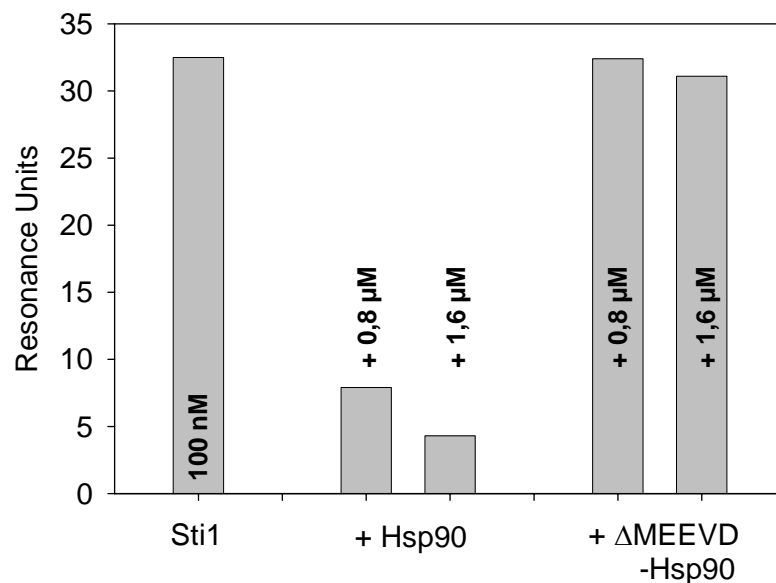


Abbildung 4-53: Bestimmung der Affinität von Sti1 zu Hsp90 und ΔMEEVD-Hsp90

Der indirekte SPR-Assay wurde verwendet, um die Affinität von Sti1 für die Proteine Hsp90 und ΔMEEVD-Hsp90 zu vergleichen. Die Proteine Hsp90 und ΔMEEVD-Hsp90 wurden unter identischen Bedingungen vermessen. Der Laufpuffer war 40 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM KCl. Die Temperatur betrug 25 °C.

Wie Abbildung 4-53 zu entnehmen ist, ist die Affinität von Sti1 zu ΔMEEVD-Hsp90 deutlich geringer als zu Hsp90. Die Interaktion der Deletionsmutante mit Sti1 ist so schwach, dass eine Quantifizierung der Affinität unter Verwendung des SPR-Assays nicht erfolgen kann. Für Cpr6 wurden analoge Daten erhalten (Daten nicht gezeigt).

4.3.7 Weitere Bindestellen zwischen Sti1 und Hsp90

Die ATPase-Aktivität der ΔMEEVD-Hsp90-Mutante konnte nur sehr schwach durch Sti1 inhibiert werden. Dies zeigt die Bedeutung dieser Bindestelle für die Interaktion. Um zu testen, ob diese Bindestelle die einzige ist, wurden Peptide konstruiert, die 7 bzw. 21 Aminosäuren des C-Terminus von Hsp90 umfassen. Ein Einfluß der Peptide auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Peptide sollten, wenn sie die komplette Bindestelle enthalten, in der Lage sein, eine Inhibition durch Sti1 vollständig wieder aufzuheben, da sie mit Hsp90 um die Sti1-Bindung kompetitieren. Bei diesen Experimenten konnte kein Einfluss auf die Bindung von Sti1 an Hsp90 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was andeutet, dass die C-terminalen Aminosäuren zwar eine wichtige, jedoch nicht die einzige Bindestelle darstellen.

Auch mit den C-terminalen Peptiden wurde versucht, die Wechselwirkung von Sti1 mit dem Hsp90-Chip zu inhibieren, indem der Injektionslösung die beschriebenen Peptide zugesetzt wurden. Als Kontrolle wurde neben Sti1 auch Cpr6 vermessen, von dem ebenfalls bekannt ist, dass es mit dem C-terminalen Bereich von Hsp90 interagiert (Abbildung 4-54).

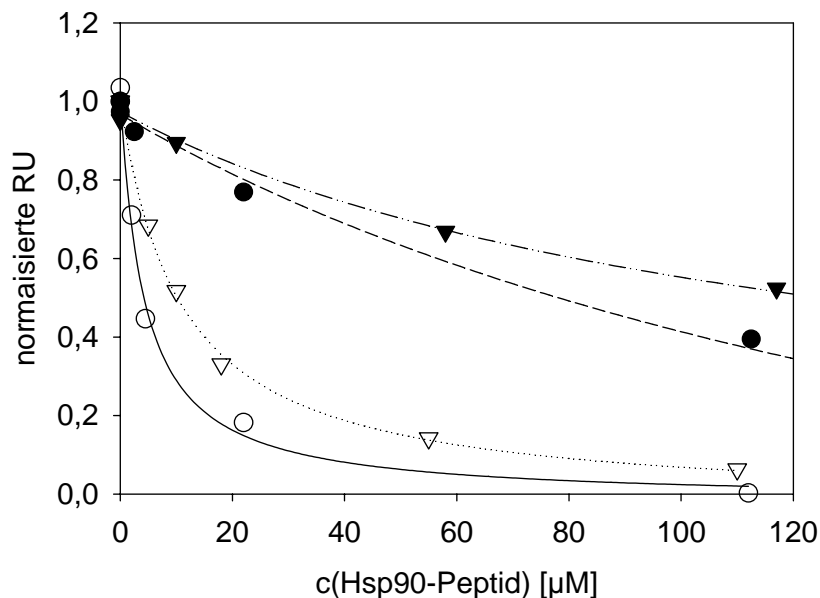


Abbildung 4-54: Interaktion C-terminaler Peptide mit den Proteinen Cpr6 und Sti1

Peptide, die 7 (Pep1) beziehungsweise 21 (Pep2) Aminosäuren der C-terminalen Sequenz von Hsp90 enthalten, wurden im SPR-Assay eingesetzt, um die Affinität der Partnerproteine Sti1 und Cpr6 für die isolierte C-terminale Bindestelle von Hsp90 zu ermitteln. Die Interaktion von Cpr6 mit Pep1 (▽) erfolgte mit einer Bindekonstante von 10 µM, die mit Pep2 (○) mit 4,2 µM. Die Interaktion von Sti1 mit Pep1 (▼) erfolgte mit einer Bindekonstante von etwa 300 µM, die mit Pep2 (●) mit 150 µM.

Für beide Peptide ist eine Affinität mit K_D -Werten von $4,2 \mu\text{M} \pm 0,5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M} \pm 1 \mu\text{M}$ für Cpr6 zu beobachten, die Affinität für Sti1 ist dagegen bei beiden Peptiden sehr schwach. Die K_D -Werte betragen hier etwa 150 µM beziehungsweise 300 µM. Basierend auf diesen Daten ergibt sich sowohl für Cpr6, als auch für Sti1, dass die Interaktion mit den C-terminalen Peptiden von Hsp90 deutlich schwächer ausfällt, als die Interaktion mit dem Vollängenprotein. Dies deutet auf weitere Bindestellen in Hsp90 hin, die bisher noch nicht identifiziert worden sind.

4.3.8 Die N-terminale Sti1-Bindestelle von Hsp90

Um weitere Bindestellen zu identifizieren, wurde unter Verwendung des SPR-Assays die Affinität einzelner Hsp90-Fragmente für das Protein Sti1 und zum Vergleich für das Protein Cpr6 bestimmt. Dazu wurde die Bindung der Partnerproteine im SPR-Assay mit verschiedenen Fragmenten kompetitiert (Abbildung 4-55) und aus den erhaltenen Kurven eine Dissoziationskonstante errechnet (siehe Kapitel 3.6.4).

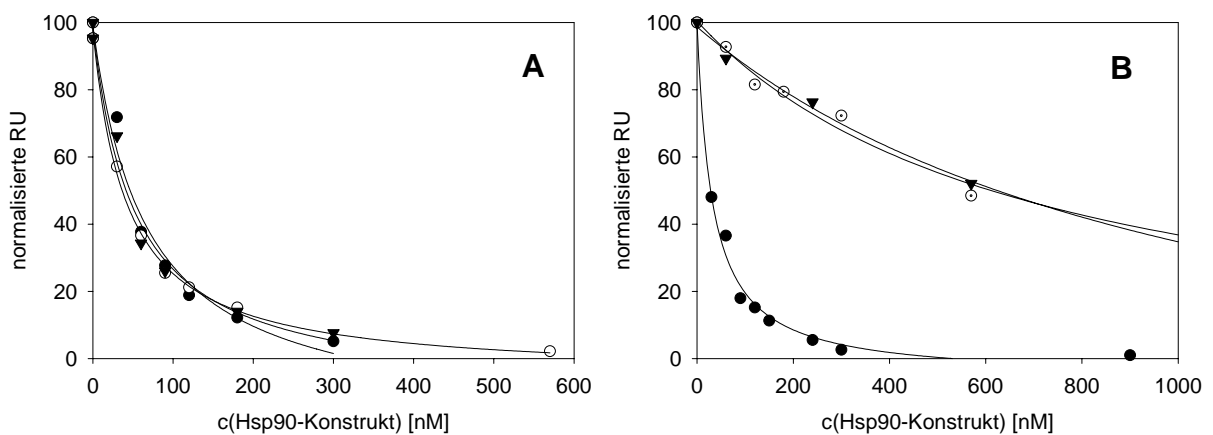


Abbildung 4-55: Bindung von Cpr6 und Sti1 an Hsp90-Fragmente

Exemplarisch dargestellt ist hier die Interaktion von Cpr6 (A) und Sti1 (B) mit Hsp90 (●), $\Delta 24$ -Hsp90 (○) und 262C (▼). Die Daten wurden mit Hilfe der indirekten Titration im SPR-Assay ermittelt und entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.6.4 ausgewertet. Als Laufpuffer wurde 40 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM KCl verwendet. Die Temperatur lag bei 25 °C.

Die errechneten Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst.

	K_D für Cpr6 [nM]	K_D für Sti1 [nM]
Hsp90	41 ± 4	40 ± 4
$\Delta 8$ – Hsp90	36 ± 3	111 ± 41
$\Delta 16$ – Hsp90	18 ± 2	209 ± 55
$\Delta 24$ – Hsp90	30 ± 8	571 ± 279
262C – Hsp90	20 ± 3	654 ± 115
527C – Hsp90	43 ± 6	> 1000
N529Cys	Keine Bindung	Keine Bindung

Tabelle 4-6: Zusammenfassung der durch SPR ermittelten Dissoziationskonstanten für Hsp90-Fragmente

Den Werten in Tabelle 4-6 ist zu entnehmen, dass die Interaktion von Sti1 mit N-terminal deletierten Fragmenten deutlich schwächer ist, als mit Vollängen-Hsp90. Somit ist zu erwarten, dass neben der bereits identifizierten C-terminalen Bindestelle im Falle von Sti1 (siehe Kapitel 4.3.6) auch eine N-terminale Bindestelle existiert. Diese Bindestelle ist jedoch nur aufgrund der kooperativen Wirkung mit der C-terminalen Bindestelle zu detektieren, da für das Fragment N529Cys keine Interaktion mit Sti1 detektiert werden konnte. Interessant ist dabei, dass die Affinität für die Deletionsmutante $\Delta 24$ -Hsp90 genauso groß ist, wie für das Hsp90-Fragment 262C, dem die gesamte N-terminale Bindestelle fehlt. Da diese 24 Aminosäuren genau dem Bereich entsprechen, der zuvor für die Dimerisierung der N-terminalen Domänen ausfindig gemacht wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die nicht-kompetitive Inhibition von Sti1 darauf zurückzuführen ist, dass es die für die ATP-Hydrolyse essentielle Dimerisierung der N-terminalen Domänen inhibiert.

4.3.9 Die Inhibition von $\Delta 8$ -Hsp90 ist erschwert

Eine verringerte Dimerisierung der N-terminalen Domänen könnte ein effizienter Mechanismus zur Inhibition der Hsp90-ATPase sein. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurde getestet, inwieweit Sti1 in der Lage ist, eine Hsp90-Mutante zu inhibieren, die eine deutlich erhöhte Tendenz zur N-terminalen Dimerisierung aufweist. Dazu wurde die Deletionsmutante $\Delta 8$ -Hsp90 verwendet, für die in vorherigen Experimenten gezeigt wurde, dass hier eine verstärkte Dimerisierung der N-terminalen Domänen nach Bindung von ATP zu beobachten ist. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 4-56 dargestellt.

