

Regulation von Hsp90 und seinem Substrat p53

Marco Retzlaff

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Thomas Kiefhaber

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. Christian F.W. Becker
3. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Die Dissertation wurde am 2. März 2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12. Mai 2009 angenommen.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Proteine	1
1.2	Proteinfaltung in vitro	1
1.3	Proteinfaltung in vivo	3
1.4	Molekulare Chaperone	5
1.5	Das Molekulare Chaperon Hsp90	10
1.5.1	Unterschiede und Sonderfälle der Hsp90-Familie	10
1.5.2	Domänenstruktur von Hsp90-Proteinen	10
1.5.3	Struktureller Aufbau von Hsp90	11
1.5.4	Das „aktive“ Chaperone Hsp90	14
1.5.5	Inaktivierung von Hsp90 durch spezifische Inhibitoren	15
1.5.6	Modellierung der Hsp90 Aktivität durch Co-Chaperone	17
1.5.7	Modellierung der Hsp90 Aktivität durch post-translationale Modifikationen	21
1.5.8	Mechanismus der S-Nitrosylierung	23
1.5.9	Hsp90 Substrate	24
1.6	Der Tumorsuppressor p53	25
1.6.1	Domänenstruktur von p53	26
1.6.2	Die DNA-Binderegion	27
1.6.3	Die Tetramerisierungsdomäne	28
1.6.4	Die Regulationsdomäne	29
1.6.5	Die Quartärstruktur von p53	30
1.7	Post-translationale Modifikationen	31
1.7.1	Phosphorylierung	32
1.7.2	Acetylierung	33
1.7.3	Ubiquitinierung	33
1.7.4	Weitere Modifikationen von p53	34
1.8	Die Regulation von p53 durch Chaperone	34
1.8.1	p53 und Hsp70/Hsp40	35
1.8.2	p53 und Hsp90	35
1.9	Problemstellung	37
2	MATERIAL UND METHODEN	39
2.1	Verwendete Materialien	39
2.1.1	Chemikalien	39
2.1.2	Proteine und Antikörper	40
2.1.3	Größenstandards, Kits und sonstige Materialien	40
2.1.4	Geräte	41
2.2	Verwendete Kulturen und Medien	44
2.2.1	Bakterienstämme	44
2.2.2	Hefestämme	44
2.3	Molekularbiologische Methoden	45
2.3.1	Anzucht und Aufbewahrung von E. coli	45
2.3.2	Anzucht und Aufbewahrung von S. cerevisiae	45
2.3.3	Herstellung chemisch-kompetenter E. coli-Zellen	45
2.3.4	Transformation mit Plasmiden in E. coli Stämme	46
2.3.5	Transformation von S. cerevisiae mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode	46
2.3.6	Vektoren	46
2.3.7	Oligonukleotide	47

2.3.8	Plasmide	48
2.3.9	Medien	50
2.3.10	Antibiotika	51
2.3.11	Puffer für molekularbiologische Methoden	51
2.3.12	Polymerase-Kettenreaktion PCR	52
2.3.13	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	52
2.3.14	Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmente	53
2.3.15	Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA	53
2.3.16	Restriktionsverdau	54
2.3.17	Dephosphorylierung von DNA-Enden	54
2.3.18	Ligation	54
2.3.19	DNA Sequenzanalyse	55
2.4	Proteinanalytische Methoden	55
2.4.1	Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.4.2	Nativ-Gelelektrophorese	56
2.4.3	Immunoblotting (Western Blot)	56
2.4.4	Electrophoretic Mobility Shift Assay	57
2.4.5	Methoden der Proteinreinigung	58
2.4.6	Verwendete Puffer für die Reinigung von Hsp90 und p53	59
2.4.7	Anzucht von Bakterienkulturen	60
2.4.8	Zellaufschluss	60
2.5	Chromatographische Methoden	60
2.5.1	Affinitätschromatographie mit Ni-Sepharose als Säulenmaterial	60
2.5.2	Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose als Säulenmaterial	61
2.5.3	Ionenaustauscherchromatographie	61
2.5.4	Abspaltung des His ₆ -tag durch Thrombinverdau	62
2.5.5	Chromatographie mit Hydroxyapatit-Säulenmaterial	62
2.5.6	Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)	62
2.5.7	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	63
2.5.8	Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	64
2.5.9	Modifizierung von Proteinen durch in vitro S-Nitrosylierung	64
2.5.10	Ellmann Assay	65
2.6	Spektrometrische Methoden	65
2.6.1	Maldi ToF/ToF Massenspektrometrie	65
2.6.2	Probenvorbereitung für die MS-Analyse von Proteinen nach Trypsinverdau	66
2.7	Kalorimetrische Verfahren	67
2.7.1	Differenzial-Scanning Kalorimetrie (DSC)	67
2.8	Multidimensionale Kernresonanz Spetrokopie (NMR)	67
2.8.1	Struktur-Kalkulation und Molekulares Docking	68
2.9	Spektroskopische Methoden	69
2.9.1	UV/Vis-Spektroskopie	69
2.9.2	Fluoreszenzspektroskopie	70
2.9.3	Fluoreszenztitration	71
2.9.4	Fluoreszenzpolarisation	72
2.9.5	Fluoreszenzspektroskopie der ANS Bindung	73
2.9.6	Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	74
2.9.7	Dimeraustausch von Hsp90 gemessen mit FRET	75
2.9.8	Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation	76
2.9.9	Circulardichroismus	77
2.10	Stabilitätsuntersuchungen an Proteinen	79
2.10.1	Chemische Denaturierung und Renaturierung	79

2.11	Biochemischen Methoden zur Bestimmung von Aktivitäten	80
2.11.1	Regenerativer-enzymgekoppelter ATPase Aktivitätsassay	80
2.11.2	Unterdrückung von thermisch induzierter Aggregation (Chaperon Assay)	83
2.11.3	Hsp90 vermittelte Reverse Transkriptase- Aktivität	84
2.11.4	Hsp90 vermittelte v-Src Aktivität	85
3	ERGEBNISSE	87
3.1	Domänenstruktur von Hsp90	87
3.2	Charakterisierung der Hsp90 Mitteldomäne	88
3.2.1	Struktur- und Stabilitätsanalyse der Hsp90 Mitteldomäne	89
3.3	Die Hsp90 C-terminale Domäne	94
3.4	Die Regulation von Hsp90 durch einen C-terminalen „Druckpunkt“	96
3.4.1	Die Konservierung des Druckpunkts	96
3.4.2	ATPase Aktivität der Hsp90 Cystein-Mutanten und der Einfluss der in vitro S -Nitrosylierung	98
3.4.3	Der Einfluss auf die Hsp90 Aktivität durch Substitution einer Aminosäure	100
3.4.4	Der Einfluss der Co-Chaperone auf die ATPase Aktivität von Hsp90 Varianten	102
3.4.5	Strukturelle Untersuchung der Hsp90 Mutanten	104
3.4.6	Strukturelle und kinetische Untersuchung der Hsp90 Varianten mittels FRET	107
3.4.7	Auswirkungen der Hsp90 Mutationen auf die Prozessierung der Reversen Transkriptase	112
3.4.8	In vivo Charakterisierung der Hsp90 Mutanten	114
3.4.9	Zusammenfassung: S-Nitrosylierung: die post-translationale Modifikation von Hsp90 am C-term. Druckpunkt	116
3.5	Die Regulation von Hsp90 durch das Co-chaperon Aha1	117
3.5.1	Die Domänenstruktur von Aha1	117
3.5.2	Aha1 bindet mit beiden Domänen an Hsp90	119
3.5.3	Bindung von Aha1 und Aha1 Fragmenten an Hsp90 und die Brückenfunktion von Aha1	121
3.5.4	Aha1 Bindung an die Mutante yHsp90V391E	123
3.5.5	Aha1 stimuliert die Hsp90-Untereinheiten in cis und trans	125
3.5.6	Die Bindung von Aha1 erfolgt an die N-terminale und Mitteldomäne von Hsp90	127
3.5.7	Zusammenfassung: Der Aktivierungsmechanismus von Hsp90 durch Aha1 zeigt eine Brückenfunktion von Aha1 und die gleichzeitige cis- und trans-Stimulierung	131
3.6	Die Substraterkennung und Prozessierung des molekularen Chaperones Hsp90	134
3.6.1	Die Interaktion von Hsp90 mit dem Tumorsuppressor p53	134
3.6.2	Interaktionseigenschaften von Hsp90 mit p53	136
3.6.3	Der Einfluss der Co-Chaperone auf die Substraterkennung von Hsp90	138
3.6.4	Die Substraterkennung von Hsp90 ist nukleotid-unabhängig	140
3.6.5	Die induzierte Dissoziation des Chaperon-Substrat-Komplexes durch DNA	141
3.6.6	Bestimmung der Interaktionsfläche zwischen Hsp90MD und p53 DBD	143
3.6.7	Die Interaktionsfläche der Co-Chaperone Aha1 und Sti1 mit der Hsp90MD	145
3.6.8	Die Interaktionsfläche von p53 ist in der Hsp90 Familie konserviert	146
3.6.9	Kreation individueller Hsp90 Punktmutanten zur Charakterisierung der Substraterkennung	148
3.6.10	Der Einfluss der Punktmutationen von Hsp90 auf die Substraterkennung	149
3.6.11	In vivo Analyse der Hsp90 Punktmutanten	150
3.6.12	In vivo Stimulierung der p53 Aktivität durch Hsp90	152
3.6.13	Zusammenfassung: Die Substraterkennung von Hsp90 ist hauptsächlich von der Hsp90 Mitteldomäne abhängig, nukleotid-unabhängig und verschieden für unterschiedliche Substrate	153
3.7	Die Domänenkommunikation im tetrameren p53	155
3.7.1	Die Domänenstruktur von p53 und die Konservierung der Regulationsdomäne	155
3.7.2	Beiträge der individuellen Domänen auf die Stabilität von p53	157
3.7.3	Das Oligomerisierungsverhalten von p53 wird durch die Regulationsdomäne beeinflusst	160
3.7.4	Die DNA-Bindeaffinität von p53 wird sowohl von der N-terminalen als auch von der Regulationsdomäne beeinflusst	161
3.7.5	Die Regulationsdomäne von p53 interagiert mit der DNA-Binderegion	163

3.7.6	Die Serin-Phosphorylierung erhöht die Affinität des C-terminalen Peptids zu p53	165
3.7.7	Erzeugung und Charakterisierung einer C-terminal verlängerten p53 Cystein-Mutante	167
3.7.8	Die p53_394C Mutante bildet kovalente Oligomere aus	169
3.7.9	Kovalente Verknüpfung von p53_394C mit einem Bimane-basierten fluoreszenzaktiven Crosslinker	170
3.7.10	Die spezifische, kovalente Verknüpfung von p53_394C Untereinheiten über dem thiol-spezifischen, wasserlöslichen Crosslinker BM(POE) ₂	172
3.7.11	Identifikation der spezifischen inter-molekularen Interaktion des Cys-394 mit Cys-182	174
3.7.12	Analyse der DNA Bindeeigenschaft und der Molekülgestalt von p53 Varianten über analytische Ultrazentrifugation	176
3.7.13	Das tetramere p53 wird durch ein Zusammenspiel der Domänen funktionalisiert	177
4	DISKUSSION	180
4.1	Konformationsgleichgewichte in den Hsp90-Proteinen	180
4.2	Ein konservierter „Druckpunkt“ in der Hsp90-Familie reguliert die Hsp90 Aktivität	180
4.3	Das Co-Chaperon Aha1 aktiviert Hsp90 über einen intermediären, kompakten Zustand	181
4.4	Die Interaktion von Hsp90 und p53	183
4.5	Die <i>inter</i> -molekularen Wechselwirkungen im tetrameren p53	184
5	LITERATURVERZEICHNIS	186

**Meinen Eltern
Ingrid und Bruno**

1 Einleitung

1.1 Proteine

Proteine sind essentielle Bausteine des Lebens. Die Bezeichnung *Protein* ist aus dem Alt-Griechischen *proteuo*, „ich nehme den ersten Platz ein“ und *protos*, „erstes“, „wichtigstes“ abgeleitet worden. Proteine sind linear Polymere, aufgebaut aus 20 Aminosäuren, die in einer für jedes Protein spezifischen Abfolge über Peptidbindungen miteinander kovalent verknüpft werden. Die exakte Abfolge der Verknüpfung, die Primärsequenz der Proteine, ist als universeller Code auf dem entsprechenden Gen abgelegt. Aktivierte Aminosäuren werden im Zytoplasma der Zelle am Ribosom verknüpft. Dabei wird die genetische Information in die Bildung der Proteinen übersetzt (*Translation*).

Proteine übernehmen eine schier unüberschaubar große Anzahl von Funktionen in lebenden Organismen. Katalysieren Proteine chemische Reaktionen z.B. im Stoffwechsel der Zelle, werden sie als Enzyme bezeichnet. Proteine übernehmen aber auch weitere biologische Funktionen in der Immunabwehr, der Strukturbildung oder im Transport von Makromolekülen. Können mit der Nahrung nicht genügend Proteine dem menschlichen Organismus zugefügt werden, kommt es zu Proteinmangelkrankheiten, wie Kwashiorkor, eine Krankheit, die meist Kinder betrifft und sich in einem so genannten Hungerbauch, eine übermäßige Einlagerung von Wasser, äußert (Rubin, 2008)..

Für die Funktionalität der Proteine ist aber nicht nur ihre Primärsequenz von Bedeutung. Die Ausbildung der korrekten, dreidimensionalen Faltung, sowie die Bildung von höheren Assoziaten entscheidet darüber, ob ein Protein aktiv in den Lebenszyklus der Zelle eingreift oder abgebaut wird.

1.2 Proteinfaltung in vitro

Die Faltung von Proteinen beschreibt im Wesentlichen einen physikalischen Prozess, bei dem ein Polypeptid eine definierte, dreidimensionale Struktur einnimmt. In den 1960er Jahren wurde der Grundstein zum Verständnis der Proteinfaltung wesentlich von Christian B. Anfinsen gelegt, der mit seinen Versuchen zur Rückfaltung von chemisch denaturierte Ribonuklease A zeigen konnte, dass die zur Ausbildung der korrekten, reversiblen Faltung benötigte Information in der Primärsequenz des Proteins enthalten ist (Anfinsen *et al.*, 1961; Anfinsen, 1973). Die native Faltung eines Proteins ist die Grundvoraussetzung für

seine Aktivität (Dill et al., 1995). Bei der Faltung spielt eine Vielzahl verschiedener Faktoren zusammen, wie die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Aminosäuren oder deren Freiheitsgrade. Die Faltung eines Proteins ist von all diesen Faktoren und von zusätzlichen atomaren Interaktionen abhängig, wobei der Faltungsprozess kooperativ verläuft (Go & Taketome 1978, Kortemme et al., 1998). Eine Vorhersage der finalen Struktur eines Proteins aus der Primärstruktur ist bis heute allerdings nur eingeschränkt möglich (Fersht & Daggett, 2002) und zeigt die Grenzen des Verständnisses über die vorhersagbare Proteinfaltung auf. Ein Konsensus der entwickelten Modelle kann auf die meisten bisher untersuchten Proteine übertragen werden. Ein Grundsatz beruht dabei auf dem *Levinthal Paradoxon*, das besagt, dass ein Protein seine native Konformation nicht durch eine statische Suche innerhalb des biologischen Zeitraums finden kann. Es wird daher davon ausgegangen, dass gerichtete Faltungswege existieren (Levinthal, 1968). Auf diesen Wegen führt der Faltungsvorgang über die Ausbildung von Faltungskernen (Fersht, 1997) und über einen schnellen Kollaps zu einer Struktur mit bereits ausgebildeten Sekundärstrukturen. Daraufhin wird der Hauptanteil der hydrophoben Aminosäurereste im Inneren des Proteins angeordnet, was zu einem vollständigen Wasserausschluss im Kern des Moleküls (Creighton, 1990) und zur Ausbildung der Tertiärstruktur führt. Auf dem Weg zur nativen Konformation durchläuft ein Protein ausgehend von der ungefalteten Peptidsequenz Intermediate, energetisch unterschiedliche lokale Minima. Der Faltungsweg und die damit verbundenen unterschiedlichen Energiezustände des Moleküls, kann durch einen Trichter bildlich veranschaulicht werden (**Abb. 1-1**). Der obere Rand entspricht hierbei dem Ensemble ungefalteter Zustände hoher innerer Energie, während die native Struktur das globale Minimum darstellt (N). Die Innenwand des Trichters repräsentiert das Energie-Potential ΔG , welches im Verlauf der Faltung durchschritten wird. Erhöhungen entsprechen energetisch ungünstigen Konformationen, lokale Minima entsprechen Intermediatskonformationen oder energetisch stabileren, falschen Konformationen (Dill & Chan, 1997; Gruebele, 2000).

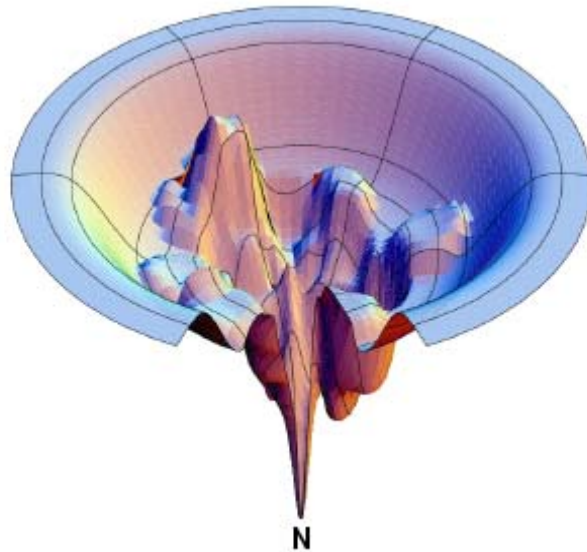


Abbildung 1-1: Faltungstrichter nach Dill & Chan (1997)

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

1.3 Proteinfaltung in vivo

Die Proteinfaltung in lebenden Organismen unterscheidet sich von der Faltung der isolierten Proteine in Lösung hauptsächlich dadurch, dass die Faltung der am Ribosom synthetisierten Proteine bereits während der Synthese beginnt (Bergmann & Kuehl, 1979; Braakman et al., 1991). Schon in diesem frühen Stadium kann es zur Fehlfaltung oder Aggregation kommen (Craig et al., 2003), wobei, wenn diese Fehlfaltung irreversibler Natur ist, die Proteine den energetisch ungünstigen proteolytischen Abbau zugeführt werden. Bei einer zellulären Proteinkonzentration von bis zu 400 mg/ml (Ross & Miton, 1977, Fulton, 1982) und einer Syntheserate von 60.000 Proteinen in der Minute (Lorimer, 1996), ist die Fehlerrate bei der Faltung neu synthetisierter Proteine, die sofort dem Abbau zugefügt werden, mit 30 % entsprechend hoch (Schubert et al., 2000). Zur Verringerung der Aggregationsvorgänge in der Zelle haben sich evolutiv mehrere Klassen von Faltungshelfer-Proteinen herausgebildet, die verschiedene Schritte der Proteinfaltung kontrollieren (Buchner, 1996, Hartl, 1996). Eine spezielle Gruppe von Faltungshelfern hilft individuelle Faltungsreaktionen zu beschleunigen, damit das Protein schnell seine native Struktur einnimmt und aggregationsanfällige Faltungsintermediate vermieden werden (Gething & Sambrook, 1992). In der Faltung von Proteinen können vor allem zwei langsam ablaufende und daher geschwindigkeitsbestimmende Schritte katalysiert werden, die Bildung korrekter Disulfidbrücken (Darby et al., 1994) und die Isomerisierung der

Prolyl-Peptidbindungen (Brandts et al., 1975). Für beide Schritte haben sich selektiv Faltungskatalysatoren herausgebildet, zum einen die Protein-Disulfid Isomerasen (PDIs) (Freedman et al., 1994; Gruber et al, 2006) und zum anderen die Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) (Fischer et al, 1984, Fischer und Aumuller, 2003). PDIs wirken im Endoplasmatischen Retikulum, wo sie die korrekte Ausbildung von *intra*-molekularen Disulfidbrücken katalysieren. PPIasen zeichnen sich durch einen ähnlichen Wirkungsmechanismus aus. Hier binden PPIasen ihre Substrate in einem Übergangszustand, der einer teilweisen rotierten $C_{\text{xaa}}-N_{\text{Pro}}$ Bindung entspricht, und katalysieren die Isomerisierungsrate der Peptidylprolyl-Bindung durch die Erniedrigung der Aktivierungsenergie für die Rotation um diese Bindung (Fanghanel & Fischer, 2004). Dabei erhöhen PPIasen die Reaktionsgeschwindigkeit z.B. des Substrates RNase T1 bei der Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerisierung um das Dreihundertfache (Schonbrunner et al., 1991). Die PPIasen teilen sich zwar den gleichen Wirkungsmechanismus, unterscheiden sich aber erheblich in Größe, Struktur und Substratspezifität und werden in die Klassen der Cyclophiline, der FK506-bindenden Proteine (FKBPs) und der Parvuline. In der Therapie eingesetzte Immunsuppressiva basieren auf der selektiven Inhibierung der PPIase-Aktivität (Fischer, 1994).

Trotz dieser verschiedenen Faltungshelfer können Proteine aggregieren und zu dauerhaften Schädigungen des Zelle und des Organismus führen. Die Aggregationsanfälligkeit spezifischer Proteine wird auch als Ursache für eine Reihe von neurodegenerativen Krankheiten vermutet. Die Ablagerung von Proteinaggregaten im Gehirn von Säugern kann zur Alzheimer Krankheit (Beyreuther et al., 1991) und zur Prionenerkrankung (Prusiner, 1996) führen. Weitere Krankheiten, die durch eine Aggregation fehlgefalteter Proteine hervorgerufen wird, ist die Lateralsklerose (Shibata et al., 2000), Morbus Parkinson (Lucking & Brice, 2000), sowie die Chorea Huntington (Bates, 2003). Dabei bilden sich Plaques und andere Ablagerungskörper aus, die Neuronen und Motorneuronen zerstören können, was wiederum eine Funktionsverlust der Muskulatur zur Folge hat (Bossy-Wetzel et al., 2004).

Verschiedene Qualitätskontrollen von Proteinen haben sich im eukaryontischen System ausgebildet. So veranlasst eine Ansammlung ungefalteter Proteine im Cytosol eine so genannte *heat shock response*, die eine erhöhte Syntheserate von Faltungshelfern bewirkt (Morimoto et al, 1996). Eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle spielt das Endoplasmatische Retikulum (ER). Das ER besitzt durch einen Mechanismus, der

„Unfolded Protein Response“ (UPR) genannt wird, die Möglichkeit, die korrekte Faltung von Proteinen auch während Stresssituationen zu gewährleisten. Bei der UPR wird die Translation von Protein verringert und Signalewege, die zu einer erhöhten Expression von molekularen Chaperonen führt, aktiviert oder die Apoptose der Zelle initiiert. Proteine, die im ER nicht in der Lage sind, ihre native Konformation einzunehmen, werden durch den SEC61-Porenkomplex in das Cytosol retranslokiert und dort durch Proteasen abgebaut (Tsai & Rapoport, 2002; Kostova & Wolf, 2003). Die Erkennung von falsch gefalteten oder auch mutierten Proteinen im ER zusammen mit den ubiquitin-basierten Abbau der Proteine im Cytosol nennt man „*ER associated degradation*“ (ERAD).

1.4 Molekulare Chaperone

Neben den Faltungskatalysatoren hat sich eine weitere Gruppe von Proteinen herausgebildet, die mit aggregationsanfälligen Proteinen interagieren und somit direkt in Konkurrenz zur Aggregationsreaktion stehen (Buchner, 1996, Walter und Buchner, 2002). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie werden molekulare Chaperone genannt, die meist essentielle Funktionen für die Zelle übernehmen. Molekulare Chaperone sind komplexe, hochkonservierte Proteinmaschinerien, die unter Stressbedingungen eine erhöhte Syntheserate aufweisen und somit zu den klassischen Hitzeschockproteinen (Hsp) gehören (Georgopoulos et al., 1993). Beim Auftreten anderer Stressfaktoren wie oxidativer Stress oder zellschädigende Substanzen, wird ebenfalls eine erhöhte Expressionsrate der Hitzeschockproteine beobachtet (Gething et al., 1992; Ruddock et al. 1999).

Die Familie der Chaperone kann in fünf Gruppen unterteilt werden (**Abb. 1-2**), wobei die Einteilung hauptsächlich über die molekulare Größe stattfindet. Die Familie der Chaperone zeichnet sich vor allem durch eine vergleichbare Funktion aus. Innerhalb jeder Gruppe besitzen die einzelnen Mitglieder eine hohe Sequenzhomologie, die charakteristisch für jede Gruppe ist und nicht übertragen werden kann. Im Einzelnen handelt es sich dabei um folgende Unterteilungen: die Hsp100/Clp Familie (Parsell et al., 1994; Schirmer et al., 1996), die Hsp90 Familie (Prodromou et al., 2003, Richter et al., 2001, Wegele et al., 2004, Young et al., 2001), die Hsp70 Familie (Bukau et al., 1998, Craig et al., 2003), die Hsp60 Familie (Beissinger et al., 1998; Goloubinoff et al., 1989; Lorimer et al., 1996; Walter et al., 2002; Martin et al., 1992) und die Familie der kleinen Hitzeschockproteine (Haslbeck et al., 2002, Mournier et al., 2002, Van Montfort et al., 2001).

Die identische Funktion der Chaperone besteht darin, Zellfunktionen aufrecht zu erhalten, in dem sie mit aggregationsanfälligen Substraten interagieren und diese entweder in die

native und daher aktive Konformation überführen oder sie in dieser halten. Dabei erkennen Chaperone ein weites Spektrum von Substraten, die eine aggregationsanfällige oder partiell ungefaltete Struktur mit exponierten hydrophoben Resten teilen (Walter & Buchner, 2002). Das Auftreten von Chaperonen erhöht die Toleranz der Zelle gegenüber Stressbedingungen, die zu einer vermehrten Aggregation von Proteinen führen würden (Lindquist et al., 1988).

Die Familie der Hsp60-Proteine, zu denen das *E. coli* Protein GroEL und das humane CCT gehören sind Oligomere, die einen abgeschlossenen Raum bilden, in dem aggregationsanfällige Proteine mit hydrophoben Oberflächen isoliert werden (Mayhew et al., 1996). Durch die weitere Interaktion mit dem Co-Chaperon GroES können Proteine unter dem Schutz der Chaperone zur nativen Konformation finden und werden über eine ATP-getriebene Reaktion wieder entlassen. Die Anwesenheit der Nukleotide ATP und ADP reguliert dabei einerseits die Affinität des Chaperons zum Substrat (Fenton & Horwich, 1997) und andererseits die Konformation des Chaperons, die dadurch entweder eine Bindestelle für Substrate freilegt oder verbirgt (Xu et al., 1997).

Die Mitglieder der Hsp70 Chaperon-Familie können in allen Lebewesen, bis auf einige Archaeenarten, gefunden werden. Es wurden allein in *S. cerevisiae* 14 verschiedene Gene dieser Familie identifiziert (Craig & Yan, 1999) und einige Vertreter besitzen sehr spezifische Funktionen, wie das im ER lokalisierte Hsp70 Homologe BiP (heavy chain binding protein) (Haas & Wabl, 1983). Die Domänenstruktur von Hsp70 weist eine N-terminale ATPase Domäne mit ≈ 44 kDa auf, die getrennt durch einen flexiblen Linker mit der Substratbindedomäne von ≈ 30 kDa verbunden ist. Hsp70 Proteine können Dimere ausbilden, die Ähnlichkeit mit dem Substratkomplex aufweisen. Allerdings kann durch Zugabe von Substratpeptid oder ATP die Dimerisierung wieder aufgelöst werden (Blond-Elguind et al., 1993; Benaroudj et al., 1995; Knarr et al., 2002). Wie auch bei GroEL reguliert die Nukleotidbindung die Substrataffinität. Im ADP gebundenen Zustand besitzt Hsp70 eine hohe Affinität, im ATP gebundenen Zustand eine niedrige Affinität zu Substraten (Greene et al., 1995; McCarty et al., 1995). Zwei Klassen von Co-Chaperonen regulieren dabei die Funktion von Hsp70, die Hsp40/J-Domänen Proteine und die Homologen des bakteriellen GrpE, die als Nukleotidaustauschfaktoren bezeichnet werden. Die Hsp40/J-Domänen Proteine können dabei selbst Substrate binden und an das Hsp70-Chaperon weiterleiten (Erbse et al., 2004). Zudem stimulieren sie die ATPase Aktivität von Hsp70, in dem sie das Substrat in die Bindetasche des Chaperones führen (Cheetham et al., 1994; Liberek et al., 1991). GrpE bindet dagegen an die ADP-gebundene Form von

Hsp70 und beschleunigt den Austausch des Nukleotids, indem es die ATP-Bindetasche öffnet (Harrison et al., 1997). Die Co-Chaperone sind für die Rückfaltung von Proteinen *in vitro* essentiell (Liberek et al., 1991, Schroder et al., 1993; Wall et al., 1994). *In vivo* reguliert Hsp70 die Translokation von Proteinen durch Membranen (Ungermann et al., 1994), die Rückfaltung von aggregierten Proteinen (Goloubinoff et al., 1999) und ist an der Umordnung des Cytoskeletts beteiligt (Linag & Macrae, 1997).

