TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biotechnologie

Einfluss des Hsp70/Hsp90-Chaperonsystems auf die Reifung und Aktivierung von Hsp90-Substratproteinen

Julia Rohrberg

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

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

Die Dissertation wurde am 26.10.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 29.11.2011 angenommen.

Inhalt

1 Zusammenfassung 1

2 Summary 2

3 Einleitung 4

3.1 Die Theorie der Proteinfaltung 4

3.2 Proteinfaltung *in vivo* 5

3.3 Vom Ribosom zum gefalteten Protein 6

3.4 Faltungskatalysatoren und molekulare Chaperone 7

3.4.1 Proteindisulfidisomerasen (PDIs) 7

3.4.2 Peptidylprolyl-*cis*/*trans*-Isomerasen (PPIasen) 7

3.5 Molekulare Chaperone 8

3.6 Hsp70 8

3.7 Chaperonine 9

3.8 Hsp100 10

3.9 Kleine Hitzeschockproteine (sHsps) 11

3.10 Das molekulare Chaperon Hsp90 12

3.10.1 Die Hsp90-Proteinfamilie und deren Vorkommen 13

3.10.2 Struktur von Hsp90 15

3.10.3 Der dynamische Hsp90-Chaperonzyklus 17

3.10.4 Regulation des Chaperonzyklus durch Cochaperone 18

3.10.5 Regulation von Hsp90 durch posttranslationale Modifikationen 23

3.10.6 Inhibitoren von Hsp90 23

3.11 Hsp90 und Proteinabbau 24

3.12 Hsp90-Substratproteine 25

3.12.1 v-Src 26

3.12.2 Steroidhormonrezeptoren 26

3.12.3 p53 28

3.13 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellsystem 37

3.13.1 Das Hsp90-System der Hefe 37

3.13.2 Das Hsp70-System der Hefe 38

3.14 Zielsetzung 40

4 Material und Methoden 42
4.1 Verwendete Materialien 42
4.1.1 Geräte 42
4.1.2 Chemikalien 43
4.1.3 Chromatographiematerialien und -säulen 45
4.1.4 Verbrauchsmaterialien 45
4.1.5 Antikörper und Immunologische Materialien 46
4.1.6 Proteine, Enzyme und Standards für die Molekularbiologie 47
4.1.7 Oligonukleotide 47
4.1.8 Bakterielle Plasmide und Stämme 50
4.1.9 Medien und Antibiotika für die Anzucht von *E. coli* 50
4.1.10 Hefevektoren und Hefestämme 51
4.1.11 Medien und Lösungen für die Anzucht von *S. cerevisiae* 53
4.1.12 Puffer für die Proteinchemie 54
4.1.13 Computerprogramme 57
4.2 Molekularbiologische Methoden 57
4.2.1 Herstellung, Isolierung und Reinigung von DNA 57
4.2.2 Mutagenese-PCR 58
4.2.3 Klonierung des p53-Reporterkonstrukts 58
4.3 Methoden zur Arbeit mit *S. cerevisiae* 58
4.3.1 Anzucht und Aufbewahrung von *S. cerevisiae* 58
4.3.2 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA 59
4.3.3 Plasmidshuffling in *S. cerevisiae* 59
4.3.4 Analyse des Phänotyps von *S. cerevisiae* mittels Rasterelektronenmikroskopie 59
4.3.5 Herstellung von Hefelysat 60
4.3.6 Aktivitätsassays für Hsp90-Substratproteine 61
4.3.7 Bestimmung der Aktivität von Hsp90-Substratproteinen in Hsp70-defizienten Stämmen 65
4.3.8 Transkriptionsanalyse von ΔYdj1 und ΔAha1 mittels Genchips 66
4.3.9 Signifikanzanalyse 66
4.4 Proteinanalytische Methoden 67
4.4.1 Methoden der Proteinreinigung 67
4.4.2 Markierung von p53 mit einem Fluoreszenfarbstoff 68

4.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung 69
4.4.4 Diskontinuierliche Gelelektrophorese 70
4.4.5 Nativ-Gelelektrophorese 70
4.4.6 Coomassiefärbung 70
4.4.7 Silberfärbung 71
4.4.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) 71
4.4.9 Immunologische Methoden 71
4.4.10 Spektroskopische Methoden 73
4.4.11 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) 75
4.4.12 Analytische Ultrazentrifugation 75
5 Ergebnisse 76
5.1 Einfluss des Hsp70/Hsp90-Chaperonsystems auf verschiedene Hsp90-Substratproteine in *S. cerevisiae* 76
5.1.1 Charakterisierung der Chaperone-Abhängigkeit von p53 76
5.1.2 Charakterisierung der Chaperonabhängigkeit von v-Src 93
5.1.3 Charakterisierung der Chaperonabhängigkeit von Steroidhormonrezeptoren 98
5.1.4 Vergleichende Betrachtung der Einflüsse des Hsp70- und Hsp90-Chaperonsystems auf die untersuchten Hsp90-Substrate 122
5.1.5 Charakterisierung der Knock-out-Stämme 126
5.2 Untersuchungen zur Regulation von p53 durch das C-terminale Segment 134
5.2.1 p53-Domänenstruktur und verwendete p53-Fragmente 134
5.2.2 Stabilität und Sekundärstruktur der p53-Fragmente 134
5.2.3 Das Einführen von negativen Ladungen im C-terminalen Segment verändert die DNA-Bindung 136
5.2.4 Die C-terminale Domäne beeinflusst das Oligomerisierungsverhalten 136
5.2.5 Untersuchung der *in vivo*-Aktivität der p53-Mutanten 139
6 Diskussion 141
6.1 Prozessierung der Hsp90-Substratproteine durch das Hsp70/Hsp90-Chaperonsystem 141
6.2 Intermolekulare Regulation von p53 148
7 Literatur 151

1 Zusammenfassung

Hsp90 ist ein hoch konserviertes molekulares Chaperon, welches die Reifung vieler verschiedener Proteine unterstützt. Zu diesen Substratproteinen gehören Kinasen und Transkriptionsfaktoren, die an wichtigen Signaltransduktionswegen der Zelle beteiligt sind. Hsp90 unterscheidet sich durch seine Selektivität für bestimmte Substratproteine von anderen Chaperonsystemen. Es bindet seine Substrate im nativ-ähnlichen Zustand und reguliert deren Konformation.

Trotz biochemischer und struktureller Daten, die in den letzten Jahren sehr zum Verständnis der Regulation von Hsp90 und seiner Funktion beigetragen haben, wurde bisher noch keine einheitliche Bindestelle der Substratproteine gefunden und es ist unklar, welche Bereiche der Substratproteine von Hsp90 erkannt werden. Cochaperone modulieren den konformationellen Zyklus von Hsp90 und sind so an der Erkennung und Reifung der Substratproteine beteiligt. Wie genau sie das bewerkstelligen, ist jedoch weitgehend ungeklärt. Hsp90 kontrolliert neben der Faltung von Proteinen auch deren Abbau, wobei es mit anderen Systemen der Zelle, wie z.B. dem Ubiquitin-Proteasomsystem, interagiert. Außerdem steht Hsp90 in enger Wechselwirkung mit dem Hsp70-Chaperonsystem, welches promiskuitiv an hydrophobe Polypeptidketten bindet. So ist bekannt, dass die vom Ribosom naszierenden Substratproteine zunächst mit Hilfe von Hsp40 auf Hsp70 übertragen und dann, vermutlich über Konnektorproteine wie Sti1/Hop, mit Hsp90 in Verbindung gebracht werden. Ob das für alle Hsp90-Substratproteine gilt oder ob substratspezifische Mechanismen existieren, ist bisher ebenfalls noch weitgehend unbeschrieben.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Hsp90- und Hsp70-Cochaperone auf die Aktivität von Hsp90-Substratproteinen in dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* durch Reporterassays untersucht. Dabei wurde die Familie der Steroidhormonrezeptoren (SHRs), die Kinase v-Src, Luciferase, ein häufig für Chaperonstudien eingesetztes Modellsubstrat, und der Transkriptionsfaktor p53 betrachtet. Durch diese Auswahl konnte der Einfluss der Cochaperone auf Proteine innerhalb einer Familie, den SHRs, und auf Proteine sehr verschiedener Klassen verglichen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Proteine stark von Hsp70 abhängig sind. Ohne funktionelles Hsp70 ist keines der untersuchten Hsp90-Substratproteine in der Zelle aktiv. Außerdem wurde gezeigt, dass das Hsp70-Cochaperon Ydj1, welches zur Hsp40-Familie gehört, jedes getestete Protein in sehr spezifischer Weise beeinflusst. So kann sich Ydj1 aktivierend, als auch reprimierend auf die Substratproteine auswirken, was teilweise auf einen veränderten Abbau der Proteine in der Zelle zurückzuführen ist. Auch die Hsp70-Cochaperone Sse1 und Snl1 haben einen Einfluss auf die Aktivität der Hsp90-Susbtratproteine, wobei Sse1 für fast alle getesteten Proteine wichtig ist und Snl1 eher substratspezifisch agiert.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass, im Gegensatz zur generellen Abhängigkeit von Hsp70, jedes getestete Substratprotein einen spezifischen Bedarf an Hsp90 aufweist, was sich auch im Einfluss der Hsp90-Cochaperone widerspiegelt. So ist die Bedeutung und Auswirkung der Cochaperone Sti1, Ppt1, Sba1, Cpr6, Cpr7, Aha1 und Hch1 sehr substratspezifisch, wobei auch die Anzahl an benötigten Cochaperonen vom Hsp90-Substratprotein abhängt. Außerdem konnte am Beispiel von p53 gezeigt werden, dass der aktivierende Effekt des Aha1/Hch1-KOs auf einen verminderten Abbau von p53 in der Zelle zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse demonstrieren eine ungeahnte Plastizität des Hsp90-Chaperonsystems, das durch die Interaktion mit Hsp70, dem Ubiquitin-Proteasomsystem und seinen vielen verschiedenen Cochaperonen ein für jedes Substrat spezifisches Ergebnis erzielen kann.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das Hsp90-Substratprotein p53 näher untersucht. Das Tumorsuppressorprotein, welches in 50% aller Krebsarten mutiert ist, wird über eine Vielzahl an Mechanismen reguliert. So ist p53 intrinsisch instabil und viele posttranslationale Modifizierungen, unter anderem im C-terminalen Segment, regulieren seine Aktivität und Stabilität. Die Auswirkung der C-terminalen Domäne auf die Regulation von p53 ist in der Literatur kontrovers diskutiert. In dieser Arbeit wurden der Einfluss der C-terminalen Domäne und ihrer Modifikationen auf die Stabilität des Proteins *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die C-terminale Domäne die Oligomerisierung des Proteins beeinflusst, indem sie intramolekular an die DNA-Bindedomäne eines anderen Monomers bindet. Durch Phosphorylierungen und Acetylierungen im C-terminalen Bereich wird dieser Effekt verstärkt, sodass das p53-Tetramer stabilisiert und p53 aktiviert wird. Mit diesem Modell kann die Regulation von p53 über seine C-terminale Domäne erklärt werden.

2 Summary

The Hsp90 machinery is the most complex chaperone system in the cytosol of the eukaryotic cell. It is set apart from other chaperones by its selectivity for certain client proteins including steroid hormone receptors and kinases and by the fact that it binds to native-like proteins thereby controlling the conformational state. A large number of cofactors exist which associate with Hsp90 at different stages of the cycle to achieve the activation of the bound client and its release. How exactly co-chaperones contribute to the recognition and maturation of Hsp90 clients is still under debate.

Hsp90 is not only promoting the folding of client proteins but also contributing to their degradation by the interaction with the ubiquitin proteasome system. Furthermore, Hsp90 closely interacts with the Hsp70 system that binds promiscuously to hydrophobic patches on polypeptide chains. It is known that the polypeptide chain emerging from the ribosome is bound by Hsp40 and transferred to Hsp70. With the help of connector proteins like Sti1/Hop, the client is then brought into contact with Hsp90. Whether this is true for all Hsp90 clients is not known yet.

In this work, the effects of co-chaperones on client activity were determined in the model organism *S. cerevisiae* using co-chaperone deletion strains and reporter systems for client proteins. A wide variety of Hsp90 clients were tested, including steroid hormone receptors, p53, luciferase and v-Src kinase. Therefore, a comparison between clients from one protein family and between very different classes was possible.

The results showed that all clients tested are strongly affected by Hsp70. Loss of Hsp70 function leads to the inactivation of all clients. Furthermore, the analysis unveiled a strong effect of the Hsp70 co-chaperone Ydj1 that belongs to the Hsp40 family. Ydj1 can either promote or repress the activity of a client. It was shown that this is in part due to malfunctioning degradation of the client in the cell. Also Sse1 and Snl1 affected the client proteins, with Sse1 being important for almost every client protein tested and Snl1 being more client-specific.

In contrast to the general dependency on Hsp70, it turned out that the requirement for Hsp90 showed client-specific differences even within the group of established Hsp90 substrates. The results also revealed a striking discriminatory effect of the Hsp90 co-chaperones Sti1, Ppt1, Sba1, Cpr6, Cpr7, Aha1 and Hch1, even within one class of clients. For p53 it was shown that the activating effect of an Aha1/Hch1 KO was due to the reduced degradation of p53 in the cell.

Taken together, the results demonstrate an unexpected plasticity of the Hsp90 system using highly client-specific co-chaperones and the interaction with Hsp70 and the ubiqutin proteasome system to achieve substrate maturation. Its cochaperones allow Hsp90 to exhibit substrate-specific activity. Thus this basic chaperone machinery can have many different outcomes specific for a client protein.

The Hsp90 client p53 was studied in more detail. This tumor suppressor protein, which is mutated in over 50 % of cancers, is regulated by a multitude of mechanisms. p53 is intrinsically instable and many posttranslational modifications, especially. In the C-terminal region, regulate its stability and activity. The influence of the C-terminal region on the regulation of the protein is controversially discussed in the field. Thus, the impact of the C-terminal region and its posttranslational modifications on stability and activity was analyzed *in vivo* and *in vitro*. The results revealed that the C-terminal domain influences the oligomerization of p53 by binding to the DNA-binding domain of another monomer. The modification of this region by phosphorylation and acetylation strengthen this effect, thus stabilizing the tetramer and activating p53. With this model the regulation of p53´s activity by its C-terminal domain can be explained.

3 Einleitung

3.1 Die Theorie der Proteinfaltung

Proteine gehören zu den wichtigsten Molekülen eines Lebewesens, da sie an fast allen Aspekten des Lebens beteiligt sind. Proteine können die wichtigen Funktionen jedoch nur übernehmen, wenn die lineare Aminosäurekette in einer bestimmten dreidimensionalen Struktur vorliegt, d.h. nativ gefaltet ist. Dabei werden Sekundärstukturen wie ß-Faltblätter oder α-Helices geformt, die durch Schleifen (*Loops*) miteinander verbunden sind und dadurch die Tertiärstruktur ausbilden. Viele Proteine bestehen aus mehreren solcher Domänen, die miteinander wechselwirken. Die geordnete Zusammenlagerung mehrerer gefalteter Proteine gleicher oder verschiedener Spezies führt zur Bildung der Quartärstruktur.

Die genaue Aufklärung dieses komplizierten Prozesses ist eines der grundlegenden Probleme der Biochemie. Christian Anfinsen hat mit seinen Pionierexperimenten zur spontanen Proteinfaltung *in vitro* gezeigt, dass die in der Aminosäuresequenz gespeicherte Information ausreicht, um die Struktur eines gefalteten Proteins zu bestimmen (Anfinsen et al, 1961). Die grundlegende Frage besteht, wie Proteine die richtige Konformation finden können, obwohl theoretisch eine endlose Zahl an potentiellen dreidimensionalen Strukturen möglich ist. Dieses Faltungsproblem wurde von Cyrus Levinthal 1969 beschrieben und ist als Levinthal-Paradoxon bekannt (Levinthal, 1968). Er berechnete, dass ein aus 100 Aminosäuren bestehendes Protein 100 Billionen Jahre brauchen würde, um die richtige Konformationen zu finden, wenn jede Konformation der Polypeptidkette gleich wahrscheinlich wäre. Da aber kleine Proteine im Allgemeinen in Millisekunden oder Sekunden falten (Kubelka et al, 2004), stellt das tatsächlich ein Paradoxon dar. Daher, so Levinthal, müsse es eine andere, effektivere Methode in der Natur geben, damit Proteine ihre native Struktur innerhalb dieser kurzen Zeit erreichen können. Er postulierte die Existenz von definierten Faltungswegen für jedes Protein, wobei die native Struktur den Endpunkt darstellt. Damit ein Protein in angemessener Zeit faltet, muss es energetische Faktoren geben, die den Faltungsprozess beeinflussen. Aufgrund neuer experimenteller und theoretischer Befunde wird heute eine andere Sichtweise (*new view*) der Proteinfaltung beschrieben, die besagt, dass Proteine über verschiedene, parallele Faltungswege und Übergangszustände falten können (Baldwin, 1994; Sali et al, 1994). Es ergibt sich eine Energielandschaft zwischen dem Ensemble verschiedener Konformationen des ungefalteten Zustands und dem nativen Zustand des Proteins, wobei alle Faltungswege innerhalb dieser Energielandschaft verlaufen. Eine bildliche Darstellung dieses Modells der Proteinfaltung ist der sogenannte Faltungstrichter (Chan & Dill, 1998). Die Konformationen des entfalteten Zustands am Rande des Trichters haben viele Möglichkeiten entlang der Energiefläche in den nativen Zustand unter Enthalpiegewinn zu falten (Abbildung 1). Diese Sichtweise schließt die spezielle Energetik der Proteinfaltung mit ein, wobei

keine kovalenten Bindungen gebrochen oder geschlossen werden, sondern die Proteinfaltung nur durch viele kleine Konformationsänderungen innerhalb der Peptidkette zustande kommt (Onuchic & Wolynes, 2004). Diese werden durch die Energielandschaft des Faltungstrichters beschrieben, welche parallele Faltungswege einschließt. Die Verengung der Energiefläche des Trichters symbolisiert das Absinken der Entropie, welche durch die Faltung der Polypeptidkette zur nativen Struktur zustande kommt und einen Großteil des Enthalpiegewinns aufhebt. Dieses Modell beschreibt außerdem, wie partiell gefaltete Zustände kinetisch in lokalen Energieminima gefangen sein können. Solche Faltungsintermediate werden häufig bei Proteinen gefunden, die länger als 100 Aminosäuren sind (90% aller Proteine einer Zelle) (Bartlett & Radford, 2009). Diese können durch unspezifische Interaktionen stabilisiert werden, was zu einem missgefalteten Zustand des Proteins führt (Jahn & Radford, 2005). Partiell gefaltete oder fehlgefaltete Zustände sind in der Zelle problematisch, da sie durch die freiliegenden hydrophoben Bereiche, die im nativen Zustand verborgen sind, leicht aggregieren können.

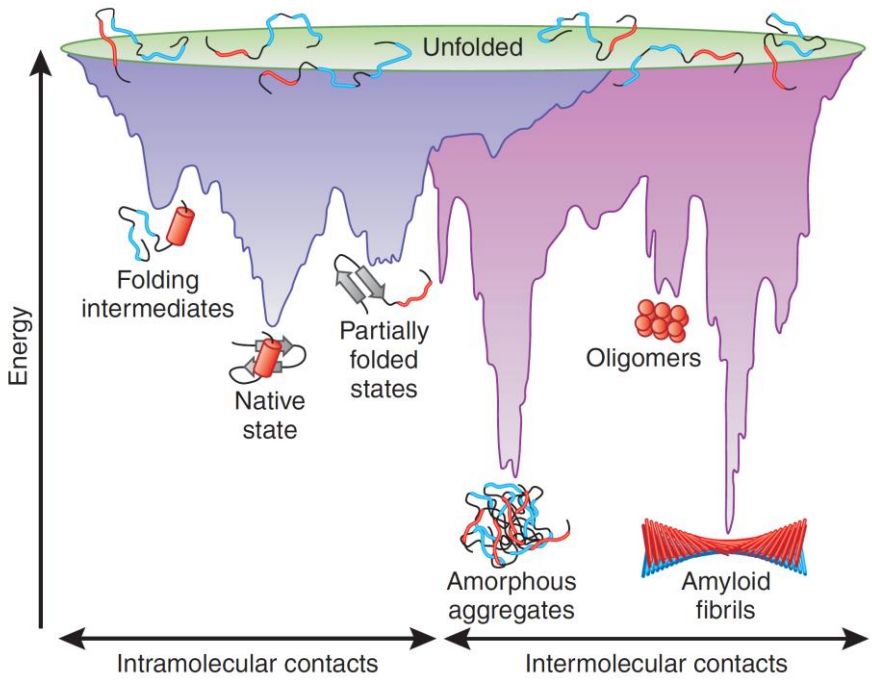

Abbildung 1 Energielandschaft der Proteinfaltung und -aggregation basierend auf dem Modell des Faltungstrichters. Die verschiedenen Konformationen des ungefalteten Zustands am Rand des Trichters können über verschiedene Faltungswege den nativen Zustand oder partiell gefaltete Zustände erreichen. Außerdem können durch intermolekulare Kontakte (in violett gezeigt) Oligomere, Aggregate und fibrilläre Strukturen entstehen. Abbildung aus (Hartl & Hayer-Hartl, 2009).

3.2 *Proteinfaltung* in vivo

Das Verständnis der Proteinfaltung beruht weitestgehend auf *in silico* Ergebnissen oder auf *in vitro* Experimenten, bei denen die Faltung einzelner Proteine oder gar isolierter Domänen untersucht wurde. In einer lebenden Zelle findet man eine weitaus komplexere Situation vor. Obwohl die Regeln

der Thermodynamik auch für die Proteinfaltung *in vivo* zutreffen, wird die Faltung der naszierenden Polypeptidkette durch die hohe Dichte an Proteinen und anderen Biomolekülen in der Zelle beeinflusst. Die Konzentration an Proteinen einer typischen Säugerzelle beträgt bis zu 400 mg/ml (Ellis & Minton, 2006), was zum sogenannten *macromolecular crowding* führt. Durch diese dichte, molekülreiche Umgebung sind neu synthetisierte Polypeptidketten oder bereits gefaltete instabile Proteine ständig dem Risiko ausgesetzt zu aggregieren oder fehlzufalten. Ein weiterer Aspekt kommt *in vivo* hinzu: Die Proteinfaltung beginnt wenn der N-Terminus der Polypeptidkette das Ribosom verlässt, der C-Terminus hingegen noch nicht synthetisiert wurde (Frydman & Hartl, 1996). Die Faltungsrate eines typischen Proteins ($t_{1/2}$ < 1s) ist jedoch viel schneller als die Syntheserate des Ribosoms (4-20 Aminosäuren pro Sekunde) (Agashe & Hartl, 2000). Da die die Faltung des N-terminalen Bereichs vor der Bildung des C-terminalen Segments beginnt, enthalten die naszierenden Polypeptidketten noch nicht die komplette Information, die nötig ist, um den nativen Zustand auszubilden.

Außerdem sind viele Proteine intrinsisch instabil und ihre Struktur ist empfindlich gegenüber Änderungen der Umgebung. Stressbedingungen, wie die Erhöhung der Temperatur, können zur Entfaltung und Aggregation vieler Proteine führen. Der Grund für die Instabilität von Proteinen ist der geringe Unterschied zwischen der freien Energie des nativen und des ungefalteten Zustands von nur 4-60 kJ/mol (Fersht & Daggett, 2002). Das ist jedoch zugleich die Voraussetzung für die konformationelle Flexibilität, die Proteine aufweisen müssen, damit sie ihre Funktionen in der Zelle ausüben können. 20-30% aller Proteine einer Säugerzelle liegen sogar gänzlich oder teilweise ungefaltet vor, bis z.B. durch die Bindung eines Partnermoleküls eine Struktur induziert wird (Dunker et al, 2008). Solche metastabilen Proteine können leicht fibrilläre Aggregate bilden, was zu Krankheiten wie Parkinson oder Demenz führen kann. Um den Problemen der Aggregation und Missfaltung zu begegnen, besitzt die Zelle Mechanismen zur Qualitätskontrolle und Aufrechterhaltung der Homöostase des Proteoms, bekannt als Proteostase (Gidalevitz et al, 2010). Die Proteostase wird durch ein Netzwerk vieler verschiedener Proteine ermöglicht: Chaperone und deren Regulatoren, welche die *de novo* Faltung und Rückfaltung von Proteinen unterstützen (Hartl & Hayer-Hartl, 2009) und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), welches zusammen mit dem Autophagiesystem bereits aggregierte und irreversibel missgefaltete Proteine aus der Zelle entfernt (Arndt et al, 2007; Gamerdinger et al, 2009). Ist die Proteostase der Zelle gestört, können sich verschiedene Krankheiten entwickeln, wie die bereits genannte Neurodegeneration, Typ 2 -Diabetes oder Krebs (Balch et al, 2008).

3.3 Vom Ribosom zum gefalteten Protein

Damit naszierende Polypeptidketten nicht fehlfalten oder aggregieren, interagieren Ribosom-assoziierte Chaperone mit den neu synthetisierten Proteinen und halten sie in einem faltungskompetenten Zustand. In Bakterien übernimmt der Trigger-Faktor diese Aufgabe. Er nimmt die naszierende

Polypeptidkette in eine hydrophobe Tasche auf (Hoffmann et al, 2010). Dort finden vermutlich die ersten Schritte der Proteinfaltung statt, wobei die molekularen Details dieses Faltungsprozesses noch weitgehend unklar sind. Multidomänenproteine können während der Translation domänenweise falten, da die unabhängigen Domänen sequenziell vom Ribosom entlassen werden. In eukaryotischen Zellen, in denen komplexe Multidomänenproteine evolvierten, ist dieser Prozess besonders effektiv. Eukaryotische Ribosomen weisen eine langsamere Translationsgeschwindigkeit auf und ein angepasstes Chaperonsystem liegt vor (Netzer & Hartl, 1997). So binden spezialisierte Hsp70-Chaperone an die naszierenden Polypeptide, welche z.B. das Chaperonin TRiC und andere Faktoren wie Prefoldin rekrutieren können (Cuellar et al, 2008; Frydman, 2001). Für die meisten Proteine reicht die Faltung am Ribosom jedoch nicht aus, um die native Konformation zu erreichen. Dafür besitzt die Zelle weitere Chaperone und Faltungskatalysatoren, die zusammen ein kooperierendes Netzwerk bilden.

3.4 Faltungskatalysatoren und molekulare Chaperone

Um die Proteostase zu erhalten, besitzen Zellen molekulare Chaperone, die mehr als fünf Prozent der gesamten Zelle ausmachen können (Soti & Csermely, 2003). Zum einen schützen sie die neu synthetisierten Polypeptidketten und verhindern Aggregation, indem sie die freiliegenden hydrophoben Bereiche binden. Zum anderen können sie die Faltung von Proteinen aktiv unterstützen und bereits aggregierte Proteine wieder in den nativen Zustand zurückführen. Faltungskatalysatoren hingegen sind Proteine, die die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Proteinfaltung, wie Proteindisulfid- und Peptidylprolylisomerisierungen, katalysieren.

3.4.1 Proteindisulfidisomerasen (PDIs)

PDIs beschleunigen die Proteinfaltung durch Bildung, Isomerisierung oder Reduktion von Disulfidbrücken in einer Polypeptidkette (Creighton et al, 1980; Weissman & Kim, 1993). Im Endoplasmatischen Retikulum können sekretorische, ungefaltete Proteine durch Disulfidaustausch mit Glutathion oder mit PDIs ihre native Konformation erreichen (Noiva & Lennarz, 1992). PDIs sind Oxidoreduktasen und besitzen das gemeinsame Strukturmotiv Cys-x-x-Cys, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysiert.

3.4.2 Peptidylprolyl-*cis*/*trans*-Isomerasen (PPIasen)

PPIasen katalysieren die Umwandlung der *cis*- und *trans*-Konformation einer Peptidyl-Prolylbindung (Fischer et al, 1984). *Cis*-Peptidylprolylbindungen in nativen Proteinen verkomplizieren den Faltungsprozess, da in ungefalteten Proteinen die *trans*-Bindung vorherrschend ist und die Isomerisierung zu *cis* ein vergleichsweise langsamer Prozess ist. PPIasen reduzieren die Aktivierungs-

energie, die für die Rotation von *trans* zu *cis* notwendig ist. Derzeit sind drei Familien von PPIasen identifiziert: Cyclophiline (Cyp), FK506 bindende Proteine (FKBP) und Parvuline (Par) (Ivery, 2000).

3.5 Molekulare Chaperone

Als Chaperone werden Proteine definiert, die mit anderen Proteinen interagieren, sie stabilisieren und ihnen helfen, die aktive Konformation zu erreichen. Außerdem sind sie nicht Bestandteil der finalen Struktur (Hartl, 1996). Die Expression von Chaperonen wird als Stressantwort, z.B. bei hohen Temperaturen, hochreguliert und sind daher auch als Hitzeschockproteine (HSPs) bekannt (Richter et al, 2010). Sie werden nach ihrem Molekulargewicht in verschiedene Gruppen eingeteilt: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 und kleine Hitzeschockproteine (sHsps) (Buchner, 1996). Chaperone sind für die Erhaltung der Proteostase unerlässlich, da sie an der *de novo* Faltung, der Oligomerisierung, dem Transport, dem proteolytischen Abbau und der Rückfaltung von denaturierten Proteinen beteiligt sind. Die meisten von ihnen sind Multikomponentensysteme, die ATP- und cofaktorabhängig hydrophobe Bereiche von Polypeptidketten binden und entlassen. Sie kooperieren mit ATP-unabhängigen Chaperonen, wie den sHsps, welche als „Holdasen“ fungieren und die nicht-nativen Proteine auf ihrer Oberfläche präsentieren (Haslbeck et al, 2005).

3.6 Hsp70

Hsp70 erfüllt seine Funktion als Chaperon in einem ATP-abhängigen Reaktionszyklus, der durch Chaperone der Hsp40-Familie (auch DnaJ-Familie genannt) und durch Nukleotidaustauschfaktoren reguliert wird (Mayer & Bukau, 2005). Hsp70 besteht aus einer N-terminalen ATPase-Domäne und einer C-terminalen Peptidbindungsdomäne, welche sieben Aminosäuren lange hydrophobe Peptide erkennt (Rudiger et al, 1997). Der C-terminale Teil besteht aus einem α-helikalen „Deckel“ und einer β-Faltblatt-Subdomäne. ATP-Hydrolyse in der N-terminalen Domäne, welche durch Hsp40 stark beschleunigt wird, führt durch strukturelle Umformungen und Schließen des Deckels der C-Domäne zur stabilen Bindung des Peptids (Abbildung 2). Hsp40 kann auch direkt mit ungefalteten Polypeptiden interagieren, um sie zu Hsp70 zu rekrutieren (Kampinga & Craig, 2010; Langer et al, 1992). Nach der ATP-Hydrolyse wird durch die Bindung eines Nukleotidaustauschfaktors ADP durch ATP ersetzt, was in der Entlassung des Substrats durch das Öffnen des molekularen Deckels resultiert. Proteine, die noch nicht gefaltet sind, können den Hsp70-Zyklus neu beginnen.

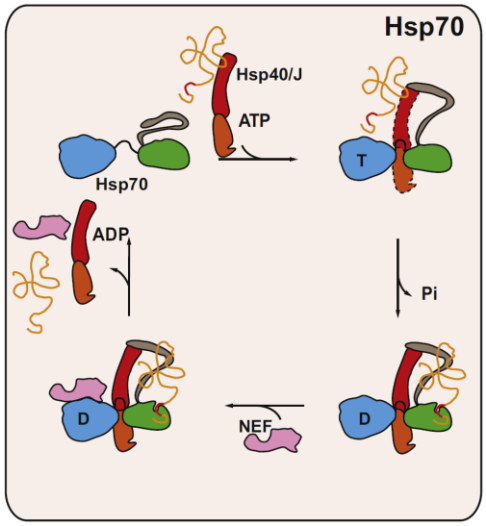

Abbildung 2 ATPase-Zyklus des Hsp70-Chaperonsystems. Ungefaltete Polypeptidketten werden durch Hsp40 auf ATP-gebundenes Hsp70 übertragen. ATP-Hydrolyse führt zur stabilen Bindung des Peptids. Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs) beschleunigen den Austausch von ADP zu ATP, was zur Freisetzung des Substrats führt. Abbildung übernommen aus (Richter et al, 2010).

3.7 Chaperonine

Proteine, die nach der Interaktion mit Hsp70 nicht gefaltet vorliegen, wie z.B. Aktin und Tubulin, werden zu den Chaperoninen übertragen (Frydman, 2001). Chaperonine sind große Komplexe von 800-900 kDa, die durch ihren Doppelring eine Art Käfig bilden, der eine spezialisierte Umgebung für die Proteinfaltung darstellt (Horwich & Fenton, 2009). Sie werden in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe I Chaperonine, bekannt als Hsp60 in eukaryotischen Chloroplasten und Mitochondrien und GroEL in Bakterien arbeiten zusammen mit HSP10-Proteinen (GroES in Bakterien), welche den Deckel des Faltungskäfigs bilden. Gruppe II Chaperonine kommen in Archäen (Thermosom) und im eukaryotischen Zytosol (TRiC/CCT) vor und arbeiten unabhängig von HSP10.

Das GroEL/GroES-System aus *E. coli* ist am besten charakterisiert (Abbildung 3). Etwa 250 verschiedenen zytosolische Proteine mit einer komplizierten Domänenstruktur sind bekannt, die durch GroEL/GroES gefaltet werden (Kerner et al, 2005). Das Substrat wird von der apikalen Domäne von GroEL durch hydrophobe Reste gebunden, welches dann durch die Bindung von GroES in den Faltungskäfig eingeschlossen wird. Die Bindung von GroES ist ATP-abhängig und führt über eine Konformationsänderung zu einer hydrophilen, geladenen Käfigwand in GroEL (Hartl & Hayer-Hartl, 2009; Horwich & Fenton, 2009; Xu et al, 1997). Das Substrat hat nun so lange Zeit in dieser Umgebung zu falten, bis das ATP in GroEL hydrolysiert wird. Über allosterische Interaktion der Ringe löst die ATP-Hydrolyse die Dissoziation von GroES im gegenüberliegenden Ring aus. Das Substrat verlässt den Käfig und kann, wenn noch nicht gefaltet, einen weiteren Zyklus durchlaufen.

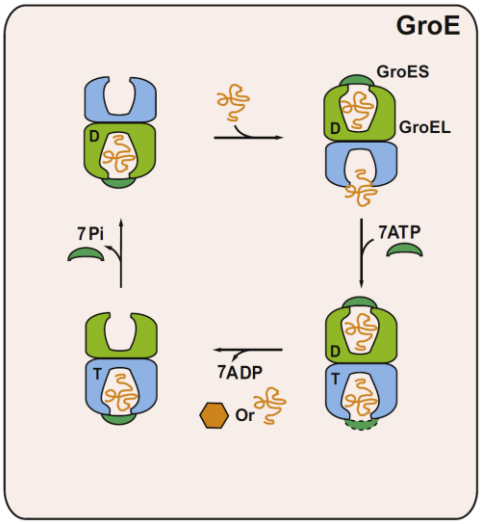

Abbildung 3 Faltung durch das GroEL-GroES-Chaperonin. Ungefaltetes Protein wird durch die Apikaldomäne von GroEL gebunden. ATP- und GroES-Bindung führt zum Einschließen des Substrats in den Faltungskäfig. ATP-Hydrolyse führt zur Dissoziation von GroES und zur Freisetzung des Substrats. Abbildung übernommen aus (Richter et al, 2010).

Das TRiC/CCT-Chaperoninsystem im eukaryotischen Zytosol unterscheidet sich von GroEL/GroES dadurch, dass die Apikaldomäne mit zusätzlichen Aminosäureresten ausgestattet ist, die die Funktion von GroES übernehmen (Douglas et al, 2011). TRiC interagiert mit etwa 10% aller neu synthetisierten zytosolischen Proteine (Frydman, 2001).

3.8 Hsp100

Hsp100-Proteine, in *E. coli* Clp-Familie genannt, sind hexamere ATPasen, deren Hauptaufgabe die Erkennung und Rückfaltung nicht nativer oder bereits aggregierter Proteine ist. Hsp100/Clp-Chaperone ziehen ihr Substrat ATP-abhängig durch einen zentralen Kanal, nachdem es zunächst ungefaltet vorliegt (Abbildung 4) (Doyle et al, 2007; Schaupp et al, 2007; Weber-Ban et al, 1999). Mit Hilfe anderer Chaperonsysteme, wie dem Hsp70/Hsp40-System, kann das Substratprotein in den nativen Zustand gebracht werden (Goloubinoff et al, 1999). Dieser Mechanismus der Disaggregation ist essentiell für die Thermotoleranz von Organismen, da es erlaubt, die durch Hitzeschock aggregierten Proteine zurückzugewinnen (Sanchez & Lindquist, 1990). Hsp100/Clp-Proteine werden in Prokaryoten, einigen Parasiten, Pflanzen und Pilzen und deren Plastiden und Mitochondrien gefunden.

Hsp100-Chaperone werden nach der Anzahl ihrer AAA-ATPase-Domänen in zwei Gruppen unterteilt, wobei Proteine der Gruppe 1 zwei AAA-ATPase-Domäne besitzen und Proteine der Gruppe 2 nur eine (Martin et al, 2005; Schirmer et al, 1996). Einige sind mit einer Protease assoziiert und bilden ein proteolytisches System (ClpA und ClpX). Andere (ClpB) können zusammen mit DnaJ (Hsp40) und DnaK (Hsp70) Substrate aus Aggregaten lösen und sie in den nativen Zustand falten. Das Hsp100-Protein aus der Hefe, Hsp104 wird für die Hitzeschockantwort benötigt (Sanchez & Lindquist, 1990).

Auch unter normalen Bedingungen wird Hsp104 auf geringem Level exprimiert und ist an der Weitergabe von Hefe-Prionen beteiligt (Jones & Tuite, 2005).

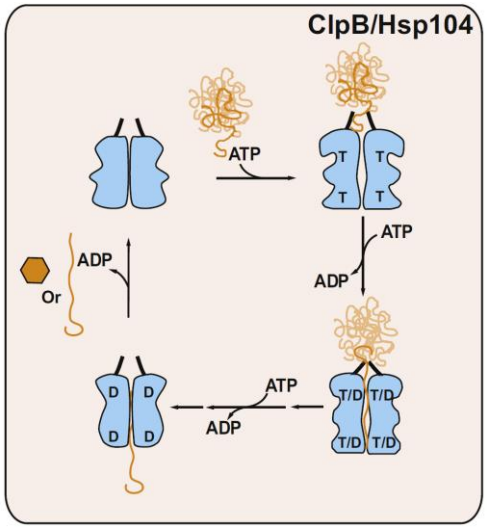

Abbildung 4 Mechanismus der Aggregatauflösung durch Hsp100. In Bakterien und Hefen kann Hsp100 aggregierte Proteine auflösen, indem es sie aktiv durch einen inneren Kanal zieht. Jedes Protomer besitzt zwei ATPase-Domänen, die sich in Umsatz und Funktion unterscheiden. Das Protein wird durch Hsp100 entfaltet und Rückfaltung geschieht spontan oder mit Hilfe anderer Chaperonsysteme wie dem Hsp70/Hsp40-Chaperonsystem. Abbildung übernommen aus (Richter et al, 2010).

3.9 Kleine Hitzeschockproteine (sHsps)

Die Hauptaufgabe von sHsps ist die Verhinderung der Aggregation von Proteinen, welche besonders nach Hitzestress entfaltet vorliegen und anfällig für Aggregation sind.

Sie bilden die weitverbreitetste aber auch die am wenigsten konservierte Familie der Chaperone, da Größe und Sequenz stark variieren (Kriehuber et al, 2010). Allen gemein ist die konservierte α-Crystallindomäne, deren Name von dem Augenlinsenprotein α-Crystallin stammt (Horwitz, 2003). sHsps bilden meist große, dynamische Oligomere, welche oft aus 24 Untereinheiten bestehen (Van Montfort et al, 2001). Derzeit wird angenommen, dass sHsps als Holdase ATP-unabhängig die Aggregation von ungefalteten Proteinen verhindern, indem sie mit den hydrophoben Bereichen interagieren und auf ihre Oberfläche binden (Abbildung 5). Mit Hilfe anderer Chaperonsysteme, wie Hsp100 oder dem Hsp70/Hsp40-System, können die Substratproteine in ihren nativen Zustand zurückgefaltet werden (Lee et al, 1997; Mogk et al, 2003). sHsps werden häufig durch Hitzestress oder posttranslationale Modifikationen aktiviert, was zur Dissoziation in kleinere Komplexe führen kann (Haslbeck et al, 1999).

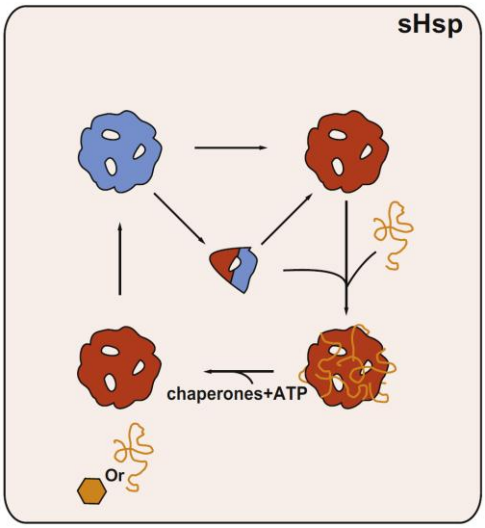

Abbildung 5 Funktionsweise von kleinen Hitzeschockproteinen (sHsps). sHsps sind oligomere Komplexe, die oft durch Hitzestress oder Modifikationen aktiviert werden. sHsps binden Proteine, die durch Hitzeschock oder andere Stress-situationen in einem nicht nativen Zustand vorliegen. Mit Hilfe anderer Chaperonsysteme, wie Hsp70/Hsp40 oder Hsp100, kann das gebundene Protein entlassen und rückgefaltet werden. Abbildung übernommen aus (Richter et al, 2010).

3.10 Das molekulare Chaperon Hsp90

Eine Sonderstellung unter den molekularen Chaperonen nimmt Hsp90 ein, welches mit ein bis zwei Prozent des gesamten löslichen Zellproteins eines der am häufigsten vorkommenden Proteine der Zelle ist (Welch & Feramisco, 1982). Hsp90 stellt den zentralen Knotenpunkt in der Erhaltung der zellulären Protein-Homöostase dar, da es Proteine vieler wichtiger Signalwege kontrolliert. So ist Hsp90 an Prozessen wie Zellzyklus, Telomerregulation, Apoptose, Signaltransduktion in der Mitose, dem vesikulären Transport, der angeborenen Immunität und dem gezielten Proteinabbau beteiligt (Taipale et al, 2010). Derzeit wird angenommen, dass Hsp90 auch die Evolution und Erhaltung dieser Netzwerke steuert, da es die Wirkung destabilisierender Mutationen der beteiligten Proteine puffert und somit die Entstehung neuer Funktionen und Wege ermöglicht (Rutherford & Lindquist, 1998).

Hsp90 interagiert nicht, wie viele andere Chaperone, promiskuitiv mit hydrophoben Bereichen von Proteinen, sondern mit schon (teilweise) gefalteten Proteinen. Außerdem besitzt Hsp90 ein ausgewähltes Substratspektrum, zu dem wichtige Proteine der Signaltransduktion, wie Kinasen oder Steroidrezeptoren zählen (McClellan et al, 2007; Taipale et al, 2010). Häufig bewirkt Hsp90 eine konformationelle Änderung in den Substratproteinen, welche dadurch in einen aktiven Zustand überführt werden (Pratt & Toft, 2003). In diesem Prozess kooperiert Hsp90 mit vielen Cochaperonen und regulatorischen Proteinen, die den ATPase-Zyklus von Hsp90 beeinflussen (Abbildung 6) (siehe 3.10.3 und 3.10.4). Wie Hsp90 jedoch die konformationelle Änderung im Substratprotein auslöst, ist bisher weitgehend ungeklärt (Wandinger et al, 2008).

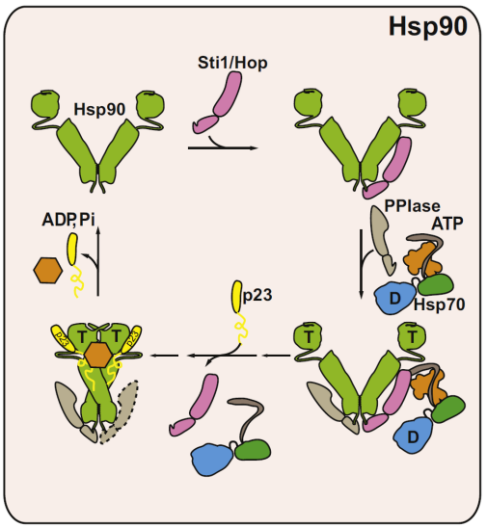

Abbildung 6 ATPase-Zyklus des Hsp90-Chaperonsystems. Einige Substrate werden von Hsp70 mit Hilfe des Cochaperons Sti1/Hop auf Hsp90 übertragen, indem Sti1 Hsp70 und Hsp90 bindet und die Hsp90-ATPase-Aktivität inhibiert. Ein weiteres Cochaperon (PPIase) tritt diesem Komplex bei und die Bindung von ATP und p23 führt zur Freisetzung von Sti1. Letztendlich führt die ATP-Hydrolyse zur Entlassung des gefalteten Substrats. Weitere Cochaperone können diesem Zyklus beitreten und die Aktivität von Hsp90 beeinflussen. Abbildung übernommen aus (Richter et al, 2010).

3.10.1 Die Hsp90-Proteinfamilie und deren Vorkommen

Die Proteine der Hsp90-Familie sind hoch konserviert. Außer Archäen besitzen alle Organismen ein oder mehrere Gene, die für Hsp90 kodieren (Chen et al, 2006). Außerdem wird Hsp90 in fast jedem Kompartiment einer eukaryotischen Zelle gefunden. Die Hsp90-Familie wird in fünf Untergruppen eingeteilt: zytosolisches Hsp90A, Hsp90B im endoplasmatischen Retikulum (ER), Hsp90C im Chloroplasten, mitochrondriales TNFR-assoziiertes Protein (TRAP) und bakterielles *high temperature* Protein G (HtpG) (Abbildung 7) (Chen et al, 2006). Während eukaryotisches Hsp90 essentiell unter Stress- und Normalbedingungen ist, ist bakterielles HtpG nicht essentiell unter normalen Bedingungen und zeigt nur einen leichten Wachstumseffekt bei erhöhten Temperaturen (Bardwell & Craig, 1988; Spence & Georgopoulos, 1989).

Die TRAP-Familie der mitochondrialen Hsp90-Proteine mit der bakteriellen HtpG-Familie eng verwandt. Trotzdem wird ein endosymbiontischer Ursprung ausgeschlossen (Chen et al, 2006). Stattdessen wird angenommen, dass sich diese Familie unabhängig von Hsp90A, Hsp90B und Hsp90C entwickelt hat. Die Funktion von TRAP ist erst wenig verstanden. Es wurde gezeigt, dass humanes TRAP eine Rolle in der durch oxydativen Stress induzierten Apoptose spielt (Pridgeon et al, 2007). Die im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Hsp90B-Familie (bekannt als Grp94 im Mensch) ist an der Qualitätskontrolle von Proteinen im ER beteiligt (Argon & Simen, 1999). Alle bekannten Grp94-Substrate werden in sekretorischen Signalwegen oder an der Zelloberfläche gefunden (Yang & Li, 2005). Die Hsp90A-Gruppe ist die größte, am weitesten verbreitete und am besten charakterisierte Hsp90-Familie. Evolutionär nahe Duplikationen führten zu mehreren Genen für zytosolisches Hsp90 in einigen Organismen. So besitzen die meisten Vertebraten und auch die Hefe zwei Gene für Hsp90.

Diese Paralogen weisen meist stark überlappende Funktionen auf, obwohl auch einige paralog-spezifische Funktionen beschrieben sind (Eustace et al, 2004). Im Menschen sind zwei Isoformen bekannt, Hsp90α und Hsp90β, welche 85% Sequenzidentität besitzen, wobei Hsp90β einige Aminosäuren in der N-terminalen Domäne und in der geladenen Region weniger besitzt (Chen et al, 2005a). Hsp90β wird konstitutiv exprimiert, während Hsp90α stressinduziert ist und unterschiedliche Funktionen in Zelldifferenzierung und Entwicklung vermutet werden (Sreedhar et al, 2004).

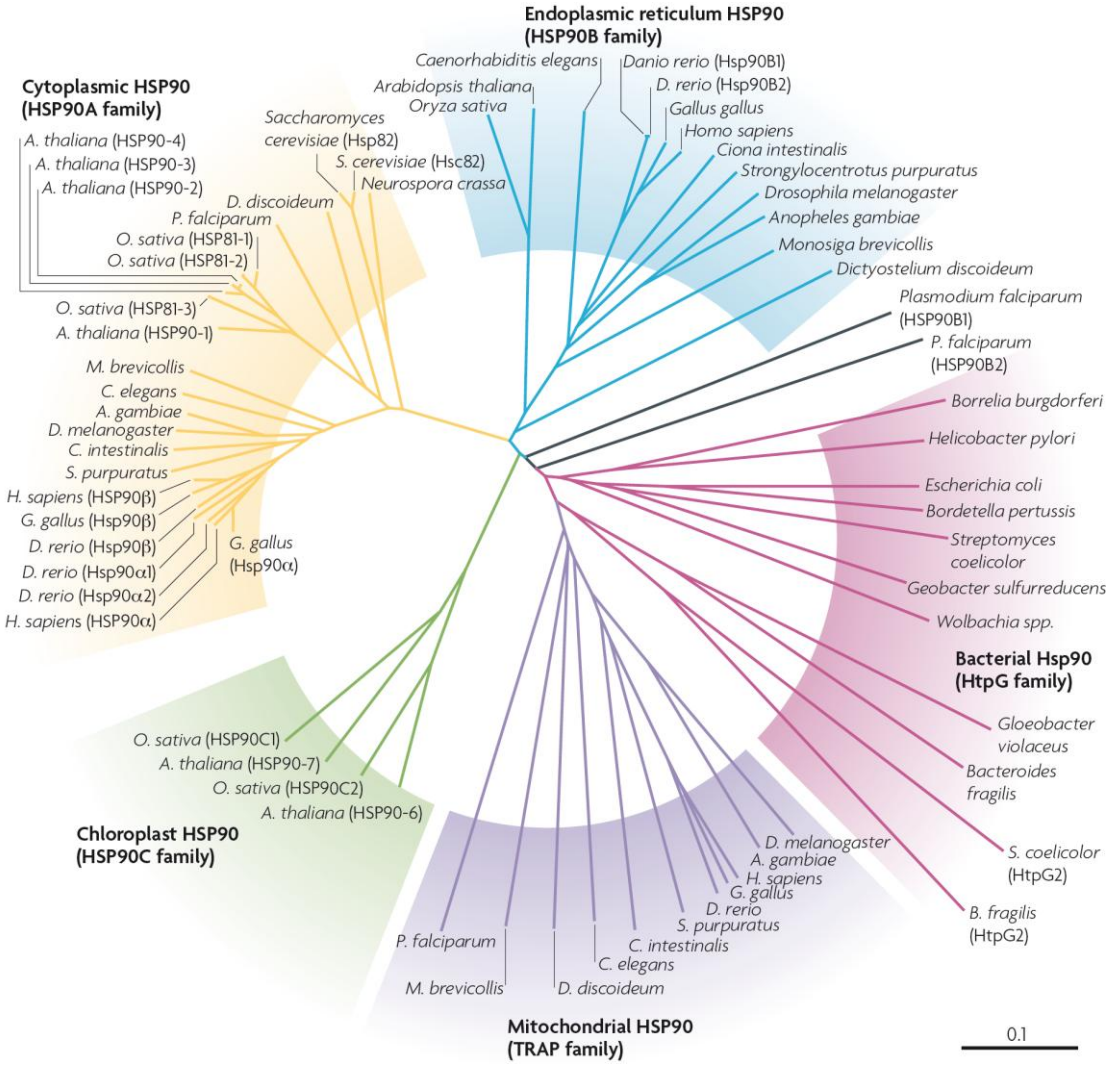

Abbildung 7 Stammbaum der Hsp90-Familie. Dargestellt ist die Verwandtschaft der Hsp90-Homologen aus einzelnen Organismen. Der Maßstabsbalken zeigt den genetischen Abstand. Abbildung entnommen aus (Taipale et al, 2010).

Obwohl Hsp90 kein Kernlokalisierungssignal besitzt, wird es nach Stress oder anderen Stimuli auch im Kern gefunden (Akner et al, 1992; Biggiogera et al, 1996; Langer et al, 2003; Pratt & Toft, 1997). Vermutlich wird Hsp90 zusammen mit seinen Substraten in den Kern transportiert. Zudem kann zytosolisches Hsp90 auch in anderen Kompartimenten der Zelle vorkommen. So wurde es z.B. in der extrazellulären Matrix nachgewiesen (Tsutsumi & Neckers, 2007) und in Mitochondrien, zusätzlich zu dem dort vorkommenden mitochondrialem TRAP (Kang et al, 2007).

3.10.2 Struktur von Hsp90

Hsp90 ist ein Mitglied der GHKL-Superfamilie (Gyrase, Hsp90, Histidinkinase und MutL), welche durch eine typische Struktur der ATPase-Domäne, dem sogenannten *Bergerat fold*, charakterisiert ist (Bergerat et al, 1997; Dutta & Inouye, 2000). Ein Monomer des Hsp90-Dimers besteht aus einer N-terminalen Domäne (NTD), einer mittleren Domäne (MD) und einer C-terminalen Domäne (CTD) (Abbildung 8). Die Strukturen einzelner Domänen im Komplex mit Nukleotiden, Inhibitoren und Cochaperonen wurden mit Röntgenkristallografie bestimmt (Ali et al, 2006; Meyer et al, 2004; Prodromou et al, 1997; Roe et al, 2004; Stebbins et al, 1997; Zhang et al, 2008). Außerdem konnten kürzlich die Strukturen von Volllängen-Hsp90 aus Bakterien, Hefen und Säugetieren aufgeklärt werden (Abbildung 8) (Ali et al, 2006; Dollins et al, 2007; Shiau et al, 2006). Ihre Domänenarchitektur ist zueinander ähnlich, jedoch scheinen die Subdomänen in den einzelnen Strukturen gegeneinander rotiert zu sein. Wahrscheinlich stellen diese Strukturen einen Schnappschuss der Domänenumordnung dar, die normalerweise transient während des Chaperon-Zyklus passiert werden und untereinander in einem dynamischen Gleichgewicht stehen (siehe auch 3.10.3 - Der dynamische Hsp90-Chaperonzyklus).

In der NTD von Hsp90 befindet sich die ATP-Bindestelle. Sie besteht aus einer β-Faltblattstruktur, die von mehreren α-Helices umgeben ist. Bei der Bindung wird ATP ungewöhnlich stark geknickt, sodass nur noch das γ-Phosphat lösungsmittelexponiert ist (Prodromou et al, 1997). Mehrere konservierte Aminosäurereste der NTD bilden einen molekularen „Deckel“, der sich über der Nukleotidbindetasche schließt und gebundenes ATP fixiert (Richter et al, 2006). Für eine effektive ATP-Hydrolyse ist außerdem noch ein katalytisches Arginin nötig, welches sich in einem flexiblen Loop der Mitteldomäne befindet und als Akzeptor der γ-Phosphatgruppe des ATPs dient (Ali et al, 2006; Meyer et al, 2004). Eine weitere konformationelle Änderung führt zur Stabilisierung des Dimers, bei der der erste Strang des β-Faltblatts der Monomere untereinander ausgetauscht wird (*strand swap*). Außerdem konnte der NTD eine Rolle in der Substratbindung zugeordnet werden (Hagn et al, 2011; Vaughan et al, 2006).

Die NTD ist über eine geladene Linkerregion mit der Mitteldomäne verbunden, dessen Länge zwischen den verschiedenen Hsp90-Homologen variiert. Mutationen in dieser Region führen zur Beeinträchtigung der Aktivierung von Substratproteinen und der Interaktion mit Cochaperonen (Hainzl et al, 2009; Tsutsumi et al, 2009). Außerdem wurde eine Funktion der Linkerregion bei der Sekretion von Hsp90 gezeigt, was eine Rolle in der Immunantwort, Zellmobilität und Krebsentwicklung spielt (Tsutsumi et al., 2009).

Die Mitteldomäne besteht aus zwei αβα-Motiven, die durch eine Reihe von α-Helices verbunden sind (Meyer et al, 2003). Es wird angenommen, dass die MD eine wichtige Rolle in der Erkennung und

Bindung von Substratproteinen einnimmt (Hagn et al, 2011; Park et al, 2011; Street et al, 2011; Vaughan et al, 2006).

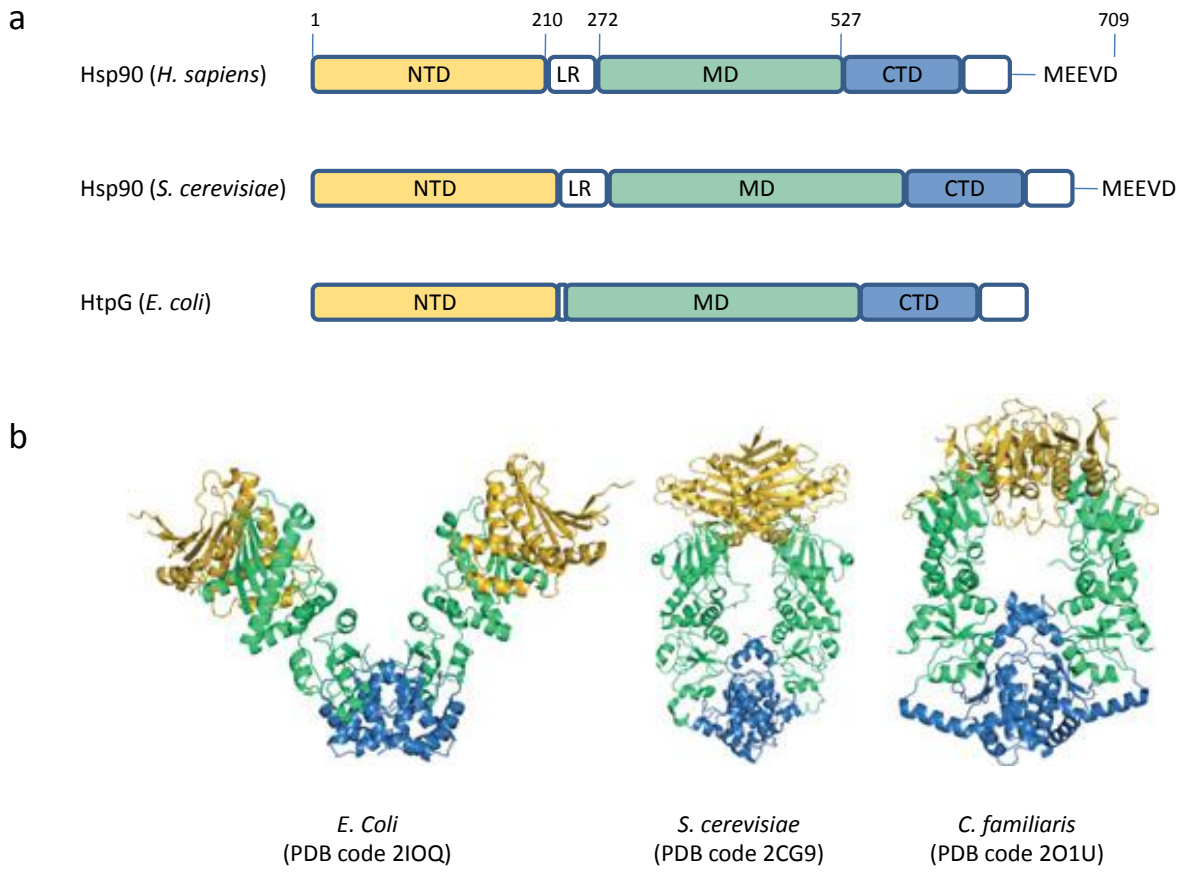

Abbildung 8 Domänenstruktur von Hsp90. a Vergleich der Domänenstruktur von Hsp90 aus Mensch, Hefe und *E. coli*, bestehend aus einer N-terminalen Domäne (NTD, gelb), einer Mitteldomäne (MD, grün), einer C-terminalen Domäne (CTD, blau) und für Hsp90 aus Mensch und Hefe einer geladenen Linkerregion (LR, weiß). Die unstrukturierte C-terminale Verlängerung wurde in weiß dargestellt. Humanes und Hefe-Hsp90 besitzen am C-Terminus das MEEVD-Motiv. **b** Strukturen von Hsp90-Dimeren aus *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (beide zytosolisch) und *Canis familiaris* (Grp94, ein Hsp90 aus dem ER). Abbildung b übernommen von Taipale et al. (Taipale et al, 2010).

Die CTD ist verantwortlich für die Dimerisierung von Hsp90 (Harris et al, 2004; Minami et al, 1994) und ist weniger konserviert verglichen mit dem Rest des Moleküls. Sie ist eine Mischung aus α-Helices und β-Faltblättern, wobei zwei α-Helices von jedem Monomer ein vier-Helix-Bündel an der Dimerkontaktfläche bilden. In der CTD wird eine weitere Nukleotidbindestelle vermutet (Garnier et al, 2002; Soti et al, 2002). Der Bereich nach den Dimerisierungshelices konnte bisher strukturell noch nicht aufgeklärt werden, was vermutlich auf die hohe Flexibilität dieser Region zurückzuführen ist. In Hefe und Eukaryoten befindet sich in dieser Region das hoch konservierte, aus fünf Aminosäuren bestehende MEEVD-Motiv (Met-Glu-Glu-Val-Asp), welches die Bindestelle für viele Cochaperone darstellt. Diese interagieren mittels ihrer TPR (Tetratricopeptid)-Domäne mit dem MEEVD-Motiv. Wie für die NTD und die MD wird auch für die CTD die Interaktion mit Substratproteinen vermutet (Hagn et al, 2011).

3.10.3 Der dynamische Hsp90-Chaperonzyklus

Damit Hsp90 viele verschiedene Substrate binden kann, sind große konformationelle Änderungen im Molekül notwendig. Frühe Studien belegen, dass die Bindung von ATP Hsp90 von einer offenen zu einer geschlossenen Form überführt (Csermely et al, 1993; Grenert et al, 1997; Sullivan et al, 1997). Später konnte gezeigt werden, dass die ATP-Hydrolyse zu weiteren strukturellen Änderungen führt (Chadli et al, 2000; Maruya et al, 1999; Prodromou et al, 2000). Hsp90 besitzt eine vergleichsweise geringe ATP-Hydrolyserate (Hsp90 aus Hefe: 1 min^{-1}, humanes Hsp90: 0,08 min^{-1}) (Richter et al, 2001; Richter et al, 2008; Scheibel et al, 1998), die aber durch die Interaktion mit Substratproteinen und Cochaperonen beeinflusst wird. Die Strukturen von Hsp90 aus unterschiedlichen Spezies zeigen Hsp90 in verschiedenen Konformationen (Abbildung 8b) und auch elektronenmikroskopische Bilder von Hsp90 aus Mensch, Hefe und *E. coli* zeigen eine erstaunliche Variabilität der konformationellen Zustände (Southworth & Agard, 2008). Das lässt auf ein hochdynamisches Gleichgewicht der verschiedenen Hsp90-Konformationen schließen, welches spezifisch für jede Spezies ist. So konnte z.B. Hsp90 aus *E. coli* und Hefe ohne Nukleotid in der offenen und geschlossenen Konformation, humanes Hsp90 hingegen nur in der offenen Konformation beobachtet werden (Southworth & Agard, 2008). Weitere *in vitro* Studien konnten die meisten durch Nukleotidbindung induzierten Konformationen bestätigen (Graf et al, 2009; Hessling et al, 2009; McLaughlin et al, 2006; Mickler et al, 2009; Phillips et al, 2007). Die Ergebnisse lassen sich zu einem kinetischen Modell zusammenfassen, welches die konformationellen Änderungen in Hsp90 durch ATP-Hydrolyse und den Effekt der Cochaperone darauf beschreibt (Abbildung 9): ATP-Bindung führt zum Schließen des molekularen „Deckels“ über der Nukleotidbindetasche, was den langsamen Übergang in den geschlossenen Zustand auslöst. Dieser Übergang läuft vermutlich über Intermediate und endet in einer Dimerisierung der NTDs. ATP-Hydrolyse und ADP-Dissoziation überführt Hsp90 in den Ausgangszustand. Die strukturellen Änderungen sind geschwindigkeitsbestimmend, da sie langsamer vonstattengehen als die ATP-Hydrolyse selbst. Derzeit wird angenommen, dass das konformationelle Gleichgewicht eine zentrale Rolle in der Substraterkennung spielt und auf jeden Organismus mit seinen verschiedenen Substraten und Cochaperonen abgestimmt ist.

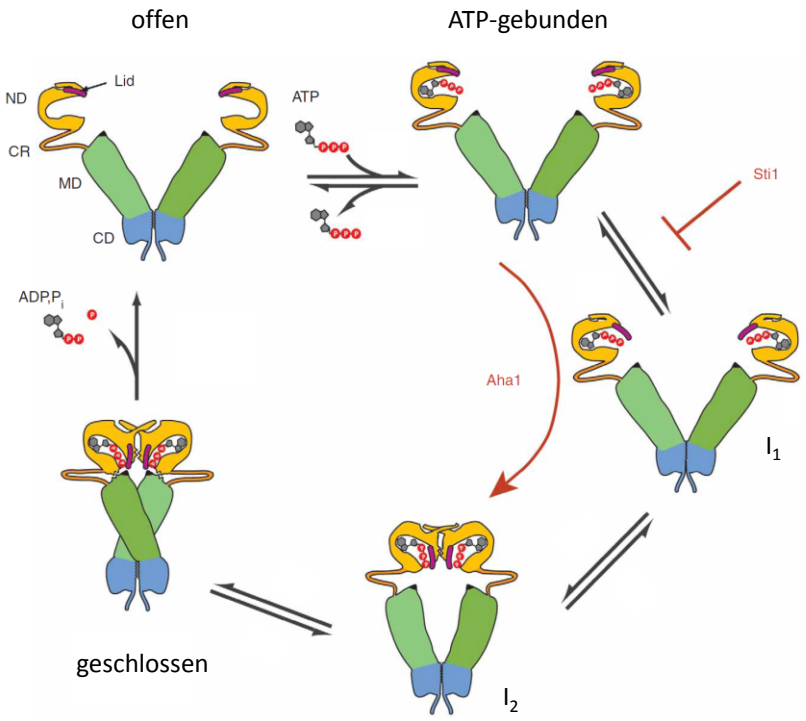

Abbildung 9 Modell des dynamischen Hsp90-Chaperonzyklus. Nach schneller ATP-Bindung erfolgen konformationelle Änderungen in der N-terminalen Domäne, wobei sich der ATP-„Deckel“ über der Nukleotidbindetasche schließt (Intermediat 1, I_1). N-terminale Dimerisierung führt zur Bildung von Intermediat 2 (I_2). Die Interaktion der NTD mit der MD führt zum geschlossenen Zustand, was ATP-Hydrolyse ermöglicht. Das Cochaperon Sti1 behindert frühe strukturelle Änderungen im Zyklus, wohingegen Aha1 strukturelle Änderungen auch ohne Nukleotid fördert. Nach ATP-Hydrolyse wird ADP freigesetzt und Hsp90 kehrt in den offenen Grundzustand zurück. Abbildung adaptiert nach Hessling et al. (Hessling et al, 2009).

3.10.4 Regulation des Chaperonzyklus durch Cochaperone

In Eukaryoten sind über 20 Hsp90-Cochaperone bekannt (Tabelle 1). Von vielen ist jedoch die biologische Funktion noch nicht genau beschrieben. Verschiedene Organismen weisen ein unterschiedliches Repertoire an Cochaperonen auf, welches die Aktivität von Hsp90 spezifisch reguliert (Johnson & Brown, 2009). Die Zusammensetzung des Hsp90-Chaperon-Komplexes variiert je nach Bedarf zwischen verschiedenen Spezies. Die Studie von Johnson und Brown ergab, dass kein Cochaperon existiert, welches in allen Spezies gefunden wird. Das Cochaperon Sti1/Hop ist am weitesten verbreitet, während z.B. Cdc37 nur in 9 der 19 untersuchten Organismen gefunden wurde. Für prokaryotisches HtpG und organellspezifisches GRP94 und TRAP1 sind bisher keine Cochaperone bekannt (Jackson et al, 2004).

Tabelle 1 Ausgewählte Hsp90-Cochaperone. Adaptiert von (Wandinger et al, 2008).