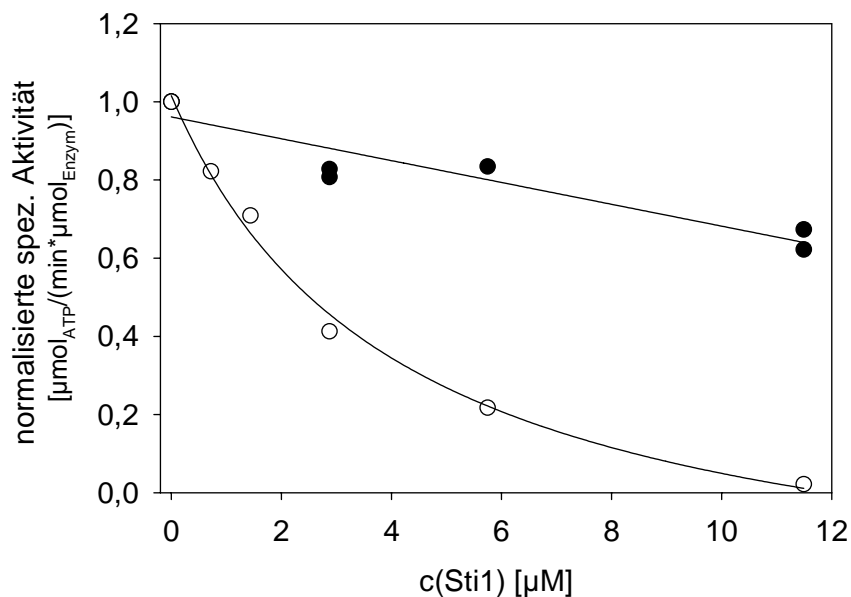


Abbildung 4-56: Inhibition der ATPase von $\Delta 8$ -Hsp90 und Hsp90 durch Sti1

Unter identischen Bedingungen wurde die Inhibition der ATPase von $\Delta 8$ -Hsp90 (2,5 μM) und Hsp90 (4 μM) durch Sti1 untersucht. Um eine stabile Wechselwirkung zu gewährleisten, wurde ein Puffer verwendet, der nur 80 mM KCl enthielt. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine starke Bindung von Sti1 an Hsp90 (Abbildung 4-48).

Interessanterweise ist die Wechselwirkung zwischen Sti1 und $\Delta 8$ -Hsp90 deutlich schwächer als die zwischen Hsp90 und Sti1. Zwei Gründe sind prinzipiell dafür möglich: erstens könnte durch die Deletion der ersten acht Aminosäuren ein Bereich entfernt worden sein, der für die Interaktion mit Sti1 direkt erforderlich ist. Andererseits könnte die Deletionsmutante $\Delta 8$ -Hsp90 unter den Bedingungen des ATPase-Assays in einer Konformation vorliegen, die weniger gut für die Bindung von Sti1 geeignet ist. Da bereits bekannt ist, dass $\Delta 8$ -Hsp90 unter den verwendeten Bedingungen stärker N-terminal dimerisiert ist als das Vollängen-Hsp90 wäre zu vermuten, dass genau diese Konformation weniger gut an Sti1 bindet, als die „offene“ Konformation.

4.3.10 ATP verringert die Bindung von Sti1 an $\Delta 8$ -Hsp90

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde im Weiteren ausgenutzt, dass $\Delta 8$ -Hsp90 nur in der Gegenwart von ATP eine N-terminal dimerisierte Konformation annimmt und dieser Effekt bei Hsp90 nicht zu beobachten ist (siehe Abbildung 4-36 und Abbildung 4-37). Demzufolge wurde die Affinität von Sti1 für Hsp90 oder $\Delta 8$ -Hsp90 in An-

und Abwesenheit von ATP bestimmt. Dies wurde mit Hilfe des SPR-Assays untersucht, in dem Laufpuffer verwendet wurde, der 2 mM ATP enthielt. Die erhaltenen Werte wurden anschließend mit Experimenten verglichen, bei denen ohne Zusatz von ATP gearbeitet wurde.

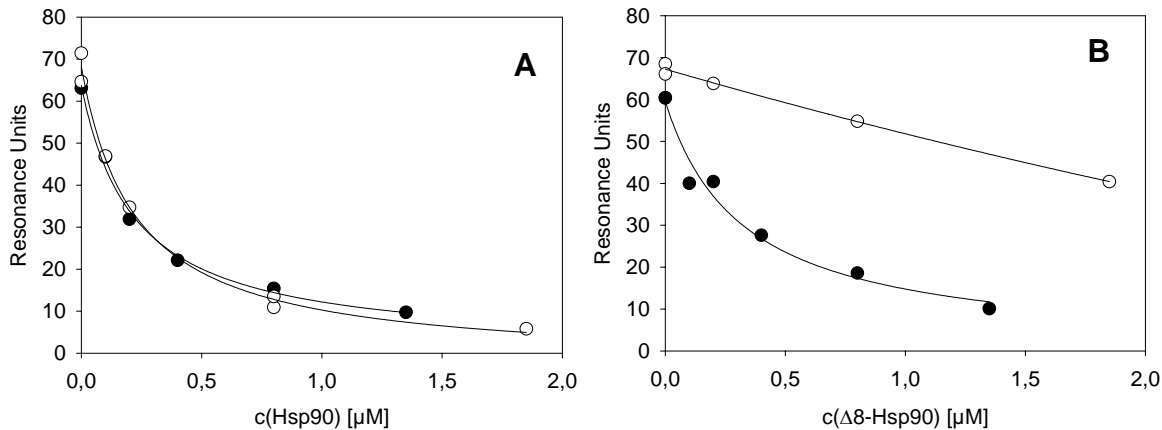


Abbildung 4-57: Einfluss von ATP auf die Interaktion von Sti1 mit Hsp90 und Δ8-Hsp90

Der indirekte SPR-Assay wurde verwendet, um die Affinität von Hsp90 (A) und Δ8-Hsp90 (B) für Sti1 in Anwesenheit (○) und Abwesenheit (●) von Mg•ATP zu bestimmen. Dazu wurden dem Laufpuffer 2 mM Mg•ATP zugesetzt und die so ermittelten Bindekonstanten mit denen verglichen, die ohne diesen Zusatz gemessen worden waren.

Zu beobachten ist in Abbildung 4-57, dass die Affinität für Hsp90 nicht durch die Anwesenheit von 2 mM ATP beeinflusst wird (Abbildung 4-57A). Die Affinität von Δ8-Hsp90 dagegen wird in Anwesenheit von ATP schwächer (Abbildung 4-57B). Die Dissoziationskonstante steigt von etwa 200 nM auf über 2 μM. Dieses Verhalten belegt, dass die Bindung von Sti1 an Δ8-Hsp90 in erheblichem Maße durch ATP verringert wird und zeigt damit, dass die Konformation, die Hsp90 einnimmt, mitbestimmend für die Affinität von Sti1 für Hsp90 ist. Diese Daten legen einen Mechanismus nahe, bei dem Sti1 die N-terminale Dimerisierung nach Bindung des ATP-Moleküls verhindert. Dies ist im Falle von Hsp90 sicherlich ein effizienter Mechanismus, der die beobachtete Inhibition der ATPase erklären könnte. Ein derartiger Mechanismus ist im Falle von Δ8-Hsp90 jedoch scheinbar dadurch erschwert, dass die N-terminale Dimerisierung in Anwesenheit von ATP sehr viel stärker ist als bei Hsp90 und Sti1 somit nicht mehr in der Lage ist, diese zu unterbinden. Da Δ8-Hsp90 offensichtlich nach Bindung von ATP in einer Konformation vorliegt, die am N-Terminus keine Bindung von Sti1 mehr erlaubt, ist die Gesamtaffinität von Sti1 für Δ8-Hsp90 reduziert und damit auch die inhibitorische Wirkung von Sti1 auf Δ8-Hsp90.

4.3.11 Die Bindung von Sba1 erfordert alle drei Domänen von Hsp90

Der Einfluss des Proteins Sti1 auf die ATPase von Hsp90, und die Möglichkeit seine Interaktion mit Hsp90 basierend auf den vorhandenen Fragmenten zu klären, führte dazu, auch das Partnerprotein Sba1 auf seine Interaktion mit Hsp90 hin zu untersuchen. Dazu wurde zunächst das Gen für Sba1 in den Vektor pET28b kloniert, das Protein exprimiert und entsprechend der Reinigungsvorschrift für His₆-getaggte Protein gereinigt (siehe Kapitel 3.4.9). Um das Bindungsverhalten von Sba1 an Hsp90 zu verstehen, wurde zunächst ein etablierter Interaktionstest von Sba1 und Hsp90 durchgeführt (Prodromou *et al.*, 2000; Weikl *et al.*, 2000). Dabei werden Sba1 und Hsp90 chemisch quervernetzt und die erhaltenen Spezies mittels SDS-PAGE getrennt (siehe Kapitel 3.5.9). Zur Analyse erfolgt der immunologische Nachweis von Sba1 mittels Western Blotting (siehe Kapitel 3.5.7). Zunächst galt es, Hsp90-Fragmente zu finden, die Sba1 in diesem Assay binden können. Da es in der Literatur zahlreiche Hinweise gibt, dass die Bindung von Sba1 der Sättigung von Hsp90 mit ATP bedarf, wurden die Experimente jeweils mit 2 mM AMP-PNP beziehungsweise 2 mM ATP durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-58 gezeigt.

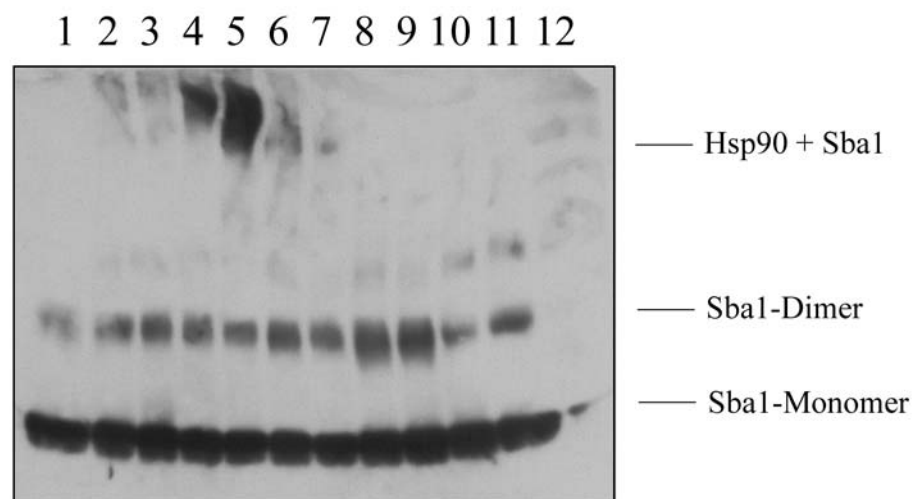


Abbildung 4-58: Quervernetzung von Sba1 mit Hsp90, $\Delta 8$ -Hsp90, $\Delta 24$ -Hsp90, 262C und N529Cys

Sba1 wurde jeweils in Gegenwart von 2 mM AMP-PNP beziehungsweise 2 mM ATP mit unterschiedlichen Hsp90-Konstrukten quervernetzt. Dazu wurden Hsp90 (Spur 2, 3), $\Delta 8$ -Hsp90 (4, 5), $\Delta 24$ -Hsp90 (6, 7), 262C (8, 9) und N529Cys (10, 11) verwendet. In Spur 1 wurde Sba1 alleine quervernetzt. Der Puffer war 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.5.9 beschrieben.

Diese Experimente zeigen, dass die Bindung von Sba1 der Anwesenheit aller drei Domänen bedarf, da weder für 262C noch für N530 spezifische Crosslinks detektiert werden konnten. Interessant ist die Beobachtung, dass der Crosslink an $\Delta 8$ -Hsp90 scheinbar deutlich effizienter funktioniert, als an Hsp90. Da der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Proteinen die Deletion von acht N-terminalen Aminosäuren bei $\Delta 8$ -Hsp90 ist, verbleiben im Wesentlichen zwei Möglichkeiten, die beobachteten Affinitäts-Unterschiede zu erklären: Einerseits könnte durch die Deletion eine inhibitorische Sequenz entfernt worden sein. Andererseits könnte auch die Bindung von Sba1 – ähnlich wie die Bindung von Sti1 – spezifisch für eine bestimmte Konformation des Hsp90-Moleküls sein.

4.3.12 Sba1 inhibiert die ATPase-Aktivität von $\Delta 8$ -Hsp90

Um einen Einfluss von Sba1 auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 zu untersuchen, wurde die Aktivität der Proteine Hsp90 und $\Delta 8$ -Hsp90 in Abhängigkeit der Sba1-Konzentration bestimmt (Abbildung 4-59).

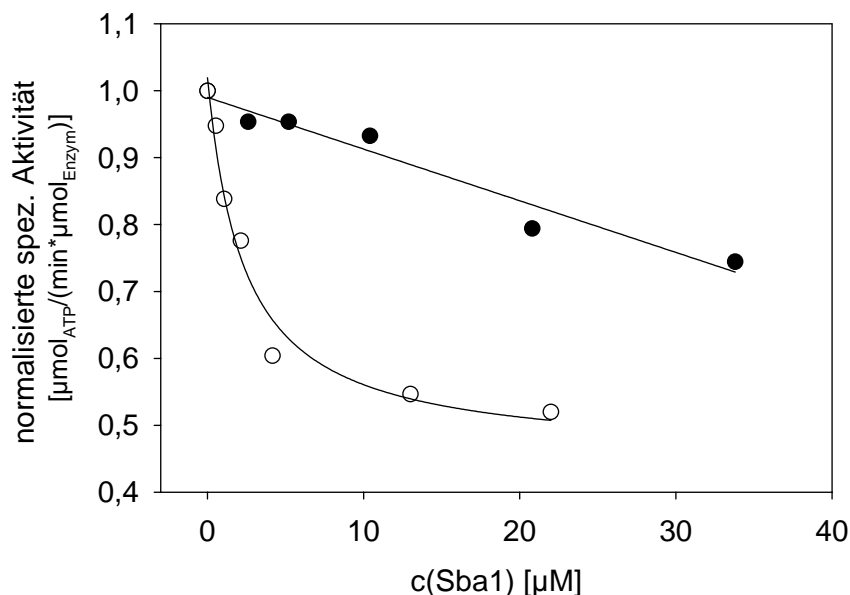


Abbildung 4-59: Inhibition der ATPase von Hsp90 und $\Delta 8$ -Hsp90 durch Sba1

ATPase-Assays wurden bei einer Konzentration von 4 μM Hsp90 (●) beziehungsweise 2,8 μM $\Delta 8$ -Hsp90 (○) durchgeführt. Die Konzentration an Sba1 wurde variiert. Als Puffer wurde 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl_2 verwendet. Die Temperatur betrug 37 °C. Die Auswertung erfolgte, wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben.