Die Klasse der Hsp100-Proteine wird eine Funktion als Disaggregase zugeteilt (ClpB, (Lee et al., 2003); Hsp104, (Bösl et al., 2006)). Diese Proteine sind in der Lage, bestehende Aggregate von Proteinen wieder aufzulösen und die darin enthaltenen Proteine mit der Hilfe anderer Chaperone wie Hsp70 wieder zurückzufalten (Glover & Lindquist, 1998; Goloubinoff et al., 1999). Neben der Disaggregasefunktion können die Hsp100-Proteine auch als Protease fungieren (ClpX, (Wojkowiak et al., 1993); ClpA (Thompson & Maurizi, 1994)), indem sie ihr Substrat falten und mit Hilfe einer assoziierten Protease abbauen (Zolkiewski, 2006). Die Struktur der Hsp100-Proteine weist zwei ATP-Bindestellen und zwei Hydrolyseaktivitäten auf (Parsell et al., 1991; Woo et al., 1992). Es wird angenommen, dass die Hydrolyse von ATP verwendet wird, um die ansonsten endergonische Faltungsreaktion wieder umzukehren (Zolkiewski, 2006). Hsp104 aus *S. cerevisiae* vermittelt eine erhöhte Thermotoleranz und vergrößert die Resistenz gegenüber anderen, zellulären Stressarten (Sanchez et al., 1992).

Eine weitere Klasse der molekularen Chaperone bilden die Vertreter der kleinen Hitzeschockproteine (sHsp), die vor allem Stressbedingungen in der Zelle dadurch abpuffern sollen, dass sie partiell denaturierte Substratproteine binden und dadurch in Lösung halten (de Jong et al., 1993; Haslbeck et al., 2005a; Nakamoto & Vigh, 2007). Im zellulären Chaperonnetzwerk erfolgt die Übergabe der gebundenen Substrate an die ATP-regulierte Chaperone der Hsp70 und Hsp100 Familie, welche die Rückfaltung des Substrats in seine native Konformation bewirken (Lee & Verling, 2000; Cashika et al., 2005; Haslbeck et al., 2005b). Die sHsps besitzen eine große Varianz in den einzelnen Organismen, deren Bedeutung bisher noch ungeklärt ist. Der Großteil der sHsps ist im Cytosol lokalisiert, es wurden aber auch schon Vertreter in den Mitochondrien, Chloroplasten und im ER identifiziert (Waters & Verling, 1999; Scharf et al., 2001). Zu der Klasse der sHsps gehört auch das α -Crystallin der menschlichen Augenlinse. In der Augenlinse sind die beiden Isoformen α A- und α B-Crystallin sehr hoch konzentriert und unterdrücken die Aggregation der Linsenproteine, wodurch sie die Bildung von lichtstreuenden Aggregaten verhindern (Horwitz, 2003). Die Bedeutung von α -Crystallin

konnte durch *knock-out* Mäusen gezeigt werden, die bereits im jungen Alter schwere Katarakte der Augenlinse aufwiesen (Horwitz, 2003; Brady 1997).

Die Familie der Hsp90-Proteine bildet transiente Dimere aus und besitzt eine ATPase-Aktivität, die für ihre *in vivo* Funktion essentiell ist (Obermann et al., 1998, Panaretou et al., 1997). Die Vertreter der Hsp90-Familie sind abundant vorkommende Proteine mit einem zellulären Proteinanteil von 1 – 2 % (Welch et al., 1982). Hsp90 übernimmt neben der stabilisierenden Funktion auf metastabile Substrate auch eine essentielle Aufgabe bei der Reifung von Proteinen. Viele der Hsp90 Substrate sind in der Signaltransduktion der Zelle involviert, wie Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren oder Steroidhormonrezeptoren (Pratt, 1997, Picard, 2002). Vertreter der Hsp90 Familie finden sich in fast allen Lebewesen wieder, wie in Eubakterien, bei höheren Eukaryoten im Cytosol, in Mitochondrien und im ER, sowie bei Pflanzen in Chloroplasten (Wegele et al., 2004). Nur Archaeen scheinen keine Hsp90-Proteine zu besitzen (Chen et al., 2006). Die Expression von Hsp90 liegt unter der Kontrolle des Hitzeschockfaktors (Hsf1) (Rabindran et al., 1991), welcher selbst wiederum ein Substrat von Hsp90 darstellt und die Induktion dadurch an eine *feedback*-Schleife gekoppelt ist (Nadeau et al., 1993; Zuckermann, 1980). Eine Reihe von Hsp90 Proteinen ist ähnlich zu einigen Hsp70-Vertretern konstitutiv exprimiert, die so genannten Hsc90-Proteine. Über die genaue Struktur und Funktion von Hsp90 wird in Kapitel 1.5 berichtet.

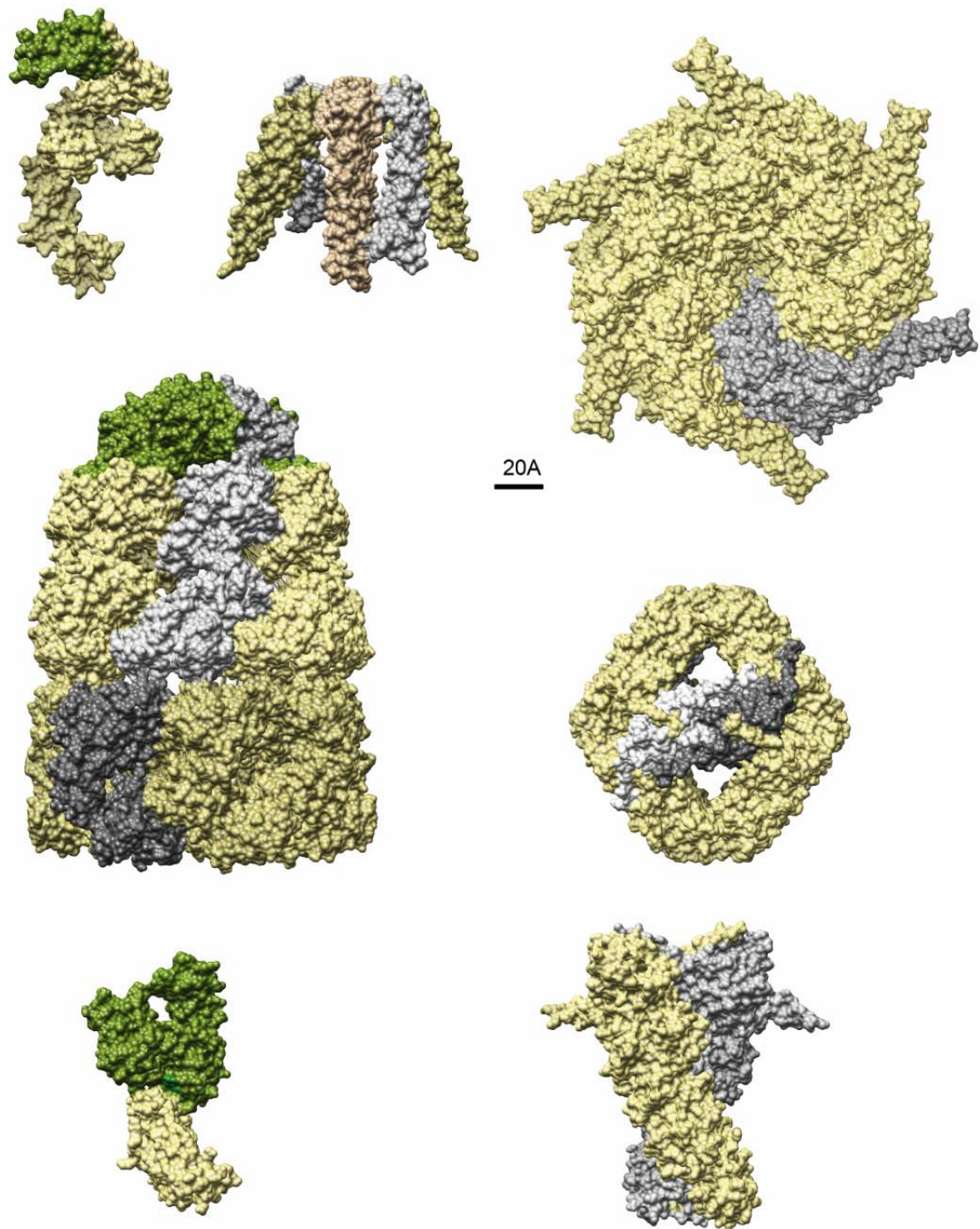


Abbildung 1-2: Kristallstrukturen wichtiger Vertreter der Chaperonklassen

Die Bezeichnung der Ursprungsorganismen sowie der pdb code sind in Klammer angegeben. Bei oligomeren Strukturen sind einzelne Monomere durch Grautöne hervorgehoben. Reihenfolge von links nach rechts, oben nach unten: Trigger Factor, PPIase Domäne in grün hervorgehoben (*E. coli*, pdb: 1W26); Prefoldin (*M. thermoautotrophicum*, pdb: 1fXK); ClpB (*T. thermophilus*, pdb: 1QVR); GroEL/GroES in hellbeige und dunkelbeige, GroES in grün (*E. coli*, pdb: 1AoN); Hsp16.5 (*M. jannaschii*, pdb: 1QVR); Hsp70, ATPase Domäne in grün, Substratbindedomäne in hellbeige (modelliert aus *DNaK* von *E. coli*, pdb: 1dkX und Hsp70 aus *B. taurus*, pdb: 1YUW); Hsp90 (*S. cerevisiae*, pdb: 2CG9). Der Maßstabbalken hat eine Länge von 20 Å. Abbildung übernommen aus der Dissertationsarbeit von Dr- O. Hainzl.

1.5 Das Molekulare Chaperon Hsp90

1.5.1 Unterschiede und Sonderfälle der Hsp90-Familie

Wie schon in Kapitel 1.4 beschrieben, besteht die Hsp90-Familie aus hoch konservierten Mitgliedern, die in fast allen Lebensformen gefunden werden. Cytoplasmatisches Hsp90 ist in Eukaryoten für die Lebensfähigkeit essentiell, in Bakterien hingegen scheint das Hsp90 Homologe HtpG unter Normalbedingungen verzichtbar zu sein (Bradwell & Craig, 1988, Spence & Geogopoulos, 1989). Auch bei den Pilzen gibt es eine Besonderheit, denn sie scheinen das Grp94, das Hsp90 im endoplasmatischen Retikulum verloren zu haben (Gupta, 1995, Chen et al., 2005). Um eine schnelle Antwort auf Stressbedingungen geben zu können, entwickelten höhere Eukaryoten evolutionär zwei oder mehr Genkopien cytosolischer Hsp90 Isoformen (Langkjaer et al., 2003; Kellis et al., 2004). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* findet man das konstitutiv exprimierte Hsc82 und das stark regulierbare Hsp82 (Borkovich et al., 1989), die entsprechenden Isoformen des Menschen sind Hsp90 α und Hsp90 β . Hefezellen, die in der logarithmischen Phase auf SD Medium wachsen, enthalten in ihrem Cytosol 132.000 Moleküle Hsc90 und 445.000 Moleküle Hsp90 (Ghaemmaghami et al., 2003). Reduziert man die Hsp90 Konzentration in *S. cerevisiae* auf ein Zwanzigstel der normalen Menge, sind Hefezellen immer noch lebensfähig (Picard et al., 1990; Xu & Lindquist, 1993). Zudem ist nur der doppel-*knock-out* beider Hsp90 Isoformen für die Hefezellen tödlich (Borkovich et al., 1989). Es sind zwei Fälle bekannt, bei denen nur eine Form von Hsp90 genetisch codiert ist, die aber ebenfalls lebenswichtig sind. Der Nematode *C. elegans* verfügt nur über Daf-21 und in der Fruchtfliege *Drosophila spp.* wurde nur das Hsp83 identifiziert (Birnbay et al., 2000; van der Straten et al., 1997; Yue et al., 1999).

1.5.2 Domänenstruktur von Hsp90-Proteinen

Das 90 kDa schwere Hsp90 Monomer bildet unter physiologischen Bedingungen Dimere aus. Die Dimerisierung ist dabei für die Aktivität von Hsp90 essentiell (Wayne & Bolon, 2007). Die permanente C-terminale Dimerisierung mit einer Dimerisierungskonstante von ungefähr 60 nM für Hefe Hsp90 bildet eine ATP-unabhängige, hochaffine Dimerisierungsfläche (Richter et al., 2001). Eine weitere, transiente Dimerisierung erfolgt nach ATP-Bindung zwischen der N-terminalen Domänen von Hsp90 (Ali et al., 2006). Prinzipiell ist Hsp90 in drei voneinander abhängigen, hochkonservierten Domänen unterteilt (Prodromou et al., 1997; Maruya et al., 1999; Chadli et al., 2000). Die N-

terminale ATPase Domäne, die Mitteldomäne und die C-terminale Dimerisierungsdomäne (**Abb. 1-3**).

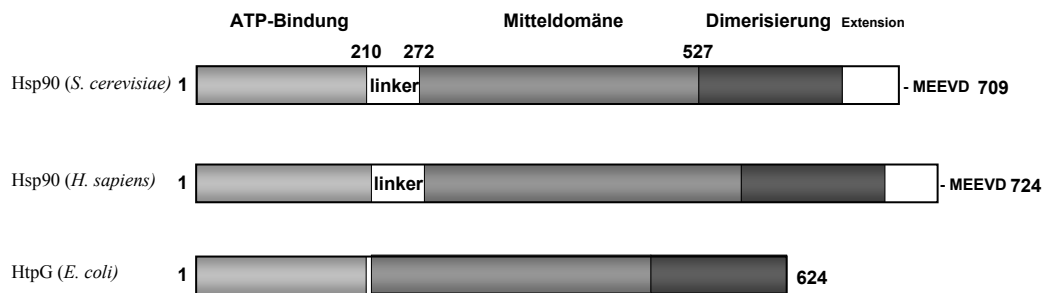


Abbildung 1-3: Domänenstruktur der Vertreter der Hsp90-Familie

Gezeigt sind die Domänenstrukturen von Hsp90 aus *S. cerevisiae*, Hsp90 β aus *H. sapiens* und HtpG aus *E. coli*. Die Domänen sind hellgrau: ATPase Bindedomäne, grau: die Mitteldomäne und dunkelgrau: die Dimerisierungsdomäne. Die unstrukturierten Bereiche wie der geladene Linker, der die N- mit der M-Domäne verknüpft, sowie die C-terminale Verlängerung sind weiß. Das -MEEVD Motiv ist für die Bindung von TPR-Co-Chaperonen wichtig.

Innerhalb der Hsp90-Familie haben sich zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Hsp90 Formen individuelle Unterschiede einzelner Bereiche herausgebildet. In prokaryotischen Vertretern, wie dem HtpG, ist die N-terminale Domäne mit der Mitteldomäne durch einen acht Aminosäuren langen, hydrophoben Linker verbunden, in eukaryotischen Formen dagegen besteht dieser Bereich aus einem 50 – 60 Aminosäure langen, hoch geladenen Linker oder sogar aus einem Linker bestehend aus 90 Aminosäuren, wie er im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* vorkommt (Bonney et al., 1994; Kumar et al., 2007). Dem Linkerbereich wird eine Rolle in der Substraterkennung und -Bindung zugeordnet (Scheibel et al. 1999; Johnson et al. 2000). Weiterhin besitzen eukaryotische Hsp90-Proteine eine Extension am Carboxyterminus, die aus bis zu 60 Aminosäuren besteht und mit dem strikt konservierten Motiv -MEEVD endet. Dieses Motiv dient als Bindestelle für eine Reihe von Co-Chaperonen, die ein *Tetratricopeptidrepeat* (TPR) Sequenzmotiv aufweisen. Prokaryotische Hsp90-Vertretern fehlt diese C-terminale Verlängerung. Für diese Vertreter sind auch noch keine Co-Chaperone bekannt.

1.5.3 Struktureller Aufbau von Hsp90

In den letzten 3 Jahren sind die biologischen und biochemischen Daten zum strukturellen Aufbau von Hsp90 immer präziser geworden. Die Kristallstrukturen gleich mehrerer

Vertreter der Hsp90-Familie (**Abb. 1-4**) (Ali et al., 2006; Dollins et al., 2007; Shiau et al., 2006) und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von verschiedenen konformationellen Zuständen des Hsp90 (Shiau et al., 2006; Krukenberg et al., 2008; Southworth & Agard, 2008) ergänzen die biochemischen und biologischen Daten zu einem vollständigen Bild.

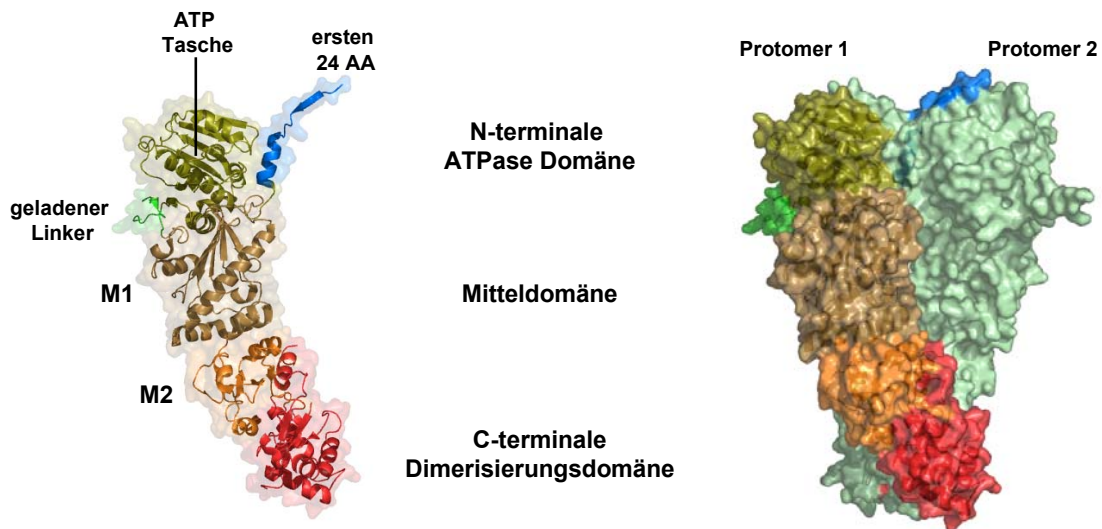


Abbildung 1-4: Struktur des geschlossenen Zustands von Hsp90

Der geschlossenen Zustand von Hefe Hsp90 im AMP-PNP gebundenen Zustand (pdb: 2cg9). Rechts ist ein Protomer gezeigt, bei dem die ersten 24 Aminosäuren hervorgehoben sind (blau), die am Strangaustausch bei der N-terminalen Dimerisierung beteiligt sind. Der geladene Linker (grün) ist in der Struktur nicht vollständig aufgelöst und nur angedeutet. Die Mitteldomäne ist in ihre Subdomänen M1 (Aminosäure 272 – 441, braun) und M2 (AA 442 – 527, orange) unterteilt. Die C-terminale Domäne (rot) ist nur teilweise dargestellt. Die C-terminale Extension sowie das MEEVD Motiv sind strukturell nicht aufgelöst. Links ist das Hsp90 Dimer in geschlossenem Zustand mit den entsprechenden Farbcodes für die einzelnen Domänen dargestellt.

Da die Domänenorganisation von Hsp90 sowie dessen ATPase Mechanismus starke Ähnlichkeit mit der bakteriellen DNA Gyrase B und MutL ausweist, wurden diese Proteine als Klasse der GHKL ATPase zusammengefasst (Gyrase Hsp90 Histidin Kinase MutL) (Ban & Yang, 1998; Bilwes et al., 1999; Dutta & Inonye, 2000). In Einzelnen sind die Domänen von Hsp90 wie folgt charakterisiert. Die N-terminale ATP-Bindedomäne (N-Domäne) besteht aus einer β -Faltblattsstruktur, die von mehreren α -Helices umgeben ist. In der N-Domäne befindet sich die tief liegende Nukleotid-Bindetasche, die sowohl ATP als auch ADP bindet, aber auch die Bindestelle für spezifische Hsp90 Inhibitoren wie Geldanamycin (Stebbins et al., 1997) und Radicicol (Roe et al. 1999) darstellt. Die Effektivität der Inhibitoren lässt sich durch die Architektur der ATP Bindetasche erklären, dem so genannten „Bergerat Fold“ (Bergerat et al., 1997). Bei der Bindung wird das ATP-

Molekül ungewöhnlich stark geknickt, so dass nur noch das γ -Phosphat Lösungsmittel-exponiert ist (Prodromou et al., 1997; Wigley et al. 1991; Ban et al., 1998). Die Inhibitoren imitieren diesen geknickten Zustand und binden in die Nukleotid-Bindetasche von Hsp90 mit einer wesentlich höheren Affinität als ATP (Roe et al., 1999). Nach ATP-Bindung findet eine konformationelle Änderung in der N-terminalen Domäne statt, wobei sich der aus zwei α -Helices und einem flexiblen Loop bestehende ATP-Lid von oben über die Bindetasche legt und das Nukleotid fixiert (Richter et al., 2006). Eine weitere konformationelle Änderung führt die N-terminalen Domänen beider Protomere nähern zusammen, die dann in einer gegenseitigen Austauschreaktion (strand swap) den ersten Strang des β -Faltblattes untereinander austauschen, wobei die transiente N-terminale Dimerisierung stabilisiert wird (Ali et al., 2006; Prodromou et al., 2000; Richter et al., 2006).

Die Mitteldomäne von Hsp90 kann in zwei Subdomänen unterteilt werden. Dabei besteht die größere Domäne aus einer charakteristischen α - β - α Architektur, die über eine *coil*/Helix-Struktur mit einer kleineren Domäne der gleichen Faltung (α - β - α) verbunden ist. Die Mitteldomäne, die keine Nukleotid-Bindestelle aufweist, ist trotzdem direkt an der ATP-Hydrolyse beteiligt. In einem flexiblen Loop befindet sich ein katalytisches Arginin an der Position 380, das als Akzeptor der γ -Phosphatgruppe des N-terminal gebundenen ATPs dient (Meyer et al., 2004; Ali et al., 2006). Da sich der für die ATP-Hydrolyse wichtige katalytische Rest in der Mitteldomäne befindet, und damit in einer andern Domäne als die eigentliche Nukleotidbindestelle, wird Hsp90 auch als *split ATPase* bezeichnet (Meyer et al., 2003). Während der ATP-Bindung und Hydrolyse wurden in der Mitteldomäne keine signifikanten konformationellen Änderungen festgestellt. Durch Strukturanalysen von Komplexen identifizierte man das Co-Chaperone Aha1, dass mit der Mitteldomäne von Hsp90 interagiert (Mayer et al., 2004; s.h. **Abb. 1-7**). Der Mitteldomäne von Hsp90 wurde eine Rolle als Diskriminator zwischen verschiedenen Substratproteinen zugewiesen und scheinbar spielt sie bei der Erkennung und Bindung von Substraten eine entscheidende Rolle (Hawle et al., 2006).

Die carboxyterminale Domäne von Hsp90 ist mit der Mitteldomäne über eine ausgedehnte α -Helix verbunden. Abgesehen von der C-terminalen Extension, die mit dem für die Co-Chaperon wichtigen Bindemotiv MEEVD endet, wird der C-terminalen Domäne nur eine Dimerisierungsfunktion zugeordnet, wobei die Domäne in Hefe Hsp90 sogar durch Substitution einer artifiziellen Disulfid-Brücke ausgetauscht werden können (Wegele et al., 2003). Strukturell besteht diese etwa 12 kDa schwere Domäne aus einem labilen

dreisträngigen β -Faltblatt, das gegen die domänenverbindende α -Helix orientiert ist. Die Kontaktflächen der Dimersisierung setzt sich in einem aus α -Helices und β -Faltblättern zusammengesetzten Teil fort. Der Bereich nach der Dimerisierungshelix konnte bisher noch in keiner Struktur aufgelöst werden, was auf eine sehr hohe Flexibilität der Polypeptidkette schließen lässt.

1.5.4 Das „aktive“ Chaperone Hsp90

Wie schon erwähnt, ist die ATPase Funktion von Hsp90 *in vivo* essentiell (Panaretou et al., 1997; Obermann et al., 1998). Allerdings besitzt Hsp90 eine sehr geringe ATP-Hydrolyserate (Hefe Hsp90 $\approx 1 \text{ min}^{-1}$, humanes Hsp90 $\approx 0.08 \text{ min}^{-1}$, Richter et al., 2001; Richter et al., 2008) und bindet ATP mit einer Affinität von 300 μM (Scheibel et al., 1997). Die Bindung von ADP ist um Faktor 3 stärker, was unter physiologischen Bedingungen allerdings keine Rolle spielt, da die ATP- gegenüber der ADP-Konzentration etwa 100fach höher ist (Kuster et al., 1976). Bisher ist nicht geklärt, wofür Hsp90 seine ATPase Funktion wirklich benötigt. Die Konformationsänderungen, die durch Bindung des Nukleotids induziert werden, sind für die langsame Hydrolyserate verantwortlich und bilden den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im ATPase Zyklus (**Abb. 1-5**) (Wandinger et al., 2008). Die Konformationsänderungen beginnen mit der ATP-Bindung, wobei der ATP-Lid der N-terminalen Domäne sich von oben auf die ATP-Bindetasche legt (Richter et al., 2006). Diese Bewegung setzt ein kleines Segment der N-Domäne frei, das in einer Austauschreaktion mit dem N-terminalen Segment des anderen Protomers transiente Dimere bildet (Ali et al., 2006; Richter et al., 2006). Die N-terminale Assoziation induziert weitere Neuorientierungen der Domänen im ganzen Hsp90 Dimer und führt zu einer kompakten, verdrillten Form, in der sich die N-terminale und die Mitteldomäne um 40 Å im Vergleich zum offenen Zustand annähern (Ali et al., 2006). Diese Annäherung bringt das Arg-380 der Hsp90 Mitteldomäne in die hydrolyseaktive Position und katalysiert die ATP-Hydrolyse. Nach Abspaltung des γ -Phosphats scheint Hsp90 in den ADP-gebundenen Zustand eine weitere, sehr kompakte Konformation zu durchlaufen, bei der die N-Domäne auf die Mitteldomäne klappt und eine große Interaktionsfläche zwischen den beiden Domänen entsteht, wie es für HtpG gezeigt wurde (Shiau et al., 2006). Dieser Schritt könnte bei der Freisetzung der Substrate eine wichtige Rolle spielen. Die Konformationsänderungen im ATPase Zyklus sind in der ganzen Hsp90-Familie konserviert (Frey et al., 2007; Leskovar et al., 2008; Richter et al., 2008).