Cochaperon		Funktion
Höhere Eukaryoten	Hefe	
TPR-Cochaperone		
Hsp organizing protein		
Hop	Sti1	Involviert in Substratreifung (Steroidrezeptoren), bindet Hsp70 und Hsp90, ATPase-Inhibitor (Hefe)
Große PPIasen		
FKBP51 FKBP52	-	Involviert in Substratreifung (Steroidrezeptoren), Chaperonaktivität
Cyp40	Cpr6 Cpr7	Involviert in Substratreifung (Steroidrezeptoren), Chaperonaktivität
Xap2	-	Komplexbildung mit Arylhydrocarbonrezeptor und Hbx
Ubiquitinligase		
CHIP	-	Markiert Proteine für den Abbau, L4-Ubiquitinligase
Hsp90-Phosphatase		
PP5	Ppt1	Dephosphorylierung von Hsp90, optimiert Substratreifung
Andere TPR-Cochaperone		
Unc45	She4	Assemblierung von Myosin
TTC4	Cns1	Essentiell in Hefe
Tom70	Tom70	Proteinimport Mitochondrium
Toc64	-	Proteinimport Chloroplast
Sgt1	Sgt1	Interagiert nukleotidabhängig mit Hsp90 via der CS-Domäne, Komplexbildung über die TPR-Domäne mit Skp1/ Cdc53/ F box-Protein, Ubiquitinligasekomplex
Cochaperone ohne TPR-Domäne		
p23	Sba1	Involviert in Substratreifung (Steroidrezeptoren), ATPase-Inhibitor, Chaperonaktivität
Aha1	Aha1; Hch1	ATPase-Aktivator
Cdc37	Cdc37	Kinasespezifisches Cochaperon, ATPase-Inhibitor, Chaperonaktivität

Die beschriebenen Hsp90-Cochaperone lassen sich in fünf funktionelle Gruppen einteilen: 1. sie koordinieren die Interaktion mit anderen Chaperonen, wie z.B. dem Hsp70-Chaperonsystem, 2. sie beeinflussen die Hsp90-ATPase-Aktivität, 3. sie rekrutieren bestimmte Hsp90-Substratproteine, 4. sie beteiligen sich durch ihre enzymatischen Aktivitäten am Hsp90-Zyklus oder 5. sie binden in Gegenwart bestimmter Substrate und sind wichtig für deren Reifung.

TPR-Cochaperone – Sti1, PPIasen, PP5

Der größte Teil der Cochaperone gehört zu den TPR-Proteinen, die das MEEVD-Motiv im C-Terminus von Hsp90 binden (Young et al, 1998). Trotz dieses gemeinsamen Bindungsmechanismus sind sie hinsichtlich ihrer Funktionen sehr divers. Einige sind in der Lage spezifische Proteine zu rekrutieren (z.B. Hop), andere haben zusätzliche Funktionen wie Phosphatase- (PP5) oder Prolylisomeraseaktivität (PPIasen).

TPR-Cochaperone können neben Hsp90 auch Hsp70 binden, da auch dieses ein MEEVD-Motiv aufweisen kann (z.B. eukaryotisches zytosolisches Hsp70). Das am besten charakterisierte Beispiel ist Hop/Sti1, welches gleich mehrere TPR-Domänen besitzt. Dadurch kann es simultan Hsp70 und Hsp90 binden und ermöglicht so eine aufeinanderfolgende Interaktion eines Substratproteins mit diesen Chaperonen (Pratt & Toft, 2003; Scheufler et al, 2000; Wegele et al, 2006).

PPIasen besitzen eine Peptidylprolylisomerase-Domäne, jedoch ist ihre Funktion bezüglich des Hsp90-Chaperonzyklus noch nicht genau geklärt. Humanes FKBP52 wird im Komplex mit Hsp90, GR/PR und p23 *in vivo* gefunden und erhöht die Hormonbindeaktivität von GR (Riggs et al, 2004; Riggs et al, 2003). Außerdem ist es essentiell für die optimale Aktivität von PR *in vivo* (Chadli et al, 2000; Riggs et al, 2003). PPIasen scheinen nicht die Substratbindung von Hsp90 zu beeinflussen, da ihre Beteiligung erst spät im Zyklus, nachdem Hsp90 den Rezeptor gebunden hatte, nachgewiesen wurde (Smith et al, 1995).

Aha1

Ein Cochaperon, welches die Hsp90-ATPase-Aktivität stimuliert, ist Aha1 (Panaretou et al, 2002). Die Kristallstruktur der Hsp90-Mitteldomäne mit dem N-Terminus von Aha1 zeigt, dass Aha1 die Interaktion des katalytischen Loops der Hsp90-MD mit der NTD unterstützt und somit eine effizientere ATP-Hydrolyse ermöglicht (Meyer et al, 2004) (Abbildung 10). Übereinstimmend damit konnte eine andere Studie zeigen, dass Aha1 asymmetrisch mit Hsp90 interagiert, wodurch es die geschlossene Konformation von Hsp90 begünstigt (Retzlaff et al, 2010). Interessanterweise können die strukturellen Änderungen durch Aha1 auch in Abwesenheit von Nukleotid beobachtet werden (Hessling et al, 2009). Durch die Beschleunigung des ATPase-Zyklus durch Aha1 wird wahrscheinlich die Reifung und Aktivierung der Substratproteine reguliert. So wurde ein Einfluss von Aha1 auf das Hsp90-

Susbtratprotein CFTR gezeigt, wobei eine Überexpression von Aha1 zu einer Destabilisierung von CFTR führte (Koulov et al, 2010).

Cdc37

Ebenso konnten die Strukturen inhibierender Cochaperone, wie Cdc37 und p23, im Komplex mit Hsp90 gelöst werden. Cdc37 interagiert N-terminal mit einer Kinase und C-terminal mit Hsp90 wodurch das Substratprotein auf Hsp90 übertragen wird (Roe et al, 2004; Shao et al, 2001; Shao et al, 2003; Silverstein et al, 1998). Cdc37 bindet an die NTD von Hsp90 (Abbildung 10) und inhibiert auf drei verschiedene Weisen die Hsp90-ATPase-Aktivität. Zum einen verhindert Cdc37 durch seine Bindung den Zugang des katalytischen Loops der Mitteldomäne zu der Nukleotidbindestelle. Zweitens blockiert Cdc37 die ATP-Bindetasche, indem es den molekularen „Deckel" offen hält. Drittens behindert die Bindung von Cdc37 die N-terminale Dimerisierung von Hsp90. Cdc37 scheint spezifisch für einige Substratproteine zu sein, da bisher nur die Interaktion mit Kinasen bekannt ist.

p23

Ein weiteres Cochaperon, von dem eine Kristallstruktur im Komplex mit Hsp90 gelöst wurde, ist p23. p23 assoziiert spät im Chaperonzyklus mit Hsp90, stabilisiert Hsp90-Substratkomplexe (gezeigt für Steroidrezeptoren) und ermöglicht so die Reifung der Substratproteine (Freeman et al, 2000; Young & Hartl, 2000). Wie Cdc37 bindet auch p23 im N-Terminus von Hsp90 (Abbildung 10), wodurch die konformationelle Flexibilität von Hsp90 vermindert wird. Nur wenn Hsp90 ATP gebunden hat, der molekulare „Deckel" geschlossen ist, die NTDs dimerisiert sind und der Loop aus der Mitteldomäne mit der NTD interagiert, kann p23 binden. Die Stabilisierung dieses normalerweise transienten Zustands ermöglicht die Bindung des Substrats und zeigt, wie wichtig die strukturelle Flexibilität von Hsp90 ist. p23 inhibiert so die ATP-Hydrolyse und stimuliert gleichzeitig die Bindung von ATP (McLaughlin et al, 2006). Außerdem besitzt p23 selbst Chaperonaktivität. Der C-terminale unstrukturierte Teil bindet dabei an nicht-native Proteine und verhindert deren Aggregation (Weikl et al, 1999).

Sgt1

Ein anderes, mit p23 strukturell verwandtes Cochaperon ist Sgt1 (Zhang et al, 2008). Sgt1 bindet ebenfalls an der NTD von Hsp90, inhibiert aber nicht seine ATPase-Aktivität (Abbildung 10). Der Grund dafür ist möglicherweise, dass Sgt1 nicht direkt den molekularen „Deckel" von Hsp90 bindet und somit nicht die Flexibilität des Chaperons stört. Sgt1 scheint wie Cdc37 in der Bildung von Hsp90-Substratkomplexen beteiligt zu sein (Bansal et al, 2004; Kadota et al, 2008; Sbroggio et al, 2008; Shirasu, 2009). Obwohl Sgt1 eine TPR-Domäne besitzt, bindet diese nicht an das MEEVD-Motiv von

Hsp90. Stattdessen wird die Interaktion mit der NTD von Hsp90 über eine CS-Domäne (*CHORD and Sgt domain*) von Sgt1 vermittelt (Catlett & Kaplan, 2006). Hsp90 bildet zusammen mit Sgt1 und einem weiteren Cochaperon, Rar1, einen ternären Komplex. Rar1 ist an der Immunantwort in Pflanzen beteiligt und interagiert über seine CHORD-Domäne (*cysteine and histidine rich domain*) mit Hsp90 (Takahashi et al, 2003; Zhang et al, 2010).

Verschiedene Cochaperone assoziieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zyklus mit Hsp90 (Li et al, 2011). So bindet Sti1 eher die offene Konformation, also zu frühen Zeitpunkten des Zyklus. Aha1, PPIasen und p23 treten in den Zyklus später ein, indem sie den geschlossenen Zustand von Hsp90 binden. Unklar ist bislang jedoch, wie die Umwandlung vom frühen in den späten Komplex in der Zelle genau vonstattengeht, da die Konzentrationen der Cochaperone *in vivo* und die jeweiligen Affinitäten zu Hsp90 sehr ähnlich sind. *In vitro* werden vier Komponenten (zwei TPR-Cochaperone, p23 und Nukleotid) benötigt, um den späten Komplex von Hsp90 zu bilden und die Dissoziation von Sti1 zu erreichen (Li et al, 2011). Bei allen Cochaperon-Hsp90-Interaktionen handelt es sich um Gleichgewichtsreaktionen, die durch statistische Assoziation und Dissoziation bestimmt sind. Die ATP-Hydrolyse und die damit verbundene strukturelle Änderung von Hsp90 stellt somit die Antriebskraft des Zyklus dar.

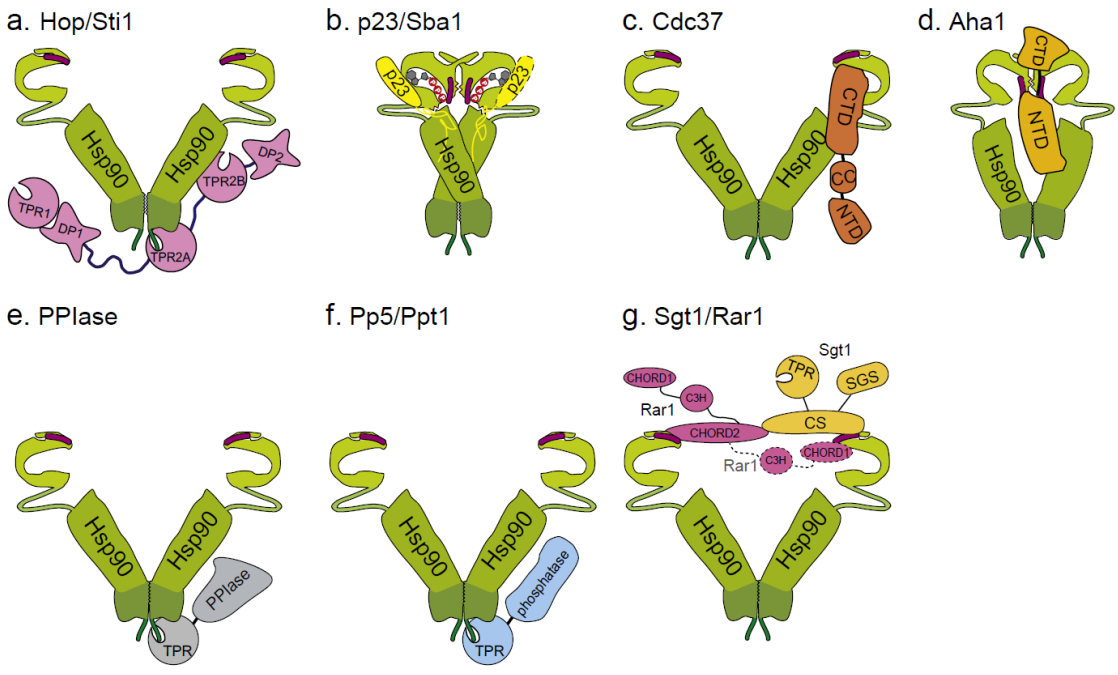

Abbildung 10 Bindestellen einiger Cochaperone in Hsp90.a Sti1/Hop bindet über seine TPR2A-Domäne an das C-terminale MEEVD-Motiv in Hsp90. Möglicherweise existiert noch eine weitere Bindestelle in der MD. **b** p23/Sba1 und **c** Cdc37 binden in der Nähe der ATP-Bindetasche. **d** Die Bindestellen von Aha1 befinden sich entlang der MD und in der NTD. **e** PPIasen und **f** Pp5/Ppt1 binden über die TPR-Domäne an das C-terminale MEEVD-Motiv von Hsp90. **g** Sgt1, Rar1 und Hsp90 bilden einen ternären Komplex, wobei Sgt1 mittels CS-Domäne und Rar1 mittels der CHORD2-Domäne (die Bindestelle der CHORD1-Domäne ist nicht bekannt) mit der NTD von Hsp90 interagieren.

Obwohl die Funktionen vieler Cochaperone noch nicht genau verstanden sind, wird angenommen, dass Hsp90-Substratproteine die Unterstützung bestimmter, substratspezifischer Cochaperone brauchen und dass auch eng verwandte Cochaperone unterschiedliche Effekte auf verschiedene Substrate haben können (Felts et al, 2007; Riggs et al, 2004; Smith & Toft, 2008).

3.10.5 Regulation von Hsp90 durch posttranslationale Modifikationen

Hsp90 wird neben den Cochaperonen auch durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Nitrosylierung reguliert.

Die Phosphorylierung der geladenen Linkerregion in humanem Hsp90β beeinflusst die Interaktion mit dem Substratprotein Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) (Ogiso et al, 2004). Phosphorylierung von Serin 225 und Serin 254 vermindert die Affinität von Hsp90 zu AHR. Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung von Y300 durch c-Src notwendig, um mit der endothelischen Nitritoxidase (eNOS) zu interagieren (Duval et al, 2007). Außerdem reguliert die Phosphorylierung das Hsp90-Level in der Zelle. So phosphoryliert Swe1 zellzyklusabhängig Tyrosin 24 von Hsp82 in Hefe, was zur Ubiquitinierung und dem Abbau von Hsp90 führt (Mollapour et al, 2010). Zudem wurde gezeigt, dass die Deletion der Phosphatase Ppt1 in Hefe zur Hyperphosphorylierung von Hsp82 führt und die Reifung vieler verschiedener Substrate beeinflusst (Wandinger et al, 2006). Neuste Studien zeigen, dass die Phosphorylierung von Hsp90 an Threonin 22 die ATPase-Aktivität und die Interaktion mit Cochaperonen wie Cdc37 und Aha1 beeinflusst (Mollapour et al, 2011).

Eine weitere posttranslationale Modifikation von Hsp90 ist die Acetylierung von Lysinseitenketten. Die Acetylierung von Lysin 294 in der Mitteldomäne vermindert die Reifung von Hsp90-Substraten sowie die Interaktion mit Cochaperonen (Kovacs et al, 2005; Scroggins et al, 2007).

S-Nitrosylierung von Hsp90 wurde bisher in zwei Studien beschrieben, welche beide eine wichtige regulatorische Rolle dieser Modifikation zeigen. Dabei wird ein Cystein reversibel mit dem freien Stickstoffmonoxidradikal kovalent modifiziert. Die Nitrosylierung von Cystein 597 in der C-terminalen Domäne von Hsp90β inhibiert die Aktivität des Hsp90-Substrats eNOS *in vivo* (Martinez-Ruiz et al, 2005; Retzlaff et al, 2009). Außerdem konnte i*n vitro* gezeigt werden, dass der Effekt auf der Inhibition der ATPase-Aktivität (Martinez-Ruiz et al, 2005) und der Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts des Chaperonzyklus beruht (Retzlaff et al, 2009). Hsp90 aus Hefe und *E. coli* besitzen keine Cysteinseitenketten, weshalb Nitrosylierung und somit eine Regulation über diese Modifikation hier nicht stattfinden kann.

3.10.6 Inhibitoren von Hsp90

Die Aktivität von Hsp90 kann durch natürlich vorkommende Substanzen wie Geldanamycin und Radicicol spezifisch inhibiert werden. Diese wirken als kompetitive Inhibitoren, indem sie die

ungewöhnlich geknickte Konformation des gebundenen ATPs imitieren. Die Affinität dieser Substanzen zur Nukleotidbindetasche ist um ein vielfaches höher als die von ATP (Grenert et al, 1997; Roe et al, 1999; Stebbins et al, 1997), weshalb die Bindung der Inhibitoren die Nukleotidbindetasche blockiert und damit die ATP-abhängigen Vorgänge im Hsp90-Molekül effektiv verhindert (Whitesell et al, 1994). Die Inhibition von Hsp90 führt zu einer Verminderung der Aktivität und der Konzentration von Hsp90-Substraten *in vivo*, was auf einen erhöhten proteasomalen Abbau oder auf Aggregation zurückzuführen ist (Xu et al, 2005). Hsp90-Inhibitoren werden zur Bekämpfung von Tumoren eingesetzt, da viele Hsp90-Substratproteine Onkogene, wie v-Src, ErbB2 oder Raf-1, darstellen und deren Aktivität durch die Behandlung mit Hsp90-Inhibitoren reduziert werden kann (Neckers, 2006; Pratt & Toft, 2003). Die Antitumoraktivität dieser Substanzen ist auch auf die Tatsache zurückzuführen, dass Hsp90 in Krebszellen in einem sogenannten *high ATPase* Zustand vorliegt, der eine 100fach erhöhte Affinität zum Inhibitor 17-AAG als zu ATP aufweist (Kamal et al, 2003). Daher sind Hsp90-Inhibitoren interessante Substanzen für die Krebstherapie und einige klinische Studien zeigen bereits Erfolge (Chiosis et al, 2002).

3.11 Hsp90 und Proteinabbau

Obwohl Hsp90 im Allgemeinen seine Substratproteine stabilisiert, hat es auch einen Einfluss auf den deren Abbau, was z.B. für den Von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor (VHL) gezeigt wurde (McClellan et al, 2005a). Ein Modell legt das sogenannte *kinetic partitioning* zugrunde, bei dem Substratproteine, die nach mehreren Runden im Hsp90-Zyklus immer noch ungefaltet vorliegen, eher mit Ubiquitinligasen zusammentreffen, welche dann das Protein für den Abbau markieren. In diesem Modell übernimmt Hsp90 zwar eine wichtige, aber passive Rolle. Die Entdeckung von Ubiquitinligasen, die direkt mit Chaperonen interagieren, lässt eine aktivere Interaktion von Hsp90 mit dem Ubiquitin-Proteasomsystem vermuten (McClellan et al, 2005b). So kann z.B. die Ubiquitinligase CHIP (*C terminus of Hsp70-interacting protein*) mittels seiner TPR-Domäne mit Hsp70 und Hsp90 interagieren (Connell et al, 2001; Murata et al, 2001). Der Knockdown von CHIP in kultivierten Zellen führt zur Stabilisierung einiger Hsp90-Substratproteine, wie ER, AR c-ErbB2, wohingegen die Überexpression von CHIP deren Abbau fördert (Cardozo et al, 2003; Fan et al, 2005b; Xu et al, 2002). Für ein anderes Hsp90-Substratprotein, CFTR, wurde gezeigt, das die Überexpression des Cochaperons Aha1 zu einem höheren Abbau des Substratproteins führt (Wang et al, 2006).

Wie schon zuvor erwähnt, arbeitet Hsp90 eng mit dem Hsp70-System zusammen. Auch in der Regulation des Abbaus von Hsp90-Substratproteinen spielt Hsp70 eine große Rolle. So wurde gezeigt, dass Sse1, welches als Nukleotidaustauschfaktor für Hsp70 aus Hefe fungiert, für den Abbau von Kinasen *in vivo* nach Zugabe von Geldanamycin benötig wird (Shaner & Morano, 2007). Im Gegensatz dazu führt der Verlust des Hsp40-Chaperons Ydj1 zu einem schnellen Abbau der Kinasen, was einen

schützenden Effekt von Ydj1 auf Hsp90-Substratproteine vermuten lässt (Mandal et al, 2008). Für einige andere Hsp90-Substratproteine wurde Ydj1 jedoch für den Abbau gebraucht (Huyer et al, 2004; Lee et al, 1996; McClellan et al, 2005a; Park et al, 2007). Offensichtlich übernimmt Ydj1 viele verschiedene, möglicherweise substratspezifische Funktionen.

Zusammengefasst spielt Hsp90 durch seine Beteiligung an der Aktivierung und im Abbau von Proteinen eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle.

3.12 Hsp90-Substratproteine

Damit ein Protein als Hsp90-Substratprotein definiert wird, muss es zwei Eigenschaften besitzen: Zum einen muss es direkt mit Hsp90 interagieren und zum anderen muss die Inhibition von Hsp90 zur Verminderung der Aktivität *in vivo* führen.

Frühe Experimente identifizierten zunächst zwei Klassen als Hsp90-Substratproteine: Kinasen und Hormonrezeptoren. Entdeckt wurde Hsp90 durch Affinitätsreinigung mit dem Onkogen v-Src aus mit Rous-Sarkom-Virus infizierte Zellen aus Huhn (Brugge et al, 1981). Auch mit anderen Src-ähnlichen viralen Kinasen wie Fes, Fps und Yes konnte Hsp90 affinitätsgereinigt werden (Lipsich et al, 1982). Etwa zur gleichen Zeit wurde Hsp90 im Komplex mit nukleären Hormonrezeptoren gefunden (Joab et al, 1984; Sanchez et al, 1987; Schuh et al, 1985). Obwohl Steroidhormonrezeptoren und Kinasen die wohl am besten verstandenen Hsp90-Substratproteine darstellen, konnten noch viele mehr charakterisiert werden, wie z.B. eNOS (Garcia-Cardena et al, 1998), die Telomerase reverse Transkriptase (TERT) (Holt et al, 1999) sowie Transkriptionsfaktoren und Chromatinproteine (z.B. PAS-Familie, p53, STAT3) (Minet et al, 1999; Sato et al, 2003; Sepehrnia et al, 1996; Tariq et al, 2009). Durch die Interaktion mit seinen Substratproteinen spielt Hsp90 auch eine zentrale regulatorische Rolle in Prozessen wie der angeborenen und adaptierten Immunantwort (Li et al, 2002; Lu et al, 2003; Mayor et al, 2007; Takahashi & Mendelsohn, 2003), im Proteintransport und der Sekretion durch Interaktion mit Komponenten des Rab-GTPase-Zyklus (Chen et al, 2005b; Lotz et al, 2008) und der RNA-Prozessierung (Boulon et al, 2008; Suzuki et al, 2009; Zhao et al, 2008). Diese Beispiele geben nur einen kleinen Eindruck der außergewöhnlichen Vielfalt der Hsp90-Substratproteine. Die Arbeitsgruppe von D. Picard unterhält eine ständig aktualisierte Liste aller Hsp90-Substratproteine in multizellulären Organismen (http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf).

Bisher ist weder bekannt, wie Hsp90 seine Substratproteine erkennt, was die genaue Funktion der intrinsischen Flexibilität von Hsp90 ist, noch wie die vielen verschiedenen Cochaperone zur Substraterkennung beitragen.

In den folgenden Kapiteln sollen die in dieser Arbeit benutzten Hsp90-Substratproteine genauer beschrieben werden.

3.12.1 v-Src

v-Src ist das erste identifizierte Hsp90-Substratprotein (Brugge et al, 1981). v-Src gehört zu der Familie der Src-Kinasen, die eine wichtige Rolle in vielen Signaltransduktionswegen spielen. Neben dem ersten Hsp90-Substratprotein war v-Src auch das erste identifizierte Onkogen (Rous, 1911). Die Infektion von Hühnern mit dem Rous-Sarkom-Virus löst bösartige Tumore des Bindegewebes aus, was auf die konstitutive Aktivität von v-Src zurückzuführen ist. Das humane Homolog (98% Sequenzhomologie) zu dem Virusprotein ist das Protoonkogen c-Src (Stehelin et al, 1976). c-Src ist das namens gebende Protein der Src-Familie, die im Menschen aus 12 Mitgliedern besteht. Normalerweise liegt c-Src inaktiv vor und wird nur unter bestimmten Bedingungen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung aktiviert. Im Gegensatz zu v-Src, welches stabil an Hsp90 gebunden vorliegt, interagiert c-Src nur transient mit Hsp90 (Brugge, 1986; Xu & Lindquist, 1993; Xu et al, 1999). Während v-Src instabil bei Körpertemperatur vorliegt, ist c-Src resistent gegenüber chemischer oder thermischer Denaturierung (Falsone et al, 2004). Das lässt vermuten, dass die Erkennung durch Hsp90 mit der Konformation und der Stabilität des Substrats verbunden ist, obwohl Studien an anderen Kinasen auch ein bestimmtes Hsp90-Sequenzmotiv vermuten lassen (Citri et al, 2006; Hikri et al, 2009; Li et al, 2006).

Sowohl bei v-Src, als auch bei anderen Kinasen, wurde immer das Cochaperon Cdc37 im Komplex mit Hsp90 gefunden (Stancato et al, 1994; Stepanova et al, 1996). Daher wird Cdc37 als kinasespezifisches Cochaperon bezeichnet (Mandal et al, 2007). Es wird vermutet, dass durch Cdc37 der Kontakt zwischen Kinase und Hsp90 ermöglicht wird. An diesen ternären Komplex bindet ein weiteres Cochaperon, die Phosphatase PP5 (in Hefe Ppt1). Durch die Dephosphorylierung dissoziiert Cdc37, in der Folge führt ATP-Hydrolyse und die Interaktion mit anderen Cochaperonen (vermutlich Aha1) zur Freisetzung der aktiven Kinase.

3.12.2 Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren (SHRs) werden durch Bindung von Steroidhormonen über eine konformationelle Änderung aktiviert. Sie können dann als Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Zielgene anschalten und beeinflussen so Entwicklung, Homöostase und Metabolismus eines Organismus (Evans, 1988).

SHRs bestehen aus vier Domänen (Kumar & Thompson, 1999): einer N-terminalen variablen Domäne, die sich zwischen den einzelnen Rezeptoren am stärksten unterscheidet, einer DNA-Bindedomäne (DBD), welche hoch konserviert ist und an das sogenannte *hormone response element* (HRE) der DNA bindet und einer variablen Region, welche die DBD mit der Ligandenbindedomäne (LBD) verbindet.

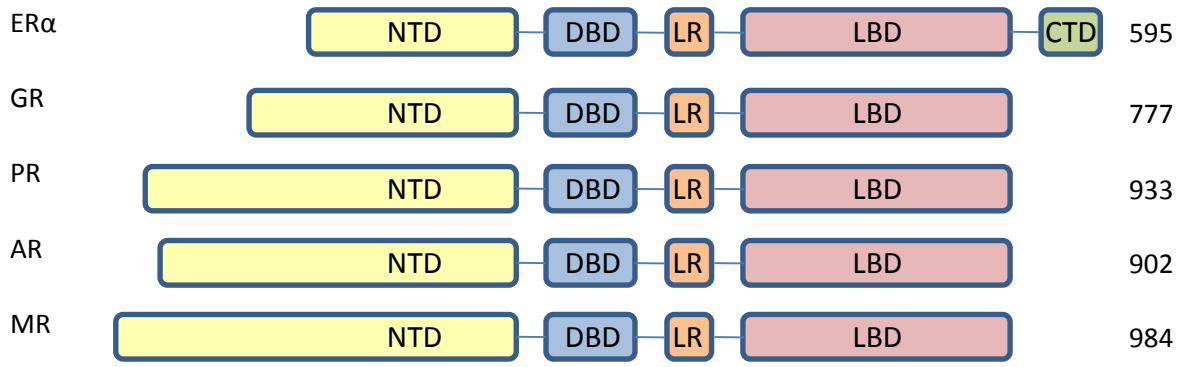

Abbildung 11 Domänenstruktur der SHRs. SHRs bestehen aus einer N-terminalen Domäne (NTD), gefolgt von der DNA-Bindedomäne (DBD), einer flexiblen Linkerregion, die das Kernlokalisationssignal enthält und der Ligandenbindedomäne (LBD). SHRs können eine unstrukturierte C-terminale Domäne (CTD) enthalten, dessen Funktion nicht bekannt ist.

Nukleäre Rezeptoren werden nach ihrem Funktionsmechanismus und ihrer zellulären Lokalisation in Untergruppen eingeteilt (Mangelsdorf et al, 1995). In dieser Studie werden Rezeptoren der Subfamilie 3 untersucht, nämlich der Glucocorticoidrezeptor (GR), der Mineralocorticoidrezeptor (MR), der Estrogenrezeptor α (ER), der Progesteronrezeptor (PR) und der Androgenrezeptor (AR). Die Rezeptoren sind entweder vorwiegend im Zytosol lokalisiert, wandern nach Hormonbindung in den Kern (AR, GR), oder sie werden im hormongebundenen als auch im hormonungebundenen Zustand vorwiegend im Kern gefunden (ER, PR). Der MR wird in seiner unliganderten Form zu gleichen Teilen im Kern und Zytoplasma gefunden (Echeverria & Picard, 2010). Der Import in den Nukleus geschieht über *nuclear localization signals* (NLS), die in der variablen Region und der LBD gefunden werden (Picard et al, 1990; Picard & Yamamoto, 1987; Zhou et al, 1994). Die NLSs sind in den meisten Fällen durch gebundene Chaperone verborgen und werden erst durch die Bindung des Hormons freigelegt. GR und MR zeigen die höchste Sequenzhomologie, gefolgt von PR, AR und ER mit abnehmender Homologie (Mangelsdorf et al, 1995).

Für PR und GR ist die Interaktion mit dem Hsp70/Hsp90-Chaperonsystem am besten charakterisiert (Cintron & Toft, 2006) (Abbildung 12): Zunächst bindet Hsp40 an den SHR und an Hsp70. Hsp40 stimuliert die ATPase-Aktivität von Hsp70, was zu einer stabilen Interaktion von ADP-Hsp70 mit dem SHR führt. Durch die Bindung von Hop/Sti1 an ADP-Hsp70 und Hsp90, dessen ATPase-Aktivität gleichzeitig inhibiert wird, ist eine Übergabe des SHRs an Hsp90 möglich. Der finale Schritt beinhaltet die Bindung von p23, einer Prolylisomerase und ATP, was zu einer Dissoziation von Hop und Hsp70 führt. Durch Anwesenheit von Hormon wird der Rezeptor aktiviert und verlässt den Hsp90-Komplex. *In vitro* kann Hsp90 allein nicht an die LBD binden. Stattdessen ist ein Minimalsystem aus Hsp40, Hsp70, Hop/Sti1, Hsp90 und p23 nötig, um GR oder PR zu aktivieren (Dittmar et al, 1997). Nur Hsp40 ist in der Lage auch isoliert an die LBD zu binden, was gleichzeitig die Voraussetzung für die Bindung von Hsp70 ist (Cintron & Toft, 2006; Hernandez et al, 2002).

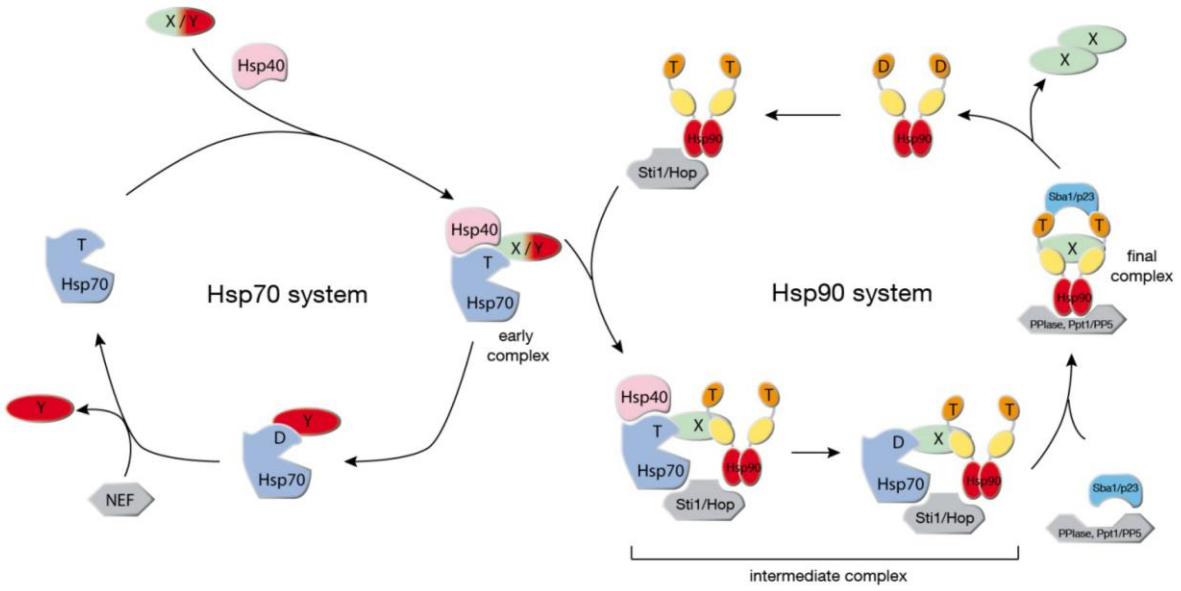

Abbildung 12 Hsp70-Hsp90-Chaperonzyklus. Die naszierende Polypeptidkette (X/Y) wird zunächst von Hsp40 gebunden und auf Hsp70-ATP übertragen. Proteine, die keine Hsp90-Substrate sind (Y) werden im Hsp70-ATPase-Zyklus prozessiert. Der SHR (X) wird über Hop/Sti1 auf Hsp90 übertragen (*intermediate complex*). Durch die Bindung von p23 und PPIasen wird Hsp70 aus dem Komplex entlassen (*final complex*). Durch Bindung des Hormons wird der Rezeptor aktiviert und vom Hsp90-Komplex entlassen. Abbildung aus (Wegele et al, 2004)

Die PPIasen FKBP52, FKBP51, Cyp40 und PP5 werden alle zu einem gewissen Grad in Rezeptorkomplexen gefunden (Barent et al, 1998), wobei jeder Rezeptor andere PPIasen bevorzugt, so wird PP5 hauptsächlich in GR-Komplexen gefunden (Silverstein et al, 1997). FKBP51 hingegen interagiert bevorzugt mit PR, GR und MR und Cyp40 wird im Komplex mit ER beobachtet (Davies & Sanchez, 2005; Riggs et al, 2007; Riggs et al, 2003; Tranguch et al, 2005). Die Bindung von FKBP52 an PR, GR oder AR führt zur Erhöhung der Hormonbindeaktivität. FKBP52 wird auch im Komplex mit ER und MR gefunden, wobei der Einfluss je nach Rezeptor unterschiedlich ist (Gallo et al, 2007; Riggs et al, 2003). Durch welchen Mechanismus die PPIasen die Aktivitäten der Rezeptoren regulieren, ist bisher nicht bekannt. Die PPIase-Aktivität ist jedoch nicht notwendig, um den spezifischen Effekt auszuüben (Riggs et al, 2007). Auch ist nicht klar, was die Rolle von Cyp40 bei der Bindung an ER ist. PP5 ist wichtig für die Aktivität von GR in Zellen, jedoch ist nicht bekannt, ob die Phosphataseaktivität dabei eine Rolle spielt (Chen et al, 1996; Dean et al, 2001). Für ER wurde ebenfalls eine Assoziation von PP5 beobachtet (Ikeda et al, 2004). Zusätzlich zu dem Effekt auf die Hormonbindeaktivität der SHRs konnte ein Effekt der PPIasen auf den zellulären Transport der Rezeptorkomplexe beobachtet werden (Pratt et al, 2004).

3.12.3 p53

Ein weiteres Hsp90-Substratprotein ist das Tumorsuppressorprotein p53. p53 wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es Schäden der DNA erkennen und reparieren oder Einfluss auf den Zellzyklus nehmen und den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten kann (Lane, 1992). In über

50% aller Krebsarten ist p53 mutiert oder anderweitig deaktiviert (Soussi et al, 1994; Vogelstein et al, 2000). p53 steht im Mittelpunkt eines riesigen Netzwerkes, welches die Verarbeitung verschiedener Signale ermöglicht (Evan & Vousden, 2001; Jin & Levine, 2001). Unter normalen Bedingungen ist das p53-Netzwerk inaktiv und p53 selbst unterliegt einer starken Regulation. Zum einen wird die p53-Aktivität durch posttranslationale Modifizierungen reguliert, zum anderen binden regulatorische Proteine wie Mdm2 an p53 und halten dadurch das Level in der Zelle niedrig (Barak et al, 1993; Meek, 2004). Ein zu hohes Level an p53 würde andernfalls unter normalen Bedingungen zu Apoptose oder Zellzyklusarrest führen. Erst durch unterschiedliche Stressbedingungen, wie UV-Strahlung und die dadurch verursachte DNA-Schädigung, wird p53 aktiviert, welches dann an die DNA bindet und die Transkription bestimmter Zielgene einschaltet. p53 ist unabhängig von der Funktion als Transkriptionsfaktor auch an Mechanismen der Apoptose im Zytosol (Marchenko et al, 2000), der Seneszenz und des Alterns beteiligt (Donehower, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der p53-Aktivität *in vitro* untersucht, daher soll das Molekül in den nächsten Kapiteln etwas genauer beschrieben werden.

3.12.3.1 Die Domänenstruktur von p53

p53 besteht aus 393 Aminosäuren und kann in verschiedene funktionelle Domänen eingeteilt werden: Eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (NTD), die mit Proteinen der Transkriptionsmachinerie interagiert und eine prolinreiche SH3-Region enthält, einer DNA-Bindedomäne (DBD), welche für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich ist, einer Tetramerisierungsdomäne mit Signalregionen für den nukleären Import und Export und einer C-terminalen Regulationsdomäne (Abbildung 13).

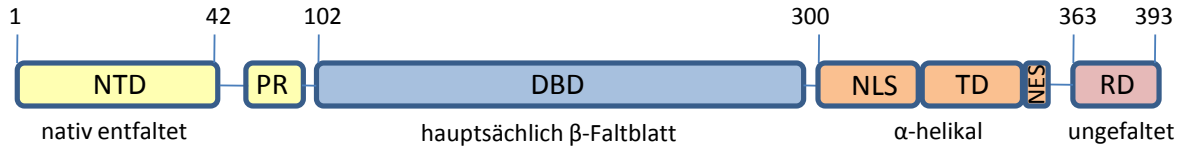

Abbildung 13 p53-Domänenstruktur. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne (NTD), welche nativ entfaltet vorliegt und mit Komponenten der Transkriptionsmachinerie interagiert wird gefolgt von der prolinreichen Region (PR). Die zentrale DNA-Bindedomäne (DBD) besteht vorwiegend aus β-Faltblättern und enthält 95% der vorkommenden onkogenen Mutationen. Der C-terminale Bereich besteht aus dem *nuclear localization signal* (NLS), einer Tetramerisierungsdomäne (TD), dem *nuclear export signal* (NES) und einer ungefalteten regulatorischen Domäne (RD).

Die N-terminale Transaktivierungsdomäne (NTD)

Die NTD besteht aus der Transaktivierungsdomäne und der sogenannten *SH3-target* Region. Diese prolinreiche Region wird von Proteinen, welche eine SH3-Domäne (*Src homology domain 3*) besitzen, gebunden und spielt eine Rolle bei der p53-vermittelten Apoptose (Sakamuro et al, 1997; Venot et al, 1998; Walker & Levine, 1996). Proteine der Transkriptionsmachinerie binden an die NTD, werden zur

DNA rekrutiert und aktivieren die Expression der p53-Zielgene (Fields & Jang, 1990; Lu & Levine, 1995). Die NTD ist gleichzeitig auch die Bindestelle für regulatorische Proteine wie Mdm2, Hbx oder E1B (Bottger et al, 1999; Kussie et al, 1996; Truant et al, 1995; Uesugi & Verdine, 1999). Die Interaktion der NTD mit Proteinen wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert (Banin et al, 1998; Liu et al, 2001). Die NTD ist unstrukturiert (Bell et al, 2002; Dawson et al, 2003; Lee et al, 2000), was häufig bei Transkriptionsfaktoren zu finden ist (Dyson & Wright, 2002). Die Interaktion mit Zielproteinen induziert eine konformationelle Änderung in der unstrukturierten Region, sodass ein breites Spektrum an Bindemotiven für verschiedene Zielproteine bereitgestellt werden kann (Chene, 2003; Dawson et al, 2003).

Die DNA-Bindedomäne (DBD)

Die zentrale DNA-bindende Region ist essentiell für die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen. Die DBD ist resistent gegenüber proteolytischem Verdau und stellt den stabilsten Bereich des Proteins dar (Bargonetti et al, 1993; Pavletich et al, 1993). Die DBD besteht aus zwei β-Faltblattstrukturen, einem Loop-β-Faltblatt-Helix-Motiv und zwei Loops, die durch ein Zink-Ion stabilisiert sind. Dieses Zink-Ion ist durch ein Histidin- und drei Cysteinreste koordiniert (Abbildung 14c). Über 90% der 20000 verschiedenen, in Krebs vorkommenden Mutationen liegen in der DBD (Olivier et al, 2002). Die häufigsten Mutationen, die sogenannten *hot spot* Mutationen, machen etwa ein Viertel aller Mutationen aus und betreffen R175, G245, R248, R249, R273 und R282 (Abbildung 14a). Der Mechanismus der DNA-Bindung ist auf Grund der Kristallstruktur und NMR-Studien gut verstanden (Bullock & Fersht, 2001; Cho et al, 1994). Die *hot spot* Aminosäuren R273 und R248 kontaktieren direkt die große und die kleine Furche der DNA (Abbildung 14a) und können durch die entgegengesetzten Ladungen (Arginin positiv, DNA negativ) eine stabile Bindung ausbilden. Die vier restlichen *hot spot* Mutationen sind durch Wasserstoffbrückenbindung in die Stabilisierung der umgebenden Struktur involviert. Punktmutationen in anderen Bereichen der DBD führen zu einer thermodynamischen Destabilisierung, so dass sich die Konformation der DBD ändert und keine DNA mehr binden kann (Bullock et al, 2000). Dafür hat sich in der Literatur der Ausdruck „mutiertes“ p53 etabliert. Der Begriff tauchte zum ersten Mal auf, als Antikörper gefunden wurden, die die aktive und mutierte Form von p53 unterscheiden konnten (Milner et al, 1991). Einige dieser p53-Mutanten können aber unter bestimmten Umständen wieder aktiviert werden und so eine aktive nativ-ähnliche Konformation einnehmen (Di Como & Prives, 1998). Der Übergang zwischen aktiver „wildtyp“ Konformation und inaktiver „mutierter“ Konformation kann durch bestimmte Substanzen, durch Temperatur oder durch molekulare Chaperone reguliert werden (Hansen et al, 1996a; Petros et al, 2004; Zeimet et al, 2000).

Mehr als 500 DNA-Bindestellen für p53 konnten bisher identifiziert werden (Wei et al, 2006). p53 bindet spezifisch an zwei Kopien einer palindromischen Konsensussequenz, die durch bis zu 13 Basenpaare voneinander getrennt sein können (Abbildung 14d). Ein stabiler p53-DNA-Komplex besteht aus einem p53-Tetramer, welches eine ganze Erkennungssequenz bindet. Die Bindung von p53 verursacht ein Biegen und Drehen der DNA (Balagurumoorthy et al, 1995; Nagaich et al, 1999). Da die Bindesequenz palindromisch ist, wird vermutet, dass das Tetramer zwischen zwei DNA-Strängen, welche die Richtung gewechselt haben und so die Stränge in entgegengesetzte Richtungen laufen, bindet (Klein et al, 2001). Die DNA-Bindesequenz variiert zwischen Promotoren der Zielgene, wodurch p53 unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Promotoren aufweist (Weinberg et al, 2005).

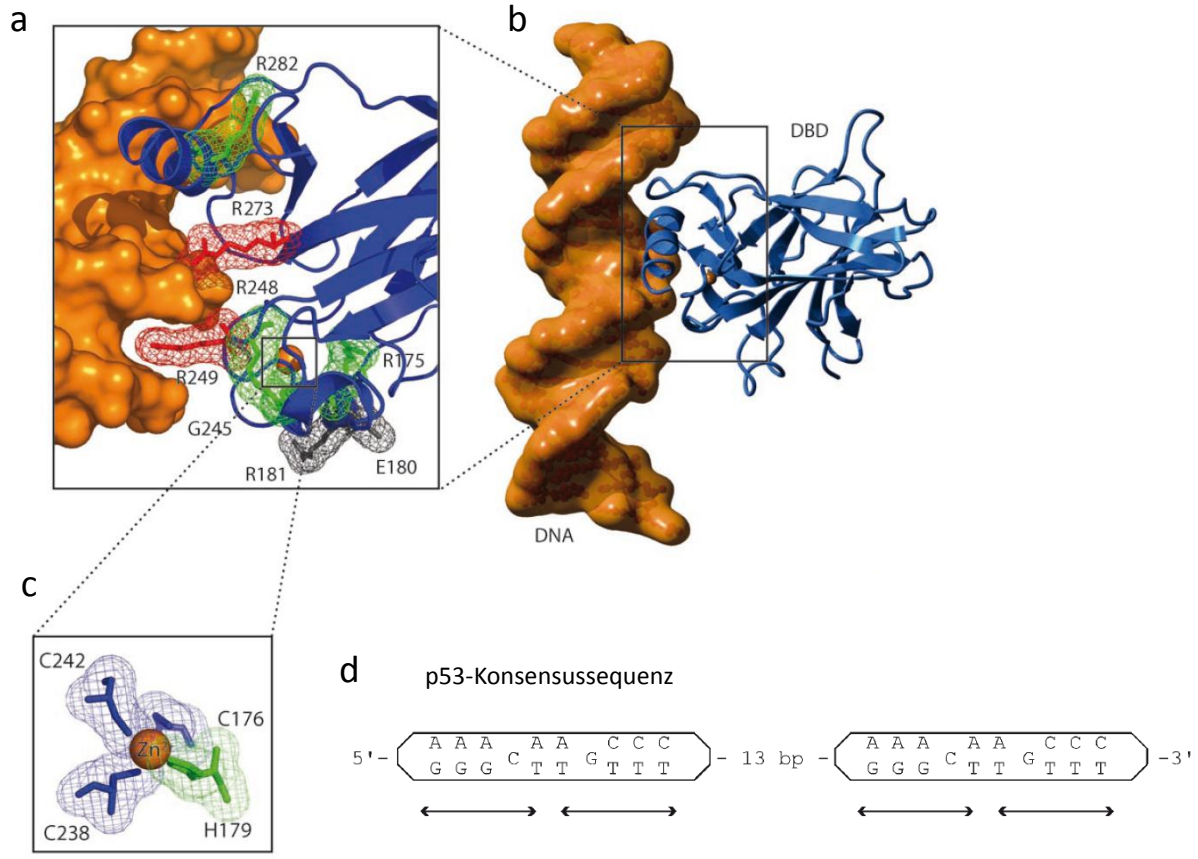

Abbildung 14 a Hot-Spot-Mutationen in der DBD. DNA-Kontaktmutanten sind in rot und strukturelle Mutationen in grün dargestellt. Aminosäuren, die an der kooperativen DNA-Bindung beteiligt sind, sind in grau dargestellt. PDB: 1TSR. **b Kristallstruktur der DBD gebunden an DNA.** PDB: 1TSR. **c Koordination des Zink-Ions**. Das essentielle Zn^{2+}-Ion wird über ein Histidin (grün) und drei Cysteine (blau) koordiniert. **d Die palindromische DNA-Konsensussequenz von p53.** p53 bindet spezifisch an zwei Kopien einer DNA-Promotersequenz, die bis zu 13 Basenpaaren (bp) voneinander getrennt sein können. Abbildung entnommen aus (Romer et al, 2006).

In Lösung ist die Bindung von p53 und DNA sehr kooperativ (Klein et al, 2001; Nagaich et al, 1999), was auf eine stabilisierende Dimerisierung der DBD zurückzuführen ist (Dehner et al, 2005). Diese Dimerisierung ist unabhängig von der Tetramerisierung des Volllängenproteins und wird durch zwei

Salzbrücken zwischen E180 und R181 in der DBD der Monomere ermöglicht (Dehner et al, 2005; McLure & Lee, 1998). Die Mutationen E180K und R181X führen zum Li-Fraumeni-Syndrom, welches durch eine sehr frühe Entwicklung von Krebs charakterisiert ist (Olivier et al, 2002; Varley, 2003; Wang et al, 1995).
Bisher konnte noch keine Struktur des Volllängen Proteins mit oder ohne DNA gelöst werden, was vermutlich auf die hohe Flexibilität von p53 in Lösung zurückzuführen ist.

Die Tetramerisierungsdomäne (TD)

Die Quartärstruktur von p53 ist bestimmt durch eine definierte Tetramerisierungsdomäne (Hupp et al, 1992; Wang et al, 1994). Die Tetramerisierung von p53 ist wichtig für die spezifische DNA-Bindung (Hainaut et al, 1994). Die isolierte TD ist wie auch die DBD sehr stabil (Johnson et al, 1995; Mateu & Fersht, 1998; Mateu et al, 1999), was eine Strukturauflösung mittels NMR-Spektroskopie und Röngtenkristallografie möglich machte (Clore et al, 1995; Jeffrey et al, 1995; Lee et al, 1994). Das Tetramer ist aus einem Dimer aus Dimeren aufgebaut (Abbildung 15). p53 liegt in Lösung in einem Gleichgewicht zwischen Dimer und Tetramer vor, was sich in Anwesenheit von DNA stark auf die Seite des Tetramers verschiebt (Weinberg et al, 2004).

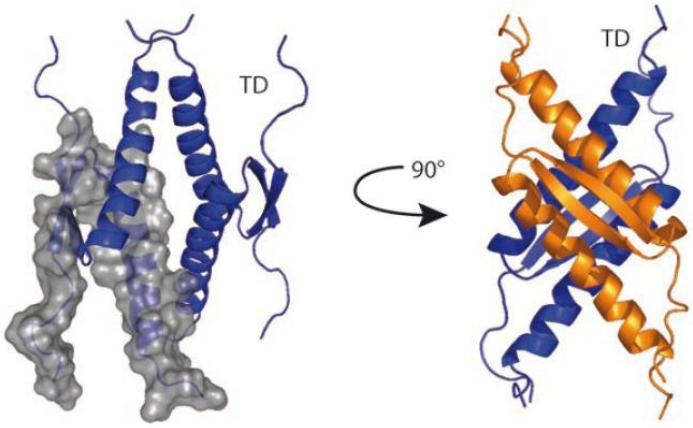

Abbildung 15 Struktur der Tetramerisierungsdomäne. Struktur von vier TDs, die ein Dimer aus Dimeren bilden (orange/blau). PDB: 1OLG. Abbildung entnommen aus (Romer et al, 2006).

Die regulatorische Domäne (RD)

Die C-terminale RD ist über eine basische Linkerregion mit der TD verbunden. Diese Linkerregion enthält das Kernlokalisierungssignal (Shaulsky et al, 1990). Die RD ist, wie der Name schon sagt, wichtig für die Regulation der Aktivität des Proteins (Ahn & Prives, 2001). Mehrere Studien zeigten, dass die letzen 30, hauptsächlich basischen Aminosäuren des Proteins die DNA-Bindung beeinflussen. Die Bindung eines Antikörpers (PAb421), dessen Epitop im Bereich der letzten 30 Aminosäuren liegt, führten zu einer Erhöhung der spezifischen DNA-Bindung *in vitro* (Hupp et al, 1992). Auch die Phosphorylierung, insbesondere von Serin 392, und Acetylierung einiger Aminosäuren oder die

komplette Deletion des C-Terminus führt zur höheren DNA-Bindeaktivität *in vitro. In vivo* werden einige dieser Reste als Antwort auf DNA-Schädigung modifiziert (Appella & Anderson, 2000). Der Antikörper PAb421 ist sogar in der Lage, inaktive tumorassoziierte p53-Mutanten *in vitro* zu reaktivieren (Hupp et al, 1993). Ein Peptid, bestehend aus dem PAb421-Epitop, kann die DNA-Bindung *in vitro* stimulieren (Hupp et al, 1995) und, wenn in Zellen injiziert, WT und mutiertes p53 aktivieren (Abarzua et al, 1996; Kim et al, 1999; Selivanova et al, 1999). Außerdem konnten zelluläre Proteine identifiziert werden, die die DNA-Bindung *in vitro* und *in vivo* abhängig vom C-Terminus stimulieren (Jayaraman et al, 1997; Otsuka et al, 2000; Waterman et al, 1998; Zhang et al, 1998). Diese Daten werden in einem sogenannten Konformationsmodell zusammengefasst, welches besagt, dass der C-Terminus von p53 die Interaktion der DBD mit spezifischer DNA verhindert. Die Modifizierung des C-Terminus oder die Bindung anderer Proteine wirkt dem negativen Effekt entgegen und p53 wird durch eine Konformationsänderung von dem inaktiven in den aktiven Zustand überführt (Abbildung 16a).

Später wurde ein zweites Modell postuliert, welches durch die Beobachtung, dass der C-Terminus selbst DNA-Bindeaktivität besitzt, und dass diese durch den Antikörper PAb421 inhibiert werden kann, unterstützt wurde (Anderson et al, 1997; Bayle et al, 1995): Wenn der C-Terminus an lange, unspezifische DNA gebunden ist, kann durch sterische Hinderung die DBD nicht an die DNA binden (Interferenzmodell) (Abbildung 16a). Wird der C-Terminus modifiziert oder deletiert, kann die DBD mit der spezifische Erkennungssequenz interagieren. Das bedeutet, dass hier keine Konformations-änderungen nötig sind, damit p53 spezifisch an DNA binden kann. Diese Behauptung wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die Abwesenheit von langer unspezifischer DNA in *in vitro*-Experimenten die Wirkung des Antikörpers PAb421 aufhebt. Außerdem konnte eine NMR-Studie keine signifikanten strukturellen Unterschiede zwischen p53wt und einer Mutante, der die letzten 30 Aminosäuren fehlen, feststellen, was das Konformationsmodell nicht bestätigt (Ayed et al, 2001).

Weitere Experimente verkomplizieren die Situation der Funktion des C-Terminus zusätzlich. So konnte neben dem inhibitorischen Effekt des C-Terminus auch ein stimulierender gefunden werden. Wenn die DNA zusammen mit Histonen vorlag, wirkte die Anwesenheit des Antikörpers PAb421 inhibierend auf die DNA-Bindeaktivität (Cain et al, 2000). Dieser Effekt konnte in einer zweiten Studie bestätigt werden, die außerdem zeigte, dass in diesem Kontext C-terminal verkürztes p53 schlechter die Transkription aktiviert als Volllängen p53 (Espinosa & Emerson, 2001). So wird letztendlich ein drittes Modell diskutiert, welches besagt, dass der C-Terminus die Bindung der DBD an die Erkennungssequenz ermöglicht, wenn diese im Kontext von langer DNA oder Chromatin vorliegt (Abbildung 16c). Dieses Modell spricht also gegen das Konformations- und das Interferenzmodell, da unter den getesteten Bedingungen der C-Terminus einen positiven Effekt aufwies.

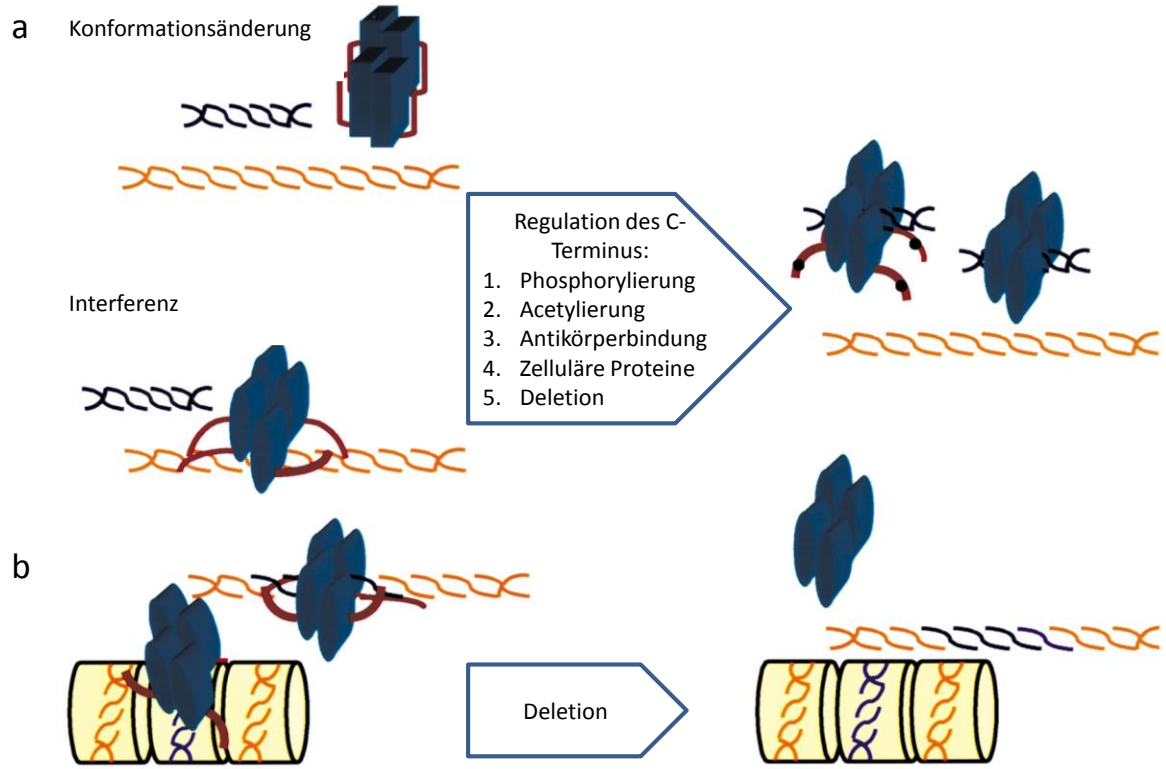

Abbildung 16 Verschiedene Modelle, wie der C-terminale Bereich die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 reguliert. Die DBDs der p53-Tetramere sind in blau dargestellt, die C-terminalen Sequenzen in rot. Die schwarzen Punkte an den C-Termini stellen Modifizierungen oder interagierende Proteine dar. Die p53-Erkennungssequenz ist in schwarz dargestellt, unspezifische DNA in Orange. **a Negative Regulation durch den C-Terminus über das Konformations- und Interferenz-modell.** Das Konformationsmodell besagt, dass latente p53-Tetramere (Rechteck) nicht an DNA binden können, bis sie durch eine Konformationsänderung aktiviert werden (Oval). Die Aktivierung geschieht entweder durch Modifikationen oder durch Bindung anderer Proteine an den C-Terminus. Das Interferenzmodell besagt, dass solange der C-Terminus an unspezifische DNA gebunden ist, die DBD nicht an die Erkennungssequenz binden kann. Modifikationen im C-Terminus verhindern die Interaktion mit unspezifischer DNA sodass nun die DBD an die Erkennungssequenz binden kann. **b Positive Regulation durch den C-Terminus.** Durch die Fähigkeit des C-Terminus an unspezifische DNA zu binden, kann er die Bindung der DBD an die Erkennungssequenz in Anwesenheit von anderer DNA und Chromatin stabilisieren. Abbildung adaptiert von (Ahn & Prives, 2001).

Die Rolle des C-Terminus auf die Aktivität von p53 ist also bisher noch nicht geklärt und es existiert kein Modell, mit dem alle beobachteten Effekte erklärt werden können. Die Regulation der Aktivität über den C-Terminus ist offensichtlich sehr komplex und von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. So wurde auch ein Effekt auf die Tetramerisierung diskutiert, der nicht nur die DNA-Bindung sondern auch die Lokalisierung von p53 beeinflusst (Sakaguchi et al, 1997; Stommel et al, 1999).

3.12.3.2 Posttranslationale Modifikationen und regulatorische Proteine

Über 50 individuelle posttranslationale Modifikationen von p53 sind bekannt, von denen viele als Antwort auf verschiedene Stresssituationen auftauchen (Meek, 2004) (Abbildung 17). p53 kann phosphoryliert, acetyliert, methyliert, ubiquitiniert, sumoyliert und neddyliert werden. Die Modifikationen zeigen eine gegenseitige Abhängigkeit, so dass eine Modifikation eine andere auslösen kann. Z.B. führt die Phosphorylierung durch die ATM-Kinase zur Rekrutierung von Histon/Lysin-Acetyltrans-

ferasen (HAT), wie p300 oder CBP, die dann verschiedene Lysine in der DBD und der RD acetylieren (Dumaz & Meek, 1999; Lambert et al, 1998; Teufel et al, 2009).

In normalen, ungestressten Zellen unterliegt p53 einem schnellen Abbau, so dass das Proteinlevel in der Zelle gering gehalten wird. Das verbleibende Protein ist zudem transkriptionell inaktiv. Zellstress, wie z.B. DNA-Schädigung, führt zur schnellen Aktivierung von p53, indem es zum einen vor Abbau geschützt und zum anderen an vielen Stellen posttranslational modifiziert wird. Abhängig vom Zelltyp, vom eingehenden Signal und der resultierenden Modifikation wird entweder Zellzyklusarrest, Apoptose oder Seneszenz eingeleitet.

Mdm2 ist der wichtigste Regulator der p53-Aktivität. Mdm2 polyubiquitiniert p53 und markiert es so für den Export aus dem Zellkern und den Abbau über das Proteasom (Fang et al, 2000; Jesenberger & Jentsch, 2002). Hauptziel der Mdm2-Ubiquitinierung sind sechs Lysine im C-Terminus von p53 (Rodriguez et al, 2000) (Abbildung 17). p53 und Mdm2 sind über einen autoregulatorischen *Feed-backloop* verbunden, in dem p53 die Transkription von Mdm2 induziert, während Mdm2 den Abbau von p53 fördert (Juven et al, 1993). Viele andere Ubiquitinligasen sind bekannt, die den Abbau von p53 induzieren (Brooks & Gu, 2006). Zusätzlich zu Ubiquitin kann p53 auch mit SUMO und Nedd8, einem ubiquitinähnlichem Protein, modifiziert werden (Rodriguez et al, 1999; Xirodimas et al, 2004). In ruhenden Zellen ist p53 kaum neddyliert, erst als Antwort auf UV-Strahlung nimmt die Neddylierung zu.

Neben Ubiquitinierung, Sumoylierung und Neddylierung wird p53 umfangreich phosphoryliert, acetyliert und methyliert (Abbildung 17). Diese Modifizierungen beeinflussen neben der p53-Stabilität hauptsächlich die Aktivität. Das kann durch verschiedene Mechanismen geschehen, die in vielen Reviews gut zusammengefasst sind (Appella & Anderson, 2000; Boehme & Blattner, 2009). In normalen, ungestressten Zellen liegt p53 hauptsächlich unmodifiziert vor. Als Antwort auf Stress wird p53 durch verschiedene Enzyme modifiziert (Abbildung 17). Diese können Auswirkungen auf die Stabilität durch die Behinderung der Mdm2-Bindung, auf die Tetramerisierung, auf die Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen, auf die Lokalisation im Zellkern oder Zytoplasma oder auf die DNA-Bindeaktivität an sich haben.

p53 wird also durch eine Vielzahl an Modifizierungen und Interaktionen mit anderen Proteinen auf sehr verschiedene Weise reguliert, die untereinander in Verbindung stehen und sich gegenseitig beeinflussen. Abbildung 17 soll deutlich machen, welches ausgedehnte Netzwerk an Modifizierungen und Interaktionen existiert, was eine schnelle und individuelle Regulation der p53-Aktivität als Antwort auf Stresssituationen und DNA-Schäden ermöglicht.

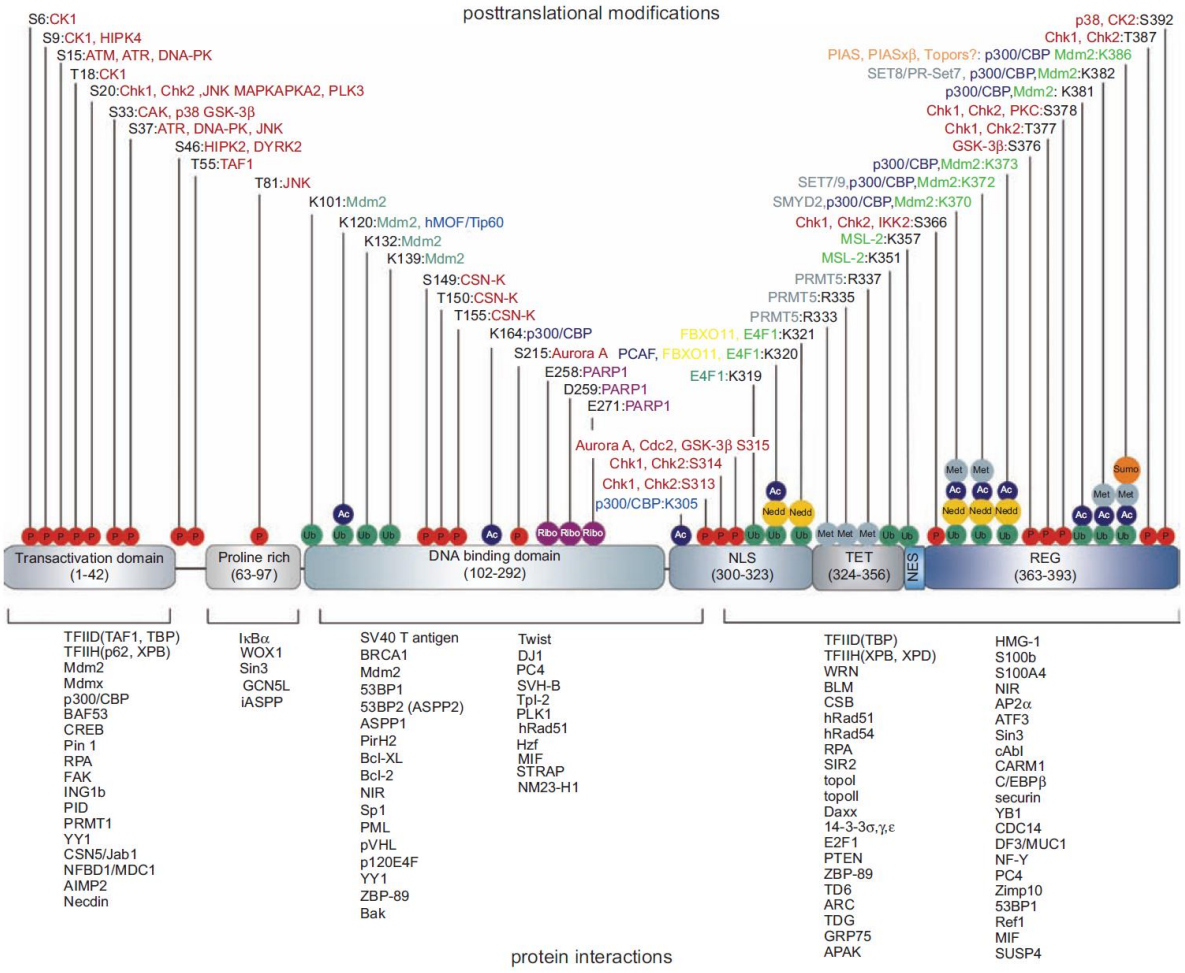

Abbildung 17 Posttranslationale Modifikationen und interagierende Proteine von p53. Über der p53-Domänenstruktur sind alle posttranslationalen Modifikationen mit den dazugehörigen Proteinen angegeben. P - Phosphorylierung, Ub - Ubiquitinierung, Ac - Acetylierung, Ribo - Ribosylierung, Nedd - Neddylierung, Met - Methylierung, Sumo - Sumoylierung. NLS - *nuclear localization signal*, TET – Tetramerisierungsdomäne, NES - *nuclear export signal*, REG - regulatorische Domäne. Unter der p53-Domänenstruktur sind regulatorische Proteine angegeben, die mit den einzelnen Domänen interagieren. Abbildung adaptiert von (Boehme & Blattner, 2009).

3.12.3.3 Die Interaktion von p53 mit Chaperonen

Neben den posttranslationalen Modifikationen und den regulatorischen Proteinen übernehmen auch Chaperone eine wichtige Aufgabe in der Regulation der p53-Aktivität. Als erstes wurde Hsp70 im Komplex mit mutiertem p53 gefunden (Hupp et al, 2000). Die Hauptaufgabe von Hsp70 in diesem Zusammenhang ist die Regulation der Translokation von p53 zwischen Kern und Zytoplasma (Zylicz et al, 2001). Die Bindung von Hsp70 an mutiertes p53 verbirgt das NLS und inhibiert so den Import in den Kern (Akakura et al, 2001). Das ungebundene WT p53 kann weiterhin in den Kern wandern und die Transkription der Zielgene aktivieren.