Der Einfluss von Sba1 auf Hsp90 ist sehr schwach. Die Bindungsaffinität scheint gering zu sein, da auch bei hohen Sba1-Konzentrationen noch keine Sättigung zu beobachten ist. Der Einfluss auf die Aktivität von $\Delta 8$ -Hsp90 dagegen ist sehr deutlich. Interessant ist dabei, dass es nicht zu einer vollständigen Inhibierung kommt, sondern dass die Aktivität im offensichtlich gebildeten Sba1• $\Delta 8$ -Hsp90-Komplex auf niedrigerem Niveau erhalten bleibt. Da $\Delta 8$ -Hsp90 – wie in dieser Arbeit gezeigt – in Gegenwart von ATP besonders die N-terminal dimerisierte Konformation annimmt, könnte dieses Experiment zeigen, dass im Falle von Sba1 diese Konformation der bevorzugte Bindungspartner ist. Dies wäre im Einklang mit den Arbeiten anderer Gruppen, die diese Konformation als Bindungspartner postulieren (Chadli *et al.*, 2000; Prodromou *et al.*, 2000).

4.3.13 Sba1 bindet ATP-spezifisch an $\Delta 8$ -Hsp90

Um die beobachtete Interaktion zwischen $\Delta 8$ -Hsp90 und Sba1 zu verifizieren, wurde der Interaktionstest durchgeführt, diesmal mit dem Ziel, die Voraussetzungen für die Bindung an Hsp90 und $\Delta 8$ -Hsp90 zu verstehen. Die N-terminal dimerisierte Konformation wird von $\Delta 8$ -Hsp90 nur angenommen, wenn ATP oder AMP-PNP gebunden ist, nicht aber ohne Nukleotid. Deshalb wurde dieser Test in Anwesenheit von AMP-PNP, ATP, ADP, Radicicol und ohne Nukleotid durchgeführt.

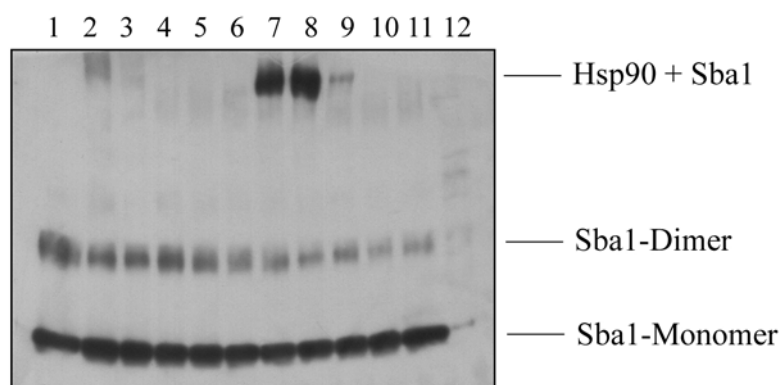


Abbildung 4-60: Quervernetzung von Sba1 mit Hsp90 und $\Delta 8$ -Hsp90

Sba1 wurde mit Hsp90 (Spur 2-6) und $\Delta 8$ -Hsp90 (Spur 7-11) bei unterschiedlichen Bedingungen quervernetzt. Der Puffer war 40 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂. Zusätzlich wurden 2 mM AMP-PNP (Spur 2,7), 2 mM ATP (3,8), 2 mM ADP (4, 9), 20 μ M Radicicol (5, 10) oder kein weiterer Zusatz (6, 11) verwendet. Spur 1 enthielt lediglich quervernetztes Sba1. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.5.9 beschrieben.

Deutlich zu erkennen ist die starke Quervernetzung von Sba1 an die AMP-PNP- und ATP-komplexierten Konformationen von $\Delta 8$ -Hsp90. Ein leichter Crosslink ist auch für ADP zu erkennen. Im Falle von Hsp90 kann nur die AMP-PNP-komplexierte Version quervernetzt werden, wie dies auch in der Literatur beschrieben ist (Prodromou *et al.*, 2000). Auch diese Daten deuten auf eine stärkere Interaktion mit einer N-terminal dimerisierten Konformation des Hsp90 hin, da diese Konformation in $\Delta 8$ -Hsp90 die Anwesenheit von ATP erfordert. Im freien Zustand dagegen liegt $\Delta 8$ -Hsp90, ähnlich wie Hsp90, vermutlich in der „offenen“ Konformation vor.

4.3.14 Diskussion zur Interaktion von Sba1, Cpr6 und Sti1 mit Hsp90

Dieser Teil der Arbeit hatte zum Gegenstand, basierend auf den zuvor erhaltenen Daten des Hydrolysemechanismus, die Bindung der Partnerproteine Sti1, Cpr6 und Sba1 zu verstehen.

Die Inhibition von Hsp90 durch Sti1

Die Beobachtung, dass Sti1 die Hydrolyse von ATP durch Hsp90 beeinflusst, wurde bereits 1999 von Prodromou *et al.* berichtet. Dies konnte hier bestätigt werden. Für Sti1 wurde beobachtet, dass die Bindung dieses Proteins bevorzugt an die N-terminal noch nicht dimerisierte Konformation von Hsp90 erfolgt. Diese Bindung wird im wt-Hsp90 nicht durch ATP beeinflusst. Die Inhibition der ATPase-Aktivität beruht im Wesentlichen darauf, dass der unter normalen Bedingungen ablaufende ATPase-Zyklus (siehe Kapitel 4.2.15) die Dimerisierung der N-Termini erfordert. Diese kann bei Bindung von Sti1 nicht mehr erfolgen, so dass Sti1 als potenter Inhibitor der Hsp90-ATPase fungiert. Den Ergebnissen dieser Arbeit zu Folge, bindet Sti1 mit gleicher Affinität an nukleotidfreies Hsp90 und an ATP-komplexiertes Hsp90 (Abbildung 4-57).

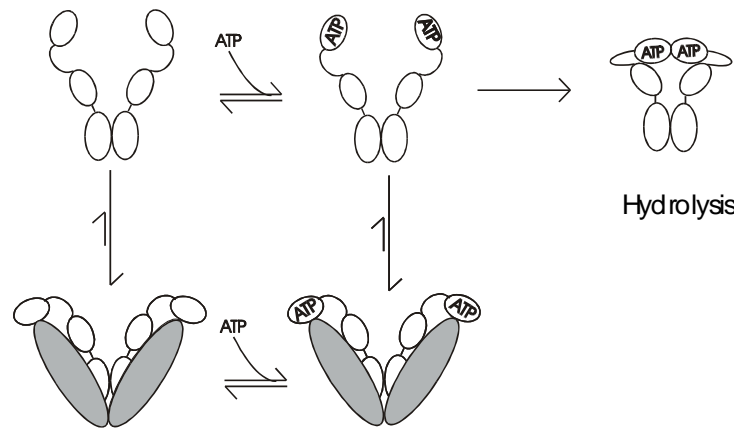


Abbildung 4-61: Modell zur Inhibition von Hsp90 durch Sti1

Im oberen Teil sind die Reaktionen des ATPase-Zyklus gezeigt. Die Inhibition durch Sti1 (grau) erfolgt als nicht-kompetitiver Inhibitor, indem die N-terminale Dimerisierung von Hsp90 verhindert wird.

Dieses Modell steht in Widerspruch zu einigen bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet. So wird Sti1 bisher für einen kompetitiven Inhibitor gehalten, der die ATP-Bindung an den N-Terminus durch eine direkte Interaktion mit der Bindestelle verhindert (Prodromou *et al.*, 1999). Diese Daten beruhen auf der Interpretation von CD-Spektren, die aufgrund der Chiralität von Geldanamycin erhalten werden konnten. Das CD-Spektrum von Geldanamycin ändert sich durch die Bindung an Hsp90. Dabei wurde festgestellt, dass die Bindung an den Hsp90•Sti1-Komplex zu einem schwächeren CD-Signal und zugleich zu einer schwächeren Affinität der Bindung führt. Diese Beobachtung wurde dahingehend interpretiert, dass Geldanamycin und Hsp90 um die Nukleotidbindestelle von Hsp90 konkurrieren (Prodromou *et al.*, 1999). Die komplexe Natur des ATPase-Zyklus lässt jedoch auch andere Interpretationen dieser Daten zu. So führt die Bindung von Sti1 an die N-terminale Domäne sicherlich zu leichten Veränderungen in der Struktur dieser Domäne. Dadurch könnte auch die chemische Umgebung in der Nähe der Geldanamycinbindestelle beeinflusst werden, so dass es zu einer Veränderung des CD-Signals kommen kann. Auch eine leicht verringerte Affinität, wie sie durch CD-Spektroskopie beobachtet wurde, kann durch Veränderungen in der Tertiärstruktur des Proteins erfolgen, ohne dass eine direkte Konkurrenz der beiden Bindungspartner vorliegen muss.

Auch Daten, dass die Bindung von Hop an hHsp90 ausschließlich an den letzten sieben Aminosäuren erfolgt (Brinker *et al.*, 2002; Scheufler *et al.*, 2000), konnten für das Hefe-System nicht bestätigt werden. Die Bindung von Sti1 erfolgt den Daten dieser Arbeit zu Folge

sowohl an die N-terminale Domäne (Abbildung 4-55), als auch an den C-Terminus von Hsp90, wobei die C-terminale Bindestelle auch für sich alleine nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4-54), was demonstriert, dass diese die hauptsächliche Bindestelle darstellt. Die Bindung von Sti1 an die N-terminale Bindungsstelle erfolgt nicht mehr, sobald die ersten 24 Aminosäuren von Hsp90 deletiert sind. Die Deletion der ersten 24 Aminosäuren führt, der Kristallstruktur zufolge, zu einer Veränderung der Tertiärstruktur zwischen den Aminosäuren 80 und 120 (Abbildung 4-35). Dieser Bereich ist eventuell an der Dimerisierung der N-terminalen Domänen ebenso beteiligt, wie die ersten 24 Aminosäuren selbst (siehe Kapitel 4.2.15). Einer dieser Bereiche dürfte als N-terminale Bindestelle von Sti1 fungieren, was die Effizienz, mit der Sti1 die N-terminale Dimerisierung unterbindet, erklären würde. Die Existenz einer N-terminalen Bindestelle vermuten auch Chen *et al.* (1998), die sogar drei Bereiche identifizieren konnten, bei deren Mutation eine Bindung von Hsp90 an Hop nicht mehr erfolgt. Dabei führte die Deletion der ersten 114 Aminosäuren zu einem dramatischen Verlust der Affinität von Hsp90 an Hop, genauso wie die Deletion der letzten vier Aminosäuren und eine Deletion der Aminosäuren 381-441. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass der Hsp90•Hop-Komplex ADP stärker bindet als ATP (Johnson *et al.*, 1998). Diese Daten korrelieren in weiten Zügen sehr gut mit den in dieser Arbeit dargestellten Messdaten. Die verstärkte Bindung von ADP gegenüber ATP erfolgt auch bei partnerproteinfreiem Hsp90. Daneben ist auch vorstellbar, dass die N-terminale Dimerisierung, die bei humanem Hsp90 ebenso wie bei Hefe-Hsp90 durch ATP ausgelöst wird, einen Teil der Affinität für ATP im humanen System beisteuert (Johnson *et al.*, 1998). Eine geringfügig schwächere Bindung von ATP wäre demnach dadurch erklärbar, dass das hHsp90 im Komplex mit Hop nicht mehr N-terminal dimerisieren kann. Allerdings ist diese Übertragbarkeit der hier gewonnenen mechanistischen Daten auf das humane System noch spekulativ.

Die Interaktion von Hsp90 mit Sba1

Die Interaktion von Sba1 erfolgt nicht nur unseren Daten zufolge an eine Hsp90-Konformation, die N-terminal dimerisiert ist. So konnte gezeigt werden, dass die p23-Bindung an die erste und zweite Domäne von Hsp90 zwar möglich war, aber nur dann stattfand, wenn dieses Konstrukt artifiziell dimerisiert wurde (Chadli *et al.*, 2000). Das Erreichen einer N-terminal dimerisierten Konformation erfordert die Bindung von ATP oder besser AMP-PNP, weshalb auch nur bei Anwesenheit dieser Nukleotide eine Bindung zu detektieren ist (Johnson *et al.*, 1996; Prodromou *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2002).