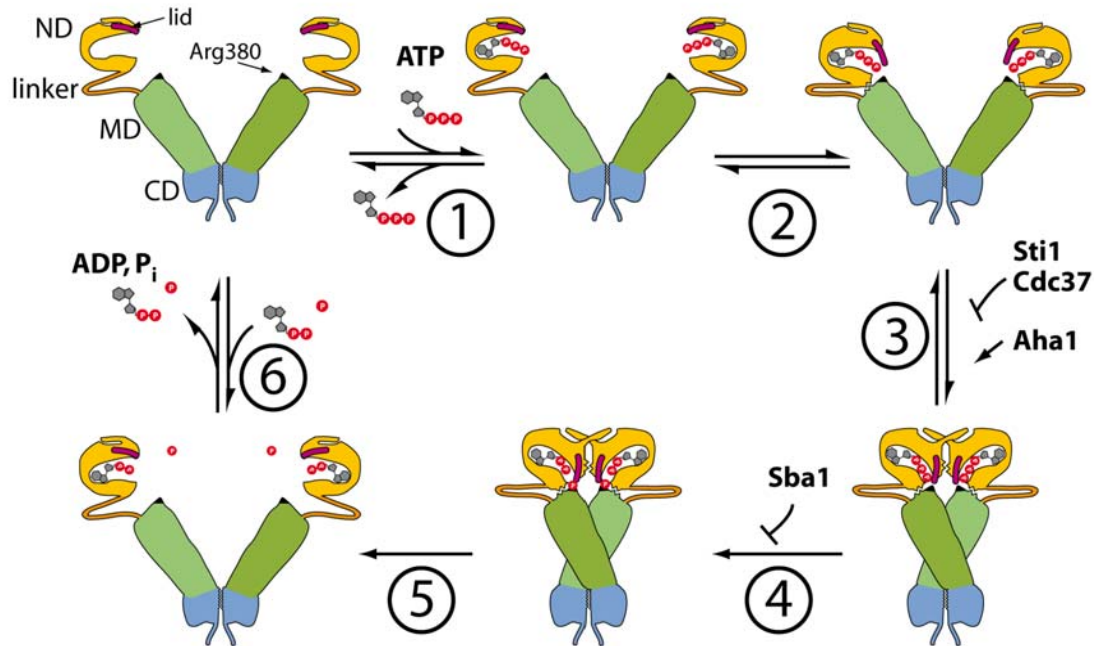


Abbildung 1-5: ATPase Zyklus der Hsp90-Familie

Nach ATP-Bindung (1), durchläuft die N-terminale ATPase Domäne eine Konformationsänderung, wobei der ATP-Lid sich über die ATP-Bindetasche legt (2), der im offenen ATP-freien Zustand mit den letzten N-terminalen Resten in Verbindung steht. Nach der Lid-Bewegung, dimerisieren die ersten 24 Aminosäuren der Hsp90 Protomere untereinander, indem der erste β -Strand und die erste α -Helix in einer Austauschreaktion auf die jeweils andere N-Domäne überspringen (3). Zusätzlich bilden sich neue Kontakte zwischen der N-terminalen und der Mitteldomäne jedes Protomers aus. Diese metastabile Konformation ist für die ATP-Hydrolyse notwendig (4). Diese Konformationsänderungen führen zu einer kompakten Struktur, in der die individuellen Monomere gegeneinander verdreht vorliegen. Nach der ATP-Hydrolyse lösen sich die N-terminalen Domänen wieder, wobei der ATP-Lid sich öffnet und ADP sowie abgespaltenes Phosphat freisetzt und Hsp90 in seinen Grundzustand zurückkehrt (5, 6). Abbildung entnommen aus Wandinger et al., (2008).

In der N-terminalen Domäne sind die Reste Glu-33 und Asp-79 wichtig für die Bindung und Hydrolyse von ATP (Panaretou et al., 1998). Asp-79 bildet eine Wasserstoffbrücke mit der exocyclischen Aminogruppe N6 des Adenins, während alle anderen Wasserstoffbrücken zwischen der Adeninbase und der Nukleotidbindetasche indirekt über Wassermoleküle ermittelt werden (Panaretou et al., 1998). Die Seitenkette des Glu-33 stellt eine katalytische Gruppe der Hydrolyse, indem es H_2O aktiviert und so die Hydrolyse der γ -Phosphatgruppe durch nukleophile Substitution ermöglicht. Punktmutationen dieser Reste sind in der Hefe lethal (Obermann et al., 1998; Panaretou et al., 1998).

1.5.5 Inaktivierung von Hsp90 durch spezifische Inhibitoren

Die unüblich geknickte Form in der ATP in der Bindetasche der N-terminalen Hsp90 Domäne vorliegt, wird durch einige natürlich vorkommende Verbindungen wie Radicicol

und Geldanamycin perfekt imitiert (**Abb. 1-6**). Diese Verbindungen konnten ursprünglich aus Pilzen und Bakterien (Streptomyceten) isoliert werden (Whitsell et al., 1994; Uehara et al., 2003). Die Affinität dieser heterozyklischen Inhibitoren zu der ATP-Bindetasche ist um ein Vielfaches höher im Vergleich zu ATP, im Fall von Geldanamycin beträgt sie 1.2 μM und bei Radicicol 19 nM (Stebbins et al., 1997; Grenert et al., 1997; Roe et al., 1999). Die kompetitive Bindung der Inhibitoren in die ATP-Bindetasche blockiert damit effektiv alle ATP-abhängigen Vorgänge von Hsp90, wie Konformationsänderungen und die Prozessierung der Hsp90 Substrate (Whitsell et al., 1994). Die Hsp90 Inhibitoren werden in klinischen Studien zur Bekämpfung von malignen Tumoren eingesetzt (Pratt & Toft, 2003, Neckers, 2006). Dazu werden vor allem wasserlösliche Geldanamycin-Derivate eingesetzt, wie 17-AAG (17-allylamino, 17-demthoxygeldanamycin), was bereits einige Erfolge in klinischen Studien zeigte (Goetz et al., 2003; Goetz et al., 2005; Ronnen et al., 2006). Radicicol scheint uneignet für klinische Studien zu sein, das es im Körper schnell inaktiviert wird und toxische Nebenwirkungen zeigte (Workman et al., 2007). Die Inhibierung von Signal-Transduktionswegen *in vivo* kann durch den Hsp90 Inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) erreicht werden (Hostein et al., 2001). Dabei bildet die Klasse der Oncogene, darunter v-Src, Bcr-Abl, Raf-1, und ErbB2 sind häufig das Angriffsziel der Hsp90-Inhibitor gestützten Therapie (Ziemiacki et al., 1986; Schulte et al., 1995; Grammatikakis et al., 2002). Dass die Inhibitoren vor allem in Tumorzellen ihre Wirkung entfalten, könnte mit der Beobachtung erklärt werden, dass Hsp90 in Tumorzellen in einem so genannten *high ATPase* Zustand vorliegt, der eine 100fache erhöhte Affinität zu 17-AAG aufweist (Kamal et al., 2003).

Trotz dieser sichtbaren Effekte der Hsp90-Inhibitoren, ist die breite Anwendung in klinischen Studien auf Grund der noch zu geringen Bioverfügbarkeit aller Derivate beschränkt. In neuen Ansätzen wird versucht, chimäre Substanzen zu synthetisieren, die die Vorteile aus Radicicol und Geldanamycin zu einer neuen Inhibitorklassen kombinieren. Dazu werden die Elemente von Geldanamycin (Chinon) und Radicicol (Resorcinolring) zu Radamiden bzw. Radester kombiniert (Clevenger & Blagg, 2004; Shen & Blagg, 2005).

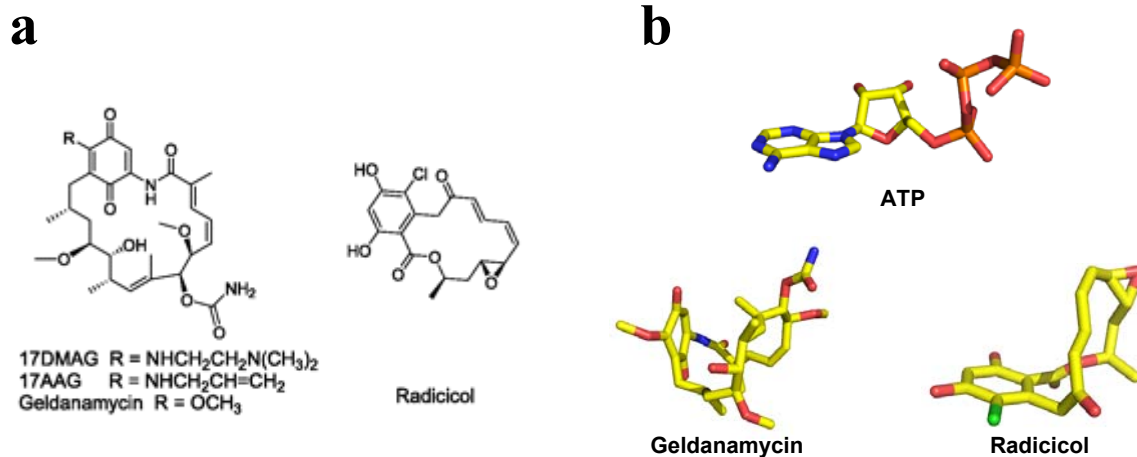


Abbildung 1-6: Struktur und Form der Inhibitoren von Hsp90

A, dargestellt sind die Inhibitoren Radicicol und Geldanamycin sowie die sich aus Geldanamycin ableitenden Derivate 17-AAG und 17-DMAG. B, dargestellt sind ATP (pdb: 2CG9), Geldanamycin (pdb: 1A4H) und Radicicol (pdb: 1BGQ) in ihrer in der Hsp90-Bindetasche gebundenen Form. Geldanamycin muss im Gegensatz zu Radicicol die geknickte Form bei der Bindung an Hsp90 erst einnehmen, was sich in der verringerten Affinität widerspiegelt. Farbcode: Kohlenstoff: gelb; Sauerstoff: rot; Stickstoff: blau; Phosphor: orange; Chlor: grün.

Ein weiterer, nicht abgebildeter Inhibitor Novobiocin gehört zu einer anderen, auf Coumeromycin basierenden Klasse von Hsp90-Inhibitoren, die an eine kryptische sekundäre Nukleotidbindestelle in der C-terminalen Domäne von Hsp90 binden sollen (Soti et al., 2002). Die schwache Affinität von Novobiocin zu Hsp90 ($\approx 700 \mu\text{M}$) bedingt Screeningverfahren zur Entdeckung analoger Inhibitoren mit höherer Spezifität. Für diese Inhibitoren wurde ebenfalls ein Struktur-Aktivitäts Zusammenhang gezeigt, der sich in Anti-Proliferationseffekten äußert (Donnelly & Blagg, 2008).

1.5.6 Modellierung der Hsp90 Aktivität durch Co-Chaperone

Die basale Aktivität von Hsp90 wird entscheidend von Co-Chaperonen beeinflusst, die sowohl die ATPase Aktivität von Hsp90 als auch die Fähigkeit, Substratproteine zu erkennen und zu prozessieren, betreffen. Dabei binden, induzieren und stabilisieren Co-Chaperone jeweils bestimmte Konformationen von Hsp90 und regulieren so die ATPase Aktivität sowie die Substrataffinität. Für einige Co-Chaperone ist die Interaktionsfläche mit Hsp90 bekannt (**Abb. 1-7**), bei anderen ist nur die Interaktion mit den TPR-Bindemotiv MEEVD nachgewiesen.

Aha1: Der Aktivator der Hsp90 Aktivität ist der einzig bekannte Co-Faktor von Hsp90, der die relativ niedrige ATPase Aktivität von Hsp90 um das 12-fache stimulieren kann (Panaretou et al., 2002). In genetischen *screens* wurde zuerst das Hefe-Protein Hch1 als

high copy Hsp90 Suppressor einer temperatur-sensitive Hsp90-Mutanten in *S. cerevisiae* identifiziert (Nathan & Lindquist, 1999). Hch1 weist eine hohe Homologie zur N-terminalen Domäne von Aha1 auf, kann die ATPase von Hsp90 aber wesentlich weniger aktivieren und kommt nur in niederen Eukaryoten vor, im Gegensatz zu Aha1, dessen Homologe von Hefe zum Menschen identifiziert wurden (Panaretou et al., 2002; Lotz et al., 2003). Durch Röntgenkristallographie konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne von Aha1 hauptsächlich über ionische Wechselwirkungen mit der Mitteldomäne von Hsp90 interagiert und dabei wahrscheinlich eine Konformationsänderung in dem Loop induziert, der das für die ATP-Hydrolyse wichtige, katalytische Arg-380 enthält (Meyer et al., 2004). Der Einfluss von Aha1 wurde auf eine Anzahl von zellulären Prozessen wie die Aktivierung von v-Src und von Glukokortikoid-Rezeptoren (Panaretou et al., 2002; Lotz et al., 2003; Holmes et al., 2008) sowie für den Phosphorylierungsstatus von Signaltransduktions-Proteinen beschrieben (Holmes et al., 2008). Eine bedeutende Rolle kommt Aha1 bei der Qualitätskontrolle von CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) zu, dessen Mutation im Menschen zum Fehlen oder zu einer eingeschränkten Funktion des Chloridkanals führt, was die Ursache der Mukoviszidose darstellt (Wang et al., 2006).

p23/Sba1: Das Co-Chaperon p23/Sba1 bindet an die N-terminale Domäne von Hsp90 (Ali et al., 2006), wobei auch Kontakte zur Hsp90 Mitteldomäne identifiziert werden konnten (Martinez-Yamout et al., 2006). Für das Protein p23 und das Hefe-Homologe Sba1 (Fang et al., 1998) konnte gezeigt werden, dass es selbst Chaperonfunktion besitzt (Bose et al., 1996; Freeman et al., 1996), die von einem unstrukturierten, geladenen Bereich im C-terminalen Teil des Proteins ausgeht (Weikl et al., 2000; Weaver et al., 2000). Im Komplex mit Hsp90 bindet p23/Sba1 bevorzugt an die ATP-gebundene, N-terminal dimerisierte Form (Ali et al., 2006; Prodromou et al., 2000; Sullivan et al., 2002) und inhibiert die ATPase Aktivität von Hsp90 wahrscheinlich durch die Konservierung einer ATP-Hydrolyse inkompetenten Konformation (Panaretou et al., 2002; Richter et al., 2004). Durch die Interaktion von Hsp90 mit p23/Sba1 wird Hsp90 in einem substrataffinen Zustand gehalten, wobei die für die Freisetzung des Substrats verantwortliche ATP-Hydrolyse inhibiert wird (Morishima et al., 2003; McLaughlin et al., 2006). Deshalb wirkt sich die Interaktion mit p23/Sba1 auf die Hsp90 ATPase Aktivität sowie den Chaperon-Zyklus aus (Richter et al., 2004).

Hop/Sti1: Das Protein Hop (Hsp79/Hsp90 organizing protein) stellt eine andere Möglichkeit der Modellierung der ATPase Aktivität von Hsp90 dar. Hop/Sba1 wurde in

Hsp70-Hsp90-Komplexen mit dem Progesteronrezeptor identifiziert und zunächst auf Grund seiner Größe als p60 beschrieben (Smith et al., 1993). Seine Funktion besteht darin, die Chaperonnetzwerke Hsp70 und Hsp90 zu verbrücken, um so den Transfer eines Substratproteins zu ermöglichen (Chen et al., 1996; Chen & Smith, 1998; Wegele et al., 2006). Sti1/Hop besteht zu einem Großteil aus TPR-Motiven. Insgesamt finden sich bei Hop neun TPR-Motive, die sich in drei Domänen (TPR1, TPR2A, TPR2B) gliedern lassen (Sikorski et al., 1990; Boguski et al., 1990). Dabei bindet die TPR2A Domäne das C-terminale MEEVD-Peptid von Hsp90 (Scheufler et al., 2000). Eine zusätzliche Bindestelle von Sti1 in der Hsp90 N- oder M-Domäne wird vermutet (Richter et al., 2003). Durch die Bindung von Sti1 kann die ATPase Aktivität von Hsp90 sehr effektiv inhibiert werden (Prodromou et al., 1999; Richter et al., 2004), wobei Sti1 an die offene Konformation von Hsp90 bindet und die N-terminale Dimerisierung verhindert (Richter et al., 2004). Die Affinität von Hsp90 zum ATP (K_M -Wert) wird dabei nicht beeinflusst, die Umsatzrate (k_{cat} -Wert) für ATP wird aber signifikant erniedrigt, was Sti1 zu einem klassischen nicht-kompetitiven Inhibitor macht.

Cdc37: Bei der Charakterisierung von Hsp90-Kinase Komplexen wurde das Protein Cdc37 identifiziert (Brugge, 1986; Perdeu et al., 1991; Stepanova et al., 1996; Dey et al., 1996). Cdc37 wird als Kinase-spezifisches Partnerprotein beschrieben (Kimura et al., 1997; Caplan et al., 2007), das direkt an Hsp90 bindet. Dabei ist die Bindung von Cdc37 an Hsp90 mit 100 μ M sehr schwach, bei hohem Überschuss an Cdc37 konnte jedoch eine Inhibierung der ATPase von Hsp90 festgestellt werden (Siligardi et al., 2002). Kristallographische Daten suggerieren, dass Cdc37 mit der N-terminalen ATPase Domäne interagiert (Sreeramulu et al., 2009) und die N-terminale Dimerisierung von Hsp90 beeinträchtigt, indem es als Dimer zwischen die beiden Hsp90 N-Domänen insertiert (Roe et al., 2004). Cdc37 könnte so die offene Konformation von Hsp90 einfrieren, die zur Erkennung der Kinasen wichtig ist. Der Komplex aus Hsp90-Cdc37 und der Kinase Cdk4 zeigt einen asymmetrischen Komplex, der auf einer Seite Cdc37 und auf der anderen Seite Cdk4 gebunden hat (Vaughan et al., 2006). Dabei scheint der Phosphorylierungszustand von Cdc37 selbst einen Einfluss auf den Hsp90 Chaperonzyklus zu nehmen (Vaughan et al., 2008).

Weitere Co-Chaperone: Hsp90 besitzt noch weitere Co-Chaperone, die in den Hsp90 Zyklus eingreifen. Die Prolylisomerase der menschlichen *FKBP*-Familie, zu denen auch die Hefe-Homologen Cyclophiline *Cpr6* und *Cpr7* gehören, sind strukturell und funktionell verwandt mit den Peptidyl-prolyl-*cis/trans* Isomerasen. Sie teilen mit den

Isomerasen jeweils die PPIase-Domäne und binden an Hsp90 über eine TPR-Domäne. Die Funktion der PPIase in den Hsp90-Komplexen ist nicht geklärt, eine substratspezifische Beteiligung an dem Hsp90 Zyklus wird jedoch vermutet (Dunia et al., 1996a; Mayr et al., 2000; Dolinski et al., 1998).

Die Hsp90-spezifische Phosphatase *PP5/Ppt1* ist eine Serin/Threonin Phosphatase (Becker et al., 1994; Sinclair et al., 1999), die ebenfalls über das TPR-Motiv mit Hsp90 interagiert. Die Bindung des MEEVD-Peptids an die TPR Domäne von PP5/Ppt1 induziert eine Ablösung der TPR-Domäne von der Phosphatasedomäne, löst die Autoinhibierung auf und aktiviert so die Phosphatase (Sinclair et al., 1999; Kang et al., 2001). Die Phosphatase Ppt1 reguliert den Phosphorylierungsstatus von Hsp90 in der Hefe, der eng an die Substratprozessierung durch Hsp90 gekoppelt ist. Wird Hsp90 nicht mehr durch die Phosphatase dephosphoryliert, ist die Reifung von verschiedenen Hsp90-Substratproteinen stark beeinflusst (Wandinger et al., 2006).

Für die Lebensfähigkeit von Hefezellen sind das Co-chaperon Cdc37 und ein weiterer Co-Faktor Cns1 essentiell (Kimura et al., 1997; Marsh et al., 1998; Hainzl et al., 2004). Cns1 wurde in Komplexen mit Hsp70 und mit Hsp90 identifiziert, da es aber nur eine TPR-Domäne besitzt, ist ein ternärer Komplex ausgeschlossen (Hainzl et al., 2004). Cns1 ist in der Lage, die Wachstumsdefekt eines Δ Cpr7 Deletionsstammes aufzuheben, so dass die Hefezellen eine normale Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen (Duina et al., 1996b). Daher leitet sich auch der Name *cyclophilin seven suppressor 1* ab. Die Funktion von Cns1 allerdings ist immer noch nicht aufgeklärt.

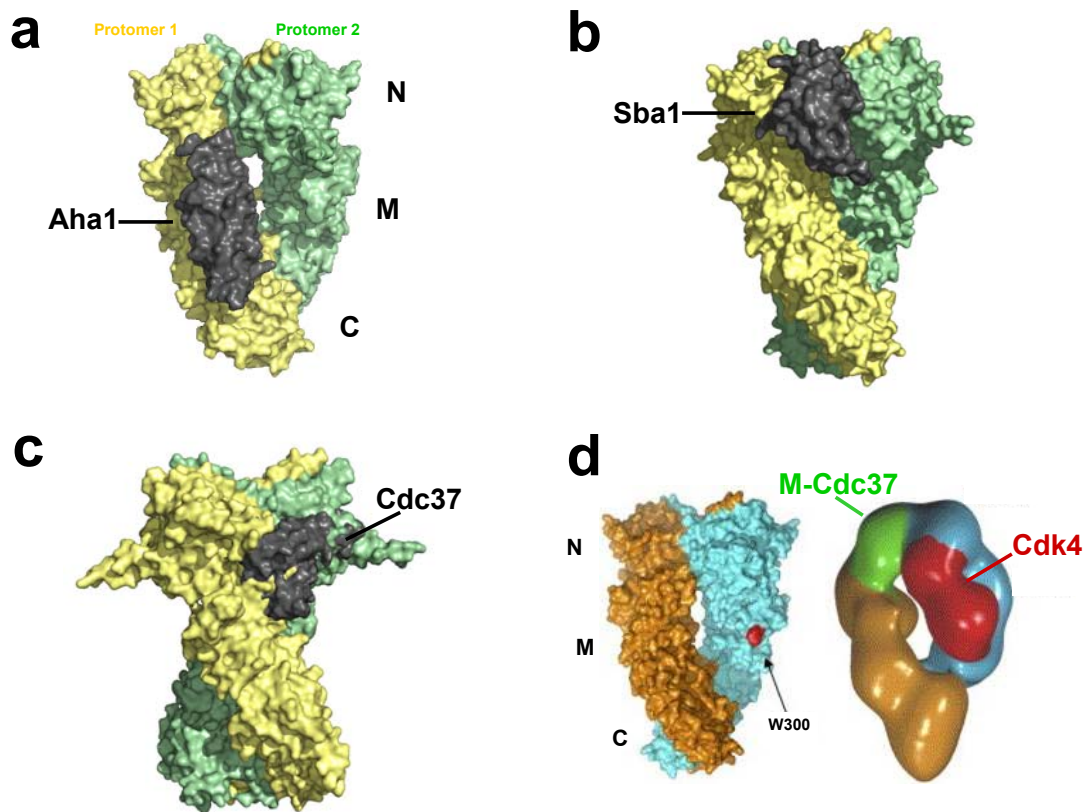


Abbildung 1-7: Bindungsstellen der Co-Chaperone

A – D, die Bindungsstellen der individuellen Co-Chaperone aus den Kristall- und NMR-Strukturdaten sind auf die geschlossene Struktur von Hsp90 (pdb: 2cg9) übertragen worden. A, die Interaktionsfläche der N-terminalen Domäne von Aha1 (pdb: 1usu). B, die Interaktionsfläche von Sba1 (pdb: 2cg9). C, Interaktionsfläche von Cdc37, entnommen aus der NMR-basierten Interaktion von M-Cdc37 und der N-terminalen Domäne von Hsp90 (pdb: 2k5b), daher ergeben sich bei der dimeren Hsp90 Vollängen sterische Überlappungen. D, elektronenmikroskopische Aufnahme des ternären Komplexes aus Hsp90-Cdc37-Cdk4. Abbildung direkt entnommen aus Vaughan et al., (2006).

1.5.7 Modellierung der Hsp90 Aktivität durch post-translationale Modifikationen

Nicht nur Co-Chaperone können die Aktivität von Hsp90 regulieren, Veränderungen von Aminosäureseitenketten durch post-translationale Modifikationen scheinen bei der Regulation der Hsp90 Aktivität sowie bei der Substratprozessierung eine wichtige Rolle zu spielen (Scroggins & Neckers, 2007). Drei Formen von post-translationalen Modifikationen sind bisher beschrieben worden, die Acetylierung (Scroggins et al., 2007), die Phosphorylierung (Sefton et al., 1978; Dougherty et al., 1982; Dougherty et al., 1987; Wandler et al., 2006), sowie die S-Nitrosylierung (Martinez-Ruiz et al., 2006). Alle drei Modifikationen beeinflussen die Reifung von Hsp90 Substraten (Scroggins et al., 2007).

Die Acetylierung: Diese Modifikation betrifft Lysin-Seitenketten, die durch eine Acetyl-Gruppe modifiziert werden. Unter dem Einsatz von Histon-Deacetylase (HDAC)

Inhibitoren sowie in HDCC6 *knock-out* Mäusen konnte eine hyperacetylierte Form von Hsp90 isoliert werden. Diese Hyperacetylierung resultierte in einer verringerten Interaktion mit Hsp90-Substraten und einer inhibierten Reifung von p53, Raf1, Bcl-Abl und den Glukokortikoid-Rezeptoren (Kovacs et al., 2005; Yu et al., 2002; Nimmanapalli et al., 2003; Murphy et al., 2005). HDAC6 wurde dabei als ein Enzym zur Deacetylierung von Hsp90 identifiziert (Kavacs et al., 2005). *In vivo* wird Hsp90 an mindestens zwei Stellen acetyliert, eine davon ist Lys-294 (Scroggins et al., 2007). Mutationsstudien an Lys-294 zeigten, dass die Acetylierung ein starker Regulator der Hsp90 Funktion ist und das Mutanten, die nicht mehr acetyliert werden konnten, eine reduzierte Chaperonaktivität verbunden mit einer geringeren Lebensfähigkeit in transfizierten Hefezellen zeigten (Murphy et al., 2005; Nimmanapalli et al., 2003; Scroggin et al., 2007).

Die Phosphorylierung: Die Phosphorylierung von Hsp90 ist schon seit über 30 Jahren bekannt (Sefton et al., 1978). Dabei wurden mindestens vier verschieden phosphorylierte Isoformen von Hsp90 identifiziert (Kelley & Schlesinger, 1982; Welch et al., 1983). Das menschliche Hsp90-Protein ist im Durchschnitt an drei Stellen pro Monomer phosphoryliert (Iannotti et al., 1988) und der Phosphorylierungsstatus unter physiologischen Bedingungen ist relativ hoch (Lees-Miller & Anderson, 1989). Die Phosphatase PP5/Ppt1 reguliert den Phosphorylierungszustand von Hsp90 und damit auch dessen Funktion gegenüber den Hsp90 Substraten (Wandinger et al., 2006). Alle bisher bekannten Phosphorylierungsstellen liegen in der N-terminalen Domäne von Hsp90, aber bisher konnte noch kein spezifischer Effekt einer Phosphorylierung zugeordnet werden.

Die S-Nitrosylierung: Die S-Nitrosylierung von Hsp90 ist eine erst kürzlich entdeckte Modifikation von Hsp90 (Martinez-Ruiz et al., 2006), die auf der reversiblen Modifikation einer Cystein-Seitenkette basiert, die kovalent mit dem freien Radikal Stickstoffmonooxid (NO) reagiert, wobei S-Nitrosothiole gebildet werden. Dieser Vorgang wird S-Nitrosylierung (SNO) genannt. Für humanes Hsp90 α wurde durch Massenspektrometrie ein Cystein identifiziert (Cys-597), dass nach der Inkubation von rekombinant exprimierten Hsp90 mit einem NO-Donorsalz die SNO-Modifikation aufwies (Martinez-Ruiz et al., 2006). Dieses Cystein befindet sich in der C-terminalen Domäne von Hsp90 und Hsp90 zeigte nach der SNO-Modifikation ein verringerte ATPase Aktivität, sowie eine inhibierte Stimulierung der Hsp90-vermittelten endotheliale NO-Synthase (eNOS) Aktivität (Martinez-Ruiz et al., 2006). Die Inhibierung von Hsp90 durch NO ist damit an der Hsp90-vermittelten Stimulierung der eNOS in einem negativen *feedback-loop*

gekoppelt, was möglicherweise eine Regulationsmechanismus des zellulären NO Levels darstellt (Garcia-Gardena et al., 1998).