Auch Hsp90 wurde im Komplex mit mutiertem p53 in Tumorzellen gefunden (Blagosklonny et al, 1996; Nagata et al, 1999; Sepehrnia et al, 1996; Whitesell & Lindquist, 2005). Hsp90 bindet mutiertes p53 sehr stark, wie in *in vitro* Translationsexperimenten und Immunopräzipitation aus Tumorzellen

gezeigt wurde (Peng et al, 2001). Hsp90 interagiert aber nicht nur mit mutiertem p53, sondern auch mit WT p53, obwohl diese Interaktion schwächer ist (Muller et al, 2004; Walerych et al, 2004). Die Interaktion mit Hsp90 verhindert *in vitro* die Aggregation von p53 und erhält so die DNA-Bindeaktivität. Mittels NMR-Spektroskopie und Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass die DBD von p53 mit verschiedenen Domänen von Hefe-Hsp90 interagiert, wobei p53 am stärksten an die C-terminale Domäne bindet (Hagn et al, 2011; Park et al, 2011).

Kürzlich konnte *in vivo* und *in vitro* beobachtet werden, dass Hsp90 und Hsp70 mit WT und mutiertem p53 interagieren, um bei die 37°C DNA-Bindeaktivität zu erhalten. Bei Hitzeschocktemperaturen nimmt der Einfluss des Hsp70-Systems gegenüber dem Hsp90-System zu (Walerych et al, 2009).

3.13 Saccharomyces cerevisiae *als Modellsystem*

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist aus mehreren Gründen ein gut geeigneter Modellorganismus, um das Hsp90-Hsp70-Chaperonsystem zu studieren. Zum einen sind Funktion und Struktur der Chaperonsysteme von Hefe bis Mensch zum großen Teil konserviert. So sind eukaryotische Proteine wie v-Src oder GR auch in der Hefe abhängig vom Hsp70-Hsp90-System (Nathan & Lindquist, 1995). Viele Erkenntnisse über die Chaperonabhängigkeit und den Einfluss der Cochaperone auf die Substrataktivität basieren auf Experimenten in der Hefe. Zweitens können leicht Veränderungen im Genom der Hefe vorgenommen werden, so dass Knock-outs verschiedener Chaperone und Cochaperone generiert werden können und so der Effekt des Verlusts eines Cochaperons auf die Aktivität von Hsp90-Substratproteinen untersucht werden kann. Drittens kann die heterologe Expression humaner Proteine in der Hefe in der Hinsicht von Vorteil sein, dass der Einfluss der Chaperonsysteme direkt gemessen werden kann, weil die vielen regulatorischen Proteine, die charakteristisch für Hsp90-Substratproteine sind, in der Hefe nicht vorhanden sind.

3.13.1 Das Hsp90-System der Hefe

Hsp90 aus Hefe ist 60% sequenzhomolog zu humanem Hsp90α und beide Spezies besitzen zwei Gene für Hsp90 (Rebbe et al, 1987). Die Domänenstruktur und Funktionsweise zwischen Hefe und humanem Hsp90 ist hoch konserviert. Hsp90 aus Hefe und Mensch weisen leicht unterschiedliche ATPase-Aktivitäten auf (0,3 Moleküle ATP pro Minute bzw. 0,09 pro Minute) und auch die Cochaperonausstattung variiert (Wegele et al, 2004). So besitzt die Hefe 12 Hsp90-Cochaperone, deren Homologe alle in Säugetieren exprimiert werden, welche noch zusätzliche Cochaperone aufweisen (Johnson & Brown, 2009). Ein weiterer Unterschied ist, dass die Hefe zwei Homologe von Aha1 besitzt, nämlich Aha1 und Hch1. Hch1 stellt eine kürzere Variante von Aha1 dar, bestehend aus der N-terminalen Domäne von Aha1 (Nathan et al, 1999). Hch1 stimuliert die ATPase-Aktivität von

Hsp90 weniger gut als Aha1 (Panaretou et al, 2002). Trotzdem wurde Hch1, nicht Aha1, als Suppressor einer temperatursensitiven Hsp90-Mutation gefunden (Nathan et al, 1999). Die Hefe besitzt zwei PPIasen, Cpr6 und Cpr7, welche als Homologe zu humanem Cyp40 gelten (Mayr et al, 2000). Aus der Familie der FK506-bindenen Proteine (FKBP51, FKBP52) werden keine Homologen in der Hefe gefunden. In Tabelle 1 sind Hsp90-Cochaperone aus Hefe mit den Homologen aus höheren Eukaryoten angegeben.

3.13.2 Das Hsp70-System der Hefe

Das Hsp70-Chaperonsystem ist eine der am höchsten konservierten Proteinfamilie der Evolution. Der Mensch besitzt acht verschiedene Hsp70-Proteine, von denen sechs im Zytoplasma gefunden werden und zwei Isoformen (Hsp70 und Hsc70) den Hauptanteil der zytosolischen Hsp70er bilden (Daugaard et al, 2007). Die Hsp70-Familie in der Hefe besteht aus 14 Mitgliedern (Werner-Washburne & Craig, 1989), von denen neun im Zytoplasma lokalisiert sind, die in die Unterfamilien Ssa, Ssb, Sse und Ssz (Ss steht für *stress seventy-related*) unterteilt werden. Die Ssa-Familie, die aus Ssa1-4 besteht, ist am nächsten verwandt mit den zytosolischen Hsp70s aus Säugetieren. Diese Proteine sind ebenfalls in die Stressantwort und die Translokation von Proteinen über Membranen involviert (Deshaies et al, 1988). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Ssa-Proteine Bestandteil eines Hsp70-Hsp90-Chaperonkomplexes sind (Chang & Lindquist, 1994; Wegele et al, 2003). Die Ssa-Subfamilie ist essentiell für die Hefe und die Expression von mindestens einem der vier Gene ist nötig für das Überleben (Stone & Craig, 1990). Ssa1 und Ssa2 werden konstitutiv exprimiert, während Ssa3 und Ssa4 stressinduziert sind (Stone & Craig, 1990). Der Knock-out von Ssa1 und Ssa2 führt zur Überexpression anderer Hsps sowie von Ssa3 und Ssa4. Die Ssb-Familie, bestehend aus Ssb1 und Ssb2, ist zu 37% homolog mit der Ssa-Familie und besitzt spezialisiertere Funktionen wie die Bindung an translatierende Ribosomen und an die naszierende Polypeptidkette (Nelson et al, 1992; Pfund et al, 1998). Ssz1 ist Bestandteil des sogenannten *ribosome associated complex* (RAC), welcher ebenfalls mit naszierenden Polypeptidketten interagiert (Gautschi et al, 2001; Gautschi et al, 2002). Die Familie der Sse-Proteine besteht aus Sse1 und Sse2 und wird zu den Hsp110-Chaperonen gezählt und nur in Eukaryoten gefunden (Mukai et al, 1993). Hauptsächlich fungieren sie als Nukleotidaustauschfaktor für Hsp70 während der Proteinfaltung (Dragovic et al, 2006; Easton et al, 2000; Shaner et al, 2005). Unabhängig davon besitzen sie Holdase-Funktion, indem sie ungefaltete Proteine binden und sie vor Missfaltung und Aggregation schützen (Easton et al, 2000). Sse wurde außerdem auch im Komplex mit Hsp90 gefunden (Liu et al, 1999). Die ATPase-Aktivität von Sse wird durch Sis1, einem Hsp40-Cochaperon, stimuliert (Raviol et al, 2006). Der Knock-out von Sse1 führt zu Wachstumsdefekten, während der Knock-out von Sse2 keinen Phänotypen aufweist. Der Verlust von beiden ist letal für die Hefe (Liu et al, 1999; Mukai et al, 1993; Shaner et al, 2005).

Die ATPase-Aktivität von Hsp70 wird durch Hsp40/J-Proteine stimuliert. Im Mensch wurden bisher 49 Hsp40-kodierende Gene identifiziert, in der Hefe ungefähr 20 (Kampinga & Craig, 2010; Kampinga et al, 2009). Davon sind 13 im Zytosol der Hefe zu finden. Die aus etwa 65 Aminosäuren bestehende J-Domäne ist Merkmal aller Hsp40-Chaperone und ist verantwortlich für die Stimulation der Hsp70-ATPase (Sahi & Craig, 2007). Die J-Domäne besteht aus einem hoch konservierten Histidin-Prolin-Aspartat (HPD)-Motiv. Ansonsten unterscheiden sich die Hsp40er hinsichtlich ihres Aufbaus, der zellulären Lokalisation und der Menge an Molekülen pro Zelle. Ydj1 ist das häufigste und am besten charakterisierte J-Protein der Hefe. Ydj1 ist zusammen mit der Ssa-Familie an der Proteinfaltung und an der Translokation in das ER und den Mitochrondien beteiligt (Atencio & Yaffe, 1992; Becker et al, 1996; Caplan et al, 1992; Caplan & Douglas, 1991). Der Knock-out von Ydj1 führt zu einem Wachstumsdefekt und höherer Hitzesensitivität (Caplan & Douglas, 1991). Die Bedeutung der verschiedenen J-Proteine ist bisher nicht geklärt aber eine kompartiment- und substratspezifische Funktion wird vermutet (Sahi & Craig, 2007).

Die Hsp70-Aktivität wird außerdem durch Nukleotidaustauschfaktoren reguliert. Snl1 übernimmt diese Aufgabe in Hefe und zeigt Homologien zum humanen Bag1 (Sondermann et al, 2002).

Tabelle 2 Anzahl der Chaperone und Cochaperone in Hefe. Angegeben ist die Anzahl an Molekülen pro Hefezelle und der Anteil bezogen auf Ssa1 (links) und Hsp90 (rechts) in Prozent, wobei die Molekülanzahl von Hsp82 und Hsc82 summiert wurde.

Chaperon/ Cochaperon	Moleküle pro Zelle	Anteil pro Ssa1 (%)	Chaperon/ Cochaperon	Moleküle pro Zelle	Anteil pro Hsp90 (%)
Ssa1	2,69E+05		Ssa1	2,69E+05	46
Ssa2	3,64E+05	100	Sti1	6,76E+04	11
Ssa3	6,44E+03	2,5	Sba1	3,37E+04	6
Ssa4	1,79E+04	6,7	Crp6	1,86E+04	3
Sse1	7,17E+04	25	Cpr7	3,23E+03	0,5
Sse2	6,30E+03	2,5	Aha1	1,39E+04	2,5
Snl1	3,35E+03	1,25	Hch1	8,53E+03	1,5
Ydj1	1,19E+05	5	Ppt1	6,99E+03	1
Sti1	6,76E+04	25	Cns1	6,72E+02	0,1
Hsc82	1,32E+05	200	Cdc37	1,02E+04	2
Hsp82	4,45E+05		Sgt1	1,34E+03	0,2

In Tabelle 2 ist die Anzahl der Chaperone und Cochaperone in der Hefe angegeben. Dabei wird deutlich, dass Sti1 das am höchsten exprimierte Cochaperon ist, mit etwa einem Viertel der Menge von Ssa1 und einem Zehntel von Hsp90. Alle anderen Cochaperone sind geringer exprimiert mit höchstens 6% der Menge an Hsp70 oder Hsp90. Im Gegensatz zur gängigen Meinung, dass Hsc82 unter

Normalbedingungen etwa zehnmal stärker exprimiert wird als Hsp82, wurden hier ungefähr gleiche Mengen beider Proteine detektiert. Das kann unter anderem auf unterschiedliche Inkubationsbedingungen, verschiedene Stammhintergründe oder die experimentelle Methodik zurückzuführen sein.

3.14 Zielsetzung

Drei Jahrzehnte Forschung zeigen, dass Hsp90 eine zentrale Bedeutung in unzähligen Signalwegen der Zelle einnimmt. Trotz dieser zentralen Stellung in Biologie und Medizin sind auf Grund der hohen Komplexität des Systems längst nicht alle Fragestellungen zur Funktion, Regulation und Struktur von Hsp90 geklärt. Hsp90 interagiert mit sehr unterschiedlichen Substratproteinen, welche viele verschiedene Konformationen einnehmen können. Bislang konnte noch kein gemeinsames Sequenzmotiv der Substratproteine festgestellt werden. So stellen sich folgende Fragen: Wie erkennt Hsp90 seine Substrate? Wie genau tragen die vielen Cochaperone zur Erkennung und Reifung der Substrate bei? Wie interagiert Hsp90 dabei mit anderen Systemen, wie dem Hsp70-Chaperon- oder dem Ubiquitin-Proteasomsystem und wie wird die Entscheidung zwischen Faltung und Abbau eines Substratproteins getroffen?

In dieser Arbeit soll mit Hilfe des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* der Einfluss der Hsp90- und Hsp70-Chaperonsysteme mit ihren Cochaperonen auf verschiedene Hsp90-Substratproteine untersucht werden. Dazu werden Knock-out-Stämme verwendet, welche bestimmte Cochaperone nicht mehr exprimieren. Durch den Vergleich der Aktivitäten im Knock-out und im WT-Stamm kann der Einfluss des jeweiligen Cochaperons auf das Hsp90-Substratprotein bestimmt werden. Außerdem soll untersucht werden, ob eine unterschiedliche Hsp90- oder Hsp70-Abhängigkeit zwischen verschiedenen Substratproteinen existiert. Durch den Vergleich acht verschiedener Hsp90-Substratproteine soll die Frage geklärt werden, ob alle Proteine gleichermaßen auf Änderungen im Hsp70/Hsp90-Chaperonsystem reagieren oder ob Unterschiede in der Chaperonabhängigkeit existieren. Außerdem soll untersucht werden, wie die Cochaperone die Substratproteine beeinflussen. Zeigen sie Substratspezifität oder agieren sie eher promiskuitiv? Als Hsp90-Substratproteine wurden die Familie der Steroidhormonrezeptoren, die Kinase v-Src, das Modellsubstrat Luciferase und das Tumorsuppressorprotein p53 untersucht. Durch diese Auswahl ist sowohl ein Vergleich innerhalb einer Proteinfamilie (fünf Steroidhormonrezeptoren) als auch zwischen sehr verschiedenen Proteinen (z.B. zwischen dem Transkriptionsfaktor p53 und der Kinase v-Src) möglich. Über die Interaktion von p53 mit dem Hsp90-Chaperonsystem ist bisher wenig bekannt. Daher soll in dieser Arbeit der Einfluss der Cochaperone auf p53 näher beschrieben werden.

Die p53-Aktivität wird nicht nur über ein riesiges Netzwerk an interagierenden und modifizierenden Proteinen kontrolliert, sondern auch intrinsisch reguliert. So wird eine regulatorische Rolle des C-

Terminus angenommen, welche aber in der Literatur kontrovers diskutiert wird. In dieser Arbeit sollen daher p53 und p53-Mutanten rekombinant aus *E. coli* gereinigt werden und unmodifiziertes mit phosphoryliertem bzw. acetyliertem p53 verglichen werden. Außerdem soll der Einfluss des C-terminalen Fragments auf die Aktivität und Stabilität des Moleküls bestimmt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien

4.1.1 Geräte

Absorptionsspektrophotometer	
Cary 50 Bio UV-VIS-Spectrophotometer	Varian (Palo Alto, USA)
Cary 100 Bio UV-VIS-Spectrophotometer	Varian (Palo Alto, USA)
Nanodrop	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Spektrophotometer Novaspec II	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Chromatographieanlagen mit Zubehör	
Äkta FPLC	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
HPLC mit UV/ FL-Detektor	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Superloop Injektionsschleife	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
(5 ml, 10 ml, 150 ml)	
Circulardichroismus-Spektropolarimeter	Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
Jasco J-715 mit PTC 343 Peltierelement	
Dampfautoklav Varioklav EP-Z	H+P (Oberschleißheim, Deutschland)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, Deutschland)
Entwicklermaschine Optimax TR	MS Laborgeräte (Heidelberg, Deutschland)
Fluoreszenzspektrometer	Spex (Edison, USA)
FluoroMax-2 mit temperierbarem Küvettenhalter	
FluoroMax-3 mit temperierbarem Küvettenhalter	
Geldokumentationssystem Biodoc II	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Gelelektrophorese- und Blotapparaturen	
Hoefer Mighty Small	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Fast Blot B44 Apparatur	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Hoefer SE600 Ruby	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Homogenisator Ultra Thurrax DIAX900	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Kühltruhe, -80°C	Sanyo (San Diego, USA)
Luminometer	Tecan (Crailsheim, Deutschland)
Genios Spectra Fluor Plus	
Magnetrührer MR 2000	Heidolph (Kelheim, Deutschland)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Plattformschüttler Polymax	Heidolph (Kelheim, Deutschland)

Rasterelektronenmikroskop JEOL 5900 LV	Jeol (Eching, Deutschland)
Reagenzglasroller	Heidolph (Kelheim, Deutschland)
Schwingmühle MM400	Retsch (Haan, Deutschland)
Spannungsquelle EPS 3500, 3501 und 1001	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Thermocycler Primus 25	MWG (Ebersberg, Deutschland)
Thermomixer	Eppendorf (Köln, Deutschland)
Umluftinkubator	New Brunswick (Nürtingen, Deutschland)
Vakuumpumpe	Vacuubrand (Wertheim, Deutschland)
Typhoon 9400	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Vortex MS2	IKA (Wilmington, USA)
Waagen	
Analysenwaage BP 121 S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Halbmikrowaage BL 310	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Halbmikrowaage 1409 MP	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad Haake F6-K	Haake (Karlsruhe, Deutschland)
Zellaufschlussmaschine Basic Z	Constant Systems (Warwick, England)
Zentrifugen	
Avanti J25 und J26 XP	Beckman (Krefeld, Deutschland)
Mit Rotoren JA-10 und JA.25.50	
Analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A	Beckman (Krefeld, Deutschland)
Kühlzentrifuge Universal 32R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
und Rotina 46R	
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Köln, Deutschland)

4.1.2 Chemikalien

Acrylamidlösung (38% mit 2% Bisacrylamid)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Dinatriumsalz	Roche (Mannheim, Deutschland)
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Dinatriumsalz	Roche (Mannheim, Deutschland)
Agar Agar	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Aminosäuren	Sigma (St. Louis, USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bacto-Trypton	BD Biosciences (San Jose, USA)
Bacto-Pepton	BD Biosciences (San Jose, USA)

5´-Carboxyfluorescein	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blau R-250	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (St. Louis, USA)
Dithiothreitol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma (St. Louis, USA)
5´-Fluoroorotic acid (5´-FOA)	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
G418, Disulfatsalz	GibcoBRL (Karlsruhe, Deutschland)
Galaktose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Geldanamycin	Sigma (St. Louis, USA)
Glukose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin, 99%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Harnstoff	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hefeextrakt	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Imidazol	Sigma (St. Louis, USA)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Lachs-Sperma DNA	Sigma (St. Louis, USA)
Macbecin II	DTP NCI/NIH (Bethesda, USA)
2-Mercaptoethanol, reinst	Sigma (St. Louis, USA)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Nikotinsäureamidadenindinukleotid (NADH), Dinatriumsalz	Roche (Mannheim, Deutschland)
o-Nitrophenol-ß-D-Galactopyranosid (ONPG)	Sigma (St. Louis, USA)
N-(2-Hydroxethyl)-piperazine-N'-2-Ethansulfonsäure (Hepes)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nonidet 40 (NP-40)	Sigma (St. Louis, USA)
Phosphoenolpyruvat (PEP), Kaliumsalz	Sigma (St. Louis, USA)
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat (Tween-20)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Protease Inhibitor Mix FY, G, HP	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Radicicol	Sigma (St. Louis, USA)
Raffinose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Steroidhormone	Sigma (St. Louis, USA)
Aldosteron	
21-Hydroxyprogesteron	
Progesteron	
ß-Estradiol	
Testosteron	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochlorid (TCEP)	Pierce (Rockford, USA)
Triton X-100	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Uracil	Sigma (St. Louis, USA)
Yeast Nitrogen Base	Difco (Detroit, USA)
YPD-Medium	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Alle weiteren Chemikalien stammen von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) und besitzen, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p.A. Alle Lösungen wurden mit Millipore-gefiltertem bidestillierten Wasser hergestellt (Millipore, Bedford, USA).

4.1.3 Chromatographiematerialien und -säulen

HiTrap SP FF	GE Healthcare (München, Deutschland)
HiTrap Q FF	GE Healthcare (München, Deutschland)
HiTrap Heparin HP	GE Healthcare (München, Deutschland)
HiTrap Desalting	GE Healthcare (München, Deutschland)
HisTrap FF	GE Healthcare (München, Deutschland)
Superdex 200 HiLoad 26/60	GE Healthcare (München, Deutschland)
Superdex 75 HiLoad 26/60	GE Healthcare (München, Deutschland)
Superdex 200 HiLoad 10/300 GL	GE Healthcare (München, Deutschland)
Resource Q	GE Healthcare (München, Deutschland)

4.1.4 Verbrauchsmaterialien

96-well-Platten	Greiner & Söhne (Nürtingen, Deutschland)
BCA-Proteinassay Reagenz	Pierce (Rockford, USA)
Bradford-Reagenz	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Dialyseschläuche	Spectrum Laboratories (Houston, USA)
ECL plus Westernblot Detektionssystem	GE Healthcare (München, Deutschland)
Filtereinheit für Zentrifugen (Centrikon 10 und 30 kDa)	Amicon (Witten, Deutschland)
Filterpapier	Whatman (Maidstone, USA)
Glaskugeln (Ø 4 mm)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glasperlen (Ø 0,25 mm)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Immobilon-P Membran (PVDF)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Membranfilter (0,22 µm)	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
PCR Product Purification and Gel Extraction Kit	Promega (Mannheim, Deutschland)
Petrischalen, Polystyrol, 94 mm	Greiner & Söhne (Nürtingen, Deutschland)
pH-Indikatorstreifen	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Plasmid Preparation Kit	Promega (Mannheim, Deutschland)
Plastikküvetten, Einweg	Brand (Wertheim, Deutschland)
Polyethylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner & Söhne (Nürtingen, Deutschland)
Röntgenfilme X-OMAT^{TM} AR	Kodak (Rochester, USA)
Sterilfilter (0,22 µm)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
UV-Küvetten, Glas	Hellma (München, Deutschland)

4.1.5 Antikörper und Immunologische Materialien

Dynabeads Antibody Coupling Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Monoklonale IgG Anti-p53 Antikörper (aus Maus) Ab-3, Ab-5, Ab-6	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Monoklonaler IgG Anti-Chicken Src Antikörper EC10 (aus Maus)	Millipore (Bedford, USA)
Monoklonaler IgG Anti-GR-Antikörper (P-20) (aus Maus)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Monoklonaler IgG Anti-Phospho-p53 (S392) Antikörper (aus Maus)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Monoklonaler IgG Anti-Phosphotyrosin Antikörper (aus Maus)	Millipore (Bedford, USA)
Monoklonales IgG Anti-Kaninchen-POD-Konjugat	Sigma (St. Louis, USA)
Monoklonales IgG Anti-Maus-POD-Konjugat	Sigma (St. Louis, USA)
Polyklonaler IgG Anti-p53 Antikörper affinitätsgereinigt, (aus Kaninchen)	Bethyl (Montgomery, USA)

Polyklonales Serum gegen Hefe-Hsp90, Ydj1, Sti1, Ppt1 (aus Kaninchen)	Pineda Research (Berlin, Deutschland)
rProtein A-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare (München, Deutschland)

4.1.6 Proteine, Enzyme und Standards für die Molekularbiologie

Alkaline Phosphatase	Roche (Mannheim, Deutschland)
DNA-Größenstandard 1kb	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
DNAseI	Roche (Mannheim, Deutschland)
Lachshoden-DNA	Sigma (St. Louis, USA)
Pfu-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim, Deutschland)
Protein-Molekulargewichtsstandard (LMW)	BioRad (München, Deutschland)
Protein-Molekulargewichtsstandard vorgefärbt	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pwo-DNA-Polymerase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Pyruvatkinase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Restriktionsenzyme	NEB (Frankfurt, Deutschland)
T4 DNA-Ligase	Promega (Mannheim, Deutschland)
Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, USA)

4.1.7 Oligonukleotide

Als spezifische Erkennungssequenz für p53 wurde folgendes Oligonukleotid verwendet. Dieses war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert und wurde für die Analyse der p53-DNA-Bindung mittels EMSA eingesetzt.

Cy5 p21 fwd 5'-TGGCCATCAGGAACATGTCCCAACATGTTGAGCTCTGGCA

p21 rev 5'-TCGCAGAGCTCAACATGTTGGGACATGTTCCTGATGGCCA

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Klonierung benutzt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 3: Für die Klonierung verwendete Oligonukleotide

	Primer	Sequenz (5´→ 3´)
1	316e392erev	cgaattggagctctcagtcttcgtcaggcccttctgtcttg
2	316s392afwd	caagacagaagggcctgacgcagactgagagctccaattcg
3	316s392afwd	caagacagaagggcctgacgcagactgagagctccaattcg
4	316s392arev	cgaattggagctctcagtctgcgtcaggcccttctgtcttg
5	316s392arev	cgaattggagctctcagtctgcgtcaggcccttctgtcttg
6	316s392efwd	caagacagaagggcctgacgaagactgagagctccaattcg
7	316s392rfwd	caagacagaagggcctgacagagactgagagctccaattcg

8	316s392rrev	cgaattggagctctcagtctctgtcaggcccttctgtcttg
9	Aha1fwdBamHI	ggcggatccatggtcgtgaataacccaaataac
10	Aha1revHindIII	ggcaagcttttataatacggcaccaaagccg
11	AhaPromBamHI	catcggatccccgatgcgctagttgccagcgccctgatac
12	AhaTermHindIII	actgaagcttgttcacaacggctaactatcgacg
13	C363revSacI	atatgagctctcacctgctccccccctggctcc
14	Cyc1 rev NcoI	nnnnccatggattaatttagtgtgtgtatttgtgtt
15	Cyc1 fwd BglII	nnnnagatctcagatccgccaggcgtgtatatatag
16	eYFP Link fwd	ggttcgacggtaccgcgggcc
17	eYFP NotI rev	ggtttagcggccgcttacttgtacagctcgtccatg
18	FKBP52fwd KpnI	cggggtaccatgacagccgaggagatgaaggcgaccgag
19	FKPB52rev SpeI	ggactagtctatgcttctgtctccacctgagactggctccc
20	hAha1 fwd BamHI	ggcggatccatggccaagtggggtgaggg
21	hAha1 rev XhoI	ggcctcgagctaaaataagcgtgcgccatagc
22	Hch1fwdBamHI	ggcggatccatggttgtcttgaatccaaataac
23	Hch1revHindIII	ggcaagctttcaaacttgtatatcctttgagtg
24	lacZ f BamHI	cgggatccatgactatgattacggattctctgg
25	LacZ f NotI	gattagaatgcggccgcatgactatgattacggattctctgg
26	LacZ r NotI	gattagaatgcggccgcttatttttgacaccagaccaactggt
27	LacZ r SacI	cgcggagctcttatttttgacaccagaccaactgg
28	LacZ fwd NcoI	nnnnccatgggaactatgattacggattctctggcc
29	LacZ rev XbaI	nngttctagattatttttgacaccagaccaactggt
30	Luci f BamHI	cgggatccatggaagacgccaaaaacataaag
31	Luci r XbaI	gctctagattacaatttggactttccgccc
32	N93p53fwdNotI	atatgcggccgcatgtcatcttctgtcccttcccag
33	p53 fwd BamHI	ccgggatccatggaggagccgcagtcagatc
34	p53 fwd NotI	atatgcggccgcatggaggagccgcagtcagatc
35	p53 Link rev	tggatcccgggcccgcggtacagtcgaaccgtctgagtcaggcccttctg
36	p53 rev EcoRI	ccggaattctcagtctgagtcaggcccttctg
37	p53 rev SacI	atatgagctctcagtctgagtcaggcccttc
38	p53Cfw	caacaccagctcctctcccc
39	p53corefw	ccagccccctcctggcccctgtcatcttctgtcccttccc
40	p53corerev	ctttggctggggagaggagctggtgttgttgggcag
41	p53I254Ffwd	ggaggcccatcctcaccttcatcacactggaagactcc

42	p53I254Frev	ggagtcttccagtgtgatgaaggtgaggatgggcctcc
43	p53P177Lfwd	ggttgtgaggcgctgcctccaccatgagcgctgc
44	p53P177Lrev	gcagcgctcatggtggaggcagcgcctcacaacc
45	p53P72Rfwd	gccagaggctgctccccgcgtggcccctgcaccagc
46	p53P72Rrev	gctggtgcaggggccacgcggggagcagcctctggc
47	p53R248Efwd	tgcatgggcggcatgaacgagaggcccatcctcaccatc
48	p53R248Erev	gatggtgaggatgggcctctcgttcatgccgcccatgcag
49	p53R273Efwd	gacggaacagctttgaggtggaggtttgtgcctgtcctggga
50	p53R273Erev	tcccaggacaggcacaaacctccacctcaaagctgttccgtc
51	p53R280Efwd	tgtttgtgcctgtcctggggaagaccggcgcacagaggaag
52	p53R280Erev	cttcctctgtgcgccggtcttccccaggacaggcacaaaca
53	p53R283Hfwd	cctgggagagaccggcacacagaggaagag
54	p53R283Hrev	ctcttcctctgtgtgccggtctctcccagg
55	p53V143Afwd	ccaagacctgccctgcgcagctgtgggttg
56	p53V143Arev	caacccacagctgcgcagggcaggtcttgg
57	p53Y220Cfwd	gtgtggtggtgccctgtgagccgcctgaggttgg
58	p53Y220Crev	ccaacctcaggcggctcacagggcaccaccacac
59	RE fwd	tcgaccttgcctggacttgcctggccttgccttt
60	RE rev	tcgaaaaggcaaggccaggcaagtccaggcaagg
61	S371Efwd	ccagccacctgaaggagaaaaagggtcagtc
62	S371Erev	gactgacccttttttctccttcaggtggctgg
63	S376Efwd	ggagaaaaagggtcaggagacctcccgcc
64	S376Erev	ggcgggaggtctcctgacccttttttctcc
65	S378Efwd	gggtcaggagaccgagcgccataaaaaactc
66	S378Erev	gagtttttttatggcgctcggtctcctgaccc
67	S392ErevSacI	atatgagctctcagtcttcgtcaggcccttc
68	S392RrevSacI	atatgagctctcagtctctgtcaggcccttc
69	TL fwd	ccgagctcccagtgcaagtgcaggtgcc
70	yfp fwd	cgccaccatggtgagcaagggcgagg
71	YFP fwd RF	caaatacacacactaaattaatccatgccatggtgagcaagggcgaggag
72	yfp rev	gcgcggatccttacttgtacagctcgtccatgcc
73	YFP rev RF	gcccgggggatccactagttctagattacttgtacagctcgtccatgccg

4.1.8 Bakterielle Plasmide und Stämme

4.1.8.1 Plasmide

Tabelle 4 Verwendete Plasmide für *E. coli*

Plasmid	Insert	Herkunft
pET28a	p53wt	Hagn, TU München
pET28a	p53 S392E	Hagn, TU München
pET28a	N93p53	Hagn, TU München
pET28a	p53Δ10	Hagn, TU München
pET28a	p53Δ30	Hagn, TU München
pET28a	p53Δ37	Hagn, TU München
pET28a	p53 R280E	Hagn, TU München
pET28a	yeast Hsp82 WT	Hessling, TU München

4.1.8.2 Stämme

Tabelle 5 Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Ursprung
BL21 (DE3) codon plus	F– *ompT hsdS*(rB– mB–) *dcm*+ Tetr *gal endA* Hte [*argU proL* Camr]	Stratagene (La Jolla, USA)
Mach1^{TM}T1R	F– Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *hsd*R(rK–, mK+) Δ*rec*A1398 *end*A1 *ton*A	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
XL1- Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac	Stratagene (La Jolla, USA)

E. coli XL1- Blue und *E. coli* Mach1 ^{TM}T1R wurden für die Klonierung und Amplifizieren von Plasmiden verwendet. Für die Expression von Proteinen wurde *E. coli* BL21 (DE3) codon plus verwendet.

4.1.9 Medien und Antibiotika für die Anzucht von *E. coli*

LB_0:	LB-Medium	20 g/l
	für Platten: Agar Agar	20g/l
Antibiotika:	Ampicillin	200 µg/ml in ddH_2O
	Kanamycin	50 µg/ml in ddH_2O
	Chloramphenicol	35 µg/ml in Ethanol

Die Medien wurden für 20 min bei 121°C in einem Dampfautoklav autoklaviert. Die Antibiotikalösungen wurden steril filtriert und bei -20°C gelagert. Das Antibiotikum wurde in einem Verhältnis von 1:1000 nach dem Autoklavieren zum Medium hinzugegeben.

4.1.10 Hefevektoren und Hefestämme

4.1.10.1 Hefevektoren

Tabelle 6 Verwendete und in dieser Arbeit hergestellte Plasmide für *S. cerevisiae*

Plasmidname	Beschreibung	Ursprung
p415GPD	Leervektor	LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland)
pRS313	Leervektor	LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland)
pRS316CUPp53	p53-Expressionsplasmid, kupferinduzierbarer Promoter	Bianchi, TU München
pRS316CUPp53 S392E	p53-Expressionsplasmid, kupferinduzierbarer Promoter, S392E-Mutation	diese Arbeit
pRS316CUPp53 S392R	p53-Expressionsplasmid, kupferinduzierbarer Promoter, S392R-Mutation	diese Arbeit
pRS316CUPp53 R248E	p53-Expressionsplasmid, kupferinduzierbarer Promoter, R248E-Mutation	diese Arbeit
pp53RepßGal	p53-Reporterplasmid, p21-Promotersequenz und Cyc1-Minimalpromoter vor der ß-Galaktosidasesequenz	diese Arbeit
p413GPD human GR	GR-Expressionsplasmid, GPD-Promoter	Schmid, TU München
p413GPD human AR	AR-Expressionsplasmid, GPD-Promoter	Schmid, TU München
p413GPD rat MR	MR-Expressionsplasmid, GPD-Promoter	Schmid, TU München
p413GPD human ER	ER-Expressionsplasmid, GPD-Promoter	Schmid, TU München
p413GPD human PR	PR-Expressionsplasmid, GPD-Promoter	Schmid, TU München
p413GPD Luciferase	Luciferase-Expressionsplasmid, GPD-Promoter	Schmid, TU München
pUCΔSS-26X	ßGalaktosidase-Reporterplasmid für GR, MR, PR, AR	J.F. Louvion (Louvion et al, 1996)
pΔsERE	ßGalaktosidase-Reporterplasmid für ER	B. Freeman (Freeman et al, 2000)

Yp314Gal vSrc	v-Src-Expressionsplasmid, galaktoseinduzierbarer Promoter	S. Lindquist (Nathan & Lindquist, 1995)
pRS315Ydj1	Ydj1 unter endogenem Promoter	E. Craig (Sahi & Craig, 2007)
pRS315Ydj1 N104	N-terminales Deletionskonstrukt von Ydj1 unter endogenem Promoter	E. Craig (Sahi & Craig, 2007)
pRS315Ydj1 N172	N-terminales Deletionskonstrukt von Ydj1 unter endogenem Promoter	E. Craig (Sahi & Craig, 2007)
pRS316CUPßGal	ßGalaktosidase-Expressionsplasmid, kupferinduzierbarer Promoter	S. Lindquist
p426GPDßGal	ßGalaktosidase-Expressionsplasmid, GPD-Promoter	Schmid, TU München
p413GPDGFP	GFP-Expressionsplasmid, GPD-Promoter	Schmid, TU München

4.1.10.2 Hefestämme

Tabelle 7 Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Ursprung
BY4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔSti1	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YOR027w::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔYdj1	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YNL064c::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔSnl1	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YIL016w::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔSse1	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YPL106c::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔSba1	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YKL117w::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔCpr6	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YLR216c::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔCpr7	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YJR032w::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔPpt1	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YGR123c::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 ΔAha1	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0;	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)

	YDR214w::kanMX4	
BY4741 ΔHch1	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YNL281w::kanMX4	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
ECU82α	Mat α, can1-100, ade2-1, his3-11, 15, leu2-3, 12, trp1-1, ura3-1, hsc82::LEU2, hsp82::LEU2 mit Hsc82-Plasmit pKAT6	S. Lindquist (Nathan & Lindquist, 1995)
JN55	MATa leu2-3,112 his3-11 ura3-52 trp1D1 lys2	E. Craig (Becker et al, 1996)
JN516	MATa leu2-3,112 his3-11 ura3-52 trp1D1 lys2 ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::LYS2	E. Craig (Becker et al., 1996)
JB67	MATa leu2-3,112 his3-11 ura3-52 trp1D1 lys2 ssa1-45:URA3 ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::LYS2	E. Craig (Becker et al., 1996)

4.1.11 Medien und Lösungen für die Anzucht von *S. cerevisiae*

YPD-Medium:	YPD	50g/l
	für Platten: Agar Agar	20 g/l
Dropout-Medium (CSM):	YNB	6,7 g/l
	Selektiver Aminosäuremix	0,87 g/l
	Glucose/Galaktose/Raffinose	20 g/l
	für Platten: Agar Agar	20 g/l
Selektiver Aminosäuremix:	Adenin	0,5g/l
	Arginin	2 g/l
	Aspartat	2 g/l
	Histidin	2 g/l
	Leucin	10 g/l
	Lysin	2 g/l
	Methionin	2 g/l
	Phenylalanin	2 g/l
	Threonin	2 g/l
	Tryptophan	2 g/l
	Tyrosin	2 g/l
	Uracil	2 g/l
Additive:	G418-Sulfat	200 mg/l

5-FOA	1 g/l

Die Medien wurden für 20 min bei 121°C in einem Dampfautoklav autoklaviert. Die Additive wurden nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

PLATE-Lösung für die Transformation:	Steriles 45 % PEG 400	90 ml
	1 M LiOAc	10 ml
	1 M Tris-HCl (pH 7,5)	1 ml
	0,5 M EDTA	0,2 ml

4.1.12 Puffer für die Proteinchemie

4.1.12.1 Puffer für die Reinigung von p53

Aufschlusspuffer	40 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5
	50 mM KCl
	1 mM DTT
	1 mM EDTA
Heparin A	40 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5
	5 % Glycerin
	50 mM KCl
	1 mM DTT
Heparin B	40 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5
	5 % Glycerin
	1 M KCl
	1 mM DTT
Verdünnungspuffer	20 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4P, pH 7,5
Sepharose A	50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5
	50 mM KCl
	5 mM ETDA
	1 mM DTT
Sepharose B	50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5
	1 M KCl
	5 mM ETDA
	1 mM DTT
GF-Puffer	50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5
	100 mM KCl
	1 mM TCEP

Die Puffer wurden filtriert und entgast.

4.1.12.2 Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Lämmli-Probenpuffer (5x)	300 mM Tris/HCl, pH 6,8
	10 % (w/v) SDS
	50 %(v/v) Glycerin
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau
	5 % (v/v) ß-Mercaptoethanol
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
	0,8 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 6,8
	0,4 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris
	2 M Glycin
	1% (w/v) SDS
	pH 8,8

4.1.12.3 Puffer und Lösungen für die Nativ-Gelelektrophorese

Nativgel-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,3
	192 mM Glycin
5 x Auftragspuffer:	300 mM Tris/HCl, pH 7,4
	50 % (v/v) Glycerin
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau

4.1.12.4 Puffer und Lösungen für EMSA

EMSA-Laufpuffer	0,03 M Tris/HCl, pH 8
	0,03 M Borsäure
	0,005 mM EDTA
	0,1% (v/v) TritonX-100
2x DNA-Bindepuffer	80 mM HEPES/KOH, pH 8
	15 % (v/v) Glycerin
	20 mM $MgCl_2$
	0,2 % (w/v) TritonX-100
	2 mg/ml BSA
	10 mM DTT

	100 mM KCl
Reaktionsmix	6 µl 0,5 pmol/µl Cy5-p21
	200 µl 2x DNA-Bindepuffer
	0,8 µl 100 pmol/µl unspezifische DNA
	119,5 µl H_2O

4.1.12.5 Puffer und Lösungen für Coomassiefärbung

Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	0,05 % (w/v) Coomassie Blue R250
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure

4.1.12.6 Puffer und Lösungen für Silberfärbung

Fixierlösung	60 ml 50 % (v/v) Aceton
	25 µl 37% Formaldehyd
	1,5 ml 50 % (w/v) TCA
Vorbehandlungslösung 1	60 ml 50 % (v/v) Aceton
Vorbehandlungslösung 2	60 ml 50 % (v/v) Aceton
	100 ml 10 % (w/v) $Na_2S_2O_3$
Imprägnierlösung	60 ml H_2O
	0,8 ml 20 % (w/v) $AgNO_3$
	25 µl 10 % (w/v) $Na_2S_2O_3$
Stoplösung	1 % (v/v) Essigsäure

4.1.12.7 Puffer und Lösungen für Westernblot

Westernblot-Transferpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
	40 mM Glycin
	0,04% (w/v) SDS
	20% (v/v) Methanol
PBS (10x)	40 mM KH_2PO_4
	160 mM Na_2HPO_4
	1,15 M NaCl
PBS-T	1x PBS
	0,1 % (w/v) Tween
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7
	100 mM ß-Mercaptoethanol

	2% (w/v) SDS

4.1.12.8 Puffer und Lösungen für den ß-Galaktosidase-Assay

Z-Puffer	66 mM Na_2HPO_4
(autoklaviert)	40 mM NaH_2PO_4
	100 mM KCl
	1 mM $MgSO_4$
	pH 7,0
Z-Puffer + ß-Mercaptoethanol	Z-Puffer
	0,27 % (v/v) ß-Mercaptoethanol
ONPG	4 mg/ml in Z-Puffer

4.1.13 Computerprogramme

Adobe Illustrator CS2	Adobe Inc. (San Jose, USA)
Adobe Photoshop CS2	Adobe Inc. (San Jose, USA)
Adobe Reader 8.0	Adobe Inc. (San Jose, USA)
Borwin	Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
Endnoteweb	Thomson Reuters (New York, USA)
ImageQuant	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Microsoft Office 2001	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
NCBI Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
Origin 8.0	OriginLab Corp. (Northhampton, USA)
ProtParam Tool	ExPasy (www.expasy.ch)

4.2 Molekularbiologische Methoden

Alle Lösungen für das molekularbiologische Arbeiten wurden sterilisiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt. Für Polymerasekettenreaktion (PCR), DNA-Elektrophorese, Restriktionsverdau, Ligation, Anzucht und Transformation von *E. coli* wurden Standardprotokolle verwendet (Sambrook & Russel, 2001).

4.2.1 Herstellung, Isolierung und Reinigung von DNA

4.2.1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Der *E. coli*-Stamm XL-1 Blue wurde für das Herstellen und die Vervielfältigung von Plasmid-DNA verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eine Plasmidisolierungskits nach Herstellerangaben aufgereinigt (Promega, Mannheim, Deutschland) und bei -20°C gelagert.

4.2.1.2 Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

DNA, die durch Restriktionsverdau oder PCR (Mullis et al, 1986) erhalten wurde, wurde mit einem PCR-Produkt-Aufreinigungskit gereinigt (Promega, Mannheim, Deutschland). Wenn nötig wurden DNA-Fragmente vorher durch Agarosegelelektrophorese nach Standardbedingungen getrennt (Sambrook & Russel, 2001). Banden der richtigen Größe wurden mit Hilfe von Ethidiumbromid-färbung und UV-Licht detektiert, ausgeschnitten und mit Hilfe des Kits gereinigt.

4.2.2 Mutagenese-PCR

Um eine Punktmutation in eine DNA-Sequenz einzuführen wurde eine Mutagenese-PCR mit Hilfe des *Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Der Hefe-Shuttle-Vektor pRS316CUP (siehe Tabelle 4) mit der enthaltenen p53-kodierenden Sequenz wurde als Templat eingesetzt. Die Mutagenese-PCR wurde mit den entsprechenden Mutagenese-Primern durchgeführt (siehe Tabelle 1). Die Mutationen wurden durch Sequenzierung des gesamten Gens mit Standard-sequenzierungsprimern verifiziert.

4.2.3 Klonierung des p53-Reporterkonstrukts

Um den Reportervektor für p53 herzustellen, wurde die p53-Erkennungssequenz (p53 *responsive element*, p53 RE) mit dem CytochromC-Minimalpromoter fusioniert und vor die ß-Galaktosidase-sequenz kloniert. Als Basis diente ein Reportervektor, der für p53-Aktivitätsassays in Säugerzellen designt wurde *(Translucent Reporter Vectors*, Panomics, Santa Clara, USA). Dazu wurde der Promoter aus dem *Translucent Reporter Vector* gegen den CytochromC- Minimalpromoter ausgetauscht. Dieser wurde mittels PCR von genomischer Hefe-DNA amplifiziert (Primer Cyc1 fwd BglII und Cyc1 rev NcoI, siehe Tabelle 3). Anschließend wurde das Luciferasegen des *Translucent Reporter Vectors* gegen die ß-Galaktosidasesequenz ausgetauscht, welche zuvor mittels PCR aus *E. coli* amplifiziert wurde (Primer LacZ fwd NcoI und LacZ rev XbaI, siehe Tabelle 3). Schließlich wurde das komplette Reporterfragment, bestehend aus p53RE, Cytochrom c- Minimalpromoter und ß-Galaktosidase, in den Hefevektor pRS313 kloniert.

4.3 Methoden zur Arbeit mit S. cerevisiae

4.3.1 Anzucht und Aufbewahrung von *S. cerevisiae*

Alle verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Anzucht von *S. cerevisiae* in Flüssigkultur und auf Agarplatte erfolgte standardmäßig und wenn nicht anders angegeben bei 30°C im jeweiligen CSM-Medium zur Selektion auf das enthaltene Plasmid. Die Anzucht von kleinen Volumen Flüssigkultur erfolgte im Reagenzglasroller, die Anzucht größerer Volumina (ab 10 ml) erfolgte im Kolben im Umluftschüttelinkubator. Wachstum und Zelldichte der Kulturen wurden in einem UV/Vis-Spektrometer bei 600 nm protokolliert. Für die Langzeitlagerung wurden Glycerin-

kulturen der Hefe-Kulturen in stationärer Phase durch Versetzten mit 50% Glycerin hergestellt. Die Glycerinkulturen wurden bei -80°C gelagert.

4.3.2 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

Die Transformation von S. cerevisiae erfolgte nach der *Modified Lithium Acetate Yeast Transformation*-Methode (Amberg et al, 2005).

Je Transformation wurde 1 ml einer stationären Hefekultur geerntet. Der Überstand wurde bis auf etwa 100 µl Medium verworfen. Das Zellpellet wurde mit 2 µl Träger-DNA (Lachshoden-DNA) versetzt und resuspendiert. Anschließend wurde ca. 1 µg Plasmid hinzugegeben und gevortext. Nach Zugabe von 500 µl PLATE-Lösung und Vortexen wurden 20 µl 1 M DTT hinzugegeben und gevortext. Nach Inkubation der Zellsuspension über Nacht bei Raumtemperatur erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 min. Die Zellen wurden zentrifugiert und auf entsprechende CSM-Platten ausgestrichen.

4.3.3 Plasmidshuffling in *S. cerevisiae*

In dem Hefestamm ECU82α wurden beide endogenen Gene für Hsp90, Hsp82 und Hsc82, gegen LEU-Marker ausgetauscht. Die Lebensfähigkeit wurde durch die Transformation eines URA-markierten Plasmids mit dem Hsc82-Gen (pKAT6) gewährleistet (Nathan & Lindquist, 1995).

Zunächst wurde der Hefestamm ECU82α mit einem LEU-markiertem Plasmid, welches entweder Hsp90WT oder eine Mutante exprimierte, transformiert und auf URA-LEU-Selektionsmedium ausplattiert. Danach wurden die Hefen auf LEU-Agarplatten, welche 0,1% 5-FOA enthielten, ausgestrichen. Hefen mit der URA3-Sequenz können auf 5-FOA-Selektionsmedium nicht wachsen, da das URA3-Genprodukt 5-FOA in eine toxische Verbindung konvertiert. Daher überleben nur die Hefezellen, die das URA3-Plasmid verloren haben. Diese Hefezellen enthalten somit nur das neue Plasmid, welches Hsp90WT oder die entsprechende Mutante enthält.

4.3.4 Analyse des Phänotyps von *S. cerevisiae* mittels Rasterelektronen-mikroskopie

Um die Oberflächenbeschaffenheit von Hefestämmen zu untersuchen wurde die Methode der Rasterelektronenmikroskopie angewandt. Dabei wandert ein Elektronenstrahl über das Objekt wobei die Wechselwirkung der Elektronen mit der Oberfläche zur Erzeugung des Bildes genutzt wird.

Für die Messung wurden 2 ml Hefezellen aus der stationären Wachstumsphase geerntet. Die Probenvorbereitung und Messung der Proben wurde durch Bettina Richter wie zuvor beschrieben (Haslbeck et al, 2004) an einem JEOL 5900 LV Mikroskop durchgeführt.

4.3.5 Herstellung von Hefelysat

4.3.5.1 NaOH/TCA-Fällung

Drei OD_{600}-Einheiten einer Hefekultur wurden durch Zentrifugation bei 16000 g für 30 s geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl Medium resuspendiert. Dazu wurden 50 µl 1,85 M NaOH gegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 50 µL 50 % TCA zum Ansatz hinzugegeben, wiederum 10 min bei 4°C inkubiert, anschließend für 5 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 70 µl Probenpuffer (1V Lämmli-Probenpuffer, 1V 1M Tris) resuspendiert und für 10 min bei 95°C erhitzt. Entweder wurden 10 µl sofort für eine Gelelektrophorese eingesetzt oder die Proben bei -20°C für spätere Analysen aufbewahrt.

4.3.5.2 Aufschluss in denaturierendem Puffer

Drei OD600-Einheiten einer Hefekultur wurden durch Zentrifugation bei 16000 g für 30 s geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µl Hefeaufschlusspuffer (8 M Harnstoff; 5% (w/v) SDS; 40 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 mM ETDA) resuspendiert. Etwa die gleiche Menge an Glasperlen wie die Größe des Pellets wurde hinzugegeben und in einer Schwingmühle für acht Minuten bei 30 Hz aufgeschlossen. Danach wurde das Lysat für 10 min bei 16000 g zentrifugiert, der Überstand entnommen und die Konzentration mittels BCA-Test bestimmt. Das Pellet wurde in 150 µl PBS aufgenommen und resuspendiert. Die Proben wurden 1:5 mit 5fach Lämmli versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Entweder wurden 10 µl sofort für eine Gelelektrophorese eingesetzt oder die Proben bei -20°C für spätere Analysen aufbewahrt.

4.3.5.3 Herstellung von nativem Hefelysat

Zwischen drei und zehn OD600-Einheiten einer Hefekultur wurden durch Zentrifugation bei 16000 g für 30 s geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µl PBS, welcher mit dem Proteaseinhibitormix FY 1:50 versetzt wurde, resuspendiert. Etwa die gleiche Menge an Glasperlen wie die Größe des Pellets wurde hinzugegeben und in einer Schwingmühle für drei mal zwei Minuten mit 30 Sekunden Pause bei 30 Hz und 4°C aufgeschlossen. Danach wurde das Lysat für zehn Minuten bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die Konzentration mittels Bradford-Test bestimmt. Das Pellet wurde gegebenenfalls in 150 µl PBS aufgenommen und resuspendiert. Die Proben wurden mit 1/5 5fach Lämmli versetzt und für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Entweder wurden 10 µl sofort für eine Gelelektrophorese eingesetzt oder die Proben bei -20°C für spätere Analysen aufbewahrt.

4.3.6 Aktivitätsassays für Hsp90-Substratproteine

4.3.6.1 ß-Galaktosidase-Assay

Der ß-Galaktosidase-Assay ist eine sensitive kolorimetrische Methode für die Detektion und Quantifizierung der ß-Galaktosidase, die als Reporterenzym für die p53- und Steroidhormonrezeptor-Aktivität dient. Dazu wird die katalytische Aktivität der ß-Galaktosidase kolorimetrisch bestimmt, indem man die Hydrolyserate des chromogenen Substrats ONPG misst. Das Reaktionsprodukt dieser Reaktion, o-Nitrophenol, absorbiert im Bereich von 420 nm. Die Absorption bei 420 nm wird gemessen und zum Bestimmen der ß-Galaktosidaseaktivität herangezogen.

ONPG $\longrightarrow$ Galaktose + o-Nitrophenol (gelb)

Je nach Zelldichte wurden 200 µl bis 1 ml einer Hefekultur durch Zentrifugation bei 13000 rmp für 30 s geerntet. Das Pellet wurde in 300 µl Z-Puffer resuspendiert. Etwa die gleiche Menge an Glasperlen wie die Größe des Pellets wurde hinzugegeben und in einer Schwingmühle für 2 min bei 30 Hz aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat bei 4°C für 10 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität herangezogen. Dies erfolgte mittels zwei verschiedener Methoden:

1. 50 µl des Überstandes wurden mit 50 µl Bradfordlösung versetzt und die Absorption bei 595 nm im Cary 50 Plate Reader bestimmt. Weitere 50 µl des Überstandes wurden mit 50 µl ONPG-Lösung, welches 0,01% ß-Mercaptoethanol enthielt, versetzt und die Gelbfärbung im Cary50 Plate Reader bei 420 nm verfolgt. Die Hydrolyserate wurde durch Bestimmung des Anstiegs der Kurve und durch die Normierung mit der Proteinkonzentration des Lysats, ermittelt.
2. 100 µl des Lysats wurden mit 700 µl Z-Puffer+ ß-Mercaptoethanol und 160 µl ONPG-Lösung versetzt und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 400 µl 1M Na_2CO_3 gestoppt und die genaue Zeit, vom Starten der Reaktion durch Zugabe von ONPG bis zum Stoppen, aufgenommen (t). Die Gelbfärbung der Lösung wurde durch Bestimmen der optischen Dichte bei 420 nm (OD_{420}) gemessen. Außerdem wurde die Proteinkonzentration des Überstandes durch Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm(A_{280}) mit Hilfe des NanoDrops bestimmt. Die ß-Galaktosidaseaktivität wurde durch folgende Formel berechnet:

$$ßGalUnits = \frac{OD_{420}}{t \cdot A_{280}}$$

Formel 1 Berechnung der ß-Galaktosidase-Aktivität.
OD_{420} Optische Dichte bei 420 nm
t Zeit in min
A_{280} Absorption bei 280 nm

4.3.6.2 Aktivitätsassay für p53

Ausgangsmaterial für die Bestimmung der p53-Aktivität *in vivo* waren Hefestämme (Tabelle 7), die das p53-Expressionsplasmid und das p53-Reporterplasmid enthielten. Die Aktivität von p53 wurde mittels eines Reporterassays ermittelt. Liegt p53 aktiv in der Zelle vor, kann es als Transkriptionsfaktor fungieren und an die p53-spezifische Promotersequenz binden, die auf dem Reporterplasmid vor der ß-Galaktosidasesequenz kodiert ist. Dadurch wird die Transkriptionsmaschinerie der Hefezelle rekrutiert und die Expression der ß-Galaktosidase angeschaltet. Die Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität mit Hilfe des ß-Galaktosidase-Assays liefert somit Rückschlüsse auf die Aktivität von p53. Zunächst wurden 2 ml Medium von Platte oder Glycerinkultur angeimpft und bei 30°C inkubiert bis die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde bestimmt und alle Kulturen auf OD_{600}=0,3 verdünnt. Die Expression von p53 wurde durch Zugabe von 100 bis 500 µM $CuSO_4$ induziert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde mit Hilfe des ß-Galaktosidase-Assays die p53-Aktivität bestimmt.

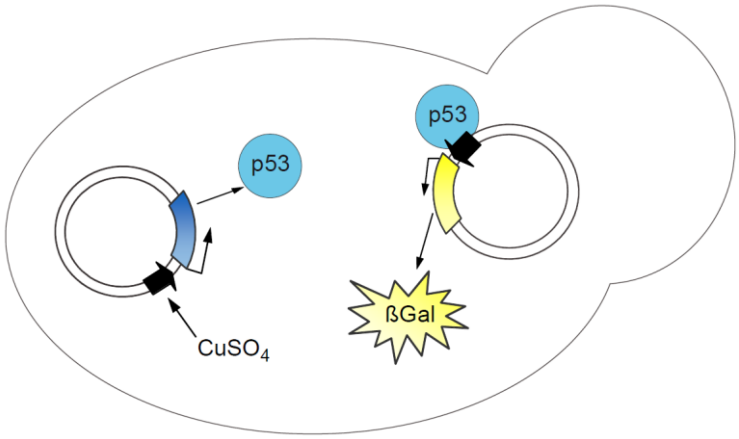

Abbildung 18 Prinzip des p53-Reporterassays. Die Expression von p53 wird durch die Zugabe von $CuSO_4$ induziert. Aktives p53 bindet an seine spezifische Promotersequenz und schaltet so die Transkription der ß-Galaktosidase ein.

4.3.6.2.1 Hitzestressexperimente

Um die Abhängigkeit der p53-Aktivität von Chaperonen in der Hefe zu bestimmen, wurden Experimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Kulturen wurden bis zur stationären Wachstumsphase bei 30°C inkubiert, die OD_{600} bestimmt und auf OD_{600} = 0,5 verdünnt. Nach Induktion der p53-Expression mit 100 µM $CuSO_4$ wurde die Kultur geteilt: Ein Teil wurde für 5 h bei

30°C und ein anderer bei 37°C inkubiert. Ein weiterer Teil wurde für 40 min bei 45°C inkubiert, um die Hitzeschockantwort auszulösen und dann für 4h 20min bei 30°C weiter inkubiert. Danach wurde ein Aktivitätsassay für p53 durchgeführt (siehe 4.3.6.2).

4.3.6.2.2 p53-Induktionsstopp

Um den Abbau von p53 in der Hefe zu analysieren, wurde p53 unter einen Galaktose-induzierbaren Promoter kloniert, sodass ein Stoppen der Expression durch Zugabe von Glukose zum Medium möglich war.

Zunächst wurden 2 ml Medium mit Raffinose als Kohlenstoffquelle von Platte oder Glycerinkultur angeimpft und bei 30°C inkubiert, bis die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde bestimmt und alle Kulturen auf OD_{600}=0,3 in galaktose-haltigem Medium verdünnt. Dadurch wurde die p53-Expression induziert. Nach 5 h wurden die Kulturen zentrifugiert und das Zellpellet in gleichem Volumen glukosehaltigen Mediums aufgenommen. Die Glukose stoppt die p53-Expression. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die OD_{600} bestimmt und Proben, welche einer OD_{600} = 2 entsprachen, entnommen. Die p53-Menge wurde mittels Westernblot bestimmt.

4.3.6.3 Aktivitätsassay für Steroidhormonrezeptoren

Ausgangsmaterial für die Bestimmung der SHR-Aktivität *in vivo* waren Hefestämme (Tabelle 7), die das jeweilige Expressionsplasmid und das entsprechende Reporterplasmid enthielten. Die Aktivität der SHRs wurde mittels eines Reporterassays ermittelt. Liegt der Rezeptor aktiv in der Zelle vor, kann es als Transkriptionsfaktor fungieren indem es an seine spezifische Promotersequenz bindet, die auf dem Reporterplasmid vor der ß-Galaktosidasesequenz kodiert ist. Dadurch wird die Transkriptions-machinerie der Hefezelle rekrutiert und die Expression der ß-Galaktosidase angeschaltet. Die Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität mit Hilfe des ß-Galaktosidase-Assays liefert somit Rückschlüsse auf die Aktivität des jeweiligen Rezeptors.

Zunächst wurden 2 ml Medium von Platte oder Glycerinkultur angeimpft und bei 30°C inkubiert bis die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde bestimmt und alle Kulturen auf OD_{600}=0,3 verdünnt. Das jeweilige Hormon wurde in einem Verhältnis von 1:1000 hinzugegeben, sodass es in einer Endkonzentration von 10 µM vorlag. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde mit Hilfe des ß-Galaktosidase-Assays die SHR-Aktivität bestimmt.

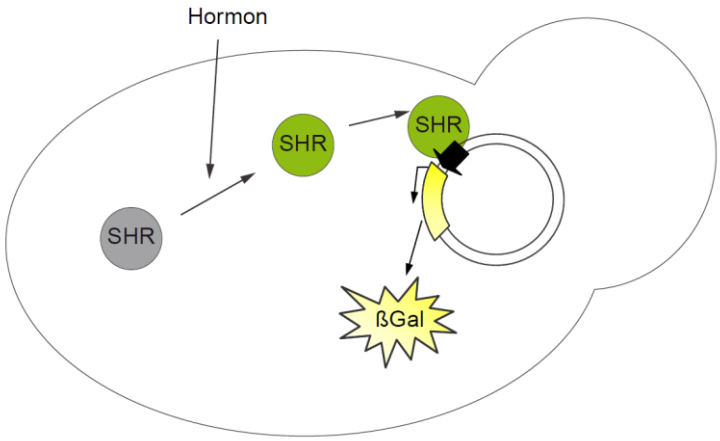

Abbildung 19 Prinzip des SHR-Reporterassays. Durch Zugabe des Hormons wird der Rezeptor aktiviert. Der aktive Rezeptor bindet an seine spezifische Promotersequenz und schaltet so die Transkription der ß-Galaktosidase ein.

Folgende Hormone wurden für die Aktivierung der SHRs eingesetzt:

GR: 21-Hydroxyprogesteron (=11-Deoxycorticosteron)

MR: Aldosteron

PR: Progesteron

ER: ß-Estradiol

AR: Testosteron

4.3.6.4 Aktivitätsassays für v-Src

Die Messung der Aktivität der Proteinkinase v-Src *in vivo* beruht auf dem Fakt, dass die v-Src-Expression für die Hefezelle toxisch ist, da alle Hefeproteine unspezifisch phosphoryliert werden. Daher kann man zum einen über die Überlebensrate der Hefezelle und zum anderen durch Detektion des Phosphorylierungsstatus der Hefeproteine Rückschlüsse auf die Aktivität von v-Src ziehen. Ausgangsmaterial waren Hefestämme (Tabelle 7), die v-Src unter der Kontrolle eines galaktose-induzierbarem Promoters enthielten. Dieser wird in Anwesenheit von Glucose reprimiert und in Anwesenheit von Galaktose induziert.

4.3.6.4.1 Bestimmung der Überlebensrate von v-Src-exprimierenden Zellen

Zunächst wurden 5 ml Medium, welches Raffinose als Kohlenstoffquelle enthielt, von Platte oder Glycerinkultur angeimpft und bei 30°C inkubiert bis die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde bestimmt und alle Kulturen auf OD_{600}=1 verdünnt. Davon wurden fünf 1:10 Verdünnungen hergestellt und jeweils 3 µl auf eine Platte mit Galaktose pipettiert. Diese wurde für fünf Tage bei 30°C inkubiert.

4.3.6.4.2 Bestimmung des Phosphorylierungsstatus der Hefeproteine

Zunächst wurden 5 ml Medium, welches Raffinose als Kohlenstoffquelle enthielt, von Platte oder Glycerinkultur angeimpft und bei 30°C inkubiert bis die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte. Hefelysat wurde durch Aufschluss in denaturierendem Puffer hergestellt (4.3.5.2). Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mittels BCA-Test ermittelt und die Konzentration aller Proben auf einen Wert angeglichen. Für eine SDS-PAGE und Westernblot wurden die Proben 1:5 mit Lämmlipuffer versetzt. Phosphorylierte Proteine wurde mittels des phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers 4G10 quantitativ nachgewiesen.

4.3.6.5 Aktivitätsassay für Luciferase

Ausgangsmaterial waren Hefestämme (Tabelle 7), die konstitutiv exprimierte Luciferase enthielten. Der Aktivitätsassay für Luciferase beruht auf der Umsetzung des Luciferasesubstrats Luciferin zu Oxyluciferin und Licht (Lumineszenz), welches detektiert und quantifiziert werden kann.

Zunächst wurden 2 ml Medium von Platte oder Glycerinkultur angeimpft und bei 30°C inkubiert bis die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde bestimmt und alle Kulturen auf OD_{600} = 2 verdünnt. Um die Hitzestressantwort anzuschalten, wurden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert und weitere 30 min bei 46°C inkubiert, um die Luciferase zu inaktivieren. 10 mg/ml Cycloheximid wurden sofort zum Medium gegeben, um eine weitere Expression von Luciferase zu verhindern. Die Zellen wurden weiter bei 30°C inkubiert, um eine Rückfaltung der Luciferase zu ermöglichen. Vor und nach dem 37°C- Schritt und zu verschiedenen Zeitpunkten der Rückfaltung wurden 100 µl Aliquots entnommen, mit 50 mM Luciferin versetzt und die Lumineszenz mit dem Tecan Plate Reader gemessen.

4.3.7 Bestimmung der Aktivität von Hsp90-Substratproteinen in Hsp70-defizienten Stämmen

Um die Anhängigkeit der Hsp90-Substratproteine von Hsp70 *in vivo* zu bestimmen, wurden Aktivitätsassays in Hsp70-defizienten Stämmen durchgeführt. Dazu wurden folgende Stämme, welche vom E. Craig-Labor generiert wurden (Becker et al, 1996), mit den jeweiligen Plasmiden für die Hsp90-Substratproteine transformiert (Genotypen siehe Tabelle 7 Verwendete Hefestämme):

JN55: WT-Stamm

JN516: Ssa2-4 deletiert

JB67: Ssa2-4 deletiert, Ssa1 als temperatursensitive Mutante

Saccharomyces cerevisiae besitzt vier Gene für Hsp70: Ssa1, Ssa2, Ssa3 und Ssa4. In dem Stamm JN516 wurden die Gene für Ssa2-4 deletiert, sodass nur noch Ssa1 exprimiert wird. In dem Stamm JB67 wurden ebenfalls die Gene für Ssa2-4 deletiert und anstelle für Ssa1 wurde eine temperatur-

sensitive Mutante von Ssa1 (ssa1ts) eingeführt. Diese verliert bei 37°C ihre Aktivität, sodass bei dieser Temperatur kein funktionierendes Hsp70 in der Zelle vorliegt.

Um den Phänotypen der Stämme zu überprüfen, wurden die transformierten Stämme auf die jeweiligen Selektionsplatten ausgestrichen und bei 25°C und 37°C für drei Tage inkubiert. Der Stamm JB67 sollte bei 37°C nicht wachsen.

Um die Aktivitätsassays durchzuführen wurden 2 ml Medium von Platte angeimpft und bei 25°C inkubiert, bis die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte. Die OD_{600} wurde bestimmt und alle Kulturen auf OD=0,5 verdünnt. Die p53-Expression (siehe Aktivitätsassay für p53) und die SHR-Aktivierung mit dem jeweiligen Hormon (siehe Aktivitätsassay für Steroidhormonrezeptoren) wurde induziert. Für Luciferase wurde die Inkubation bei 37°C und die Inaktivierung (siehe Aktivitätsassay für Luciferase) durchgeführt. Die Kulturen wurden bei 25°C und 37°C für 5 h inkubiert und dann die Aktivität der Hsp90-Substratproteine gemessen.

4.3.8 Transkriptionsanalyse von ΔYdj1 und ΔAha1 mittels Genchips

Um die mRNA-Levels aller Gene in Ydj1- und Aha1-Deletionshefen im Vergleich zum WT-Stamm zu bestimmen, wurden Genchip-Analysen durchgeführt. Dazu wurden jeweils drei unabhängige Kulturen bestehend aus 50 ml Hefen aus der stationären Wachstumsphase geerntet, mit PBS gewaschen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik in Regensburg (KFB-Regensburg) führte von Probenbehandlung bis Detektion der mRNA-Level mit Genchips der Firma Affimetrix alle Schritte durch. Die Signalstärken wurden über den MAS5-Algorithmus in Expressionswerte umgewandelt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der drei unabhängigen Proben gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Dann wurden die Mittelwerte aller Gene des Knock-out-Stammes auf die Mittelwerte der Gene aus dem WT normiert. Die Gene, die mindestens einen 2fachen Unterschied zum WT aufwiesen, wurden zur weiteren Analyse herangezogen. Diese wurden mittels des *GOSlim Mappers* der *Saccharomyces Genome Database* nach zellulärer Funktion oder Prozess klassifiziert.

4.3.9 Signifikanzanalyse

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Aktivitäten in WT und Knock-out wurde ein ungepaarter studentischer T-Test angewandt. Dazu wird die Hypothese formuliert, dass die Mittelwerte aller Proben gleich sind. Kommt der Test zu dem Ergebnis, dass die Hypothese abgelehnt wird, so gibt es einen Unterschied zwischen den getesteten Mittelwerten. Als signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit $P < 0,01$ bezeichnet und mit ** gekennzeichnet. War die Wahrscheinlichkeit $P < 0,05$ handelte es sich um indifferente „verdächtige“ Daten. Diese wurden mit * gekennzeichnet. Um eine verlässliche Aussage zu bekommen, sollten hier weitere Daten erhoben werden.

4.4 Proteinanalytische Methoden

4.4.1 Methoden der Proteinreinigung

Alle Proteinreinigungen wurden an der Äkta FPLC-Anlage bei 4°C durchgeführt. Jeder Schritt im Aufreinigungsschema wurde mit Hilfe der SDS-PAGE auf Proteinanwesenheit und Reinheit geprüft. Die erhaltenen Proteine wurden mittels Massenspektrometrie am Maldi ToF/ToF auf die zu erwartende Masse und Reinheit geprüft.