Die beobachtete Inhibition der ATPase-Aktivität durch Sba1 (Abbildung 4-59) ist vermutlich dadurch erklärbar, dass Sba1 diese Konformation während des ATPase-Zyklus bindet und dadurch die Schritte, die zur Hydrolyse führen, verlangsamt. Dabei scheint auch der Sba1•Hsp90-Komplex eine Hydrolysereaktion durchzuführen, wenn auch mit langsamerer Umsatzgeschwindigkeit. Anders ist es nicht zu erklären, dass durch die Zugabe von Sba1 zu $\Delta 8$ -Hsp90 nur eine Inhibition von 50% erreicht werden kann. Die Beobachtung, dass die Inhibition besonders bei $\Delta 8$ -Hsp90 sehr deutlich ausfällt, ist vermutlich dadurch zu erklären, dass bei diesem Protein der N-terminal dimerisierte Zustand während des ATPase-Zyklus stark akkumuliert ist und deswegen eine Inhibition hier leichter erfolgen kann. Die Integration von Sba1 in den ATPase-Zyklus führt zu folgendem Modell (Abbildung 4-62).

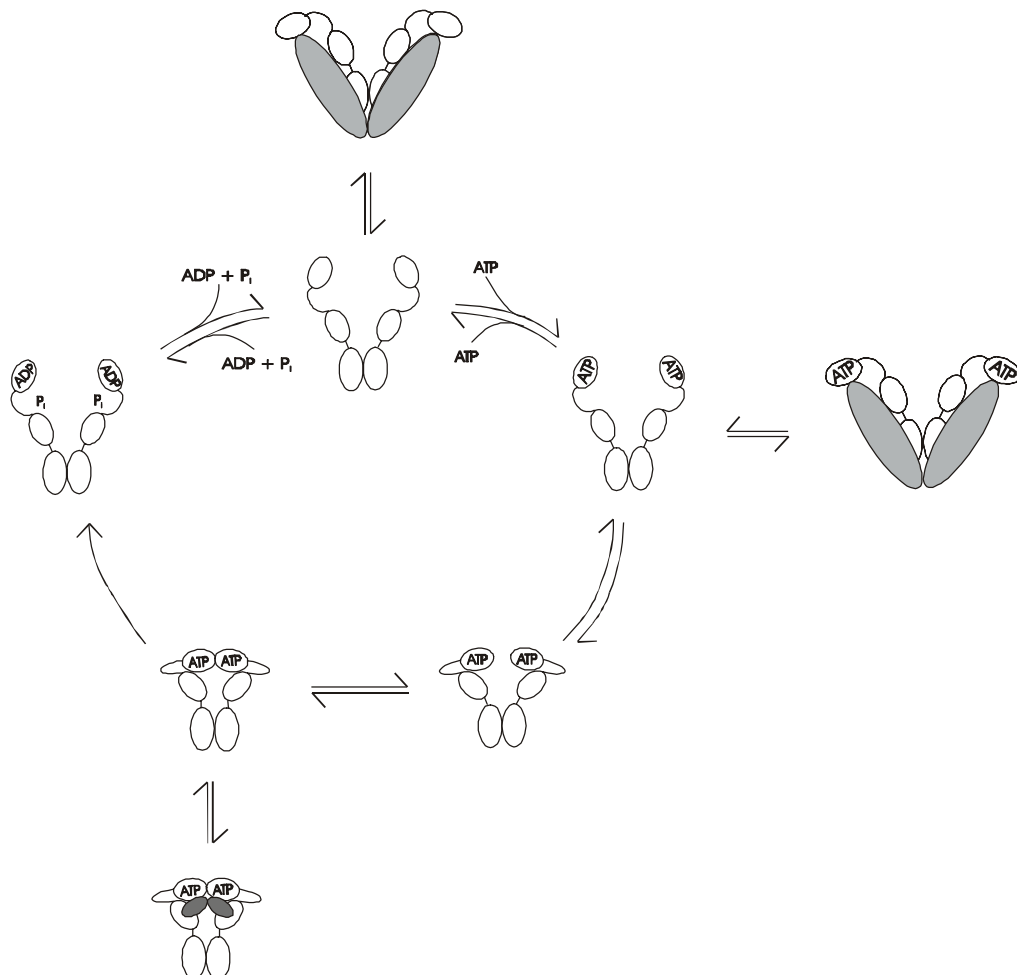


Abbildung 4-62: Modell des ATPase-Zyklus mit Partnerproteinen

Der obere Teil des Zyklus zeigt die Inhibition der Hsp90-ATPase durch Sti1, der untere Teil zeigt die Bindung von Sba1 an den N-terminal dimerisierten Zustand. Die Stöchiometrie der Sba1•Hsp90-Komplexe ist noch nicht geklärt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren vollständig auf Untersuchungen des Hefe-Systems. Eine Übertragbarkeit dieser Daten auf das Hsp90-System von höheren Eukaryonten ist nicht nachgewiesen, zumal sich die Partnerproteine Hop und p23 in beiden Systemen sehr unterschiedlich verhalten. Während im Hefe-System Hop/Sti1 ein Inhibitor der ATPase-Aktivität ist, hat Hop im humanen Hsp90-System keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von hHsp90 (McLaughlin *et al.*, 2002). Stattdessen ist hier p23 ein effizienter Inhibitor (McLaughlin *et al.*, 2002). Auch die Grundaktivitäten der beiden Hsp90-Proteine unterscheiden sich erheblich. Humanes Hsp90 besitzt eine ATPase-Aktivität von $0,05 \text{ min}^{-1}$ (McLaughlin *et al.*, 2002), während die Aktivität von Hefe-Hsp90 etwa 20mal so hoch ist. Zumindest über den Einfluß der Partnerproteine auf das jeweilige Hsp90-Protein lässt sich – basierend auf den hier erhaltenen Daten – spekulieren. So zeigt eine Mutante von Hefe-Hsp90 ($\Delta 8$ -Hsp90) in dieser Hinsicht ein Verhalten, wie dies auch für das humane Hsp90 zu beobachten ist. Der Einfluss von Sti1 auf die ATPase-Aktivität ist gering, und Sba1 wirkt stattdessen als starker Inhibitor. Ergebnisse, die in dieser Arbeit mit $\Delta 8$ -Hsp90 erzielt wurden, zeigen, dass bei dieser Mutante die ATP-induzierte N-terminale Dimerisierung im Vergleich zu Hsp90 verstärkt ist. Somit könnte es sein, dass ein erheblicher Unterschied zwischen dem humanen Hsp90 und dem Hefe-Hsp90 die verstärkte Tendenz zur ATP-abhängigen Dimerisierung im Falle des hHsp90 ist, während die Assoziation der Partnerproteine bei beiden Systemen in gleichem Ausmaß konformationsabhängig ist.

Hypothetisches Modell für den Chaperonzyklus von Hsp90

Mit Hilfe der vielen bereits bekannten Daten zu Hsp90 und zu seiner dynamischen Assoziation mit Partnerproteinen lässt sich aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zu ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und den damit verbundenen Konformationsänderungen ein Modell entwickeln, das den Chaperonzyklus von Hsp90 beschreibt. Dazu ist allerdings eine Übertragung einiger Daten aus dem humanen System auf das Hefe-System erforderlich.

Die Bindung der großen PPIase Cpr6 erfolgt im Hefe-System in Konkurrenz zu Sti1 (Prodromou *et al.*, 1999), während keine Daten zur Bildung von Sba1•Hsp90•Cpr6-Komplexen vorliegen. Dagegen ist für das humane System die Bildung der homologen p23•Hsp90•PPIase-Komplexe mehrfach nachgewiesen worden. Dies könnte somit auch für Cpr6, die große PPIase aus *S. cerevisiae* zutreffen, zumal in dieser Arbeit festgestellt wurde, dass Cpr6 – im Gegensatz zu Sti1 – keine Interaktionen mit N-terminalen Domänen von

Hsp90 eingeht (Tabelle 4-6), diese somit „frei“ wären für eine Interaktion mit Sba1. Während die stabile Bildung von Sti1•Hsp90•Sba1-Komplexen aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an die Hsp90-Konformation nicht zu erwarten ist, wäre die Bildung von Sba1•Hsp90•Cpr6-Komplexen durchaus möglich. Dieser Komplex – bestehend aus den humanen Proteinen – bildet im Chaperonzyklus einen wichtigen Schritt bei der Stimulierung der Hsp90-abhängigen Substrate. Da bisher keine Daten zugänglich sind, wie die Hydrolyse von ATP beim Durchlaufen des Chaperonzyklus erfolgt, und welche Konformationen das Hsp90 in den jeweiligen Komplexen einnimmt, lässt sich auf Basis der Beobachtung, dass zumindest zwei der drei Partnerproteine eine klare Präferenz für bestimmte Hsp90-Konformationen aufweisen, erstmals die Hydrolyse von ATP mit dem Chaperonzyklus verknüpfen. Die Verknüpfung der wichtigen Komplexe des Chaperonzyklus mit der ATP-Hydrolyse – wie sie durch diese Überlegungen erfolgt – legt nahe, dass die Assemblierung der Chaperonkomplexe durch den ATPase-Zyklus kontrolliert wird.

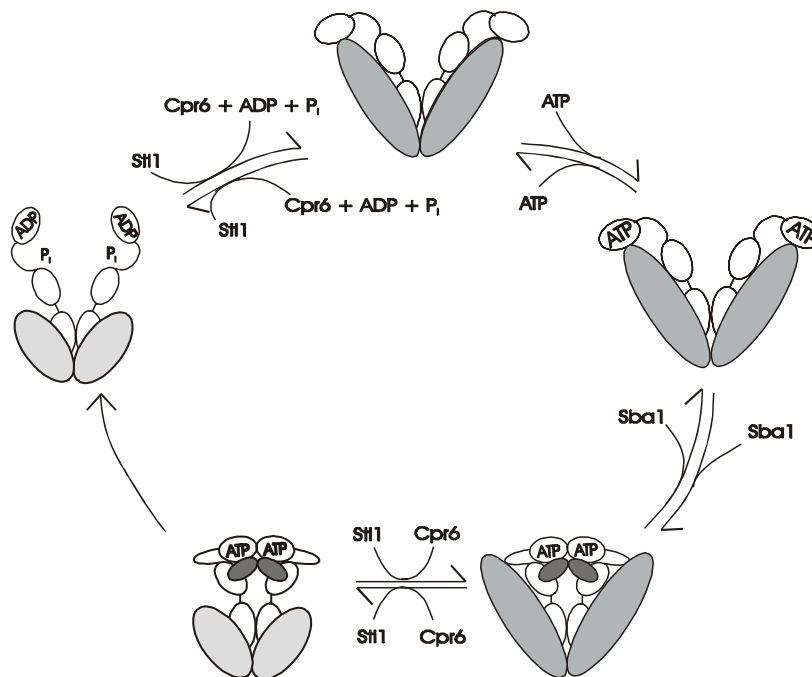


Abbildung 4-63: Darstellung des Chaperonzyklus unter Einbeziehung der Hsp90-ATPase

Der Hsp90-ATPase-Zyklus wurde verwendet, um die Assemblierung von Hsp90 mit den Proteinen Sba1 (dunkelgrau), Cpr6 (hellgrau) und Sti1 (grau) basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit zu erklären. Der Komplex bestehend aus Sti1, Sba1 und Hsp90 ist nur als transienter Komplex gedacht, um einen fließenden Übergang der Komplexe zu gewährleisten.

Basierend auf diesem Zyklus lässt sich vermuten, dass die Triebkraft, die den gesamten Zyklus antreibt die Hydrolyse von ATP ist. Nur wenn der Zyklus, ausgehend von einem

Sti1•Hsp90-Komplex, in dieser Form durchlaufen wird, kommt es zunächst zur Bindung von ATP und dann, unter Mithilfe von Sba1 und Cpr6, zur Verdrängung des Inhibitors Sti1 und dadurch zur N-terminalen Dimerisierung. Dazu sollten die beiden Proteine energetisch gesehen in der Lage sein, da die Interaktion von Cpr6 alleine bereits mit ähnlicher Affinität erfolgt, wie die Interaktion von Sti1 mit Hsp90. Die N-terminale Dimerisierung bildet einen essentiellen Zwischenschritt, da in dieser Konformation die Aktivierung der ATP-Hydrolyse erfolgt, so dass es ohne die beiden Partnerproteine Sba1 und Cpr6 nicht oder zumindest nur sehr verlangsamt zur Hydrolyse des ATPs käme. Die Hydrolyse und das damit entstehende ADP führen dann zur Freisetzung von Sba1 und damit zur Wiederherstellung der offenen Konformation von Hsp90.