1.5.8 Mechanismus der S-Nitrosylierung

Stickstoffmonooxid spielt in vielen Signalwegen wie der Xylognese, der Angiogenese, den programmierten Zelltod und in der Abwehr von pathogenen Organismen eine besondere Rolle (Gallo et al., 1998; Fukumura et al., 2001; Fukumura et al., 2006; Desikan et al., 2006). In der Zelle kann dabei freies NO mit Superoxiden, Übergangsmetallen und Haem-Gruppen von Proteinen sowie mit freien Cysteinen reagieren (SNO). Die S-Nitrosylierung (**Abb. 1-8**) ist eine reversible, redox-basierte post-translationale Modifikation von Proteinen. Das erste SNO modifizierte Enzym wurde vor 15 Jahren entdeckt, als gezeigt werden konnte, dass micromolare Mengen eines S-Nitrosoadduktes des Albumins im Blut zirkulierten (Stamler et al., 1992). Bis heute sind mehrere Hundert Proteine gefunden worden, die unter der Regulation von NO stehen (Stamler et al., 2001). Im Vergleich zu alle anderen post-translationalen Modifikationen wie die Phosphorylierung von Serinen/Threoninen oder die Acetylierung von Lysinen, ist die Reaktion von NO mit Cystein-Seitenketten nicht abhängig von Kinasen oder Phosphatasen. Dennoch ist die Modifikation von Cysteinen eine hochselektive Modifikation. In fast allen Fällen wird nur ein Cystein im ganzen Protein oder sogar in Proteinkomplexen modifiziert. Die Spezifität der SNO-Modifikation zeigt sich bei dem Ryanodinrezeptor, bei den die Thiolgruppe nur eines von 50 Cysteinen des Proteins SNO modifiziert wird (Sun et al., 2001). Dabei liegen die Thiolgruppen meist nicht lösungsmittlexponiert vor, sondern innerhalb einer Pore, die durch eine bestimmte Architektur von hydrophoben, sauren und basischen Motiven gebildet wird, die das eintretende NO Molekül positionieren und aktivieren (Hao et al., 2006).

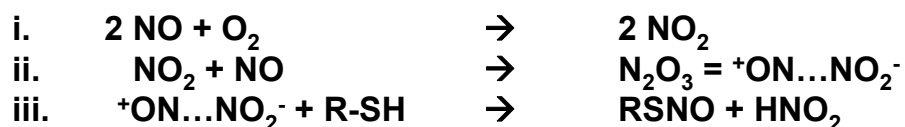


Abb. 1-8: Reaktionsmechanis der S-Nitrosylierung von Thiolresten (R) eines Proteins

1.5.9 Hsp90 Substrate

Hsp90, das 2 % der zellulären Proteinkonzentration stellt, interagiert mit einer Vielzahl von Substraten (Picard, 2002). Die entscheidende Frage dabei gilt der Substraterkennung und der Substratspezifität. Die meisten der Hsp90 Substrate lassen sich in zwei Klassen einteilen, die Transkriptionsfaktoren (SHRs und p53) und die Kinasen (v-Src, Cdk4). Da Hsp90 mit wichtigen Regulationsproteinen interagiert, kann es indirekt eine Vielzahl von Prozessen regulieren, wie Evolutionsereignisse (Queitsch et al., 2002; Cowen et al., 2005), mitochondriale Homeostase (Kang et al., 2007) oder die Vermehrung von RNA Viren (Geller et al., 2007). Die verschiedenen Substrat-Proteine unterschieden sich stark in ihrer Struktur und lassen kein einheitliches Motiv für die Erkennung durch Hsp90 erkennen. Die Src-Kinase zum Beispiel, kommt in zwei Isoformen vor, in der zellulären Form (c-Src) und in der viralen Form (v-Src). Beiden Formen sind nahezu identisch (95 % Identität). Es hängt aber nur die Aktivität der v-Src strikt von der Anwesenheit von Hsp90 ab, wohingegen die Aktivität der c-Src fast vollständig Hsp90-unabhängig ist (Xu & Lindquist, 1993). Dieses Verhältnis der Abhängigkeit der beiden Src-Proteine von Hsp90 wird deutlicher, vergleicht man die intrinsischen Stabilitäten der beiden Proteine, wobei v-Src eine sehr instabiles Protein ist (Falsone et al., 2004). Systematische Veränderungen von Kinasen, die mit Hsp90 wechselwirken, vertiefen die Ansicht, dass nicht bestimmte Bindemotive in Substraten für die Interaktion mit Hsp90 verantwortlich sind, sondern eher der Zustand eines Proteins die Interaktion mit Hsp90 bedingt (Terasawa et al., 2006). Allerdings sei hier erwähnt, dass in Hsp90 ein spezieller Kinase-Loop identifiziert wurde, der möglicherweise für die Interaktion mit den Kinasen verantwortlich ist (Sato et al., 2000). Im Vergleich zu anderen molekularen Chaperonen, für die ein klares Bild über die Interaktionsfläche und den Interaktionsmechanismus mit Substraten erstellt werden konnte, ist noch kein einheitlicher Konsensus für Hsp90 postuliert worden. Experimentelle Daten zeigten für alle drei Hsp90-Domänen eine Interaktionsfläche mit Substraten (Young et al., 1997; Scheibel et al., 1999; Vaughan et al., 2006). Die Parallelen, die auf Grund der vergleichbaren Konformationsänderung zwischen den GHKL-Proteinen gezogen wurden, versuchte man auch auf die Substratbindung zu übertragen. Dabei wurde postuliert, dass Hsp90 als *clamp-like* Protein die Substrate zwischen den beiden Protomeren des Hsp90 Dimers einschließen und so die hydrophoben Flächen der Substrate schützt (Harris et al., 2006; Prodromou et al., 2000; Stirling et al., 2006). Dieses Modell kann nach der strukturellen Charakterisierung der offenen und geschlossenen Hsp90 Zustände nicht mehr aufrechterhalten werden (Ali et al., 2006). Einen ersten Einblick in die Substratbindestelle

konnte aus den elektromikroskopischen Aufnahmen des Hsp90-Cdc37-Cdk4-Komplexes gewonnen werden (Vaughan et al., 2006). Hier bindet die Kinase an die Mitteldomäne und wahrscheinlich an die N-terminale Domäne von Hsp90 und die Kinase interagiert auf der anderen Seite des Chaperons, was zu einem hoch asymmetrischen Komplex führt. Ob diese Bindestelle auch für andere Substrate zutrifft und wie andere Co-Chaperone dabei mit den Substraten interagieren, bleibt zu klären.

1.6 Der Tumorsuppressor p53

Eines der am intensivsten beforschten Protein der letzten 25 Jahre ist das Tumorsuppressor-Protein p53, das mit gut 50.000 Publikationen (Stand 2009) beschrieben ist. Die enorme Wichtigkeit von p53 für Therapieansätze gegen Krebs wird klar, bedenkt man, dass mutiertes p53 in 50 % aller menschlichen Tumore identifiziert wird (Soussi et al., 1994; Vogelstein et al., 2000). Die dabei auftretenden Mutationen von p53 betreffen vor allem die so genannten *hot spot* Aminosäuren in der DNA-Binderegion von p53 (**Abb. 1-9**) (Hernandez-Boussard et al., 1999). p53 übernimmt als „Wächter des Genoms“ (Levine, 1997; Lane, 1992) vor allem die Aufgabe, die täglich tausende Mal auftretenden, natürlich vorkommenden Mutation im Erbgut zu erkennen und entweder die Reparatur der geschädigten DNA einzuleiten, oder in der Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose, zu aktivieren (Prives et al., 1999; Hofseth et al., 2004). Ist die Funktion von p53 dabei durch Mutationen gestört, kommt es in der Zelle schneller zur Ausbildung von Tumoren (Hofseth et al., 2004).

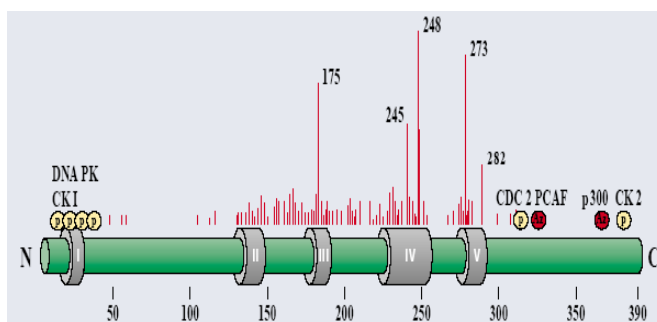


Abbildung 1-8: Häufig auftretende Mutation in p53

Gezeigt sind die in malignen Zellen identifizierten Mutationen von p53, geordnet nach ihrer Häufigkeit. Dabei stechen die so genannten *hot spot* Mutationen heraus, die sich alle in der DNA-Binderegion von p53 befinden. Angegeben sind außerdem signifikante Stellen für post-translationale Modifikationen P (Phosphorylierung) und Ac (Acetylierung). Das Bild wurde aus Ko & Prives, (1996) adaptiert.

1.6.1 Domänenstruktur von p53

Da p53 im Zentrum eines großflächigen Netzwerks steht, das durch Signal-Kaskaden eine enorme Anzahl von Proteinen steuert, ist das Expressionslevel in normalen Zellen erwartungsgemäß niedrig. Zudem unterliegt p53 in der Zelle einer sehr schnellen *turnover* Rate mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten (Maltzman & Czyzyk, 1984). Erst Stresssignale wie z.B. DNA-Schäden sorgen für eine erhöhte Syntheserate von p53 und aktivieren das Protein u.a. dadurch, dass die Ausbildung von Tetrameren und damit aktiven p53 Assoziaten möglich ist (Weinberg et al., 2004). Die niedrige Halbwertszeit von p53 in der Zelle ist auch auf die Stabilität des Proteins zurückzuführen. p53 ist ein labiles Protein, das aus vier unterschiedlichen Domänen besteht (**Abb. 1-10**).

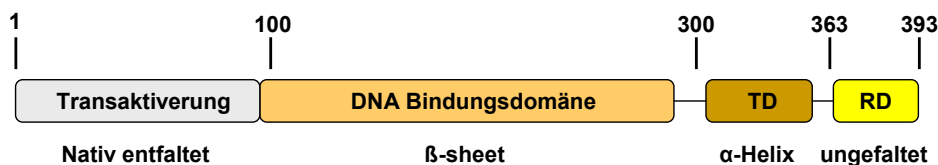


Abbildung 1-10: Die Domänenstruktur von p53

Die Domänenstruktur von p53 (*H. sapiens*) besteht aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, die nativ entfaltet ist, gefolgt von der DNA-Bindedomäne (DBD). Die p53 DBD besteht hauptsächlich aus einer Anordnung von β -Faltblättern. Die DBD und die Tetramerisierungsdomäne (TD) sind durch einen flexiblen, unstrukturierten Linker verbunden. Die TD besteht aus einem α -Helixbündel, das durch ein β -Faltblatt stabilisiert wird. Die negative Regulationsdomäne (RD) am C-terminalen Ende von p53 besitzt ebenfalls keine definierte Struktur.

Das humane Gen von p53 kodiert für 393 Aminosäuren, die vier Domänen bilden. Die nativ entfaltete N-terminale Domäne von p53 besitzt eine Transkriptionsfunktion (Aminosäure 1 – 42) (Walker and Levine, 1996) und enthält zudem eine Prolin-reiche SH3-Region (Aminosäure 60 -97) (Yu et al., 1994). Die DNA-Binderegion von p53 wird von einer stabilen Domäne gebildet, die für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich ist. Die Tetramerisierungsdomäne (TD) (Aminosäure 323 – 365) bildet ebenfalls eine stabile Subdomäne von p53, die auch isoliert exprimiert stabile Tetramere ausbildet (Sakaguchi et al., 1997). Die unstrukturierte carboxyterminale Domäne ist hoch geladen, ein Angriffspunkt für viele post-translationale Modifikationen und wird auf Grund der inhibierenden spezifischen DNA-Bindung in p53 auch als negative Regulationsdomäne beschrieben (Muller-Tiemann et al., 1998; Sauer et al., 2008).

1.6.2 Die DNA-Binderegion

Die DNA-Binderegion wird auch als *core* (Kern, Herz) Region von p53 bezeichnet. Sie besteht aus einem viersträngigen und einem fünfsträngigen β -Faltblatt und einem Schleifen-Faltblatt-Helix-Motiv, das eine Schleife (Reste 113 – 123), ein dreisträngiges Falblatt und eine α -Helix (Reste 278 – 286) umschließt. Zwei weitere Schleifen (Reste 278 – 286 und 237 – 250) werden durch ein komplexiertes Zinkion stabilisiert (Cho et al., 1994; Bullock & Fersht, 2001). Bei der Bindung von p53 an seine palindrome Konsensus-Sequenz, wird die DNA in einer ungewöhnlichen Form geknickt (Nagaich et al., 1999; Balagurumoorthy et al., 1995). Die Bindung von DNA an die p53 DBD in Lösung ist kooperativ, wobei jeweils zwei Untereinheiten der DNA-Binderegion eine Dimerisierungsstelle bilden (Klein et al., 2001; Rippin et al., 2002; Dehner et al. 2005; Kitayner et al., 2006). Dabei wird die Dimerisierungsstelle u.a. durch eine Salzbrücke der Reste E180 – R181 gebildet, die, wenn es zu Mutationen in den beiden Resten kommt, mit einer autosomalen Erbkrankheit (Li-Fraumeni-Syndrom) assoziiert ist, die zu frühzeitiger Krebserkrankung führen kann (Wang et al., 1995; Campomenosi et al., 2001). Die meisten für die Entstehung verantwortlichen Mutationen von p53 befinden sich ebenfalls in der DNA-Binderegion (*hot spot* Mutationen) und beeinflussen die Effektivität der DNA-Bindung und dadurch die transkriptionale Aktivierung der Zielgene von p53 auf unterschiedliche Weise. Dabei lassen sich drei Klassen von Mutationen unterscheiden, die Kontaktmutanten, die direkt an der DNA-Bindung beteiligt sind, die Destabilisierungsmutanten, die die thermodynamische Stabilität von p53 herabsetzen oder lokale Entfaltung von p53 bewirken und schließlich die Mutationen der Helixregion, die die kooperative Bindung verhindern (Dehner et al., 2005; Bullock & Fersht, 2001). Ist p53 nur auf einem Allel der Gensequenz mutiert kann es auch zur Ausbildung von dominant-negativen Effekten kommen, die ebenfalls zur Krebsentstehung beitragen (Chene, 1998; Kern et al., 1992; Milner et al., 1991; Shaulian et al., 1992).

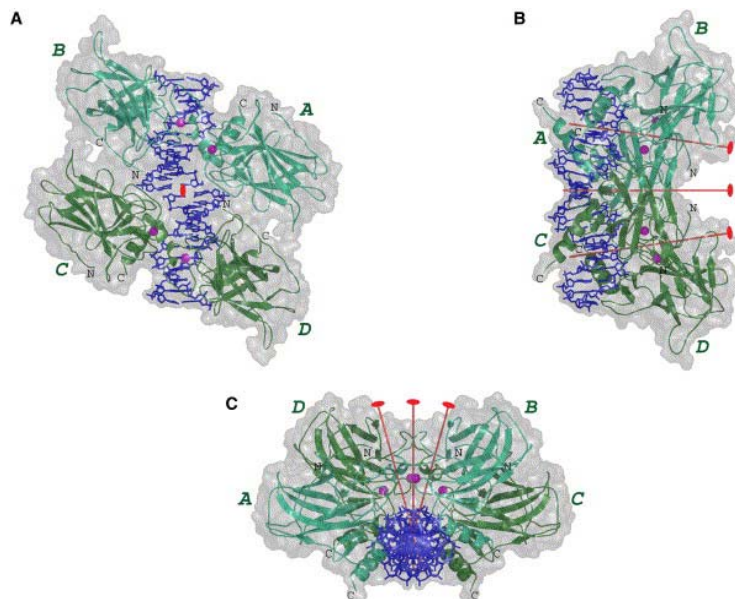


Abbildung 1-11: Die p53 DNA-Bindedomäne als Tetramer im Komplex mit DNA

Vier p53 DBD (gekennzeichnet als A, B, C und D) gezeigt als Rückgrat-Präsentation interagieren mit zwei doppelsträngigen DNA Molekülen (blau). Die p53 DBD besteht aus einem Dimer von Dimeren: A-B (in cyan) und C-D (in grün). Die Van-der-Waals Oberfläche ist in einem transparenten Grau dargestellt. Die vier Zin-Ionen sind in magenta-farbenen Kügelchen abgebildet. In rot dargestellt sind die zweizähligen Achsen, die sich bei der Kristallisation ergaben (pdb: 2ATA, 2AHI, 2ACO). Abbildung entnommen aus Kitayner et al., (2006).

1.6.3 Die Tetramerisierungsdomäne

Die Ausbildung tetramerer Assoziate ist wichtig für die Aktivität von p53 (Hainaut et al., 1994). Der Oligomerisierungszustand von p53 wird dabei durch die Tetramerisierungsdomäne (TD) reguliert (Hupp et al., 1992; Wang et al., 1994). Die isolierte Tetramerisierungsdomäne ist im Gegensatz zur p53 Volllänge relativ stabil, wobei die Affinität zur Ausbildung von Tetrameren im Volllängenprotein wesentlich höher als in der isolierten Tetramerisierungsdomäne ist (Johnson et al., 1995; Mateu & Fersht, 1998; Mateu & Fersht, 1999). Die **Abb. 1-12** zeigt, dass p53 aus einem Dimer von Dimeren aufgebaut ist (Cloure et al., 1995; Lee et al., 1994; Jeffrey et al., 1995). In der isolierten Tetramerisierungsdomäne konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung über einen Übergangszustand stattfindet, in dem die primären Dimere vollständig gefaltet sind, die Interaktionsflächen zwischen den Dimeren aber nur partiell ausgebildet werden (Mateu & Fersht, 1999). In der Zelle herrscht auf Grund der geringen Expression und der niedrigen Halbwertszeit von p53 ein Gleichgewicht zwischen p53 Monomeren, Dimeren und Tetrameren, wobei die Tetramerisierung durch die Anwesenheit von spezifischen p53-DNA-Bindungssequenzen bevorzugt wird (Weinberg et al., 2004). Zudem bindet der p53 Co-Faktor 14-3-3 (epsilon und gamma) an die Tetramerisierungsdomäne und stabilisiert so

die tetramere Form von p53 und erhöht die DNA-Bindeeigenschaft (Rajagopalan et al., 2008). Eine Mutante der Tetramerisierungsdomäne, die nur in der Lage ist, Dimere auszubilden, weist eine um die Hälfte reduzierte DNA-Bindefähigkeit auf (Davison et al., 2001). Der Kooperativität der DNA-Bindung durch die p53 DBD (**Abb. 1-11**) folgt demnach eine zweite Kooperativität bei der Ausbildung von Tetrameren.

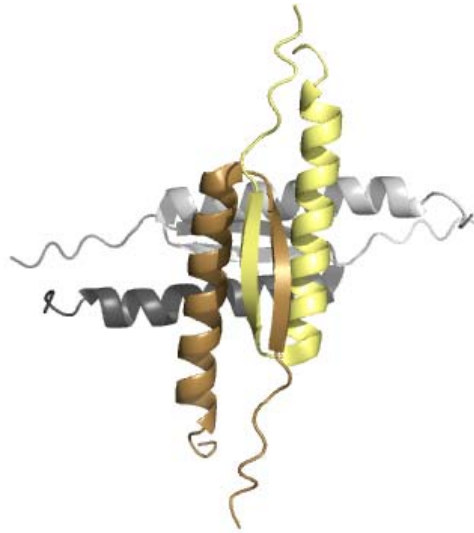


Abbildung 1-12: Die Struktur der Tetramerisierungsdomänen von p53

Die NMR-Struktur der p53 Tetramerisierungsdomäne (pdb: 3sak) besteht aus einem Vier-Helix Bündel und zeigt, dass das p53 Tetramer aus einem Dimer von Dimeren besteht. Je zwei α -Helices sind zu einander parallel und 90 °C verdreht zu zwei weiteren α -Helices angeordnet.

1.6.4 Die Regulationsdomäne

Die carboxyterminale Regulationsdomäne (RD) ist eine in nativen p53 ungefaltete, hoch geladene Domäne, die über einen basischen Linker mit der Tetramerisierungsdomäne verbunden ist. In der Sequenz der Regulationsdomäne ist die Kernlokalisierungssequenz von p53 codiert (Shaulsky et al., 1990). Es wurde immer wieder von einem inhibierenden Einfluss der Regulationsdomäne auf die Aktivität von p53 berichtet, weswegen auch von der negativ regulatorischen Domäne gesprochen wird (Hupp et al., 1992). Durch post-translationale Modifikationen (oder durch den Einsatz von RD-spezifischen Antikörpern) kann die Aktivierung und die Stabilität von p53 erhöht werden (Hupp & Lane, 1994; Hupp et al., 1995; Anderson et al., 1997). Die RD selbst besitzt die Fähigkeit auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen, unspezifisch an doppelsträngige DNA und Doppelstrangbrüche zu binden (Steinmeyer et al., 1988; Bakalkin et al., 1995). Die Erkennung von Insertions- und Deletionsschäden in die DNA-Doppelstränge (Lee et al., 1995) führt dazu, dass p53 die DNA-Schädigungen erkennt und Reparaturmechanismen

einleitet. Wie die Regulation von p53 durch die C-terminale Domäne allerdings genau funktioniert, wird in der Literatur noch kontrovers diskutiert. Ein allosterisches Modell geht davon aus, dass es eine direkte Wechselwirkung der RD mit der DNA-Bindedomäne gibt, wobei die p53 DBD in einer inaktiven Konformation gehalten wird und zwar so lange, bis aktivierende Modifikationen an der RD diese Wechselwirkung inhibiert (Hupp & Lane, 1994). Ein Interferenzmodell basiert auf der Konkurrenz zwischen der spezifischen DNA Bindung durch die DBD und der unspezifischen durch die RD. Hier bewirken Modifikationen der RD eine Freisetzung der DNA-Bindeaktivität der DBD (Anderson et al., 1997; May & May, 1999).

Zusätzlich wird angenommen, dass die Regulationsdomäne mit ihrer unspezifischen Wechselwirkung dazu beiträgt, dass p53 über eine permanente Interaktion auf der DNA eindimensional-diffusionskontrolliert entlanggleitet (McKinney et al., 2004; Tafvizi et al., 2008) und so DNA-Schäden erkennt.

Die Aktivität der Regulationsdomäne wird dabei selbst von dem S100B-Protein reguliert. S100B bindet an Regulationsdomäne, induziert eine α -helikale Struktur und blockiert so effektiv die Phosphorylierungs- und Acetylierungsstellen der RD (**Abb. 1-13**).

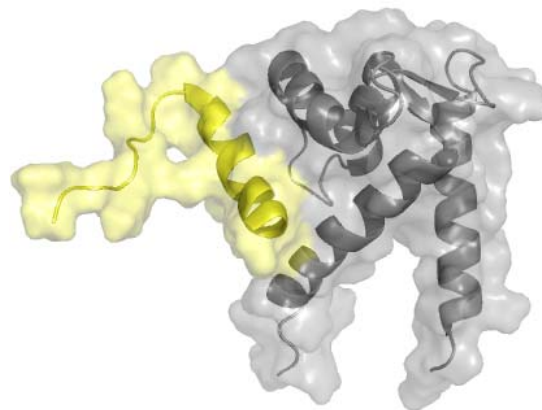


Abbildung 1-13: Die Struktur der Regulationsdomäne von p53 in Komplex mit S100

Die Regulationsdomäne von p53 besitzt in der nativen, ungebundenen Form von p53 keine Struktur. Im Komplex mit dem Calcium-komplexierten Protein S100 (grau) adaptieren die letzten Aminosäuren der Regulationsdomäne eine α -helikale Struktur (gelb) (pdb: 1dt7).

1.6.5 Die Quartärstruktur von p53

Auf Grund der hohen Flexibilität der terminalen Domänen von p53 konnte das Molekül bisher nicht erfolgreich kristallisiert werden. Zwei kürzlich veröffentlichte elektronenmikroskopische Strukturen können einen ersten Einblick in die Quartärstruktur von p53 liefern (Okorokov et al., 2006; Tidow et al., 2007). Dabei scheint die Struktur, die

eine Tetramerisierung von p53 über N- und C-terminale Kontakte beschreibt, eine ungewöhnliche, vielleicht nicht biologisch relevante zu sein (Okorokov et al., 2006). Eine weitere Struktur, basierend auf einer Kombination von NMR- und Kristallisations- sowie SAXS-Daten (small angle X-ray scattering), zeigte, dass sowohl die N-terminale als auch die Regulationsdomäne von p53 zugänglich für post-translationale Modifikationen und Interaktionen mit Bindungspartner sind (Tidow et al., 2007). Bei dieser Studie konnte sowohl die offene, als auch eine DNA-bindende geschlossenen Struktur charakterisiert werden (**Abb. 1-14**). Dabei bilden vier p53 DBD eine tetramere Einheit und binden an die DNA (Kitayner et al., 2006). Auf der anderen Seite der DNA liegt die Tetramerisierungsdomäne. Der Komplex der Tetramerisierungsdomäne ist dabei parallel zur DNA angeordnet, so dass die positiv-geladenen C-Termini am Ende des p53 Tetramers unspezifisch mit der negativ-geladenen DNA wechselwirken können.

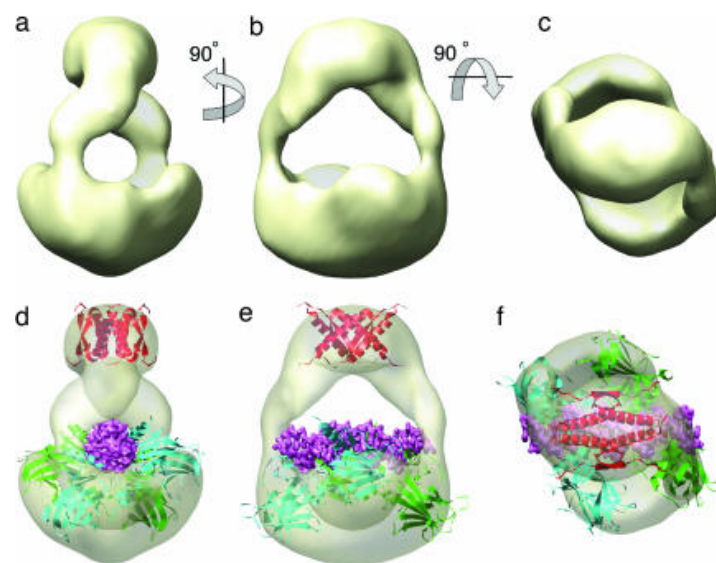


Abbildung 1-14: Die Quatärstruktur von p53 im DNA-gebundenen Zustand

3D-Elektronenmikroskopische Struktur für den Komplex aus p53 und DNA. Das p53 Tetramer in Komplex mit DNA ist einmal als undurchsichtige Struktur (a - c) und als halb-transparente Struktur gezeigt (d – f). In der Ansicht a und d schaut man in lila hervorgehobene DNA hinein. Abbildung übernommen aus (Tidow et al., 2007).

1.7 Post-translationale Modifikationen

Die Regulierung der Aktivität und Stabilität von p53 wird, wie schon angedeutet, durch post-translationale Modifikationen beeinflusst. Unter physiologischen Bedingungen wird die Expression von p53 stark reguliert und wird erst auf Grund zellulärer Stresssignale

stimuliert. Regulationsmechanismen können dabei durch die Interaktion von p53 mit Partnerproteinen wie den Antagonisten Mdm2, der p53 in einer negativen *feedback*-Schleife reguliert (Juven-Gershon & Oren, 1999; Freedman et al., 1997), stattfinden, oder durch post-translationale Modifikationen an p53 selbst wirken (Brooks & Gu, 2003; Bode & Dong, 2004).