4.4.1.1 Herstellung von rekombinantem p53

4.4.1.1.1 Zellanzucht und Ernte

Der *E. coli*-Stamm BL21-codonplus(DE3) wurde mit dem Expressionsplasmid pET28a, welches die p53-kodierende Sequenz enthielt, transformiert. Transformanten wurden auf Kan^R und Cam^R selektiert, um die Erhaltung aller Plasmide zu gewährleisten. Für die Proteinexpression wurden 100 ml LB_{Kan} angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 3 mal 2 l LB_{Kan} wurden jeweils mit 50 ml der Vorkultur versetzt und bei 37°C weiter inkubiert, bis die Kultur eine OD_{600} zwischen 0,5 und 0,8 erreicht hatte. Die Kultur wurde dann auf 25°C abgekühlt und die Expression von p53 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Zusätzlich wurde noch 100 µM $ZnSO_4$ hinzugegeben und die Kultur über Nacht bei 20°C inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 6000 g für 15 min.

4.4.1.1.2 Zellaufschluss

Das Pellet wurde im Aufschlusspuffer resuspendiert und eine Spatelspitze DNAseI und Proteaseinhibitormix G 1:50 hinzugegeben. Der Aufschluss erfolgte gekühlt in der Zellaufschlussmaschine. Das Lysat wurde für 30 min bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen.

4.4.1.1.3 Affinitätschromatografie mit Heparinsepharose

Heparin ist natürlich vorkommendes Glycosaminglycan mit zwei bis drei Sulfatgruppen. Dieses Material wird von DNA-bindenden Proteinen gebunden und eignet sich somit für den ersten Schritt der Reinigung von p53.

Das Lysat wurde auf eine HiTrapHeparin HP -Säule aufgetragen und mit 5 Säulenvolumen (SV) Heparin-Puffer A + 5% Heparin Puffer B gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen linearen Gradienten mit Heparin Puffer B wobei p53 typischerweise bei einer Salzkonzentration zwischen 350 und 400 mM KCl eluierte. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die relevanten Fraktionen wurden vereinigt, Proteaseinhibitormix G zugegeben und mit Verdünnungspuffer 1:3 versetzt, um die Salzkonzentration für die Ionenaustauschchromatografie zu reduzieren.

4.4.1.1.4 Ionenaustauschchromatografie

Die Ionenaustauschchromatografie basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix. Je nach Ladung bindet das Protein an eine positiv geladene (Q-Sepharose) oder negativ geladene (SP-Sepharose) Matrix. Da die Bindeeigenschaften von p53 schwer vorhersagbar waren, wurde die Proteinlösung gleichzeitig auf eine Q- und eine SP-Sepharosesäule aufgetragen und mit 5 SV Sepharose Puffer A + 5% Sepharose Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten mit Sepharose Puffer B getrennt von jeder Säule. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden auf 5 ml mit Hilfe einer Zentrikon (MWCO 10000) bei 4°C und 4000 g aufkonzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen.

4.4.1.1.5 Gelfiltrationschromatografie

Mit der Gelfiltrations- oder Größenausschlusschromatografie werden Proteine nach ihrem hydrodynamischen Radius aufgetrennt. Proteine, deren Durchmesser größer ist als die Porengröße der Matrix, können nicht in die Poren des Trägermaterials diffundieren und eluieren daher im Ausschlussvolumen. Kleinere Proteine hingegen, können in die Partikel eindringen wodurch sie später als die größeren Proteine eluieren.

Zwischen 5 und 10 ml der Proteinlösung wurden auf eine Superdex 200 HiLoad 26/60 aufgetragen und mit GF-Puffer laufen lassen. Die gesammelten Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert, die relevanten Fraktionen vereinigt und mit Hilfe einer Zentrikon (MWCO 10000) auf etwa 50 µM aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt und bezieht sich auf das monomere Protein. Das gereinigte Protein wurde in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.4.1.2 Herstellung von rekombinantem Hsp82

Für die Herstellung von Hsp82 wurde ein pET28a-Plasmid, welches das Hsp82-Gen enthielt, verwendet. Die Expression wurde in dem *E. coli*-Stamm BL21-codonplus(DE3) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte wie beschrieben (Richter & Buchner, 2001). Die Proteinkonzentration wurde mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt und bezieht sich auf das monomere Protein.

4.4.2 Markierung von p53 mit einem Fluoreszenfarbstoff

Für die Markierung von p53 wurde der Fluoreszenzfarbstoff 5´-Carboxyfluorescein verwendet. Um das Oligomerisierungsverhalten nicht zu stören, wurde der Fluoreszenfarbstoff selektiv an den N-Terminus gekoppelt. Daher wurde bei einem pH-Wert von 6,4 gearbeitet, da hier nur der N-Terminus nicht protoniert vorliegt und somit als Nucleophil für die Labeling -Reaktion dienen kann. Zunächst wurde das Protein mittels einer Entsalzungssäule (HiTrap Desalting) in den Labelingpuffer überführt (50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 6,4, 100 mM KCl, 1 mM TCEP). Ein fünffacher Überschuss des Labels

wurde zur Proteinlösung hinzugegeben und für drei Stunden bei 14°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kopplungsreaktion durch Zugabe von 3 M Tris gestoppt. Freies Label wurde mittels einer HiPrep 26/10 Desalting Säule mit Gelfiltrationspuffer-Puffer abgetrennt. Der Labeling-grad wurde nach Herstellerangaben des Labels bestimmt.

4.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

4.4.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford

Der Bradfordassay wurde eingesetzt, um die Proteinkonzentration von Zelllysaten zu bestimmen (Bradford, 1976).

Zur Durchführung der Makrobestimmung wurde das 5x Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 mit bidest. H_2O verdünnt. 100 µl Proteinlysat wurden mit 900 µl Bradford-Reagenz in einer Einweg-Plastikküvette (d=1cm) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde mit einem UV/VIS-Spektrophotometer bestimmt.

Zur Durchführung der Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten wurde das 5x Bradford-Reagenz im Verhältnis 2:7,5 (2 Volumenteile Bradford-Reagenz plus 5,5 Volumenteile bidest. H2O) verdünnt. 50 µl Proteinlysat wurde mit 50 µl Bradford-Reagenz in einer Mikrotiterplatte vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde mit dem Cary50 Plate Reader bestimmt.

4.4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA

Der BCA-Assay wurde verwendet, um die Konzentration eines Zelllysats, welches unter denaturierenden Bedingungen hergestellt wurde, zu bestimmen. Dazu wurde das BCA-Protein-Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) verwendet.

4.4.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV–Spektroskopie

Proteinkonzentrationen der rekombinanten Proteine wurden über Absorptionsspektroskopie mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes (siehe Gleichung 1) bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten ε = 36035 $M^{-1}cm^{-1}$ für p53, ε = 57300 für Hsp82 $M^{-1}cm^{-1}$ und ε = 50545 $M^{-1}cm^{-1}$ für Aha1 wurden auf Grund der jeweiligen Aminosäuresequenz mit Hilfe des ProtParam-Programmes von ExPasy (http://web.expasy.org/protparam) bestimmt.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d}$$

Formel 2 Lambert-Beersches Gesetz.
c: Proteinkonzentration in molar, M
A: Absorption bei 280 nm
d: Schichtdicke der Küvette in cm
ε: Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $M^{-1}cm^{-1}$

4.4.4 Diskontinuierliche Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinproben wurde die diskontinuierliche Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die Proteinproben wurden mit 5x Lämmli-Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:5 versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und in einer MightySmall-Gelelektrophorese-kammer mit 1x SDS-Laufpuffer nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde für 50 min bei einer Stromstärke von 30 mA pro Gel durchgeführt, bis der Farbstoff der Lauffront das untere Ende Gels erreicht hatte. Um die Größe der Proteine abschätzen zu können, wurde ein Molekulargewichtsstandard verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie (4.4.6) oder mit Silber (4.4.7) gefärbt.

Folgende Zusammensetzungen wurden benutzt, um ein SDS-Gel zu gießen:

Trenngel (12,5%):	3,125 ml 40% (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid (38:2)
	2,5 ml 4x Trenngelpuffer
	4,375 ml bidest. H_2O
	100 µl 10% (w/v) APS
	10 µl TEMED
Sammelgel (5%):	0,625 ml 40% (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid (38:2)
	2,5 ml 2x Sammelgelpuffer
	1,875 ml bidest. H_2O
	50 µl 10% (w/v) APS
	5 µl TEMED

4.4.5 Nativ-Gelelektrophorese

Um Proteine in ihrem nativen Zustand zu analysieren wurde eine Nativ-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:5 mit 5x Auftragspuffer versetzt und auf ein SERVA-GelTM Neutral pH 7,4 aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA für 2h bei 4°C durchgeführt. Das Gel wurde anschließend mit Silberfärbung (4.4.7) gefärbt.

4.4.6 Coomassiefärbung

Die Coomassiefärbung ist eine abgewandelte Variante der Färbung nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971) und hat ein Detektionslimit von 50 ng Protein. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel aus den Glasplatten entfernt, komplett mit der Färbelösung bedeckt, in einer Mikrowelle erhitzt und für 5 min auf einem Plattformschüttler inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entfernt, das Gel mit Wasser gewaschen und vollständig mit der Entfärbelösung bedeckt. Das Gel wurde erneut in der Mikrowelle erhitzt und ein Papiertuch hinzugefügt, um den Farbstoff aus der Lösung zu entfernen. Das Gel wurde entfärbt, bis die Proteinbanden zum Vorschein kamen.

4.4.7 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach dem Protokoll von Nesterento et al. durchgeführt. Die Silberfärbung stellt eine sensitivere Färbemethode als die Coomassiefärbung dar. Proteinmengen von weniger als 10 ng können damit detektiert werden. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel aus den Glasplatten entfernt und zweimal mit bidest. H_2O gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Proteine durch Inkubation des Gels mit der Fixierlösung für 5 min. Nach zweimaligem Waschen mit bidest. H_2O für jeweils 5 min wurde das Gel mit der Vorbehandlungslösung 1 für 5 min inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Vorbehandlungslösung 2 für 1 min. Nach dreimaligem Waschen mit bidest. H_2O wurde das Gel mit der Imprägnierlösung für 8 min inkubiert und danach zweimal mit bidest. H_2O gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in der Entwicklerlösung für 10 bis 60s. Sobald die Proteinbanden erschienen, wurde die Reaktion durch Hinzugeben der Stoplösung abgebrochen.

4.4.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Um die Bindung von p53 an DNA nachzuweisen, wurde ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) durchgeführt (Bell et al, 2002; Hansen et al, 1996b). Hierbei wird ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid zusammen mit dem Zielprotein inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Nativgelelektrophorese aufgetrennt. Freies Oligonukleotid wandert schnell in der Gelmatrix während der Protein-DNA-Komplex langsamer in das Gel einwandert. Die Detektion erfolgt über die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes und der Quantifizierung der Fluoreszenz.

Als Oligonukleotid diente die p21-Promotersequenz, die spezifisch von p53 erkannt und gebunden wird (Szak et al, 2001). Diese war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Um eine spezifische Bindung sicherzustellen, wurden den Reaktionsansätzen unspezifische DNA zugesetzt. p53 und eventuell andere Proteinen wurden mit DNA-Bindepuffer auf ein Endvolumen von 5 µl verdünnt. Die Ansätze wurden für 15 min bei der jeweils angegebenen Temperatur inkubiert und anschließend mit 20 µl Reaktionsmix versetzt. Die Proben wurden auf ein 4%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mit EMSA-Laufpuffer für 3 h mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel bei 4°C durchgeführt. Die Detektion der Cy5-markierten DNA erfolgte durch den Typhoon 9600 Phosphoimager.

4.4.9 Immunologische Methoden

4.4.9.1 Westernblot

Das Blotten von Proteinen wurde mit Hilfe des Biometra FastBlots Systems durchgeführt. Dazu wurde das Gel zwischen zwei horizontale Plattenelektroden gelegt und die Proteine durch Transfer-Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Blot wurde folgendermaßen zusammengesetzt: Auf drei aufeinanderfolgenden Whatman-Papieren folgte die PVDF-Membran. Darauf wurden das Gel und

drei weitere Whatman-Papiere gelegt. Die Membran wurde mit Methanol aktiviert und zusammen mit den Whatman-Papieren und dem Gel in Westernblot-Transferpuffer für 5 min eingelegt. Das Blotten erfolgte bei 72 mA pro Gel für 1,5 h. Nach dem Blotten wurde das Gel mit Coomassie-Färbung gefärbt und die freien Oberflächenvalenzen der Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS-T für 30 min blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper, verdünnt in 1 % (w/v) Milchpulver in PBS-T, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung ist spezifisch für jeden Antikörper und wird jeweils angegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 10 min bei RT wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Maus-Antikörper oder Anti-Kaninchen-Antikörper), verdünnt 1: 10000 in 1 % (w/v) Milchpulver in PBS-T, hinzugegeben und für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde der Blot wieder dreimal mit PBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit dem *ECL-Westernblot Detection Kit* behandelt, ein Röntgenfilm belichtet und mit der Entwicklermaschine Optimax TR entwickelt.

4.4.9.1.1 Westernblot strippen

Um den Westernblot für eine zweite Detektion mit einem Antikörper gegen ein anderes Zielprotein zu präparieren, muss der erste Antikörper entfernt werden. Dazu wurde der Westernblot in 10 ml 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7, 2 % (w/v) SDS erhitzt, 100 mM ß-Mercaptoethanol hinzugegeben und für 10 min unter Schütteln inkubiert. Vor der Inkubation mit einem weiteren Antikörper wurde der Blot intensiv mit H_2O gewaschen, bis alles ß-Mercaptoethanol entfernt war.

4.4.9.2 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Um zu bestimmen, welche Chaperone und Cochaperone mit p53 *in vivo* interagieren, wurde die Methode der Co-IP angewandt. Dazu wurde Lysat von 10 OD-Einheiten p53-exprimierender Zellen in 300 µl IP-Puffer (50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 100 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7,5) plus Proteaseinhibitormix FY bei 4°C in einer Kugelmühle aufgeschlossen. 20 µl vom Anti-p53-Antikörper Ab6 wurde auf 10 µl ProteinA-Sepharose-beads durch Invertieren für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der beads mit IP-Puffer wurde das Lysat aufgetragen, für eine Stunde bei 4°C unter Invertieren inkubiert und entfernt. Die beads wurden dreimal mit 1 ml IP-Puffer plus 0,5% NP-40 gewaschen. Zum Eluieren der gebundenen Proteine wurden die beads in 50 µl Lämmlipuffer für 3 min bei 95°C aufgekocht. Die Analyse erfolgte mittels einer 10%igen SDS-PAGE und anschließendem Westernblot.

Für die konformationsspezifische Co-IP wurde entweder der Anti-p53-Antikörper Ab3 oder Ab5 auf ProteinA-Sepharose-beads gekoppelt, die weitere Vorgehensweise erfolgte wie oben beschrieben. Um die Energieabhängigkeit der p53-Chaperonbindung zu untersuchen, wurde eine Co-IP in Anwesenheit von AMP-PNP, Apyrase oder eines ATP-regenerierenden Systems durchgeführt. Je eine OD-Einheit von 10 wurde in 300 µl 40 mM HEPES/KOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ mit

Proteaseinhibitormix FY plus entweder 10 mM AMP-PNP, 1 U Apyrase oder eines ATP-regenerierenden Systems (10 mM ATP, 24 mM Phosphoenolpyruvat, 50 mM NADH, 2750 U/ml Lactatdehydrogenase, 24 U Pyruvatkinase) aufgeschlossen. Das Lysat wurde für eine Stunde bei 4°C unter Invertieren inkubiert. Danach wurde einmal mit 1 ml 40 mM HEPES/KOH pH 7,5, 0,5% NP-40, welcher mit entweder 5 mM ATP oder 5 mM AMP-PNP versetzt war, gewaschen und einmal mit 1 ml 40 mM HEPES/KOH, pH 7,5, 0,5% NP40. Die Elution erfolgte mit 50 µl Lämmli.

4.4.10 Spektroskopische Methoden

4.4.10.1 Fluoreszenzpolarisation

Werden Fluorophore mit linear polarisiertem Licht angeregt, so strahlen sie ebenfalls linear polarisiertes Licht ab. Diese Erscheinung wird Fluoreszenzpolarisation genannt. Die Rotationsgeschwindigkeit von beweglichen Fluorophoren beeinflusst die gemessene Fluoreszenzpolarisation. Ändert sich die Größe eines mit einem Fluorophor markierten Komplexes so verringert sich dessen Rotationsgeschwindigkeit und die Polarisation nimmt ab.

Die Bindung von p53 an DNA wurde mittels Fluoreszenzanisotropie gemessen. Die Messung erfolgte bei 15°C in einem temperierbaren Fluoromax-3 Fluoreszenzspektrometer, welches mit Polarisationsfiltern ausgestattet war. Die Monochromatoren wurden auf eine Anregungswellenlänge von λex = 650 nm und einer Emissionswellenlänge von λem = 680 nm eingestellt, um die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markierte DNA anzuregen. Die Messung erfolgte in 50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM TCEP. Als Kontrolle wurde experimentell verifiziert, dass sich die Quantenausbeute der unpolarisierten Fluoreszenz bei der Emissionswellenlänge durch Bildung des DNA-Protein-Komplexes nicht ändert. Um die Bindungsparameter zu erhalten, wurde die Änderung der Anisotropie durch Titration von p53 und p53-Mutanten, bestimmt. Die Titrationsdaten wurden nach Formel 3 gefittet:

$$y = \frac{y_{max} \cdot x}{k_D + x}$$

Formel 3 Berechnung des K_d-Wertes aus Titrationsdaten der Fluoreszensanisotropie

y	Anisotropiesignal
ymax	obere Asymptote des Anisotropiesignals
k_D	Dissoziationskonstante
x	Konzentration des Liganden

4.4.10.2 Circulardichroismus-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie ist eine sensitive Methode um die Sekundärstruktur von Proteinen zu bestimmen. Es ist eine Form von Lichtabsorptionsspektroskopie, die die unterschiedliche Absorption von rechts- und linkspolarisiertem Licht misst. Die Grundlage dieses Effekts ist Eigenschaft von Chromophoren, links- und rechtszirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absor-

bieren. Bei Proteinen stellen Kohlenstoffatome, die sich in einer asymmetrischen Umgebung befinden, und aromatische Aminosäuren solche optisch aktiven Chromophore dar. Es wurde gezeigt, dass Fern-UV CD-Spektren zwischen 170 nm und 250 nm dazu genutzt werden können, verschiedene Sekundärstrukturen von Proteinen, wie α-Helices, β-Faltblatt und *random coil* zu bestimmen. α-Helices zeigen zwei starke Minima bei 2058nm und 222nm, wohingegen β-Faltblätter ein weniger ausgeprägtes Minimum bei 218 nm aufweisen. Im Nah-UV-Bereich zwischen 250 nm und 320 nm steuern aromatische Aminosäuren zum Signal bei, welches abhängig von der Umgebung der Aminosäure ist. Daher kann eine Aussage über die globalen, dreidimensionalen Eigenschaften des Proteins getroffen werden. Für eine CD-Messungen wurde 10 µM p53 in 50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM TCEP benutzt. CD-Spektren wurden von 195 nm bis 260 nm in einem Jasco J-715 CD-Spektrometer bei 20°C mit einer Scangeschwindigkeit von 20 nm/min in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm aufgenommen. Das Spektrum jeder Probe wurde 20-mal akkumuliert, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Alle Spektren wurden mit der Puffer-Baseline korrigiert. Die molare Elliptizität wurde mit Formel 4 berechnet.

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A}$$

Formel 4 Berechnung der molaren Elliptizität

θ_{MRW}	Molare Elliptizität in deg cm^2 $dmol^{-1}$
θ	gemessene Elliptizität in deg
M_r	Molekulargewicht des Proteins in g/mol
c	Proteinkonzentration in mg/ml
d	Schichtdicke der Küvette in cm
N_A	Anzahl der Peptidbindungen im Protein

Die Änderung des CD-Signals bei Temperaturerhöhung kann als Indikator für die Denaturierung von Proteinstrukturen verwendet werden. Die Größte Änderung des CS-Spektrums zwischen nativen und denaturiertem Protein lag bei p53 bei 218 nm. Daher wurde bei dieser Wellenlänge ein Temperaturübergang gemessen. Der Temperaturgradient von 15°C bis 90°C mit einer Heizrate von 60°C/h und einer Auflösung von 0,2°C wurde mittels der PTC343 Peltier-Temperiereinheit erreicht. Da der Denaturierungsübergang irreversibel ist, wurden die Übergänge sigmoidal nach der Boltzmann-Funktion gefittet.

4.4.10.3 Lichtstreuung

Mittels Lichtstreuung kann die Aggregation von Proteinen nachverfolgt werden. Um die Aggregation von p53 zu messen, wurde die Änderung der Absorption bei 320 nm in einem Cary50 Spektrophotometer verfolgt. Die Messung erfolgte bei 45°C mit 1 µM Protein in 50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM TCEP.

4.4.11 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um das Oligomerisierungsverhalten von p53 zu analysieren, wurde eine analytische Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurde 1 µM p53 in 50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM TCEP auf eine Superdex 200 HiLoad 10/300 GL aufgetragen. Der Lauf wurde mit einer Flussrate von 0,75 ml/min für 60 min bei 20°C durchgeführt. Die Detektion des Proteins erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor bei λex = 280 nm und λem = 340 nm. Mit Hilfe von Eichproteinen wurde eine Kalibrierungskurve erstellt, mit welcher das Molekulargewicht von p53 bestimmt werden konnte.

4.4.12 Analytische Ultrazentrifugation

Mit der Analytischen Ultrazentrifugation ist es möglich, das Verhalten von Proteinen in Lösung zu charakterisieren. Dabei untersucht sie die Bewegung oder Konzentrationsverteilung der gelösten Proteine unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte. Die Zentrifuge ist dazu mit einem optischen System ausgestattet, das es erlaubt, während der Zentrifugation die Messungen der lokalen Proteinkonzentration in der Probe durchzuführen. Die Messung erfolgte in der Analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A, die sowohl mit einem Fluoreszenzdetektor, als auch mit einer Absorptionsoptik ausgestattet ist. Mittels Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wird die Geschwindigkeit bestimmt, mit der sich das Protein unter Einfluss der Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegt. Ein Sedimentationslauf wurde mit 450 µl einer 3 µM p53-Lösung in einem AN50-TI Rotor bei 42000 rpm bei 10°C durchgeführt. Die Sedimentation wurde bei 280 nm verfolgt und dem Programm Sedfit (Peter Schuck, NIH, Bethesda, USA) ausgewertet. Mittels aUZ konnte nicht zwischen p53-Dimeren und Tetrameren unterschieden werden, welche zusammen einen durchschnittlichen Sedimentationskoeffizienten bildeten. Die Veränderung des apparenten Sedimentationskoeffizienten wird somit als Maß für das veränderte Gleichgewicht zwischen Dimeren und Tetrameren verwendet.
Alle Messungen und Analysen zur Analytischen Ultrazentrifugation wurden durch Dr. Alexander Bepperling durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 *Einfluss des Hsp70/Hsp90-Chaperonsystems auf verschiedene Hsp90-Substratproteine in* S. cerevisiae

5.1.1 Charakterisierung der Chaperone-Abhängigkeit von p53

5.1.1.1 Etablierung des p53-Reporterassays in *S. cerevisiae*

Um die Chaperonabhängigkeit von p53 *in vivo* zu studieren, wurde ein Reportersystem in der Hefe etabliert. p53 wurde unter die Kontrolle eines kupferinduzierbaren Promoters kloniert. Somit konnte die Expression und damit das p53-Level in der Zelle kontrolliert werden. Außerdem wurde ein entsprechendes Reporterkonstrukt hergestellt, welches die p53-Erkennungssequenz vor dem Cyc1-Minimalpromoter enthielt. Als Reporter fungierte die ß-Galaktosidase, dessen Aktivität leicht mittels des ß-Galaktosidaseassays gemessen werden kann und mit der p53-Aktivität korreliert (siehe Material und Methoden 4.3.6.2).

Zunächst wurde überprüft, ob p53 in der Hefezelle aktiv vorliegt, und ob diese Aktivität mit dem ß-Galaktosidaseassay reproduzierbar bestimmt werden kann. Dazu wurde die p53-Expression mit Kupfersulfat induziert und die Aktivität nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Um die Hintergrundaktivität zu bestimmen, wurde die ß-Galakosidaseaktivität einer uninduzierten Kultur gemessen. Als Kontrolle diente außerdem eine p53-Mutante, die durch einen Aminosäureaustausch in der DNA-Bindedomäne unfähig ist DNA zu binden (p53 R248E). Nach etwa fünf Stunden Induktion begann die ß-Galaktosidaseaktivität signifikant zu steigen bis nach zirka 30 Stunden eine Plateauphase erreicht wurde (Abbildung 20). Die inaktive p53-Mutante R248E zeigte keinerlei Aktivität, wohingegen bei der uninduzierten Kultur eine leichte Aktivität messbar war. Diese Hintergrundaktivität ist auf das im Medium vorhandene Kupfer zurückzuführen, welches den Kupferpromotor induziert. Daher wird auch ohne die Zugabe von Kupfersulfat etwas p53 exprimiert. Das Kupfer im Medium kann nicht komplett entfernt werden, da es essentiell für das Überleben der Hefen ist.

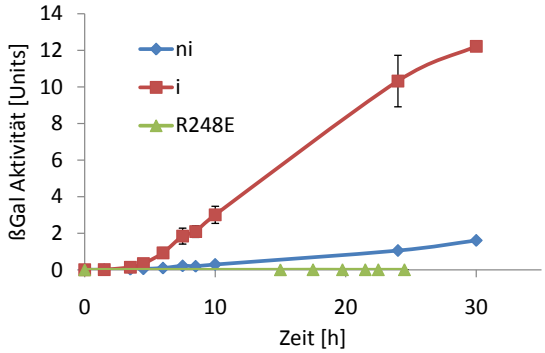

Abbildung 20 Expressionskinetik von p53 in Hefe. Die p53-Expresison wurde mit 100 µM $CuSO_4$ induziert und die Aktivität mittels ß-Galaktosidaseassay nach verschiedenen Zeitpunkten im Hefestamm BY4741 gemessen. i – induziert, ni – nicht induziert, R248E – p53-Mutante.

5.1.1.2 p53 ist ein Substrat von yHsp90

Da p53 natürlicherweise nicht in der Hefe vorkommt, musste zunächst gezeigt werden, dass das humane p53 auch von Hefe-Hsp90 (yHsp90) abhängig ist. Ein typisches Merkmal Hsp90-abhängiger Proteine ist, dass sie nach Inhibierung von Hsp90 mit niedermolekularen Substanzen wie Radicicol, Macbecin oder Geldanamycin degradiert werden (Xu et al, 2005). Nach Zugabe des Hsp90-Inhibitors Macbecin II verringerte sich die p53-Aktivität in der Hefe um etwa 50% (Abbildung 21a). Auch Inhibitoren der gleichen Substanzfamilie, wie Radicicol und Geldanamycin, zeigten eine ähnliche Wirkung auf die p53-Aktivität (Abbildung 21b).

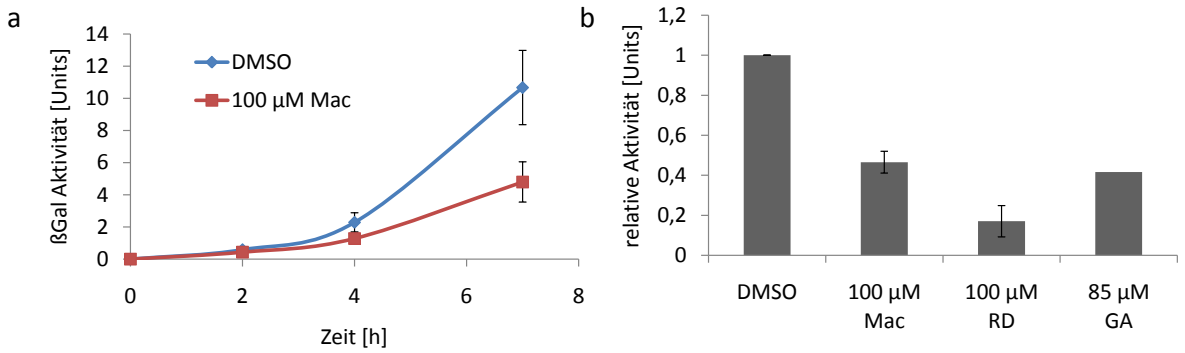

Abbildung 21 Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die p53-Aktivität. a Aktivität von p53 in An- und Abwesenheit des Hsp90-Inhibitors Macbecin II (Mac) nach verschiedenen Zeitpunkten der p53-Induktion mit 100 µM $CuSO_4$ im Hefestamm BY4741. **b** p53-Aktivität nach 20h Induktion in Anwesenheit der Hsp90-Inhibitoren Macbecin II (Mac), Radicicol (RD) und Geldanamycin (GD) bezogen auf die Aktivität in Anwesenheit von DMSO.

Um zu klären, ob die verringerte Aktivität tatsächlich auf ein geringeres p53-Level zurückzuführen war, wurden Westernblotanalysen gegen p53 durchgeführt. Nach vier Stunden p53-Expression in Anwesenheit von Macbecin II war eine geringere Menge an p53 in der Zelle zu beobachten (Abbildung 22).

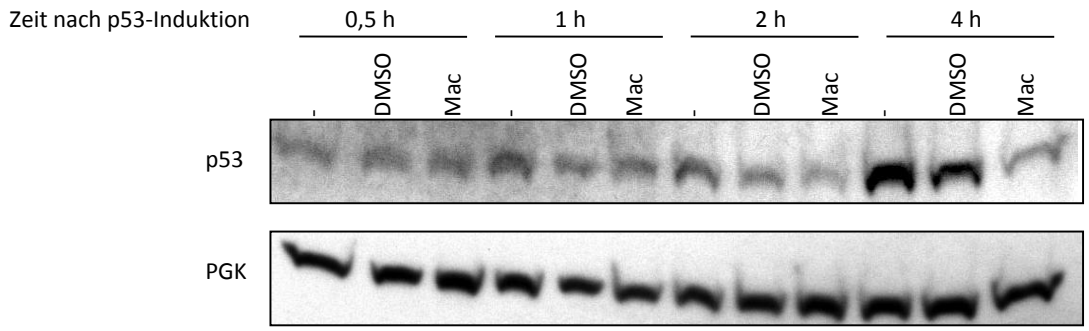

Abbildung 22 Verringerung der p53-Menge in Anwesenheit des Hsp90 Inhibitors Macbecin II. Die p53-Expression wurde in Anwesenheit von 100 µM Macbecin II oder der entsprechenden Menge an DMSO im Hefestamm BY4741 mit 100 µM $CuSO_4$ induziert, nach verschiedenen Zeitpunkten der Expression Proben genommen und mittels Westernblot analysiert. p53 wurde mit dem monoklonalem Anti-p53 Antikörper Ab6 detektiert. Als Ladekontrolle wurde die Menge an PGK mit einem monoklonalem Anti-PGK Antikörper detektiert.

Um noch auf eine unabhängige Methode den Einfluss von Hsp90 auf p53 *in vivo* zu bestimmen, wurde die Menge von Hsp90 in der Zelle reduziert. Dazu wurde ein Stamm, in dem beide Hsp90-kodierenden Gene entfernt und stattdessen ein Expressionsplasmid mit Hsp90 unter einem galaktoseinduzierbaren Promoter vorhanden war, mit dem p53-Reportersystem transformiert. Gibt man nun Glucose zum galaktosehaltigem Medium, wird die Expression vom Galaktosepromoter abhängig von der Glucosemenge reprimiert. Zusammen mit der Hsp90-Menge, nahm die p53-Menge abhängig von der Glucosekonzentration ab (Abbildung 23).

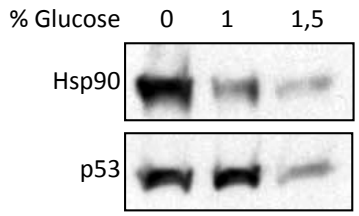

Abbildung 23 Die p53-Menge in der Zelle ist abhängig von der Hsp90-Menge. Menge an p53 nach 20 h Induktion mit 100 µM $CuSO_4$ im Hefestamm ECU82α. Die Inkubation erfolgte in galaktosehaltigem Medium in Anwesenheit der angegebenen Glucosemenge.

Außerdem konnte mittels Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass Hsp90 mit p53 in der Hefe interagiert (Abbildung 24).

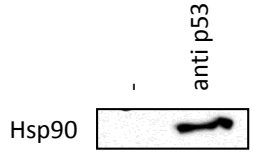

Abbildung 24 Co-Immunopräzipitation von Hsp90 mit p53 aus Hefelysat. Lysat von p53 exprimierenden BY4741-Hefezellen wurde entweder mit Anti-p53 gekoppelten ProteinA-Sepharose beads oder als Negativkontrolle mit ungekoppelten beads inkubiert. Das Eluat wurde mittels Westernblot und einem polyklonalen Anti-Hsp90 Antikörper auf gebundenes Hsp90 untersucht.

Es konnte also erfolgreich ein ß-Galaktosidase-Reportersystem für p53 in der Hefe etabliert werden. Zusätzlich wurde auf zwei unterschiedliche Weisen gezeigt, dass die p53-Aktivität von Hsp90 abhängig ist und dass Hsp90 mit p53 interagiert. Das bedeutet, dass humanes p53 ein Substrat von Hefe-Hsp90 ist und dass daher der p53-Reporterassay in der Hefe gut geeignet ist, um den Einfluss des Hsp90-Chaperonsystems auf p53 *in vivo* zu studieren.

5.1.1.3 Einfluss der Hsp90-Cochaperone auf p53

Der ATPase-Zyklus von Hsp90 und somit seine Aktivität wird durch verschiedene Cochaperone reguliert. Um zu testen, welchen Einfluss die einzelnen Cochaperone auf die p53-Aktivität besitzen, wurde das p53-Reportersystem in Cochaperon-Knock-out Stämme (KOs) transformiert und ß-Galaktosidaseassay durchgeführt.

Zunächst wurde der Effekt des Cochaperons Sti1 untersucht, welches, wie für einige Substratproteine gezeigt worden war, das Protein von Hsp70 auf Hsp90 überträgt (Cintron & Toft, 2006). Überraschenderweise hatte der Verlust von Sti1 keinen Einfluss auf die p53-Aktivität (Abbildung 25). Als nächstes wurden weitere Cochaperon-Knock-outs mit dem Reportersystem transformiert und die p53-Aktivität gemessen (Abbildung 25). Auch der Verlust von Ppt1 oder Sba1 wirkte sich nicht auf die p53-Aktivität aus. Im KO der PPIase Cpr6 war jedoch eine um etwa 20 % reduzierte Aktivität zu beobachten, was durch den T-Test als statistisch signifikant belegt wurde. Der Knock-out einer weiteren PPIase aus Hefe, Cpr7, hatte allerdings keinen Einfluss auf die p53-Aktivierung. Ein unerwarteter Effekt wurde im KO des ATPase-Aktivators Aha1 beobachtet. Ist dieses Cochaperon nicht mehr in der Hefe vorhanden, ist die p53-Aktivität um ca. 20% erhöht. Der Knock-out des Aha1-Homologen Hch1 hatte hingegen keinen Effekt auf die p53-Aktivität. Bestimmte man die Aktivität in einem Stamm, in dem beide Cochaperone ausgeknockt waren, erhöhte sich die p53-Aktivität um 50% verglichen mit dem WT-Stamm. Der Verlust eines Cochaperons kann sich also nicht nur negativ auf die Aktivität eines Hsp90-Substratproteins auswirken, sondern auch zu einer Erhöhung der Aktivität führen. Das bedeutet, dass die Anwesenheit dieses Cochaperons einen negativen Effekt auf die Aktivität des Substratproteins ausübt.

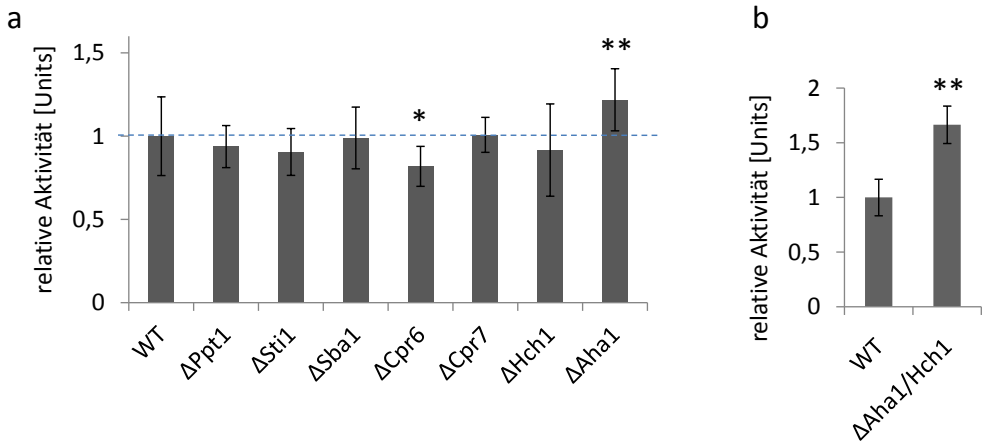

Abbildung 25 Die Aktivität von p53 ist abhängig von Hsp90-Cochaperonen. a p53-Aktivität nach 24 h Expression in BY4741 Cochaperon-Knock-outs bei 30°C. **b** p53-Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-Knock-out (FY 1679-28C). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

5.1.1.4 Einfluss des Hsp70-Systems auf p53

Als nächstes wurde der Einfluss des Hsp70-Systems auf p53 getestet. Dazu wurde zunächst das p53-Reportersystem in Hsp70-defiziente Stämme transformiert. Zum einen wurde ein Stamm verwendet, welcher nur eins der vier Hsp70-Proteine der Ssa-Familie exprimierte, und zwar Ssa1 (ΔSsa2-4). Die Ssa-Subfamilie ist essentiell für die Hefe, mindestens eins dieser Gene muss exprimiert werden um das Überleben der Hefe zu vermitteln. Der zweite hier verwendete Stamm enthält wiederum nur Ssa1, aber als temperatursensitive Mutante (Ssa1ts). Durch Inkubation bei 37°C verliert Ssa1ts seine Aktivität, wodurch die Zelle kein funktionierendes Hsp70 mehr besitzt. Daher kann durch Vergleich der p53-Aktivitäten bei 25°C und 37°C ein Rückschluss auf den Einfluss von Hsp70 auf p53 gezogen werden. Zunächst wurde die Aktivität von p53 in den zwei Stämmen mit dem entsprechenden WT-Stamm bei 25°C verglichen (Abbildung 26). In den ΔSsa2-4-Stämmen, welche entweder Ssa1wt oder Ssa1ts enthielten, wies p53 eine dreifach höhere Aktivität auf. Möglicherweise ist durch den Verlust von Ssa2-4 die Expression anderer Chaperone hochreguliert um für die fehlenden Ssa-Proteine zu kompensieren, was den Grund für die erhöhte Aktivität von p53 in ΔSsa2-4 darstellen könnte.

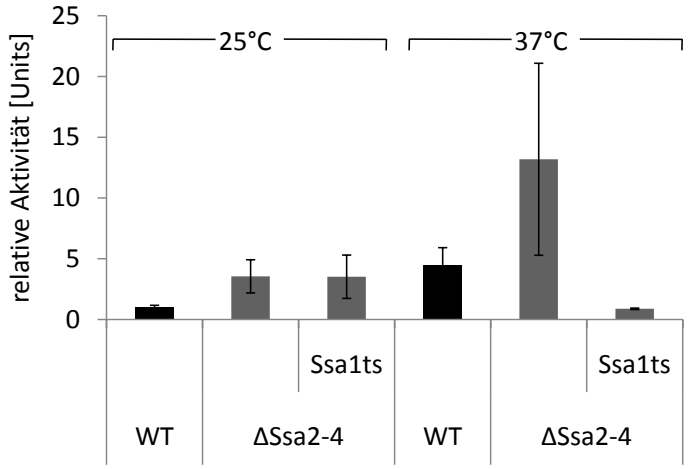

Abbildung 26 Die p53-Aktivität ist abhängig von Hsp70. p53-Aktivität nach 5h Expression in den Ssa-defizienten Hefestämmen JN55, JN516 und JB67 bei 25°C und 37°C. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität im WT-Stamm bei 25°C normiert.

Nach Inkubation bei 37°C erhöhte sich die p53-Aktivität im WT-Stamm um das Fünffache, was auf eine vermehrte Expression/Aktivität von Chaperonen bei dieser Temperatur zurückzuführen sein könnte. Im ΔSsa2-4-Stamm war eine 10fache Erhöhung der Aktivität beobachtbar. Das könnte wieder auf die vermehrte Expression von Ssa1 oder anderen Chaperonen in ΔSsa2-4 im Vergleich zum WT zurückzuführen sein. Im Stamm, der Ssa1ts enthielt, war eine Verringerung der Aktivität um 75% zu beobachten. Das zeigt deutlich, dass ohne ein funktionelles Hsp70 in der Zelle p53 nicht mehr aktiv ist.

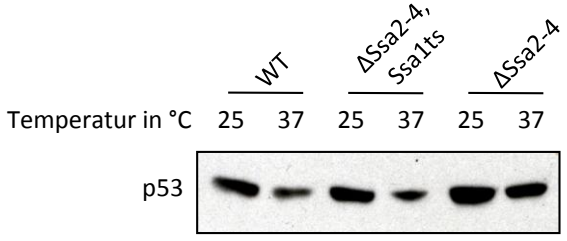

Abbildung 27 Das p53-Level in Hsp70-defizienten Stämmen ist nicht beeinflusst. p53 wurde für 5h in JN55, JN516 und JB67 bei 25°C oder 37°C exprimiert und Lysat durch Aufschluss in denaturierendem Puffer hergestellt. p53 wurde mit dem Anti-p53 Antikörper Ab6 detektiert. Gleiche Auftragsmenge der Proben wurde durch Coomassiefärbung des Gels nach dem Blot überprüft.

Ein Westernblot gegen die Gesamtmenge an p53 in der Zelle zeigte, dass die p53-Stabilität oder -expression in den Ssa-defizienten Stämmen nicht beeinflusst war (Abbildung 27). Das bedeutet, dass der Verlust von funktionellem Hsp70 weder die Translation oder Expression noch die Stabilität oder den Abbau von p53 beeinflusst. Vermutlich kann p53 ohne die Hilfe von Hsp70 nicht korrekt falten und somit nicht seine aktive Konformation erreichen.

5.1.1.4.1 Einfluss der Hsp70-Cochaperone auf p53

Nachdem gezeigt wurde, dass funktionelles Hsp70 essentiell für aktives p53 ist, stellte sich die Frage, ob auch kleinere Veränderungen im Hsp70-System die Aktivität von p53 beeinflussen. Dazu wurden Hsp70-Cochaperon-Knock-out -Stämme mit dem p53-Reportersystem transformiert. Zum einen wurde der Sse1-KO untersucht. Sse1 gehört zur Hsp70-Familie, fungiert als Nukleotidaustauschfaktor für Hsp70 (Shaner et al, 2005) und besitzt Holdasefunktion (Easton et al, 2000). Zum anderen wurde untersucht, welchen Einfluss der Verlust von Snl1 besitzt. Snl1 zeigt Homologie zu humanem Bag1, fungiert also ebenfalls als Nukleotidaustauschfaktor, und stimuliert die Entlassung des Substrats (Sondermann et al, 2002). Als dritter Stamm wurde der Ydj1-KO mit dem p53-Reportersystem transformiert. Ydj1 gehört zur Familie der Hsp40-Proteine, welche naszierende Polypeptidketten zu Hsp70 transferieren und die Hsp70-ATPase-Aktivität stimulieren. Die Hefe besitzt mehrere Hsp40-Proteine, von denen Ydj1 den Hauptbestandteil in der Zelle darstellt (Sahi & Craig, 2007).
Die Expression von p53 in ΔYdj1 führte zu einer 50% gesteigerten p53-Aktivität (Abbildung 28). Auch im Snl1-KO war die p53-Aktivität um etwa 50% erhöht. Im Gegensatz dazu war im Sse1-defizienten Stamm die p53-Aktivität um etwa 40% reduziert. Das zeigt, dass jede Änderung im Hsp70-System einen Effekt auf die p53-Aktivität zeigt und dass die Cochaperon-KOs die p53-Aktivität negativ als auch positiv beeinflussen können. Nur ein intaktes Hsp70-System ermöglicht eine optimale Aktivität von p53.

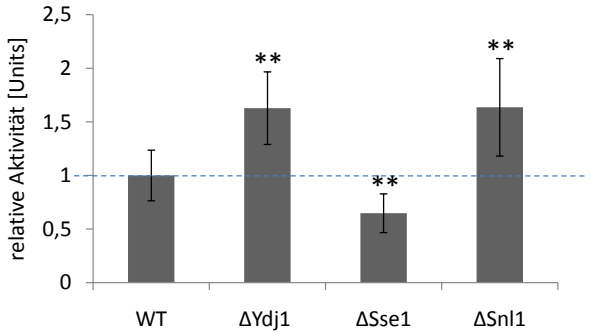

Abbildung 28 Die p53-Aktivität ist abhängig von Hsp70-Cochaperonen. p53-Aktivität nach 24 h Expression bei 30°C in BY4741 Cochaperon-Knock-outs. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen **P < 0,01.

5.1.1.5 Hsp70- und Hsp90-Cochaperone beeinflussen die p53-Menge in der Zelle

Um zu bestimmen, ob die Aktivitätsunterschiede von p53 in den KOs auf ein verändertes p53-Level zurückzuführen waren, wurde Lysat nach 20 Stunden p53-Expression hergestellt. In einigen KOs

konnte man eine veränderte p53-Menge in der löslichen Fraktion des Lysats feststellen (Abbildung 29a).

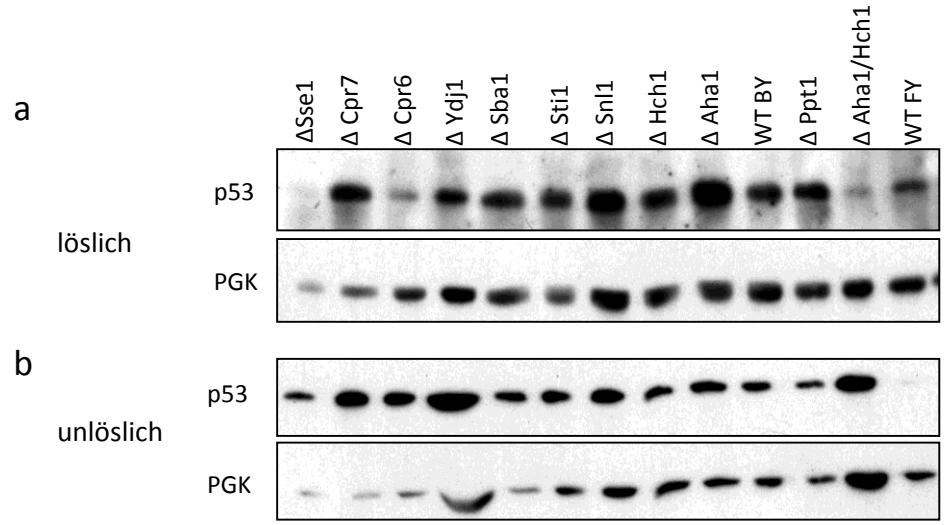

Abbildung 29 Die p53-Menge in der Zelle ist abhängig von Hsp70- und Hsp90-Cochaperonen. p53 wurde für 20 h bei 30°C exprimiert, Lysat unter nativen Bedingungen hergestellt und für 10 min bei 16 000 g zentrifugiert. Die lösliche (**a**) und unlösliche Fraktion (**b**) wurde mittels Westernblot analysiert. p53 wurde mit dem Anti-p53 Antikörper Ab6 detektiert. Als Ladekontrolle wurde die Menge an PGK detektiert. WT FY – WT-Stamm (FY 1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs.

In ΔSse1 und ΔCpr6 wurde weniger p53 als im WT beobachtet. Gründe dafür können eine verminderte p53-Stabilität, eine geringere Expression oder ein erhöhter p53-Abbau sein. Die reduzierte Menge korrelierte mit der geringeren Aktivität von p53 in diesen KOs. Auch im ΔAha1-KO war eine Korrelation zwischen höherer Aktivität und größerer Menge an p53 zu finden. Erstaunlicherweise bestätigte sich diese Tendenz im ΔAha1/Hch1-Doppel-KO nicht, obwohl hier die p53-Aktivität um nochmal 25% gesteigert war.

In ΔYdj1 und ΔSnl1 korrelierte die um 50 % erhöhte Aktivität nicht mit einer höheren Menge an p53. Diese war für ΔYdj1 vergleichbar mit der im WT, in Δha1/Hch1 lag sogar weniger p53 vor.

Betrachtete man jedoch die Menge an p53 in der unlöslichen Fraktion, fand man eine leichte Erhöhung in ΔYdj1 und eine sehr starke in ΔAha1/Hch1 (Abbildung 29b).

Das bedeutet, dass in ΔYdj1 und ΔAha1/Hch1 mehr p53 vorliegt, welches eine höhere Tendenz zum Aggregieren besitzt. Die erhöhte Gesamtmenge an p53 könnte die ebenfalls höhere Aktivität in diesen KOs erklären.

5.1.1.6 Die p53-Aktivität und die Effekte der Cochaperone sind temperaturabhängig

Um die Chaperon-Abhängigkeit von p53 näher zu charakterisieren, wurde die p53-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Inkubierte man p53-exprimierende Zellen bei der leichten Stresstemperatur von 37°C, stieg die p53-Aktiviät um das Doppelte verglichen mit der Aktivität bei

30°C (Abbildung 30). Bei einer Inkubation von 39°C für eine Stunde stieg die Aktivität um nur 25%. Setzte man die Zellen zunächst einem starken Hitzeschock aus (40 min, 45°C) und inkubierte sie dann weiter bei 30°C, so sank die Aktivität von p53 um 25%.

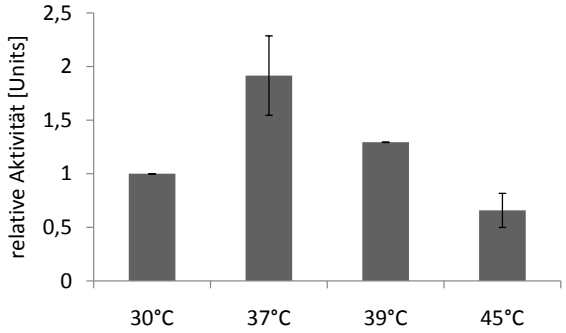

Abbildung 30 p53-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen. Die p53-Expression wurde induziert und die Zellen für 5h bei 30°C, 37°C oder die letzte Stunde bei 39°C inkubiert. Für den Hitzeschock bei 45°C wurden die Zellen für 40 min bei 45°C und dann für 4h und 20 min bei 30°C inkubiert. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität von p53 bei 30°C normiert.

Diese Temperaturabhängigkeit der p53-Aktivität könnte zum einen auf eine veränderte Chaperonexpression zurückzuführen sein, oder auf die p53-Aktivität selbst. Ein Westernblot gegen Hsp90 zeigte, dass die Inkubation bei 37°C und 39°C in einer erhöhten Hsp90-Expression resultierte (Abbildung 31). Die p53-Menge hingegen korrelierte nicht mit der höheren Aktivität, sondern war sogar geringer bei erhöhten Inkubationstemperaturen. Demnach vermittelte vermutlich die zusätzliche Hsp90-Expression die höhere p53-Aktivität, obwohl die Erhöhung der Inkubationstemperatur gleichzeitig auch eine Destabilisierung von p53 zur Folge hatte. In der Summe überwiegte aber offensichtlich die vermehrte Chaperonexpression, was letztendlich zu einem aktiverem p53 führte.

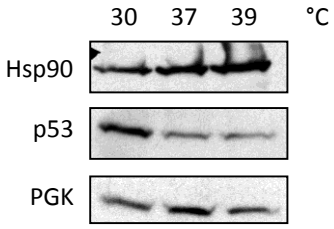

Abbildung 31 p53- und Hsp90-Level in Hefe bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. Die p53-Expression wurde induziert und die Hefen entweder bei 30°C und 37°C für 5 h oder für 4 h bei 30°C und 1 h bei 39°C inkubiert und Lysat unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. p53 wurde mit dem Anti-p53 Antikörper Ab6 und Hsp90 mit einem polyklonalem Antiserum detektiert. Als Ladekontrolle diente die Menge an PGK.

Da die p53-Aktivität temperaturabhängig ist, sollte der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die p53-Aktivität getestet werden, wenn ein Cochaperon deletiert war. Inkubierte man die Zellen bei 25°C, verschwanden die zuvor bei 30°C beobachteten aktivierenden Effekte des Ydj1-, Snl1- oder Aha1/Hch1-KOs. Im Gegensatz dazu verstärkte sich der negative Effekt von ΔSse1 auf p53 (Abbildung 32). Die Inkubation bei 37°C wirkte sich ebenfalls auf verschiedene Weise auf die Aktivität von p53 in den KOs aus. Statt, wie bei 30°C aktiver zu sein, besaß p53 in ΔSnl1 und ΔAha1/Hch1 eine geringere

Aktivität. Im ΔCpr6 und ΔSse1 verstärkte sich der reprimierende Effekt des KOs bei der höheren Inkubationstemperatur. Die Aktivität im Ydj1-KO konnte nicht gemessen werden, da dieser Stamm bei 37°C nicht lebensfähig war.

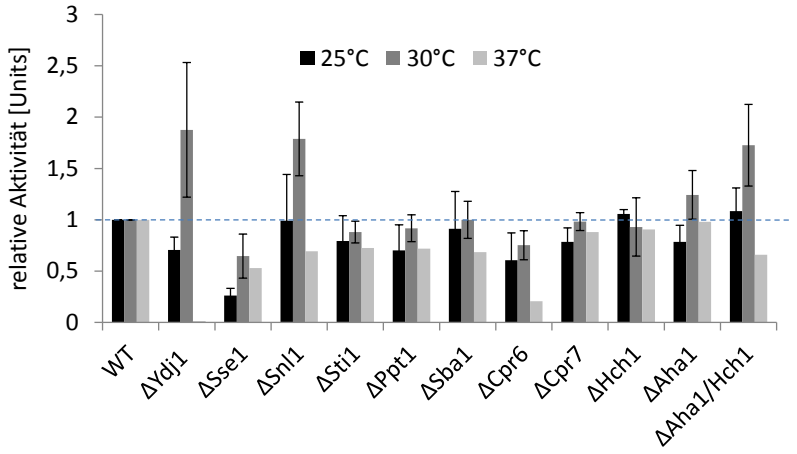

Abbildung 32 Die Aktivität von p53 in Cochaperon-KOs ist temperaturabhängig. p53-Aktivität nach 24 h Expression in Cochaperon-Knock-outs (BY4741 bzw. FY1679-28C für Aha1/Hch1-KO) bei 25°C, 30°C und 37°C. Für 25°C und 30°C sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Für 37°C ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Aktivität wurde jeweils auf die Aktivität im WT-Stamm bei der entsprechenden Temperatur normiert

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die p53-Aktivität temperaturabhängig ist, was vermutlich auf eine veränderte Chaperonexpression bei verschiedenen Temperaturen zurückzuführen ist. Das Fehlen bestimmter Cochaperone wirkt sich außerdem je nach Temperatur positiv oder negativ auf die p53-Aktivität aus.

5.1.1.7 Die destabilisierte p53-Mutante V143A zeigt eine veränderte Abhängigkeit von Cochaperonen

Die p53-Mutation V143A liegt in der DNA-Bindedomäne und gehört zu den sogenannten „Hot Spot"-Mutationen, die oft in Krebszellen gefunden werden (Di Como & Prives, 1998). Sie führt zu einer strukturellen Änderung und Destabilisierung von p53, welches dadurch seine Funktion in der Zelle nicht mehr optimal ausführen kann. Außerdem wird vermutet, dass strukturell destabilisierte Mutanten stärker mit Hsp90 und Hsp70 interagieren (Blagosklonny et al, 1996; Hupp et al, 2000).
Die p53-Mutante V143A zeigte nur 25 % der Aktivität von p53wt in der Hefe (Abbildung 33).

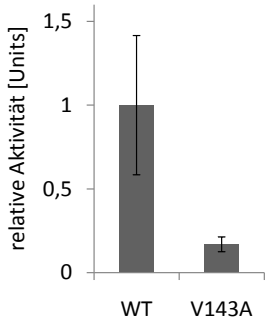

Abbildung 33 Aktivität von p53wt und p53 V143A. p53-Aktivität nach 24 h Expression in BY4741 bei 30°C. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität von p53wt wurde gleich 1 gesetzt.

Außerdem zeigte p53V143A ein stark verändertes Muster der Cochaperon-Abhängigkeit. Erstens zeigte fast jeder Cochaperon-KO einen Einfluss auf die Aktivität (Abbildung 34), mit Ausnahme des Aha1/Hch1-Doppel-KO. Zweitens war bei keinem KO eine Erhöhung der Aktivität zu beobachten, was bei p53wt für Ydj1, Snl1 und Aha1/Hch1 der Fall war. Das bedeutet, dass die veränderte Stabilität von p53V143A eine andere Abhängigkeit vom Hsp70-Hsp90-Chaperonsystem hervorruft.

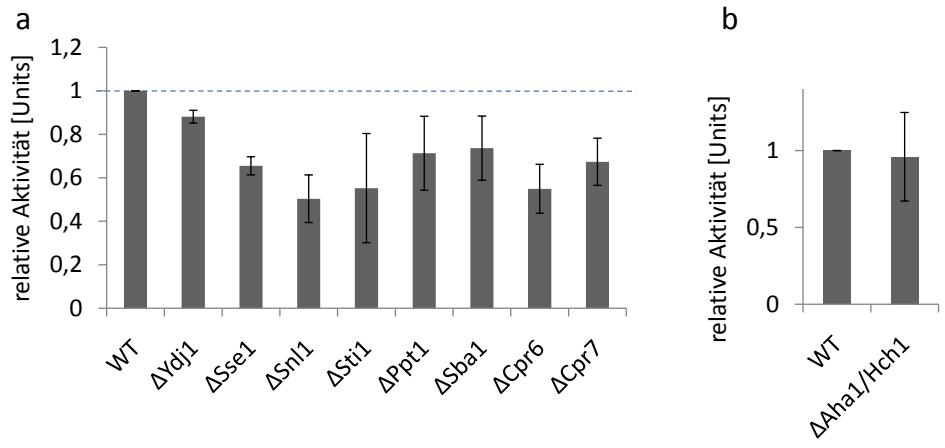

Abbildung 34 Die Aktivität von p53V143A ist abhängig von Cochaperonen. a p53-Aktivität nach 24 h Expression in BY4741 Cochaperon-KOs bei 30°C. **b** p53-Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-KO (FY 1679-28C). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität im WT-Stamm normiert.

Im Gegensatz zu p53wt hatte die Inkubation von p53V143A bei niedrigeren Temperaturen (20°C und 25°C) keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivitäten in den KOs (Abbildung 35). Bei einer Expression bei 37°C konnte gar keine Aktivität mehr gemessen werden, was wahrscheinlich auf einen kompletten Verlust der Struktur der labilen Mutante zurückzuführen war.

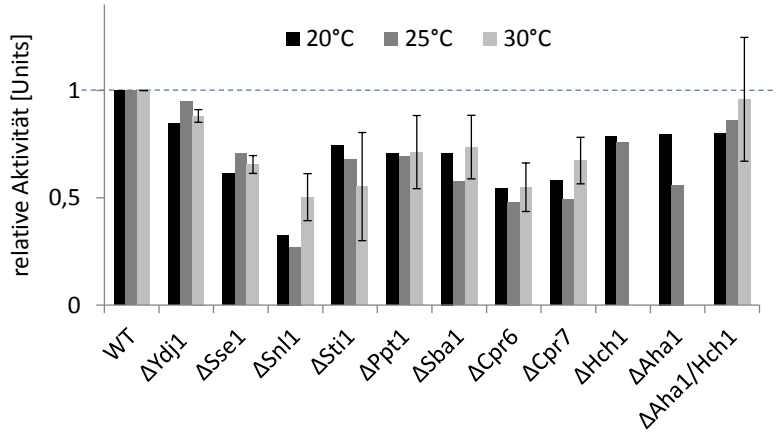

Abbildung 35 Die Aktivität von p53 V143A ist temperaturunabhängig. p53V143A-Aktivität nach 24 h Expression in Cochaperon-KOs (BY4741 bzw. FY1679-28C für Aha1/Hch1-KO) bei 20°C, 25°C und 30°C. Für 30°C sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben, für 20°C und 25°C ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Aktivität wurde jeweils auf die Aktivität im WT-Stamm bei der entsprechenden Temperatur normiert.

Anders als bei p53wt sind die Level an p53V143A größtenteils unabhängig vom Verlust eines Cochaperons (Abbildung 36). Ausgenommen davon ist ΔCpr6, bei dem ein geringeres Level an p53V143A beobachtet wurde, was mit einer verminderten Aktivität korreliert. Im Aha1/Hch1-Doppel-KO war, wie auch schon bei p53wt beobachtet, ein höheres Level an p53V143A zu detektieren. Das spiegelte sich aber nicht in der Aktivität wieder. Leider konnte die p53-Mutante beim Aufschluss unter nativen Bedingungen nicht detektiert werden, da es wahrscheinlich durch die der Herstellung des Lysats verloren ging. Daher konnte keine getrennte Analyse der löslichen und unlöslichen Fraktion durchgeführt, sondern nur die Gesamtproteinmenge studiert werden.

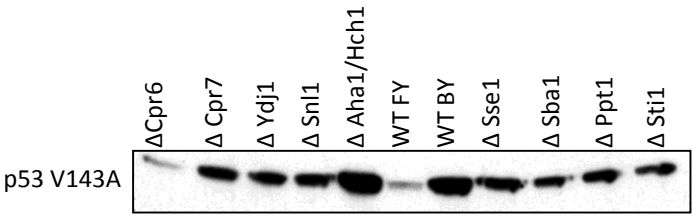

Abbildung 36 p53V143A-Level in Cochaperon-KOs. p53V143A wurde für 20 h bei 25°C exprimiert und Lysat unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. p53V143A wurde mit dem Anti-p53 Antikörper Ab6 detektiert. WT FY – WT-Stamm (FY1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs.

5.1.1.8 Coimmunopräzipitation von Cochaperonen mit p53

Um zu untersuchen, welche Chaperone und Cochaperone mit p53 in der Hefe interagieren, wurde die Methode der Coimmunopräzipitation (Co-IP) angewendet. Dazu wurde ein Anti-p53 Antikörper mit Protein A-Sepharose *beads* gekoppelt und mit Lysat von p53-exprimierenden Hefen inkubiert. An p53 gebundene Chaperone wurden dann mittels Westernblot ermittelt. Zunächst wurde die Konzentration an Anti-p53 Antikörper titriert (Abbildung 37a) um das optimale Verhältnis zu ermitteln.

3,75 µg Antikörper pro 10 µl *beads* waren am besten geeignet Coimmunopräzipitationen durchzuführen. Die Bindung der Proteinphosphatase Ppt1 an p53 konnte mittels Co-IP nachgewiesen werden (Abbildung 37a). Erst nach längerem Waschen konnte die unspezifische Bindung von Hsp90 an die *beads* eliminiert und die spezifische Bindung an p53 gezeigt werden (Abbildung 37b). Auch die Bindung der Cochaperone Ydj1 und Sti1 an p53 konnte detektiert werden. Alle anderen Cochaperone hatten entweder unspezifisch an die *beads* gebunden oder konnten gar nicht detektiert werden.

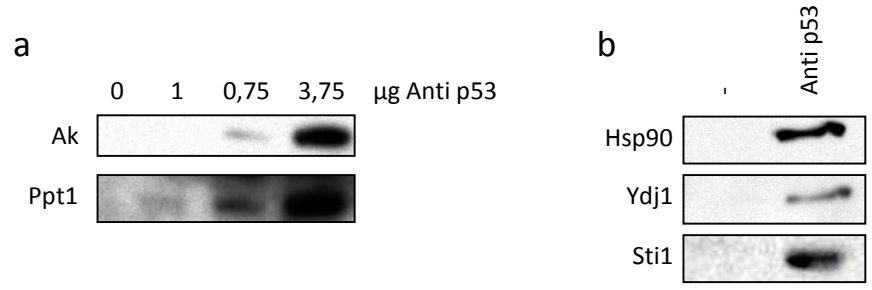

Abbildung 37 Coimmunopräzipitation von Hsp90, Ppt1 und Ydj1 mit p53. a Steigende Konzentrationen an Anti-p53 Antikörper (Ab6) wurden an Protein A-Sepharose gekoppelt und mit Hefelysat inkubiert. Ppt1 co-immunopräzipitierte konzentrationsabhängig mit p53 **b** 3,75 µg Anti-p53 Antikörper wurde an 10 µl Protein A-Sepharose gekoppelt und mit Lysat aus p53-exprimierenden Hefen inkubiert. Als Kontrolle diente Protein A-Sepharose ohne gekoppelten Antikörper. Die Detektion von Ppt1, Hsp90, Ydj1 und Sti1 erfolgte mit polyklonalen Antiseren und Anti-Rabbit-Antikörper, gekoppelter Ab6 wurde mit Anti-Maus detektiert.

Da einige Cochaperon-KOs einen Einfluss auf die p53-Aktivität zeigten, stellte sich die Frage, ob das Fehlen eines bestimmten Cochaperons die Bindung von Hsp70 oder Hsp90 an p53 verändern würde. Dazu wurde eine Co-IP aus den KOs durchgeführt. Sowohl Hsp90, als auch Hsp70 interagierten stärker mit p53 im ΔYdj1-, ΔPpt1- und ΔCpr6-Stamm (Abbildung 38). Diese erhöhte Interaktion könnte die höhere Aktivität von p53 im ΔYdj1-Stamm erklären. Für ΔPpt1 und ΔCpr6 wurde allerdings keine höhere Aktivität gemessen.

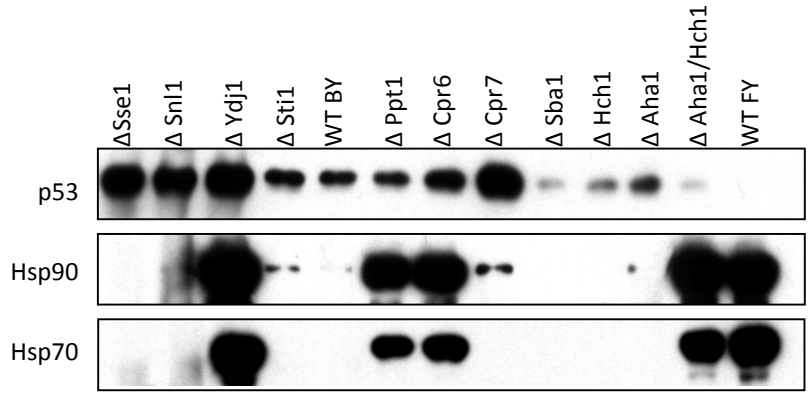

Abbildung 38 Coimmuopräzipitation von Hsp90 und Hsp70 mit p53. Anti-p53 (Ab6) gekoppelte Protein A-Sepharose beads wurden mit Lysat aus p53-exprimierenden Hefen inkubiert. Hsp90 und Hsp70 wurden mit polyklonalen Antiseren detektiert. WT FY – WT-Stamm (FY1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs.

Für p53 wurde gezeigt, dass es neben seiner nativen Konformation auch eine „mutierte" Konformation ausbilden kann. In vielen Krebszellen führt eine Punktmutation in p53 dazu, dass mehr

p53 in der mutierten als in der nativen Konformation vorliegt, was zu inaktivem p53 führt (Milner et al, 1991). Diese Konformationen können mit spezifischen Antikörpern unterschieden werden. Durch Immunopräzipitation mit diesen Antikörpern kann man zwischen nativ gefaltetem und p53 in der mutierten Konformation unterscheiden.

Um zu bestimmen, ob das Fehlen bestimmter Cochaperone einen Einfluss auf die p53-Konformation hat, wurde eine Immunopräzipitation mit konformationsspezifischen Antikörpern (Ab3 gegen mutiertes p53, Ab5 gegen p53wt) durchgeführt. Diese ergab, dass die p53-Konformation durch das Fehlen eines bestimmten Cochaperons nicht beeinflusst wurde (Abbildung 39).

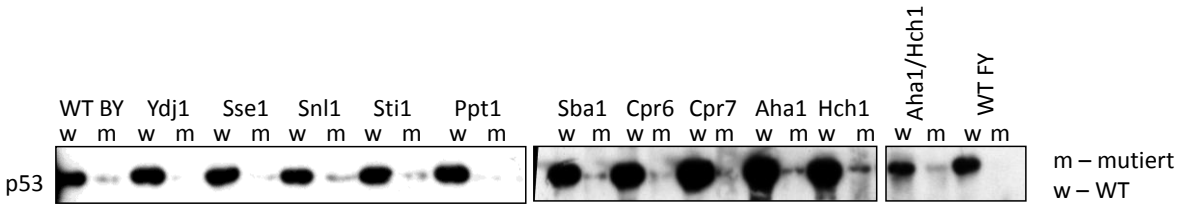

Abbildung 39 Immunopräzipitation mit konformationsspezifischen Antikörpern. Protein A-Sepharose beads wurden mit Antikörpern Ab5 und Ab3 gegen p53 in der WT-Konformation (w) und in der mutierten Konformation (m) gekoppelt und mit Lysat von p53-exprimierenden Hefen inkubiert. p53 wurde mit polyklonalem Anti-p53 Serum aus Kaninchen detektiert. WT FY – WT-Stamm (FY1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs.