Welche Bedeutung diese Multiprotein-Komplexe im Zusammenhang mit der Umsetzung von Substraten haben, ist für das humane System größtenteils verstanden. Hier ist bekannt, dass das Hsp90-Substrat durch den Hop•Hsp70-Komplex in den Hsp90-Zyklus eingeschleußt wird. Der entstehende Komplex aus Hop, Hsp70 und Hsp90 wird dann nach ATP-Bindung an Hsp90 durch den Komplex p23•Hsp90•PPIase abgelöst. In diesem Komplex scheint es zur Aktivierung des Substrates zu kommen. Zumindest ist ein Steroidhormonrezeptor, der mit diesem Komplex assoziiert ist, bereits in der Lage das Hormon zu binden. Die Bildung dieses Komplexes aus dem Hsp70•Hop•Hsp90-Komplex wird eventuell auch durch das Substrat selbst begünstigt, da sowohl für die PPIase, als auch für p23 eine Interaktion mit den Substraten vermutet wird. Prinzipiell ist es vorstellbar, dass die Konformationen des obigen Zyklus auch in Gegenwart von Substrat durchlaufen werden, da es kaum zu erwarten ist, dass die Konformationsspezifität der Proteine Sba1 und Sti1 durch die Anwesenheit von Substraten verändert wird. Eine strukturelle Umlagerung im Substrat wäre durch die Konformationsänderungen von Hsp90 während der Hydrolyse leicht vorzustellen, wenn dadurch die relative Lage von Substratbindestellen zueinander verändert würde. Somit wäre eine Kopplung der ATP-Hydrolyse an strukturelle Änderungen in den Substratproteinen erreichbar.

5. Zusammenfassung

Die Familie der Hsp90-Proteine ist eine der am höchsten konservierten Chaperonklassen. Die Aufgaben, die Hsp90-Proteine im zellulären Kontext erfüllen, reicht von der generellen Stabilisierung hitzelabiler Proteine bis zu der spezifischen Wechselwirkung mit Signaltransduktionskinasen, Transkriptionsfaktoren und einer Vielzahl weiterer nachgewiesener Substrate. Die meisten dieser Prozesse – mit Ausnahme der Stabilisierung von labilen Proteinen – erfordern die Hydrolyse von ATP durch Hsp90 und eine Inhibition dieser Hydrolyse, sei es durch Mutationen oder durch spezifische Inhibitoren, führt bei eukaryontischen Zellen zum Wachstumsstopp. Trotz ihrer Bedeutung für zelluläre Prozesse ist das Verständnis für die ATP-Hydrolyse von Hsp90 noch sehr gering. Eine zentrale Aufgabe dieser Arbeit war es deshalb, den Mechanismus der ATP-Hydrolyse von Hsp90 zu untersuchen und ein Modell zu entwickeln, das einen Einblick in den Hydrolysemechanismus gewähren kann. Die angestrebte Strategie ging von der Fragmentierung von Hsp90 aus. Es sollten definierte Fragmente, die im besten Fall einzelnen Domänen von Hsp90 entsprechen, konstruiert werden und die Stabilität, Struktur und Funktionalität dieser Fragmente demonstriert werden. Basierend auf diesen Fragmenten konnten einige Charakteristika des ATPase-Mechanismus aufgeklärt werden.

- 1) Die ATP-Hydrolyse stellt einen Zyklus dar, der ausgehend von der Bindung des ATPs eine Reihe von Konformationsänderungen durchläuft, die zu einer Konformation führen, bei der die N-terminalen Domänen dimerisiert vorliegen. Die Bildung dieser Struktur ist erforderlich, da eine Aktivierung der latenten ATPase-Aktivität in den einzelnen Untereinheiten scheinbar erst durch den Kontakt zwischen den beiden N-terminalen Domänen erreicht wird. Dieses Modell verbindet eine Reihe von vorherigen Untersuchungen, die bereits einzelne Konformationsänderungen beobachtet hatten.
- 2) Die Aktivierung im N-terminal dimerisierten Zustand scheint die ersten 24 Aminosäuren des Hsp90-Moleküls zu erfordern. Basierend auf den hier ermittelten Daten wurde ein Mechanismus postuliert, bei dem die ersten Aminosäuren der N-terminalen Domäne an die jeweilige Partnerdomäne binden. Dieser Austausch von Aminosäuren erfolgt analog zu den Proteinen GyraseB und MutL, bei denen dieser Zustand in einer Kristallstruktur sichtbar ist.

- 3) Die Deletion der acht N-terminalen Aminosäuren führt dagegen zu einem Protein, das eine verstärkte N-terminale Dimerisierung aufweist. Diese Mutante ist aktiv mit einer Umsatzrate, die etwa 30% über der von Hsp90 liegt. Die starke Stimulierung dieser Mutante durch inaktive Punktmutanten und die Beobachtung, dass die verstärkte Dimerisierung nur für den ATP-komplexierten Fall zutrifft, lässt vermuten, dass diese Mutante den ATP-Zyklus bis zur Dimerisierung beschleunigt durchläuft, die Hydrolyse, die zur Auflösung des dimeren Zustands führt, dann aber verlangsamt ist. Diese Hydrolyse könnte durch die inaktive Punktmutante stimuliert werden.

Neben der Untersuchung der ATPase-Aktivität des isolierten Hsp90 wurden auch Experimente mit den Partnerproteinen von Hsp90 durchgeführt. Dazu wurden die Proteine Sti1, Sba1 und Cpr6 verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Einblicke erhalten, die zum Verständnis für die Wirkung der Partnerproteine auf Hsp90 und zum Verständnis für die gerichtete Assemblierung der Partnerproteine im Rahmen des Chaperonzyklus beitragen.

- 1) Sti ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der Hsp90-ATPase. Dieser Mechanismus konnte dadurch verifiziert werden, dass die Bindung von Nukleotiden an den Hsp90•Sti1-Komplex nahezu unverändert erfolgt. Dieser Wirkmechanismus steht im Widerspruch zu den Daten anderer Gruppen, die Sti1 für einen kompetitiven Inhibitor gehalten hatten. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass Sti1 neben der bekannten C-terminalen Bindestelle eine bisher nicht identifizierte N-terminale Bindestelle erkennt. Vermutlich durch diese Interaktion ist es Sti1 möglich, die N-terminale Dimerisierung, die Hsp90 durchlaufen muss, um die ATP-Moleküle zu hydrolysieren, zu inhibieren.
- 2) Cpr6 bindet in den analog durchgeführten Studien mit einer ähnlichen Affinität wie Sti1 an das Volllängenprotein, zeigt diese Affinität aber auch in unverminderter Höhe gegenüber N-terminal deletierten Fragmenten. Somit ist zu beobachten, dass die Bindung von Cpr6 ausschließlich an die C-terminale Domäne erfolgt.
- 3) Sba1 bindet einen N-terminal dimerisierten Zustand und ist dadurch in der Lage, die ATPase von $\Delta 8$ -Hsp90 besonders stark zu inhibieren. Scheinbar ist der Effekt von Sba1 auf wt-Hsp90 nur deshalb sehr viel geringer, weil dieser N-terminal dimerisierte Zustand im Falle des wt-Hsp90 kaum populiert ist. Die Bindung von Sba1 führt dann jedoch nicht zu einer vollständigen Inhibierung der Hsp90-ATPase, sondern lediglich zu einer Reduktion auf etwa 50%. Dieser Wert deutet an, dass die Hydrolyse des ATP

auch von dem Sba1•Hsp90-Komplex durchgeführt wird, allerdings mit sehr viel langsamerer Geschwindigkeit. Die Bindung von Sba1 sowohl an Hsp90, als auch an $\Delta 8$ -Hsp90 erfolgt nur in Gegenwart von ATP (im Falle von $\Delta 8$ -Hsp90) oder AMP-PNP (im Falle von $\Delta 8$ -Hsp90 und Hsp90).

Diese Untersuchungen helfen, den bisher postulierten Chaperonzyklus soweit zu verstehen, dass die Hydrolyse von ATP, die bisher kein Bestandteil des Zyklus gewesen ist, zumindest in Form eines Modells erklärbar wird. Dabei wird durch die Anwesenheit der Partnerproteine ein Zyklus durchlaufen, bei dem die Konformationen, die Hsp90 annimmt, denen des ATPase-Zyklus entsprechen. Die Proteine Sti1 und Sba1 binden konformationsspezifisch, stabilisieren die jeweiligen Konformationen und führen somit zur Bildung der aus der Arbeit an Steroidhormonrezeptoren bekannten Multiproteinkomplexe. Auch die chronologische Reihenfolge, in der diese Komplexe durchlaufen werden, wird anhand dieses Modells deutlich und es ist zu vermuten, dass die Hydrolyse des ATP nicht nur die Konformationsänderungen im Hsp90-Molekül koordiniert, sondern auch die Assemblierung der Partnerproteine bestimmt.

Gerade im Hinblick darauf, dass die Hsp90-ATPase-Inhibitoren Geldanamycin und Radicicol in klinischen Studien auf ihr therapeutisches Potential erprobt werden, erscheint es wichtig, die von diesen Wirkstoffen blockierten Reaktionen zu verstehen. Die ATPase von Hsp90 ist der Schlüssel zum Verständnis dieses komplexen Proteinsystems, und die Untersuchung der ATPase zusammen mit Substraten und Partnerproteinen ist der Weg, der zum Verständnis dieses Proteins führen dürfte. Deshalb ist es wohl eine der wichtigsten Aufgaben, die es zu lösen gilt, die Expression von natürlichen Substraten, die *in vitro* zusammen mit diesen Proteinen untersucht werden können.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas-Terki, T., Donze, O. & Picard, D. (2000) The molecular chaperone Cdc37 is required for Ste11 function and pheromone-induced cell cycle arrest. *FEBS Lett.* **467**: 111-6
- Ali, J. A., Jackson, A. P., Howells, A. J. & Maxwell, A. (1993) The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry* **32**: 2717-24
- Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-30
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. & White, F. H. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **47**: 1309-14
- Baldwin, R. L. (1989) How does protein folding get started? *Trends Biochem. Sci.* **14**: 291-4
- Baldwin, R. L. (2002) Making a network of hydrophobic clusters. *Science* **295**: 1657-8
- Ban, C., Junop, M. & Yang, W. (1999) Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* **97**: 85-97
- Ban, C. & Yang, W. (1998) Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* **95**: 541-52
- Bardwell, J. C. (1997) *Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts*, Ed: Gething, M. J., *Oxford University Press*, Oxford
- Bardwell, J. C. & Craig, E. A. (1987) Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**: 5177-81
- Bardwell, J. C. & Craig, E. A. (1988) Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* **170**: 2977-83
- Beissinger, M. & Buchner, J. (1998) How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* **379**: 245-59
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas, A. & Forterre, P. (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**: 414-7
- Bijlmakers, M. J. & Marsh, M. (2000) Hsp90 is essential for the synthesis and subsequent membrane association, but not the maintenance, of the Src-kinase p56(lck). *Mol. Biol. Cell* **11**: 1585-95
- Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. & Simon, M. I. (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**: 131-41

- Bolivar, F. & Backman, K. (1979) Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* **68**: 245-67
- Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J. & Lindquist, S. (1989) hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell Biol.* **9**: 3919-30
- Bose, S., Weikl, T., Bugl, H. & Buchner, J. (1996) Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* **274**: 1715-7
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**: 248-54
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**: 578-86
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975) Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**: 4953-63
- Brinker, A., Scheufler, C., Von Der, M. F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I. & Hartl, F. U. (2002) Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. *J. Biol. Chem.* **277**: 19265-75
- Brino, L., Urzhumtsev, A., Mousli, M., Bronner, C., Mitschler, A., Oudet, P. & Moras, D. (2000) Dimerization of *Escherichia coli* DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *J. Biol. Chem.* **275**: 9468-75
- Brugge, J., Yonemoto, W. & Darrow, D. (1983) Interaction between the Rous sarcoma virus transforming protein and two cellular phosphoproteins: analysis of the turnover and distribution of this complex. *Mol. Cell Biol.* **3**: 9-19
- Brugge, J. S., Erikson, E. & Erikson, R. L. (1981) The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins. *Cell* **25**: 363-72
- Buchner, J. (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* **10**: 10-9
- Buchner, J. (1999) Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 136-41
- Bukau, B. & Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-66
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980) Biophysical Chemistry. *Freeman & Co*, San Francisco
- Carrello, A., Ingley, E., Minchin, R. F., Tsai, S. & Ratajczak, T. (1999) The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor-associated immunophilins and hop is located in the dimerization domain of Hsp90. *J. Biol. Chem.* **274**: 2682-9