1.7.1 Phosphorylierung

Neben der Phosphorylierung von p53 Partnerproteinen oder MDM2 regulierenden Proteinen kann p53 selbst durch Kinasen an 17 Stellen des Proteins phosphoryliert werden. Die modifizierbaren Serin- und Threoninreste befinden sich ausschließlich in der N-terminalen und in der Regulationsdomäne. Die Regulation beruht dabei auf der thermodynamischen Stabilisierung und einer verringerten Abbaurate von p53, was zu einer Akkumulation und Aktivierung von p53 führen kann (Bode & Dong, 2004; Steegenga et al., 1996). Phosphorylierungen werden allgemein durch zellulären Stress induziert, wie z.B. durch DNA-Schäden oder Aktivierung von Onkogenen. Die wichtigsten Signaltransduktionswege werden durch ATM- (Ataxia-telangiectasia-mutiertes Genprodukt) oder ATR-Kinasen (ATM- und Rad3-verwandte Proteinkinase) aktiviert. Durch nachgeschaltete Kinasen werden z.B. Ser-15 und Thr-18 in p53 phosphoryliert, was den Kerntransport von p53 inhibiert. Phosphorylierung von Thr-18 und Ser-20 unterbindet die Wechselwirkung von p53 mit Mdm2 und inaktiviert so die durch Mdm2-induzierte und durch das Proteasom gesteuerte Degradation von p53 und führt letztendlich zu einer Akkumulation von p53, sowie zur Erhöhung der p53 Affinität für spezifische Promotorsequenzen (Caspari, 2000). Die wichtigste Phosphorylierungsstelle ist Ser-46. Dessen Modifikation wird durch akute Stresssignale ausgelöst und als Folge wird direkt die Apoptose eingeleitet (Oda et al., 2000). Zur Phosphorylierung der Regulationsdomäne gibt es kontroverse Berichte. Für die Modifikation von Ser-392 konnte zum Beispiel eine Aktivierung und Stabilisierung von p53 gezeigt werden (Nichols et al., 2002). Außerdem erhöht die Phosphorylierung von Ser-392 die Tetramerisierungsstabilität der isolierten Domäne (Sakaguchi et al., 1997). Allerdings konnten diese Effekte nicht deutlich in anderen Experimenten reproduziert werden. In **Abb. 1-15** sind die möglichen post-translationalen Modifikationen von p53 und die dadurch induzierten Auswirkungen dargestellt.

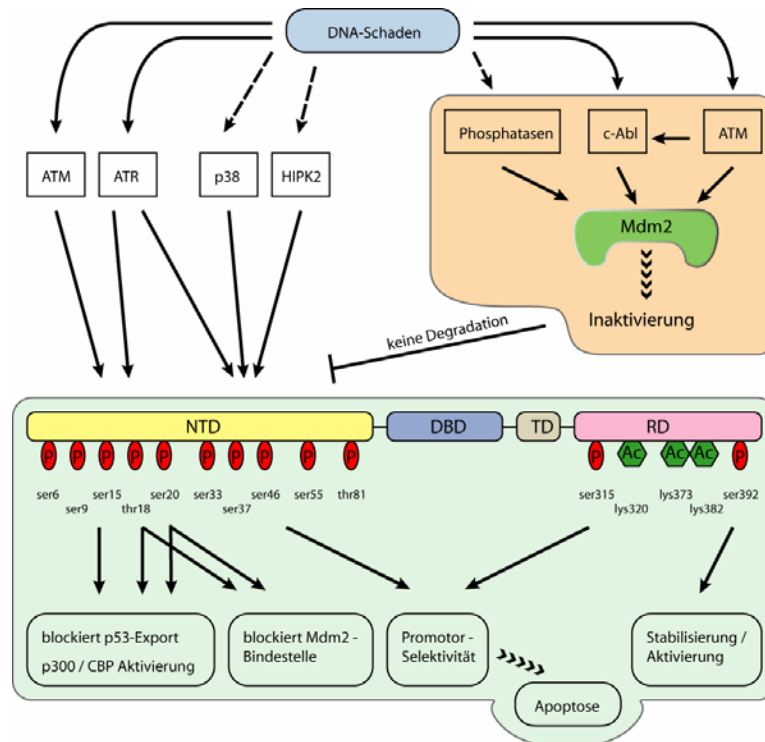


Abbildung 1-15: Post-translationale Modifikation von p53 und MDM2

Durch DNA-Schaden werden in p53 und Mdm2 Phosphorylierungen (P) und Acetylierungen (Ac) eingeführt, die die Aktivität von p53 beeinflussen. p53 ist hier schematisch dargestellt, die Größe der Domänen spiegelt nicht die durch Aminosäureanzahl gegebene Größe wieder. Unterbrochene Pfeile symbolisieren indirekte Aktivierungen. Adaptiert nach Meek, (2004).

1.7.2 Acetylierung

Die Acetylierung über p300/CBP von Lysin-Resten der Carboxyterminalen Domäne stellt einen effektiven Regulationsmechanismus von p53 dar (Bode & Dong, 2004; Gu et al., 1997; Grossman, 2001). Induziert werden die Acetylierungsmodifikationen ebenfalls wie die Phosphorylierungen, durch den zellulären Stress bei DNA-Schädigung. Dabei sind Histone-Acetyl-Transferasen bei der Regulation der Transkriptionsaktivität von p53 von Bedeutung (Barlev et al., 2001; Prives and Manley, 2001). Gleichzeitig scheint die Deacetylierung von acetyliertem p53 durch Histone-deacetylasen wie PID und Sir2 eine wichtige regulatorische Rolle zu spielen (Luo et al., 2000; Luo et al., 1997; Vaziri et al., 2001).

1.7.3 Ubiquitinierung

Der p53-Antagonist Mdm2, gleichzeitig E3-Ligase und Onkoprotein, ist hauptsächlich an der Ubiquitinierung von p53 beteiligt. Die Markierung von p53 mit Poly-Ubiquitin führt zu einem proteasomalen Abbau von p53 und ist wesentlich für die geringe Halbwertszeit von

p53 verantwortlich (Jesenberger & Jentsch, 2002; Fang et al., 2000). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang, ob niedrige Konzentrationen von Mdm2 eine Mono-Ubiquitinierung induzieren und dadurch den Kerntransport von p53 einleiten. Hohe Konzentrationen an Mdm2 dagegen resultieren in einer Poly-Ubiquitinmarkierung und in proteasomalen Abbau von p53 (Li et al., 2003). Ubiquitin-markiertes p53 kann direkt durch die Herpesvirus-assoziierte Ubiquitin-spezifische Protease desubiquitiniert werden (Li et al., 2003; Li et al., 2004). Weiterhin wurden zusätzlich p53-spezifische Ubiquitinligasen charakterisiert (Dornan et al., 2004; Shmueli & Oren, 2005), wodurch der Ubiquitin-Status von p53 durch mehrere Faktoren in der Zelle beeinflusst wird.

1.7.4 Weitere Modifikationen von p53

Die Funktion von p53 kann weiterhin durch Lysin-spezifische Modifikationen in der carboxyterminalen Domäne von p53 reguliert werden. Dabei findet die Markierung von p53 mit SUMO1 (small ubiquitin-related modifier1) und NEED8 statt (Rodriguez et al., 1999; Gostissa et al., 1999; Melchior & Hengst, 2002; Harper, 2004; Xirodimas et al., 2004). Ebenso konnte die Glykosylierung von p53 nachgewiesen werden (Shaw et al., 1996).

1.8 Die Regulation von p53 durch Chaperone

Das labile Protein p53 besitzt nur eine geringe Thermotoleranz und verliert seine Aktivität schon bei gering erhöhten Temperaturen (Muller et al., 2002; Walerych et al., 2004). Dazu kommt, dass die Akkumulation von p53 Tetrameren erst zu einem aktiven Protein führt, wobei diese Akkumulation durch post-translationale Modifikationen oder durch die direkte Bindung von Partnerproteinen an die Tetramerisierungsdomäne von p53 stattfindet (Sakaguchi et al., 1997; Rajagopalan et al., 2008). Die metastabile Struktur, die Größe von p53 und die Eigenschaft höhere Assoziat auszubilden, machen p53 zu einem klassischen Substrat von Chaperonen. Außerdem konnte ein direkter Bezug zwischen der Kernlokalisierung von p53 Mutanten und der Expression von Hsf1 nachgewiesen werden (s.h. Kapitel 1.5), wobei der Kerntransport von p53 auf die Expression von Hsf1 angewiesen ist (Li et al., 2008).

In Tumorzellen zeigt mutiertes p53 im Allgemeinen eine höhere Stabilität, die auf eine inhibierte Funktion von p53 beruht, die Expression seines Antagonisten Mdm2 zu induzieren. In diesen Tumorzellen ist mutiertes p53 auf die Anwesenheit von Hsp70,

Hsp90 und CHIP (carboxy terminus of Hsp70-interacting protein) angewiesen (Muller et al., 2008; Walerych et al., 2004).

1.8.1 p53 und Hsp70/Hsp40

Die Hitzeschockproteine der Hsp70 Familie sind an der frühen zellulären Proteinfaltung von neu-synthetisierten oder entfalteten Substraten beteiligt (Bukau & Horwich, 1998; Frydman et al., 1994). Es konnten stabile Komplexe von Hsc70, dem konstitutiv exprimierten Hsp70-Protein, mit mutiertem, aber nicht mit Wildtyp p53 nachgewiesen werden (Hupp et al., 2000). In diesem Komplex wurde zudem das molekulare Chaperone Hsp90 und das Hsp70 Co-Chaperon Hsp40 identifiziert (King et al., 2001; Sugito et al., 1995). Hier maskiert Hsc70 die Kernlokalisierungssequenz von p53 und verhindert so den Eintritt von mutiertem p53 in den Kern (Akakura et al., 2001). Die Regulation der Translokation von p53 scheint dabei die Hauptaufgabe von Hsp70 zu sein (Zylicz et al., 2001), womit Hsp70 eine Funktion in der Qualitätskontrolle von Proteinen zukommt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Hsp70 die Akkumulation von cytosolischem p53 in einigen Tumorzellen bewirkt (Helmbrecht et al., 2000) und p53 so aus der Regulation durch Mdm2 entzieht (Zaika et al., 1999). Da aber p53 so nicht mehr nach der Ubiquitin-Markierung durch Mdm2 proteasomal abgebaut werden kann, aggregiert es im Cytosol wobei die zelluläre Kontrolle von DNA-Schädigungen negativ beeinflusst wird (Moll et al., 1996).

1.8.2 p53 und Hsp90

Die chaperon-abhängige Stabilisierung und Degradierung von mutierten p53 ist auf ein Zusammenspiel von Hsp70/Hsp90 und der Ubiquitin-Ligase CHIP zurückzuführen (Muller et al., 2008). In anderen Experimenten wurde auch Hsp90 allein im Komplex mit mutiertem p53 in Tumorzellen nachgewiesen (Sepehrnia et al., 1996; Whitsell et al., 1998). Hier bindet Hsp90 vorzugsweise an p53, dass in einer mutanten Konformation vorliegt. Die Komplexbildung unter Stressbedingungen findet zwischen Hsp90 und p53 dabei hauptsächlich im cytosolischen Kompartement der Zelle statt, weniger im Zellkern (Sepehrnia et al., 1996). Es wurde weiterhin gezeigt, dass eine Komplexbildung aus Hsp90 und p53 die Eigenschaft von MDM2 inhibiert, p53 zu ubiquitinieren und so den proteolytischen Abbau von p53 zu initiieren (Nagata et al., 1999). In vielen Studien wurde eine Association von Hsp90 bevorzugt mit mutierten p53 gefunden. Eine Inhibierung von

Hsp90 durch Geldamanycin resultierte in Zellen mit mutiertem p53 in einem schnellen Abbau von 50 % des p53 Levels (Dasgupta and Momand, 1997). Zusätzlich wirkt sich Geldanamycin auf die Translokation von mutiertem p53 aus und verhindert den Kerntransport von mutiertem p53 (Dasgupta *et al.*, 1997). Der Kerntransport von p53 findet grundsätzlich wahrscheinlich über große Heterokomplexe aus Hsp70/Hsp90 und Co-Faktoren statt, wobei Immunophiline p53 mit dem Motorprotein Dynein verbinden (Galigniana *et al.*, 2004).

Setzt man Zellen, die p53 Wildtyp enthalten, erhöhten Temperaturen aus, so konnte festgestellt werden, dass die Interaktion von Hsp90 mit p53, sowie die Akt-abhängige Phosphorylierung von Ser-15 an p53, zu der Stabilisierung von p53 nach Hitzeschock beitragen (Wang and Chen, 2003). Eine Interaktion von Hsp90 mit nativem p53 unter Normalbedingungen, wie bei erhöhter Temperatur, konnte ebenfalls festgestellt werden (Müller *et al.*, 2004; Walerych *et al.*, 2004; King *et al.*, 2001). Durch die Anwesenheit von Hsp90 ist p53 in der Lage, auch nach einem Hitzeschock noch aktiv an seine Konsensus-DNA zu binden. Die Interaktion der beiden nativen Proteine scheint dabei von kurzlebiger Natur zu sein (King *et al.*, 2001). Die Interaktionsfläche beider Proteine findet wahrscheinlich zwischen der Hsp90 Mitteldomäne und der DNA-Bindedomäne von p53 statt (Müller *et al.*, 2004; Rudiger *et al.*, 2002). NMR-Untersuchungen zeigten, dass eine komplett denaturierte Form von p53 DBD irreversibel an Hsp90 bindet (Rudiger *et al.*, 2002). Die physiologische Bedeutung dieser Interaktion konnte bisher aber nicht aufgeklärt werden.

1.9 Problemstellung

Nach der erfolgreichen Fertigstellung des Human-Genomprojekts wird eins immer deutlicher: zum Verständnis von zellulären Prozessen und folgend zur Heilung von Krankheiten, treten die Eigenschaften individueller Proteine, im Kontext der durch sie beeinflussten Signalwege, immer mehr in den Vordergrund. Dazu ist das Verständnis der Struktur, der Funktion und der Regulation der Proteine von großer Wichtigkeit.

Das molekulare Chaperone Hsp90 ist in hoher Konzentration in fast allen Lebensformen vertreten und ist für die Lebensfähigkeit essentiell. In den letzten Jahren wurde vor allem das Verständnis der Struktur und der Konformationsänderungen dieser ATPase durch detaillierte Studien erweitert. Dennoch ist noch immer unklar, wie dieses Chaperon seine Vielzahl von unterschiedlichen Substraten erkennt, bindet und durch die Verknüpfung des ATPase- mit dem Chaperonzyklus letzten Endes prozessiert. Dabei besitzt Hsp90 eine geringe intrinsische ATPase Aktivität, die aber für dessen Funktionalität notwendig ist. Wie aber wird diese Aktivität unter physiologischen Bedingungen reguliert?

Es können zwei Regulationsmechanismen von Hsp90 unterschieden werden, die Regulation von Hsp90 durch seine Co-Chaperone sowie durch post-translationale Modifikationen. Beide Mechanismen sind in der gegenwärtigen Literatur nur wenig beschrieben. In dieser Arbeit soll daher aufgeklärt werden, wie der einzige bisher bekannte Aktivator von Hsp90 (Aha1) die Aktivität von Hsp90 stimuliert und wie die Modifikation einer bestimmten Seitenkette in der C-terminalen Domäne von Hsp90 dessen Funktion beeinflussen kann, wie es für die S-Nitrosylierung im humanen Hsp90 gezeigt wurde.

Das die Interaktion von Hsp90 mit seinen Substraten auch therapeutisch sehr interessant ist, wird durch den Einsatz von Hsp90-Inhibitoren in der Tumorthherapie deutlich. In 50 % aller Tumore liegt der Tumorsuppressor p53 in einer mutanten Form vor, die mit molekularen Chaperonen assoziiert ist. Trotz intensiver klinischer Studien ist das Verständnis zur Wechselwirkung dieser beiden Proteine nur ansatzweise vorhanden, weshalb die Interaktion zwischen Hsp90 und dem Tumorsuppressor p53 in den Fokus dieser Arbeit rückt. Die Frage der Interaktionsfläche der beiden Proteine ist auch eine Frage der Regulation von p53 durch Hsp90. Weitere Regulationsmöglichkeiten von p53 sind post-translationale Modifikationen, die vor allem in der N-terminalen Transkriptionsdomäne und in der carboxyterminalen Regulationsdomäne stattfinden. Wie die Aktivität von p53 durch das Zusammenspiel seiner individuellen Domänen reguliert werden kann und welchen Einfluss dabei die post-translationalen Modifikationen spielen,

ist noch immer rätselhaft. Zur Erklärung wurden kontroverse Modelle postuliert, die aber meist auf Daten der isolierten Domänen basierten. In dieser Arbeit wird der Einfluss jeder Domäne auf die Volllänge von p53 untersucht, um so die komplexen Wechselwirkungen der einzelnen Domänen in p53 verstehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid 40 % (38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Dinatriumsalz	Roche (Mannheim, Deutschland)
¹⁵ N Ammoniumchlorid	Euriso-top (Au, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ampicillin	Sigma (St. Louis, USA)
Bacto Agar	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bromphenolblau S	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Chloramphenicol	Sigma (St. Louis, USA)
Coomassie Brilliant Blue (R-250)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
D ₂ O (60 %, > 99 %)	Euriso-top (Au, Deutschland)
Desoxyribonukleotridtriphosphate (dNTPs)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Diethylamine NONOate sodium salt hydrate	Sigma (München, Deutschland)
1,5 Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
(3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)	
Fluorescein-5-maleimide (FITC)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
¹³ C-Glukose, (u.a. ² H gelabelt)	Euriso-top (Au, Deutschland)
Harnstoff, ultra rein	ICN (Meckenheim, Deutschland)
Iodoacetamide	Sigma (München, Deutschland)
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycin	Sigma (St. Louis, USA)
LB-Medium (Luria/Miller)	Roche (Mannheim, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	ICN (Meckenheim, Deutschland)
Nikotinsäureamidadeninindinukleotid (NADH), Dinatriumsalz	Roche (Mannheim, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma (St. Louis, USA)
Phosphoenolpyruvat (PEP), Kaliumsalz	Sigma (St. Louis, USA)
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Calbiochem (San Diego, USA)
Proteaseinhibitor MixG, MixHP und Mix YF	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Radicicol	Sigma (München, Deutschland)
Tetramethylrhodamine-5-(and-6)-iodoacetamide (TAMRA)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Yeast Nitrogen Base	Difco Laboratories (Detroit, USA)

Hier aufgelistet sind nur Chemikalien, die häufig verwendet wurden oder speziell für Versuche bestellt wurden. 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 und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser (H₂O_{dd}) hergestellt. Für die Lösung von Mediensubstanzen wurde entionisiertes Reinwasser (VE-Wasser) verwendet.

2.1.2 *Proteine und Antikörper*

polyklonales Serum (Kaninchen) gegen Hsp90	Dr. J. Pineda Antikörper Service, (Berlin, Deutschland)
monoklonaler IgG-POD Konjugat gegen Kaninchen-IgG (Ziege)	Sigma (St. Louis, USA)
monoklonales IgG-POD Konjugat gegen Maus-IgG (Schaf)	Sigma (St. Louis, USA)
Restriktionsenzyme	Roche (Mannheim, Deutschland)
Trypsin (modifiziert, Sequenzierungsgrad)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Thrombin	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
DNA Polymerase Pwo, Hifi	Roche (Mannheim, Deutschland)
Alkaline Phosphatase (Shrimp)	Roche (Mannheim, Deutschland)
DNA Ligase T4	Promega (Mannheim, Deutschland)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Promega (Mannheim, Deutschland)
Pyruvatkinase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Lactatdehydrogenase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Sba1	Martin Hessling (TU München)

2.1.3 *Größenstandards, Kits und sonstige Materialien*

Standards

„1 kB DNA-Leiter“ Standard	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Low/High Range Molekulargewichtsstandard (SDS-PAGE)	BioRad (München, Deutschland)
Rotimark Molekulargewichtsstandard (SDS-PAGE)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HPLC- Eichproteinsets LMW/HMW	GE Healthcare (München, Deutschland)

Kits

ECL plus Western blot Detektionssystem (München, Deutschland)	GE Healthcare
Plasmid Preparation Kit	Promega (Mannheim, Deutschland)
PCR Product Purification & Gel Extraction Kit	Promega (Mannheim, Deutschland)
Quickchange side-directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, USA)

Sonstige Materialien

Centricon 5, Centricon 10, Centricon 30	Amicon (Witten, Deutschland)
Dialyseschläuche (6-8 kDa MWCO) USA)	Spectrum Laboratories (Houston, USA)
Dialysekassetten Slide-A-Lyzer	Pierce (Rockford, USA)
Ni-NTA magnetic beads	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Plastik-Einmalküvetten, UV-zertifiziert	Brand (Wertheim, Deutschland)
PE-Röhrchen (50;15 ml) Deutschland)	Greiner&Söhne (Nürtingen,
Petrischalen aus Polystyrol, Ø 94mm Deutschland)	Greiner&Söhne (Nürtingen,
pH-Indikatorstreifen	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Röntgenfilme X-OMAT™ AR	Eastman Kodak (Rochester, USA)
Sterilfilter (0,22 µm)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Membranfilter (0,22 µm)	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Filterpapier	Whatman (Maidstone, UK)
Immobilon-NC(Nitrocellulose)-Membran	Millipore (Bedford, USA)
Immobilon-P (PVDF) Membran	Brand (Wertheim, Deutschland)
UV-Küvetten	Hellma (Müllheim)
Ultrafiltrationsmembran YM5, YM10, YM30	Amicon (Lexington, USA)

2.1.4 Geräte

Circulardichroismus-Spektropolarimeter

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

Fluoreszenzspektrometer

Spex Fluoromax II mit temperierbarem Küvettenhalter	Jobin Yvon (Grasbrunn, Deutschland)
Spex Fluoromax III mit temperierbarem Küvettenhalter	Jobin Yvon (Grasbrunn, Deutschland)

UV-VIS-Spektrophotometer

Cary 50 Bio	Varian (Darmstadt, Deutschland)
-------------	---------------------------------

Kalorimetrische Geräte

VP-DSC Microcalorimeter	Microcal (Northampton, UK)
-------------------------	----------------------------

Gelelektrophorese- und Blotapparaturen

Hoefler Mighty Small II	GE Healthcare (München, Deutschland)
Gelelektrophoreseeinheit SE220-10A-75	
Fast Blot B44 Apparatur	Biometra (Göttingen, Deutschland)

Spannungsquellen

EPS 3500, 301 und 1001 Deutschland)	GE Healthcare (München,
--	-------------------------

Waagen

Analysenwaage BP 121 S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Laborwaage 1601 004	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Halbmikrowaagen BL 310 und BL 1500S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifugen Universal 32 R und Rotina 46R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Avanti J 25 und J2-HS mit Rotoren JA-10 und JA-25.50	Beckman (Krefeld, Deutschland)
Analytische Ultrazentrifuge Optima XL-I	Beckman (Krefeld, Deutschland)

Chromatographieranlagen

FPLC-System ÄKTA	GE Healthcare (München, Deutschland)
Pumpe P920	
UV-Detektor UPC900	
Fraktionskollektor Frac900	

HPLC-System

Pumpe Mod.2248	GE Healthcare (München, Deutschland)
UV-Detektor Uvicord VW 2251	GE Healthcare (München, Deutschland)
Fluoreszenzdetektor FP-920	Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)
Lösungsmittelentgaser Degasys DG 1310	Uniflows

Chromatographiesäulen/Säulenmaterial

Ni-NTA FastFlow/HP	GE Healthcare (München, Deutschland)
Q - / SP-Sepharose Fast Flow Säulenmaterial	GE Healthcare (München, Deutschland)
HiLoad Superdex 75/200 16/60, 26/60 prep grade	GE Healthcare (München, Deutschland)
HiTrap Heparin HP 5 ml Säulen	GE Healthcare (München, Deutschland)
Bio-Gel HT Hydroxyapatit Säulenmaterial	GE Healthcare (München, Deutschland)

Weitere Geräte

Äkta-FPLC Anlage	GE Healthcare (München, Deutschland)
Entwicklermaschine Optimax TR	MS Laborgeräte (Heidelberg, Deutschland)

Kulturschüttler Certomat S	B. Braun Biotech intl. (Melsungen, Deutschland)
Geldokumentationssystem Biodoc II	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Homogenisator Ultra Thurrax DIAX900	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Massenspektrometer Ultraflex II MALDI ToF/ToF	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
NMR Spektrometer 600/750/900 MHz	Bruker (Bremen, Deutschland)
PCR Thermocycler Primus	MWG (Ebersberg, Deutschland)
pH-Meter Multical pH 538	WTW (Weilheim, Deutschland)
Refraktometer Abbe MARK II	Leica Inc. (Buffalo, USA)
Temperatur-Gradient Gelelektrophorese System	Biometra (Göttingen, Germany)
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Umluftinkubator	New Brunswick (Nürtingen, Deutschland)
Zellaufschlussgerät (Prallstrahl) Basic Z	Constant Systems Ltd. (Warwick, UK)

2.2 Verwendete Kulturen und Medien

2.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rk ⁻ m _K ⁺), λ -	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ araD139 Δ (ara, leu)7697 Δ lacX74 galU galK rpsL deoR ϕ 80dlacZ Δ M15 endA1 nupG recA1 mcrA Δ (mrr hsdRMS mcrBC)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>E. coli</i> XL1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Codon ⁺	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3) pLysS(cm ^R)	Novagen (Madison, USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen (Madison, USA)

2.2.2 Hefestämme

Tabelle 2: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
ECU82 α	α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 trp1-1 ura3-1 hsc82::LEU2 hsp82::LEU2 (pKAT6)	D. Nathan (Nathan <i>et al.</i> , 1995)

2.3 Molekularbiologische Methoden

Bei allen molekularbiologischen Arbeiten und zur Anzucht wurden sterile Geräte und Lösungen verwendet und bei Raumtemperatur gearbeitet.

2.3.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen in LB-Medium erfolgte unter Zugabe entsprechender Antibiotika (Kana₅₀, Chloramp₃₅, Amp₁₀₀) zur Selektion auf die jeweiligen Plasmidkombinationen. Hierbei wurden 50 ml von einer Einzelkolonie für eine Übernachtskulturen angeimpft, wobei die Vorkulturen falls möglich eine Antibiotikakombination enthielt, die Hauptkulturen jedoch nur auf das eingebrachte Plasmid selektioniert wurden. Wachstum und Zelldichte der Bakterienkulturen wurde in UV/Vis Spektrophotometer bei 600 nm protokolliert. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von Eins etwa 8×10^8 Zellen/ml. Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 500 µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 500 µl 80% (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 Anzucht und Aufbewahrung von *S. cerevisiae*

Ausstrichkulturen von *S. cerevisiae* wurden auf YPD-Platten 2-4 Tage bei 30°C inkubiert. Die Anzucht in Flüssigmedien erfolgte bei kleineren Volumina im Reagenzglasroller und bei größeren Volumina im Umluftschüttelinkubator. Kleinere Volumina wurden hierbei aus Einzelkolonien, größere Volumina aus Übernachtskulturen angeimpft. Das Wachstum der Zellen wurde photometrisch bei 595 nm verfolgt. Dabei entspricht eine OD₅₉₅ von Eins etwa 2×10^7 Zellen/ml. Die Hefestämme wurden über kürzere Zeiträume auf Agarplatten bei 4°C gelagert. Alternativ wurden zur Langzeitaufbewahrung 600 µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 400 µl frischem 80% (v/v) Glycerin versetzt, bei -20 °C für eine Stunde gefroren und dann überführt und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Mit einer frischen Vorkultur wurden 100 mL LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 inkubiert. Zur Kultur wurden dann 2 mL einer 1 M MgCl₂ Lösung zugesetzt und die Kultur wird 10 Minuten bei 37 °C weiterberührt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 4600 x g bei 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 mL Puffer (3 M

Natriumacetat, 1 M CaCl₂, 2,8 M MnCl₂, pH 5,5) resuspendiert und für 60 Minuten auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1500 x g und 4°C wurde das Pellet in 2 mL Puffer (1 M Natriumacetat, 0,3 M CaCl₂, 0,9 M MnCl₂, 87% Glycerin, pH 5,5) resuspendiert, die Zellen aliquotiert und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

2.3.4 Transformation mit Plasmiden in *E. coli* Stämme

Die Transformation von *E. coli*-Stämmen mit Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Hanahan durchgeführt (Hanahan, 1983). Diese Methode liefert eine Ausbeute von etwa 10⁷-10⁸ Transformanten pro µg Plasmid-DNA. Je 100 µL kompetenter Zellen wurden mit 0,5-1 µL Plasmid-DNA Lösung vermischt und 5-10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschritt bei 42°C wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und mit 1 mL LB₀ Medium versetzt. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Ampicillin-resistente Zellen können nach 10 Minuten ausplattiert werden.