Um zu bestimmen, ob unterschiedliche Mengen an Hsp90 oder Hsp70 an p53 in der WT- oder mutierten Konformation binden, wurde eine Coimmunopräzipitation von Hsp90 und Hsp70 mit den konformationsspezifischen Antikörpern durchgeführt. Wie zu erwarten war, wurde mehr Hsp90 und Hsp70 mit p53 in der mutierten Konformation coimmunopräzipitiert (Abbildung 40). Die Bandenstärke von Hsp90 und Hsp70 war für beide p53-Konformationen gleich, jedoch war viel weniger mutiertes p53 vorhanden, was bedeutet, dass im Verhältnis mehr Chaperone an die mutierte Konformation gebunden hatten.

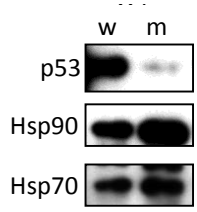

Abbildung 40 Coimmunopräzipitation von Hsp90 und Hsp70 mit nativem und mutiertem p53. Protein A-Sepharose beads wurden mit den Antikörpern Ab5 und Ab3 gegen p53 in der WT-Konformation (w) und in der mutierten Konformation (m) gekoppelt und mit Lysat von p53-exprimierenden Hefen inkubiert. p53, Hsp90 und Hsp70 wurden mit polyklonalem Serum aus Kaninchen detektiert.

Als nächstes sollte bestimmt werden, ob es in den KOs Unterschiede in der Bindung von Hsp90 und Hsp70 an die verschiedenen Konformationen von p53 gibt. Dazu wurden Hsp90 und Hsp70 mit p53 in der mutierten und nativen Konformation aus den Cochaperon-KOs coimmunopräzipitiert. Nach mehreren Wiederholungen stellte sich heraus, dass die Bindung von Hsp90 und Hsp70 von

Experiment zu Experiment sehr schwankte. Zum einen variierte die Menge an coimmunopräzipitiertem Hsp90 und Hsp70 in den KOs zwischen den Experimenten sehr stark, zum anderen schwankte die Menge auch zwischen nativem oder mutiertem p53 in ein und demselben KO. In Abbildung 41 wurde exemplarisch die Coimmunopräzipitation aus ΔYdj1 im Vergleich mit dem WT dargestellt. In Experiment 1 wurde mehr Hsp90 und Hsp70 im Ydj1-KO als im WT mit p53 coimmunopräzipitiert und es war zu erkennen, dass mehr Chaperone an mutiertes p53 binden als an natives. Die stärkere Bindung von Hsp90 und Hsp70 an p53 in ΔYdj1 konnte in Experiment 2 bestätigt werden. Jedoch war der Unterschied zwischen mutierter und nativer Konformation im Ydj1-KO nicht mehr zu erkennen. In Experiment 3 konnte weder die stärkere Bindung der Chaperone an p53 im Ydj1-KO noch an mutiertes p53 nachgewiesen werden. Diese Schwankungen wurden auch für andere KOs beobachtet.

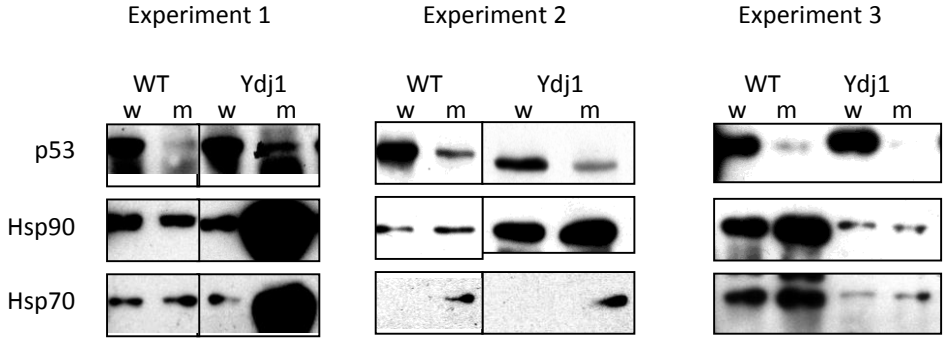

Abbildung 41 Coimmunopräzipitation von Hsp90 und Hsp70 mit nativem und mutiertem p53. Protein A-Sepharose beads wurden mit Antikörpern Ab5 und Ab3 gegen p53 in der WT-Konformation (w) und in der mutierten Konformation (m) gekoppelt und mit Lysat von p53-exprimierenden Hefen inkubiert. p53, Hsp90 und Hsp70 wurden mit polyklonalem Serum aus Kaninchen detektiert.

Möglicherweise ist die Coimmunopräzipitation von Chaperonen mit p53 sehr anfällig für Änderungen der experimentellen Parameter. Obwohl darauf geachtet wurde, dass alle Bedingungen zwischen den Experimenten gleich sind, können kleine Variationen nicht ausgeschlossen werden. Da Hsp90 und Hsp70 ATP-abhängig sind, spielt der Energiestatus der Zelle möglicherweise eine große Rolle. Dieser ändert sich beim Aufschluss der Zellen, da kein ATP mehr nachproduziert werden kann. Möglicherweise war der Energiestatus im Zelllysat von Experiment zu Experiment. Um zu testen, ob der Energiestatus einen Einfluss auf die Bindung von Hsp90 und Hsp70 mit p53 hat, wurde die Coimmunopräzipitation in Anwesenheit von AMP-PNP, einem ATP-regenerierenden Systems oder dem Enzym Apyrase durchgeführt. Tatsächlich konnte in Anwesenheit des ATP-regenerierenden Systems eine viel stärkere Bindung von Hsp90 und Hsp70 an p53 detektiert werden (Abbildung 42).

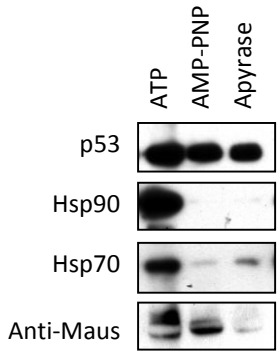

Abbildung 42 Coimmunopräzipitation von Hsp90 und Hsp70 mit p53 in Abhängigkeit verschiedener Nukleotidbedingungen. Anti-p53 (Ab6) gekoppelte Protein A-Sepharose beads wurden mit Lysat aus p53-exprimierenden WT-Hefen in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems (10 mM), AMP-PNP (10 mM) oder Apyrase (1 U) inkubiert. p53, Hsp90 und Hsp70 wurden mit polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen detektiert. Als Ladekontrolle wurde der gekoppelte Anti-p53 Antikörper mittels Anti-Maus detektiert.

Interessanterweise war die Energieabhängigkeit der Hsp90- und Hsp70-Bindung in ΔYdj1, ΔSnl1, ΔAha1, ΔHch1 und ΔAha1/Hch1 nicht mehr gegeben, da auch hier in Anwesenheit von AMP-PNP eine Bindung von Hsp90 und Hsp70 zu beobachten war (Abbildung 43).

Das zeigt, dass der Verlust eines Cochaperons die Nukleotidabhängigkeit von Hsp90 und damit Regulation der Substrataktivierung über den ATPase-Zyklus verändern kann.

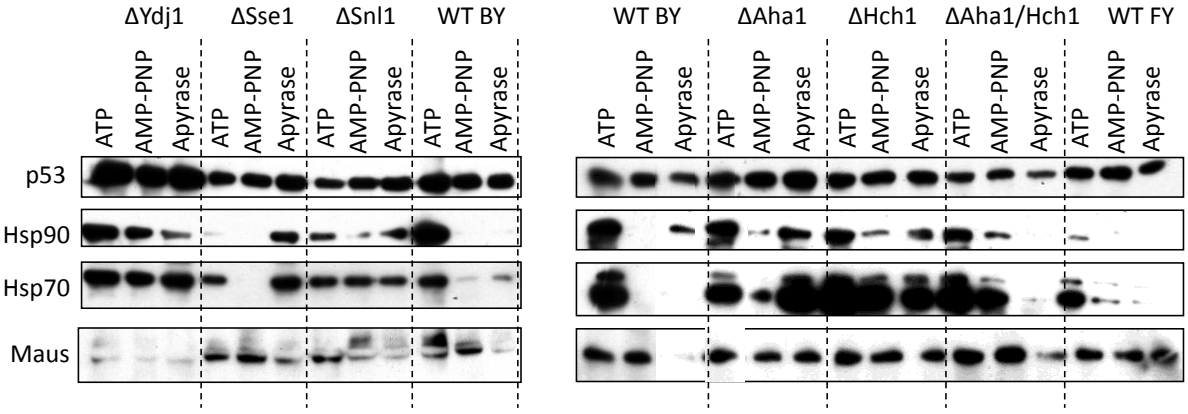

Abbildung 43 Coimmunopräzipitation von Hsp90 und Hsp70 mit p53 ist abhängig vom Energiestatus. Anti-p53 (Ab6) gekoppelte ProteinA-Sepharose beads wurden mit Lysat aus p53-exprimierenden Hefen in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems, AMP-PNP oder Apyrase inkubiert. p53, Hsp90 und Hsp70 wurden mit polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen detektiert. Als Ladekontrolle wurde der gekoppelte Anti-p53 Antikörper mittels Anti-Maus detektiert. WT FY – WT-Stamm (FY1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs.

5.1.1.9 Charakterisierung des Effekts von ΔYdj1 und ΔAha1 auf p53

Bisher wurde gezeigt, dass p53 in ΔYdj1 und in ΔAha1 bzw. ΔAha1/Hch1 eine höhere Aktivität aufweist. Diese korrelierte mit einer erhöhten Menge an p53 in der Zelle. Um die Frage zu beantworten, ob die höhere Menge auf einen verminderten Abbau in Folge des Cochaperonverlusts zurückzuführen ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt. p53 wurde unter einen Galaktose-

induzierbaren Promoter kloniert, sodass durch Zugabe von Glukose zum Medium ein Stoppen der p53-Expression möglich war. Durch Probenentnahme nach verschiedenen Zeitpunkten konnte die Verweilzeit von p53 in der Zelle (ohne Neusynthese) analysiert werden. Es stellte sich heraus, dass im ΔAha1/Hch1 und im ΔYdj1 der Abbau von p53 langsamer vonstattenging als im jeweiligen WT-Stamm (Abbildung 44).

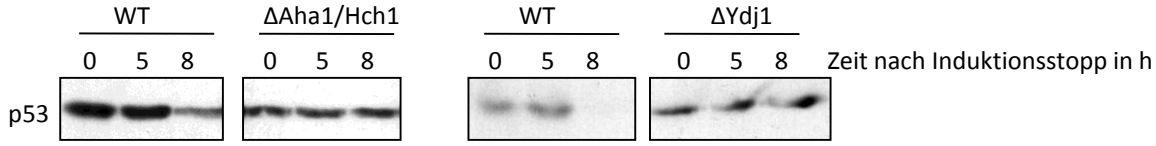

Abbildung 44 p53-Induktionsstopp durch Zugabe von Glukose. p53 wurde von einem galaktoseinduzierbaren Promoter exprimiert. Durch Zugabe von Glukose wurde die Expression gestoppt und nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für einen Westerblot genommen. p53 wurde mit dem Anti-p53 Antikörper Ab6 detektiert.

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der Cochaperone am p53-Abbau ist, dass die Inhibition von Hsp90 in ΔYdj1 und ΔAha1/Hch1 keinen Abbau von p53 zur Folge hatte (Abbildung 45a). Auch die Aktivität in Anwesenheit des Hsp90-Inhibitors reduzierte sich dementsprechend nicht (Abbildung 45b).

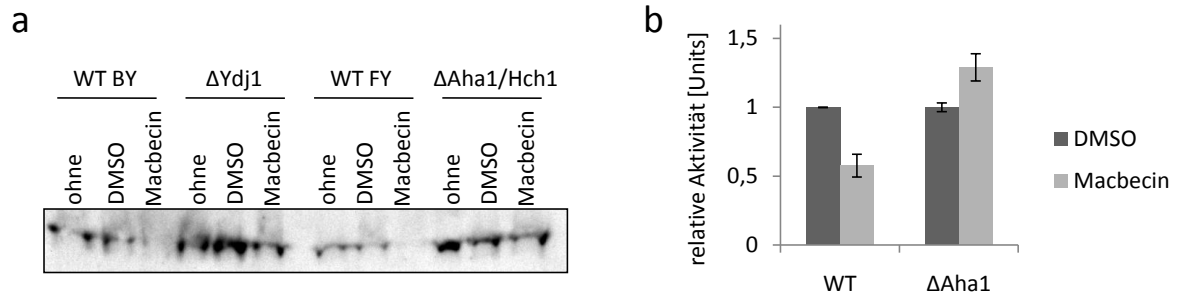

Abbildung 45 Einfluss von Macbecin II auf p53 in WT, ΔYdj1 und ΔAha1/Hch1. a p53-Level nach 5h Induktion in Anwesenheit von 100 µM Macbecin II **b** p53-Aktivität nach 24h Expression in Anwesenheit von 100 µM Macbecin II.

Aus den vorherigen Experimenten kann geschlussfolgert werden, dass die Cochaperone Ydj1 und Aha1/Hch1 am Abbau von p53 beteiligt sind. Möglicherweise wird die Interaktion des Substrats mit Hsp90 durch das Fehlen eines Cochaperons gestört und so das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Abbau verschoben.

5.1.1.10 EMSA

Um den Einfluss der Cochaperone Aha1 und Hch1 auf die Aktivität von p53 durch Hsp90 näher zu untersuchen, wurde versucht *in vitro* die Hsp90-abhängige Aktivität von p53 nachzustellen. Dazu wurde die Methode des *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) angewandt. Damit konnte

gezeigt werden, dass auch *in vitro* Hsp90 eine schützende Funktion auf p53 ausübt (Abbildung 46). Nach 30 min Inkubation bei 37°C war p53 nur noch in Anwesenheit von Hsp90 aktiv. Die Anwesenheit von ATP verstärkte den schützenden Effekt von Hsp90.

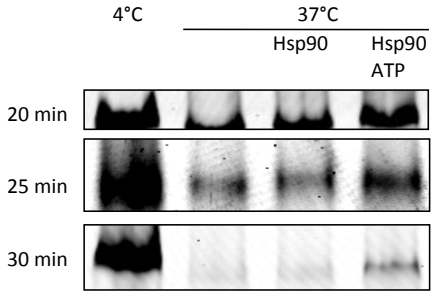

Abbildung 46 Einfluss von Hsp90 auf die DNA-Bindeaktivität von p53. 3 µM p53 wurde bei 37°C mit und ohne10 µM Hsp90 in An- und Abwesenheit von 15 mM ATP inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten mit einem EMSA analysiert. Als Kontrolle diente die p53-Aktivität nach Inkubation bei 4°C.

Die Zugabe der Hsp90 ATPase-Aktivatoren Aha1 und Hch1 hatten keinen signifikanter Effekt auf die p53-Aktivität *in vitro* bei 37°C und in Anwesenheit von Hsp90 (Abbildung 47). Nur nach Zugabe sehr hoher Mengen konnte im Fall von Hch1 ein *Supershift* gesehen werden, der auf der Bildung eines größeren Komplexes beruht. Vielleicht liegt bei diesen hohen Konzentrationen Hsp90 immer im Komplex mit Hch1 vor, welches dadurch p53 nicht mehr entlässt und so zusammen mit p53 an die DNA bindet. Da der 20fache Überschuss an Hch1 gegenüber Hsp90 aber unphysiologisch ist, sollte dieses Ergebnis mit anderen Methoden überprüft werden.

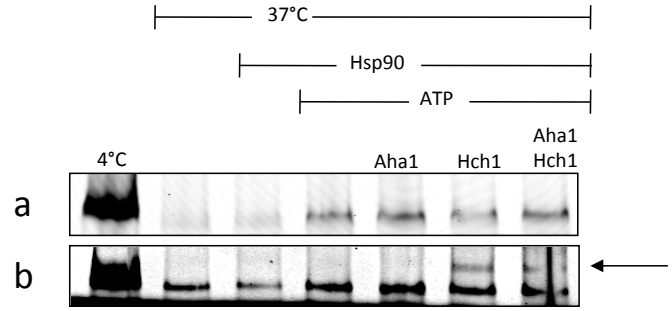

Abbildung 47 Einfluss von Aha1 und Hch1 auf die DNA-Bindeaktivität von p53. 3 µM p53 wurde bei 37°C mit und ohne10 µM Hsp90 in An- und Abwesenheit von 15 mM ATP inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten mit einem EMSA analysiert. Zusätzlich wurden **a** 100 µM Aha1, Hch1 oder beide oder **b** 150 µM Aha1, 200 µM Hch1 oder beide hinzugegeben. Pfeil – Supershift der DNA. Als Kontrolle diente die p53-Aktivität nach Inkubation bei 4°C.

5.1.2 Charakterisierung der Chaperonabhängigkeit von v-Src

Um die Chaperon-Abhängigkeit verschiedener Hsp90-Substratproteine untereinander vergleichen zu können, wurde die Aktivität weiterer Proteine in den Cochaperon-KOs untersucht. In diesem Kapitel soll die Abhängigkeit des Hsp90-Substratproteins v-Src gezeigt werden. Dazu wurde v-Src unter einem galaktoseinduzierbaren Promoter in die KOs transformiert. Ist v-Src aktiv, werden Hefeproteine unspezifisch phosphoryliert. Da dies für die Hefezelle lethal ist, kann man durch einen einfachen Wachstumsassay die Aktivität von v-Src bestimmen.

5.1.2.1 Untersuchung der v-Src-Aktivität in Hsp70- und Hsp90-Cochaperon-Knock-outs

Zunächst wurde die Abhängigkeit von den Hsp70-Cochaperonen bestimmt. Induzierte man die Expression von v-Src in WT-Hefen durch Inkubation auf galaktosehaltigen Platten, fand kein Wachstum statt (Abbildung 48).

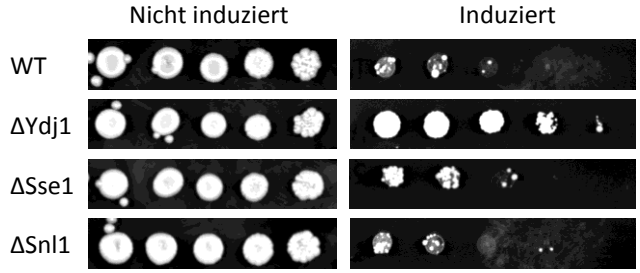

Abbildung 48 Aktivität von v-Src in Hsp70-Cochaperon-Knock-outs. Nach Inkubation in raffinosehaltigem Medium wurden die Hefen entweder auf Glukoseplatten (v-Src-Expression wird nicht induziert) oder auf Galaktoseplatten (v-Src-Expression wird induziert) für 4 Tage inkubiert.

v-Src-exprimierende ΔYdj1-Hefen wuchsen sehr gut auf galaktosehaltigem Medium, was bedeutet, dass hier v-Src nicht aktiv ist (Abbildung 48). Auch ΔSse1-Hefen wuchsen etwas besser als der WT-Stamm auf Galaktose, jedoch nicht so gut wie ΔYdj1. Der Verlust von Snl1 hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefezellen, und beeinflusst somit nicht die Aktivität von v-Src. Das bedeutet, dass die Anwesenheit von Ydj1 und Sse1 für eine optimale Aktivität des Hsp90-Substrats v-Src gebraucht wird.

Als nächstes wurde überprüft, ob die v-Src-Aktivität auch von Hsp90-Cochaperonen abhängig ist. Der KO von Sti1 führte zu einer Verringerung der Aktivität (Abbildung 49). Auch Ppt1 und Sba1 hatten einen leichten Effekt auf die v-Src-Aktivität, da die Hefezellen dieser KOs auf galaktosehaltigem Medium etwas besser wuchsen als der WT-Stamm. Interessanterweise führte der Verlust von Cpr7 zu einer Verringerung der Aktivität, der KO von Crp6 hingegen hatte keinen Einfluss. Hefen, die kein Aha1 oder kein Hch1 mehr exprimierten, wuchsen besser als der WT-Stamm auf galaktosehaltigem Medium. Das bedeutet, dass Sti1, Ppt1, Sba1, Cpr7, Aha 1und Hch1 zur Aktivierung von v-Src beitragen.

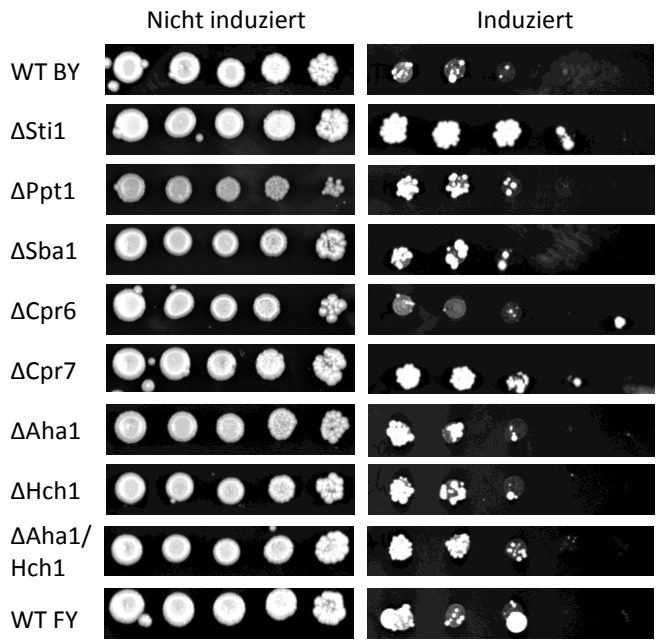

Abbildung 49 Aktivität von v-Src in Hsp90-Cochaperon-KOs. Nach Inkubation in raffinosehaltigem Medium wurden die Hefen entweder auf Glukoseplatten (v-Src-Expression wird nicht induziert) oder auf Galaktoseplatten (v-Src-Expression wird induziert) für 4 Tage inkubiert. WT FY – WT-Stamm (FY1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs.

Die v-Src-Aktivität kann auch mit Hilfe eines Westernblots gegen Phosphotyrosin detektiert werden, wobei alle tyrosinphosphorylierten Proteine des Hefelysats sichtbar werden. Die inhibierenden Effekte von ΔYdj1, ΔSse1 und ΔSti1 konnten mit Hilfe dieser Methode bestätigt werden, da hier im Blot kaum Signal zu sehen war (Abbildung 50). Die schwächeren Effekte von ΔPpt1, ΔSba1, ΔAha1 und ΔHch1 waren mit Hilfe des Blots nicht nachzuweisen. Lediglich der Aha1/Hch1-Doppel-KO zeigte ein geringeres Phosphorylierungslevel als der dazugehörige WT-Stamm.

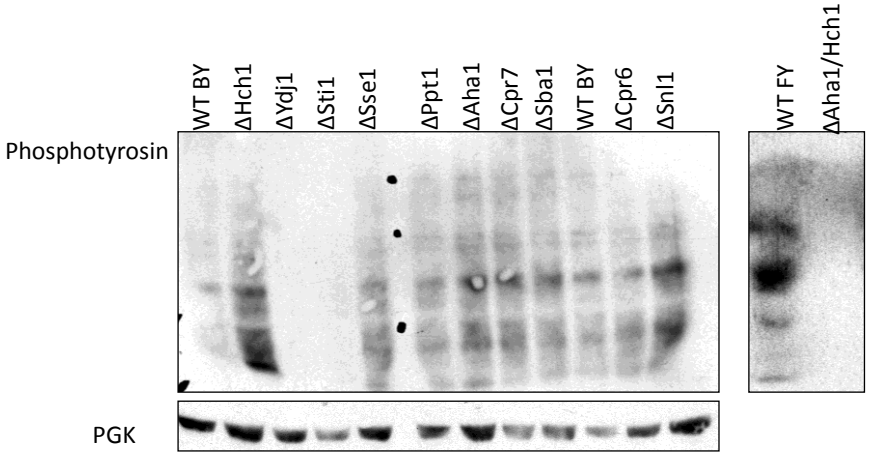

Abbildung 50 Phosphotyrosinlevel in v-Src-exprimierenden Hefen. Die v-Src-Expression wurde für 5h induziert und Lysat unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper. WT FY – WT-Stamm (FY1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs. Als Ladekontrolle wurde die Menge an PGK detektiert.

Um zu testen, ob die geringere Aktivität von v-Src auf eine verminderte Stabilität des Proteins zurückzuführen ist oder ob die Cochaperone einen direkten Einfluss auf die Aktivität nehmen, wurde ein Westernblot gegen v-Src durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die im Wachstumsassay beobachtete geringere Aktivität von v-Src in ΔYdj1 und ΔSti1 auf ein geringeres Level an v-Src in der Zelle zurückzuführen war (Abbildung 51). Die verminderte Aktivität von v-Src in ΔCpr7 konnte allerdings nicht auf ein reduziertes Level zurückgeführt werden. Im ΔSnl1-, ΔHch1- und ΔSba1-KO konnte v-Src mittels Westernblot nicht nachgewiesen werden, obwohl hier die Aktivität gar nicht oder nur etwas geringer war als im WT. Das weist darauf hin, dass das Fehlen eines Cochaperons einerseits die Stabilität, andererseits die Aktivität von v-Src oder beides zusammen beeinflussen kann.

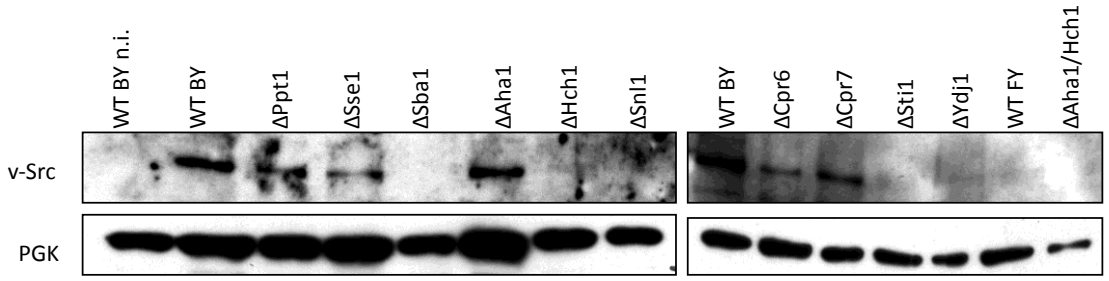

Abbildung 51 v-Src-Level in Cochaperone-KOs. Die v-Src-Expression wurde für 5 h induziert und Lysat unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalem Anti-v-Src Antikörper. Gleiche Auftragsmenge der Proben wurde durch Coomassiefärbung des Gels nach dem Blot überprüft. Als Negativkontrolle diente Lysat von uninduzierten Hefen. WT FY – WT-Stamm (FY1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs. Als Ladekontrolle wurde die Menge an PGK detektiert.

5.1.2.2 Einfluss der Hsp90-Inhibition auf v-Src

Als Hsp90-Substratprotein konnte die Aktivität von v-Src mit dem Hsp90-Inhibitor Radicicol inhibiert werden (Abbildung 52a). Mindestens 10 µM Radicicol wurden benötigt um einen signifikanten Effekt auf das Wachstum der Hefen beobachten zu können. Auch Macbecin II führte zur Inaktivierung von v-Src (Abbildung 52b).

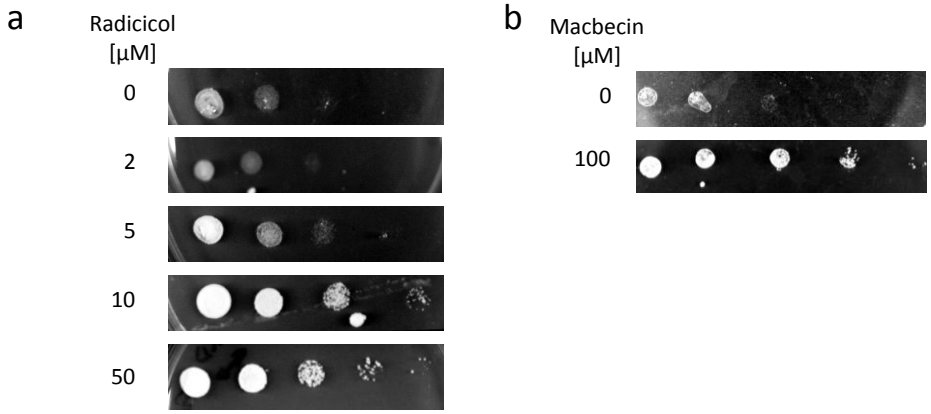

Abbildung 52 Verminderung der v-Src-Aktivität durch Hsp90-Inhibition. Nach Inkubation in raffinosehaltigem Medium wurde der Hefestamm BY47471 auf Galaktoseplatten (v-Src-Expression wird induziert) für 7 Tage in Anwesenheit steigender Konzentration an Radicicol **(a)** oder mit 100 µM Macbecin II **(b)** inkubiert.

Die Inhibition von Hsp90 in den Cochaperon-KOs hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die v-Src-Aktivität. In ΔHch1, ΔAha1 und Im Aha1/Hch1-Doppel-KO führte die Inhibition von Hsp90 zu nicht komplett inaktivem v-Src, da die Hefen einen stärkeren Wachstumsdefekt aufwiesen als der entsprechende WT-Stamm (Abbildung 53). Auch im ΔCpr7-Stamm war v-Src noch deutlich aktiver als im WT, was bedeutet, dass sich hier die Hsp90-Inhibition durch das Fehlen von Cpr7 nicht mehr so stark auf die v-Src-Aktivität auswirkt. Diese Effekte konnten durch Inhibierung der Hsp90-Aktivität mit Macbecin II reproduziert werden (nicht gezeigt).

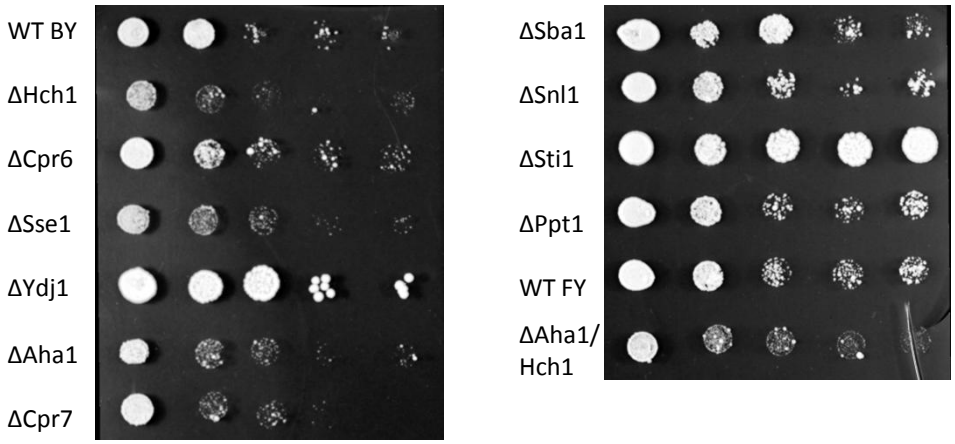

Abbildung 53 Verminderung der v-Src-Aktivität durch Hsp90-Inhibition in Cochaperone-KOs. Nach Inkubation in raffinosehaltigem Medium wurden die Hefen auf Galaktoseplatten (v-Src-Expression wird induziert) für 7 Tage in Anwesenheit von 10 µM Radicicol inkubiert. WT FY – WT-Stamm (FY1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs.

5.1.2.3 Aufhebung des Ydj1-Effekts durch verschiedene Ydj1-Konstrukte

Die N-terminale J-Domäne und eine G/F-reiche Region von Ydj1 allein reichen aus, um die ATPase-Aktivität von Hsp70 zu stimulieren (Lu & Cyr, 1998). Substratbindestellen wurden in der Zink-Fingerregion und der C-terminalen Domäne lokalisiert (Lu & Cyr, 1998; Szabo et al, 1996).

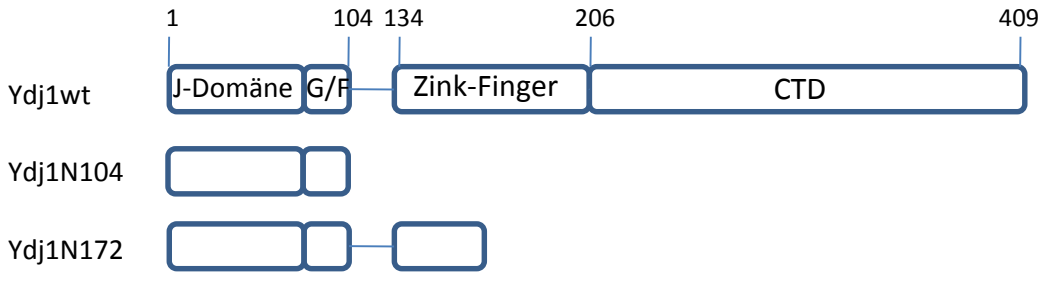

Abbildung 54 Domänenstruktur von Ydj1 und der verwendeten Fragmente. Ydj1 besteht aus einer N-terminalen J-Domäne gefolgt von einer G/F-reichen Region, welche für die Stimulierung der ATPase-Aktivität von Hsp70 verantwortlich sind. Substratbindestellen wurden sowohl in der Zink-Fingerregion, als auch in der C-terminalen Domäne (CTD) lokalisiert.

Um zu analysieren, ob der Effekt des Ydj1-KOs auf die v-Src-Aktivität nur auf die fehlende Stimulation der Hsp70- ATPase-Aktivität zurückzuführen ist, oder ob das gesamte Protein benötigt wird, wurden verschiedene Ydj1-Fragmente in ΔYdj1 exprimiert (Abbildung 54).

Dazu wurde ΔYdj1 mit Ydj1 WT oder einem von zwei N-terminalen Fragmenten transformiert (N104, N172). Ydj1 N104 besteht aus den ersten 104 Aminosäuren von Ydj1, was die J-Domäne und eine G/F-reichen Region umfasst. Außerdem wurde noch ein längeres Fragment untersucht, welches zusätzlich einen Teil der Zink-Finger-Region umfasst (Ydj N172).

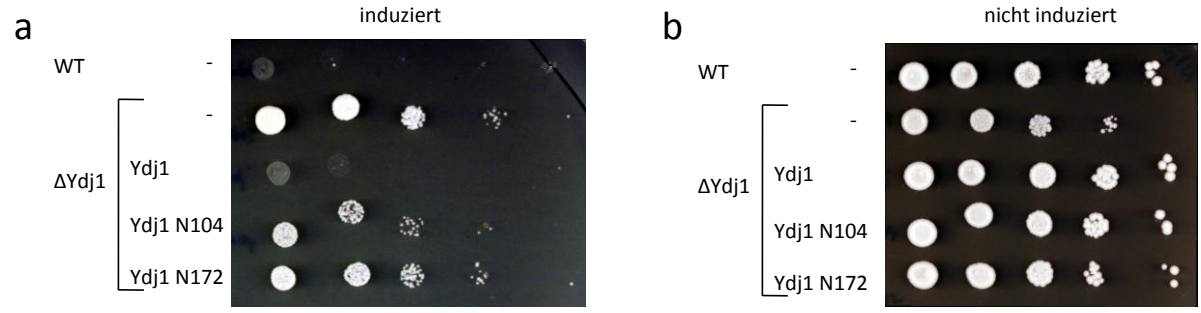

Abbildung 55 Effekt der Expression von Ydj1-Fragmenten im ΔYdj1-Stamm. Nach Inkubation in raffinosehaltigem Medium wurden WT-Hefen und ΔYdj1-Hefen, welche entweder kein Ydj1, Ydj1 WT oder N-terminale Fragmente von Ydj1 (Ydj1 N104, Ydj1 N172) exprimierten auf **a** Galaktoseplatten (v-Src-Expression wird induziert) oder **b** Glukoseplatten (v-Src-Expression wird nicht induziert) für 3 Tage inkubiert.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Expression des Volllängenproteins den Effekt von ΔYdj1 aufhebt (Abbildung 55a). Die Expression der N-terminalen Domäne allein reichte allerdings nicht aus, um v-Src zu reaktivieren. Auch das längere Kontrukt (N172) konnte dies nicht bewerkstelligen. Bei Hefen, die kein v-Src exprimierten, konnte aber jedes Konstrukt von Ydj1 den Wachstumseffekt der ΔYdj1-Hefen aufheben (Abbildung 55b). Das bedeutet, dass der Verlust der Aktivierung der ATPase-Aktivität von Hsp70 der Grund für den Wachstumsdefekt der Hefen an sich ist, jedoch nicht für die verminderte v-Src-Aktivität. Vielmehr ist das gesamte Cochaperon nötig, um v-Src vollständig zu aktivieren.

5.1.3 Charakterisierung der Chaperonabhängigkeit von Steroidhormonrezeptoren

Um weitere Hsp90-Substratproteine in die Studie mit einzubeziehen, wurde die Klasse der Steroidhormonrezeptoren untersucht. Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die durch Bindung des entsprechenden Hormons aktiviert werden und die Transkription bestimmter Gene anschalten. Daher kann auch hier, wie für p53, mit einem Reportersystem gearbeitet werden. Die Gruppe der Steroidhormonrezeptoren (SHRs) besteht aus dem Glucocorticoid- (GR), Mineralocorticoid- (MR), Progesteron- (PR) und Androgen- (AR) sowie dem Östrogenrezeptor α(ERα) und β (ERβ). In dieser Arbeit wurden alle außer dem ERβ untersucht.

5.1.3.1 Einfluss des Hsp90- und des Hsp70-Chaperonsystems auf den Glucocorticoidrezeptor

Der am besten charakterisierte Hormonrezeptor aus dieser Familie ist neben dem PR der GR. Es ist bekannt, dass der GR Heterokomplexe mit Hsp70 und Hsp90 bildet (Cintron & Toft, 2006). Auch die Interaktion mit p23, PP5, Prolylisomerasen und Hop ist bekannt (Dittmar et al, 1997). Seine Abhängigkeit vom Hsp70- und Hsp90-Chaperonsystem wurde auch schon mit Hilfe des Reportersystems in der Hefe studiert (Johnson & Craig, 2000; Kimura et al, 1995), und die Wechselwirkung mit Ydj1, Cpr6, Cpr7 und Sti1 gezeigt.

5.1.3.1.1 Einfluss des Hsp70-Chaperonsystems

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss das Hsp70-System auf die Aktivität des GRs hat. Dazu wurde das Reportersystem in Hsp70-defiziente Stämme transformiert. Zum einen wurde ein Stamm verwendet, welcher nur eins (Ssa1) der vier Hsp70-Proteine der Hefe exprimiert (ΔSsa2-4). Der zweite verwendete Stamm enthält wiederum nur Ssa1, aber als temperatursensitive Mutante (Ssa1ts). Bei Inkubation bei 37°C verliert Ssa1ts seine Aktivität und somit besitzt die Zelle kein funktionierendes Hsp70 mehr (Becker et al, 1996). Daher kann durch Vergleich der Aktivitäten bei 25°C und 37°C ein Rückschluss auf den Einfluss von Hsp70 auf die GR-Aktivität gezogen werden. Bei 25°C war der GR im ΔSsa2-4-Stamm etwa fünfmal aktiver verglichen mit dem WT (Abbildung 56).

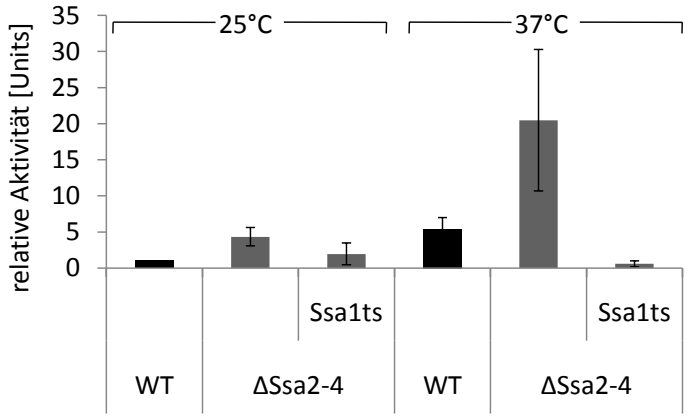

Abbildung 56 Abhängigkeit der GR-Aktivität von Hsp70. GR wurde durch Zugabe von 10 µM Desoxycorticosteron aktiviert und nach 5 h Inkubation bei 25°C oder 37°C die Aktivität gemessen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm bei 25°C normiert.

War in diesem Stamm statt Ssa1wt die temperatursensitive Mutante vorhanden, so war die Aktivität nur um das Dreifache erhöht. Inkubierte man nun diese Stämme bei 37°C so stieg die Aktivität von GR im WT-Stamm und im Stamm, der nur Ssa1 enthielt, um das Fünffache. Eine Erhöhung der GR-Aktivität bei 37°C war schon früher beobachtet worden (Nathan & Lindquist, 1995). Im Stamm, der Ssa1ts enthielt, konnte bei 37°C keinerlei GR-Aktivität beobachtet werden, was bedeutet, dass bei

Verlust der Hsp70-Aktivität auch die GR-Aktivität verloren geht. Die erhöhte Aktivität im ΔSsa2-4-Stamm kann durch eine höhere Expression des noch vorhandenen Ssa1s oder anderer Chaperone erklärt werden, welche möglicherweise das Fehlen der restlichen Ssa-Proteine kompensieren (Becker et al, 1996).

Als nächstes sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine weniger drastische Änderung des Hsp70-Systems auf den GR hat. Dazu wurde das GR-Reportersystem in Hsp70-Cochaperon-KOs transformiert und die Aktivität nach Zugabe des Hormons gemessen. Wie schon in früheren Publikationen gezeigt, konnte in ΔYdj1 eine vierfach erhöhte Aktivität des GR gemessen werden (Kimura et al, 1995) (Abbildung 57). Im Sse1-KO hingegen war die Aktivität des GRs sehr viel geringer als im WT. Auch dieser Effekt wurde schon durch andere Gruppen beobachtet (Liu et al, 1999). Der Verlust des Nukleotidaustauschfaktors Snl1 hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung des GR.

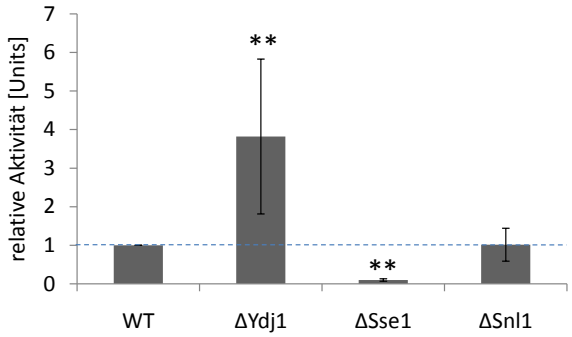

Abbildung 57 Die GR-Aktivität ist abhängig von Hsp70-Cochaperonen. GR-Aktivität nach 24 h Aktivierung mit 10 µM Desoxycorticosteron in BY4741 Cochaperon- KOs bei 30°C. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen **P < 0,01

Aus der Literatur ist bekannt, dass der GR im Ydj1-KO konstitutiv, d.h. ohne die Zugabe des Hormons, aktiv vorliegt (Kimura et al, 1995). Dieses Verhalten konnte in dieser Studie bestätigt werden (Abbildung 58). Auch ohne Zugabe des Hormons ist der GR in ΔYdj1 in der Lage als Transkriptions-faktor zu fungieren und die Transkription der ß-Galaktosidase anzuschalten. Im WT-Stamm, wie auch in ΔSse1 und ΔSnl1 wurde keine konstitutive Aktivität festgestellt.

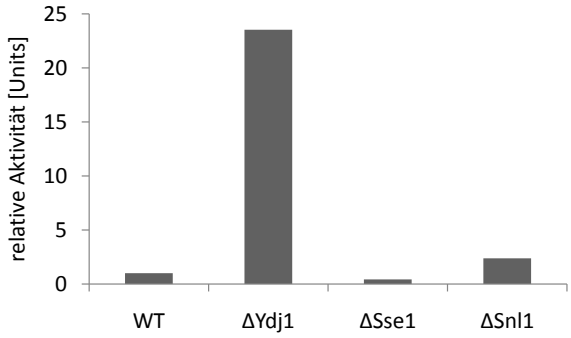

Abbildung 58 Konstitutive Aktivität von GR in Abhängigkeit von Hsp70-Cochaperonen. GR-Aktivität in BY4741 Hsp70-Cochaperon-KOs ohne Zugabe von Hormon bei 30°C. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert.

5.1.3.1.2 Einfluss des Hsp90-Chaperonsystems

Da es sich beim GR um ein Hsp90-Substratprotein handelt, konnte seine Aktivität durch Zugabe des Hsp90-Inhibitors Radicicol gehemmt werden (Abbildung 59). 20 µM Radicicol wurden benötigt um eine 90%ige Inhibierung der GR-Aktivität zu erreichen.

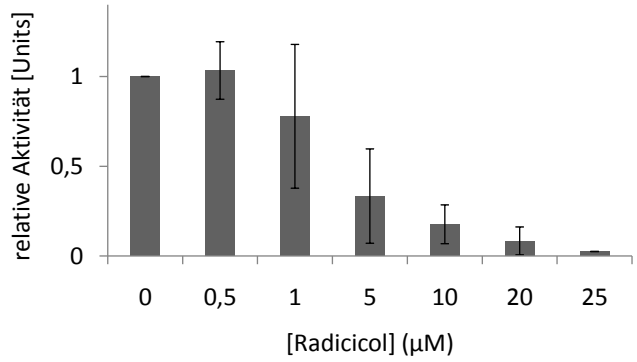

Abbildung 59 Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die GR-Aktivität. GR-Aktivität 5 h nach Aktivierung mit 10 µM Desoxycorticosteron bei 30°C und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Radicicol. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität ohne Radicicol (mit DMSO) bezogen.

Als nächstes wurde der Effekt der Cochaperon-KOs auf die GR-Aktivität untersucht. Der Verlust des Konnektorproteins Sti1 führte, übereinstimmend mit der Literatur, zu einem 70%igen Verlust der GR-Aktivität (Chang et al, 1997) (Abbildung 60). Auch der KO von Sba1, Cpr6 oder Cpr7 resultierte in einem um etwa 40 % inaktiveren GR, was ebenfalls in der Literatur bekannt ist (Duina et al, 1996). War die Proteinphosphatase Ppt1 nicht mehr in der Zelle vorhanden, so fand man einen um 30 % aktiveren GR vor. ΔAha1, ΔHch1 und der Doppel-Knock-out ΔAha1/Hch1 hatten keinen Einfluss auf die GR-Aktivität.

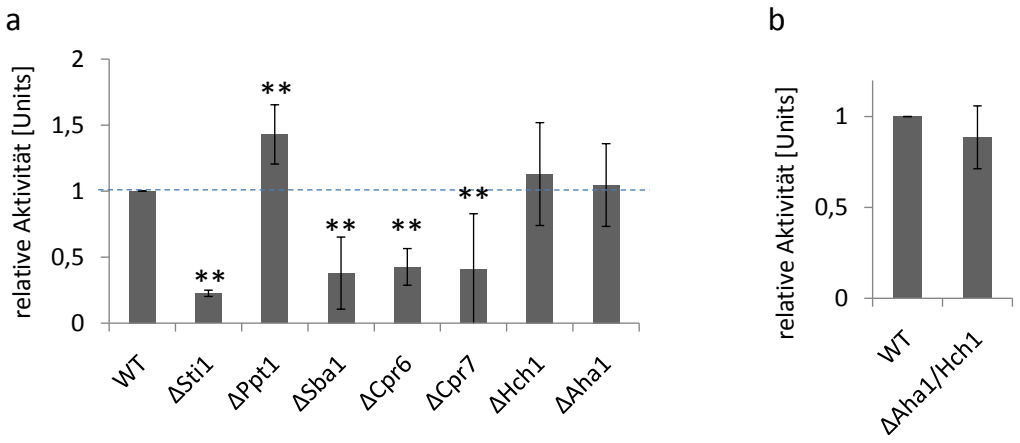

Abbildung 60 Die Aktivität von GR ist abhängig von Hsp90-Cochaperonen. a GR-Aktivität nach 24 h Induktion mit 10 µM Desoxycorticosteron in BY4741 Cochaperon- KOs bei 30°C. **b** GR-Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-KO (FY 1679-28C). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen. **P < 0,01

Das bedeutet, dass die Aktivität des GRs von vielen Cochaperonen moduliert wird und dass der Effekt des KOs positiv, als auch negativ sein kann.

In keinem der KOs war der GR konstitutiv, ohne die Anwesenheit von Hormon, aktiv (Abbildung 61).

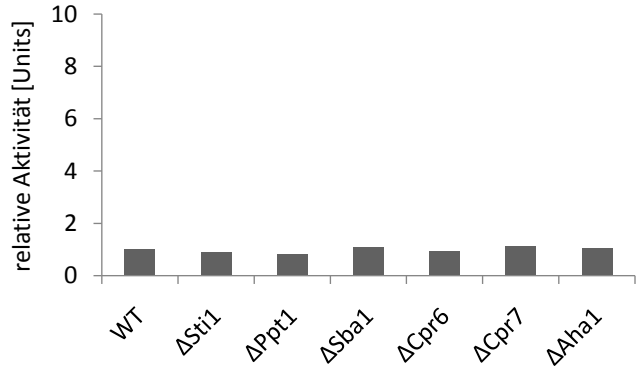

Abbildung 61 Konstitutive Aktivität von GR in Abhängigkeit von Hsp90-Cochaperonen. GR-Aktivität in BY4741 Hsp90-Cochaperon-KOs ohne Zugabe von Hormon bei 30°C.

5.1.3.1.3 Hsp70- und Hsp90-Cochaperone beeinflussen die GR-Menge in der Zelle

Um zu bestimmen, ob die Aktivitätsunterschiede von GR in den KOs auf ein verändertes GR-Level zurückzuführen ist, wurde Lysat nach 20 h Expression in den KOs hergestellt. Leider war es nicht möglich, den GR in nativ hergestelltem Lysat zu detektieren. Daher wurden die Zellen in denaturierendem Puffer aufgeschlossen, um eine Degradation des GRs zu verhindern. Die Menge an GR in den KOs korrelierte zum Teil mit der gemessenen Aktivität (Abbildung 62). So war die erhöhte Aktivität in ΔYdj1 auf ein erhöhtes Proteinlevel zurückzuführen. In ΔSse1 und ΔSba1 war kein GR zu detektieren, was sich auch in den erniedrigten Aktivitäten wiederspiegelte. Die erniedrigte GR-Aktivität in ΔSti1, ΔCpr6 und ΔCpr7 konnte jedoch nicht auf ein reduziertes Level in dem jeweiligen KO zurückgeführt

werden. Dafür war im Aha1/Hch1-Doppel-KO weniger GR zu detektieren als im WT, was sich jedoch nicht auf die Aktivität auswirkte. Das bedeutet, dass die Cochaperon-KOs zum einen die Aktivität und zum anderen das Level des GRs beeinflussen können und diese zum Teil korrelieren. Leider konnte hier nicht zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion unterschieden werden, sodass keine Aussage über das Aggregationsverhalten in Abwesenheit bestimmter Cochaperone zu treffen ist.

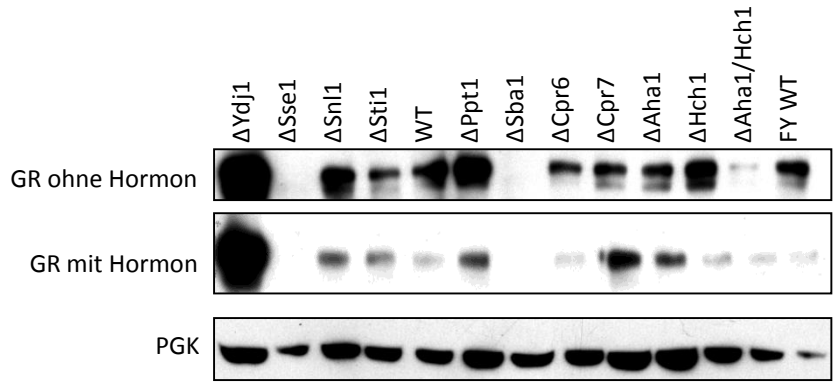

Abbildung 62 GR-Level in Cochaperon-KOs. Der GR wurde entweder ohne Hormon oder mit 10 µM Desoxycorticosteron für 20 h bei 30°C inkubiert und Lysat unter denaturierenden Bedingungen hergestellt. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalem Anti-GR Antikörper. Gleiche Auftragsmengen wurde durch Detektion der PGK überprüft. WT FY – WT-Stamm (FY 1679-28C) zu ΔAha1/Hch1, WT BY – WT-Stamm (BY4741) zu allen anderen KOs. Als Ladekontrolle wurde die Menge an PGK detektiert.

5.1.3.1.4 Aufhebung des Ydj1-Effekts durch verschiedene Ydj1-Konstrukte

Wie schon für v-Src untersucht, sollte auch hier getestet werden, ob die J-Domäne von Ydj1 allein ausreicht, um den Effekt des KOs rückgängig zu machen. Dazu wurde ΔYdj1 mit entweder Ydj1 WT oder zwei N-terminal verkürzten Fragmenten transformiert (siehe Kapitel 5.1.2.3).

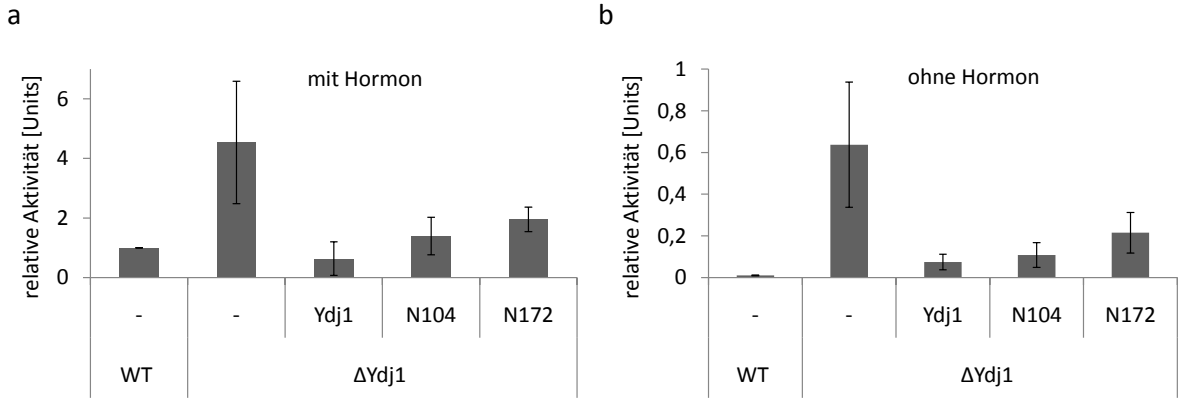

Abbildung 63 Effekt von Ydj1-Fragmenten auf die GR-Aktivität. a GR-Aktivität nach 24 h Induktion mit 10 µM Desoxycorticosteron in BY4741 WT und ΔYdj1 bei 30°C, welche entweder kein Ydj1, Ydj1 WT oder N-terminale Fragmente von Ydj1 (Ydj1 N104, Ydj1 N172) exprimierten. **b** GR-Aktivität ohne Aktivierung mit Hormon. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert.

Die Expression des Volllängen-Ydj1s konnte die erhöhte Aktivität des GR mit und ohne Hormon in ΔYdj1 aufheben (Abbildung 63). Auch die zwei N-terminalen Fragmente waren in der Lage zum Teil

den Effekt des Ydj1-Verlusts rückgängig zu machen. Das bedeutet, dass im Falle vom GR, anders als bei v-Src, die Aktivierung der Hsp70-ATPase-Aktivität durch die J-Domäne ausreicht, die GR-Aktivität zu beeinflussen.

5.1.3.2 Einfluss des Hsp90- und des Hsp70-Chaperonsystems auf den Mineralocorticoidrezeptor

Über die Abhängigkeit des Mineralocorticoidrezeptors (MR) von Hsp90 und Hsp70 ist längst nicht so viel bekannt wie für den GR. Die Interaktion der Prolylisomerase FKBP52 mit MR wurde beschrieben (Gallo et al, 2007). Daher soll hier die Abhängigkeit der MR-Aktivität mit Hilfe des Hefe-Reporter-assays näher beschrieben werden.

5.1.3.2.1 Einfluss des Hsp70-Chaperonsystems

Zunächst sollte bestimmt werden, welchen Einfluss Hsp70 auf die MR-Aktivität nimmt. Daher wurde das Reportersystem in Hsp70-defiziente Stämme transformiert (siehe 5.1.3.1.1). Die Aktivität von MR bei 25°C war in dem Stamm, der nur Ssa1 enthielt, zehnfach höher als im entsprechenden WT-Stamm (Abbildung 64). Das könnte, wie auch schon für p53 und GR diskutiert, auf eine erhöhte Expression von Ssa1 oder anderen Chaperonen in diesem Stamm zurückzuführen sein. Exprimiert die Hefe anstelle von Ssa1wt eine temperatursensitive Mutante (Ssa1ts), die sich bei 25°C wie Ssa1wt verhalten sollte, so beobachtet man diesen starken Anstieg in der Aktivität nicht. Offensichtlich besitzt Ssa1-ts bei 25°C nicht die gleiche Aktivität wie Ssa1wt. Inkubierte man nun die Zellen bei 37°C, so erhöhte sich die MR-Aktivität um 50% im WT-Stamm. Im ΔSsa2-4-Stamm erhöhte sich die Aktivität nicht weiter verglichen mit 25°C. Im Stamm, in dem Ssa1ts exprimiert wurde, welches nun bei 37°C seine Aktivität verlor, war keinerlei MR-Aktivität mehr zu beobachten. Das zeigt deutlich, dass die MR-Aktivität sehr stark von funktionellem Hsp70 abhängig ist.

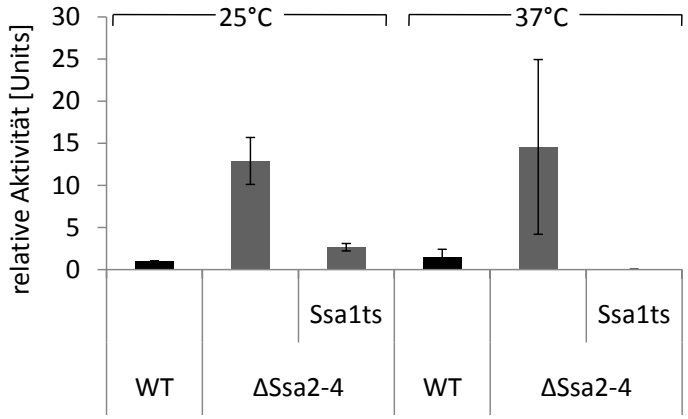

Abbildung 64 Abhängigkeit der MR-Aktivität von Hsp70. MR wurde durch Zugabe von 10 µM Aldosteron aktiviert und nach 5 h Inkubation bei 25°C oder 37°C die Aktivität gemessen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm bei 25°C normiert.

Um zu beantworten, ob der MR auch von dem Verlust der Hsp70-Cochaperone betroffen ist, wurde das Reportersystem in die entsprechenden KOs transformiert. Der Verlust von Sse1 führte zu einer Verringerung der MR-Aktivität von rund 50 % (Abbildung 65). Der Knock-out von Ydj1 hingegen führte zu einem 3,5fach aktiveren MR. Snl1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die MR-Aktivität.

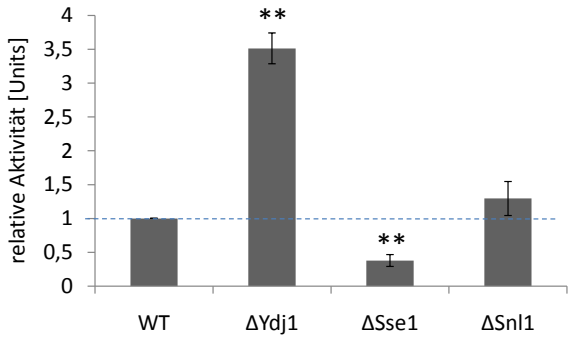

Abbildung 65 Abhängigkeit der MR-Aktivität von Hsp70-Cochaperonen. MR-Aktivität nach 24 h Aktivierung mit 10 µM Aldosteron in BY4741 Cochaperon-KOs bei 30°C. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen **P < 0,01

Beim GR führte der Ydj1-KO zu einem auch ohne Hormon konstitutiv aktiven Rezeptor. Beim MR war das nicht der Fall, denn ohne die Zugabe von Hormon konnte keine Aktivität gemessen werden (Abbildung 66). Das zeigt, dass die Wirkungsweise von Ydj1 auf die zwei getesteten Rezeptoren unterschiedlich ist. Bei beiden führt der KO zu einer höheren Aktivität in Anwesenheit des Hormons. Jedoch war nur der GR in Abwesenheit von Ydj1 auch ohne Hormon aktiv, wohingegen der MR sein Hormon brauchte um aktiv zu sein.

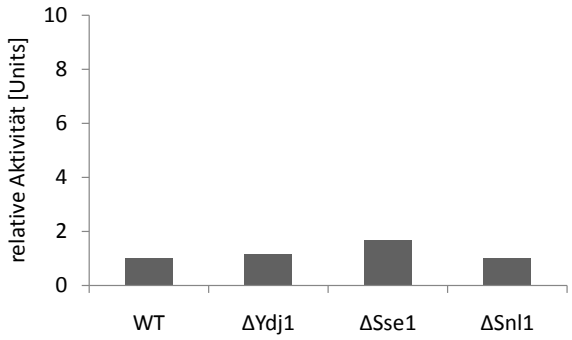

Abbildung 66 Konstitutive Aktivität von MR in Abhängigkeit von Hsp70-Cochaperonen. MR-Aktivität in BY4741 Hsp70-Cochaperon-KOs und konstitutiver Expression ohne Zugabe von Hormon bei 30°C.

5.1.3.2.2 Einfluss des Hsp90-Chaperonsystems

Zunächst wurde der generelle Einfluss von Hsp90 auf den MR untersucht. Dazu wurde die Hsp90-Aktivität durch Zugabe von Radicicol inhibiert. Die MR-Aktivität reagierte sensitiver auf die Hsp90-

Inhibierung als der GR, da nur 5 statt 20 µM Radicicol benötigt wurden, um eine 95%ige Hemmung zu erreichen (Abbildung 67).

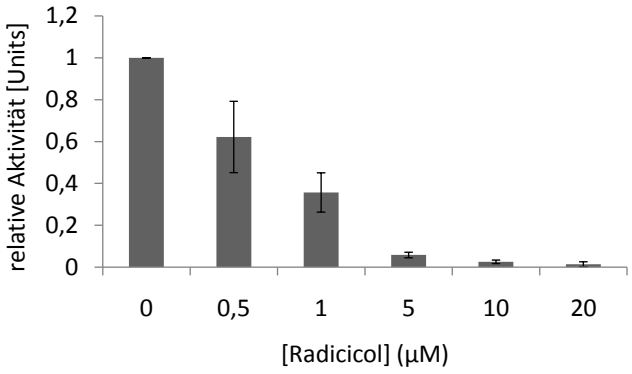

Abbildung 67 Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die MR-Aktivität. MR-Aktivität 5 h nach Aktivierung mit 10 µM Aldosteron und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Radicicol. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität ohne Radicicol (mit DMSO) bezogen.

Um die Abhängigkeit vom Hsp90-Chaperonsystem näher zu beschreiben, wurde das MR-Reporter-system in Hsp90-Cochaperon-KOs transformiert. Der Verlust des Konnektorproteins Sti1 führte zu einer 30%igen Steigerung der Aktivität (Abbildung 68a). In ΔCpr6 und in ΔAha1 war die Aktivität um 75% erhöht. Seltsamerweise war die Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-KO aber um 75% reduziert (Abbildung 68b). Da diese beiden KOs unterschiedliche Stammhintergründe besitzen, ist nicht auszuschließen, dass das der Grund für diese Effekte ist. Um zu überprüfen, ob der KO beider Homologen zu einem gegensätzlichen Ergebnis führt als der KO von nur einem der beiden Cochaperone, müsste man im gleichen Stammhintergrund die Aktivität messen.

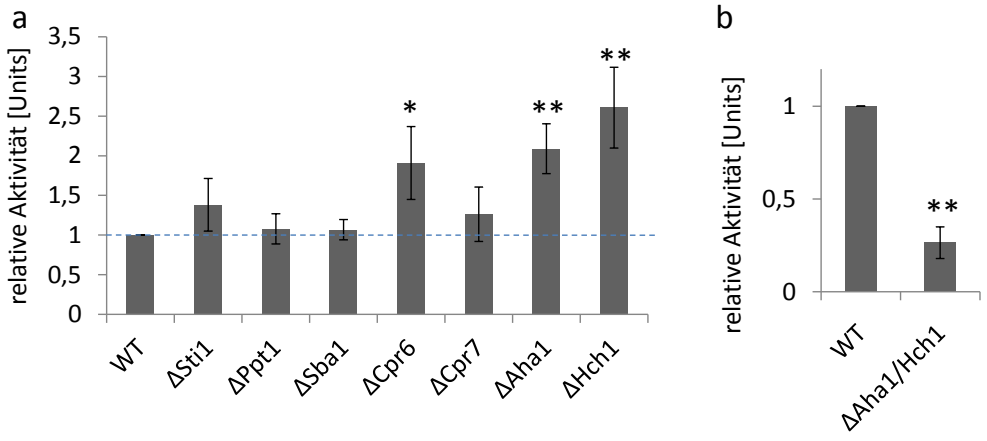

Abbildung 68 Abhängigkeit der MR-Aktivität von Hsp90-Cochaperonen. a MR-Aktivität nach 24 h Induktion mit 10 µM Aldosteron in BY4741 Cochaperon- KOs bei 30°C. **b** MR-Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-KO (FY 1679-28C). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

Der KO der Hsp90-Cochaperone hatte keinen Einfluss auf die Aktivität ohne Hormon. Das Hormon war immer nötig, um eine Aktivierung des MRs zu erreichen (Daten nicht gezeigt).

5.1.3.3 Einfluss des Hsp90- und des Hsp70-Chaperonsystems auf den Androgenrezeptor

Über die Interaktion des Androgenrezeptors (AR) mit dem Hsp90-/Hsp70-Systems ist bereits bekannt, dass p23, Ydj1 und Sse1 einen Einfluss auf die AR-Aktivität besitzen (Fan et al, 2005a; Fang et al, 1998; Goeckeler et al, 2002).

5.1.3.3.1 Einfluss des Hsp70-Chaperonsystems

Um den Einfluss von Hsp70 auf den AR zu untersuchen, wurde, wie schon für GR und MR, das Reportersystem in Hsp70-defiziente Stämme transformiert (siehe 5.1.3.1.1). Das Vorhandensein von nur einem Hsp70, und zwar Ssa1, führte bei 25°C Inkubationstemperatur zu einem 6fach aktiveren AR, was vermutlich an der höheren Expression von Ssa1 oder anderen Chaperonen lag (Abbildung 69). Die gleiche Tendenz wurde auch schon für GR und MR beobachtet, obwohl es Unterschiede in der Stärke dieses Effekts und beim Einfluss von Ssa1ts gibt. Aber auch für den AR gilt, dass die Inkubation bei 37°C, bei der Ssa1ts nicht mehr aktiv vorliegt, keinerlei Aktivität besitzt. Das bedeutet, dass auch die Aktivität des AR stark von Hsp70 abhängig ist.

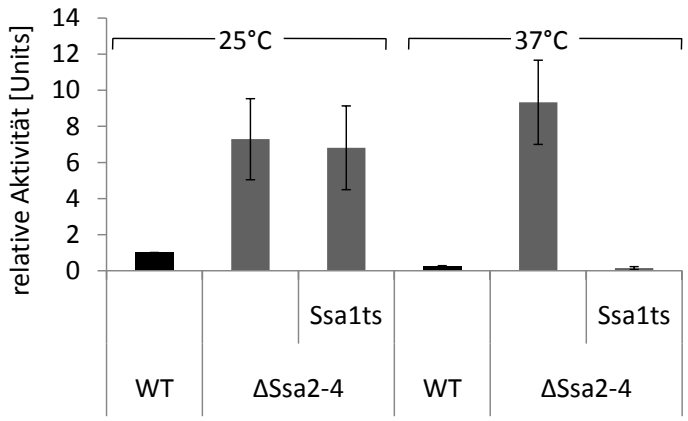

Abbildung 69 Abhängigkeit der AR-Aktivität von Hsp70. AR wurde durch Zugabe von 10 µM Testosteron aktiviert und nach 5 h Inkubation bei 25°C oder 37°C die Aktivität gemessen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm bei 25°C normiert.

Um auch den Einfluss von Ydj1, Sse1 und Snl1 zu analysieren, wurde das Reportersystem in diese KOs transformiert. Der AR verhält sich völlig gegensätzlich zu GR und MR. Der Knock-out von Ydj1 führte hier nicht zu einer Aktivierung, sondern zu einem Verlust der AR-Aktivität von 80 % (Abbildung 70), was auch schon in einer früheren Studie gezeigt wurde (Fan et al, 2005a). Ein weiterer Unterschied zu GR und MR ist, dass der Sse1-KO keinen Einfluss auf die AR-Aktivität zeigte. Auch in ΔSnl1 verhielt sich der AR anders als GR und MR, da hier eine Zunahme der Aktivität um 25 % zu beobachten war.