- Catelli, M. G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J. M., Baulieu, E. E., Feramisco, J. R. & Welch, W. J. (1985b) The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J.* **4**: 3131-5
- Catelli, M. G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J. M., Baulieu, E. E., Feramisco, J. R. & Welch, W. J. (1985a) The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J.* **4**: 3131-5
- Cechetto, J. D. & Gupta, R. S. (2000) Immunoelectron microscopy provides evidence that tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP-1) is a mitochondrial protein which also localizes at specific extramitochondrial sites. *Exp. Cell Res.* **260**: 30-9
- Chadli, A., Bouhouche, I., Sullivan, W., Stensgard, B., McMahon, N., Catelli, M. G. & Toft, D. O. (2000) Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 12524-9
- Chadli, A., Ladjimi, M. M., Baulieu, E. E. & Catelli, M. G. (1999) Heat-induced oligomerization of the molecular chaperone Hsp90. Inhibition by ATP and geldanamycin and activation by transition metal oxyanions. *J. Biol. Chem.* **274**: 4133-9
- Chang, H. C., Nathan, D. F. & Lindquist, S. (1997) In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol. Cell Biol.* **17**: 318-25
- Chen, C. F., Chen, Y., Dai, K., Chen, P. L., Riley, D. J. & Lee, W. H. (1996a) A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol. Cell Biol.* **16**: 4691-9
- Chen, L. & Sigler, P. B. (1999) The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell* **99**: 757-68
- Chen, M. S., Silverstein, A. M., Pratt, W. B. & Chinkers, M. (1996b) The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J. Biol. Chem.* **271**: 32315-20
- Chen, S., Prapapanich, V., Rimerman, R. A., Honore, B. & Smith, D. F. (1996c) Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70. *Mol. Endocrinol.* **10**: 682-93
- Chen, S., Sullivan, W. P., Toft, D. O. & Smith, D. F. (1998) Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress. Chaperones.* **3**: 118-29
- Chernoff, Y. O., Lindquist, S. L., Ono, B., Inge-Vechtsov, S. G. & Liebman, S. W. (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science* **268**: 880-4
- Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Hohfeld, J. & Patterson, C. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* **3**: 93-6

- Cowing, D. W., Bardwell, J. C., Craig, E. A., Woolford, C., Hendrix, R. W. & Gross, C. A. (1985) Consensus sequence for Escherichia coli heat shock gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**: 2679-83
- Craig, E. A. & Yan, P. J. (1999) *Molecular Chaperones and Folding-Catalysts*, Ed: Bukau, B., Harwood, Amsterdam
- Creighton, T. E. (1975) The two-disulphide intermediates and the folding pathway of reduced pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **95**: 167-99
- Creighton, T. E. (1990) Protein folding. *Biochem. J.* **270**: 1-16
- Crevel, G., Bates, H., Huikeshoven, H. & Cotterill, S. (2001) The Drosophila Dpit47 protein is a nuclear Hsp90 co-chaperone that interacts with DNA polymerase alpha. *J. Cell Sci.* **114**: 2015-25
- Csermely, P., Kajtar, J., Hollosi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C. R., Gergely, P., Jr., Soti, C., Mihaly, K. & Somogyi, J. (1993) ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J. Biol. Chem.* **268**: 1901-7
- Cutforth, T. & Rubin, G. M. (1994) Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in Drosophila. *Cell* **77**: 1027-36
- Czar, M. J., Lyons, R. H., Welsh, M. J., Renoir, J. M. & Pratt, W. B. (1995) Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Mol. Endocrinol.* **9**: 1549-60
- Darby, N. J., Freedman, R. B. & Creighton, T. E. (1994) Dissecting the mechanism of protein disulfide isomerase: catalysis of disulfide bond formation in a model peptide. *Biochemistry* **33**: 7937-47
- Denis, M. & Gustafsson, J. A. (1989) The Mr approximately 90,000 heat shock protein: an important modulator of ligand and DNA-binding properties of the glucocorticoid receptor. *Cancer Res.* **49**: 2275s-81s
- Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D. & Chan, H. S. (1995) Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Sci.* **4**: 561-602
- Dill, K. A. & Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 10-9
- Dolinski, K. J., Cardenas, M. E. & Heitman, J. (1998) CNS1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in Saccharomyces cerevisiae that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol. Cell Biol.* **18**: 7344-52
- Duina, A. A., Chang, H. C., Marsh, J. A., Lindquist, S. & Gaber, R. F. (1996) A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science* **274**: 1713-5
- Duina, A. A., Kalton, H. M. & Gaber, R. F. (1998a) Requirement for Hsp90 and a CyP-40-type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response. *J. Biol. Chem.* **273**: 18974-8

- Duina, A. A., Marsh, J. A., Kurtz, R. B., Chang, H. C., Lindquist, S. & Gaber, R. F. (1998b) The peptidyl-prolyl isomerase domain of the CyP-40 cyclophilin homolog Cpr7 is not required to support growth or glucocorticoid receptor activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 10819-22
- Dutta, R. & Inouye, M. (2000) GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 24-8
- Eaglestone, S. S., Ruddock, L. W., Cox, B. S. & Tuite, M. F. (2000) Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI(+)] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 240-4
- Edman, P. & Begg, G. (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem* **1**: 80-91
- Ehrensperger, M., Buchner, J. & Gaestel, M. (1997a) Molecular Chaperones in the life cycle of Proteins, Ed: Fink, A. L. & Goto, Y., *Marcel Dekker*, New York
- Ehrensperger, M., Graber, S., Gaestel, M. & Buchner, J. (1997b) Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**: 221-9
- Eleuteri, A. M., Cuccioloni, M., Bellesi, J., Lupidi, G., Fioretti, E. & Angeletti, M. (2002) Interaction of Hsp90 with 20S proteasome: thermodynamic and kinetic characterization. *Proteins* **48**: 169-77
- Ellis, J. (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328**: 378-9
- Emelyanov, V. V. (2002) Phylogenetic relationships of organellar Hsp90 homologs reveal fundamental differences to organellar Hsp70 and Hsp60 evolution. *Gene* **299**: 125-33
- Erkine, A. M., Magrogan, S. F., Sekinger, E. A. & Gross, D. S. (1999) Cooperative binding of heat shock factor to the yeast HSP82 promoter in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.* **19**: 1627-39
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-17
- Felts, S. J., Owen, B. A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D. B. & Toft, D. O. (2000) The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J. Biol. Chem.* **275**: 3305-12
- Fenton, W. A. & Horwich, A. L. (1997) GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci.* **6**: 743-60
- Fersht, A. R. (1997) Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 3-9
- Fersht, A. R. & Daggett, V. (2002) Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell* **108**: 573-82
- Fischer, G. (1994a) *Angew. Chem.* **106**: 1479-501

- Fischer, G. (1994b) *Angew. Chem.* **106**: 1479-501
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem* **155**: 83-8
- Freeman, B. C., Felts, S. J., Toft, D. O. & Yamamoto, K. R. (2000) The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev.* **14**: 422-34
- Freeman, B. C. & Morimoto, R. I. (1996) The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J.* **15**: 2969-79
- Freeman, B. C., Toft, D. O. & Morimoto, R. I. (1996) Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* **274**: 1718-20
- Garcia-Ranea, J. A., Mirey, G., Camonis, J. & Valencia, A. (2002) p23 and HSP20/alpha-crystallin proteins define a conserved sequence domain present in other eukaryotic protein families. *FEBS Lett.* **529**: 162-7
- Gardiner, L. P., Roper, D. I., Hammonds, T. R. & Maxwell, A. (1998) The N-terminal domain of human topoisomerase IIalpha is a DNA-dependent ATPase. *Biochemistry* **37**: 16997-7004
- Garnier, C., Lafitte, D., Jorgensen, T. J., Jensen, O. N., Briand, C. & Peyrot, V. (2001) Phosphorylation and oligomerization states of native pig brain HSP90 studied by mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2402-7
- Garnier, C., Lafitte, D., Tsvetkov, P. O., Barbier, P., Leclerc-Devin, J., Millot, J. M., Briand, C., Makarov, A. A., Catelli, M. G. & Peyrot, V. (2002) Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **277**: 12208-14
- Gething, M. J. & Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45
- Glover, J. R. & Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82
- Go, N. & Taketomi, H. (1978) Respective roles of short- and long-range interactions in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**: 559-63
- Goldberg, D. P. (1989) Protein Structure: A practical approach, Ed: Creighton, T. E., *IRL Press*, Oxford
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A. P., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**: 13732-7

- Grammatikakis, N., Vultur, A., Ramana, C. V., Sigano, A., Schweinfest, C. W., Watson, D. K. & Raptis, L. (2002) The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J. Biol. Chem.* **277**: 8312-20
- Grandin, N. & Charbonneau, M. (2001) Hsp90 levels affect telomere length in yeast. *Mol. Genet. Genomics* **265**: 126-34
- Grenert, J. P., Johnson, B. D. & Toft, D. O. (1999) The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J. Biol. Chem.* **274**: 17525-33
- 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., Neckers, L. M. & Toft, D. O. (1997) The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J. Biol. Chem.* **272**: 23843-50
- Gruebele, M. (2002) Protein folding: the free energy surface. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 161-8
- Guarne, A., Junop, M. S. & Yang, W. (2001) Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase. *EMBO J.* **20**: 5521-31
- Gupta, R. S. (1995) Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 1063-73
- Gupta, R. S. & Golding, G. B. (1996) The origin of the eukaryotic cell. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 166-71
- Hansen, L. K., Houchins, J. P. & O'Leary, J. J. (1991) Differential regulation of HSC70, HSP70, HSP90 alpha, and HSP90 beta mRNA expression by mitogen activation and heat shock in human lymphocytes. *Exp. Cell Res.* **192**: 587-96
- Harris, N., MacLean, M., Hatzianthis, K., Panaretou, B. & Piper, P. W. (2001) Increasing *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance, through the overactivation of the heat shock response resulting from defects in the Hsp90 chaperone, does not extend replicative life span but can be associated with slower chronological ageing of nondividing cells. *Mol. Genet. Genomics* **265**: 258-63
- Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-9
- Hartson, S. D., Irwin, A. D., Shao, J., Scroggins, B. T., Volk, L., Huang, W. & Matts, R. L. (2000) p50(cdc37) is a nonexclusive Hsp90 cohort which participates intimately in Hsp90-mediated folding of immature kinase molecules. *Biochemistry* **39**: 7631-44
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. & Buchner, J. (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* **18**: 6744-51
- Heitzer, A., Mason, C. A., Snozzi, M. & Hamer, G. (1990) Some effects of growth conditions on steady state and heat shock induced htpG gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **155**: 7-12

- Hernandez, M. P., Chadli, A. & Toft, D. O. (2002) HSP40 binding is the first step in the HSP90 chaperoning pathway for the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* **277**: 11873-81
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32
- Heyde, M. & Portalier, R. (1990) Acid shock proteins of Escherichia coli. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 19-26
- Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**: 10449-53
- Hossain, M. M. & Nakamoto, H. (2002) HtpG plays a role in cold acclimation in cyanobacteria. *Curr. Microbiol.* **44**: 291-6
- Hossain, M. M. & Nakamoto, H. (2003) Role for the Cyanobacterial HtpG in Protection from Oxidative Stress. *Curr. Microbiol.* **46**: 70-6
- Housley, P. R., Sanchez, E. R., Danielsen, M., Ringold, G. M. & Pratt, W. B. (1990) Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two-site model for hsp90 binding to the steroid binding domain. *J. Biol. Chem.* **265**: 12778-81
- Hu, J. & Seeger, C. (1996) Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**: 1060-4
- Imai, J. & Yahara, I. (2000) Role of HSP90 in salt stress tolerance via stabilization and regulation of calcineurin. *Mol. Cell Biol.* **20**: 9262-70
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1986) Refolding and association of oligomeric proteins. *Methods Enzymol.* **131**: 218-50
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1989) Protein Structure: A practical approach, Ed: Creighton, T. E., *IRL Press*, Oxford
- Jakob, U. & Buchner, J. (1994) Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 205-11
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. & Buchner, J. (1995a) Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**: 7288-94
- Jakob, U., Meyer, I., Bugl, H., Andre, S., Bardwell, J. C. & Buchner, J. (1995b) Structural organization of procaryotic and eucaryotic Hsp90. Influence of divalent cations on structure and function. *J. Biol. Chem.* **270**: 14412-9
- Jakob, U., Scheibel, T., Bose, S., Reinstein, J. & Buchner, J. (1996) Assessment of the ATP binding properties of Hsp90. *J. Biol. Chem.* **271**: 10035-41

- Jelesarov, I. & Bosshard, H. R. (1999) Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **12**: 3-18
- Jessee, J. (1986) *FOCUS* **8**: 9-10
- Jibard, N., Meng, X., Leclerc, P., Rajkowski, K., Fortin, D., Schweizer-Groyer, G., Catelli, M. G., Baulieu, E. E. & Cadepond, F. (1999) Delimitation of two regions in the 90-kDa heat shock protein (Hsp90) able to interact with the glucocorticosteroid receptor (GR). *Exp. Cell Res.* **247**: 461-74
- Johnson, B. D., Chadli, A., Felts, S. J., Bouhouche, I., Catelli, M. G. & Toft, D. O. (2000) Hsp90 chaperone activity requires the full-length protein and interaction among its multiple domains. *J. Biol. Chem.* **275**: 32499-507
- Johnson, B. D., Schumacher, R. J., Ross, E. D. & Toft, D. O. (1998) Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.* **273**: 3679-86
- Johnson, J., Corbisier, R., Stensgard, B. & Toft, D. (1996) The involvement of p23, hsp90, and immunophilins in the assembly of progesterone receptor complexes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **56**: 31-7
- Johnson, J. L., Beito, T. G., Krco, C. J. & Toft, D. O. (1994) Characterization of a novel 23-kilodalton protein of inactive progesterone receptor complexes. *Mol. Cell Biol.* **14**: 1956-63
- Johnson, J. L. & Toft, D. O. (1994) A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J. Biol. Chem.* **269**: 24989-93
- Johnson, J. L. & Toft, D. O. (1995) Binding of p23 and hsp90 during assembly with the progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* **9**: 670-8
- Kampranis, S. C., Bates, A. D. & Maxwell, A. (1999) A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**: 8414-9
- Kelley, P. M. & Schlesinger, M. J. (1982) Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species. *Mol. Cell Biol.* **2**: 267-74
- Kim, K. K., Kim, R. & Kim, S. H. (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**: 595-9
- Kimura, Y., Rutherford, S. L., Miyata, Y., Yahara, I., Freeman, B. C., Yue, L., Morimoto, R. I. & Lindquist, S. (1997) Cdc37 is a molecular chaperone with specific functions in signal transduction. *Genes Dev.* **11**: 1775-85
- Kortemme, T., Ramirez-Alvarado, M. & Serrano, L. (1998) Design of a 20-amino acid, three-stranded beta-sheet protein. *Science* **281**: 253-6
- Krishna, P. & Gloor, G. (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress. Chaperones.* **6**: 238-46

- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-32
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5
- Lai, B. T., Chin, N. W., Stanek, A. E., Keh, W. & Lanks, K. W. (1984) Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol. Cell Biol.* **4**: 2802-10
- Lange, B. M., Rebollo, E., Herold, A. & Gonzalez, C. (2002) Cdc37 is essential for chromosome segregation and cytokinesis in higher eukaryotes. *EMBO J.* **21**: 5364-74
- Lanks, K. W. & Kasambalides, E. J. (1979) Purification and characterization of a major component from the cytoplasmic matrix of cultured murine L cells. *Biochim. Biophys. Acta* **578**: 1-12
- Laue, T. M. & Stafford, W. F., III (1999) Modern applications of analytical ultracentrifugation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**: 75-100
- Lee, G. J. & Vierling, E. (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol* **122**: 189-98
- Levinthal, C. (1968) *J. Chim. Phys.* **65**: 44-5
- Li, M. & Schweizer, H. P. (1993) *FOCUS* **14/15**: 19-20
- Liang, P. & MacRae, T. H. (1997) Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **110** (Pt 13): 1431-40
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. & Zylicz, M. (1991) Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**: 2874-8
- Lorimer, G. H. (1996) A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo. *FASEB J.* **10**: 5-9
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998) Bioanalytik. *Spektrum Verlag*, Berlin
- Louvion, J. F., Abbas-Terki, T. & Picard, D. (1998) Hsp90 is required for pheromone signaling in yeast. *Mol. Biol. Cell* **9**: 3071-83
- Louvion, J. F., Warth, R. & 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**: 13937-42
- Malmqvist, M. (1993) Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 282-6
- Margosiak, S. A., Vanderpool, D. L., Sisson, W., Pinko, C. & Kan, C. C. (1996) Dimerization of the human cytomegalovirus protease: kinetic and biochemical characterization of the catalytic homodimer. *Biochemistry* **35**: 5300-7

- Marsh, J. A., Kalton, H. M. & Gaber, R. F. (1998) Cns1 is an essential protein associated with the hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin 40-dependent functions in *cpr7Delta* cells. *Mol. Cell Biol.* **18**: 7353-9
- Maruya, M., Sameshima, M., Nemoto, T. & Yahara, I. (1999) Monomer arrangement in HSP90 dimer as determined by decoration with N and C-terminal region specific antibodies. *J. Mol. Biol.* **285**: 903-7
- Mayr, C., Richter, K., Lilie, H. & Buchner, J. (2000) Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90-associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae*, differ in their functional properties. *J. Biol. Chem.* **275**: 34140-6
- McLaughlin, S. H., Smith, H. W. & Jackson, S. E. (2002) Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. *J. Mol. Biol.* **315**: 787-98
- Meng, X., Devin, J., Sullivan, W. P., Toft, D., Baulieu, E. E. & Catelli, M. G. (1996) Mutational analysis of Hsp90 alpha dimerization and subcellular localization: dimer disruption does not impede 'in vivo' interaction with estrogen receptor. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 7): 1677-87
- Minami, M., Nakamura, M., Emori, Y. & Minami, Y. (2001) Both the N- and C-terminal chaperone sites of Hsp90 participate in protein refolding. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2520-4
- Minami, Y., Kawasaki, H., Minami, M., Tanahashi, N., Tanaka, K. & Yahara, I. (2000) A critical role for the proteasome activator PA28 in the Hsp90-dependent protein refolding. *J. Biol. Chem.* **275**: 9055-61
- Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K. & Yahara, I. (1994) The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol. Cell Biol.* **14**: 1459-64
- Miyata, Y. & Yahara, I. (1992) The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.* **267**: 7042-7
- Montel, V., Gardrat, F., Azanza, J. L. & Raymond, J. (1999) 20S proteasome, hsp90, p97 fusion protein, PA28 activator copurifying oligomers and ATPase activities. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47**: 465-72
- Morimoto, R. I., Tissieres, A. & Georgopoulos, C. (1994) *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Ed: Morimoto, R. I., Tissieres, A. & Georgopoulos, C., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour
- Morishima, Y., Kanelakis, K. C., Murphy, P. J., Shewach, D. S. & Pratt, W. B. (2001) Evidence for iterative ratcheting of receptor-bound hsp70 between its ATP and ADP conformations during assembly of glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplexes. *Biochemistry* **40**: 1109-16
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. & Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* **2**: 1133-8

- Nadeau, K., Das, A. & Walsh, C. T. (1993) Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* **268**: 1479-87
- Nathan, D. F., Vos, M. H. & Lindquist, S. (1997) In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**: 12949-56
- Nathan, D. F., Vos, M. H. & Lindquist, S. (1999) Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**: 1409-14
- Neckers, L. (2002) Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol. Med.* **8**: S55-S61
- Neckers, L., Schulte, T. W. & Mimnaugh, E. (1999) Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Invest New Drugs* **17**: 361-73
- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M., Takagi, T. & Yokoyama, K. (1995) Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.* **233**: 1-8
- Nemoto, T. & Sato, N. (1998) Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *Biochem. J.* **330** (Pt 2): 989-95
- Neri, D., Billeter, M., Wider, G. & Wuthrich, K. (1992) NMR determination of residual structure in a urea-denatured protein, the 434-repressor. *Science* **257**: 1559-63
- Nollen, E. A. & Morimoto, R. I. (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J. Cell Sci.* **115**: 2809-16
- Obermann, W. M., Sondermann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P. & Hartl, F. U. (1998) In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* **143**: 901-10
- Owen, B. A., Sullivan, W. P., Felts, S. J. & Toft, D. O. (2002) Regulation of heat shock protein 90 ATPase activity by sequences in the carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **277**: 7086-91
- Owens-Grillo, J. K., Czar, M. J., Hutchison, K. A., Hoffmann, K., Perdew, G. H. & Pratt, W. B. (1996) A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J. Biol. Chem.* **271**: 13468-75
- Owens-Grillo, J. K., Hoffmann, K., Hutchison, K. A., Yem, A. W., Deibel, M. R., Jr., Handschumacher, R. E. & Pratt, W. B. (1995) The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 20479-84
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1998) ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.* **17**: 4829-36

- Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J. K., Singh, S., Millson, S. H., Clarke, P. A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Cramer, R., Mollapour, M., Workman, P., Piper, P. W., Pearl, L. H. & Prodromou, C. (2002a) Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol. Cell* **10**: 1307-18
- Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J. K., Singh, S., Millson, S. H., Clarke, P. A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Cramer, R., Mollapour, M., Workman, P., Piper, P. W., Pearl, L. H. & Prodromou, C. (2002b) Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol. Cell* **10**: 1307-18
- Perdew, G. H., Wiegand, H., Vanden Heuvel, J. P., Mitchell, C. & Singh, S. S. (1997) A 50 kilodalton protein associated with raf and pp60(v-src) protein kinases is a mammalian homolog of the cell cycle control protein cdc37. *Biochemistry* **36**: 3600-7
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M. J., Fortin, M. G., Lindquist, S. & Yamamoto, K. R. (1990) Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* **348**: 166-8
- Pirkl, F., Fischer, E., Modrow, S. & Buchner, J. (2001) Localization of the chaperone domain of FKBP52. *J. Biol. Chem.* **276**: 37034-41
- Pratt, W. B. (1997) The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 297-326
- Pratt, W. B., Silverstein, A. M. & Galigniana, M. D. (1999) A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal.* **11**: 839-51
- Pratt, W. B. & Toft, D. O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**: 306-60
- Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Roe, S. M., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (2000) The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.* **19**: 4383-92
- Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & 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. & 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**: 477-82
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D. N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.* **18**: 754-62
- Prusiner, S. B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* **278**: 245-51
- Queitsch, C., Sangster, T. A. & Lindquist, S. (2002) Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* **417**: 618-24

- Radanyi, C., Renoir, J. M., Sabbah, M. & Baulieu, E. E. (1989) Chick heat-shock protein of Mr = 90,000, free or released from progesterone receptor, is in a dimeric form. *J. Biol. Chem.* **264**: 2568-73
- Ramsey, A. J., Russell, L. C., Whitt, S. R. & Chinkers, M. (2000) Overlapping sites of tetratricopeptide repeat protein binding and chaperone activity in heat shock protein 90. *J. Biol. Chem.* **275**: 17857-62
- Randow, F. & Seed, B. (2001) Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat. Cell Biol.* **3**: 891-6
- Ripley, B. J., Stephanou, A., Isenberg, D. A. & Latchman, D. S. (1999) Interleukin-10 activates heat-shock protein 90beta gene expression. *Immunology* **97**: 226-31
- Roe, S. M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1999) Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.* **42**: 260-6
- Roulland-Dussoix, D. & Boyer, H. W. (1969) The Escherichia coli B restriction endonuclease. *Biochim. Biophys. Acta* **195**: 219-29
- Rutherford, S. L. & Lindquist, S. (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**: 336-42
- Rye, H. S., Burston, S. G., Fenton, W. A., Beechem, J. M., Xu, Z., Sigler, P. B. & Horwich, A. L. (1997) Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature* **388**: 792-8
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. In: *Cold Spring Harbor Press*, New York
- Sanger, F. (1949) *Biochem J.* **44**: 126-8
- Scheibel, T., Neuhofen, S., Weikl, T., Mayr, C., Reinstein, J., Vogel, P. D. & Buchner, J. (1997) ATP-binding properties of human Hsp90. *J. Biol. Chem.* **272**: 18608-13
- Scheibel, T., Weikl, T. & Buchner, J. (1998) Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 1495-9
- Scheibel, T., Weikl, T., Rimerman, R., Smith, D., Lindquist, S. & Buchner, J. (1999) Contribution of N- and C-terminal domains to the function of Hsp90 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **34**: 701-13
- Scherrer, L. C., Dalman, F. C., Massa, E., Meshinchi, S. & Pratt, W. B. (1990) Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex. *J. Biol. Chem.* **265**: 21397-400
- Scherrer, L. C., Picard, D., Massa, E., Harmon, J. M., Simons, S. S., Jr., Yamamoto, K. R. & Pratt, W. B. (1993) Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry* **32**: 5381-6

- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. & Moarefi, I. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**: 199-210
- Schmid, F. X. (1997a) Protein Structure: A practical approach, Ed: Creighton, T. E., *IRL Press*, Oxford
- Schmid, F. X. (1997b) Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins, Ed: Fink, A. L. & Goto, Y., *Marcel Dekker*, New York
- Schmitz, G., Schmidt, M. & Feierabend, J. (1996) Characterization of a plastid-specific HSP90 homologue: identification of a cDNA sequence, phylogenetic descendance and analysis of its mRNA and protein expression. *Plant Mol. Biol.* **30**: 479-92
- Scholz, G. M., Cartledge, K. & Hall, N. E. (2001) Identification and characterization of Hsc70, a novel Hsp90-associating relative of Cdc37. *J. Biol. Chem.* **276**: 30971-9
- Schroder, H., Langer, T., Hartl, F. U. & Bukau, B. (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* **12**: 4137-44
- Schulz, A., Schwab, S., Homuth, G., Versteeg, S. & Schumann, W. (1997) The htpG gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. *J. Bacteriol.* **179**: 3103-9
- Schumacher, R. J., Hansen, W. J., Freeman, B. C., Alnemri, E., Litwack, G. & Toft, D. O. (1996) Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation. *Biochemistry* **35**: 14889-98
- Schumacher, R. J., Hurst, R., Sullivan, W. P., McMahon, N. J., Toft, D. O. & Matts, R. L. (1994) ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **269**: 9493-9
- Sengchanthalangsy, L. L., Datta, S., Huang, D. B., Anderson, E., Braswell, E. H. & Ghosh, G. (1999) Characterization of the dimer interface of transcription factor NFkappaB p50 homodimer. *J. Mol. Biol.* **289**: 1029-40
- Shaknovich, R., Shue, G. & Kohtz, D. S. (1992) Conformational activation of a basic helix-loop-helix protein (MyoD1) by the C-terminal region of murine HSP90 (HSP84). *Mol. Cell Biol.* **12**: 5059-68
- Shortle, D. (1996) The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J.* **10**: 27-34
- Shortle, D. & Ackerman, M. S. (2001) Persistence of native-like topology in a denatured protein in 8 M urea. *Science* **293**: 487-9
- Shue, G. & Kohtz, D. S. (1994) Structural and functional aspects of basic helix-loop-helix protein folding by heat-shock protein 90. *J. Biol. Chem.* **269**: 2707-11