2.3.5 Transformation von *S. cerevisiae* mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithium-Acetat Methode (Ito *et al.*, 1983). Hierzu wurden 100 ml exponentiell wachsende Flüssigkulturen (2-3x10⁶ Zellen/ml) bei RT für 5 min, 1500 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dreimal in 20 ml 0,1 M LiAc/TE gewaschen. Die Zellen wurden schließlich in 1 ml 0,1 M LiAc/TE resuspendiert und innerhalb der nächsten 3 h verarbeitet. 50 µl kompetente Hefezellen wurden mit 5 µl Plasmid-DNA aus einer Standardplasmidpräparation transformiert. Dazu wurde die Proben-DNA mit den kompetenten Zellen vermischt, 5 µl Lachssperma-DNA (Sigma, St. Louis, USA) als Carrier-DNA und 300 µl Puffer (40% (w/v) PEG4000 in 0,1 M LiAc/TE 10.1) zugesetzt. Diese Mischung wurde 30 min bei 30°C inkubiert. Nach 15 min Hitzeschock bei 42°C wurde 1 ml steriles Wasser (RT) zugegeben und 5 min bei RT und 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment im verbleibenden Restmedium resuspendiert und auf CSM Selektionsplatten ausgestrichen.

2.3.6 Vektoren

Zur Klonierung alle die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurde der pET28a Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) unter der Verwendung der

Restriktionsenzyme *NdeI/XhoI* oder *NdeI/BamHI* benutzt. Die Ausnahme bilden alle Konstrukte, die auf der p53 Sequenz basieren. Hier wurde *NcoI/XhoI* verwendet, um tag-freie p53 Gene zu exprimieren.

2.3.7 Oligonukleotide

Die zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Zur Planung der Primer wurde das Programm FastPCR (University of Helsinki, Finnland) verwendet, um optimale Primersequenzen zu erhalten. Primer für die Quick-Change Mutagenese wurden nach Herstellerangaben geplant und mittels FastPCR Programm optimiert.

Zur Ermittlung der DNA-Bindeigenschaften von p53 in den Fluoreszenzanisotropie Versuchen wurden die Oligonukleotide abgeleitet von der p21-Bindesequenz oder der Konsensussequenz synthetisiert und am 5'-Ende entweder FITC oder Cy5-gelabelt.

p21-DNA_fwd: Modifikation Cy5 / FITC-5'
5'- TGGCCATCAGGAACATGTCCCAACATGTTGAGCTCTGGCA

p21-DNA_bwd:
5'- TGCCAGAGCTCAACATGTTGGGACATGTTCCCTGATGGCCA

p53-con2x5_fwd: Modifikation Cy5/FITC-5'
5'-CCTAGACATGCCTAAT

p53-con2x5_bwd:
5'-ATTAGGCATGTCTAGG

2.3.8 Plasmide

Folgende Plasmide/Konstrukte wurden in dieser Arbeit hergestellt bzw. verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Konstrukte und Plasmide

Insert/Fragment	Plasmid	Klonierung	Herkunft/Referenz
yeast Hsp82 wild type yeast Hsp82D61C yeast Hsp82Q385C yeast Hsp82A577C yeast Hsp82A577I yeast Hsp82A577N yeast Hsp82A577D yeast Hsp82A576C yeast Hsp82P486A yeast Hsp82A509C yeast Hsp82Q286K yeast Hsp82V306R yeast Hsp82E412K yeast Hsp82E415K yeast Hsp82L454R yeast Hsp82D503H yeast Hsp82D61C/A577I yeast Hsp82D61C/A577N yeast Hsp82Q385C/A577I yeast Hsp82Q385C/A577N yeast Hsp82D79N yeast Hsp82K387D yeast Hsp82V391E yeast Hsp82Q206A yeast Hsp82V209A yeast Hsp82D79N/V391E yeast Hsp82D79N/V209A	pET28a	<i>NdeI/XhoI</i>	Hessling , TU München Hessling , TU München
yeast Hsp82MD _{NMR} (aa 272-527) yeast Hsp82MD _{II} (aa 272-560) yeast Hsp82M _I (aa 272-441) yeast Hsp82M _{short} C _{short} (aa 442-636) yeast Hsp82M _{short} C _{short} -A577C yeast Hsp82C _{short} (aa 528-636) yeast Hsp82C _{short} -A577C			
yeast Aha1 yeast Aha1-N (aa 1-156) yeast Aha1-C (aa 157-356)	pET28a	<i>NdeI/XhoI</i>	Richter, TU München
yeast Sti1	pET28a	<i>NdeI/XhoI</i>	Schmid, TU München
yeast Ppt5	pET28a		Wandinger, TUM
human Hsp90 β wild type human Hsp90BC590A human Hsp90BC590I	pET28a	<i>NdeI/XhoI</i>	

yeast Hsp82 wild type yeast Hsp82A577C yeast Hsp82A577I yeast Hsp82A577N yeast Hsp82A577D yeast Hsp82Q286K yeast Hsp82V306R yeast Hsp82E412K yeast Hsp82E415K yeast Hsp82L454R yeast Hsp82D503H	pRS423 (Amp,His)		Hainzl, TU München
p53 wild type p53 DBD (aa 94-312) p53Δ10 p53Δ30 p53Δ37 N93p53 p53R280E p53S392E p53S392R N93p53S392E N93p53S392R N93p53R280E	pET28a	<i>Nco1/Xho1</i> <i>Nde1/Xho1</i> <i>Nco1/Xho1</i>	Hagn, TU München
yeast Hsp82M2 (aa 442-527)	pQE30 Xa (Amp)		diese Arbeit
yeast Cpr6	pRSETA		Grimminger, TUM
v-Src	pCH3Src (URA)		Nathan et al., (1997)

2.3.9 Medien

Folgende Medien wurden für die Anzucht von Bakterien verwendet.

LB-Medium 10 g/l Bacto Trypton
 5 g/l Yeast Extract
 5 g/l NaCl

Minimal Medium (M9) zur Isotopenmarkierung von Proteinen für NMR Messungen:

(Die Angaben beziehen sich auf 1 Liter Medium (steril filtriert))

1 g		(NH ₄) ₂ Cl ₄	
0.5 g		NaCl	
3 g		KH ₂ PO ₄	
6 g		Na ₂ HPO ₄	pH 7.4
2 ml	1 M	MgSO ₄	
12.5 ml		20% D-Glucose	
0.2 ml	0.5 M	CaCl ₂	
Antibiotika			
1 mg		Biotin	
0.5 ml	(2 mg/l)	Thiamin Hydrochlorid	
1 ml	(15 mg/l)	FeSO ₄ · 7H ₂ O	
1 ml	(15 mg/l)	ZnCl ₂	
1ml		Spurenelemente*	

* Spurenelementen-Mix: Anleitung für 1L 100x Spurenelementenmix

0,01g CuCl₂

0,01g CoCl₂

0,01g Borsäure

1,6g MnCl₂

etwas Ni₂SO₄

etwas molybdic acid

in 1L H₂O lösen,

nicht den pH einstellen, da sonst Mn(OH)₂ o.ä. ausfällt und daher nicht autoklavieren, sondern steril filtrieren.

Nach der Induktion wird dem Medium 2.5 ml 20 % D-Glukose zugegeben.

2.3.10 Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung:	100 mg/ml in H ₂ O _{dd} , stabil bei -20°C
Kanamycin-Stammlösung:	50 mg/ml in H ₂ O _{dd} , stabil bei -20°C
Chloramphenicol-Stammlösung:	35 mg/ml in EtOH, stabil bei -20°C

Die Stammlösung wird dem LB-Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Folgende Medien wurden für die Anzucht von Hefen verwendet:

YPD-Medium	10 g/l	Yeast Extract
	20 g/l	Bacto Pepton
	20 g/l	D(+)-Glucose
CSM-Selektivmedium:	6,7 g/l	YNB
	1,4 g/l	Selektiv-Aminosäuren-Mix
	20 g/l	D(+)-Glucose
	mit NaOH auf pH 7.2 einstellen	

Selektiv-Aminosäure-Mix:

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

5'-FOA – Platten: zusätzlich 0,1% (w/v) 5'-Fluor-orothsäure bei 50 °C zugeben

2.3.11 Puffer für molekularbiologische Methoden

10x DNA-Auftragspuffer:	50% (v/v) Glycerin
	0,25% (w/v) Xylencyanol
	0,25% (w/v) Bromphenolblau
TAE-Puffer:	40 mM Tris/Acetat pH 8,0
	1 mM EDTA

2.3.12 Polymerase-Kettenreaktion PCR

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) (Mullis & Faloona, 1987) wurden DNA-Bereiche aus plasmidcodierten cDNAs amplifiziert. Um die Fehlerrate bei der PCR zu minimieren wurde die Polymerase *Pwo* aus *Pyrococcus woesei* mit 3'-5' Exonukleaseaktivität (*proof reading*-Aktivität) verwendet. Eine PCR findet in Zyklen von (i) DNA-Denaturierung, (ii) Primer-Anlagerung und (iii) Primer-Extension statt. Die Amplifikation wurde in 30 Zyklen wiederholt. Zum Abschluss können eventuell unvollständige Amplifikate in einer verlängerten Extensionsphase komplettiert werden. In der Regel wurden die PCR-Amplifikationen in folgendem Standardansatz durchgeführt.

Standardreaktionsansatz einer PCR von 100 μ l

1 μ l	<i> fwd</i> -Primer (100 pmol)
1 μ l	<i> bwd</i> -Primer (100 pmol)
0.5 μ l	Template-DNA (cDNA auf Plasmid)
2 μ l	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP; je 0,2 mM)
10 μ l	10x <i>Pwo</i> -Reaktionspuffer (mit 20 mM MgCl ₂)
84,5 μ l	H ₂ O _{dd}
<hr/>	
0,5 μ l	<i>Pwo</i> -Polymerase (2,5 U)

Standarddurchführung einer PCR im ThermoCycler Primus (MWG, Ebersberg, Deutschland)

Denaturierung 95 °C	60 s	} 30 Zyklen
Denaturierung 95 °C	45 s	
Annealing 52-55 °C	45 s	
Synthese 68 °C	1min/kb	
Extention 68 °C	10 min	
Lagerung bei 4 °C		

Die Annealing Temperatur und die Synthesezeit wurde je nach Primerpaarung und zu amplifizierendes Konstrukt variiert.

2.3.13 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte in Gelen aus 1% (w/v) Agarose (in 1x TAE), denen 0,4 μ g/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 120 mA durchgeführt und anschließend mittels einer CCD-Kamera unter UV-Licht (Biodoc II, Biometra) detektiert. Als Längenstandard diente die „1 kb DNA-Leiter“ (Peqlab).

2.3.14 Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmente

Alle PCR-Produkte wurden mit dem Aufreinigungskit *PCR Product Purification & Gel Extraction Kit* (Promega) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3.15 Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA

Durch die Einführung von Punktmutationen wurde mit Hilfe des *Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, USA) eine gezielte Aminosäure ausgetauscht. Diese Technik kann auch verwendet werden, um bestimmte Sequenzen eines Gens zu deletieren oder zu insertieren.

Als Templat dient das komplette Plasmid auf dem sich das Gen befindet. Die Synthese erfolgte mit der Pfu Turbo DNA Polymerase. Die Oligonukleotid-Primer wurden nach Herstellerangaben geplant. Die Plasmidamplifikation wurde im ThermoCycler durchgeführt. Der Zyklus bestehend aus Denaturierung bei 95 °C, Hybridisierung bei 55 °C und DNA-Synthese bei 68 °C wurde 18 mal wiederholt. Direkt zu dem PCR Produkt wurde 1 µl DpnI zugegeben und der Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Restriktionsenzym DpnI schneidet spezifisch nur methylierte und hemimethylierte DNA. DpnI wurde eingesetzt, um sämtliche DNA-Stränge eines unmutierten Templatplasmids, die sich im Reaktionsgemisch der PCR befinden, vollständig zu verdauen und so auf das in der PCR produzierte, nicht methylierte Plasmid mit den gewünschten Mutationen zu selektieren.

Schließlich wurden 8 µl des PCR Ansatzes zur Transformation in kompetente *E. coli* Stämme verwendet und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Zur Kostenreduzierung wurden die Punktmutationen aus einzelnen Komponenten wie folgt zusammengesetzt:

Standardreaktionsansatz einer *site directed Mutagenesis* Reaktion von 50 μ l

0.5 μ l	<i>fwd</i> -Primer (20 pmol)
0.5 μ l	<i>bwd</i> -Primer (20 pmol)
0.4 μ l	Template-DNA (cDNA auf Plasmid)
1 μ l	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP; je 0,2 mM)
5 μ l	10x Pfu-Reaktionspuffer (mit 20 mM MgCl ₂)
41,6 μ l*	H ₂ O _{dd}
<hr/>	
1 μ l	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U)

* Wahlweise 1 μ l DMSO zur Reaktion zugeben

Standarddurchführung einer *site directed Mutagenesis* Reaktion

Denaturierung 95 °C	45 s	} 18 Zyklen
Denaturierung 95 °C	30 s	
Annealing 55 °C	60 s	
Synthese 68 °C	1min/kb	
Extention 68 °C	10 min	
Lagerung bei 4 °C		

2.3.16 Restriktionsverdau

Doppelsträngige DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Diese Enzyme erkennen spezifische DNA-Sequenzen und spalten hydrolytisch zu überhängenden (sticky) Enden. Der Verdau wurde bei 37° C für 2 Stunde inkubiert.

2.3.17 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Vermeidung von Re-Ligationen geschnittener Vektoren wurde der Restriktionsansatz nach dem Verdau mit alkalischer Phosphatase (Roche) behandelt. Entsprechende Ansätze wurden mit ca. 8-12 U alkalischer Phosphatase für ca. 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.3.18 Ligation

Ligationen wurden mit etwa 200-300 ng verdauter, dephosphorylierter Plasmid-DNA (ca. 0.5 μ l), verdautem Insert (ca. 2 μ l) in drei- bis fünffach molarem Überschuss und 2 U T4-DNA-Ligase (2 μ l) (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur nach dem so genannten *Quick-Ligation* Ansatz für 15 Minuten unter Verwendung des folgenden Puffers.

Zusammensetzung des Quick-Ligation Puffers:

132 mM Tris HCl	(3.3 ml of 1 M stock)
20 mM MgCl ₂	(0.5 ml of 1 μ stock)
2 mM DTT	(50 μl of 1 M stock)
2 mM ATP	(100 μl of 500 mM stock)
15 % PEG 6000	3.75 g

Mit H₂O auf 25 ml auffüllen und pH auf 7.6 einstellen. Lagerung bei – 20 °C

2.3.19 DNA Sequenzanalyse

Alle molekularbiologisch veränderten Vektoren und DNA-Fragmente wurden vor ihrer Weiterverwendung vollständig sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland).

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacryl-Gelelektrophorese wird verwendet, um Proteine ihrer Größe entsprechend in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Das anionische Detergens SDS maskiert hierbei die Eigenladung der Proteine und bindet an Proteine in einem bestimmten Verhältnis von 1.4 g SDS pro Gramm Protein. So entsteht ein konstantes Ladungs- zu Massenverhältnis. Die native Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine wird durch Hitzedenaturierung und durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol in den Probenpuffer aufgelöst, so dass die Proteine eine einheitliche ellipsoide Form mit reduzierten Cysteinen bilden. Die Wanderungstrecke eines Proteins ist somit dem Logarithmus seiner Molekulargewichts indirekt proportional.

Für die SDS-PAGE wurde ein 8-15 %iges SDS-Gel verwendet. Die Proteinproben wurden mit 5 x Lämmli-Auftragspuffer (300 mM Tris, 10% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 6,8) versetzt und zur vollständigen Denaturierung 5 min bei 95°C inkubiert. Nach Auftragung wurde für ca. 45 min bei 25 mA in Gel-Laufpuffer (0.1% (w/v) SDS, 0,25 M Tris, 0.2 M Glycin, pH 8,8) aufgetrennt.

Die Detektion der Proteine wurde nach dem von Fairbanks entwickelten Verfahren durchgeführt (Fairbanks et al., 1971). Das Polyacrylamidgel wird in Fairbanks-

Färbelösung A (25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,05% (w/v) Coomassie Blau R250) aufgekocht und für einige Minuten unter Schütteln inkubiert. Danach wurde mit 10 %iger Essigsäure unter kurzem Aufkochen entfärbt. Bei in dieser Arbeit abgebildeten Gelen ist die Größe von Markerbanden in Kilodalton (kDa) angegeben. Das Detektionslimit mit dieser Methode liegt bei ungefähr 50 ng Protein.

2.4.2 Nativ-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von nativ gefalteten Proteinen nach ihrer Größe wurde eine Nativ-Gelelektrophorese durchgeführt. Analog zu SDS-PAGE wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel (4%) aufgetragen (ohne SDS Zugabe). Die Proben werden native aufgetragen und nicht denaturiert. Nach Auftragung wurde für ca. 2 h bei 25 mA in Nativ-Gel-Laufpuffer (0,03 M Tris, 0,03 M Borsäure, 0,005 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, pH 8) bei 4 °C aufgetrennt. So können die Proteine in ihrer nativen, aktiven Form in das Gel eindringen und anschließend durch Coomassie oder Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. Da die Auftrennung von Proteinen Ladungsabhängig ist, sollte der pI-Wert eines Proteins beachtet werden.

2.4.3 Immunoblotting (Western Blot)

Der Immunoblot von Proteinen ist eine sehr empfindliche Nachweismethode zur Detektion eines spezifischen Proteins aus einem Zelllysat heraus oder nach einer Proteinpräparation. Die Methode (Towbin et al., 1979) basiert auf der Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper. Zu Beginn werden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt, dann im *Semi-dry* Verfahren mittels Whatman Filterpapiere auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Übertragung der Proteine erfolgte für 90 Minuten bei 1.5 A/mm² Fläche des SDS-PAGE Gels. Freie Oberflächenvalenzen der Membran werden mit Milchpulver abgesättigt. Die Proteine werden dann durch eine spezifische Immunreaktion mit einem primären Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt mittels ECL Reaktion. Hierbei ermöglicht eine an einen sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase durch Abbau von H₂O₂ die Oxidation von zyklischem Diacylhydrazin-Luminol, wobei Licht freigesetzt wird (Chemolumineszenz). Die Lichtreaktion wurde auf Röntgenfilmen (X-Omat, Kodak, Rochester, USA) detektiert.

Standardvorschrift für die Immunoblot Methode:

Blockieren:	Blocking- Reagenz	90 min bei RT
Waschen:	H ₂ O	3 x 10 min bei RT
Inkubation I:	prim. Antikörperlösung in Inkubationspuffer	60 min/ÜN bei 4 °C
Waschen:	PBS-Tween Waschpuffer	3 x 20 min bei 4 °C
Inkubation II:	sek. Antikörperlösung in Inkubationspuffer	40 min bei 4 °C
Waschen:	PBS-Tween Waschpuffer	3 x 10 min bei 4 °C
Entwicklung:	ECL I (2mL) + ECL II (50µL)	Filmbelichtung
Inkubationspuffer:	50 mM Tris 40 mM Glycin 0,04% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol	pH 7.5
PBS (pH 7,5):	2 mM Kaliumphosphat 16 mM Natriumphosphat 115 mM Natriumchlorid 0.1 % (v/v) Tween 20	
Blocking-Reagenz:	PBS + 0,05% (v/v) Tween20 + 5% (w/v) Milchpulver	
Ak- Inkubationspuffer:	Ak (Verdünnung) + 1% (w/v) Milchpulver + 0,1% (v/v) Tween20	

Verdünnungsvorschrift und Inkubationszeit für verschiedene Antikörper:

Anti-Hsp82	1 : 50.000	90 min
Anti-p53 (Ab-1)	1 : 20.000	3 h - über Nacht
Anti-v-Src (4G10)	1 : 2000	Über Nacht

2.4.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Auf der Grundlage des Nativgels wurde in dieser Arbeit ein Assay verwendet, der zum Nachweis der spezifischen DNA-Bindung von p53 an gelabelte konsensus DNA dient (Bell et al., 2002, Hansen et al. 1996). Dieser EMSA Assay (Electrophoretic Mobility Shift Assay / Bandshift) basiert darauf, dass die freie fluoreszenz-gelabelte DNA schnell in das Nativgel einwandert, während der Protein-DNA-Komplex auf Grund seiner Größe einen so genannten *supershift* erfährt und sehr viel langsamer ins Gel einwandert.

Der Protein-DNA-Komplex wird dazu vorher auf Eis inkubiert. Das fluoreszenz-markierte Oligonukleotid enthält z.B. die doppelsträngige p21-DNA-Sequenz (Szak et al., 2001) und ist am 5'-Ende Cy5 markiert. Um eine unspezifische Bindung von DNA mit der positiv geladenen carboxy-terminalen Regulationsdomäne von p53 auszuschließen, wurde dem Reaktionsansatz Kompetitor-DNA (z.B. in Form von Poly dI-dC) zugesetzt. Die Bindung von nativen p53 an DNA kann allosterisch durch einen Antikörper Pab421 (Ab-1), der am carboxy-terminalen Ende von p53 bindet, aktiviert werden.

Alle Ansätze enthielten 150 ng p53 und 500 ng Hsp90 (oder andere Chaperone) verdünnt in 5 μ L DNA-Bindepuffer. Den Ansätzen wurden danach wurden 20 μ L Reaktionsmix zugegeben und der Reaktionsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert.

Zusammensetzung für 2x DNA-Bindepuffer (pH 8):

Hepes	80 mM
Glycerin	30% (v/v)
MgCl ₂	20 mM
Triton X-100	0,2% (v/v)
BSA	2 mg/mL
DTT	10 mM
KCl	100 mM

Zusammensetzung des Reaktionsmixes:

DNA-Label p21 Oligonukleotid (0,5 pmol/ μ L)	6 μ L
Antikörper pAb421 (0,1 μ g/ μ L)	32 μ L
2x DNA-Bindepuffer	200 μ L
Kompetitor DNA Poly dI-dC	0,8 μ L
H ₂ O	87,5 μ L

Die Gelelektrophorese wurde für ca. 3 h bei 20 mA in 4%igen Nativ-Gelen (vergleiche Kapitel 2.4.2) durchgeführt. Die Detektion der Cy5-markierten DNA erfolgte durch den Typhoon 9600 Phosphoimager.

2.4.5 Methoden der Proteinreinigung

In dieser Arbeit wurde die Proteinreinigung nach den folgenden chromatographischen Methoden an einer Äkta FPLC Anlage (Amersham, Uppsala, Schweden) 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. Im Nachfolgenden werden die chromatographischen Verfahren anhand von zwei Reinigungen gezeigt, die universell für die Reinigung von Hsp90 und Hsp90-Fragmenten, sowie p53 und p53 Fragmente angewendet werden können. Alle weiteren Proteine wie Hsp90 Co-chaperone, Aha1-Fragmente und sonstige Proteine wurden nach demselben Schema wie die Hsp90 Reinigung aufgereinigt.

2.4.6 *Verwendete Puffer für die Reinigung von Hsp90 und p53*

	Zellaufschlusspuffer (pH 7.5)	
Hsp90:	100 mM KPP 50 mM KCl	p53: 40 mM KPP 50 mM KCl 1 mM TCEP 1 mM EDTA
	Ni-NTA Puffer (pH 7.5)	
Hsp90:	50 mM KPP 100 mM KCl 10 mM Imidazol (A) / 500 mM Imidazol (B)	
	Heparin Puffer (pH 7.5)	
		p53: 40 mM KPP 1 mM TCEP 5 % Glycerin 50 mM KCl (A) / 1000 mM KCl (B)
	Sepharose Puffer (pH 7.5)	
Hsp90:	50 mM KPP 50 mM KCl (A) / 1000 mM KCl (B)	p53: 50 mM KPP 1 mM TCEP 5 mM EDTA 50 mM KCl (A) / 1000 mM KCl (B)
	Gelfiltrationspuffer (pH 7.5)	
Hsp90:	50 mM HEPES 150 mM KCl	p53: 50 mM KPP 100 mM KCl 1 mM TCEP

2.4.7 Anzucht von Bakterienkulturen

Von einer Selektionsplatte wurden mehrere Bakterienkolonien in eine mit den entsprechenden Antibiotika (z.B. Kana₅₀ und Chloramp₃₅) versehene 100 ml LB-Kultur überführt und über Nacht bei 37 °C bebrühtet. Diese Vorkultur wurde in 4 Liter LB-Kultur (Kana₅₀) überführt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0.8 für ca. 3 – 3.5 h inkubiert. Danach wurde die Hauptkultur auf Eis ca. 8 Minuten abgekühlt und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression der Zielgene wurde über Nacht bei 22 Grad durchgeführt.

2.4.8 Zellaufschluss

Die Zellkulturen wurden für 10 min bei 6000 x g pelletiert und in 150 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Aufluss der Zellen erfolgte mit dem Zellaufschlussgerät (Prallstrahl) Basic Z unter Zugabe von DNase und einem Protease-Inhibitormix (Serva, Heidelberg, Deutschland). Zellbruchstücke u.ä. wurden bei 40.000 x g für 35 min durch Zentrifugation entfernt.

2.5 Chromatographische Methoden

2.5.1 Affinitätschromatographie mit Ni-Sepharose als Säulenmaterial

Alle Hsp90 Proteine und die p53 DBD enthielten einen N-terminalen RGS-His₆-tag, eingefügt durch die Klonierung mit *NdeI* im pET28 Vektor. Die artifizielle Extension mit sechs Histidinen erlaubt eine Komplexbildung des *tags* mit Übergangsmetallionen wie Ni²⁺ die vorher in die Säulenmatrix (gecrosslinkte Sepharose) eingefügt wurden (IMAC = immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie). Die Elution der Proteine erfolgt durch kompetitive Verdrängung des Proteins von der Matrix oder durch einen pH-Wert Änderung auf pH 3, da hier die Histidine-Seitenketten keine positive Ladung mehr tragen. Das Zelllysat wurde direkt auf eine HisTrap Ni-chelating FastFlow Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) aufgetragen und mit 5 % Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen Sprung auf 60 % Puffer B (300 mM Imidazolkonzentration). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert und vereinigt. Zur weiteren Reinigung per Ionenaustauscherchromatographie wurde der vereinigte Pool 1:7 mit Wasser verdünnt.

2.5.2 Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose als Säulenmaterial

Alle tag-freien p53 Proteine außer die p53 DBD wurden über die Heparin-Säule aufgereinigt. Heparin-Sepharose ist ein sehr gutes Säulenmaterial zur Trennung von DNA-Bindeproteinen, Wachstumsfaktoren und Steroid Rezeptoren. Der Ligand der Heparin-Sepharose ist natürlich vorkommendes Glycosaminglycan, das zwei bis drei Sulfatgruppen trägt. Die DNA-Bindedomäne von p53 bindet spezifisch an die Heparin-Säule und kann durch die Erhöhung der Ionenstärke des Puffers eluiert werden.

Das Zellysate wurde direkt auf eine HiTrep Heparin HP 5ml Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) gegeben und mit 5 % Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten mit Heparin Puffer B. Die Elution von p53 erfolgte bei etwa 350 – 400 mM KCl. Proteinenthaltene Fraktionen wurden per SDS-PAGE überprüft und vereinigt. Zur weiteren Reinigung per Ionenaustauscherchromatographie wurde der vereinigte Pool 1:3 mit einem Puffer aus 20 mM KPP (pH 7.5) unter Zugabe von Proteaseinhibitoren verdünnt.

2.5.3 Ionenaustauscherchromatographie

Die Ionenaustauscherchromatographie basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix. Je nach Ladung des Proteins, die über den theoretischen isoelektronischen Punkt pI-Wert ([www. Expasy.ch](http://www.Expasy.ch)) abgeschätzt werden kann, wird eine positiv geladene Matrix (gecrosslinkte Sepharose mit quaternären Ammonium-Ionen, Q-Sepharose) oder eine negativ geladene Matrix (gecrosslinkte Sepharose mit Sulfat-Gruppen, SP-Sepharose) verwendet. Die Elution erfolgt durch das Anlegen eines linearen Gradienten zur Erhöhung der Ionenstärke.

Hsp90 und Hsp90 Fragmente werden nach der Ni-Sepharose auf die Q-Sepharose aufgetragen und mit 5 % Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem linearen KCl-Gradienten. Hsp90 eluiert für gewöhnlich bei 200 – 300 mM KCl. Die p53 DNA-Binde Domäne wird ebenfalls auf die Q-Sepharose aufgetragen, jedoch bindet die p53 DBD nicht an die Säule und befindet sich im Durchlauf.