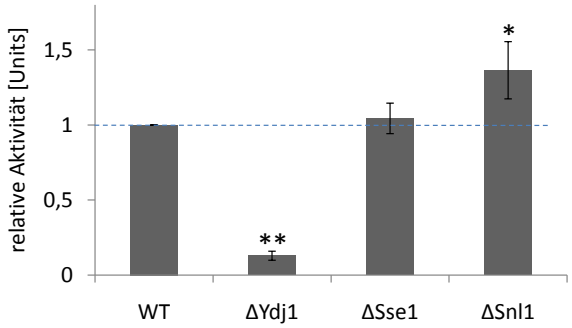

Abbildung 70 Abhängigkeit der AR-Aktivität von Hsp70-Cochaperonen. AR-Aktivität nach 24 h Aktivierung mit 10 µM Testosteron in BY4741 Cochaperon- KOs bei 30°C.Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen * P < 0,05 **P < 0,01

5.1.3.3.2 Einfluss des Hsp90-Chaperonsystems

Der direkte Einfluss von Hsp90 kann durch dessen Inhibition getestet werden. Dazu wurde der Hsp90-Inhibitor Radicicol zugegeben, der AR durch Testosteron aktiviert und für 5 h inkubiert. Die Inhibierung von Hsp90 hatte keinen so großen Effekt wie auf den MR oder GR, da bei 20 µM Radicicol noch 60 % Aktivität verblieben (Abbildung 71).

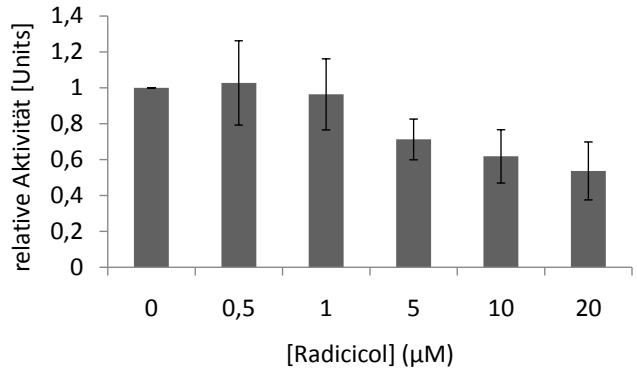

Abbildung 71 Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die AR-Aktivität. AR-Aktivität 5 h nach Aktivierung mit 10 µM Testosteron und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Radicicol. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität ohne Radicicol (mit DMSO) bezogen.

Auch zeigte sich, dass die Abhängigkeit von den Hsp90-Cochaperonen nicht so stark wie die von GR oder MR war. Nur der Hch1-KO zeigte einen Effekt auf die AR-Aktivität. Hier lag der AR um 80 % inaktiver vor (Abbildung 72a).

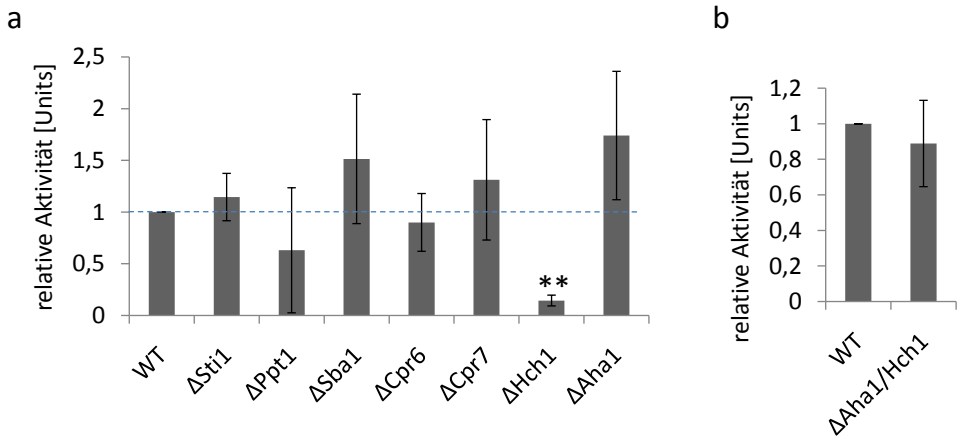

Abbildung 72 Abhängigkeit der AR-Aktivität von Hsp90-Cochaperonen. a AR-Aktivität nach 24 h Induktion mit 10 µM Testosteron in BY4741 Cochaperon-KOs bei 30°C. **b** AR-Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-KO (FY 1679-28C). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen. **P < 0,01.

Wie schon beim MR, gab es auch hier wieder eine Diskrepanz zwischen den zwei verschiedenen Hefestämmen. Beobachtet man im Hch1-KO nur noch 20% der Aktivität, so ist zu erwarten, dass im Aha1/Hch1-Doppel-KO dieser Effekt auch auftritt, wenn nicht sogar noch verstärkt. Das war allerdings nicht der Fall, es wurde kein Einfluss des Fehlens von Aha1 und Hch1 beobachtet (Abbildung 72b). Um wirklich eine Aussage treffen zu können, muss man den Doppel-KO im BY4741-Stamm herstellen und die Aktivität des ARs in diesem Stamm messen, da Varianzen zwischen verschiedenen Stämmen nicht auszuschließen sind.

5.1.3.3.3 Aufhebung des Ydj1-Effekts mit verschiedenen Ydj1-Konstrukten

Um zu beantworten, ob die J-Domäne von Ydj1 ausreicht, um eine Aktivierung des ARs zu erreichen, wurden verschiedene Ydj1-Fragmente in ΔYdj1 transformiert. Wie zuvor beschrieben (5.1.3.1.4) reicht das N-terminale Fragment N104 aus, um die Hsp70-ATPase-Aktivität zu stimulieren. Die Aktivität der J-Domäne ist aber nicht genug, um den AR zu aktivieren (Abbildung 73). Im Gegensatz zum GR, bei dem die J-Domäne ausreichte, um die optimale Aktivität wiederherzustellen, ist für die Reifung des AR das vollständige Protein nötig.

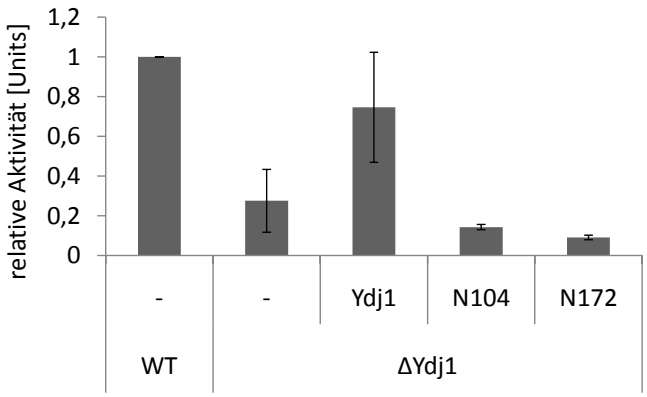

Abbildung 73 Effekt von Ydj1-Fragmenten auf die AR-Aktivität. AR-Aktivität nach 24 h Induktion mit 10 µM Testosteron in BY4741 bei 30°C in ΔYdj1, welche entweder kein Ydj1, Ydj1 WT oder N-terminale Fragmente von Ydj1 (Ydj1 N104, Ydj1 N172) exprimierten. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert.

5.1.3.4 Einfluss des Hsp90- und des Hsp70-Chaperonsystems auf den Estrogenrezeptor

Der Estrogenrezeptor (ER) wurde im Komplex mit Hsp90, p23 und PPIasen wie Cyp40 und FKBP52 gefunden (Smith & Toft, 2008) und es wird vermutet, dass Hsp90 den ER in einem aktivierbaren Zustand hält, bis Hormon bindet. Um die Chaperonabhängigkeit näher zu beschreiben und mit den bereits untersuchten SHRs zu vergleichen, wurde auch der ER in diese Studie mit einbezogen.

5.1.3.4.1 Einfluss des Hsp70-Chaperonsystems

Um den Einfluss von Hsp70 auf die ER-Aktivität zu bestimmen, wurde das Reportersystem in Hsp70-defiziente Stämme transformiert (siehe 5.1.3.1.1).

Anders als GR, MR und AR zeigte ER keine höhere Aktivität in ΔSsa2-4, weder mit Ssa1wt noch mit Ssa1ts (Abbildung 74a). Auch das Verhalten bei 37°C unterschied sich von GR, MR und AR, welche entweder genauso aktiv oder aktiver waren als bei 25°C. Der ER hingegen zeigte bei 37°C nur 1 % seiner Aktivität bei 25°C im WT-Stamm und in ΔSsa2-4. Die verbliebene Aktivität nahm noch zusätzlich ab, wenn nur Ssa1ts exprimiert wurde (Abbildung 74b). Das zeigt, dass auch die verbliebene Aktivität bei 37°C abhängig von funktionellem Hsp70 ist, also auch der ER Hsp70 braucht, um aktiv zu sein.

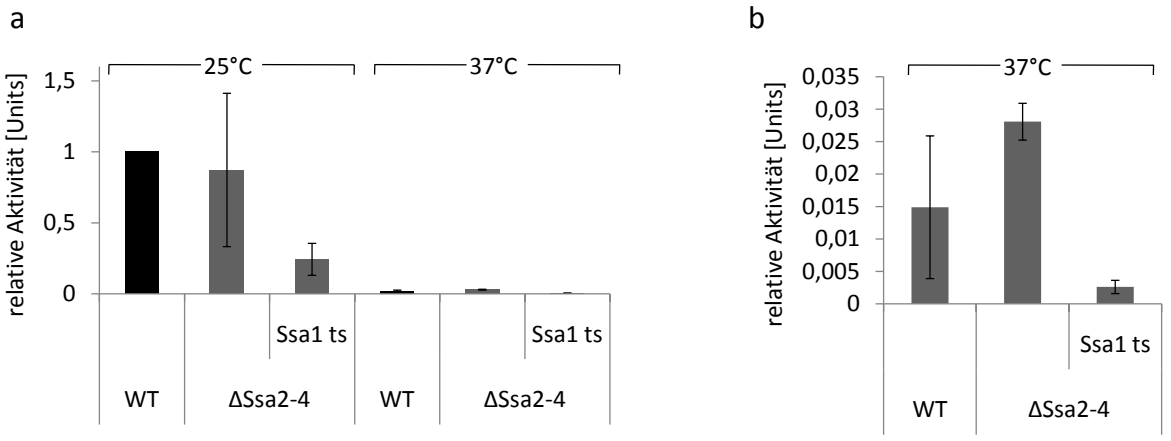

Abbildung 74 Abhängigkeit der ER-Aktivität von Hsp70. ER wurde durch Zugabe von 10 µM Estradiol aktiviert und nach 5 h Inkubation bei 25°C oder 37°C die Aktivität gemessen. **a** ER-Aktivität bei 25°C und 37°C **b** Zur besseren Anschaulichkeit wurde die ER-Aktivität bei 37°C allein dargestellt. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm bei 25°C normiert.

Um nicht nur den direkten Einfluss von Hsp70 auf die ER-Aktivität zu studieren, sondern auch kleinere Änderungen im Hsp70-System in Betracht zu ziehen, wurde das Reportersystem in ΔYdj1, ΔSse1 und ΔSnl1 transformiert. Wie schon bei GR, MR und AR zeigte auch hier der Ydj1-KO einen Effekt. ER zeigte, ähnlich wie der AR, eine um 50 % verminderte Aktivität in ΔYdj1 (Abbildung 75), in Übereinstimmung mit einer früheren Publikation (Kimura et al, 1995). Auch der Verlust von Sse1 hatte einen negativen Effekt auf die ER-Aktivität, da nur noch 60 % der WT-Aktivität vorhanden waren. Snl1 zeigte keinen Einfluss auf den ER.

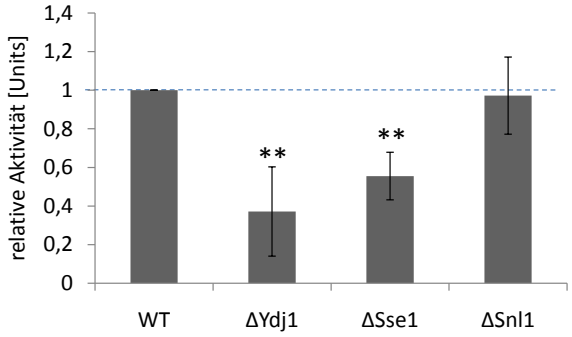

Abbildung 75 Abhängigkeit der ER-Aktivität von Hsp70-Cochaperonen. ER-Aktivität nach 24 h Aktivierung mit 10 µM Estradiol in BY4741 Cochaperon- KOs bei 30°C. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen **P < 0,01

Obwohl der ER in ΔYdj1 nur 50 % Aktivität aufwies, stellte sich heraus, dass er ohne die Zugabe des Hormons konstitutiv aktiv vorlag (Abbildung 76). Ohne Estradiol konnte eine ca. 20fach erhöhte Aktivität im Vergleich zum WT festgestellt werden. Im gleichen Bereich lag auch die Erhöhung der GR-Aktivität in ΔYdj1 ohne Hormon.

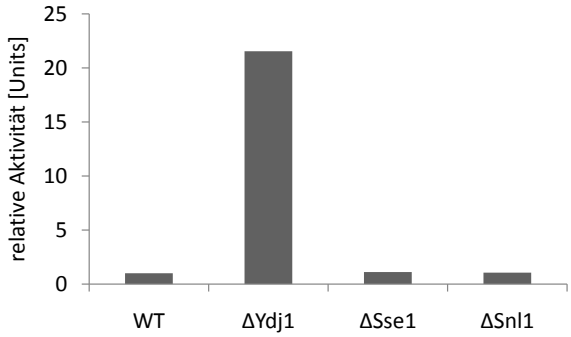

Abbildung 76 Konstitutive Aktivität von ER in Abhängigkeit von Hsp70-Cochaperonen. ER-Aktivität in BY4741 Hsp70-Cochaperon-KOs ohne Zugabe von Hormon bei 30°C. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert.

5.1.3.4.2 Einfluss des Hsp90-Chaperonsystems

Nach der Charakterisierung des Einflusses des Hsp70-Chaperonsystems auf die Aktivität des ER, wurde das Hsp90-System untersucht.

Der ER war nicht so sensitiv für die Inhibierung der Hsp90-Aktivität mit Radicicol wie der GR und der MR, sondern war eher vergleichbar mit AR (Abbildung 77). 20 µM Radicicol führten zu einer Verringerung der ER-Aktivität um 40 %.

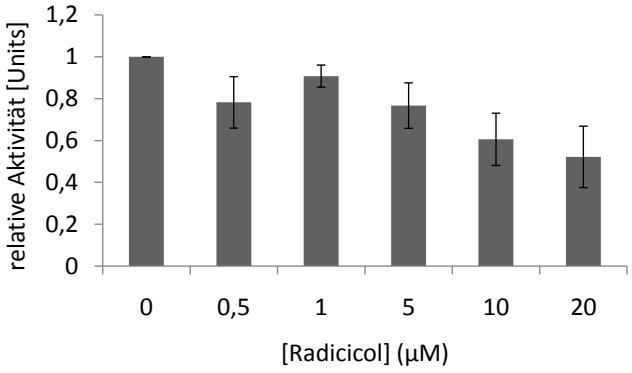

Abbildung 77 Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die ER-Aktivität. ER-Aktivität 5 h nach Aktivierung mit 10 µM Estradiol und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Radicicol. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität ohne Radicicol (mit DMSO) bezogen.

Die Analyse der ER-Aktivität in Hsp90-Cochaperon-KOs ergab, dass der Verlust von Aha1 zu einer signifikanten Erhöhung der ER-Aktivität führte (Abbildung 78).

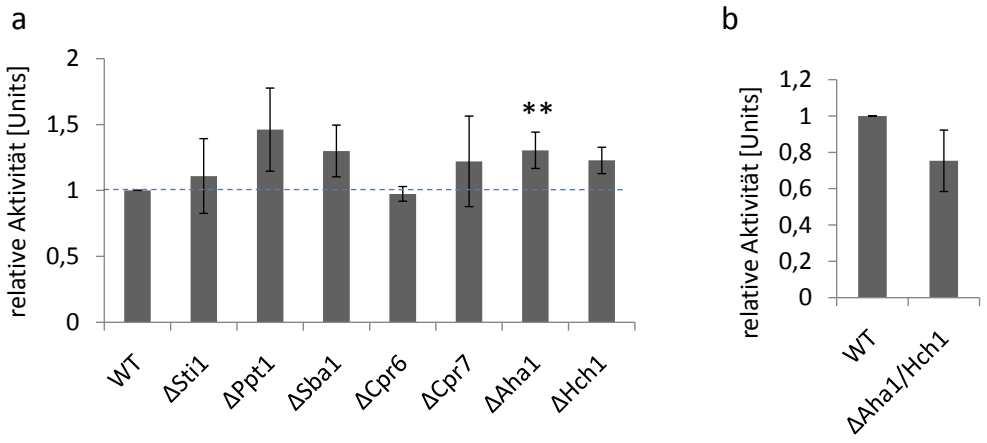

Abbildung 78 Abhängigkeit der ER-Aktivität von Hsp90-Cochaperonen. a ER-Aktivität nach 24 h Induktion mit 10 µM Estradiol in BY4741 Cochaperon-KOs bei 30°C. **b** ER-Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-KO (FY 1679-28C). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen. **P < 0,01.

Auch der KO des Homologen Hch1 führte zu einer leichten Erhöhung der Aktivität (Abbildung 78), was aber durch weitere Experimente auf Signifikanz geprüft werden muss. Der Doppel-KO hingegen zeigte eine Erniedrigung der Aktivität. Diese Diskrepanz kann an den unterschiedlichen Stammhintergründen liegen, oder aber das Fehlen beider Cochaperone führt zu einer Verminderung der Aktivität, wohingegen das Fehlen nur eines der beiden Cochaperone zu einer Erhöhung führt. Das muss über die Aktivität entweder in einem BY4741-Doppel-KO oder in einem Einzel-KO des FY 1679-28C-Stammhintergrunds bestätigt werden. Die anderen KOs zeigten keinen Einfluss auf die Aktivität des ERs.

5.1.3.4.3 Aufhebung des Ydj1-Effekts mit verschiedenen Ydj1-Konstrukten

Da der ER auch im Ydj1-KO ohne Hormon aktiv war, wurde getestet, ob dieser Effekt mit den schon beschriebenen Ydj1-Konstrukten rückgängig zu machen war. Dazu wurde ΔYdj1 mit Ydj1 WT und den N-terminalen Fragmenten N104 und N172 transformiert. N104 reicht aus, um die ATPase-Aktivität von Hsp70 zu stimulieren. Ob dieses Fragment auch ausreicht, um die konstitutive Aktivität ohne Hormon und die geringere Aktivität in Anwesenheit von Hormon rückgängig zu machen, wurde im folgenden Experiment untersucht. Zum einen wurde die ER-Aktivität in Anwesenheit von Estradiol gemessen (Abbildung 79a). Hier kann nur Ydj1 WT den Effekt der geringeren Aktivität rückgängig machen. Die zwei N-terminalen Konstrukte waren nicht in der Lage den Effekt von ΔYdj1 aufzuheben. In Abwesenheit des Hormons konnte die erhöhte Aktivität des ERs durch Expression von Ydj1 WT rückgängig gemacht werden. Die Expression von Ydj1 N104 konnte die Aktivität des ERs teilweise reprimieren, wohingegen Ydj1 N172 keinerlei Effekt zeigte.

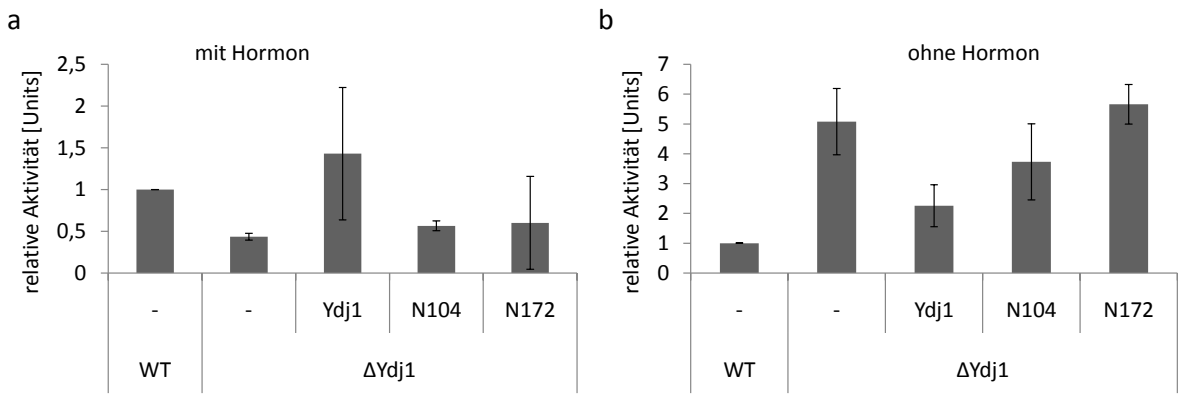

Abbildung 79 Effekt von Ydj1-Fragmenten auf die ER-Aktivität. a ER-Aktivität nach 24 h Induktion mit 10 µM Estradiol in BY4741 WT und ΔYdj1 bei 30°C, welche entweder kein Ydj1, Ydj1 WT oder N-terminale Fragmente von Ydj1 (Ydj1 N104, Ydj1 N172) exprimierten. **b** ER-Aktivität ohne Aktivierung mit Hormon. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert.

5.1.3.5 Einfluss des Hsp90- und des Hsp70-Chaperonsystems auf den Progesteronrezeptor

In Retikulozytenlysat aus Kaninchen assembliert der Progesteronrezeptor (PR) mit Hsp90, Hsp70, den PPIasen FKBP52, FKBP54 und Cyp-40, sowie p23. Um die Abhängigkeit des PRs von Hsp70 und Hsp90 mit den schon hier charakterisierten SHRs vergleichen zu können, wurde auch dieser mit Hilfe eines Reportersystems in der Hefe untersucht.

5.1.3.5.1 Einfluss des Hsp70-Chaperonsystems

Um den Einfluss von Hsp70 direkt zu bestimmen, wurde die PR-Aktivität, wie schon zuvor für die anderen SHRs gezeigt, in Hsp70-defizienten Stämmen gemessen (siehe 5.1.3.1.1). Wie bei GR, MR und AR, stieg auch die PR-Aktivität in den Stämmen, die kein Ssa2-4 mehr exprimierten, sondern entweder Ssa1wt oder die temperatursensitive Mutante Ssa1ts (Abbildung 80). Wie schon zuvor erwähnt, könnte das auf die vermehrte Expression/Aktivität des verbleibenden Ssa1s oder anderer Chaperone zurückzuführen sein, um den Verlust von Ssa2-4 zu kompensieren. Die Expression bei 37°C führte im WT-Stamm zu einer sehr stark reduzierten Aktivität und auch im ΔSsa2-4-Stamm war die erhöhte Aktivität nicht mehr so stark ausgeprägt, aber trotzdem noch höher als im WT-Stamm. Ist statt Ssa1wt die temperatursensitive Mutante vorhanden, so sind nur noch 3 % Restaktivität vorhanden. Die Abhängigkeit des PRs von Hsp70 ist hier nicht exakt auswertbar, da der PR bei 37°C im WT-Stamm schon keine Aktivität mehr zeigt. Aber da der PR in diesem Stamm bei 25°C aktiv ist, und bei 37°C nur 3 % dieser Aktivität zeigt, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass der PR von Hsp70 abhängig ist.

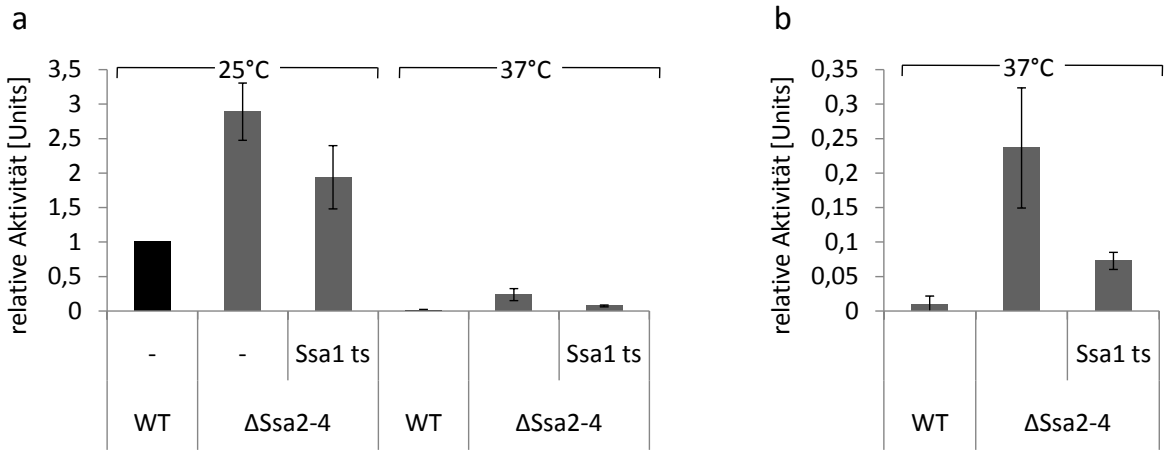

Abbildung 80 Abhängigkeit der PR-Aktivität von Hsp70. PR wurde durch Zugabe von 10 µM Progesteron aktiviert und nach 5 h Inkubation bei 25°C oder 37°C die Aktivität gemessen. **a** PR-Aktivität bei 25°C und 37°C **b** Zur besseren Anschaulichkeit wurde die PR-Aktivität bei 37°C allein dargestellt. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm bei 25°C normiert.

Auch für den PR wurde der Einfluss von Ydj1, Sse1 und Snl1 bestimmt, indem die Aktivität in den entsprechenden KOs gemessen wurde. Der Verlust von Ydj1 führt wie beim ER und AR zu einem weniger aktiven Rezeptor. Auch der Sse1-KO hat einen negativen Effekt auf die Aktivität des PRs, da nur noch 30 % der Aktivität vorhanden waren. Der KO von Snl1 hatte keinen Einfluss auf die Rezeptoraktivität.

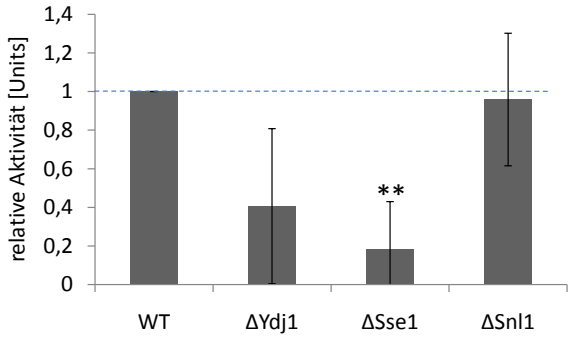

Abbildung 81 Abhängigkeit der PR-Aktivität von Hsp70-Cochaperonen. PR-Aktivität nach 24 h Aktivierung mit 10 µM Progesteron in BY4741 Cochaperon-KOs bei 30°C. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen **P < 0,01

5.1.3.5.2 Einfluss des Hsp90-Chaperonsystems

Durch Inhibition der Hsp90-Aktivität mit Radicicol konnte der direkte Einfluss von Hsp90 auf die PR-Aktivität bestimmt werden. PR reagierte nicht so sensitiv wie GR und MR aber sensitiver als ER und AR auf die Hsp90-Inhibition, da 20 µM Radicicol zu einer verbleibenden Aktivität von 30 % führten (Abbildung 82).

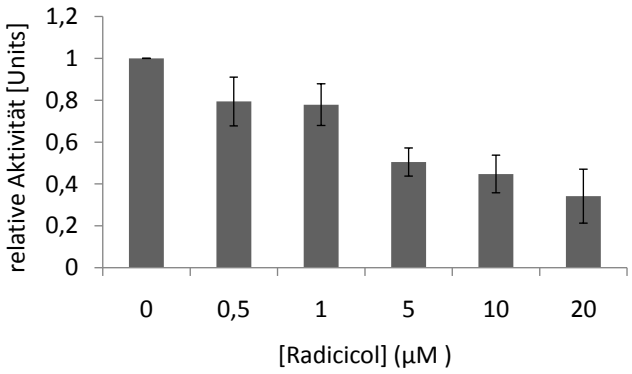

Abbildung 82 Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die PR-Aktivität. PR-Aktivität 5 h nach Aktivierung mit 10 µM Progesteron und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Radicicol. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität ohne Radicicol (mit DMSO) bezogen.

Die Aktivitätsanalyse in Hsp90-Cochaperon-KOs ergab, dass nur der Aha1/Hch1-Doppel-KO einen signifikanten Einfluss auf die PR-Aktivität hatte (Abbildung 83). Alle anderen KOs beeinflussten nicht oder nur schwach die PR-Aktivität unter den getesteten Bedingungen.

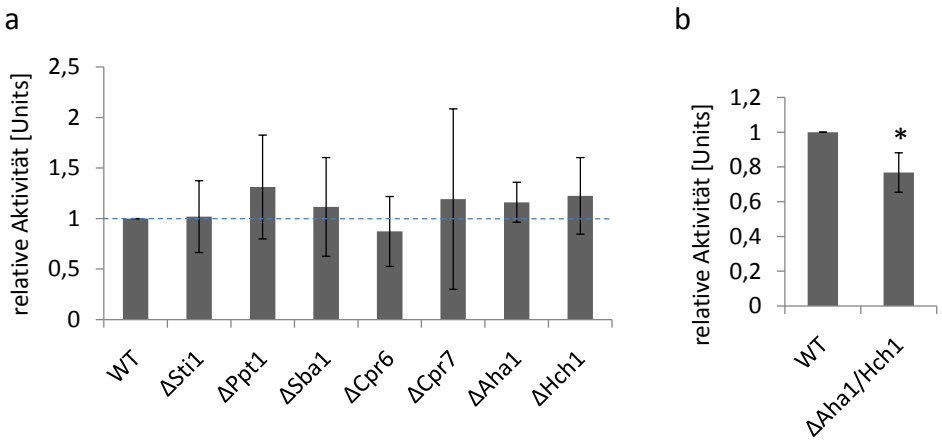

Abbildung 83 Abhängigkeit der PR-Aktivität von Hsp90-Cochaperonen. a PR-Aktivität nach 24 h Induktion mit 10 µM Progesteron in BY4741 Cochaperon-KOs bei 30°C. **b** PR-Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-KO (FY 1679-28C). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen. *P < 0,05.

5.1.3.6 Einfluss des Hsp90- und des Hsp70-Chaperonsystems auf die ß-Galaktosidase

Da ß-Galaktosidase als Reporterenzym benutzt wurde, wurden zur Kontrolle der Assay in den gleichen Stämmen mit ß-Galaktosidase allein durchgeführt. Diese sollte keine Abhängigkeit von Hsp90 zeigen, da es sich um kein Substratprotein handelt. Ein Einfluss von Hsp70 auf die Tetramerisierung der ß-Galaktosidase und somit auf die Aktivität ist möglich.

5.1.3.6.1 Einfluss des Hsp70-Chaperonsystems

Zunächst sollte bestimmt werden, ob ß-Galaktosidase unterschiedliche Aktivitäten in den Hsp70-defizienten Stämmen, die für die Bestimmung der Hsp70-Abhängigkeit der Hsp90-Substratproteine benutzt wurden, aufweist (siehe 5.1.3.1.1). Dazu wurde, wie bei den anderen verwendeten Proteinen auch, die ß-Galaktosidase-Expression induziert und nach fünf Stunden Inkubation bei 25°C oder 37°C gemessen.

Außer dem ER waren alle anderen Substratproteine bei 25°C aktiver im ΔSsa2-4-Stamm, der entweder Ssa1 oder die temperatursensitive Mutante Ssa1ts enthielt. Diese Tendenz konnte für ß-Galaktosidase nicht beobachtet werden, deren Aktivität blieb unverändert (Abbildung 84). Das bedeutet, dass die gemessenen Aktivität in den Reporterassays tatsächlich auf eine Erhöhung der Aktivität der Hsp90-Substratproteine zurückzuführen ist. Außerdem war für einige Hsp90-Substratproteine, wie p53, GR und MR eine Erhöhung der Aktivität bei 37°C Inkubationstemperatur im WT und ΔSsa2-4-Stamm zu beobachten. Diese Tendenz war auch bei ß-Galaktosidase zu sehen, die 4mal aktiver war als bei 25°C. Alle getesteten Hsp90-Substratproteine verloren ihre Aktivität, wenn sie bei 37°C im ΔSsa2-4-Stamm mit Ssa1ts inkubiert wurden, was bedeutet, dass alle Hsp90-Substratproteine stark Hsp70-abhängig sind. Erstaunlicherweise blieb die ß-Galaktosidase-Aktivität unverändert bei 37°C in ΔSsa2-4 mit Ssa1ts. Das bedeutet zum einen, dass die ß-Galaktosidase-Aktivität unter den getesteten Bedingungen nicht abhängig von Hsp70 ist. Und zum anderen kann daraus geschlossen werden, dass die gemessenen Aktivität mit Hilfe der ß-Galaktosidase-Reporterassays tatsächlich auf die Aktivitäten der Hsp90-Substratproteine zurückzuführen sind. Außerdem zeigt dieser Versuch, dass die Inkubation des ΔSsa2-4-Stamms mit Ssa1ts bei 37°C für 5 h nicht zu unspezifischen Ergebnissen führt. Stattdessen war die ß-Galaktosidase-Aktivität unbeeinflusst, was bedeutet, dass dieser Stamm stoffwechselaktiv und in der Lage ist, das Protein zu produzieren.

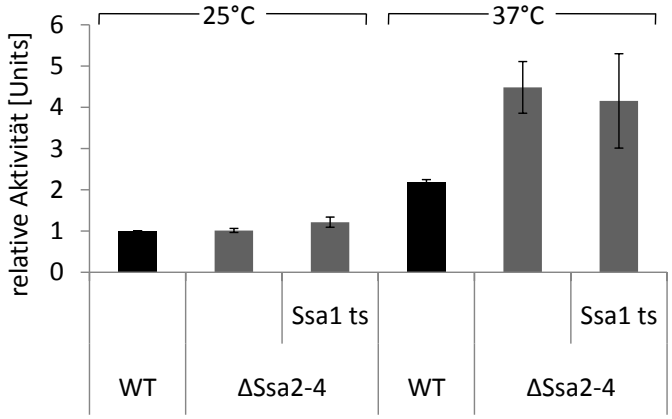

Abbildung 84 Abhängigkeit der ß-Galaktosidase-Aktivität von Hsp70. Die ß-Galaktosidase-Expression wurde induziert und nach 5 h Inkubation bei 25°C oder 37°C die Aktivität gemessen. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm bei 25°C normiert.

Auch die Aktivitätsmessung in den Hsp70-Cochaperon-KOs bestätigte, dass die ß-Galaktosidase nicht stark abhängig vom Hsp70-Chaperonsystem ist (Abbildung 85). Im Ydj1- und Sse1-KO konnte eine leichte Verringerung der Aktivität festgestellt werden, die jedoch sehr schwankte und durch weitere Messungen verifiziert werden muss.

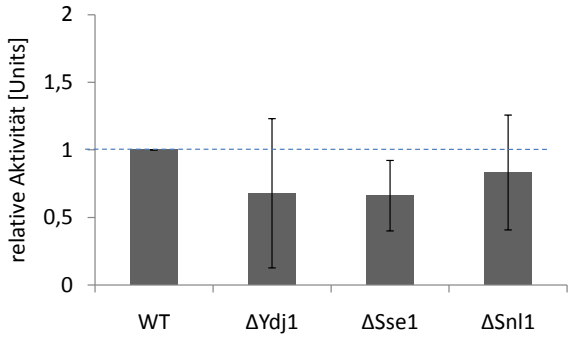

Abbildung 85 Abhängigkeit der ß-Galaktosidase-Aktivität von Hsp70-Cochaperonen. ß-Galaktosidaseaktivität-Aktivität nach 24 h Induktion in BY4741 Cochaperon-KOs bei 30°C. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

5.1.3.6.2 Einfluss des Hsp90-Chaperonsystems

Zunächst wurde untersucht, ob die ß-Galaktosidase-Aktivität von Hsp90 abhängig ist. Dazu wurde die Expression der ß-Galaktosidase induziert und für 5 h inkubiert. Tatsächlich hatte die Inhibierung von Hsp90 mit Radicicol einen hemmenden Effekt auf die ß-Galaktosidaseaktivität, da sie bei 20 µM nur noch 40 % ihrer Aktivität aufwies (Abbildung 86a).

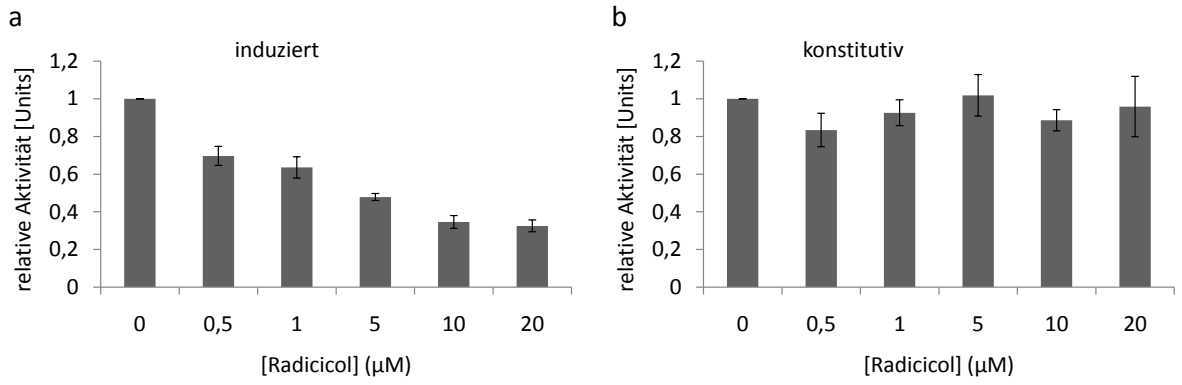

Abbildung 86 Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die ß-Galaktosidase-Aktivität. a ß-Galaktosidase-Aktivität 5 h nach Induktion mit 100 µM $CuSO_4$ und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an Radicicol. **b** ß-Galaktosidase exprimiert von einem konstitutiven Promoter (GPD). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivität wurde auf die Aktivität ohne Radicicol (mit DMSO) bezogen.

Wurde die ß-Galaktosidase konstitutiv exprimiert, konnte kein Einfluss der Hsp90-Inhibierung gemessen werden (Abbildung 86b). Das bedeutet, dass entweder die Induktion oder die Expression der ß-Galaktosidase von Hsp90 abhängig ist. Die eigentliche Aktivität der ß-Galaktosidase ist nicht

betroffen, da keine Aktivitätsunterschiede zu messen waren, wenn sie konstitutiv exprimiert wurde. Dieses Ergebnis muss bei der Interpretation der Experimente mit Radicicol und p53, ER, AR und PR mit einbezogen werden. Da die Wirkung auf GR und MR größer ist als die für die ß-Galaktosidase gemessenen 40 % können diese auf jeden Fall als signifikant interpretiert werden.

Die Hsp90-Cochaperone zeigten keinen Einfluss auf die ß-Galaktosidaseaktivität (Abbildung 87). Das bedeutet, dass die Unterschiede, die mit dem Reporterassay in den KOs gemessen wurden, tatsächlich auf das jeweilige Hsp90-Substratprotein zurückzuführen sind.

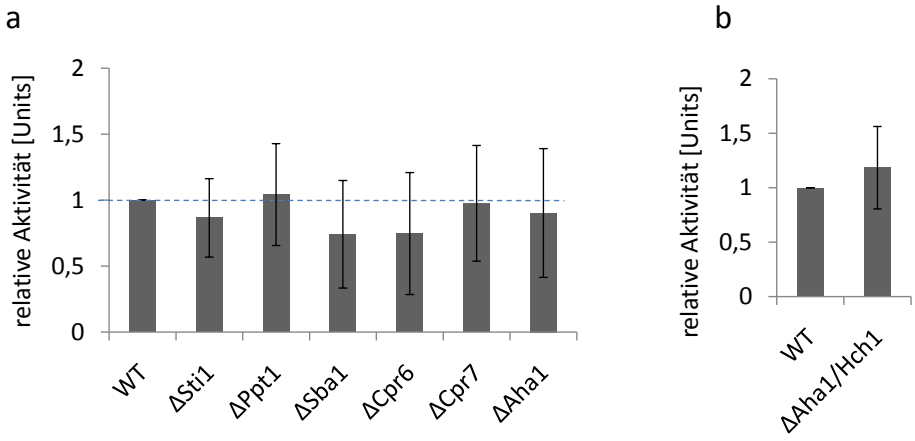

Abbildung 87 Abhängigkeit der ß-Galaktosidase-Aktivität von Hsp90-Cochaperonen. a ß-Galaktosidase-Aktivität nach 24 h Expression in BY4741 Cochaperon-KOs bei 30°C. **b** ß-Galaktosidase-Aktivität im Aha1/Hch1-Doppel-KO (FY 1679-28C). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

5.1.3.7 Einfluss des Hsp90- und des Hsp70-Chaperonsystems auf die Luciferase

Die Luciferase wird oft als Modellsubstrat für die Untersuchung der Wirkungsweise von Chaperonen *in vivo* und *in vitro* benutzt. Dazu wird sie meistens denaturiert und ihre Rückfaltung in An- und Abwesenheit von Chaperonen bestimmt (Raviol et al, 2006). Um in dieser Studie die Abhängigkeit der Luciferase von Cochaperonen zu untersuchen, wurde nach einem etablierten Protokoll vorgegangen. Dabei inkubiert man die Hefen, welche die Luciferase konstitutiv exprimieren, zunächst eine halbe Stunde bei 37°C, um die Hitzeschockantwort zu induzieren, und setzt sie dann einem Hitzeschock aus, bei dem die Luciferase denaturiert und ihre Aktivität verliert. Dann inkubiert man die Zellen wieder bei 30°C und misst die Rückkehr der Luciferaseaktivität (Abbildung 88).

Zum einen fiel auf, dass sich die Luciferaseaktivität bei 30°C oder nach Inkubation bei 37°C abhängig vom KO unterschied, und zum anderen, dass die Rückfaltung nach dem Hitzeschock teilweise unterschiedlich war. Die Aktivität nach der Rückfaltung wurde auf die Aktivität vor dem Hitzeschock bei 30°C normiert. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 88 der Verlauf eines typischen Experiments

gezeigt. Im Folgenden werden die Aktivitäten bei 30°C und 37°C gezeigt und die Rückfaltung in % normiert auf den Wert vor Hitzeschock (30°C) angegeben.

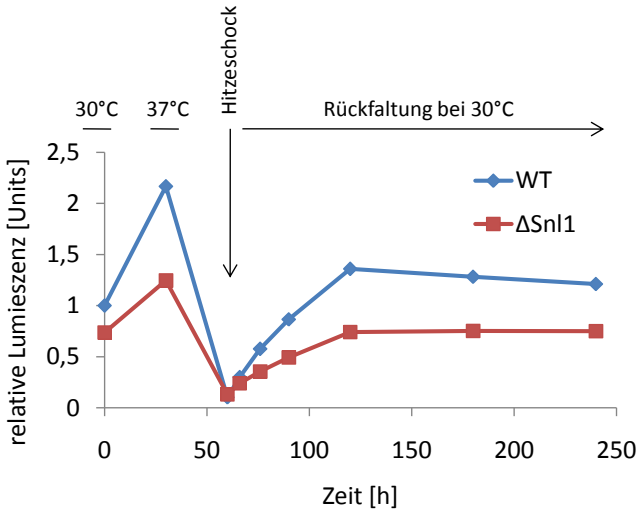

Abbildung 88 Typischer Ablauf eines Luciferaseaktivitätsassays in der Hefe. Bei 30°C inkubierte Zellen werden für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 min bei 46°C. Die Rückfaltung der Luciferase wurde bei 30°C nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Hier gezeigt sind die Luciferaseaktivität in BY4741 WT und ΔSnl1.

5.1.3.7.1 Einfluss des Hsp70-Chaperonsystems

Zunächst wurde die Abhängigkeit vom Hsp70-System untersucht, indem die Luciferase in Hsp70-Cochaperon-KOs transformiert wurde. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C erhöhte sich die Aktivität der Luciferase im WT-Stamm (Abbildung 89a). In ΔYdj1, ΔSse1 und ΔSnl1 war die Erhöhung der Aktivität nicht so stark ausgeprägt, sodass hier ein signifikanter Aktivitätsunterschied messbar war. Nach Durchführung des Hitzeschocks bei 46°C für 30 min wurde die Regeneration der Luciferaseaktivität im WT und in den KOs gemessen. Die Regeneration der Aktivität war in Abwesenheit von Sse1 und Snl1 geringer, da nur 80 % der Ausgangsaktivität erreicht wurden (Abbildung 89b). Im Ydj1-KO ging die Regeneration ebenfalls langsamer von statten, erzielte jedoch 100 % Aktivität nach 2 h Rückfaltung.

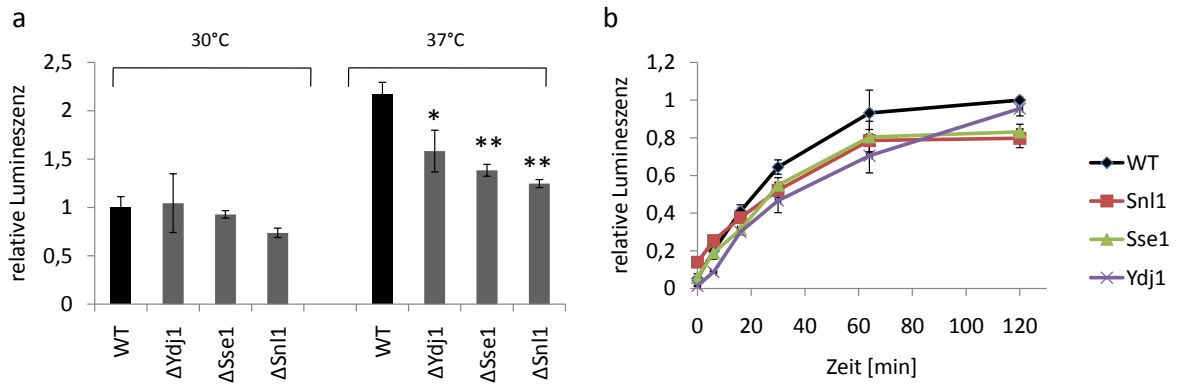

Abbildung 89 Abhängigkeit der Luciferaseaktivität von Hsp70-Cochaperonen. a Luciferaseaktivität bei 30°C und nach 30 min bei 37°C in BY4741 WT und KOs. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten des jeweiligen KOs und dem WT zu bestimmen. * P < 0,05 **P < 0,01 **b** Regeneration der Luciferaseaktivität bei 30°C nach Hitzeschock für 30 min bei 46°C normiert auf die Aktivität vor Hitzeschock. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei verschiedenen Proben.

5.1.3.7.2 Einfluss des Hsp90-Chaperonsystems

Um die Abhängigkeit der Luciferase von Hsp90-Cochaperonen zu testen, wurde der Luciferaseexpressionsvektor in die entsprechenden KOs transformiert.

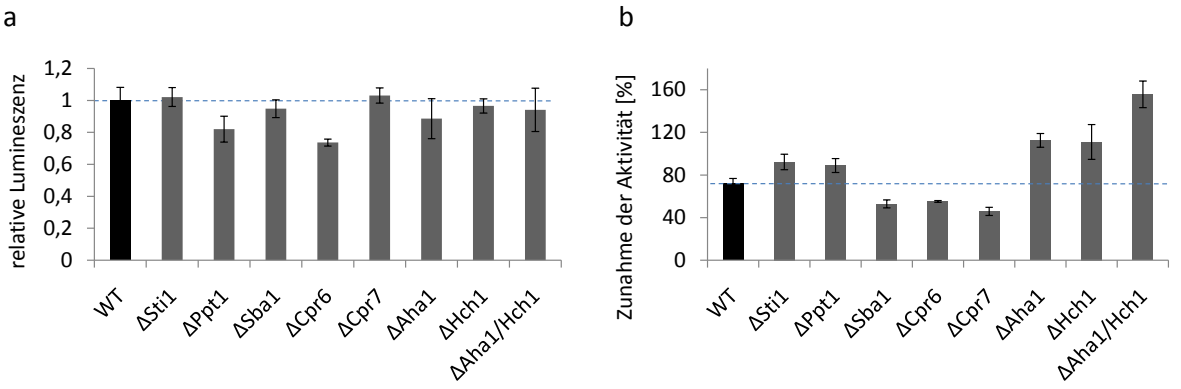

Abbildung 90 Abhängigkeit der Luciferaseaktivität von Hsp90-Cochaperonen. a Luciferaseaktivität bei 30°C in Hsp90-Cochaperon-KOs. Die Aktivitäten wurden auf die Aktivität im WT-Stamm normiert. **b** Zunahme der Luciferaseaktivität nach 30 min bei 37°C in Prozent. Die Aktivität wurde auf die Aktivität bei 30°C normiert. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei verschiedenen Proben.

Schon bei 30°C zeigte die konstitutiv exprimierte Luciferase unterschiedliche Aktivitäten in verschiedenen KOs. So war die Aktivität in ΔPpt1 und ΔCpr6 um 20 % bzw. 25 % reduziert (Abbildung 90a). Inkubierte man die Hefen bei 37°C, um die Hitzeschockantwort zu aktivieren, so stieg die Aktivität, wie schon im vorherigen Kapitel beschrieben, um etwa 80 %. In ΔSba1, ΔCpr6 und ΔCpr7 war die Zunahme der Aktivität um etwa 20 % geringer als im WT-Stamm, was darauf hinweist, dass diese Cochaperone für die Luciferaseaktivität benötigt werden (Abbildung 90b). Interessanterweise war eine höhere Aktivität in ΔAha1 und ΔHch1 im Vergleich zum WT zu beobachten. Diese Tendenz war noch ausgeprägter im ΔAha1/Hch1-Doppel-KO.

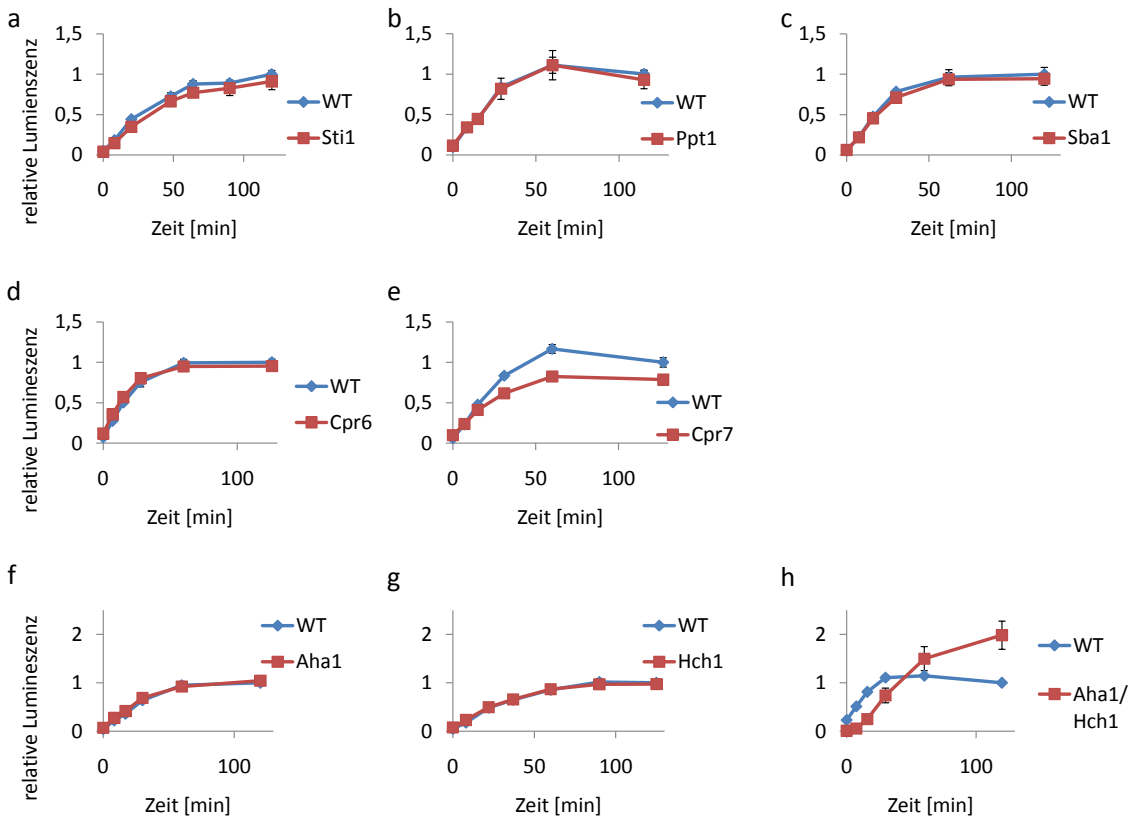

Abbildung 91 Abhängigkeit der Luciferaseaktivität von Hsp90-Cochaperonen. Regeneration der Luciferaseaktivität bei 30°C nach Hitzeschock für 30 min bei 46°C normiert auf die Aktivität vor Hitzeschock in ΔSti1 (**a**), ΔPpt1 (**b**), ΔSba1 (**c**), ΔCpr6 (**d**), ΔCpr7 (**e**), ΔAha1 (**f**), ΔHch1 (**g**) und ΔAha1/Hch1 (**h**). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei verschiedenen Proben.

Nach einem Hitzeschock bei 46°C für 30 min, wodurch die Luciferase denaturiert wurde, wurde die Regeneration der Aktivität bei 30°C beobachtet. Die Abwesenheit von Sti1, Ppt1, Sba1 und Cpr6 hatte keinen Einfluss auf die Regeneration der Aktivität der Luciferase (Abbildung 91 a-d). Jedoch führte der Verlust von Cpr7 zu einer geringeren Rückfaltungsausbeute, da nur 80% der Ausgangsaktivität nach zwei Stunden Regeneration erreicht wurden (Abbildung 91e). Diese Tendenz korrelierte auch mit der geringeren Aktivität bei 37°C. In ΔAha1 und ΔHch1 konnte kein Unterschied zum WT festgestellt werden, obwohl bei 37°C die Aktivität um 20 % höher lag als im WT (Abbildung 91f und g). Der KO von beiden Cochaperonen führte zu einem veränderten Verlauf der Rückfaltungskinetik, welche in einer Verdopplung der Aktivität nach zwei Stunden Regenerationszeit resultierte (Abbildung 91h). Diese Tendenz wurde auch schon bei 37°C beobachtet, wo die Aktivität um ca. 50 % erhöht war.

5.1.4 Vergleichende Betrachtung der Einflüsse des Hsp70- und Hsp90-Chaperonsystems auf die untersuchten Hsp90-Substrate

Um die verschiedenen Hsp90-Substratproteine und deren unterschiedliche Abhängigkeiten von den Chaperonsystemen besser untereinander vergleichen zu können, werden alle Daten in diesem Kapitel zusammenfassend dargestellt.

5.1.4.1 Einfluss von Hsp70 auf verschiedene Hsp90-Substrate

Der Einfluss von Hsp70 auf Hsp90-Substratproteine wurde mit Hilfe Hsp70-defizienter Stämme bestimmt. In diesen wurden die drei Hsp70er Ssa2, Ssa3 und Ssa4 ausgeknockt, sodass nur noch Ssa1 als einziges Hsp70 vorlag. In einem weiteren Stamm wurde Ssa1wt gegen eine temperatursensitive Mutante ausgetauscht, die bei 37°C keine Aktivität mehr besitzt. Durch den Vergleich der Aktivitäten bei 25°C und 37°C war so eine Aussage über den Beitrag von Hsp70 zur Aktivität der Hsp90-Substratproteine möglich. Als Kontrolle wurde die ß-Galaktosidase (ßGal) als Hsp90-unabhängiges Protein gemessen.

Zunächst war offensichtlich, dass die Aktivität von p53, GR, AR, PR und MR im ΔSsa2-4-Stamm höher war als im WT-Stamm, unabhängig davon, ob Ssa1wt oder Ssa1ts vorhanden war (Abbildung 92). Die Aktivität der ßGal hingegen war in allen drei Stämmen etwa gleich. Nur die Aktivität von ER war nicht erhöht im ΔSsa2-4-Stamm, welcher Ssa1wt oder Ssa1ts exprimierte. Das bedeutet zum einen, dass die Expression von entweder Ssa1wt oder Ssa1ts bei 25°C keine substantiellen Auswirkungen hat. Zum anderen deuten diese Ergebnisse an, dass die Aktivität der Hsp90-Substratproteine von Hsp70 abhängig ist, da sie eine geänderte, meist höhere Aktivität in ΔSsa2-4 zeigen. In diesem Stamm wurde die Hsp70-Situation der Zelle geändert und möglicherweise sind Ssa1 oder andere Chaperone hochreguliert, um das Fehlen der Hsp70-Proteine zu kompensieren. Dies könnte anhand von Transkriptionsanalysen untersucht werden.

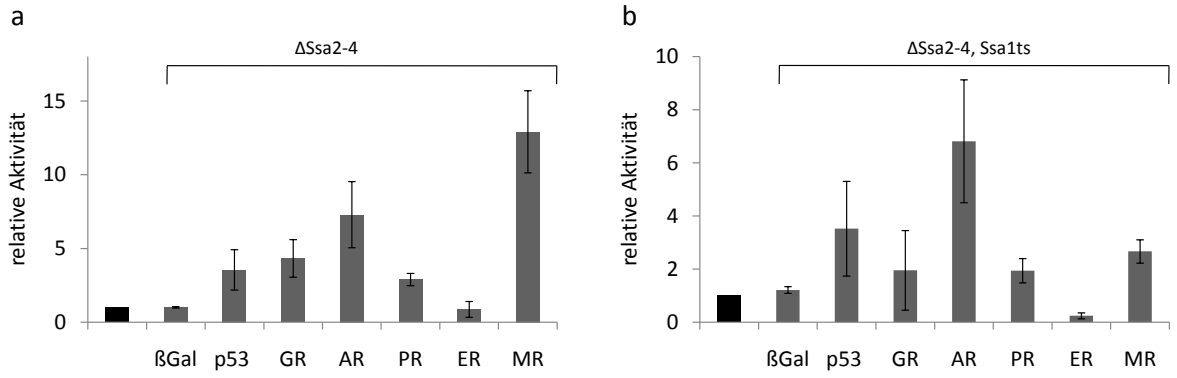

Abbildung 92 Aktivität der Hsp90-Substratproteine in Hsp70-defizienten Stämmen bei 25°C. a Aktivität in ΔSsa2-4 bei 25°C normiert auf die Aktivität im WT-Stamm (schwarz). **b** Aktivität in ΔSsa2-4 mit temperatursensitivem Ssa1 (Ssa1ts) bei 25°C normiert auf die Aktivität im WT-Stamm (schwarz). Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Als nächstes wurde die Aktivität der Hsp90-Substratproteine bei 37°C mit der Aktivität bei 25°C verglichen. Im WT-Stamm stieg die Aktivität von ß-Gal, p53, GR und MR bei 37°C Inkubationstemperatur verglichen mit 25°C um das Doppelte bis Sechsfache (Abbildung 93a). Im Gegensatz dazu sank die AR-Aktivität und für PR und ER war nur eine sehr geringe Aktivität bei 37°C messbar. In ΔSsa2-4 wurde ebenfalls ein Anstieg der Aktivität bei 37°C von ß-Gal, p53, GR und MR beobachtet, wobei dieser Effekt teilweise noch ausgeprägter war als im WT (Abbildung 93b). Die erhöhte Aktivität

von p53, GR und MR sind zum Teil auf die ß-Gal-Aktivität zurückzuführen, die bei 37°C ebenfalls erhöht war. Hier kann schwer gesagt werden, welcher Anteil des gemessenen Signals vom aktiveren Substratprotein oder von ß-Gal ausgeht. Die AR-Aktivität zeigte keinen Unterschied zu 25°C und PR und ER waren wieder viel weniger aktiv.

Allen Hsp90-Substratproteinen war gemein, dass sie ihre Aktivität bei der Inkubation bei 37°C im ΔSsa2-4-Stamm, welcher Ssa1ts exprimierte, vollständig verloren (Abbildung 93c). Da bei dieser Temperatur Ssa1ts inaktiv vorliegt, bedeutet das, dass alle Hsp90-Substratproteine abhängig von der Hsp70-Funktionalität sind. Erstaunlicherweise beeinflusst der Verlust von funktionellem Hsp70 die Aktivität der ßGal nicht, da sie noch genauso aktiv wie in Anwesenheit von funktionellem Ssa1 war.

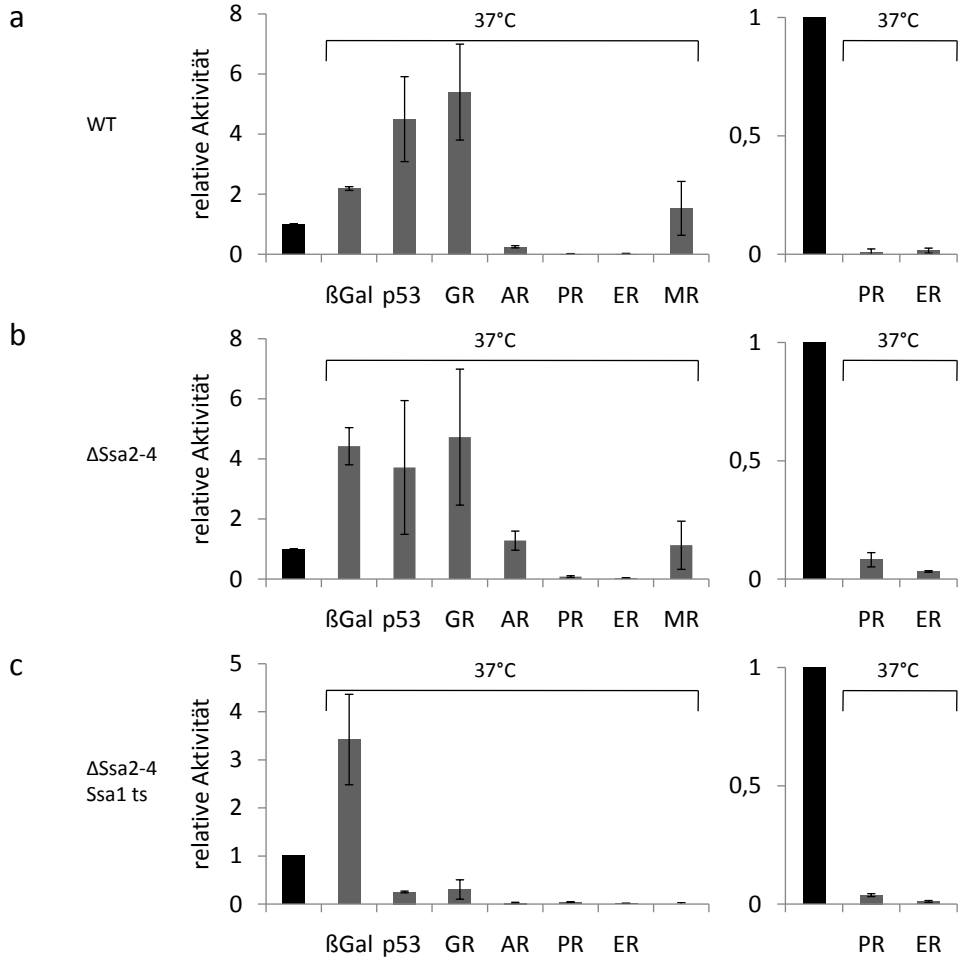

Abbildung 93 Einfluss von Hsp70 auf Hsp90-Substratproteine. Aktivität der verschiedenen Proteine in Hsp70-defizienten Stämmen und dem entsprechenden WT-Stamm bei 37°C (grau) normalisiert auf die Aktivität bei 25°C (schwarz). Zur besseren Veranschaulichung wurden die Aktivitäten für PR und ER mit einer anderen Skalierung zusätzlich rechts dargestellt. **a** Aktivität im WT-Stamm. **b** Aktivität in ΔSsa2-4. **c** Aktivität in ΔSsa2-4, in dem Ssa1 gegen eine temperatursensitive Mutante Ssa1ts ausgetauscht wurde. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

5.1.4.2 Einfluss der Hsp70- und Hsp90-Cochaperone auf Hsp90-Substratproteine

Zur besseren Veranschaulichung und Vergleichbarkeit wurden die Aktivitäten der einzelnen Hsp90-Substratproteine in den KOs, in den Hsp70-defizienten Stämmen und in Abhängigkeit von Radicicol in Farbwerte umgewandelt (Abbildung 94). Dabei wurden alle Aktivitäten auf die entsprechende Aktivität im WT-Stamm bzw. in Abwesenheit von Radicicol normiert, welche in Weiß dargestellt ist. Aktivitäten, die höher waren als im WT, sind in Rot dargestellt. Die Anwesenheit des Chaperons/Cochaperons würde einen reprimierenden Effekt auf die Aktivität besitzen. Die Werte, die zwischen der Aktivität im WT-Stamm (entspricht 100 %, weiß) und der höchsten gemessenen Aktivität (entspricht 400 % von der Aktivität im WT-Stamm, rot) lagen, wurden als entsprechende Rottöne dargestellt. Wurde eine niedrigere Aktivität im KO oder in Anwesenheit von Radicicol gemessen, ist die Aktivität in Grüntönen dargestellt, zwischen 100 % Aktivität im WT-Stamm (weiß) und 0,125 % als niedrigster gemessener Wert (grün). Die Anwesenheit dieses Chaperons/ Cochaperons wirkt also aktivierend auf das Substratprotein. Für v-Src wurde die Größe der Kolonien vermessen und in Grüntöne umgewandelt. Mit Hilfe des Wachstumsassays für v-Src konnten nur negative Effekte eines KOs gemessen werden, da die Aktivität von v-Src im WT-Stamm schon zum Absterben der Zellen führte. Eine höhere v-Src-Aktivität war mit diesem Assay nicht messbar.

Abbildung 94 Umwandlung der Aktivitäten der Hsp90-Substratproteine in Farbwerte. In rot wurden Aktivitäten dargestellt, die höher waren als im WT (bis zu 400 % der WT-Aktivität). Grün repräsentiert Aktivitäten, die geringer waren als im WT (bis zu 0,125 % der WT-Aktivität). Weiß bezeichnet die Aktivität im WT (100 %). Grau: nicht bestimmt.

In Abbildung 94 ist die große Diversität der Chaperon/Cochaperon-Effekte auf verschiedene Substrate erkennbar. Hsp70 wirkt auf alle getesteten Proteine aktivieren, mit Ausnahme von ß-Gal, die unabhängig von Hsp70 ist. Der Bedarf an Hsp90 ist substratspezifischer, da Unterschiede in der Sensitivität der Hsp90-Inhibierung zu beobachten sind. Außerdem wird deutlich, dass die Hsp70-Cochaperone Ydj1 und Sse1 wichtig für fast alle Hsp90-Substratproteine sind, während Snl1 nur p53 und Luciferase beeinflusst. Interessant ist auch, dass Ydj1 verschieden starke Effekte in beide Richtungen auf die Substratproteine aufweist, wohingegen Sse1 immer aktivierend wirkt. Auffallend ist auch, dass Hsp90-Substratproteine existieren, die die Hilfe vieler Cochaperone brauchen um die optimale Aktivität zu erreichen (GR, v-Src), und andere, die nur von einigen wenigen beeinflusst werden (z.B. ER, PR).

5.1.5 Charakterisierung der Knock-out-Stämme

Um zu überprüfen, ob der KO eines Cochaperons Einfluss auf die Menge anderer Chaperone oder Cochaperone hat, wurden zum einen Westernblotanalysen durchgeführt, und zum anderen Transkriptionsanalysen für die KOs mit den größten Effekten auf die Hsp90-Substratproteine angefertigt. Außerdem wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht, ob der Verlust eines Cochaperons einen Einfluss auf die Morphologie der Hefezelle hatte.

5.1.5.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mit Hilfe der REM kann die Oberflächenbeschaffenheit der Hefezelle analysiert werden. Zum einen wurden alle Cochaperon-KOs mit dem WT verglichen, zum anderen wurde überprüft, ob die Expression der humanen Hsp90-Substratproteine einen Einfluss auf das Aussehen der Hefezelle hatte.

Es stellte sich heraus, dass weder ein KO, noch die Expression fremder Proteine einen Einfluss auf die Oberflächenstruktur der Hefe nahm. Daher werden hier exemplarisch die Aufnahmen von BY4741 WT gezeigt (Abbildung 95).