- Sikorski, R. S., Boguski, M. S., Goebel, M. & Hieter, P. (1990) A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* **60**: 307-17
- Siligardi, G., Panaretou, B., Meyer, P., Singh, S., Woolfson, D. N., Piper, P. W., Pearl, L. H. & Prodromou, C. (2002) Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J. Biol. Chem.* **277**: 20151-9
- Silverstein, A. M., Grammatikakis, N., Cochran, B. H., Chinkers, M. & Pratt, W. B. (1998) p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J. Biol. Chem.* **273**: 20090-5
- Skouboe, C., Bjergbaek, L., Oestergaard, V. H., Larsen, M. K., Knudsen, B. R. & Andersen, A. H. (2002) A human topoisomerase IIa heterodimer with only one ATP binding site can go through successive catalytic cycles. *J. Biol. Chem.*
- Smith, D. F. (1993) Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol. Endocrinol.* **7**: 1418-29
- Smith, D. F., Sullivan, W. P., Marion, T. N., Zaitsev, K., Madden, B., McCormick, D. J. & Toft, D. O. (1993) Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol. Cell Biol.* **13**: 869-76
- Song, H. Y., Dunbar, J. D., Zhang, Y. X., Guo, D. & Donner, D. B. (1995) Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 3574-81
- Soti, C., Racz, A. & Csermely, P. (2002) A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem.* **277**: 7066-75
- Srere, P. A., Brazil, H. & Gonen, L. (1963) *Acta Chem Scand* **17**: 129-33
- Stancato, L. F., Silverstein, A. M., Owens-Grillo, J. K., Chow, Y. H., Jove, R. & Pratt, W. B. (1997) The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J. Biol. Chem.* **272**: 4013-20
- Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U. & Pavletich, N. P. (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**: 239-50
- Stewart, S., Sundaram, M., Zhang, Y., Lee, J., Han, M. & Guan, K. L. (1999) Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol. Cell Biol.* **19**: 5523-34
- Sullivan, W., Stensgard, B., Caucutt, G., Bartha, B., McMahon, N., Alnemri, E. S., Litwack, G. & Toft, D. (1997) Nucleotides and two functional states of hsp90. *J. Biol. Chem.* **272**: 8007-12

- Sullivan, W. P., Owen, B. A. & Toft, D. O. (2002) The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90. *J. Biol. Chem.*
- Surette, M. G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E. G., Ninfa, A. & Stock, J. B. (1996) Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **271**: 939-45
- Tanaka, N. & Nakamoto, H. (1999) HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS Lett.* **458**: 117-23
- Tanaka, T., Saha, S. K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M. B., Yamazaki, T., Ono, A. M., Kainosho, M., Inouye, M. & Ikura, M. (1998) NMR structure of the histidine kinase domain of the E. coli osmosensor EnvZ. *Nature* **396**: 88-92
- Taylor, P., Dornan, J., Carrello, A., Minchin, R. F., Ratajczak, T. & Walkinshaw, M. D. (2001) Two structures of cyclophilin 40: folding and fidelity in the TPR domains. *Structure. (Camb.)* **9**: 431-8
- Uehara, Y., Murakami, Y., Sugimoto, Y. & Mizuno, S. (1989) Mechanism of reversion of Rous sarcoma virus transformation by herbimycin A: reduction of total phosphotyrosine levels due to reduced kinase activity and increased turnover of p60v-src1. *Cancer Res.* **49**: 780-5
- Ungermann, C., Neupert, W. & Cyr, D. M. (1994) The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* **266**: 1250-3
- van der Straten, A., Rommel, C., Dickson, B. & Hafen, E. (1997) The heat shock protein 83 (Hsp83) is required for Raf-mediated signalling in Drosophila. *EMBO J.* **16**: 1961-9
- Veitshans, T., Klimov, D. & Thirumalai, D. (1997) Protein folding kinetics: timescales, pathways and energy landscapes in terms of sequence-dependent properties. *Fold. Des* **2**: 1-22
- Villarejo, M. R. & Zabin, I. (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J. Bacteriol.* **120**: 466-74
- Voss, A. K., Thomas, T. & Gruss, P. (2000) Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development* **127**: 1-11
- Walker, G. M. (1998) Yeast Physiology and Biotechnology. Wiley, New York
- Wall, D., Zylicz, M. & Georgopoulos, C. (1994) The NH₂-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J. Biol. Chem.* **269**: 5446-51
- Walter, S. & Buchner, J. (2002) Molecular chaperones-cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **41**: 1098-113
- Weaver, A. J., Sullivan, W. P., Felts, S. J., Owen, B. A. & Toft, D. O. (2000) Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone. *J. Biol. Chem.* **275**: 23045-52

- Weber-Ban, E. U., Reid, B. G., Miranker, A. D. & Horwich, A. L. (1999) Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* **401**: 90-3
- Weikl, T., Abelmann, K. & Buchner, J. (1999) An unstructured C-terminal region of the Hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. *J. Mol. Biol.* **293**: 685-91
- Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J. & Buchner, J. (2000) C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. *J. Mol. Biol.* **303**: 583-92
- Welch, W. J. & Feramisco, J. R. (1982) Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **257**: 14949-59
- Wetlaufer, D. B. (1962) *Adv Protein Chem* **17**: 303-9
- Wetlaufer, D. B. (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **70**: 697-701
- Wetzel, R. (1997) *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Ed: Fink, A. L. & Goto, Y., *Marcel Dekker*, New York
- Whitelaw, M. L., Hutchison, K. & Perdew, G. H. (1991) A 50-kDa cytosolic protein complexed with the 90-kDa heat shock protein (hsp90) is the same protein complexed with pp60v-src hsp90 in cells transformed by the Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* **266**: 16436-40
- Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. & 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**: 8324-8
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. & Jakob, U. (1992) Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* **358**: 169-70
- Wigley, D. B., Davies, G. J., Dodson, E. J., Maxwell, A. & Dodson, G. (1991) Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351**: 624-9
- Wolynes, P., Luthey-Schulten, Z. & Onuchic, J. (1996) Fast-folding experiments and the topography of protein folding energy landscapes. *Chem. Biol.* **3**: 425-32
- Xu, M., Dittmar, K. D., Giannoukos, G., Pratt, W. B. & Simons, S. S., Jr. (1998) Binding of hsp90 to the glucocorticoid receptor requires a specific 7-amino acid sequence at the amino terminus of the hormone-binding domain. *J. Biol. Chem.* **273**: 13918-24
- Xu, Y. & Lindquist, S. (1993) Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 7074-8
- Xu, Y., Singer, M. A. & 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**: 109-14

- Xu, Z., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**: 741-50
- Yamada, S., Ono, T., Mizuno, A. & Nemoto, T. K. (2003) A hydrophobic segment within the C-terminal domain is essential for both client-binding and dimer formation of the HSP90-family molecular chaperone. *Eur. J. Biochem.* **270**: 146-54
- Yonehara, M., Minami, Y., Kawata, Y., Nagai, J. & Yahara, I. (1996) Heat-induced chaperone activity of HSP90. *J. Biol. Chem.* **271**: 2641-5
- Young, J. C. & Hartl, F. U. (2000) Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J.* **19**: 5930-40
- Young, J. C., Schneider, C. & Hartl, F. U. (1997) In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett.* **418**: 139-43
- Yue, L., Karr, T. L., Nathan, D. F., Swift, H., Srinivasan, S. & Lindquist, S. (1999) Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in Drosophila spermatogenesis. *Genetics* **151**: 1065-79
- Zarzov, P., Boucherie, H. & Mann, C. (1997) A yeast heat shock transcription factor (Hsf1) mutant is defective in both Hsc82/Hsp82 synthesis and spindle pole body duplication. *J. Cell Sci.* **110** (Pt 16): 1879-91
- Zhang, S. L., Yu, J., Cheng, X. K., Ding, L., Heng, F. Y., Wu, N. H. & Shen, Y. F. (1999) Regulation of human hsp90alpha gene expression. *FEBS Lett.* **444**: 130-5
- Zhou, Y. N., Kusukawa, N., Erickson, J. W., Gross, C. A. & Yura, T. (1988) Isolation and characterization of Escherichia coli mutants that lack the heat shock sigma factor sigma 32. *J. Bacteriol.* **170**: 3640-9
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E. & Hendrickson, W. A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**: 1606-14
- Ziemiecki, A., Catelli, M. G., Joab, I. & Moncharmont, B. (1986) Association of the heat shock protein hsp90 with steroid hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**: 1298-307

7. Abkürzungen

A	Ampere
Å	Angström = 0.1 nm = 10 ⁻¹⁰ m
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATPase	ATP-Hydrolase
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BiP	Heavy Chain Binding Protein
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Da	Dalton
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
∅	Durchmesser
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid-HCl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
H ₂ O bidest.	Quarzbidestilliertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	High Resolution
HSE	Heat Shock Element

HSF	Hitzeschockfaktor
Hsp(s)	Hitzeschockprotein(e)
ITC	Isothermische Titrationskalorimetrie
kDa	Kilodalton
k _{on}	Assoziations-Geschwindigkeitskonstante
k _{off}	Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante
λ	Wellenlänge
l	Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
μM	Mikromolar
MW	Molekulargewicht
n.d.	Nicht durchgeführt
NHS	N-hydroxy-succimid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDI	Proteindisulfidisomerase
pH	Potentia Hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt
PPIase	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Surface Plasmon Resonance
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

Tris/HCl	Trihydroxymethylaminomethan Hydrochlorid
ü.N.	Über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8. Veröffentlichungen

1. Mayr, C., Richter, K., Lilie, H. & Buchner, J. (2000) Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90-associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae*, differ in their functional properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 34140-6.
2. Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J. & Buchner, J. (2000) C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. *J. Mol. Biol.* **303**, 583-92.
3. Thies, M.J., Kammermeier, R., Richter, K. & Buchner, J. (2001) The alternatively folded state of the antibody C(H)3 domain. *J. Mol. Biol.* **309**, 1077-85.
4. Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O. & Buchner, J. (2001) Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. *J. Biol. Chem.* **276**, 33689-96.
5. Richter, K. & Buchner, J. (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell. Physiol.* **188**, 281-90.
6. Richter, K., Reinstein, J. & Buchner, J. (2002) N-terminal residues regulate the catalytic efficiency of the Hsp90 ATPase cycle. *J Biol Chem.* **277**, 44905-10.
7. Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O., Reinstein, J. & Buchner J. (2003) Sti1 is a noncompetitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the ATPase cycle. *J. Biol. Chem.* [epub ahead of print].

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1999 bis Januar 2003 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Biotechnologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner möchte ich mich herzlich für die Überlassung dieses Themas bedanken. Darüberhinaus möchte ich ihm für das Vertrauen in meine Arbeit und die Freiheit bei der Bearbeitung dieses umfangreichen Themenkomplexes danken, sowie den gelegentlich nötigen Anschub, wenn es darum ging die gewonnenen Daten zu präsentieren. Unvergessen wird der Versuch bleiben die StiI-Publikation noch vor Weihnachten einzureichen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Robert Huber für die Möglichkeit, meine Kristalle in seiner Arbeitsgruppe zu vermessen und natürlich Rainer dafür, dass er sich die Zeit dafür genommen hat. Auch Dr. Jochen Reinstein gilt mein Dank für die Diskussionen und die Durchführung der kinetischen Untersuchungen.

Bei Dr. Stefan Walter möchte ich mich unter anderem dafür bedanken, dass er für jedes noch so extravagante Experiment nicht nur ein offenes Ohr hatte, sondern auch diverse Mittagspausen dafür geopfert hat, mit mir über „wissenschaftliche Ergebnisse“ zu diskutieren. Bedanken möchte ich mich auch bei unserem Sysadmin und Spitzenforscher Lin sowie Sebastian, die gerade in letzter Zeit immer da waren, wenn die Entstehung meiner Doktorarbeit aufgrund von Computerproblemen zu stocken drohte und mir und meinen vielen Zetteln, Tassen und Flaschen den Computerraum vorübergehend überlassen haben.

Wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben auch meine Bürokollegen und Laborkollegen, denen es zu Verdanken ist, dass in Krisenzeiten der Spaß an der Arbeit nicht verloren gegangen ist. Nicht zu vergessen natürlich meine Praktikanten und meine beiden Diplomanten Otti und Sandra.

Riesigen Dank schulde ich natürlich meiner Freundin Ursula, die unermüdlich neue Versionen zum Durchlesen eingefordert hat und es dazu ertragen musste, dass mir beim Einkaufen einfällt wie p23 funktioniert und ich sofort ein Experiment dazu planen muß.

Auch meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle danken, die in den letzten Jahren bei allen „Katastrophen“ – von scheinbar harmlosen Infektionskrankheiten über Mangelernährung bis zu Autounfällen – zur Stelle waren und zeitweise einen Ingolstädter Wochenend-Erholungsbetrieb geführt haben.

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

München, Januar 2003