Die Bindeeigenschaften von p53 und p53 Fragmente sind schwer vorhersagbar. Deswegen wird hier das verdünnte Protein auf eine Q-Sepharose und eine SP-Sepharose gleichzeitig aufgetragen. Die beiden Säulen werden dazu hintereinander geschaltet. Danach werden die Säule getrennt, mit Puffer A gewaschen und jeweils mit einem linearen KCl-Gradienten eluiert.

Alle proteinhaltigen Fraktionen werden auf die Reinheit mittels SDS-PAGE überprüft und gepoolt.

2.5.4 Abspaltung des His₆-tag durch Thrombinverdau

Bei allen Hsp90 Fragmenten und der p53 DBD wurde der His-tag durch Thrombinverdau abgespalten. Dazu wurden die Proteinproben mit Thrombin versetzt (je 15 mg Protein 100 U Thrombin) und über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Proteinlösung wurde erneut über eine Ni-Sepharose geleitet und der Durchlauf aufgefangen. Das Molekulargewicht des Thrombins liegt bei 36 kDa, so dass ein weiterer Reinigungsschritt (mittels Hydroxyapatit) bei Proteinfragmenten nötig war, die ein ähnliches Molekulargewicht aufwiesen.

2.5.5 Chromatographie mit Hydroxyapatit-Säulenmaterial

Hydroxyapatit ist die kristalline Form von Kalziumphosphat und dieses Säulenmaterial kann für die präparative Reinigung von Proteinen, Antikörpern und Nukleinsäuren verwendet werden. Da die molekulare Auftrennung durch Hydroxyapatit nicht vom Molekulargewicht, der Molekülgestalt, dem isoelektronischen Punkt oder der Ladung des Proteins abhängig ist, kann die Reinigung mit Hydroxyapatit sehr gute Erfolge erzielen.

In dieser Arbeit wurde die Reinigung mit Hydroxyapatit bei den Hsp90 Mitteldomänen Fragmenten verwendet. Nach der Elution von der Q-Sepharose wurden die Hsp90MD Fragmente 1:10 mit Wasser verdünnt und auf die Hydroxyapatit-Säule geladen. Die Säule wurde mit Puffer A (20 mM KPP, pH 7.5) gewaschen und die Elution erfolgte mit einem linearen Phosphat-Gradienten mit Puffer B (400 mM KPP, pH 7.5). Alle proteinhaltigen Fraktionen werden auf die Reinheit mittels SDS-PAGE überprüft und gepoolt.

2.5.6 Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)

Bevor die Proteine durch die Gelfiltration weiter aufgereinigt werden können, müssen sie aufkonzentriert werden. Dazu wurden Centricons mit einem entsprechenden MWCO Wert (*molecular weight cutoff*) gewählt. Die Aufkonzentrierung fand bei 4 °C und 4000 x g statt.

Das Trennprinzip der Größenausschluss-Chromatographie beruht auf der Diffusion und trennt Proteine nach ihrem hydrodynamischen Radius auf. Die Matrix der Säulen besteht meist aus Mikrogranulat von quervernetztem Dextran mit definierter Partikel- und

Porengröße. Proteine, deren Durchmesser größer ist als die Porengröße, sind nicht in der Lage, in die Partikel des Trägermaterials hinein zu diffundieren und eluieren daher gemeinsam im Ausschlussvolumen. Kleinere Proteine können dagegen in die Partikel eindringen und wandern daher langsamer durch die Säule. Da die Proteine vor der Gelfiltration schon einen sehr hohen Reinheitsgrad auswiesen, wurde als Laufpuffer der Aufbewahrungspuffer der Proteine verwendet. Je nach Größe der Proteine wurde entweder die Superdex75 oder die Superdex200 Prep Grade 26/60 (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet.

Alle proteinhaltigen Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Die zur Homogenität gereinigten Proteine wurden gepoolt und erneut mittels Centricons aufkonzentriert.

Die Proteine wurden per Massenspektrometrie auf ihr Molekulargewicht und Reinheit hin überprüft, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5.7 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Mit der HPLC Methode können Quaternärstrukturen und Oligomerisierungszustände von Proteinen qualifiziert und Molekulargewichte über Standardproteine abgeschätzt werden. Obwohl es sich bei dieser Methode nicht um eine Gleichgewichtsmethode handelt und Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Matrix möglich sind, bedient man sich der HPLC Methode, um schnelle Aussagen über Oligomerisierungsverhalten von Proteinen und Proteinkomplexe zu erhalten. Die HPLC Methode wurde hier verwendet um einmal den Oligomerisierungszustand von p53 nachweisen zu können und weiterhin, um die apparente Dissoziationskonstante der C-terminal vermittelten Hsp90 Dimerisierung über die Retentionszeit quantifizieren zu können. Für letzteres wurden die Retentionszeit von je 100 μl einer 8 nM bis 30 μM Hsp90 Proteinlösung auf einer Superdex 200HR Säule (GE Biosciences Europe, Freiburg, Germany) bei einer Flussrate von 0.75 ml/min über die intrinsische Fluoreszenz von Hsp90 ($\lambda_{\text{em}} = 280\text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 330\text{ nm}$) detektiert. Der konzentrationsabhängige *shift* der Retentionszeit kann zur Errechnung der apparenten C-terminalen Dimerisierungskonstante herangezogen werden. (Richter et al., 2002). Bei dieser Näherung wird angenommen, dass sich das Protein zu jedem Zeitpunkt in einem schnellen Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer befindet. Da die Verdünnung des Proteins durch den Lauf nicht berücksichtigt wird, muss die erhaltene Dimerisierungskonstante noch durch einen Verdünnungsfaktor 5,5 geteilt werden, der sich

aus dem eingespritzten Volumen und dem Volumen bei Detektion berechnet nach Peakfläche und Peakhöhe ergibt. Es wurde folgende Formel verwandt:

$$RT = RT_{Monomer} - (RT_{Monomer} - RT_{Dimer}) \cdot \frac{c(Hsp90)}{c(Hsp90) + K_{D(app)}} \quad (1)$$

mit RT als Retentionszeit und der Konzentration des injizierten Hsp90 $c(Hsp90)$, sowie der apparenten Dissoziationskonstanten.

2.5.8 Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Proteine, die für fluoreszenzspektroskopische Assays oder Nativgele fluoreszenzmarkiert wurden, wurden nach folgenden Schemata markiert und gereinigt. Die kovalente Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte entweder unspezifisch an primäre Ammoniumgruppen wie Lysin-Seitenketten durch den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein-5-isothiocyanat oder spezifisch mit Thiolgruppen der Cystein-Seitenketten durch die Verwendung von Iodacetamid- oder Maleimid-Kopplungsgruppen. Das Fluorescein-5-isothiocyanat Label wurde nach der Vorschrift mit dem FluoReporter FITC Protein Labeling Kit (Molecular Probes, Eugene, USA) durchgeführt. 200 μ L einer etwa 100 μ M Hsp90 Proteinlösung wurden mit Natriumbicarbonat gepufferten Proteinlösung und nach Zugabe des Labels 90 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Überschüssiges Label wurde durch Zugabe von 1 M Tris/HCl Puffer pH 8 für 20 min bei RT gequenched und über Entsalzungssäule Desalting HP 26/10 abgetrennt.

Für das Labeln von Hefe Hsp90 Cysteinmutanten wurde der Farbstoff mit entsprechender Kopplungsgruppe (TAMRA, ATTO565, Luzifer Yellow oder Fluorescein-maleimid) in einem 5 molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben (Puffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl) und 90 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Freies Label wurde mit DTT gequenched und über eine Entsalzungssäule Desalting HP 26/10 abgetrennt. Die Labeleffizienz wurde mit den entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten der Proteine und der Farbstoffe berechnet.

2.5.9 Modifizierung von Proteinen durch *in vitro* S-Nitrosylierung

Die reversible Modifikation von Thiolgruppen durch das Radikal Stickstoffmonoxid $NO\cdot$, die so genannte S-Nitrosylierung, verläuft im Gegensatz zu anderen Post-translationalen

Modifikationen ohne den Einfluss weiterer Enzyme, ist aber trotzdem hoch selektiv. Daher kann die S-Nitrosylierung *in vitro* durch die Anwesenheit von NO-Donoren nachgestellt werden. Hierzu wurde jeweils frisch eine Lösung von Diethylamine NONOate Natriumsalz hydrate $((\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{N}(\text{N}=\text{O})\text{O}^- \text{Na}^+ \cdot x\text{H}_2\text{O})$ (Sigma, Munich, Germany) in 50 mM KH_2PO_4 pH 7.5, 50 mM KCl, gelöst und im 20-fach Überschuss mit 100 μM zu modifizierendes Protein für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das post-translationale Protein direkt weiterverwendet oder überschüssiger NO-Donor durch eine Entsalzungssäule Desalting HP 26/10 abgetrennt. Der Nachweis der Cysteinmodifikation wurde mit Hilfe des Ellmann Assays durchgeführt.

2.5.10 Ellmann Assay

Der Ellmann Assay wird zur quantitativen Analyse von Thiolgruppen verwendet. Dabei reagiert im Überschuss eingesetztes 5, 5'-Dithiobis-2, 2'-nitrobenzoesäure (DTNB) mit den reduzierten Thionlgruppen der Cystein-Seitenketten. Bei der Bildung eines gemischten Disulfids aus dem Thiolrest und 2-Nitro-5-thiobenzoat (NTB) wird das 2-Nitrobenzoat-thio-Anion stöchiometrisch freigesetzt. Dessen Konzentration kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm mit $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt werden. Dazu wird 1 ml einer verdünnten Proteinlösung direkt in der Küvette mit 30 μl einer 1 M DTNB-Lösung versetzt und für 20 Minuten inkubiert. Die Konzentration an freien Thiogruppen wird über das *Lambert-Beer'sche* Gesetz berechnet.

2.6 Spektrometrische Methoden

2.6.1 Maldi ToF/ToF Massenspektrometrie

In der Massenspektrometrie werden Ionen in einem Hochvakuum erzeugt und nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten m/z aufgetrennt. Bei dem hier verwendeten Maldi ToF/ToF Spektrometer erfolgt die Ionisation der Probe durch Laserpulse auf die in einer Matrix eingebetteten Proben (Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie). Danach werden die Proben beschleunigt und anschließend in einer feldfreien Driftstrecke nach ihrer Flugzeit (Time of Flight) aufgeschlüsselt. Am Ende des Analysators werden die Ionen in einem Detektor durch Sekundärelektronenvervielfachung (SEV) erkannt und ihr Masse/Ladungsverhältnis m/z ausgewertet. Das verwendete Maldi ToF/ToF verfügt über zwei Flugzeitmassenanalysatoren, welche durch einen abschaltbaren Reflektor am Ende der ersten Driftstrecke in Serie geschaltet werden können. Die

Massenspektrometrie wurde bei allen aufgereinigten Proteinen angewandt, um die korrekte Masse zu bestätigen.

Desweiteren wurden Proteinproben durch Peptidasen verdaut und die Peptid-Zusammensetzung sowie die Peptid-Sequenz analysiert. Durch spontanen Zerfall der Peptide auf der Driftstrecke ist es möglich, die dabei Auftretenden PSD-Ionen (post-source-decay) im Reflektormodus des Gerätes näher zu analysieren. Damit kann man die Aminosäuresequenz der Peptide erhalten. Neben der Möglichkeit das Peptidmuster eines proteolytischen Verdau (z.B. mit Trypsin) zu analysieren ist die PSD-Ionen-Analyse eine internet gestützte Methode zur Identifikation von Proteinen.

2.6.2 *Probenvorbereitung für die MS-Analyse von Proteinen nach Trypsinverdau*

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen nach Trypsinverdau eignet sich einerseits zur Identifizierung von Proteinen und zur Analyse von Proteinmodifikationen wie Disulfidbrücken nach einer SDS-PAGE. Die MS-Analyse wurde hier verwendet, um die Ausbildung von nativen Disulfidbrücken oder Crosslinker-basierte Verknüpfung zweier Thiolgruppen nachzuweisen. Dazu wurden die Proben vor der SDS-PAGE mit Iodazidamid behandelt, um freie Cysteine zu carboxymethylieren. Die zu analysierende Proteinspots wurden ausgestochen und wie folgt behandelt (Disulfidbrücken sollen hierbei erhalten bleiben):

Standardanweisung zur Präparation von MS-Proben:

2 mal 100 µl einer 10 mM NH₄HCO₃-Lsg zugeben, nach 10 min abziehen

100 µl einer Mischung aus Acetonitril : 10 mM NH₄HCO₃ (1:1) zugeben, nach 10 min abziehen

Pellet behandeln mit 100 µl der Lösung und für 30 min bei 37 °C schütteln:

0.5 mM Gua/HCl, 0.8 mM EDTA, 0.1 mM Tris/Hcl pH 8.2

100 µl einer 10 mM NH₄HCO₃ zugeben, nach 10 min abziehen

Waschen der Gelstücke mit je 100 µl folgender Lösung, nach 10 min jeweils abziehen

Acetonitril : 10 mM NH₄HCO₃ (1:1)

10 mM NH₄HCO₃

Acetonitril : 10 mM NH₄HCO₃ (1:1)

10 mM NH₄HCO₃

Acetonitril : 10 mM NH₄HCO₃ (1:1)

Die Gelstücke mit einer Vakuumzentrifuge vollständig trocknen (5 min)

2 µl einer vorverdünnten Trypsin-Lösung zugeben und über Nacht bei 37 °C inkubieren

Weitere Verarbeitung zur Massenanalyse über ZipTips und Peptidanalyse im Maldi ToF/ToF

Auswertung des Peptid-Fingerprints über MMass

2.7 Kalorimetrische Verfahren

2.7.1 Differenzial-Scanning Kalorimetrie (DSC)

Die DSC Methode (Difference Scanning Calorimetry) ist eine quantitative Methode, die zur kalorimetrischen Untersuchung von Proteinen verwendet wurde. Dabei wurden zwei isolierte Zellen (Proben- und Referenzzelle) entlang eines Temperaturgradienten bei identischer Temperatur gehalten. Findet in der Probenzelle eine endo- oder exotherme Phasenumwandlung statt, resultiert das in einer Differenz der für die Zellen benötigten Heizleistung. Als Messgröße wird diese Differenz (P) gewählt, die dem Unterschied der Wärmekapazitäten der zu messenden Probe c_p und der Referenz c_r direkt proportional ist:

$$\Delta C(T) = c_p - c_r = \frac{\Delta P(T)}{\beta} \quad (2)$$

Hierbei erfolgt das Aufheizen von Proben- und Messzelle mit einer konstanten Heizrate β . Die Kalorimetrischen Messungen wurden alle an einem VP-DSC Microcalorimeter (Microcal) durchgeführt. Der Temperaturgradient wurde von 10 °C – 90 °C gewählt bei einer konstanten Heizrate von 20 °C/h. Die Proteinkonzentration betrug 30 μ M in 50 mM KPP, pH 6.8, 50 mM KCl. Die Schmelztemperatur wurde nach Abzug der Basislinie mit dem Programm ORIGIN (Microcal) ausgewertet.

2.8 Multidimensionale Kernresonanz Spektroskopie (NMR)

Alle NMR Messungen sind von Franz Hagn und Stephan Lagleder durchgeführt worden und werden in ihren Arbeiten ausführlicher beschrieben.

Für das Assignment des Protein-*backbones* der Hsp90 Mitteldomäne (aa 272-527) wurde eine hochdeuterierte (> 95 %) ^{13}C - und ^{15}N -isotopenmarkierte Probe auf 1 mM aufkonzentriert und in 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl Puffer vermessen. Eine Reihe TROSY-basierter Triple-Resonanz Experimente wie HNC0, HNCA, HNCACB, HN(CO)CA, HN(CO)CACB und HN(CA)CO wurden an einem Bruker DMX750 Spektrometer (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) bei 25 °C aufgenommen. Zusätzlich wurde ein ^{15}N -basiertes NOESY-Spektrum vermessen, um das angefertigte Assignment zu bestätigen. Das Sequenz-spezifische Assignment wurde mit dem halb-automatischen Programm PASTA durchgeführt.

Zur Lokalisierung der Interaktionsfläche von Hsp90 mit Bindepartnern wurden die chemischen Verschiebungen des ^{15}N -TROSY Experiments mit 1kx256 Datenpunkte aufgenommen. Dazu wurden ein Spektrum von 500 μM des ^{15}N -markierten Proteins in 10 mM Na-phosphat pH 7.2 aufgenommen und die chemischen Verschiebungen nach Zugabe des Bindungspartners (mindestens 1.5 molarer Überschuss) analysiert. Die gewichteten chemischen Verschiebungen Δ_{av} wurden nach folgender Formel ausgewertet:

$$\Delta_{av} = \frac{\sqrt{\Delta H^2 + \frac{1}{25}\Delta N^2}}{2} \quad (3)$$

wobei ΔH und ΔN die chemischen Verschiebungen für die Proton- und Stickstoffdimension bedeuten. Für die Extraktion der Wasserstoffaustausch-Raten wurden MEXICO Experimente mit 50, 100 und 150 ms *dephrasing time* aufgenommen. Wasserstoffaustausch-Raten wurden mit Hilfe des Programms Xmgrace errechnet und gegen die Aminosäure Sequenz aufgetragen (Grace development team, <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>). Dynamiken im Nanosekunden- bis Pikosekundenbereich wurden über ein $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronukleares NOE Experiment aufgenommen. Für die Messung von HN residualen dipolaren Kopplungen wurden TROSY und semi-TROSY Komponenten der HN Korrelationssignale für den isotopischen und anisotropischen Fall verglichen. Das Alignment wurde durch die Zugabe von 6 mg/ml Pf1 Phagen (Profos AG, Germany) induziert. Spin-Labelings von Cysteine in p53 wurden nach dem Herstellerprotokoll angebracht (Battiste&Wagner2000). MTSL-markierte p53 DBD wurde zur ^{15}N -markierten Hsp90 Mitteldomäne titriert, während TROSY Experimente in der Anwesenheit und Abwesenheit von 10 mM Ascorbinsäure aufgenommen wurden.

2.8.1 Struktur-Kalkulation und Molekulares Docking

Sämtliche Messungen von von Franz Hagn durchgeführt. Strukturfiles wurden der pdb Datenbank entnommen (Hsp90MD: 1hk7, Hsp90 full-length: 2cg9, p53 DBD: 2fej). Eine Strukturvorlage der Hsp90 Mitteldomäne wurde im Programm Xplor-NIH erstellt. NMR basierte *Docking* Läufe wurden auf der Grundlage der chemischen Verschiebungen und der paramagnetischen Relaxationverstärkung als Basis für die direkt an der Interaktion beteiligten Aminosäuren (aktive Reste) sowie deren Nachbarn (passive Reste) mit Hilfe des Programms HADDOCKv2.0 (Dominguez et al., 2003) durchgeführt. Die erhaltenen Strukturen wurden analysiert und vereinigt, basierend auf den intermolekularen Energietermen und den Standardabweichungen die Struktur mit der niedrigsten Energie.

2.9 Spektroskopische Methoden

Alle in dieser Arbeit aufgenommenen Fluoreszenz oder CD-Spektren wurden gegen ein entsprechendes Pufferspektrum als Referenz korrigiert, das den Puffer enthielt, in dem sich das Protein befand. Bei allen UV/Vis-Spektren und bei den Konzentrationsbestimmungen per UV/Vis Spektroskopie wurde als Basislinie ein Pufferspektrum gemessen.

2.9.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie ist eine Absorptions-Spektroskopie, bei der eine Absorption von elektromagnetischer Strahlung in UV/Vis-Bereich erfolgt. π -Elektronen werden dabei aus ihrem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand durch Absorption von Energie angehoben. Die Carbonylgruppen des Proteinerückgrats absorbieren elektromagnetische Strahlung der Wellenlänge 180 – 240 nm, spielen aber eher eine untergeordnete Rolle. Die Absorption der aromatischen Seitenketten eines Proteins hingegen kann vielseitig z.B. zur Konzentrationsbestimmung des nativen Proteins genutzt werden. Die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren absorbieren elektromagnetische Strahlung in unterschiedlicher Stärke mit folgender Reihenfolge: Tryptophan > Tyrosin > Phenylalanin. Auch Disulfidbrücken sind an der Absorption allerdings im geringeren Maße beteiligt.

Tabelle 4: Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten von Aminosäuren und der S-S-Brücken gemessen in Wasser bei neutralem pH Wert (nach Schmid, 1989)

Aminosäure	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [$M^{-1}cm^{-1}$]
Tryptophan	280	5600
Tyrosin	274	1400
Phenylalanin	257	200
Disulfidbrücke	250	300

Da die Absorptionsintensität und das Maximum der Wellenlängenabsorption von der Polarität des den Aromaten umgebenden Lösungsmittel ist, kann die UV/Vis-Spektroskopie zur Charakterisierung der Proteinfaltung herangezogen werden. Spektren von nativen und denaturierten Protein können hier gravierende Unterschiede aufweisen.

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Konzentration von Proteinlösungen über das Lambert-Beer'sche Gesetz mit Hilfe des über das Programm *ProtParam* (www.expasy.ch) ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten in Wasser zu ermitteln. Dazu wurden Proteinlösungen so weit verdünnt, dass sie nach Abzug der Puffer-Referenz als Basislinie eine Absorption von 0.1 – 0.7 aufwies. Von dem Proteinabsorptionsmaximum bei 280 nm wurde der Absorptionswert bei 350 nm abgezogen und die Proteinkonzentration nach folgender Formel ermittelt:

$$c(\text{Proteinlösung})[M] = \frac{(A_{280} - A_{350}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Küvetteneschichtdicke}[cm]}{\varepsilon_{280}[M^{-1}cm^{-1}]} \quad (4)$$

mit A gleich der Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge und ε dem über *ProtParam* ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten.

Wenn es die Proteinstabilität erlaubte, wurden die Absorptionsspektren zur Konzentrationsbestimmung in Wasser gemessen. P53 wurde in einem Puffer aus 25 mM KPP, pH 7.5, 20 mM KCl gemessen, der hier gleichzeitig als Referenzpuffer diente. Alle UV-Absorptionsexperimente wurden in Quarzglas Suprasil Küvetten (Starna, Pfunderstadt, Deutschland) gemessen.

2.9.2 Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um einen Vorgang, bei dem ein elektronisch angeregter Zustand seine Energie durch strahlende Desaktivierung durch spontane Emission sofort nach Abschaltung der anregenden Strahlung abklingen lässt. Die Absorption versetzt das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand. Nachdem das Molekül strahlungslos Energie durch z.B. Stöße an die Umgebung abgegeben hat und an dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands angelangt ist, wird die verbleibende Anregungsenergie durch spontane Emission freigegeben. Der Übergang erfolgt vertikal im Einklang mit dem Franck-Condon-Prinzip und da ein Teil der Energie durch Schwingungsenergie übertragen wurde, erscheint die Emissionsspektrum des Moleküls in einem längerwelligen Bereich, als das Absorptionsspektrum des Moleküls (Stoke'sche Verschiebung). Diese Art der Energieabgabe ist stark temperaturabhängig, so daß bei steigender Temperatur die Fluoreszenz abnimmt.

Bei Proteinen bilden die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin die intrinsische Fluoreszenz des Proteins, wobei die relative

Empfindlichkeit der einzelnen Aminosäuren etwa dem Verhältnis entspricht: 1100: 200: 8 (Schmid, 1989). Tryptophan hat eine relativ hohe Empfindlichkeit, da es zusätzlich von der Emission der Tyrosine und Phenylalanine angeregt werden kann. Zudem ist das Emissionsmaximum der Tryptophan-Fluoreszenz abhängig von der Polarität der Tryptophanumgebung und kann daher zur Charakterisierung von Faltungszuständen von Proteinen verwendet werden. Bei Tyrosinen ändert sich lediglich die Signalintensität. Fluoreszenzspektren wurden in einem Spex FluoroMax2 oder FluoroMax3 Spektrofluorometer mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm gemessen.

2.9.3 Fluoreszenztitration

Die Änderung der Fluoreszenzintensität eines Moleküls nach Zugabe eines Bindungspartners wurde in dieser Arbeit benutzt, um Affinitäten der beiden Moleküle zueinander näherungsweise zu beschreiben. Es wurde hauptsächlich, wenn auch nicht immer, Fluoreszenzlösungen (Quenchingeffekte) beobachtet. Zu den Quenching-Effekten gehören alle die Vorgänge, die entweder den angeregten Zustand des Fluorophors *strahlungslos* in den Grundzustand überführen oder aber verhindern, dass das Fluorophor in den angeregten Zustand übergehen kann.

Die Fluoreszenztitration wurde benutzt, um die Affinität von Hsp90 und p53 zu quantifizieren. Dazu wurde Hsp90 oder Fragmente von Hsp90 unspezifisch durch den Fluoreszenzmarker Fluorescein-5-isothiocyanat gelabelt (etwas 1 Farbstoffmoleküle pro Hsp90-Monomer). Die Abnahme der Fluoreszenz von 1 μ M Hsp90-FITC nach Zugabe des Bindungspartners p53 wurde bei 15 °C in 20 mM Tris, pH 7.5, 20 mM KCl bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 498$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 516$ nm gemessen. Hsp90-FITC wurde vor der Zugabe von p53 für 30 min gebleached, dann erfolgte die Zugabe von p53 alle 80 sek. Die Fluoreszenzintensität im Gleichgewicht, um die Verdünnung nach der p53 Zugabe korrigiert, wurde nach einem *one-side binding model* mit der Software Origin (Microcal) nach folgender Formel gefittet:

$$y = \frac{B_{\text{max}} \cdot x}{K_{\text{app}} + x} \quad (5)$$

mit B_{max} gleich der obersten Asymptote, und K_{app} der apparenten Bindungskonstante der [Hsp90•p53] Komplex.

2.9.4 Fluoreszenzpolarisation

Unter Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung des UV/Vis-Bereichs (200 nm bis 800 nm) auf Moleküle mit geeigneten Chromophoren kommt es durch Lichtabsorption zur Elektronenanregung. Bei der Energieabgabe durch Fluoreszenz ändert sich das Dipolmoment des Moleküls und man kann für die strahlenden Prozesse ein Emissionsübergangsdipolmoment bestimmen. Die Übergangsdipolmomente für die Absorption und die Emission sind nicht parallel, sondern um einen bestimmten, aber meist kleinen Winkel gegeneinander verschoben. Unter der Voraussetzung, dass sich ein Fluorophor zwischen Absorption und Emission nicht nennenswert bewegt, folgt daraus, dass bei Anregung mit linear polarisiertem Licht auch die entstehende Fluoreszenzstrahlung zu einem gewissen Grad polarisiert ist.

Bei Fluoreszenzanisotropie- oder Fluoreszenzpolarisations-Messungen wurde das Spex FluoroMax-3 fluorometer verwendet, bei denen sowohl in den Anregungs- als auch in den Emissionsstrahlengang zusätzlich zum Monochromator je ein Polarisator installiert ist. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt mit monochromatischem, vertikal linear polarisiertem Licht. Die Fluoreszenzintensität wird einmal bei vertikal und einmal bei horizontal gestelltem Emissionspolarisator gemessen. Das Ausmaß der teilweisen Verschiebung der Polarisationssebene des Emissionslichtes gegen die des Absorptionslichtes wird durch die Polarisation P (Anisotropie r) nach folgenden Formeln bestimmt.

$$P = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}} \quad (6)$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot G \cdot I_{\perp}} \quad (7)$$

wobei I_{\parallel} die Intensität der parallelen Strahlung und I_{\perp} die Intensität der perpendicularen Strahlung ist. Der G-Faktor kann vor der eigentlichen Messung der Probe bestimmt werden.