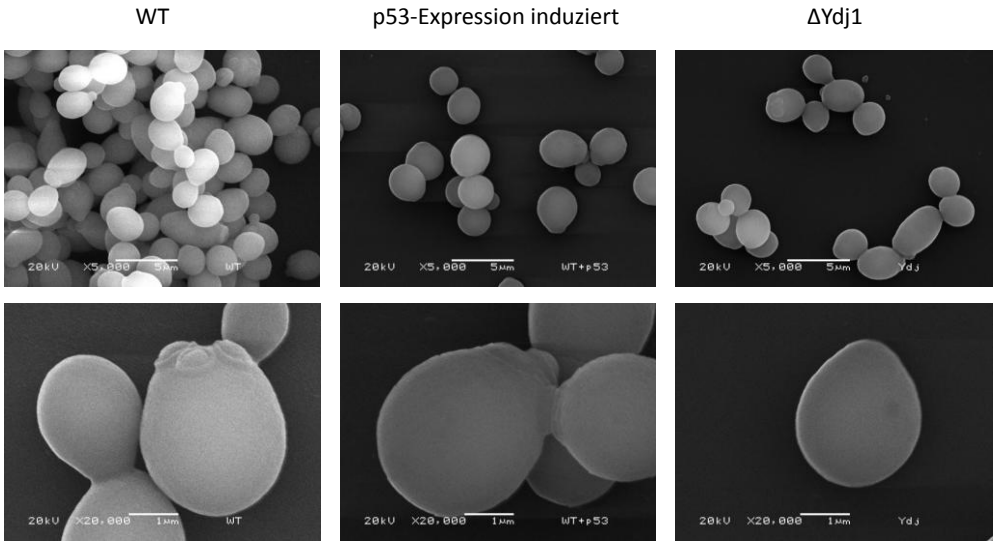

Abbildung 95 Morphologische Analyse von Hefezellen mittels Rasterelektronenmikroskopie. Aufnahmen von Zellen des Stamms BY4741 in der spät logarithmischen Wachstumsphase in zwei verschiedenen Vergrößerungen. Links: WT, Mitte: WT mit induzierter p53-Expression, rechts: ΔYdj1.

5.1.5.2 Westernblotanalysen

Die Westernblotanalysen zeigten, dass sich das Level an Hsp90 und Hsp70 in den verwendeten KOs nicht ändert (Abbildung 96). Das heißt, dass die beobachteten Effekte auf die Aktivität der Hsp90-Substratproteine nicht auf ein verändertes Level an Hsp90 oder Hsp70 zurückzuführen sind. Auch das Level des wichtigsten Vertreters der Hsp40-Familie in Hefe, Ydj1, war in allen KOs vergleichbar.

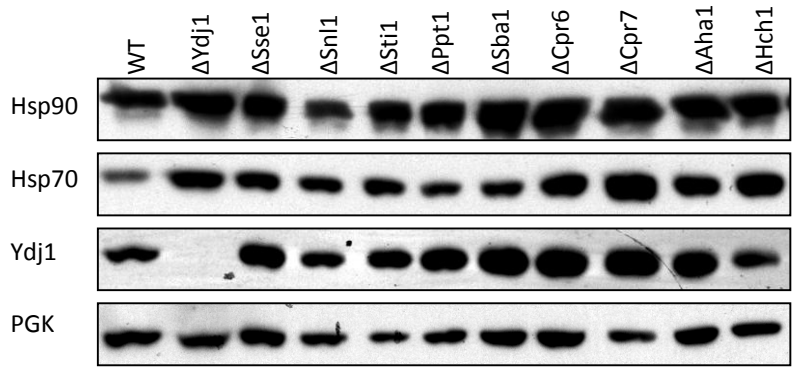

Abbildung 96 Level an Hsp90, Hsp70 und Ydj1 in Cochaperon-KOs. Lysat von BY4741 wurde unter denaturierenden Bedingungen hergestellt um das Gesamtlevel an Chaperonen zu detektieren. Hsp90, Hsp70 und Ydj1 wurden mit polyklonalen Seren detektiert. Als Ladekontrolle diente PGK, welche mit einem monoklonalem Anti-PGK Antikörper detektiert wurde.

Diese Tendenz konnte auch mit einer Transkriptionsanalyse bestätigt werden. Dabei wurde von zwei ausgewählten KOs, ΔYdj1 und Aha1, das mRNA-Level aller Gene der Hefe mittels eines Affimetrix Gen-Assays quantifiziert, sodass ein Vergleich der Expression der mRNA-Menge vom KO und WT vorgenommen werden kann.

5.1.5.3 Transkriptionsanalyse des ΔYdj1-Stammes

Von drei unabhängigen Kulturen des ΔYdj1-Stammes und des WTs wurden die mRNA-Levels mittels Genchip-Analyse bestimmt (Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik, Regensburg).

Zunächst wurde überprüft, ob sich die Level an Chaperonen und Cochaperonen ändern. Dazu wurden die Signale der mit dem MAS5-Algorithmus ausgewerteten Daten von WT und ΔYdj1 verglichen. Nur eine Veränderung von einem Faktor von mehr als 2 wurde als signifikant eingestuft. Demnach veränderten sich die Level an Hsp90, Hsp70 und deren Cochaperonen nicht, wenn Ydj1 deletiert wurde (Abbildung 97a). Auch die Expression anderer J-Proteine war nicht verändert im Ydj1-KO (Abbildung 97b).

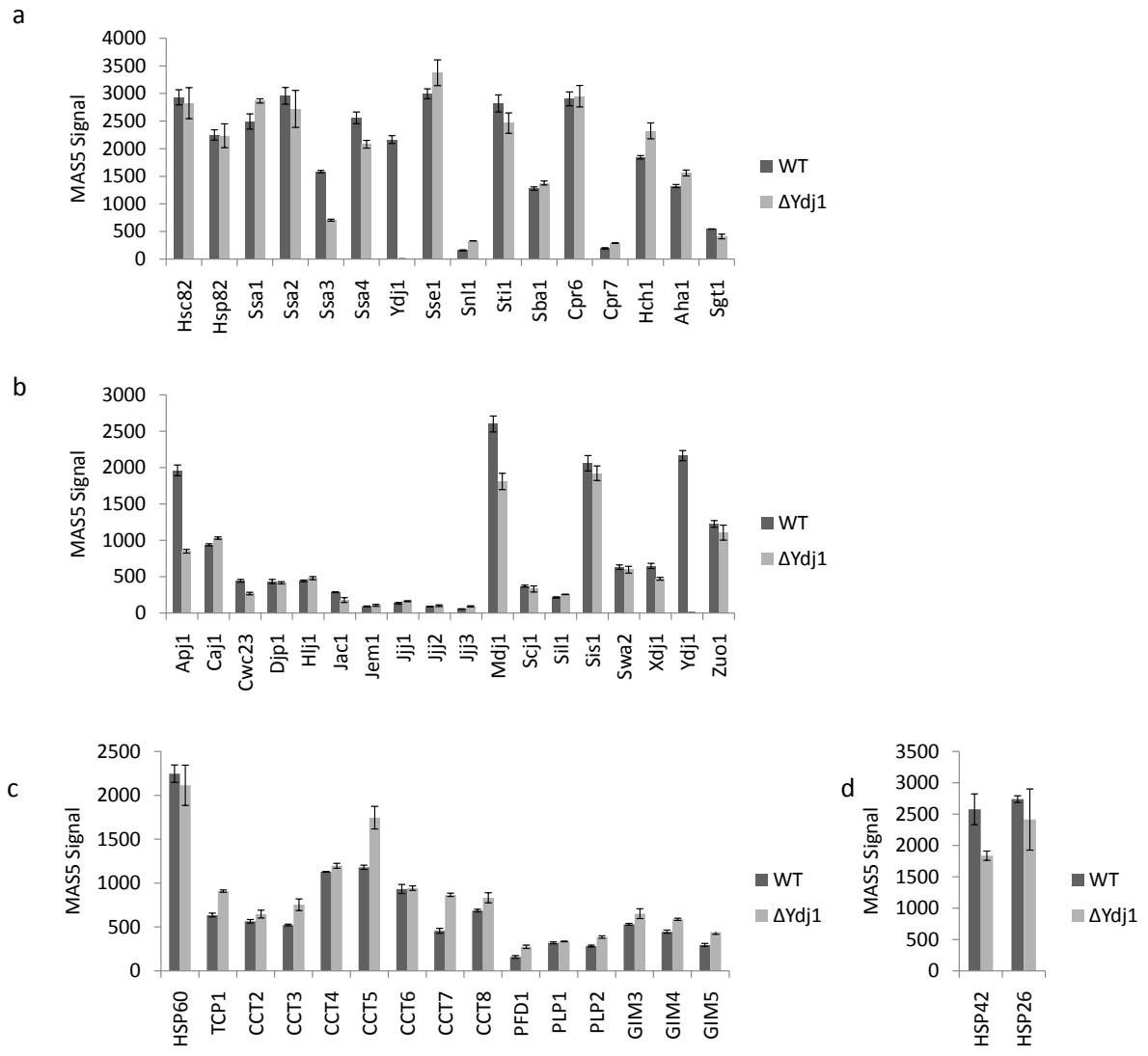

Abbildung 97 Transkriptionsanalyse des Hsp70- und Hsp90-Chaperonsystems in ΔYdj1. a Expression von Hsp90, Hsp70 und deren Cochaperone in WT und ΔYdj1. **b** Expression von J-Proteinen in WT und ΔYdj1. **c** Expression von mitochonrialem Chaperonin Hsp60, der α-Untereinheit TCP1 und der Untereinheiten CCT2-8 des zytosolischen Chaperonins (CCT1), der CCT1-interagierenden Proteinen PLP1 und PLP2, und der im Substrattransfer beteiligten Proteine PFD1 und GIM 3-5. **d** sHsp-Expression in WT und ΔYdj1. Die Signale wurden mit dem MAS5-Algorithmus ausgewertet.

Nachdem das Hsp70/Hsp90-System nicht vom Ydj1-KO beeinflusst war, stellte sich die Frage, ob andere Chaperonsysteme auf das Fehlen von Ydj1 reagierten. Doch weder die Chaperonine, noch die kleinen Hitzeschockproteine (sHsps) Hsp42 und Hsp26 zeigten ein signifikant verändertes Expressionsmuster im Ydj1-KO (Abbildung 97c und d).

Da die Suche nach veränderten Expressionsmuster bei Chaperonen zu keinem Ergebnis führte, wurden die Gene, die die größten Änderungen zwischen WT und Ydj1 zeigten, analysiert. Es wurden 206 Gene gefunden, die mindestens 2fach hochreguliert waren im Vergleich zum WT. Diesen wurden mittels des *Gene Ontology Slim Mappers* zellulären Funktionen zugeordnet (Ashburner et al, 2000). 199 Gene konnten einer GOSlim-Kategorie „Funktion“ zugeordnet werden (Tabelle 8). Interessanterweise wurden 74 der 199 Gene zu der Gruppe „Strukturmolekülaktivität“ zugeordnet. Davon waren 73 Gene struktureller Bestandteil des Ribosoms. 12 % der hochregulierten Gene konnten zu der Funktion „RNA-Bindung“ zugeordnet werden. Das bedeutet also, dass der Verlust von Ydj1 zu einer erhöhten Expression ribosomaler und RNA-bindender Proteine führt.

Tabelle 8 GOSlim-Zuordnung zur Kategorie „Funktion“ der 206 hochregulierten Gene des Ydj1-Knock-outs. Die Gene wurden mit Hilfe des GOSlim Mappers der Saccharomyces Genome Database zugeordnet. Abrufdatum: 18.9.2011, Auftragsnummer: 10119.

GO term	Frequency	Genome Frequency
structural molecule activity	74 out of 199 genes, 37.2%	354 of 6311 genes, 5.6%
structural constituent of ribosome	73 out of 199 genes, 36.7%	223 of 6311 genes, 3.5%
molecular function unknown	38 out of 199 genes, 19.1%	1998 of 6311 genes, 31.7%
RNA binding	24 out of 199 genes, 12.1%	754 of 6311 genes, 11.9%
nucleotidyltransferase activity	8 out of 199 genes, 4.0%	113 of 6311 genes, 1.8%
transmembrane transporter activity	8 out of 199 genes, 4.0%	308 of 6311 genes, 4.9%
ligase activity	6 out of 199 genes, 3.0%	181 of 6311 genes, 2.9%
transferase activity, transferring glycosyl groups	6 out of 199 genes, 3.0%	100 of 6311 genes, 1.6%
oxidoreductase activity	5 out of 199 genes, 2.5%	276 of 6311 genes, 4.4%
rRNA binding	5 out of 199 genes, 2.5%	93 of 6311 genes, 1.5%
enzyme regulator activity	4 out of 199 genes, 2.0%	214 of 6311 genes, 3.4%
methyltransferase activity	4 out of 199 genes, 2.0%	86 of 6311 genes, 1.4%
phosphatase activity	4 out of 199 genes, 2.0%	97 of 6311 genes, 1.5%
transferase activity, transferring acyl groups	3 out of 199 genes, 1.5%	112 of 6311 genes, 1.8%
kinase activity	3 out of 199 genes, 1.5%	202 of 6311 genes, 3.2%
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	3 out of 199 genes, 1.5%	61 of 6311 genes, 1%
translation factor activity, nucleic acid binding	2 out of 199 genes, 1.0%	46 of 6311 genes, 0.7%
transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	2 out of 199 genes, 1.0%	39 of 6311 genes, 0.6%
helicase activity	2 out of 199 genes, 1.0%	80 of 6311 genes, 1.3%
DNA binding	2 out of 199 genes, 1.0%	342 of 6311 genes, 5.4%
ATPase activity	2 out of 199 genes, 1.0%	230 of 6311 genes, 3.6%
protein binding transcription factor activity	2 out of 199 genes, 1.0%	77 of 6311 genes, 1.2%
nuclease activity	2 out of 199 genes, 1.0%	130 of 6311 genes, 2.1%
lipid binding	2 out of 199 genes, 1.0%	87 of 6311 genes, 1.4%

nucleic acid binding transcription factor activity	2 out of 199 genes, 1.0%	88 of 6311 genes, 1.4%
lyase activity	2 out of 199 genes, 1.0%	83 of 6311 genes, 1.3%
signal transducer activity	2 out of 199 genes, 1.0%	40 of 6311 genes, 0.6%
mRNA binding	1 out of 199 genes, 0.5%	76 of 6311 genes, 1.2%
hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	1 out of 199 genes, 0.5%	47 of 6311 genes, 0.7%
isomerase activity	1 out of 199 genes, 0.5%	57 of 6311 genes, 0.9%
protein transporter activity	1 out of 199 genes, 0.5%	51 of 6311 genes, 0.8%
protein binding, bridging	1 out of 199 genes, 0.5%	45 of 6311 genes, 0.7%
transcription factor binding	1 out of 199 genes, 0.5%	42 of 6311 genes, 0.7%
ion binding	1 out of 199 genes, 0.5%	41 of 6311 genes, 0.6%
GTPase activity	1 out of 199 genes, 0.5%	57 of 6311 genes, 0.9%
cytoskeletal protein binding	0 out of 199 genes, 0%	65 of 6311 genes, 1.0%
enzyme binding	0 out of 199 genes, 0%	39 of 6311 genes, 0.6%
peptidase activity	0 out of 199 genes, 0%	137 of 6311 genes, 2.2%
unfolded protein binding	0 out of 199 genes, 0%	67 of 6311 genes, 1.1%
triplet codon-amino acid adaptor activity	0 out of 199 genes, 0%	299 of 6311 genes, 4.7%
RNA modification guide activity	0 out of 199 genes, 0%	71 of 6311 genes, 1.1%
histone binding	0 out of 199 genes, 0%	34 of 6311 genes, 0.5%
small conjugating protein binding	0 out of 199 genes, 0%	43 of 6311 genes, 0.7%
other	7 out of 199 genes, 3.5%	

516 Gene des Ydj1-KOs zeigten mehr als eine 2fache Reduktion des entsprechenden Signals des WTs. 489 Gene konnten einer Kategorie „Funktion“ zugeordnet werden. Von knapp 50% dieser Gene ist keine Funktion bekannt (Tabelle 9).

Tabelle 9 GOSlim-Zuordnung zur Kategorie „Funktion“ der 516 herunter regulierten Gene des Ydj1-Knock-outs. Die Gene wurden mit Hilfe des *GOSlim Mappers* der *Saccharomyces Genome Database* zugeordnet. Abrufdatum: 18.9.2011, Auftragsnummer: 11153.

GO term	**Frequency**	**Genome Frequency**
molecular function unknown	242 out of 489 genes, 49.5%	1998 of 6311 genes, 31.7%
transmembrane transporter activity	39 out of 489 genes, 8%	308 of 6311 genes, 4.9%
DNA binding	31 out of 489 genes, 6.3%	342 of 6311 genes, 5.4%
oxidoreductase activity	25 out of 489 genes, 5.1%	276 of 6311 genes, 4.4%
RNA binding	19 out of 489 genes, 3.9%	754 of 6311 genes, 11.9%
kinase activity	18 out of 489 genes, 3.7%	202 of 6311 genes, 3.2%
transferase activity, transferring acyl groups	12 out of 489 genes, 2.5%	112 of 6311 genes, 1.8%
enzyme regulator activity	12 out of 489 genes, 2.5%	214 of 6311 genes, 3.4%
ATPase activity	12 out of 489 genes, 2.5%	229 of 6311 genes, 3.6%
nucleic acid binding transcription factor activity	12 out of 489 genes, 2.5%	89 of 6311 genes, 1.4%
ligase activity	9 out of 489 genes, 1.8%	181 of 6311 genes, 2.9%
mRNA binding	8 out of 489 genes, 1.6%	68 of 6311 genes, 1.1%
lyase activity	6 out of 489 genes, 1.2%	83 of 6311 genes, 1.3%
phosphatase activity	6 out of 489 genes, 1.2%	97 of 6311 genes, 1.5%
nuclease activity	5 out of 489 genes, 1.0%	130 of 6311 genes, 2.1%
structural molecule activity	5 out of 489 genes, 1.0%	354 of 6311 genes, 5.6%

unfolded protein binding	5 out of 489 genes, 1.0%	67 of 6311 genes, 1.1%
cytoskeletal protein binding	4 out of 489 genes, 0.8%	65 of 6311 genes, 1.0%
protein binding transcription factor activity	4 out of 489 genes, 0.8%	77 of 6311 genes, 1.2%
nucleotidyltransferase activity	4 out of 489 genes, 0.8%	113 of 6311 genes, 1.8%
ion binding	4 out of 489 genes, 0.8%	41 of 6311 genes, 0.6%
enzyme binding	3 out of 489 genes, 0.6%	40 of 6311 genes, 0.6%
hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	3 out of 489 genes, 0.6%	47 of 6311 genes, 0.7%
peptidase activity	3 out of 489 genes, 0.6%	137 of 6311 genes, 2.2%
histone binding	3 out of 489 genes, 0.6%	35 of 6311 genes, 0.6%
lipid binding	3 out of 489 genes, 0.6%	87 of 6311 genes, 1.4%
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	3 out of 489 genes, 0.6%	61 of 6311 genes, 1%
transcription factor binding	3 out of 489 genes, 0.6%	42 of 6311 genes, 0.7%
isomerase activity	2 out of 489 genes, 0.4%	57 of 6311 genes, 0.9%
small conjugating protein binding	2 out of 489 genes, 0.4%	43 of 6311 genes, 0.7%
protein binding, bridging	2 out of 489 genes, 0.4%	45 of 6311 genes, 0.7%
transferase activity, transferring glycosyl groups	2 out of 489 genes, 0.4%	100 of 6311 genes, 1.6%
signal transducer activity	2 out of 489 genes, 0.4%	40 of 6311 genes, 0.6%
GTPase activity	2 out of 489 genes, 0.4%	58 of 6311 genes, 0.9%
structural constituent of ribosome	1 out of 489 genes, 0.2%	223 of 6311 genes, 3.5%
translation factor activity, nucleic acid binding	1 out of 489 genes, 0.2%	46 of 6311 genes, 0.7%
transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	1 out of 489 genes, 0.2%	39 of 6311 genes, 0.6%
helicase activity	1 out of 489 genes, 0.2%	80 of 6311 genes, 1.3%
protein transporter activity	1 out of 489 genes, 0.2%	51 of 6311 genes, 0.8%
methyltransferase activity	1 out of 489 genes, 0.2%	86 of 6311 genes, 1.4%
rRNA binding	0 out of 489 genes, 0%	93 of 6311 genes, 1.5%
triplet codon-amino acid adaptor activity	0 out of 489 genes, 0%	299 of 6311 genes, 4.7%
RNA modification guide activity	0 out of 489 genes, 0%	71 of 6311 genes, 1.1%
other	28 out of 489 genes, 5.7%	

5.1.5.4 Transkriptionsanalyse des ΔAha1-Stammes

Für den Aha1-KO wurde zur Expressionsanalyse ebenfalls eine Transkriptionsanalyse mittels eines Affimetrix Gen-Assays angefertigt. Wie schon bei ΔYdj1 beobachtet, beeinflusste der Aha1-KO weder das Level an Hsp70, Hsp90 und deren Cochaperonen, noch der Familie der Chaperonine und der sHsps (Abbildung 98).

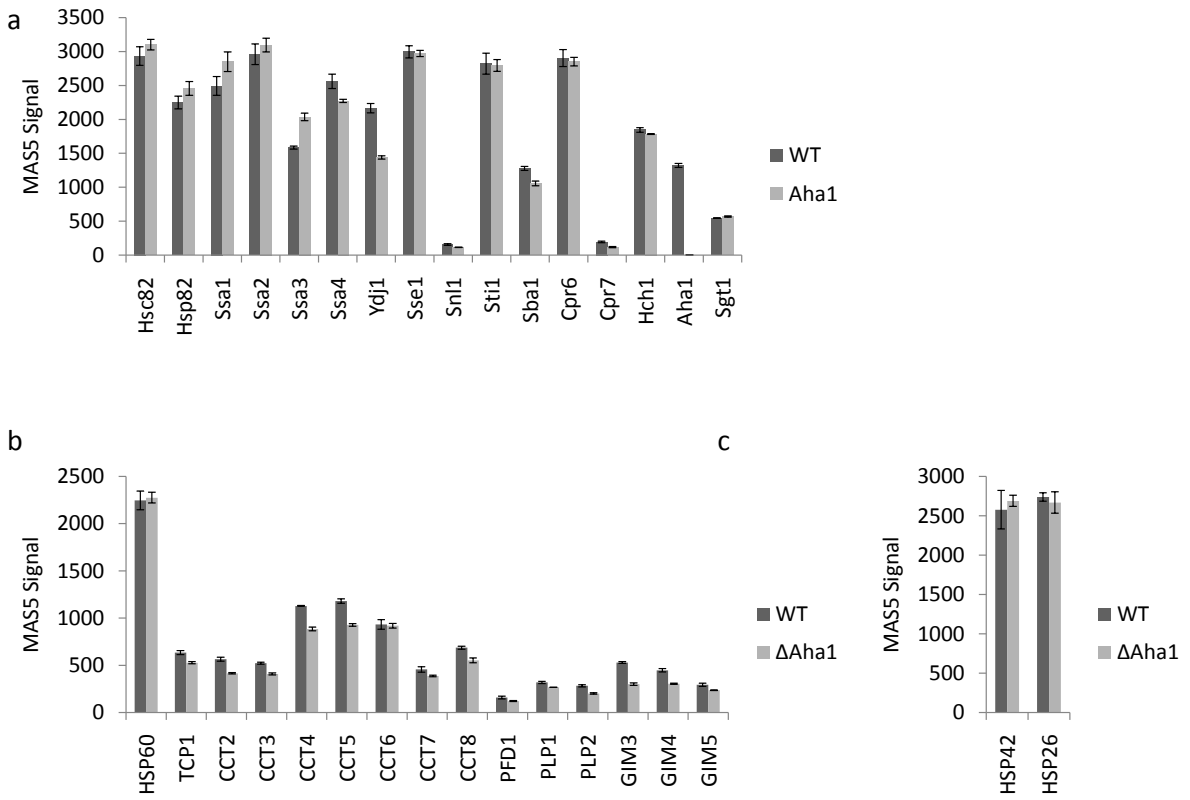

Abbildung 98 Transkriptionsanalyse der Chaperone in ΔAha1. a Expression von Hsp90, Hsp70 und deren Cochaperone in WT und ΔAha1. **b** Expression von mitochonrialem Chaperonin Hsp60, der α-Untereinheit TCP1 und der Untereinheiten CCT2-8 des zytosolischen Chaperonins (CCT1), der CCT1-interagierenden Proteinen PLP1 und PLP2, und der im Substrat-transfer beteiligten Proteine PFD1 und GIM 3-5.**c** Expression der sHsps in WT und ΔAha1. Die Signale wurden mit dem MAS5-Algorithmus ausgewertet.

Insgesamt 62 Gene waren mehr als 2fach hochreguliert in ΔAha1 verglichen mit dem WT. Den größten Unterschied zum WT zeigte GRE1, welches im Aha1-KO 6fach stärker exprimiert wird. Dabei handelt es sich um ein Hydrophillin, welches durch osmotischen, ionischen, oxydativen, Hitze- und Schwermetallstress induziert wird (Garay-Arroyo et al, 2000; Garay-Arroyo & Covarrubias, 1999; Momose & Iwahashi, 2001; Vido et al, 2001). Auch Sip18, welches durch osmotischen Stress induziert wird (Marquez et al, 1998; Miralles & Serrano, 1995), lag 4fach hochreguliert vor. Ordnete man die gefundenen Gene mittels des *GOSlim Mappers* einer Funktion zu, so konnten für 50 % der Gene keine Funktion gefunden werden (Tabelle 10). 13 % wurden der Funktion Oxidoreduktaseaktivität zugeordnet.

Tabelle 10 GOSlim-Zuordnung zur Kategorie „Funktion" der 62 hochregulierten Gene des Aha1-KOs. Die Gene wurden mit Hilfe des *GOSlim Mappers* der *Saccharomyces Genome Database* zugeordnet. Abrufdatum: 18.9.2011, Auftragsnummer: 2372.

GO term	Frequency	Genome Frequency
molecular function unknown	30 out of 62 genes, 48.4%	1998 of 6311 genes, 31.7%
oxidoreductase activity	8 out of 62 genes, 12.9%	276 of 6311 genes, 4.4%
DNA binding	4 out of 62 genes, 6.5%	342 of 6311 genes, 5.4%
transmembrane transporter activity	4 out of 62 genes, 6.5%	308 of 6311 genes, 4.9%

transferase activity, transferring acyl groups	3 out of 62 genes, 4.8%	112 of 6311 genes, 1.8%
RNA binding	3 out of 62 genes, 4.8%	754 of 6311 genes, 11.9%
nucleic acid binding transcription factor activity	2 out of 62 genes, 3.2%	88 of 6311 genes, 1.4%
methyltransferase activity	1 out of 62 genes, 1.6%	86 of 6311 genes, 1.4%
lipid binding	1 out of 62 genes, 1.6%	87 of 6311 genes, 1.4%
lyase activity	1 out of 62 genes, 1.6%	83 of 6311 genes, 1.3%
translation factor activity, nucleic acid binding	1 out of 62 genes, 1.6%	46 of 6311 genes, 0.7%
mRNA binding	1 out of 62 genes, 1.6%	76 of 6311 genes, 1.2%
transferase activity, transferring glycosyl groups	1 out of 62 genes, 1.6%	100 of 6311 genes, 1.6%
cytoskeletal protein binding	1 out of 62 genes, 1.6%	65 of 6311 genes, 1.0%
transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	1 out of 62 genes, 1.6%	39 of 6311 genes, 0.6%
peptidase activity	1 out of 62 genes, 1.6%	137 of 6311 genes, 2.2%
unfolded protein binding	1 out of 62 genes, 1.6%	67 of 6311 genes, 1.1%
enzyme regulator activity	1 out of 62 genes, 1.6%	214 of 6311 genes, 3.4%
ATPase activity	1 out of 62 genes, 1.6%	230 of 6311 genes, 3.6%
nuclease activity	1 out of 62 genes, 1.6%	130 of 6311 genes, 2.1%
kinase activity	1 out of 62 genes, 1.6%	202 of 6311 genes, 3.2%
protein binding, bridging	0 out of 62 genes, 0%	45 of 6311 genes, 0.7%
structural constituent of ribosome	0 out of 62 genes, 0%	223 of 6311 genes, 3.5%
enzyme binding	0 out of 62 genes, 0%	39 of 6311 genes, 0.6%
rRNA binding	0 out of 62 genes, 0%	93 of 6311 genes, 1.5%
RNA modification guide activity	0 out of 62 genes, 0%	71 of 6311 genes, 1.1%
histone binding	0 out of 62 genes, 0%	34 of 6311 genes, 0.5%
hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	0 out of 62 genes, 0%	61 of 6311 genes, 1%
ligase activity	0 out of 62 genes, 0%	181 of 6311 genes, 2.9%
nucleotidyltransferase activity	0 out of 62 genes, 0%	113 of 6311 genes, 1.8%
transcription factor binding	0 out of 62 genes, 0%	42 of 6311 genes, 0.7%
hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	0 out of 62 genes, 0%	47 of 6311 genes, 0.7%
structural molecule activity	0 out of 62 genes, 0%	354 of 6311 genes, 5.6%
signal transducer activity	0 out of 62 genes, 0%	40 of 6311 genes, 0.6%
triplet codon-amino acid adaptor activity	0 out of 62 genes, 0%	299 of 6311 genes, 4.7%
phosphatase activity	0 out of 62 genes, 0%	97 of 6311 genes, 1.5%
isomerase activity	0 out of 62 genes, 0%	57 of 6311 genes, 0.9%
helicase activity	0 out of 62 genes, 0%	80 of 6311 genes, 1.3%
ion binding	0 out of 62 genes, 0%	41 of 6311 genes, 0.6%
GTPase activity	0 out of 62 genes, 0%	57 of 6311 genes, 0.9%
protein transporter activity	0 out of 62 genes, 0%	51 of 6311 genes, 0.8%
small conjugating protein binding	0 out of 62 genes, 0%	43 of 6311 genes, 0.7%
protein binding transcription factor activity	0 out of 62 genes, 0%	77 of 6311 genes, 1.2%
other	2 out of 62 genes, 3.2%	

Betrachtete man die Gene, die im Aha1-KO mindestens 2fach herunter reguliert waren, so fand man 111 betroffene Gene. Von etwa 40 % war wieder die molekulare Funktion nicht bekannt und 7 % konnten Oxidoreduktaseaktivität zugeordnet werden (Abrufdatum 20.9.11, Auftragsnummer 20188).

5.2 Untersuchungen zur Regulation von p53 durch das C-terminale Segment

5.2.1 p53-Domänenstruktur und verwendete p53-Fragmente

Zur Untersuchung des Einflusses des C-terminalen Segments von p53 auf die Aktivität und Struktur des Moleküls wurden verschiedene Fragmente und Mutanten des Proteins konstruiert und gereinigt (Abbildung 99). C-terminale Mutanten, bei denen entweder die letzten zehn, 30 oder 37 Aminosäuren fehlten, wurden in der Doktorarbeit von Marco Retzlaff kloniert (Retzlaff, 2009a). Außerdem wurde mit phosphomimetischen Mutanten gearbeitet. In p53 S392E imitiert das Glutamat phosphoryliertes Serin. In p53 Cneg wurden alle möglichen Serin- und Threoninphosphorylierungen und Lysinacetylierungen im C-Terminus durch Glutamat bzw. Glutamin imitiert. Alle Konstrukte wurden ohne His-Tag gereinigt. p53Q stellt eine stabilisierte Mutante dar, die vier Aminosäureaustausche in der DBD besitzt und dadurch strukturell stabilisiert wird (Rajagopalan et al, 2008).

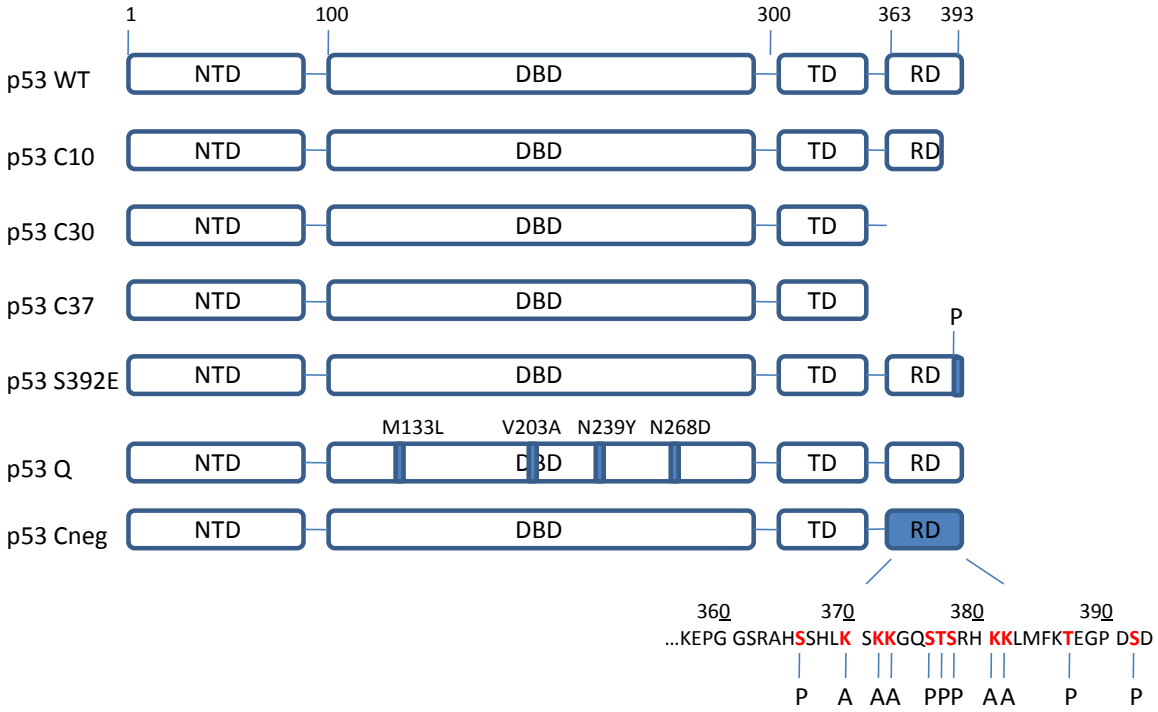

Abbildung 99 Schematische Darstellung der verwendeten p53-Fragmente und Mutanten. NTD – N-terminale Transaktivierungsdomäne, DBD – DNA-Bindedomäne, TD – Tetramerisierungsdomäne, RD – Regulatorische Domäne. P – Phosphorylierungsstelle, Phosphorylierung von Serin oder Threonin wurde durch Austausch zu Glutamat imitiert. A – Acetylierungsstelle, Lysinacetylierung wurde durch Austausch zu Glutamin imitiert.

5.2.2 Stabilität und Sekundärstruktur der p53-Fragmente

Die in dieser Arbeit hergestellten p53-Mutanten p53 Q und p53 Cneg wurden mittels CD-Spektroskopie untersucht. Der Sekundärstrukturgehalt der p53-Mutanten unterschied sich nicht von p53wt, da die CD-Spektren die gleiche Form wie p53wt aufwiesen (Retzlaff, 2009b) (Abbildung 100a und b).

Das Aussehen der Spektren spiegelt den großen Anteil unstrukturierter Bereiche in p53 wider, die im N- und C-terminalen Bereich liegen (Bell et al, 2002).

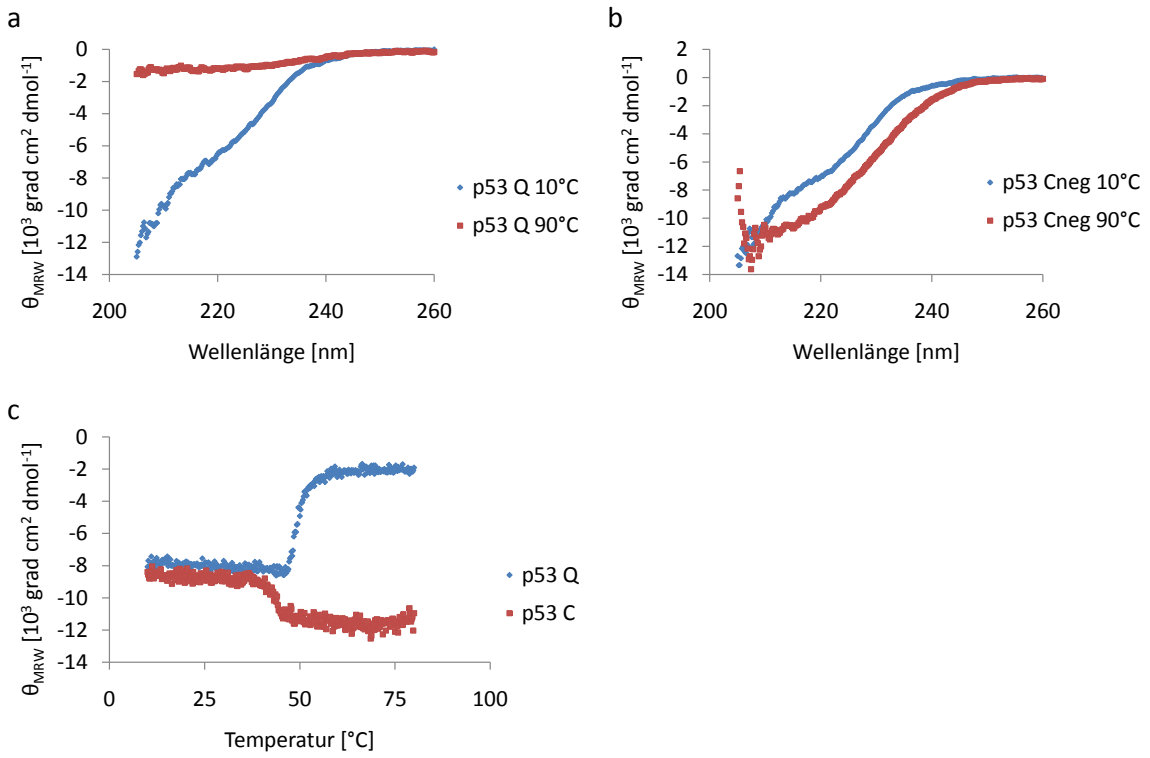

Abbildung 100 Strukturelle Charakterisierung der p53-Mutanten p53 Q und p53 Cneg. **a** CD-Spektrum von p53Q bei 10°C (blau) und 90°C (rot). **b** CD-Spektrum von p53 Cneg bei 10°C (blau) und 90°C (rot). **c** CD-Temperaturübergang von p53 Q (blau) und p53 Cneg (rot) bei 222 nm.

Durch die Messung der Änderung des CD-Signals bei 222 nm mit steigender Temperatur kann bestimmt werden, wann die thermische Denaturierung einsetzt. Für p53wt wurde eine Denaturierungstemperatur von 40°C bestimmt. Die stabilisierte p53 Mutante p53 Q zeigte eine erhöhte Denaturierungstemperatur von etwa 50°C (Abbildung 100c). Erstaunlicherweise zeigte p53 Cneg kaum Strukturänderungen bei Erhöhung der Temperatur. Das Spektrum bei 90°C hatte annähernd die gleiche Form wie bei 10°C (Abbildung 100b), wodurch der CD-Temperaturübergang auch kaum Änderungen zeigte (Abbildung 100c). Auch die bei p53wt und p53 Q zu beobachtende Aggregation in der Küvette nach Erhitzen auf 90°C war bei p53 Cneg nicht zu beobachten. Durch Messung der Absorption bei 330 nm konnte bestätigt werden, dass p53 Cneg bei erhöhten Temperaturen nicht aggregiert, der WT hingegen schon (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen wurde schon für p53 C37 beobachtet, dessen CD-Temperaturübergang dem von p53 Cneg sehr ähnelt (Retzlaff, 2009a). Das bedeutet, dass das Fehlen der C-terminalen Domäne und das Einführen von negativen Ladungen den gleichen stabilisierenden Effekt auf das gesamte Molekül haben.

5.2.3 Das Einführen von negativen Ladungen im C-terminalen Segment verändert die DNA-Bindung

Um zu überprüfen, ob sich Phosphorylierung und Acetylierung in der C-terminalen Domäne auf die DNA-Bindeeigenschaft von p53 auswirkt, wurde mittels Anisotropie der K_D-Wert der p53-Mutante p53 Cneg mit DNA bestimmt. Als DNA wurde die p53-spezifische p21-Promotersequenz eingesetzt. Es wurde ein K_D-Wert von etwa 100 nM bestimmt (Abbildung 101). Der K_D von p53wt zu DNA beträgt etwa 400 nM und der von p53 S392E etwa 200 nM (Retzlaff, 2009b). Das bedeutet, dass je mehr negative Ladungen im C-terminalen Segment vorhanden sind, desto mehr steigt die DNA-Affinität. Entfernt man das C-terminale Segment komplett (p53 C37), erhöht sich der KD auf 500 nM (Retzlaff, 2009b), d.h. die Affinität zur DNA nimmt ab.

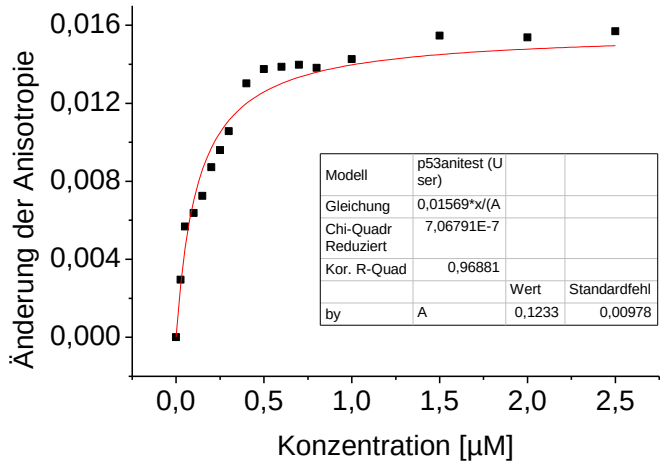

Abbildung 101 Bestimmung der DNA-Bindung von p53 Cneg mittels Anisotropie. Die Änderung der Anisotropie von Cy5-markierter p21-DNA durch Titration von p53 Cneg bei 15°C in 50 mM KPP pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM TCEP. Zur Ermittlung der Affinität K_D wurde die Kurve unter Annahme eines einfachen Bindemodells gefittet.

5.2.4 Die C-terminale Domäne beeinflusst das Oligomerisierungsverhalten

Da vermutet wird, dass die C-terminale Domäne von p53 Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten über die intermolekulare Interaktion mit der DBD nimmt, wurde hier der Oligomerisierungszustand der Mutanten analysiert. Dazu wurden die Proteine auf ein Nativgel aufgetragen, wodurch nach Größe und Ladung des Proteins aufgetrennt wird. Bei den beiden C-terminal verkürzten Mutanten p53 C30 und p53 C37 war mehr Dimer zu erkennen als bei p53wt (Abbildung 102). Außerdem war zusätzlich eine leichte Monomerbande zu erkennen, die bei p53wt nicht zu finden war. Zwischen p53wt und S392E wurde kein Unterschied festgestellt. p53 C10 tendierte stark zur Aggregation, weshalb hier nur unspezifische Aggregate auf dem Gel zu erkennen waren.

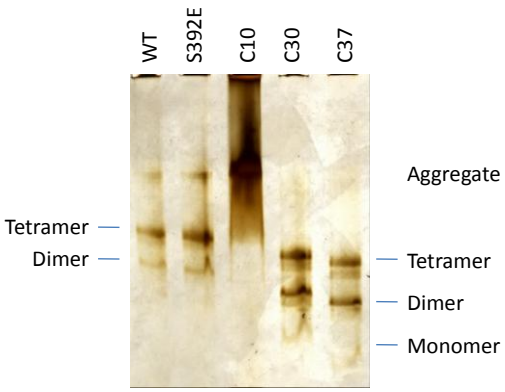

Abbildung 102 Das C-terminale Segment beeinflusst die Tetramerisierung von p53. Jeweils 1 µM p53 wurde auf ein Nativgel aufgetragen und für 2 h bei 4°C separiert.

Außerdem wurde mittels Größenausschlusschromatographie das Oligomerisierungsverhalten untersucht. Auch hier war die Tendenz zu beobachten, dass p53 C37 mehr Dimer bildet als p53wt. Für p53 C30 konnte das jedoch nicht gezeigt werden. Möglicherweise muss hier eine niedrigere Konzentration getestet werden, damit Dimere sichtbar werden.

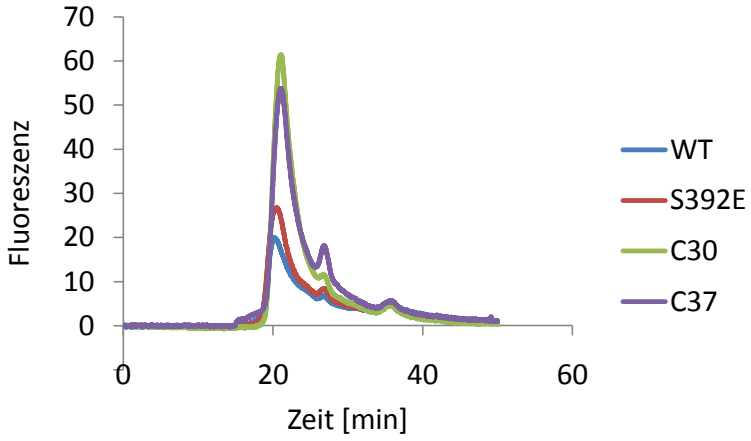

Abbildung 103 Analyse der Oligomerisierung mit Größenausschlusschromatografie. Jeweils 100 µl einer 1 µM Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 aufgetragen. Die auftrennung erfolgte mit 0,5 ml/min in 50 mM KPP pH 7,5, 100mM KCl, 1 mM TCEP.

Mittels analytischer Ultrazentrifugation (aUZ) kann über das Sedimentationsverhalten von Proteinen eine Aussage zu deren Größe getroffen werden. Für die zu untersuchenden p53-Varianten wurde eine Verringerung des Sedimentationskoeffizienten von p53 C37 im Vergleich zu p53wt beobachtet (Abbildung 104). Das beutet für p53, dass der Verlust der C-terminalen Domäne zu einer Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite des Dimers führt.

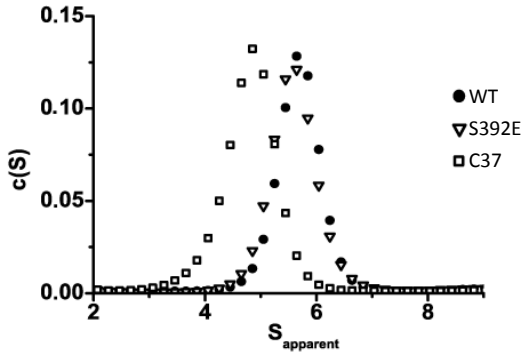

Abbildung 104 Analyse der Oligomerisierung mit Analytischer Ultrazentrifugation. Die Sedimentation wurde über Absorption bei 280 nm verfolgt. 3 µM Protein wurden in 50 mM KPP, pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM TCEP bei 10°C und 42 000 rpm gemessen.

In einer früheren Publikation wurde gezeigt, dass zwischen Dimeren und Tetrameren der p53-Mutante p53 Q mittels aUZ unterschieden werden konnte (Rajagopalan et al, 2008). Dabei wurde das Protein mit einem Flash-Tag am C-Terminus markiert, um mittels Fluoreszenzdetektion bei geringeren Konzentrationen messen zu können. In dieser Arbeit wurde dieses Protein hergestellt, um mit diesem die Daten von p53wt und dem Mutanten vergleichen zu können. Dieses wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert, damit Konzentrationen im nM-Bereich gemessen werden können. Um eine Behinderung der Tertiärstruktur von p53 auszuschließen, wurde das Label spezifisch am N-Terminus angebracht. Doch auch mit dieser Mutante unter den gleichen beschriebenen Bedingungen, wie z. B. die Durchführung der aUZ in Glycerin- und BSA-haltigem Puffer, konnte keine Trennung der Tetramere und Dimere beobachtet werden (Abbildung 105). Ein Grund dafür könnte möglicherweise der C-terminale Flash-Tag sein, der die Tetramersierung stören könnte.

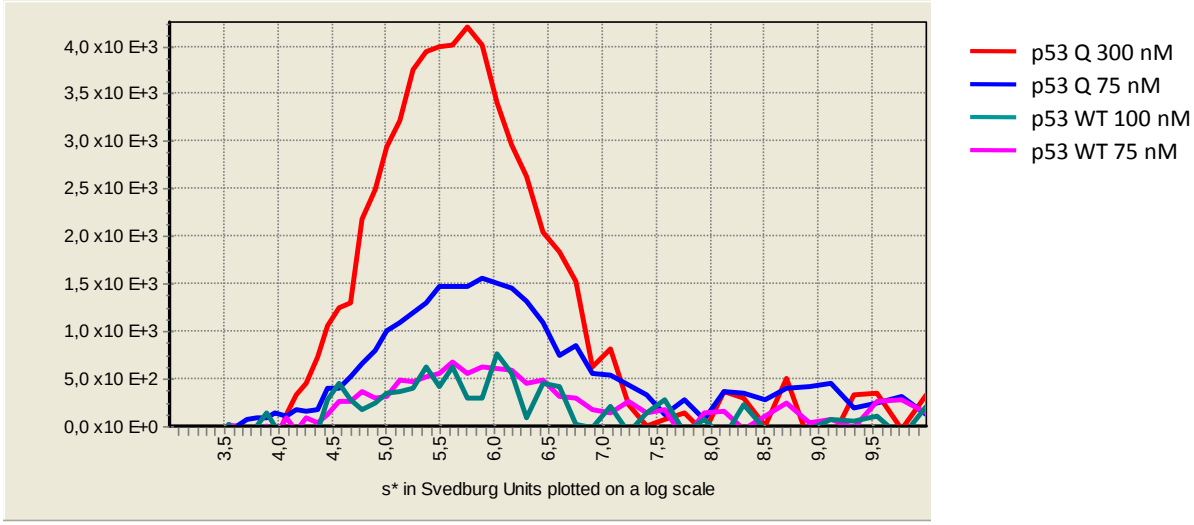

Abbildung 105 Analyse der Oligomerisierung mit Analytischer Ultrazentrifugation. Die Sedimentation wurde durch Fluoreszenz der mit Fluorescein markierten Proteine in 25 mM KPP, pH 7,2, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,2 mg/ml BSA bei 10°C und 42 000 rpm gemessen.

5.2.5 Untersuchung der *in vivo*-Aktivität der p53-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die Mutationen in der C-terminalen Domäne einen Einfluss auf die Aktivität von p53 *in vivo* besitzen, wurde der in 5.1.1.1 beschriebene Reporterassay in *S. cerevisiae* benutzt. Dazu wird p53 induzierbar in der Hefe exprimiert, welches im aktiven Zustand an sein *response element* auf einem Plasmid binden kann. Die Aktivität der exprimierten ß-Galaktosidase wird gemessen, welche mit der p53-Aktivität korreliert.

Die phosphomimetische Mutante p53 S392E zeigte eine leichte Erhöhung der Aktivität von etwa 20 % im Vergleich zum WT, wohingegen die Aktivität der C-terminal verkürzten Mutante p53 C37 nur 60 % der WT-Aktivität aufwies (Abbildung 106a).

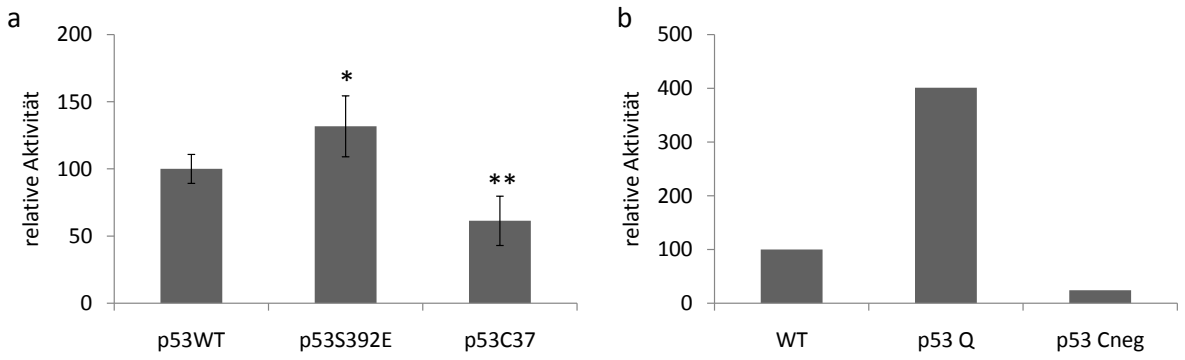

Abbildung 106 Aktivität der p53-Konstrukte *in vivo*. a Die Expression von p53wt, S392E und C37 wurde mit 20 mM CuSO4 induziert und nach 5 h die Aktivität gemessen. Die Aktivtäten wurden auf die Aktivität von p53wt normiert. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Ein ungepaarter T-Test wurde durchgeführt, um den statistischen Unterschied zwischen den Mittelwerten der jeweiligen Mutante und dem WT zu bestimmen. * $P < 0,05$ **$P < 0,01$ **b** Die Expression von p53wt, p53 Q und p53 Cneg wurde mit 100 µM CuSO4 induziert und nach 5 h die Aktivität gemessen. Die Aktivtäten wurden auf die Aktivität von p53wt normiert.

Ein Grund, wieso die phosphomimetische Mutante keinen noch höheren Anstieg in der Aktivität aufwies, könnte die Phosphoylierung von p53wt in der Hefe sein. Mit Hilfe eines Westernblots gegen an Serin 392-phosphoryliertes p53 konnte die Phosphorylierung gezeigt werden (Abbildung 107). Das bedeutet, dass schon ein Teil von p53wt in der Hefe phosphoryliert vorliegt und damit aktiviert ist, weshalb die S392E-Mutante im Vergleich zu p53wt keinen stärkeren Unterschied aufweist. Die p53-Mutante p53 Q zeigte eine viermal so hohe Aktivität wie der WT, was wohl auf die stabilisierenden Mutationen zurückzuführen ist (Abbildung 106b). Erstaunlicherweise war die p53 Cneg-Mutante inaktiver als der WT, obwohl *in vitro* eine stärkere DNA-Affinität gezeigt wurde. Das könnte an der Tatsache liegen, dass sich im C-terminalen Segment das Kernlokalisierungssignal befindet. Durch die vielen Punktmutationen ist dieses vielleicht gestört und p53 kann so nicht mehr effektiv in den Kern transportiert werden.

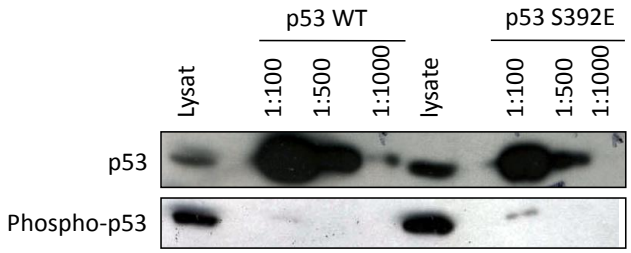

Abbildung 107 Phosphorylierungsstaus von p53 in Hefe. Westernblot mit Lysat von p53-exprimierenden Zellen und rekombinant gereinigtem p53wt und p53 S392E. Gesamt-p53 wurde mit dem Anti-p53 Antikörper Ab6 detektiert, phosphoryliertes p53 mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für S392 -phosphoryliertes p53.

6 Diskussion

6.1 Prozessierung der Hsp90-Substratproteine durch das Hsp70/Hsp90-Chaperonsystem

Hsp90 ist ein hoch konserviertes molekulares Chaperon, welches die Reifung vieler verschiedener Proteine unterstützt (Minet et al, 1999; Sato et al, 2003; Sepehrnia et al, 1996; Tariq et al, 2009). Zu diesen Substratproteinen gehören Kinasen und Transkriptionsfaktoren, die Bestandteil wichtiger Signaltransduktionswege sind. Daher nimmt Hsp90 eine zentrale Stellung der Erhaltung der zellulären Homöostase ein und beeinflusst Evolution und Krankheitsentwicklung (Rutherford & Lindquist, 1998). Biochemische und strukturelle Daten haben in den letzten Jahren sehr zum Verständnis der Regulation von Hsp90 und seiner Funktion beigetragen. Trotzdem sind längst noch nicht alle Fragen geklärt. So wurde bisher noch keine einheitliche Bindestelle der Substratproteine gefunden und es ist unklar, welche Bereiche der Substratproteine von Hsp90 erkannt werden. Vermutlich sind Cochaperone durch die Modulation des konformationellen Zyklus von Hsp90 an der Erkennung und Reifung der Substratproteine beteiligt. Wie genau sie das bewerkstelligen, ist jedoch weitgehend ungeklärt. Hsp90 kontrolliert neben der Faltung von Proteinen auch deren Abbau, wobei Hsp90 und seine Cochaperone mit anderen Systemen der Zelle, wie z.B. dem Ubiquitin-Proteasom-system, interagieren. Auch mit dem Hsp70-System steht Hsp90 in enger Wechselwirkung. So ist bekannt, dass die vom Ribosom naszierenden Substratproteine zunächst mit Hilfe von Hsp40-Co-chaperonen auf Hsp70 übertragen und dann, vermutlich über Konnektorproteine wie Sti1/Hop oder Cdc37, mit Hsp90 in Verbindung gebracht werden. Ob das für alle Hsp90-Substratproteine gilt oder ob substratspezifische Mechanismen existieren, ist bisher ebenfalls noch weitgehend unbekannt.
In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Hsp90- und Hsp70-Cochaperone auf die Aktivität von Hsp90-Substratproteinen in der Hefe untersucht. Dabei wurde die Familie der Steroidhormonrezeptoren (SHRs), die Kinase v-Src, Luciferase, ein häufig für Chaperonstudien eingesetztes Modellsubstrat, und der Transkriptionsfaktor p53 betrachtet. Durch diese Auswahl konnte der Einfluss der Cochaperone auf Proteine innerhalb einer Familie, den SHRs, und auf Proteine unterschiedlicher Klassen verglichen werden.

Einfluss des Hsp70-Systems auf die Reifung von Hsp90-Substratproteinen

Allen untersuchten Substratproteinen gemein ist die starke Abhängigkeit von Hsp70. So sind alle Proteine inaktiv, wenn kein funktionelles Hsp70 mehr in der Zelle vorhanden ist. Interessanterweise ist die Aktivität der ß-Galaktosidase durch inaktives Hsp70 nicht beeinflusst, obwohl eine

Tetramerisierung für die Funktionalität erforderlich ist und eine Hsp70-Abhängigkeit *in vitro* gezeigt wurde (Freeman & Morimoto, 1996). Trotz der großen Abhängigkeit von Hsp70 sind dennoch Unterschiede zwischen den Hsp90-Substratproteinen zu erkennen. So ist eine erhöhte Aktivität von p53, GR, AR, PR und MR in einem Hefestamm zu beobachten, in dem die Hsp70-Proteine Ssa2-4 deletiert sind und nur noch Ssa1 vorliegt. Der ER hingegen ist nicht beeinflusst vom Fehlen der drei Hsp70-Proteine. Die erhöhte Aktivität der Hsp90-Substratproteine im ΔSsa2-4-Stamm ist möglicherweise auf eine Hochregulation anderer Chaperone oder Ssa1 selbst zurückzuführen (Stone & Craig, 1990). Warum der ER hier jedoch nicht aktiver vorliegt, ist unklar, zumal eine Abhängigkeit von Hsp70 und dessen Cochaperonen gezeigt wurde.

Außerdem kann eine substratspezifische Temperaturabhängigkeit beobachtet werden (Abbildung 93). So steigt die Aktivität von p53, GR und MR bei 37°C, wohingegen eine geringere Aktivität von AR, PR und ER zu beobachten ist. Interessanterweise ist der negative Effekt der Temperaturerhöhung auf AR, PR und ER durch die Expression im ΔSsa2-4-Stamm etwas vermindert. Möglicherweise hat die erhöhte Expression anderer Chaperone oder von Ssa1 einen schützenden Effekt. Aus diesen Experimenten lässt sich ableiten, dass sich Hsp90-Substratproteine unter gleichen Bedingungen unterschiedlich verhalten, was eine substratspezifische Abhängigkeit von Chaperonen vermuten lässt. Für ß-Gal konnte ebenfalls eine Temperaturabhängigkeit beobachtet werden. So steigt die Aktivität bei 37°C um das Doppelte verglichen mit 25°C. Die MR-Aktivität steigt auch um das Doppelte, p53 und GR waren etwa 5mal so aktiv. Normalisiert man die Aktivitäten der Hsp90-Substratproteine mit der Hintergrundaktivität von ß-Gal, so ist die MR-Aktivität bei 37°C verglichen mit 25°C nicht erhöht, p53 und GR sind etwa um das Dreifache aktiver.

Um die Abhängigkeit vom Hsp70-System näher zu charakterisieren, wurden die Aktivitäten der Hsp90-Substratproteine in Hsp70-Cochaperon-KOs gemessen. Es stellte sich heraus, dass Ydj1, ein Hsp40-Cochaperon, auf jedes getestete Protein einen Einfluss hat. Erstaunlicherweise konnte sowohl ein aktivierender als auch ein inhibierender Effekt des KOs beobachtet werden. So weisen in Abwesenheit von Ydj1 p53, GR und MR eine höhere Aktivität auf, was bedeutet, dass die Anwesenheit von Ydj1 die Aktivität dieser Proteine inhibieren würde. Für GR konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte Aktivität auf ein erhöhtes Proteinlevel in der Zelle zurückzuführen ist. Nähere Untersuchungen an p53 belegen, dass der Abbau in ΔYdj1 gestört ist, sodass p53 länger in der Zelle verbleibt und damit eine höhere Aktivität messbar ist. Alle anderen getesteten Hsp90-Substratproteine sind weniger aktiv im Ydj1-KO. Für v-Src kann, entsprechend der reduzierten Aktivität, ein geringeres Level in der Zelle festgestellt werden. Das lässt vermuten, dass Ydj1 am Abbau von Hsp90-Substratproteinen beteiligt ist und dabei substratspezifisch agiert. Dementsprechend konnte in einer früheren Studie ein schützender Effekt von Ydj1 gezeigt werden, bei der der Knock-out von Ydj1 zu einem schnellen Abbau von Kinasen führt (Mandal et al, 2008). Zum anderen wurde aber auch eine

abbaufördernde Aktivität von Ydj1 beschrieben (Lee et al, 1996; McClellan et al, 2005a; Park et al, 2007).

Ein weiterer interessanter Effekt des Ydj1-KOs ist die konstitutive Aktivität mancher Hsp90-Substratproteine. So ist GR, MR und ER auch ohne die Anwesenheit des entsprechenden Hormons aktiv. Das bedeutet, dass das Fehlen von Ydj1 die Regulation der Aktivität der Rezeptoren aufhebt. Derzeit wird angenommen, dass die Bindung von Hormon die Dissoziation von Hsp90 auslöst, was in der Freisetzung der DBD, der Dimerisierungsdomänen und, im Fall von GR und MR, des nukleären Lokalisierungssignals, resultiert (Pratt & Toft, 1997). Ydj1 bringt den ungefalteten Rezeptor in den Kontakt mit Hsp70 und stimuliert dabei die ATPase-Aktivität von Hsp70 (Hernandez et al, 2002; Laufen et al, 1999). Wenn Ydj1 nun fehlt, könnte man annehmen, dass die ATPase-Aktivität von Hsp70 nicht mehr stimuliert wird und das Substrat nicht mehr effektiv an Hsp70 bindet. Die geringere Aktivität von v-Src, PR, AR und Luciferase im ΔYdj1 unterstützen dieses Modell. GR, ER, MR und auch p53 weisen jedoch eine höhere Aktivität in ΔYdj1 auf, was bedeutet, dass sich die Anwesenheit von Ydj1 negativ auf die Proteine auswirkt. Im Fall vom GR kann dieser Effekt durch die Expression der J-Domäne von Ydj1 allein rückgängig gemacht werden, d.h. nur die Stimulation der ATPase-Aktivität von Hsp70 genügt, um GR in den optimalen Zustand zurückzuführen. Für ER hingegen ist das Volllängen-Ydj1 nötig, um den Effekt des Ydj1-KOs rückgängig zu machen. Wahrscheinlich ist durch das Fehlen von Ydj1 die Regulation zwischen Faltung und Abbau gestört, was zu einer höheren Menge von p53, GR, ER und MR in der Zelle führt. Für v-Src, AR und PR hingegen führt der Ydj1-Verlust zu einer geringeren Aktivität, was möglicherweise auf einen gesteigerten Abbau zurückzuführen ist. Die Situation wird noch dadurch verkompliziert, dass sich GR, ER und MR unterschiedlich verhalten, wenn das entsprechende Hormon in der Zelle vorhanden ist. In diesem Fall steigt die Aktivität von GR und MR weiter an und erreicht ein Vielfaches ihrer Aktivität im WT-Stamm, wohingegen die ER-Aktivität nicht weiter ansteigt und so letztendlich geringer ist als im WT. Das Beispiel von Ydj1 zeigt deutlich, dass jedes Hsp90-Substratprotein sehr spezifisch auf Änderungen im Chaperonsystem reagiert, wobei möglicherweise die Balance zwischen Faltung und Abbau gestört ist.

Um aufzuzeigen, welchen Effekt eine anderweitige Änderung des Hsp70-Chaperonsystems auf die Substratproteine hat, wurden Sse1- und Snl1-Deletionsstämme verwendet. Sse1 gehört zur Hsp70-Familie, und fungiert hauptsächlich als Nukleotidaustauschfaktor für Hsp70 (Dragovic et al, 2006). Zudem besitzt es Holdasefunktion, indem Sse1 an ungefaltete Proteine bindet (Easton et al, 2000). Bei Snl1 handelt es sich ebenfalls um einen Nukleotidaustauschfaktor für Hsp70, welcher Homologien zu humanem Bag-1 aufweist (Sondermann et al, 2002). Der KO von Sse1 beeinflusst fast alle getesteten Hsp90-Substratproteine, nur die AR-Aktivität ist nicht betroffen. Interessanterweise führte der Verlust von Sse1, im Gegensatz zu Ydj1, bei den betroffenen Proteinen immer zu einer geringeren Aktivität. Das bedeutet, dass sich die Anwesenheit von Sse1 positiv auf die Aktivität der Substrat-

proteine auswirkt. Für Sse1 wurde eine Rolle im Abbau von Hsp90-Substratproteinen beobachtet (Mandal et al, 2010). Übereinstimmend damit wurde in dieser Studie im Sse1-KO eine geringere Menge an GR beobachtet. Im Fall von ΔSnl1 wurden wieder Effekte in beide Richtungen gefunden: p53, AR und MR sind aktiver im KO, während die Luciferase weniger aktiv und v-Src, ER, PR und GR nicht betroffen sind. Das zeigt eindeutig, dass jede Änderung im Hsp70-Chaperonsystem einen anderen, für das Substratprotein spezifischen Einfluss hat und die Wirkung eines Cochaperons nicht verallgemeinert werden kann.

Einfluss des Hsp90-Systems auf die Reifung von Hsp90-Substratproteinen

Der Einfluss von Hsp90 ist, im Gegensatz zu Hsp70, substratspezifisch. Jedes Substrat reagiert unterschiedlich auf die Inhibierung von Hsp90. So zeigt sich, dass MR, GR und v-Src in dieser Reihenfolge am sensitivsten auf die Inhibierung der Hsp90-Aktivität reagiert, wobei 5 bis 10 µM Radicicol für eine 80 bis 90%ige Inhibierung der Aktivität benötigt wird. PR, AR und ER, sowie p53 zeigen unter diesen Bedingungen kaum eine Abhängigkeit von Hsp90. Die p53-Aktivität kann mit 50 µM Radicicol nach längerer Inkubationszeit um 50% gehemmt werden. Das bedeutet, dass verschiedene Hsp90-Substratproteine unter den gleichen Bedingungen unterschiedliche Abhängigkeiten von Hsp90 aufweisen. Selbst innerhalb einer Proteinfamilie unterscheidet sich der Bedarf an Hsp90. Die hohe Sensitivität von MR und GR im Vergleich zu den anderen SHRs korreliert mit ihrer nahen strukturellen Verwandtschaft (Mangelsdorf et al, 1995) (Abbildung 108).

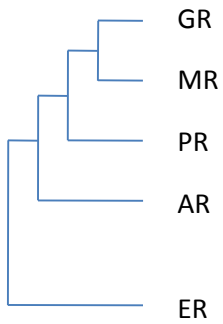

Abbildung 108 Strukturelle Verwandtschaft der SHRs. Die Verwandtschaft wurde durch ein Alignment der Aminosäuresequenzen bestimmt. Adaptiert nach Mangelsdorf et al, 1995.

Neben dem unterschiedlichen Bedarf an Hsp90 zeigt sich auch ein substratspezifisches Bedürfnis an Cochaperonen. Zunächst kann festgehalten werden, dass im Gegensatz zu den Hsp70-Cochaperonen, die auf fast jedes der getesteten Substratproteine einen Einfluss haben, zeigen die Hsp90-Cochaperone eine größere Selektivität für bestimme Substratproteine. Zweitens ist kein generelles Muster erkennbar, welches die Wirkung der Cochaperone auf die Substratproteine beschreibt. Auffällig ist, dass Hsp90-Substratproteine existieren, deren Aktivität von vielen Cochaperon-KOs gestört wird (GR, v-Src), während andere kaum von den einzelnen KOs beeinflusst werden (PR, ER).

Betrachtet man die Familie der SHRs, fällt auf, dass GR, MR und AR, von vielen Cochaperon-KOs beeinflusst werden, während der ER und der PR relativ inert gegenüber Veränderungen im Hsp90-Chaperonsystem sind. Eine mögliche Erklärung ist ihre zelluläre Lokalisation. ER und PR sind im Kern lokalisiert, während AR, GR und MR zunächst im Zytoplasma vorliegen und erst nach Hormonbindung in den Kern wandern (Echeverria & Picard, 2010). Möglicherweise ist der Einfluss der zytosolischen Hsp90-Cochaperone auf die im Kern lokalisierten SHRs weniger stark als auf die zytoplasmatischen. Diese werden mit Hilfe von Hsp90 nach Hormonbindung in den Kern transportiert (Grad & Picard, 2007), weswegen eine Änderung des Hsp90-Systems hier möglicherweise einen größeren Einfluss hat.

Obwohl GR und MR evolutionär am nahesten verwandt sind, weisen sie dennoch große Unterschiede in ihrer Cochaperon-Abhängigkeit auf. So ist GR stark von Sti1 abhängig, MR hingegen nicht. Auch der KO von Sba1 führt zu einer geringeren Aktivität von GR, während die Aktivität vom MR unbeeinflusst ist. Beide PPIasen, Cpr6 und Cpr7, haben eine aktivierende Wirkung auf den GR, jedoch wirkt sich die Anwesenheit von Cpr6 negativ auf die MR-Aktivität aus. Dafür weisen die ATPase-Aktivatoren Hch1 und Aha1 einen reprimierenden Effekt für MR auf, jedoch nicht für GR. Das zeigt deutlich, dass selbst nahe verwandte Proteine sehr unterschiedlich von den Hsp90-Cochaperonen reguliert werden.

Um den Effekt der ATPase-aktivierenden Cochaperone Aha1 und Hch1 näher zu beschreiben, wurden die Aktivitäten der Hsp90-Substratproteine in einem Stamm untersucht, in dem beide Homologe ausgeknockt waren. Dabei handelt es sich nicht um den sonst verwendeten Stammhintergrund BY4741, sondern um FY 1679-28C. Die Ergebnisse mit diesem Stamm sind teilweise widersprüchlich. So ist die MR-Aktivität, welche im Aha1- und im Hch1-KO bis zu 3fach erhöht ist, in diesem Stamm um die Hälfte reduziert. Auch der AR verhält sich widersprüchlich in den Einzel-KOs verglichen mit dem Doppel-KO. So ist die Aktivität in Abwesenheit von Hch1 um 80% reduziert, was im Aha1/Hch1-Doppel-KO nicht mehr beobachtet wird. Entweder ist diese Diskrepanz auf den veränderten Stammhintergrund zurückzuführen, oder das Verbleiben von einem der zwei Homologen in der Zelle hat eine andere Auswirkung auf die Aktivität des Substratproteins, als der Doppel-KO. Mittels Transkriptionsanalysen konnte eine veränderte Expression von Hch1 im Aha1-KO ausgeschlossen werden. Im Fall von p53 verstärkt der Aha1/Hch1-Doppel-KO den Effekt des Aha1-KOs, in dem die p53-Aktivität auf das Doppelte ansteigt. Untersuchungen hinsichtlich des Abbaus zeigen, dass p53 im Aha1/Hch1-Doppel-KO langlebiger ist als im WT, was sich auch in einer erhöhten Gesamtmenge an p53 in der Zelle wiederspiegelt. Außerdem ist p53 in diesem Stamm anfälliger für Aggregation als im WT-Stamm. Das lässt vermuten, dass die ATPase-Aktivatoren Aha1 und Hch1 in den p53-Abbau involviert sind. Eine ähnliche Situation wurde auch schon für ein anderes Hsp90-Substratprotein, CFTR, beobachtet, bei dem die Überexpression von Aha1 zu einer Destabilisierung von CFTR führte (Koulov et al, 2010).

Hop/Sti1 wird derzeit als das Konnektorprotein zwischen Hsp70 und Hsp90 angesehen, da es durch seine TPR-Domänen gleichzeitig beide Chaperone binden kann (Wegele et al, 2006). So wurde für v-Src und GR gezeigt, dass der Verlust von Sti1 zu einer geringeren Aktivität dieser Hsp90-Substratproteine führt (Chang et al, 1997). Diese Abhängigkeit wurde auch in dieser Studie belegt. Jedoch konnte kein weiteres Hsp90-Substratprotein identifiziert werden, das durch den Verlust von Sti1 beeinflusst wird. Die p53-Aktivität ist um 10% reduziert in ΔSti1, was jedoch nicht signifikant ist. Entweder es existieren andere Cochaperone, die als Konnektor fungieren, oder die Substratproteine können auch ohne ein Konnektorprotein mit Hsp90 interagieren. Möglich ist auch, dass erst unter Stressbedingungen, wie erhöhte Temperatur, der Einfluss von Sti1 sichtbar wird. Ein Hinweis darauf, dass auch andere Proteine die verbindende Funktion übernehmen können, ist Cdc37, welchem eine Rolle in der Rekrutierung von Kinasen zu Hsp90 zugesprochen wird (Grammatikakis et al, 1999; Lee et al, 2002; Lee et al, 2004).

Prozessierung von Hsp90-Substratproteinen durch das Hsp70/Hsp90-Chaperonsystem

In Abbildung 109 sind alle Daten zu einem Modell der Prozessierung von Hsp90-Substratproteinen durch das Hsp70/Hsp90-Chaperonsystem zusammengefasst. Dargestellt sind auch die Cochaperone, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, von denen aber eine Beteiligung an der Substratprozessierung bekannt ist. Das Hsp90-Substratprotein wird zunächst von Ydj1 gebunden und auf Hsp70 übertragen. Für Kinasen ist auch eine direkte Interaktion mit Cdc37 bekannt, was eine stabile Interaktion mit Hsp90 ermöglicht (Mandal et al, 2007; Vaughan et al, 2006). Die Hsp70-Aktivität wird durch Cochaperone wie Sse1, Snl1 und Ydj1 reguliert, die die Reifung des Substrats beeinflussen. Das Substrat wird dann via Sti1 auf Hsp90 übertragen, was für GR und v-Src gezeigt wurde. Für Kinasen geschieht dies möglicherweise ebenfalls mit Hilfe von Cdc37 (Theodoraki & Caplan, 2011). Hsp90 bedient sich dann aus einem Arsenal verschiedener Cochaperone, um das Substratprotein in den Zustand optimaler Aktivität zu bringen. Welches Cochaperon mit Hsp90 interagiert hängt dabei vom Substratprotein ab. Das Hsp70/Hsp90-System wechselwirkt zudem noch mit dem Ubiquitin-Proteasom-System. Eine Rolle der Cochaperone Sse1, Ydj1 und Aha1/Hch1 im Proteinabbau konnten in dieser Studie gezeigt werden und auch in der Literatur sind dazu Beispiele bekannt (Mandal et al, 2010; Mandal et al, 2008; Wang et al, 2006). Es ist anzunehmen, dass die Interaktionen des Substratproteins mit Hsp70, Hsp90 und dem Ubiquitin-Proteasom-System in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, welches durch die Cochaperone reguliert wird. Greift man nun in dieses Gleichgewicht ein, sei es durch Hsp90-Inhibition oder durch Entfernen eines Cochaperons, hat das je nach Substrat unterschiedliche Auswirkungen und kann zu Abbau oder auch Stabilisierung führen. Wahrscheinlich spielt dabei auch der Beitrag von Hsp90 eine große Rolle, welcher spezifisch für jedes Substratprotein ist. Es wird spekuliert, dass je nach Faltungspotential und Stabilität des Substrat-

proteins Hsp90 einen unterschiedlichen Beitrag zur Qualitätskontrolle leistet, was in dieser Arbeit durch die unterschiedliche Sensitivität der Substratproteine für die Inhibierung von Hsp90 veranschaulicht werden konnte. Möglicherweise wird das Chaperonsystem dem Substratprotein und der Situation in der Zelle angepasst und eine spezifische Auswahl an Cochaperonen reguliert das Gleichgewicht zwischen Abbau und Faltung.

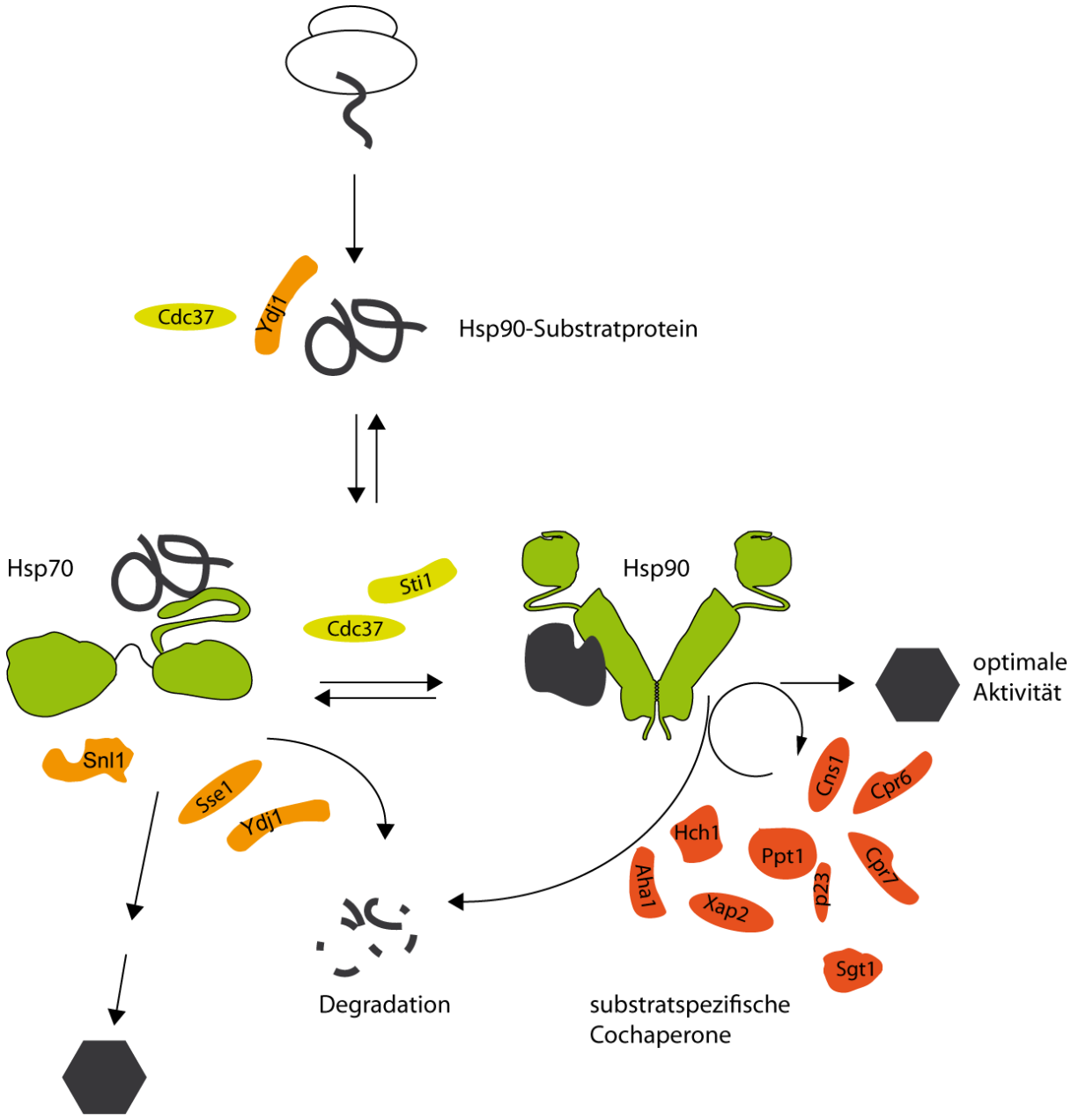

Abbildung 109 Prozessierung von Hsp90-Substratproteinen durch die Interaktion mit Hsp70. Hsp90 und deren Cochaperonen. Das vom Ribosom naszierende Substratprotein kann durch die Interaktion mit Ydj1 oder Cdc37 auf Hsp70 oder Hsp90 übertragen werden. Durch Interaktion mit Hsp70, Hsp90 und substratspezifische Cochaperone wird das Protein in den Zustand der optimalen Aktivität überführt. Ein Transfer zwischen Hsp70 und Hsp90 ist durch Cochaperone wie Sti1 oder Cdc37 möglich. Falls die Faltung des Proteins missglückt, wird es über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut, was ebenfalls durch Cochaperone, wie Sse1, Ydj1 und Aha1/Hch1 reguliert wird.

Transkriptionsanalysen der ΔYdj-1 und ΔAha1-Stämme

Der KO von Ydj1 hat zum einen Einfluss auf alle getesteten Hsp90-Substratproteine und zum anderen sind hier die größten Aktivitätsänderungen der Substrate zu beobachten. Der KO von Aha1 hingegen ist eher substratspezifisch, da nur p53, AR, MR und v-Src beeinflusst sind. Von ΔYdj1- und ΔAha1-Stämmen wurden Transkriptionsanalysen angefertigt, um Änderungen in der Expression anderer Proteine zu überprüfen.

Der KO von Ydj1 führt zu einer Vielzahl an Veränderungen der Genexpression. So sind 199 Gene mindestens 2fach stärker exprimiert, von denen 37 % funktionell mit dem Ribosom assoziiert sind. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass die ribosomalen Proteine direkt abhängig von funktionellem Ydj1 sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch das Fehlen von Ydj1 die naszierende Polypeptidkette nicht mehr so effizient in Kontakt mit Hsp70 gebracht wird und dadurch viele wichtige Proteine nicht reifen können. Durch die Überexpression an ribosomalen Proteinen versucht die Zelle möglicherweise, diesen Verlust zu kompensieren. Entgegen den Erwartungen sind keine Chaperone im Ydj1-KO hochreguliert. Neben den ribosomalen Proteinen ist von 19 % der verstärkt exprimierten Proteine keine Funktion bekannt. Ebenso kann für 50 % der Proteine, die im WT-Stamm schwächer exprimiert sind, keine Funktion zugeordnet werden.

Der KO von Aha1 führt zu viel geringeren Veränderungen als der Ydj1-KO. Hier wurden 62 Gene gefunden, deren Expression mehr als 2fach hochreguliert ist und die größten Änderungen bei Proteinen, die mit osmotischen Prozessen assoziiert sind, stattfinden. Das könnte ein Hinweis auf einen zellulären Prozess sein, der durch Hsp90, zusammen mit Aha1, reguliert wird.

6.2 Intermolekulare Regulation von p53

Ein interessantes Hsp90-Substratprotein ist der Tumorsuppressor p53. In über 50 % aller Krebsarten ist p53 mutiert oder anderweitig deaktiviert (Soussi et al, 1994; Vogelstein et al, 2000). p53 erkennt DNA-Schäden und kann entweder deren Reparatur oder, bei irreparablen Schäden, Zellzyklusarrest oder Apoptose einleiten (Lane, 1992). Die p53-Aktivität wird dabei nicht nur durch Chaperone reguliert, sondern auch durch ein riesiges Netzwerk an interagierenden Proteinen, welche die p53-Aktivität direkt oder durch posttranslationale Modifikationen beeinflussen können (Evan & Vousden, 2001; Meek, 2004). Unter normalen Bedingungen ist p53 inaktiv, was zum einen durch seine intrinsische Instabilität und zum anderen durch regulatorische Proteine, hauptsächlich durch seinen Gegenspieler Mdm2, bewerkstelligt wird. Eine besondere Stellung nimmt dabei die C-terminale Domäne von p53 ein, in der viele Aminosäuren posttranslational modifiziert werden können und die einen Einfluss auf die Stabilität des Moleküls besitzt. Ihre Rolle wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert (Ahn & Prives, 2001). Durch seine Instabilität ist die biochemische Charakterisierung von p53 nicht einfach und unvollständig. Bisher wurden hauptsächlich isolierte Domänen *in*

vitro untersucht, was ein Verständnis der intrinsischen Kommunikation der einzelnen Domänen ausschließt. In dieser Arbeit wurde daher das Volllängenprotein und Mutanten ohne Reinigungs-*Tags*, die das Verhalten des Proteins beeinflussen können, analysiert. Dabei wird deutlich, dass die C-terminale Domäne eine wichtige Rolle in der Regulation der DNA-Bindeaktivität von p53 spielt. So zeigt eine Mutante, in der Acetylierungen und Phosphorylierungen von Lysinen bzw. Serinen und Threoninen in der C-terminalen Domäne durch Mutationen imitiert sind (p53Cneg), eine viel höhere Stabilität als der WT. Des Weiteren wurde eine Mutante untersucht, bei der die Phosphorylierung nur eines Restes, Serin 392, imitiert ist. Diese weist eine höhere Affinität zu DNA als das WT-Protein auf, gefolgt von p53Cneg. p53, dem die komplette C-terminale Domäne fehlt (p53C37) hat hingegen eine geringere Affinität zur DNA. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die C-terminale Domäne einen Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten von p53 nimmt. p53-Mutanten, bei denen Teile der C-terminalen Domäne entfernt wurden, weisen mehr Dimer und Monomer auf als p53wt. Zusätzlich konnte auch *in vivo* die Korrelation der C-terminalen Domäne mit der Aktivität belegt werden. Zusammen mit Daten aus der Doktorarbeit von Marco Retzlaff (Retzlaff, 2009) kann folgendes Modell postuliert werden (Abbildung 110): Die C-terminale Domäne von p53 interagiert intermolekular mit der DNA-Bindedomäne (DBD) eines anderen Monomers und stabilisiert so das Tetramer. Das negativ geladene C-terminale Segment bindet dabei an den Bereich der DBD, der an der DNA-Bindung beteiligt ist. Posttranslationale Modifizierungen, die zu einer Erhöhung der negativen Ladung in der C-terminalen Domäne führen, stabilisieren diese Bindung zusätzlich. Das C-terminale Segment wirkt dabei möglicherweise wie ein DNA-Mimetikum, welches durch die Bindung die DBD stabilisiert, bis er durch anwesende DNA verdrängt wird. Das Fehlen der C-terminalen Domäne führt zu einer Verschiebung des Oligomergleichgewichts in Richtung des Dimers/Monomers. Durch dieses Modell kann die Regulation der p53-Aktivität durch posttranslationale Modifizierungen in der C-terminalen Domäne erklärt werden.

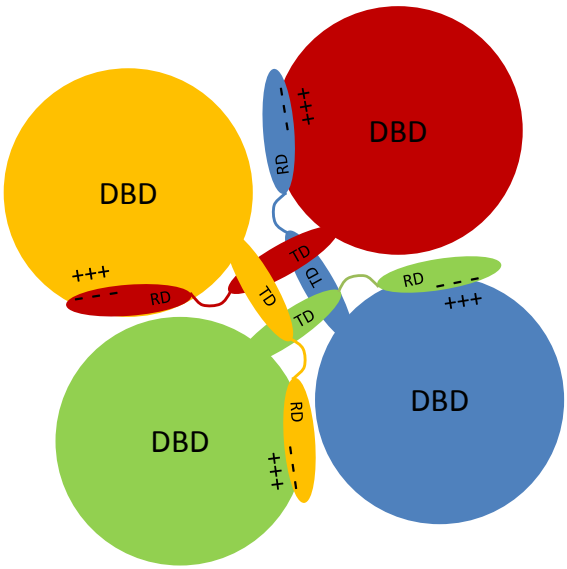

Abbildung 110 Modell der intermolekularen Regulation der p53-Stabilität über den C-Terminus. p53 bildet über seine Tetramerisierungsdomäne (TD) ein Dimer aus Dimeren. Die regulatorische Domäne (RD) stabilisiert das Tetramer, indem sie an die DNA-Bindedomäne (DBD) eines anderen Monomers über elektrostatische Wechselwirkung bindet.

7 Literatur

Abarzua P, LoSardo JE, Gubler ML, Spathis R, Lu YA, Felix A, Neri A (1996) Restoration of the transcription activation function to mutant p53 in human cancer cells. *Oncogene* **13:** 2477-2482

Agashe VR, Hartl FU (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. In *Semin Cell Dev Biol* Vol. 11, pp 15-25. England: 2000 Academic Press.

Ahn J, Prives C (2001) The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nat Struct Biol* **8:** 730-732

Akakura S, Yoshida M, Yoneda Y, Horinouchi S (2001) A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *J Biol Chem* **276:** 14649-14657

Akner G, Mossberg K, Sundqvist KG, Gustafsson JA, Wikstrom AC (1992) Evidence for reversible, non-microtubule and non-microfilament-dependent nuclear translocation of hsp90 after heat shock in human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **58:** 356-364

Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH (2006) Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. In *Nature* Vol. 440, pp 1013-1017. England

Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN (2005) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Anderson ME, Woelker B, Reed M, Wang P, Tegtmeyer P (1997) Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol* **17:** 6255-6264

Anfinsen CB, Haber E, Sela M, White FH (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47:** 1309-1314

Appella E, Anderson CW (2000) Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris)* **48:** 227-245

Argon Y, Simen BB (1999) GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol* **10:** 495-505

Arndt V, Rogon C, Hohfeld J (2007) To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci* **64:** 2525-2541

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25:** 25-29

Atencio DP, Yaffe MP (1992) MAS5, a yeast homolog of DnaJ involved in mitochondrial protein import. *Mol Cell Biol* **12:** 283-291

Ayed A, Mulder FA, Yi GS, Lu Y, Kay LE, Arrowsmith CH (2001) Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol* **8:** 756-760

Balagurumoorthy P, Sakamoto H, Lewis MS, Zambrano N, Clore GM, Gronenborn AM, Appella E, Harrington RE (1995) Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 8591-8595

Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* **319:** 916-919

Baldwin RL (1994) Protein folding. Matching speed and stability. *Nature* **369:** 183-184

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281:** 1674-1677

Bansal PK, Abdulle R, Kitagawa K (2004) Sgt1 associates with Hsp90: an initial step of assembly of the core kinetochore complex. In *Mol Cell Biol* Vol. 24, pp 8069-8079. United States

Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M (1993) mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* **12:** 461-468

Bardwell JC, Craig EA (1988) Ancient heat shock gene is dispensable. *J Bacteriol* **170:** 2977-2983

Barent RL, Nair SC, Carr DC, Ruan Y, Rimerman RA, Fulton J, Zhang Y, Smith DF (1998) Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. *Mol Endocrinol* **12:** 342-354

Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C (1993) A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev* **7:** 2565-2574

Bartlett AI, Radford SE (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat Struct Mol Biol* **16:** 582-588

Bayle JH, Elenbaas B, Levine AJ (1995) The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 5729-5733

Becker J, Walter W, Yan W, Craig EA (1996) Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol Cell Biol* **16:** 4378-4386

Bell S, Klein C, Müller L, Hansen S, Buchner J (2002) p53 contains large unstructured regions in its native state. *J Mol Biol* **322:** 917-927

Bergerat A, de Massy B, Gadelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386:** 414-417

Biggiogera M, Tanguay RM, Marin R, Wu Y, Martin TE, Fakan S (1996) Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. In *Exp Cell Res* Vol. 229, pp 77-85. United States

Blagosklonny MV, Toretsky J, Bohen S, Neckers L (1996) Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 8379-8383

Boehme KA, Blattner C (2009) Regulation of p53--insights into a complex process. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44:** 367-392

Bottger V, Bottger A, Garcia-Echeverria C, Ramos YF, van der Eb AJ, Jochemsen AG, Lane DP (1999) Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene* **18:** 189-199

Boulon S, Marmier-Gourrier N, Pradet-Balade B, Wurth L, Verheggen C, Jady BE, Rothe B, Pescia C, Robert MC, Kiss T, Bardoni B, Krol A, Branlant C, Allmang C, Bertrand E, Charpentier B (2008) The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J Cell Biol* **180:** 579-595

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72:** 248-254

Brooks CL, Gu W (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* **21:** 307-315

Brugge JS (1986) Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60src with the cellular proteins pp50 and pp90. *Curr Top Microbiol Immunol* **123:** 1-22

Brugge JS, Erikson E, Erikson RL (1981) The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins. *Cell* **25:** 363-372

Buchner J (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J* **10:** 10-19

Bullock AN, Fersht AR (2001) Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* **1:** 68-76

Bullock AN, Henckel J, Fersht AR (2000) Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* **19:** 1245-1256

Cain C, Miller S, Ahn J, Prives C (2000) The N terminus of p53 regulates its dissociation from DNA. *J Biol Chem* **275:** 39944-39953

Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG (1992) YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71:** 1143-1155

Caplan AJ, Douglas MG (1991) Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. *J Cell Biol* **114:** 609-621

Cardozo CP, Michaud C, Ost MC, Fliss AE, Yang E, Patterson C, Hall SJ, Caplan AJ (2003) C-terminal Hsp-interacting protein slows androgen receptor synthesis and reduces its rate of degradation. *Arch Biochem Biophys* **410:** 134-140

Catlett MG, Kaplan KB (2006) Sgt1p is a unique co-chaperone that acts as a client adaptor to link Hsp90 to Skp1p. In *J Biol Chem* Vol. 281, pp 33739-33748. United States

Chadli A, Bouhouche I, Sullivan W, Stensgard B, McMahon N, Catelli MG, Toft DO (2000) Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. In *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 97, pp 12524-12529. United States

Chan HS, Dill KA (1998) Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics. In *Proteins* Vol. 30, pp 2-33. United States

Chang HC, Lindquist S (1994) Conservation of Hsp90 macromolecular complexes in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **269:** 24983-24988

Chang HC, Nathan DF, Lindquist S (1997) In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol Cell Biol* **17:** 318-325

Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A (2005a) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* **86:** 627-637

Chen B, Zhong D, Monteiro A. (2006) Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. BMC Genomics., Vol. 17, p. 156.

Chen CY, Sakisaka T, Balch WE (2005b) Use of Hsp90 inhibitors to disrupt GDI-dependent Rab recycling. *Methods Enzymol* **403:** 339-347

Chen MS, Silverstein AM, Pratt WB, Chinkers M (1996) 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:** 32315-32320

Chene P (2003) Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3:** 102-109

Chiosis G, Lucas B, Shtil A, Huezo H, Rosen N (2002) Development of a purine-scaffold novel class of Hsp90 binders that inhibit the proliferation of cancer cells and induce the degradation of Her2 tyrosine kinase. *Bioorg Med Chem* **10:** 3555-3564

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265:** 346-355

Cintron NS, Toft D (2006) Defining the requirements for Hsp40 and Hsp70 in the Hsp90 chaperone pathway. *J Biol Chem* **281:** 26235-26244

Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S, Yarden Y (2006) Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J Biol Chem* **281:** 14361-14369

Clore GM, Ernst J, Clubb R, Omichinski JG, Kennedy WM, Sakaguchi K, Appella E, Gronenborn AM (1995) Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nat Struct Biol* **2:** 321-333

Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3:** 93-96

Creighton TE, Hillson DA, Freedman RB (1980) Catalysis by protein-disulphide isomerase of the unfolding and refolding of proteins with disulphide bonds. In *J Mol Biol* Vol. 142, pp 43-62. United States

Csermely P, Kajtar J, Hollosi M, Jalsovszky G, Holly S, Kahn CR, 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:** 1901-1907

Cuellar J, Martin-Benito J, Scheres SH, Sousa R, Moro F, Lopez-Vinas E, Gomez-Puertas P, Muga A, Carrascosa JL, Valpuesta JM (2008) The structure of CCT-Hsc70 NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin. In *Nat Struct Mol Biol* Vol. 15, pp 858-864. United States

Daugaard M, Rohde M, Jaattela M (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* **581:** 3702-3710

Davies TH, Sanchez ER (2005) FKBP52. *Int J Biochem Cell Biol* **37:** 42-47

Dawson R, Muller L, Dehner A, Klein C, Kessler H, Buchner J (2003) The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol* **332:** 1131-1141

Dean D, Urban G, Aragon I, Swingle M, Miller B, Rusconi S, Bueno M, Dean N, Honkanen R (2001) Serine/threonine protein phosphatase 5 (PP5) participates in the regulation of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling. *BMC Cell Biol* **2**

Dehner A, Klein C, Hansen S, Muller L, Buchner J, Schwaiger M, Kessler H (2005) Cooperative binding of p53 to DNA: regulation by protein-protein interactions through a double salt bridge. *Angew Chem Int Ed Engl* **44:** 5247-5251

Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332:** 800-805

Di Como CJ, Prives C (1998) Human tumor-derived p53 proteins exhibit binding site selectivity and temperature sensitivity for transactivation in a yeast-based assay. *Oncogene* **16:** 2527-2539

Dittmar KD, Demady DR, Stancato LF, Krishna P, Pratt WB (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J Biol Chem* **272:** 21213-21220

Dollins DE, Warren JJ, Immormino RM, Gewirth DT (2007) Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. In *Mol Cell* Vol. 28, pp 41-56. United States

Donehower LA (2002) Does p53 affect organismal aging? *J Cell Physiol* **192:** 23-33

Douglas NR, Reissmann S, Zhang J, Chen B, Jakana J, Kumar R, Chiu W, Frydman J (2011) Dual action of ATP hydrolysis couples lid closure to substrate release into the group II chaperonin chamber. In *Cell* Vol. 144, pp 240-252. United States: 2011 Elsevier Inc

Doyle SM, Shorter J, Zolkiewski M, Hoskins JR, Lindquist S, Wickner S (2007) Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity. In *Nat Struct Mol Biol* Vol. 14, pp 114-122. United States

Dragovic Z, Broadley SA, Shomura Y, Bracher A, Hartl FU (2006) Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J* **25:** 2519-2528

Duina AA, Chang HC, Marsh JA, Lindquist S, Gaber RF (1996) A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science* **274:** 1713-1715

Dumaz N, Meek DW (1999) Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J* **18:** 7002-7010

Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL (2008) Function and structure of inherently disordered proteins. In *Curr Opin Struct Biol* Vol. 18, pp 756-764. England

Dutta R, Inouye M (2000) GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. In *Trends Biochem Sci* Vol. 25, pp 24-28. England

Duval M, Le Boeuf F, Huot J, Gratton JP (2007) Src-mediated phosphorylation of Hsp90 in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is required for VEGF receptor-2 signaling to endothelial NO synthase. In *Mol Biol Cell* Vol. 18, pp 4659-4668. United States

Dyson HJ, Wright PE (2002) Insights into the structure and dynamics of unfolded proteins from nuclear magnetic resonance. *Adv Protein Chem* **62:** 311-340

Easton DP, Kaneko Y, Subjeck JR (2000) The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* **5:** 276-290

Echeverria PC, Picard D (2010) Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim Biophys Acta* **1803:** 641-649

Ellis RJ, Minton AP (2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem* **387:** 485-497

Espinosa JM, Emerson BM (2001) Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8:** 57-69

Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beste G, Scroggins BT, Neckers L, Ilag LL, Jay DG (2004) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. In *Nat Cell Biol* Vol. 6, pp 507-514. England

Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411:** 342-348

Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240:** 889-895

Falsone SF, Leptihn S, Osterauer A, Haslbeck M, Buchner J (2004) Oncogenic mutations reduce the stability of SRC kinase. *J Mol Biol* **344:** 281-291

Fan CY, Ren HY, Lee P, Caplan AJ, Cyr DM (2005a) The type I Hsp40 zinc finger-like region is required for Hsp70 to capture non-native polypeptides from Ydj1. *J Biol Chem* **280:** 695-702

Fan M, Park A, Nephew KP (2005b) CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* **19:** 2901-2914

Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* **275:** 8945-8951

Fang Y, Fliss AE, Rao J, Caplan AJ (1998) SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. *Mol Cell Biol* **18:** 3727-3734

Felts SJ, Karnitz LM, Toft DO (2007) Functioning of the Hsp90 machine in chaperoning checkpoint kinase I (Chk1) and the progesterone receptor (PR). *Cell Stress Chaperones* **12:** 353-363

Fersht AR, Daggett V (2002) Protein folding and unfolding at atomic resolution. In *Cell* Vol. 108, pp 573-582. United States

Fields S, Jang SK (1990) Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* **249:** 1046-1049

Fischer G, Bang H, Mech C (1984) [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta* **43:** 1101-1111

Freeman BC, Felts SJ, Toft DO, Yamamoto KR (2000) The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev* **14:** 422-434

Freeman BC, Morimoto RI (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:** 2969-2979

Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. In *Annu Rev Biochem* Vol. 70, pp 603-647. United States

Frydman J, Hartl FU (1996) Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science* **272:** 1497-1502

Gallo LI, Ghini AA, Piwien Pilipuk G, Galigniana MD (2007) Differential recruitment of tetratricorpeptide repeat domain immunophilins to the mineralocorticoid receptor influences both heat-shock protein 90-dependent retrotransport and hormone-dependent transcriptional activity. *Biochemistry* **46:** 14044-14057

Gamerdinger M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. In *EMBO J* Vol. 28, pp 889-901. England

Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garciarrubio A, Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem* **275:** 5668-5674

Garay-Arroyo A, Covarrubias AA (1999) Three genes whose expression is induced by stress in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **15:** 879-892

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **392:** 821-824

Garnier C, Lafitte D, Tsvetkov PO, Barbier P, Leclerc-Devin J, Millot JM, Briand C, Makarov AA, Catelli MG, Peyrot V (2002) Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. In *J Biol Chem* Vol. 277, pp 12208-12214. United States

Gautschi M, Lilie H, Funfschilling U, Mun A, Ross S, Lithgow T, Rucknagel P, Rospert S (2001) RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 3762-3767

Gautschi M, Mun A, Ross S, Rospert S (2002) A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 4209-4214

Gidalevitz T, Kikis EA, Morimoto RI (2010) A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Curr Opin Struct Biol* **20:** 23-32

Goeckeler JL, Stephens A, Lee P, Caplan AJ, Brodsky JL (2002) Overexpression of yeast Hsp110 homolog Sse1p suppresses ydj1-151 thermosensitivity and restores Hsp90-dependent activity. *Mol Biol Cell* **13:** 2760-2770

Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, 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:** 13732-13737

Grad I, Picard D (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* **275:** 2-12

Graf C, Stankiewicz M, Kramer G, Mayer MP (2009) Spatially and kinetically resolved changes in the conformational dynamics of the Hsp90 chaperone machine. In *EMBO J* Vol. 28, pp 602-613. England

Grammatikakis N, Lin JH, Grammatikakis A, Tsichlis PN, Cochran BH (1999) p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol Cell Biol* **19:** 1661-1672

Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, Haystead TA, Clark J, Mimnaugh E, Krutzsch H, Ochel HJ, Schulte TW, Sausville E, Neckers LM, Toft DO (1997) The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem* **272:** 23843-23850

Hagn F, Lagleder S, Retzlaff M, Rohrberg J, Demmer O, Richter K, Buchner J, Kessler H (2011) Structural analysis of the interaction between Hsp90 and the tumor suppressor protein p53. In *Nat Struct Mol Biol*.

Hainaut P, Hall A, Milner J (1994) Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding. *Oncogene* **9:** 299-303

Hainzl O, Lapina MC, Buchner J, Richter K (2009) The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. In *J Biol Chem* Vol. 284, pp 22559-22567. United States

Hansen S, Hupp TR, Lane DP (1996a) Allosteric regulation of the thermostability and DNA binding activity of human p53 by specific interacting proteins. CRC Cell Transformation Group. *J Biol Chem* **271:** 3917-3924

Hansen S, Hupp TR, Lane DP (1996b) Allosteric regulation of the thermostability and DNA binding activity of human p53 by specific interacting proteins. CRC Cell Transformation Group. *J Biol Chem* **271:** 3917-3924

Harris SF, Shiau AK, Agard DA (2004) The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, reveals a potential substrate binding site. In *Structure* Vol. 12, pp 1087-1097. United States

Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381:** 571-579

Hartl FU, Hayer-Hartl M (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. In *Nat Struct Mol Biol* Vol. 16, pp 574-581. United States

Haslbeck M, Braun N, Stromer T, Richter B, Model N, Weinkauf S, Buchner J (2004) Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J* **23:** 638-649

Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurtner D, Buchner J (2005) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* **12:** 842-846

Haslbeck M, Walke S, Stromer T, Ehrnsperger M, White HE, Chen S, Saibil HR, Buchner J (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J* **18:** 6744-6751

Hernandez MP, Chadli A, Toft DO (2002) HSP40 binding is the first step in the HSP90 chaperoning pathway for the progesterone receptor. *J Biol Chem* **277:** 11873-11881

Hessling M, Richter K, Buchner J (2009) Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. In *Nat Struct Mol Biol* Vol. 16, pp 287-293. United States

Hikri E, Shpungin S, Nir U (2009) Hsp90 and a tyrosine embedded in the Hsp90 recognition loop are required for the Fer tyrosine kinase activity. *Cell Signal* **21:** 588-596

Hoffmann A, Bukau B, Kramer G (2010) Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim Biophys Acta* **1803:** 650-661

Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE, White MA (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* **13:** 817-826

Horwich AL, Fenton WA (2009) Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. In *Q Rev Biophys* Vol. 42, pp 83-116. England

Horwitz J (2003) Alpha-crystallin. In *Exp Eye Res* Vol. 76, pp 145-153. England: 2003 Elsevier Science Ltd.

Hupp TR, Lane DP, Ball KL (2000) Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* **352 Pt 1:** 1-17

Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP (1992) Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* **71:** 875-886

Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP (1993) Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Res* **21:** 3167-3174

Hupp TR, Sparks A, Lane DP (1995) Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* **83:** 237-245

Huyer G, Piluek WF, Fansler Z, Kreft SG, Hochstrasser M, Brodsky JL, Michaelis S (2004) Distinct machinery is required in Saccharomyces cerevisiae for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* **279:** 38369-38378

Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S (2004) Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* **18:** 1131-1143

Jackson SE, Queitsch C, Toft D (2004) Hsp90: from structure to phenotype. *Nat Struct Mol Biol* **11:** 1152-1155

Jahn TR, Radford SE (2005) The Yin and Yang of protein folding. In *FEBS J* Vol. 272, pp 5962-5970. England

Jayaraman L, Murthy KG, Zhu C, Curran T, Xanthoudakis S, Prives C (1997) Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev* **11:** 558-570

Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* **267:** 1498-1502

Jesenberger V, Jentsch S (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3:** 112-121

Jin S, Levine AJ (2001) The p53 functional circuit. *J Cell Sci* **114:** 4139-4140

Joab I, Radanyi C, Renoir M, Buchou T, Catelli MG, Binart N, Mester J, Baulieu EE (1984) Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature* **308:** 850-853

Johnson CR, Morin PE, Arrowsmith CH, Freire E (1995) Thermodynamic analysis of the structural stability of the tetrameric oligomerization domain of p53 tumor suppressor. *Biochemistry* **34:** 5309-5316

Johnson JL, Brown C (2009) Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress Chaperones* **14:** 83-94

Johnson JL, Craig EA (2000) A role for the Hsp40 Ydj1 in repression of basal steroid receptor activity in yeast. *Mol Cell Biol* **20:** 3027-3036

Jones GW, Tuite MF (2005) Chaperoning prions: the cellular machinery for propagating an infectious protein? *Bioessays* **27:** 823-832

Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M (1993) Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* **8:** 3411-3416

Kadota Y, Amigues B, Ducassou L, Madaoui H, Ochsenbein F, Guerois R, Shirasu K (2008) Structural and functional analysis of SGT1-HSP90 core complex required for innate immunity in plants. In *EMBO Rep* Vol. 9, pp 1209-1215. England

Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* **425:** 407-410

Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. In *Nat Rev Mol Cell Biol* Vol. 11, pp 579-592. England

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* **14:** 105-111

Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC (2007) Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. In *Cell* Vol. 131, pp 257-270. United States

Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, Maier T, Chang HC, Stines AP, Georgopoulos C, Frishman D, Hayer-Hartl M, Mann M, Hartl FU (2005) Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli. *Cell* **122:** 209-220

Kim AL, Raffo AJ, Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Monaco R, Abarzua P, Fine RL (1999) Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J Biol Chem* **274:** 34924-34931

Kimura Y, Yahara I, Lindquist S (1995) Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing Hsp90-mediated signal transduction pathways. *Science* **268:** 1362-1365

Klein C, Planker E, Diercks T, Kessler H, Kunkele KP, Lang K, Hansen S, Schwaiger M (2001) NMR spectroscopy reveals the solution dimerization interface of p53 core domains bound to their consensus DNA. *J Biol Chem* **276:** 49020-49027

Koulov AV, Lapointe P, Lu B, Razvi A, Coppinger J, Dong MQ, Matteson J, Laister R, Arrowsmith C, Yates JR, 3rd, Balch WE (2010) Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. *Mol Biol Cell* **21:** 871-884

Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* **18:** 601-607

Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, Bepperling A, Haslbeck M, Buchner J (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. In *FASEB J* Vol. 24, pp 3633-3642. United States

Kubelka J, Hofrichter J, Eaton WA (2004) The protein folding 'speed limit'. *Curr Opin Struct Biol* **14:** 76-88

Kumar R, Thompson EB (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* **64:** 310-319

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274:** 948-953

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-685

Lambert PF, Kashanchi F, Radonovich MF, Shiekhattar R, Brady JN (1998) Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem* **273:** 33048-33053

Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358:** 15-16

Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356:** 683-689

Langer T, Rosmus S, Fasold H (2003) Intracellular localization of the 90 kDA heat shock protein (HSP90alpha) determined by expression of a EGFP-HSP90alpha-fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells. In *Cell Biol Int* Vol. 27, pp 47-52. England

Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J, Bukau B (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 5452-5457

Lee DH, Sherman MY, Goldberg AL (1996) Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **16:** 4773-4781

Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J* **16:** 659-671

Lee H, Mok KH, Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY, Han KH (2000) Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *J Biol Chem* **275:** 29426-29432

Lee P, Rao J, Fliss A, Yang E, Garrett S, Caplan AJ (2002) The Cdc37 protein kinase-binding domain is sufficient for protein kinase activity and cell viability. *J Cell Biol* **159:** 1051-1059

Lee P, Shabbir A, Cardozo C, Caplan AJ (2004) Sti1 and Cdc37 can stabilize Hsp90 in chaperone complexes with a protein kinase. *Mol Biol Cell* **15:** 1785-1792

Lee W, Harvey TS, Yin Y, Yau P, Litchfield D, Arrowsmith CH (1994) Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. *Nat Struct Biol* **1:** 877-890

Levinthal C. (1968) Are there pathways for protein folding? Journal of Medical Physics, Vol. 65, pp. 44-45.

Li J, Richter K, Buchner J (2011) Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. In *Nat Struct Mol Biol* Vol. 18, pp 61-66. United States

Li R, Soosairajah J, Harari D, Citri A, Price J, Ng HL, Morton CJ, Parker MW, Yarden Y, Bernard O (2006) Hsp90 increases LIM kinase activity by promoting its homo-dimerization. *FASEB J* **20:** 1218-1220

Li Z, Dai J, Zheng H, Liu B, Caudill M (2002) An integrated view of the roles and mechanisms of heat shock protein gp96-peptide complex in eliciting immune response. *Front Biosci* **7:** d731-751

Lipsich LA, Cutt JR, Brugge JS (1982) Association of the transforming proteins of Rous, Fujinami, and Y73 avian sarcoma viruses with the same two cellular proteins. *Mol Cell Biol* **2:** 875-880

Liu WL, Midgley C, Stephen C, Saville M, Lane DP (2001) Biological significance of a small highly conserved region in the N terminus of the p53 tumour suppressor protein. *J Mol Biol* **313:** 711-731

Liu XD, Morano KA, Thiele DJ (1999) The yeast Hsp110 family member, Sse1, is an Hsp90 cochaperone. *J Biol Chem* **274:** 26654-26660

Lotz GP, Brychzy A, Heinz S, Obermann WM (2008) A novel HSP90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport. *J Cell Sci* **121:** 717-723

Louvion JF, 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:** 13937-13942

Lu H, Levine AJ (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 5154-5158

Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, Rathjen JP, Bendahmane A, Day L, Baulcombe DC (2003) High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J* **22:** 5690-5699

Lu Z, Cyr DM (1998) The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J Biol Chem* **273:** 5970-5978

Mandal AK, Gibney PA, Nillegoda NB, Theodoraki MA, Caplan AJ, Morano KA (2010) Hsp110 chaperones control client fate determination in the hsp70-Hsp90 chaperone system. *Mol Biol Cell* **21:** 1439-1448

Mandal AK, Lee P, Chen JA, Nillegoda N, Heller A, DiStasio S, Oen H, Victor J, Nair DM, Brodsky JL, Caplan AJ (2007) Cdc37 has distinct roles in protein kinase quality control that protect nascent chains from degradation and promote posttranslational maturation. *J Cell Biol* **176:** 319-328

Mandal AK, Nillegoda NB, Chen JA, Caplan AJ (2008) Ydj1 protects nascent protein kinases from degradation and controls the rate of their maturation. *Mol Cell Biol* **28:** 4434-4444

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83:** 835-839

Marchenko ND, Zaika A, Moll UM (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* **275:** 16202-16212

Marquez JA, Pascual-Ahuir A, Proft M, Serrano R (1998) The Ssn6-Tup1 repressor complex of Saccharomyces cerevisiae is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. *EMBO J* **17:** 2543-2553

Martin A, Baker TA, Sauer RT (2005) Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* **437:** 1115-1120

Martinez-Ruiz A, Villanueva L, Gonzalez de Orduna C, Lopez-Ferrer D, Higueras MA, Tarin C, Rodriguez-Crespo I, Vazquez J, Lamas S (2005) S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102:** 8525-8530

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. In *J Mol Biol* Vol. 285, pp 903-907. England: 1999 Academic Press.

Mateu MG, Fersht AR (1998) Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *EMBO J* **17:** 2748-2758

Mateu MG, Sanchez Del Pino MM, Fersht AR (1999) Mechanism of folding and assembly of a small tetrameric protein domain from tumor suppressor p53. *Nat Struct Biol* **6:** 191-198

Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62:** 670-684

Mayor A, Martinon F, De Smedt T, Petrilli V, Tschopp J (2007) A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol* **8:** 497-503

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:** 34140-34146

McClellan AJ, Scott MD, Frydman J (2005a) Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell* **121:** 739-748

McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J (2005b) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol* **7:** 736-741

McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J (2007) Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. In *Cell* Vol. 131, pp 121-135. United States

McLaughlin SH, Sobott F, Yao ZP, Zhang W, Nielsen PR, Grossmann JG, Laue ED, Robinson CV, Jackson SE (2006) The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. In *J Mol Biol* Vol. 356, pp 746-758. England

McLure KG, Lee PW (1998) How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J* **17:** 3342-3350

Meek DW (2004) The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **3:** 1049-1056

Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH (2003) Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol Cell* **11:** 647-658

Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Mark Roe S, Vaughan CK, Vlasic I, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH (2004) Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. In *EMBO J* Vol. 23, pp 511-519. England

Mickler M, Hessling M, Ratzke C, Buchner J, Hugel T (2009) The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol* **16:** 281-286

Milner J, Medcalf EA, Cook AC (1991) Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol* **11:** 12-19

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:** 1459-1464

Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett* **460:** 251-256

Miralles VJ, Serrano R (1995) A genomic locus in Saccharomyces cerevisiae with four genes up-regulated by osmotic stress. *Mol Microbiol* **17:** 653-662

Mogk A, Deuerling E, Vorderwulbecke S, Vierling E, Bukau B (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. In *Mol Microbiol* Vol. 50, pp 585-595. England

Mollapour M, Tsutsumi S, Donnelly AC, Beebe K, Tokita MJ, Lee MJ, Lee S, Morra G, Bourboulia D, Scroggins BT, Colombo G, Blagg BS, Panaretou B, Stetler-Stevenson WG, Trepel JB, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH, Neckers L (2010) Swe1Wee1-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function. In *Mol Cell* Vol. 37, pp 333-343. United States

Mollapour M, Tsutsumi S, Truman AW, Xu W, Vaughan CK, Beebe K, Konstantinova A, Vourganti S, Panaretou B, Piper PW, Trepel JB, Prodromou C, Pearl LH, Neckers L (2011) Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity. *Mol Cell* **41:** 672-681

Momose Y, Iwahashi H (2001) Bioassay of cadmium using a DNA microarray: genome-wide expression patterns of Saccharomyces cerevisiae response to cadmium. *Environ Toxicol Chem* **20:** 2353-2360

Mukai H, Kuno T, Tanaka H, Hirata D, Miyakawa T, Tanaka C (1993) Isolation and characterization of SSE1 and SSE2, new members of the yeast HSP70 multigene family. *Gene* **132:** 57-66

Muller L, Schaupp A, Walerych D, Wegele H, Buchner J (2004) Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. *J Biol Chem* **279:** 48846-48854

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1:** 263-273

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:** 1133-1138

Nagaich AK, Zhurkin VB, Durell SR, Jernigan RL, Appella E, Harrington RE (1999) p53-induced DNA bending and twisting: p53 tetramer binds on the outer side of a DNA loop and increases DNA twisting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 1875-1880

Nagata Y, Anan T, Yoshida T, Mizukami T, Taya Y, Fujiwara T, Kato H, Saya H, Nakao M (1999) The stabilization mechanism of mutant-type p53 by impaired ubiquitination: the loss of wild-type p53 function and the hsp90 association. *Oncogene* **18:** 6037-6049

Nathan DF, Lindquist S (1995) Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol Cell Biol* **15:** 3917-3925

Nathan DF, Vos MH, 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:** 1409-1414

Neckers L (2006) Chaperoning oncogenes: Hsp90 as a target of geldanamycin. *Handb Exp Pharmacol***:** 259-277

Nelson RJ, Ziegelhoffer T, Nicolet C, Werner-Washburne M, Craig EA (1992) The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* **71:** 97-105

Netzer WJ, Hartl FU (1997) Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388:** 343-349

Noiva R, Lennarz WJ (1992) Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267:** 3553-3556

Ogiso H, Kagi N, Matsumoto E, Nishimoto M, Arai R, Shirouzu M, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Yokoyama S (2004) Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex. *Biochemistry* **43:** 15510-15519

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002) The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19:** 607-614

Onuchic JN, Wolynes PG (2004) Theory of protein folding. In *Curr Opin Struct Biol* Vol. 14, pp 70-75. England

Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M (2000) Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* **275:** 34122-34130

Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, Workman P, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C (2002) Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell* **10:** 1307-1318

Park SH, Bolender N, Eisele F, Kostova Z, Takeuchi J, Coffino P, Wolf DH (2007) The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell* **18:** 153-165

Park SJ, Kostic M, Dyson HJ (2011) Dynamic Interaction of Hsp90 with Its Client Protein p53. *J Mol Biol* **411:** 158-173

Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO (1993) The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* **7:** 2556-2564

Peng Y, Chen L, Li C, Lu W, Chen J (2001) Inhibition of MDM2 by hsp90 contributes to mutant p53 stabilization. *J Biol Chem* **276:** 40583-40590

Petros AM, Gunasekera A, Xu N, Olejniczak ET, Fesik SW (2004) Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. *FEBS Lett* **559:** 171-174

Pfund C, Lopez-Hoyo N, Ziegelhoffer T, Schilke BA, Lopez-Buesa P, Walter WA, Wiedmann M, Craig EA (1998) The molecular chaperone Ssb from Saccharomyces cerevisiae is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J* **17:** 3981-3989

Phillips JJ, Yao ZP, Zhang W, McLaughlin S, Laue ED, Robinson CV, Jackson SE (2007) Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90 in complexes with a co-chaperone and anticancer drugs. In *J Mol Biol* Vol. 372, pp 1189-1203. England

Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto KR (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul* **1:** 291-299

Picard D, Yamamoto KR (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* **6:** 3333-3340

Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* **40:** 41-58

Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18:** 306-360

Pratt WB, Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* **228:** 111-133

Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L (2007) PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. In *PLoS Biol* Vol. 5, p e172. United States

Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH (2000) The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J* **19:** 4383-4392

Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. In *Cell* Vol. 90, pp 65-75. United States

Rajagopalan S, Jaulent AM, Wells M, Veprintsev DB, Fersht AR (2008) 14-3-3 activation of DNA binding of p53 by enhancing its association into tetramers. *Nucleic Acids Res* **36:** 5983-5991

Raviol H, Sadlish H, Rodriguez F, Mayer MP, Bukau B (2006) Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J* **25:** 2510-2518

Rebbe NF, Ware J, Bertina RM, Modrich P, Stafford DW (1987) Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the human 90-kDa heat-shock protein family. *Gene* **53:** 235-245

Retzlaff M (2009a) Regulation von Hsp90 und seinem Substrat p53. PhD Thesis, Department Chemie Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München,

Retzlaff M, Hagn F, Mitschke L, Hessling M, Gugel F, Kessler H, Richter K, Buchner J (2010) Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. In *Mol Cell* Vol. 37, pp 344-354. United States

Retzlaff M, Stahl M, Eberl HC, Lagleder S, Beck J, Kessler H, Buchner J (2009) Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Rep* **10:** 1147-1153

Richter K, Buchner J (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* **188:** 281-290

Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010) The heat shock response: life on the verge of death. In *Mol Cell* Vol. 40, pp 253-266. United States: 2010 Elsevier Inc

Richter K, Moser S, Hagn F, Friedrich R, Hainzl O, Heller M, Schlee S, Kessler H, Reinstein J, Buchner J (2006) Intrinsic inhibition of the Hsp90 ATPase activity. *J Biol Chem* **281:** 11301-11311

Richter K, Muschler P, Hainzl O, Buchner J (2001) Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. In *J Biol Chem* Vol. 276, pp 33689-33696. United States

Richter K, Soroka J, Skalniak L, Leskovar A, Hessling M, Reinstein J, Buchner J (2008) Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. In *J Biol Chem* Vol. 283, pp 17757-17765. United States

Riggs DL, Cox MB, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Carrigan PE, Smith DF (2004) Functional specificity of co-chaperone interactions with Hsp90 client proteins. In *Crit Rev Biochem Mol Biol* Vol. 39, pp 279-295. United States

Riggs DL, Cox MB, Tardif HL, Hessling M, Buchner J, Smith DF (2007) Noncatalytic role of the FKBP52 peptidyl-prolyl isomerase domain in the regulation of steroid hormone signaling. *Mol Cell Biol* **27:** 8658-8669

Riggs DL, Roberts PJ, Chirillo SC, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Ratajczak T, Gaber R, Picard D, Smith DF (2003) The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J* **22:** 1158-1167

Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT (2000) Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20:** 8458-8467

Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* **18:** 6455-6461

Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH (2004) The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). In *Cell* Vol. 116, pp 87-98. United States

Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999) Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* **42:** 260-266

Romer L, Klein C, Dehner A, Kessler H, Buchner J (2006) p53--a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl* **45:** 6440-6460

Rous P (1911) A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *J Exp Med* **13:** 397-411

Rudiger S, Buchberger A, Bukau B (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* **4:** 342-349

Rutherford SL, Lindquist S (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396:** 336-342

Sahi C, Craig EA (2007) Network of general and specialty J protein chaperones of the yeast cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 7163-7168

Sakaguchi K, Sakamoto H, Xie D, Erickson JW, Lewis MS, Anderson CW, Appella E (1997) Effect of phosphorylation on tetramerization of the tumor suppressor protein p53. *J Protein Chem* **16:** 553-556

Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15:** 887-898

Sali A, Shakhnovich E, Karplus M (1994) How does a protein fold? *Nature* **369:** 248-251

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Labratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanchez ER, Meshinchi S, Tienrungroj W, Schlesinger MJ, Toft DO, Pratt WB (1987) Relationship of the 90-kDa murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **262:** 6986-6991

Sanchez Y, Lindquist SL (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248:** 1112-1115

Sato N, Yamamoto T, Sekine Y, Yumioka T, Junicho A, Fuse H, Matsuda T (2003) Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* **300:** 847-852

Sbroggio M, Ferretti R, Percivalle E, Gutkowska M, Zylicz A, Michowski W, Kuznicki J, Accornero F, Pacchioni B, Lanfranchi G, Hamm J, Turco E, Silengo L, Tarone G, Brancaccio M (2008) The mammalian CHORD-containing protein melusin is a stress response protein interacting with Hsp90 and Sgt1. In *FEBS Lett* Vol. 582, pp 1788-1794. Netherlands

Schaupp A, Marcinowski M, Grimminger V, Bosl B, Walter S (2007) Processing of proteins by the molecular chaperone Hsp104. In *J Mol Biol* Vol. 370, pp 674-686. England

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:** 1495-1499

Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. In *Cell* Vol. 101, pp 199-210. United States

Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* **21:** 289-296

Schmid AB (2009) The adaptor protein Sti1/Hop connects the Hsp70 and Hsp90 chaperone cycle. Department Chemie, Lehrstuhl Biotechnologie, Technische Universität München,

Schuh S, Yonemoto W, Brugge J, Bauer VJ, Riehl RM, Sullivan WP, Toft DO (1985) A 90,000-dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60v-src. *J Biol Chem* **260:** 14292-14296

Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L, Rosen N, Neckers L (2007) An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell* **25:** 151-159

Selivanova G, Ryabchenko L, Jansson E, Iotsova V, Wiman KG (1999) Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain. *Mol Cell Biol* **19:** 3395-3402

Sepehrnia B, Paz IB, Dasgupta G, Momand J (1996) Heat shock protein 84 forms a complex with mutant p53 protein predominantly within a cytoplasmic compartment of the cell. *J Biol Chem* **271:** 15084-15090

Shaner L, Morano KA (2007) All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress Chaperones* **12:** 1-8

Shaner L, Wegele H, Buchner J, Morano KA (2005) The yeast Hsp110 Sse1 functionally interacts with the Hsp70 chaperones Ssa and Ssb. *J Biol Chem* **280:** 41262-41269

Shao J, Grammatikakis N, Scroggins BT, Uma S, Huang W, Chen JJ, Hartson SD, Matts RL (2001) Hsp90 regulates p50(cdc37) function during the biogenesis of the activeconformation of the heme-regulated eIF2 alpha kinase. In *J Biol Chem* Vol. 276, pp 206-214. United States

Shao J, Irwin A, Hartson SD, Matts RL (2003) Functional dissection of cdc37: characterization of domain structure and amino acid residues critical for protein kinase binding. *Biochemistry* **42:** 12577-12588

Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V (1990) Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **10:** 6565-6577

Shiau AK, Harris SF, Southworth DR, Agard DA (2006) Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. In *Cell* Vol. 127, pp 329-340. United States

Shirasu K (2009) The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu Rev Plant Biol* **60:** 139-164

Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, Owens-Grillo JK, Chinkers M, Pratt WB (1997) Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem* **272:** 16224-16230

Silverstein AM, Grammatikakis N, Cochran BH, Chinkers M, Pratt WB (1998) p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J Biol Chem* **273:** 20090-20095

Smith DF, Toft DO (2008) Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions. In *Mol Endocrinol* Vol. 22, pp 2229-2240. United States

Smith DF, Whitesell L, Nair SC, Chen S, Prapapanich V, Rimerman RA (1995) Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol* **15:** 6804-6812

Sondermann H, Ho AK, Listenberger LL, Siegers K, Moarefi I, Wente SR, Hartl FU, Young JC (2002) Prediction of novel Bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **277:** 33220-33227

Soti C, Csermely P (2003) Aging and molecular chaperones. *Exp Gerontol* **38:** 1037-1040

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. In *J Biol Chem* Vol. 277, pp 7066-7075. United States

Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B (1994) Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* **57:** 1-9

Southworth DR, Agard DA (2008) Species-dependent ensembles of conserved conformational states define the Hsp90 chaperone ATPase cycle. In *Mol Cell* Vol. 32, pp 631-640. United States

Spence J, Georgopoulos C (1989) Purification and properties of the Escherichia coli heat shock protein, HtpG. *J Biol Chem* **264:** 4398-4403

Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* **562:** 11-15

Stancato LF, Chow YH, Owens-Grillo JK, Yem AW, Deibel MR, Jr., Jove R, Pratt WB (1994) The native v-Raf.hsp90.p50 heterocomplex contains a novel immunophilin of the FK506 binding class. *J Biol Chem* **269:** 22157-22161

Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89:** 239-250

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260:** 170-173

Stepanova L, Leng X, Parker SB, Harper JW (1996) Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev* **10:** 1491-1502

Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* **18:** 1660-1672

Stone DE, Craig EA (1990) Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **10:** 1622-1632

Street TO, Lavery LA, Agard DA (2011) Substrate binding drives large-scale conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. In *Mol Cell* Vol. 42, pp 96-105. United States: 2011 Elsevier Inc

Sullivan W, Stensgard B, Caucutt G, Bartha B, McMahon N, Alnemri ES, Litwack G, Toft D (1997) Nucleotides and two functional states of hsp90. *J Biol Chem* **272:** 8007-8012

Suzuki Y, Minami M, Suzuki M, Abe K, Zenno S, Tsujimoto M, Matsumoto K, Minami Y (2009) The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and eIF4E-transporter into stress granules and association of eIF4E with eIF4G. *J Biol Chem* **284:** 35597-35604

Szabo A, Korszun R, Hartl FU, Flanagan J (1996) A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J* **15:** 408-417

Szak ST, Mays D, Pietenpol JA (2001) Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo. *Mol Cell Biol* **21:** 3375-3386

Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. In *Nat Rev Mol Cell Biol* Vol. 11, pp 515-528. England

Takahashi A, Casais C, Ichimura K, Shirasu K (2003) HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 11777-11782

Takahashi S, Mendelsohn ME (2003) Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* **278:** 30821-30827

Tariq M, Nussbaumer U, Chen Y, Beisel C, Paro R (2009) Trithorax requires Hsp90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106:** 1157-1162

Teufel DP, Bycroft M, Fersht AR (2009) Regulation by phosphorylation of the relative affinities of the N-terminal transactivation domains of p53 for p300 domains and Mdm2. *Oncogene* **28:** 2112-2118

Theodoraki MA, Caplan AJ (2011) Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochim Biophys Acta*

Tranguch S, Cheung-Flynn J, Daikoku T, Prapapanich V, Cox MB, Xie H, Wang H, Das SK, Smith DF, Dey SK (2005) Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102:** 14326-14331

Truant R, Antunovic J, Greenblatt J, Prives C, Cromlish JA (1995) Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol* **69:** 1851-1859

Tsutsumi S, Mollapour M, Graf C, Lee CT, Scroggins BT, Xu W, Haslerova L, Hessling M, Konstantinova AA, Trepel JB, Panaretou B, Buchner J, Mayer MP, Prodromou C, Neckers L (2009) Hsp90 charged-linker truncation reverses the functional consequences of weakened hydrophobic contacts in the N domain. In *Nat Struct Mol Biol* Vol. 16, pp 1141-1147. United States

Tsutsumi S, Neckers L (2007) Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. In *Cancer Sci* Vol. 98, pp 1536-1539. England

Uesugi M, Verdine GL (1999) The alpha-helical FXXPhiPhi motif in p53: TAF interaction and discrimination by MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 14801-14806

Van Montfort R, Slingsby C, Vierling E (2001) Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* **59:** 105-156

Varley JM (2003) Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* **21:** 313-320

Vaughan CK, Gohlke U, Sobott F, Good VM, Ali MM, Prodromou C, Robinson CV, Saibil HR, Pearl LH (2006) Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. In *Mol Cell* Vol. 23, pp 697-707. United States

Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* **17:** 4668-4679

Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J (2001) A proteome analysis of the cadmium response in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **276:** 8469-8474

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408:** 307-310

Walerych D, Kudla G, Gutkowska M, Wawrzynow B, Muller L, King FW, Helwak A, Boros J, Zylicz A, Zylicz M (2004) Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **279:** 48836-48845

Walerych D, Olszewski MB, Gutkowska M, Helwak A, Zylicz M, Zylicz A (2009) Hsp70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions. *Oncogene* **28:** 4284-4294

Walker KK, Levine AJ (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 15335-15340

Wandinger SK, Richter K, Buchner J (2008) The Hsp90 chaperone machinery. In *J Biol Chem* Vol. 283, pp 18473-18477. United States

Wandinger SK, Suhre MH, Wegele H, Buchner J (2006) The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J* **25:** 367-376

Wang P, Reed M, Wang Y, Mayr G, Stenger JE, Anderson ME, Schwedes JF, Tegtmeyer P (1994) p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol* **14:** 5182-5191

Wang X, Venable J, LaPointe P, Hutt DM, Koulov AV, Coppinger J, Gurkan C, Kellner W, Matteson J, Plutner H, Riordan JR, Kelly JW, Yates JR, 3rd, Balch WE (2006) Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* **127:** 803-815

Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG, et al. (1995) p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* **10:** 188-195

Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19:** 175-178

Weber-Ban EU, Reid BG, Miranker AD, Horwich AL (1999) Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* **401:** 90-93

Wegele H, Haslbeck M, Reinstein J, Buchner J (2003) Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. *J Biol Chem* **278:** 25970-25976

Wegele H, Muller L, Buchner J (2004) Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **151:** 1-44

Wegele H, Wandinger SK, Schmid AB, Reinstein J, Buchner J (2006) Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J Mol Biol* **356:** 802-811

Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, Lee YL, Kuznetsov VA, Sung WK, Miller LD, Lim B, Liu ET, Yu Q, Ng HH, Ruan Y (2006) A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124:** 207-219

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:** 685-691

Weinberg RL, Veprintsev DB, Bycroft M, Fersht AR (2005) Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J Mol Biol* **348:** 589-596

Weinberg RL, Veprintsev DB, Fersht AR (2004) Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J Mol Biol* **341:** 1145-1159

Weissman JS, Kim PS (1993) Efficient catalysis of disulphide bond rearrangements by protein disulphide isomerase. *Nature* **365:** 185-188

Welch WJ, Feramisco JR (1982) Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem* **257:** 14949-14959

Werner-Washburne M, Craig EA (1989) Expression of members of the Saccharomyces cerevisiae hsp70 multigene family. *Genome* **31:** 684-689

Whitesell L, Lindquist SL (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* **5:** 761-772

Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91:** 8324-8328

Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, Lane DP (2004) Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* **118:** 83-97

Xu W, Marcu M, Yuan X, Mimnaugh E, Patterson C, Neckers L (2002) Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 12847-12852

Xu W, Yuan X, Xiang Z, Mimnaugh E, Marcu M, Neckers L (2005) Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nat Struct Mol Biol* **12:** 120-126

Xu Y, Lindquist S (1993) Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:** 7074-7078

Xu Y, Singer MA, Lindquist S (1999) Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 109-114

Xu Z, Horwich AL, Sigler PB (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex. *Nature* **388:** 741-750

Yang Y, Li Z (2005) Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? In *Mol Cells* Vol. 20, pp 173-182. Korea South

Young JC, Hartl FU (2000) Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J* **19:** 5930-5940

Young JC, Obermann WM, Hartl FU (1998) Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J Biol Chem* **273:** 18007-18010

Zeimet AG, Riha K, Berger J, Widschwendter M, Hermann M, Daxenbichler G, Marth C (2000) New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer. *Biochem Pharmacol* **60:** 1153-1163

Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS (1998) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* **16:** 1713-1721

Zhang M, Boter M, Li K, Kadota Y, Panaretou B, Prodromou C, Shirasu K, Pearl LH (2008) Structural and functional coupling of Hsp90- and Sgt1-centred multi-protein complexes. In *EMBO J* Vol. 27, pp 2789-2798. England

Zhang M, Kadota Y, Prodromou C, Shirasu K, Pearl LH (2010) Structural basis for assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD protein complexes: implications for chaperoning of NLR innate immunity receptors. *Mol Cell* **39:** 269-281

Zhao R, Kakihara Y, Gribun A, Huen J, Yang G, Khanna M, Costanzo M, Brost RL, Boone C, Hughes TR, Yip CM, Houry WA (2008) Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J Cell Biol* **180:** 563-578

Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM (1994) A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem* **269:** 13115-13123

Zylicz M, King FW, Wawrzynow A (2001) Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J* **20:** 4634-4638

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Julia Rohrberg, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Teile dieser Arbeit wurde in wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht.

München, Oktober 2011.

Publikationen

Im Verlauf dieser Arbeit angefertigte Publikation:

Hagn, F., S. Lagleder, M. Retzlaff, J. Rohrberg, O. Demmer, K. Richter, J. Buchner & H. Kessler. 2011. Structural analysis of the interaction between Hsp90 and the tumor suppressor protein p53. In *Nat Struct Mol Biol*.

In Vorbereitung:

Retzlaff, M., J. Rohrberg, Lagleder S., N. J. Küpper, F. Manzenrieder, A. Bepperling, H. Kessler & J. Buchner. 2011. The regulatory domain stabilizes the p53 tetramer by intersubunit contacts with the DNA binding domain.
Manuskript in Vorbereitung.

Rohrberg, J. & J. Buchner. 2011. Plasticity of Cochaperon effects on Hsp90-client processing.
Manuskript in Vorbereitung.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2007 bis Oktober 2011 im Department Chemie der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Biotechnologie unter Leitung von Prof. Dr. Johannes Buchner angefertigt.

Prof. Johannes Buchner danke ich für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung. Seine Ideen, die Diskussionsbereitschaft und der kreative Freiraum haben maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Arbeitskollegen bedanken, nicht nur für die kreative wissenschaftliche Zusammenarbeit, sondern auch für die entspannte Atmosphäre und vor allem für die lustige und schöne Zeit, die wir hier (und auch anderswo) zusammen verbracht haben. Dabei gilt mein besonderer Dank Büro 5, in dem gelacht, geschimpft, Frust abgeladen und Kuchen gegessen wurde.

Danken möchte ich auch meinen vielen Praktikanten für die Durchführung von so manchem Westernblots und ß-Gal-Assays.

Dem Elitenetzwerk Bayern danke ich für die finanzielle Unterstützung, den fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch und der schönen Zeit während der Seminare und Retreats.

Großer Dank gilt meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums und Doktorandenzeit nicht nur finanziell, sondern vor allem auch moralisch und tatkräftig unterstützt hat.