Mit Hilfe dieser Technik kann die Rotationskorrelationszeit von Fluorophoren bekannten Lebensdauer bestimmt werden. Unter Kenntnis der Viskosität der Umgebungslösung kann so durch Messung der Anisotropie bei verschiedenen Temperaturen die maximale Polarisation für diesen Komplex ermittelt werden. Ändert sich die Größe des Komplexes (z.B. durch Bindung von DNA an ein Protein) so verringert sich die

Rotationsgeschwindigkeit des Proteins und die Polarisation nimmt ab. Fluoreszenzpolarisationsmessungen dienten in dieser Arbeit zur Affinitätsbestimmung der Bindung zwischen fluoreszenz-markierter DNA und p53. Um auszuschließen, dass sich die Quantenausbeute des an die DNA gekoppelten Fluorophors während der Bildung des DNA-Protein-Komplex nicht verändert, wurde das Fluoreszenz-Spektrum von 50 nM freier Cy5-markierter p21-DNA in 50 mM KPP, pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM TCEP bei 15 °C mit $\lambda_{\text{ex}} = 650$ nm verglichen mit dem Fluoreszenzspektrum der Cy5-p21-DNA in Anwesenheit von 1 μM p53. Um Bindungsparameter zu erhalten, wurde die Änderung der Anisotropie von 50 nM Cy5-p21-DNA nach der Titration von p53 und p53 Fragmenten in einem Konzentrationsbereich von 0 – 3.5 μM ebenfalls bei 15 °C im obigen Puffer mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 650$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 680$ nm im Gleichgewicht detektiert. Die Daten wurden nach folgender Formel ausgewertet, um Affinitätsparameter der Bindung zwischen p53 und der p21-DNA zu erhalten:

$$y = \frac{y_{\text{max}} \cdot x}{k_D + x} \quad (8)$$

mit y_{max} gleich der oberen Asymptote und k_D der apparenten Dissoziationskonstanten.

2.9.5 Fluoreszenzspektroskopie der ANS Bindung

Der Fluoreszenz-Farbstoff 1-Anilinnaphthalene-8-sulfonsäure (1,8-ANS) bindet an hydrophobe Oberflächen von z.B. Proteinen und weist nach der Bindung eine stark erhöhte Fluoreszenzintensität auf. In dieser Arbeit wurde die Bindung von ANS an Hsp90 verwendet, um eine Aussage über die exponierte, hydrophobe Oberflächenstruktur von Hsp90 und Hsp90 Mutanten zu erhalten. Alle Experimente wurden bei 25 °C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl in einer 1.5 ml Rührküvette am Spex FluoroMax-2 fluorometer aufgenommen. Die Fluoreszenz-Spektren für ANS in Ab- und Anwesenheit von Hsp90 wurden mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm und einem Emissionsbereich von 400 bis 650 nm aufgenommen. Zur Bestimmung von Bindungsparametern, Die Fluoreszenz von 2 μM Hsp90 wurden bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 475$ nm detektiert und der Bindungspartner ANS wurde alle 80 sek. zu der Lösung bis zu einer finalen Konzentration von 120 μM titriert. Die Emissionsdaten wurden auf Grund des inner filter Effekts nach folgender Formel ausgewertet und die apparente Dissoziationskonstante $K_{D\text{app}}$ bestimmt:

$$F_{corr} = [Hsp90 \cdot ANS] = F_{obs} \cdot \text{anti log}\left(\frac{OD_{380} + OD_{475}}{2}\right) = \frac{F_{max} \cdot [ANS]}{K_{D(app)} + [ANS]} \quad (9)$$

mit OD_{380} und OD_{475} als die optischen Absorptiondichten bei 380 nm und 475 nm und F_{max} als maximale Quantenausbeute. Die korrigierten Daten wurden mit der Software ORIGIN (Microcal) gefittet.

2.9.6 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Der Energietransfer der Fluoreszenzresonanz ist ein physikalischer Prozess, der auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zweier Fluorophore beruht und in der Biophysik als ein Metermaß in Nanometermaßstab benutzt wird. Dabei wird die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor) übertragen, wobei die Fluoreszenz des Donors abnimmt, die Fluoreszenz des Akzeptors aber zunimmt. Die Effizienz der Energieübertragung der FRET-Paarung nimmt mit der 6. Potenz des Abstands beider Fluorophore ab. Außerdem ist der Energietransfer vom Försterradius R_0 des Fluorophorenpaars abhängig. Als Försterradius ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor definiert, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50 % ist. Dieser ist von der chemischen Natur der verwendeten Fluorophore abhängig.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (10)$$

Als FRET-Paare können zwei Fluorophore benutzt werden, die ein Überlappungsintegral des Donor-Emissionsspektrums und des Akzeptor-Absorptionsspektrums aufweisen. In dieser Arbeit wurden zwei FRET-Paare benutzt, die Paarung FITC-TAMRA (Fluorescein-5-maleimide und Tetramethylrhodamine-5-(und-6)-iodacetamid (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)) und die Paarung FITC-ATTO565 (ATTO565-maleimide, (ATTO-TEC, Siegen, Deutschland). Das Markieren von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und die Markierungseffizienz spektroskopisch bestimmt. Freies Label wurde mit DTT gequenched und über eine Entsalzungssäule Desalting HP 26/10 abgetrennt.

2.9.7 Dimeraustausch von Hsp90 gemessen mit FRET

Der Dimeraustausch (Subunit exchange) von Hsp90 in Lösung wurde mit FRET Kinetiken bei verschiedenen Konzentrationen und Temperaturen gemessen. Hierzu wurde eine Paarung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Hsp90 Mutanten verwendet. Hefe Hsp90D61C wurde FITC markiert und Hefe Hsp90Q385C wurde entweder TAMRA oder ATTO565 markiert. Es wurden zwei unterschiedliche Messmethoden zur Analyse des Dimeraustausches verwendet, die einmal auf der Bildung und einmal auf der Dissoziation des Heteromerkomplexes beruht.

Subunit exchange für die Bildung des Hsp90 Heteromerkomplexes

Die FRET-Paarung aus FITC/TAMRA wurde in einem Puffer aus 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl bei 25 °C mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 496$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm gemessen. Dazu wurden 100 nM FITC-markiertes Hsp90 für 30 Minuten gebleached. Nach der Zugabe von 100 nM TAMRA-markiertes Hsp90 wurde die Abnahme des FITC-Signals für 25 Minuten detektiert. Zur Analyse der C-terminalen Mutanten von Hsp90 wurden zusätzlich zur Cystein-Mutation entweder die Hsp90A577N oder die Hsp90A577I eingeführt und den Einfluss der C-terminalen Mutationen auf den subunit exchange gemessen. Dabei wurde die apparente Halbwertszeit $t_{1/2}$ der Reaktion ermittelt, um eine qualitative Aussage über die Änderung in der Reaktionsgeschwindigkeit zu erhalten. Die Daten wurden um das lineare Bleaching des FITC-Donors korrigiert und ausgewertet nach der Gleichung (11):

$$y = y_0 + A \cdot \exp\left(-x / \left(\frac{\ln(2)}{t_{1/2, \text{app}}}\right)\right) \quad (11)$$

wobei y_0 der Offset und $t_{1/2, \text{app}}$ die qualitative apparente Halbwertszeit der beobachteten Reaktion

Subunit exchange für den Zerfall der Heterodimerkomplexe

Um den Einfluss von Aha1 auf die Dimeraustauschraten von Hsp90 charakterisieren zu können, wurde die FRET-Paarung FITC/ATTO565 in einem Puffer aus 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl bei 20 °C mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 475$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm gemessen. 100 nM FITC-markiertes Hsp90 und 100 nM ATTO565-markiertes Hsp90 wurden zusammen bei 20 °C inkubiert und für 30 min gebleached. Nach der Zugabe von 2 μM unmarkiertes Hsp90 wurde die Zunahme

des FITC-Signals detektiert. Um den Einfluss von Aha1 auf die Austauschkinetik zu messen, wurde der Hsp90 Heterodimerkomplex geformt und Aha1 oder Aha1 Fragmente zugegeben und bei 20 °C für weitere 30 min inkubiert, bevor die Zugabe von unmarkiertem Hsp90 erfolgte. Die Daten wurden nach Gleichung (11) ausgewertet.

N-terminale Dimerisierung der Heterokomplexe

Nachdem Hsp90 Heteromere geformt wurden, kann durch die Zugabe von Nukleotiden eine weitere konformationelle Änderung indiziert werden, die eine N-terminale Assoziation der Hsp90 Heterodimere einschließlich eines Strangaustauschs zur Folge hat. Diese Strukturänderung bringt das FRET-Paar erneut in eine nähere räumliche Umgebung und resultiert erneut in der Abnahme des FRET Signals. Dazu wurden 2 mM ATP γ S (Roche, Mannheim, Deutschland) gelöst in 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl zu den Hsp90 Heterodimeren gegeben und nach einer Mischzeit von 10 sek der Abfall des FITC-Signals mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 498$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm gemessen. Die Daten wurden um das lineare Bleaching korrigiert und nach Gleichung (11) ausgewertet.

2.9.8 Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation

Alle Messungen zur Analytischen Ultrazentrifugation wurden von Dr. Titus Franzmann durchgeführt. Die analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation eignet sich im Allgemeinen, um eine exakte Bestimmung von Molekulargewichten von Proteinen unter nativen Bedingungen zu bestimmen, da bei dieser Methode ihr hydrodynamischer Radius keine Rolle spielt, oder wie in dieser Arbeit, um Protein-DNA Komplexe quali- und quantifizieren zu können. Über das Sedimentationsverhalten von FITC-markierter DNA sollte eine Aussage über die Komplexbildung mit p53 und über die Komplexgestalt erhalten werden. Für die Sedimentationsläufe wurden die analytische Ultrazentrifuge Optima XL-I von Beckman mit Fluoreszenzdetektion und mit dem Rotor Ti-60 verwendet. Eine Probenzelle wurde mit 120 μ l der freien doppelsträngigen FITC-markierten p21-DNA (50 nM und 25 nM) im p53 Aufbewahrungspuffer befüllt. Die weiteren Probenzellen enthielten p53 oder p53 Mutanten in unterschiedlichen Konzentrationen von 100 und 400 nM. Die Sedimentationsgeschwindigkeit lag bei 20.000 rpm und es wurde für 12 h rotiert. Zur Analyse der Komplexbildung zwischen Aha1 und Hsp90 wurde Aha1 mit Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit

einem Überschuss an Tris/HCl Puffer gequenchet und freier Label wurde über eine Entsalzungssäule (26/10, GE Healthcare, München) abgetrennt. 1 μM Aha1-FITC wurde mit 4 μM Hsp90 Varinaten in 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl für 30 Minuten inkubiert. Sedimentationsanalyse wurde bei 45.000 rpm und 23 °C durchgeführt. Rohdaten wurden zu nach Literaturangaben konvertiert (zu dc/dt) (Stafford, 1992). Die Daten wurden dann gefittet um die apparenten Sedimentationskoeffizienten zu erhalten.

2.9.9 Circular dichroismus

Der Circular dichroismus (CD) gehört zu den chiroptischen Methoden, die auf der Chiralität der untersuchten Stoffe beruht. Ein Stoff ist optisch aktiv, wenn er die Ebene des linear polarisierten Lichts dreht, in dem er die Eigenschaft besitzt, links- und rechtszirkular polarisiertes Licht gleicher Wellenlänge unterschiedlich stark zu absorbieren. Zusammen mit der optischen Rotationsdispersion (ORD) bildet der Circular dichroismus den Cotton-Effekt und liefert wichtige Informationen über die Struktur von Biomolekülen.

Proteine besitzen eine große Anzahl asymmetrischer Kohlenstoffatome, die sich in der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins befinden und optisch aktiv sind. Die CD-Spektroskopie kann genutzt werden, um Struktureigenschaften von Proteinen zu analysieren und diese Strukturhaltung in Abhängigkeit der Temperatur zu analysieren.

In einem CD-Spektrometer wird in einem Monochromator erzeugtes Licht der Wellenlänge λ polarisiert und dann durch einen Modulator im hochfrequenten Wechselfeld links- oder rechtszirkular polarisiert. Ein synchron geschalteter Detektor misst alternierend die Lichtintensitäten I_L und I_R . Durch die chirale Proteinlösung wird wellenlängenabhängig einer der beiden elektronischen Feldvektoren des linear polarisierten Lichts unterschiedlich stark absorbiert und die Polarisationsebene des Lichts um einen bestimmten Betrag gedreht, wonach man das CD-Spektrum der Proteinlösung erhält. Die gemessene Elliptizität Θ [Grad] wird als quantitatives Maß für die Größe des Circular dichroismus verwendet. Die Berechnung der molaren Elliptizität, d.h. der Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren Θ_{MRW} [$\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$] erfolgt nach folgender Formel:

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A} \quad (12)$$

Dabei ist Θ die gemessene Elliptizität [deg], M_r das Molekulargewicht des Proteins [g/mol], c die Proteinkonzentration [mg/ml], d die Schichtdicke der Küvette [cm] und N_A

die Anzahl der Peptidbindungen im Protein. Der Faktor 100 im Zähler entspricht der Umwandlung der molaren Konzentration in $[\text{dmol} \cdot \text{ml}^{-1}]$.

Strukturaussagen über Protein in der CD-Spektroskopie kann man in unterschiedlicher Weise erhalten. Sekundärstrukturelemente ergeben im CD-Spektrum des Fern-UV-Bereichs (180-260 nm) auf der Konformation der Polypeptidketten definierte Mini- und Maxima. α -Helices sind durch ein Doppelminimum bei 208 nm und 222 nm charakterisiert, β -Faltblätter zeichnen sich durch ein starkes Minimum bei 218 nm aus. Über die Intensität des CD-Spektrums bei den jeweiligen Wellenlängen lässt sich mit entsprechenden Algorithmen die Sekundärzusammensetzung von Proteinen berechnen (Schmid, 1989, Bohm et al., 1992). Die aromatischen Aminosäuren von Proteinen ergeben im Nah-UV-Bereich (250 – 320 nm) einen protein-spezifischen Fingerabdruck. Die CD-Spektren kommen durch die asymmetrische Umgebung der aromatischen Seitenketten im gefalteten Protein zustande und lassen Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur im Protein zu (Schmid, 1989).

Eine Zusammenfassung der Messparameter der in dieser Arbeit angewandten CD-Spektroskopie ist in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Standardparameter der CD-Messungen

Parameter	Fern-UV-CD	Nah-UV-CD
Startwellenlänge	260 nm	320
Endwellenlänge	195 nm	250
Auflösung	0,2 nm	0,2 nm
Akkumulationen	20	20
Scangeschwindigkeit	20 nm/min	20 nm/min
Schichtdicke der Küvette	0,1 cm	0,5 cm
Temperatur	15 °C - 20°C	15 °C - 20°C
Proteinkonzentration	0,1 - 0,3 mg/ml	1,5 mg/ml

Da die molaren Elliptizitäten nicht von der Temperatur abhängen, die Signalintensitäten aber die Sekundärstrukturen der Proteine beschreiben, kann die Änderung des CD-Signals in diesem Wellenlängenbereich bei einer Temperaturerhöhung als Indikation der Denaturierung von nativen Proteinstrukturen verwendet werden. Die Temperaturerhöhung

wurde mit Hilfe der PTC343 Peltier-Temperiereinheit (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Vermessung der Proben erfolgte bei einer konstanten Heizrate von 60 °C/h in einem temperaturstabilen Puffer (20 mM KPP, pH 7.5, 25 mM KCl oder anders vermerkt). Die Wellenlänge wurde aus dem größten Minimum des CD-Spektrums des nativen Proteins ermittelt und wurde für Proteinlösungen die p53 enthielten auf 218 nm, für Hsp90 enthaltenen Proteine auf 222 nm eingestellt. Die Parameter sind in der folgenden Tabelle 6 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 6: Standardparameter für die thermische Denaturierung von Proteinen im CD

Parameter	Einstellung
Heizrate	60 °C/h
Wellenlänge	218 nm / 222 nm
Temperatur	15 °C – 90 °C
Auflösung	0.2 °C
Puffer	20 mM KPP pH 7.5, 25 mM KCl
Küvette	0.1 cm

Da alle untersuchten Proben in dieser Arbeit einen irreversiblen Denaturierungsübergang zeigten, wurden die Übergänge sigmoidal nach der Boltzmann-Funktion gefittet.

2.10 Stabilitätsuntersuchungen an Proteinen

2.10.1 Chemische Denaturierung und Renaturierung

Entfaltungsübergänge von Proteinen können sowohl thermisch als auch durch die Zugabe von chaotropen Reagenzien (Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid) induziert werden. Diese Reagenzien destabilisieren die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen. Man wählt zur Verfolgung der Proteinstabilität unter Erhöhung des Denaturierungsmittels entweder die Änderung des Fluoreszenzsignals, welche meistens auf der Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz beruht, die abhängig von der Umgebung des Aromaten ist, oder man verfolgt die Abnahme des für das Protein maximalen CD-Signals entsprechender Wellenlänge. Da bei konstanter Temperatur gemessen wird, ist die Methode mit dem größtmöglichen Unterschied zwischen nativen und denaturierten Spektrum am besten geeignet. Die Proteine werden so lange im steigenden Denaturierungsmittel inkubiert, bis

sich ein Gleichgewicht einstellt und sich der Messwert nicht mehr mit der Zeit verändert, meist über Nacht. Die Konzentrationsabhängigkeit des chemischen Übergangs gibt Aufschluss über das Monomer-Oligomer Verhalten des Proteins.

Zur Analyse der chemischen Stabilität der Hsp90 Mitteldomäne wurden die harnstoffinduzierte Entfaltung unter Gleichgewichtsbedingungen mit 10 μM Hsp90 Mitteldomäne in 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl gemessen. Die Proteinlösungen wurden mit steigenden Harnstoffkonzentrationen von 0 – 6.6 M Harnstoff über Nacht bei 20 °C inkubiert und das CD-Signal bei 222 nm für 1 min gemessen. Diese Datenpunkte wurden gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen. Aus dem Verlauf der Denaturierungskurve und der Analyse der Reversibilität des Übergangs wurde angenommen, dass die native Hsp90 Mitteldomäne zur denaturierten Struktur ohne die Besetzung von intermediären Zuständen entfaltet. Für einen solches reversibles Zwei-Zustandsmodell kann zur Auswertung des Entfaltungsübergangs folgende Formel verwandt werden:

$$y = \left((F_n + m_n \cdot x) + (F_d + m_d \cdot x) \cdot e^{\left(-\left(\frac{\Delta G - m \cdot x}{R \cdot T}\right)} \right) / (1 + e^{\left(-\left(\frac{\Delta G - m \cdot x}{R \cdot T}\right)} \right)) \right) \quad (13)$$

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

2.11 Biochemischen Methoden zur Bestimmung von Aktivitäten

2.11.1 Regenerativer-enzymgekoppelter ATPase Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der ATPase Aktivität von Hsp90 wurde ein regenerativer ATPase Assay verwendet, um zu vermeiden, dass sich größere Mengen ADP bilden, das eine etwa dreifach höhere Affinität zu Hsp90 besitzt als ATP und somit eine Produktinhibierung eintreten könnte. Der hier verwendet Enzym-gekoppelte ATPase Assay (Ali et al. 1993) beruht, dass nach der Hydrolyse entstehende ADP sofort unter Verwendung von Phosphoenolpyruvat und NADH durch die enzymatische Beteiligung von Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase gleich wieder in ATP umgewandelt wird. Da die Konvertierung

von ADP zu ATP equimolar mit dem Verbrauch an NADH ist, lässt sich über die Abnahme der NADH-Konzentration die ATPase Aktivität messen. Dies geschieht spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Der ATPase Prämix hat in diesem Assay folgende Zusammensetzung: Der Puffer kann variiert werden, bestand für alle ATPase Assays aus 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM oder bei allen Aha1-betreffenden Messungen aus 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂

Zusammensetzung des ATPase Assay Prämixes:

8500 µl	Puffer
240 µl	100 mM Phosphoenolpyruvat
48 µl	50 mM NADH
12 µl	Pyruvatkinase-Suspension (Roche Diagnostics)
44 µl	Lactatdehydrogenase-Suspension (Roche Diagnostics)

Von diesem Prämix wurden 150 µl für jeden 200 µl Assay-Ansatz in Einmal-Plastikküvetten eingesetzt. Die Assays wurden bei der entsprechenden Temperatur in einem UV/Vis-Spektrometer Cary 50 (Varian) bis zu einer stabilen Baseline vorinkubiert und mit 5 mM ATP (gelöst in Wasser, pH 7.5) Zugabe gestartet und mit 100 µM Radicol (in DMSO) abgestoppt, um die Hintergrundaktivität abziehen zu können.

Zur Bestimmung der spezifischen ATPase Aktivität wurde die Abnahme von NADH mit Hilfe der Linearen Regression bestimmt und nach folgender Formel mit dem differentiellen molaren Extinktionskoeffiziente für NADH/NAD⁺ bei 340 nm (6200 cm⁻¹ M⁻¹) bestimmt:

$$v_{spez} = \frac{m}{d \cdot \left(-6200 \frac{1}{cm \cdot M} \right) \cdot c(ATPase)} \quad (14)$$

mit m als lineare Abnahme des NADH-Signals, d der Schichtdicke der Küvette und c die Konzentration der ATPase.

Zur Bestimmung der Affinität der ATPase zum ATP (K_M-Wert) sowie der stationären ATPase Aktivität k_{cat} wurde bei gleich bleibender ATPase Konzentration die Konzentration von ATP in einem Bereich von 0 – 5 mM Variiert und die erhaltenen spezifischen Aktivitäten nach der *Michaelis-Menten*-Gleichung ausgewertet:

$$v_{spez} = k_{cat} \frac{c(ATP)}{c(ATP) + K_M} \quad (15)$$

Die Bildung von Heterodimeren unterschiedlicher ATPase Aktivität führte teilweise zu einer Veränderung der ATPase Aktivität der einzelnen Untereinheiten. Dieses wurde durch ein von Dr. Klaus Richter eingeführtes Modell ausgewertet, das eine Aussage darüber

ermöglicht, ob die Bildung von Heterodimeren gleichwahrscheinlich ist, wie die Bildung der Homodimere. Dazu wurden die Homodimer vor dem ATPase Assay gemischt, wobei nur die Konzentration der Hsp90 Mutanten variiert wurde und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, bevor mit der ATP Zugabe die Aktivität bestimmt wurde. Die Aktivität wurde nach folgender Formel ausgewertet:

$$v_{spez} = v_{Hsp90} \cdot \frac{n \cdot c(Hsp90)}{n \cdot c(Hsp90) + c(Hsp90_{Mutant})} + v_{Hetero} \cdot \frac{c(Hsp90_{Mutant})}{n \cdot c(Hsp90) + c(Hsp90_{Mutant})} \quad (16)$$

mit v_{Hsp90} als die Aktivität des Hsp90-Homodimers und v_{Hetero} als die Aktivität bei Sättigung der Lösung durch die Hsp90 Mutante. Dabei ergeben sich aus den bekannten Konzentrationen von Hsp90 und der kompetitiven Hsp90 Mutanten die Aktivität von Hsp90 und dem gebildeten Heterodimer. n ist eine Wahrscheinlichkeitsaussage. Ist $n \approx 1$, so ist die Bildung der Heterodimer gleichwahrscheinlich, ist $n > 1$ ist die Bildung der Heterodimere weniger wahrscheinlich als die Bildung der Homodimere (Richter et al., 2001).

2.11.2 Unterdrückung von thermisch induzierter Aggregation (Chaperon Assay)

Viele Proteine aggregieren zeitabhängig bei einer Erhöhung der Temperatur. Und unter nicht stabilisierenden Pufferbedingungen. Zur Abschätzung bei welcher Temperatur ein Protein aggregiert, kann eine proteinspezifische thermische Entfaltungskurve im CD-Spektrometer aufgenommen werden. Chaperone besitzen die Eigenschaft diese thermische Entfaltung ihrer Substrate zu verhindern. Über den Einfluss von Chaperonen auf die Aggregation von Proteinen lässt sich eine Aussage über die Chaperonaktivität treffen, allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass es sich nicht um eine Wechselwirkung zweier nativer Proteine handelt und zusätzlich herrscht auch kein Gleichgewicht bei der Wechselwirkung. Methodisch misst man die Trübung einer Lösung bei erhöhten Temperaturen in einem UV7Vis-Spektrometer bei 360 nm. Es sei angemerkt, dass man lediglich eine Aussage über die Teilchengröße erhält, die bei einer bestimmten Größe das Licht streuen und somit für eine Absorption sorgen.

Es wurde hauptsächlich die Aggregation von p53 DBD und den Einfluss von Hsp90 untersucht. Dazu wurde eine Lösung von 1.8 μ M p53 DBD und 9 μ M Hsp90 in 50 mM HEPES, pH 7.5, 25 mM KCl bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Danach wurde die

Absorption bei 360 nm bei einer Temperatur von 45 °C gemessen. Weitere Variationen werden direkt angegeben.

2.11.3 Hsp90 vermittelte Reverse Transkriptase- Aktivität

Alle Experimente der RT-Aktivierung wurden von Dr. Michael Stahl durchgeführt und werden an anderer Stelle ausführlich diskutiert (Beck & Nassal, 2003; Stahl et al., 2007).

Hepadnaviruses ist ein partiell doppelsträngiger DNA-Virus, der sich mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) repliziert. Ein wichtiger Schritt in der Replikation ist die Bindung von ϵ -RNA, was die RT veranlasst, ein kurzes DNA Oligonucleotid zu synthetisieren (*priming reaction*), das an der RT gebunden bleibt. Hsp90 besitzt in diesem Zusammenhang zusammen mit Hsc70/Hsp40 und HOP eine stimulierende Eigenschaft auf die Aktivierung der RT. Dazu ist allerdings eine funktionale ATPase Domäne von Hsp90 essentiell und der stimulierende Effekt ist stringent abhängig von der Anwesenheit von Hsc70/Hsp40 und HOP. Die Hsp90 abhängige Aktivierung der RT wurde in dieser Arbeit genutzt, um den Einfluss von Hsp90 Punktmutationen auf die Aktivierung der RT zu messen.

Dazu wurde zuerst der RT- ϵ -RNA Komplex in Anwesenheit der Chaperone gebildet und dann die Synthese der DNA-Oligonukleotide in der *priming reaction* mit radioaktiv-markierten Nukleotiden quantitativ ausgewertet. Standard Reaktionen beinhalten 150 nM (150 ng) GrpDP (ein Fusionsprotein aus RT und GrpE, mit der Bezeichnung GrpDP), 4.2 μ M (3 μ g) Hsc70, 5.3 μ M (2 μ g) Hsp40, 0.6 μ M (0.5 μ g) Hsp90 oder Hsp90 Mutanten, 0.9 μ M (0.5 μ g) Hop, 2 μ l TKD Puffer (100 mM Tris, pH 7.5, 250 mM KCl, 10 mM DTT), 1 μ l eines ATP-regenerativen Systems (50 mM ATP, 25 mM MgCl₂, 250 mM Kreatinephosphat, 100 U/ml Phosphokreatine Kinase), 10 units von RNasin (RNase inhibitor, Promega, Mannheim, Deutschland), 1 μ M *in vitro* transkribierte D ϵ RNA und H₂O zum Auffüllen auf ein finales Volumen von 10 μ l. Der RT- ϵ -RNA Komplex wurde bei 25 °C für 2 h geformt. Die Syntheseaktivität wurde mit Hilfe von [α ³²P]dATP detektiert wie in (Stahl et al., 2007) beschrieben. Die Proben wurde per SDS-PAGE separiert und ³²P-markierte Protein wurden in einem Autoradiogramm oder über Phosphimaging (BAS-1500, Fuji Medical Systems, Stanford, USA) detektiert und mit MacBas Software (Fuji Medical Systems, Stanford, USA) quantifiziert.

2.11.4 Hsp90 vermittelte v-Src Aktivität

Die v-Src Kinase ist ein natürliches Substrat von Hsp90 dessen Aktivität strikt von Hsp90 abhängt. Zur Analyse der Hsp90 vermittelten Aktivität der v-Src wurde die Kinase artifiziell in Hefezellen transformiert, die bei längerer Expression der Kinase absterben. Dort kann die Phosphorylierung aller löslichen Proteine als Maß der Hsp90 vermittelten Aktivität der heterolog exprimierten v-Src im Immunoblot über einen spezifischen Phosphotyrosin-Antikörper ausgelesen werden (Nathan & Lindquist, 1995). Dazu wurden ein *Eco82 α HSP82/HSC82^{-/-}* Doppelknockout Hefestamm verwendet, in den Hefe Hsp90 oder Hsp90 Mutanten auf ein pRS423 Plasmid über die Lithium-Acetatmethode eingebracht wurde. Das *rescue* Plasmid wurde über mehrere Ausstriche auf *Leu⁻* / 0.1 % 5-fluoro-ortotrichsäure Platten herausgeschuffelt.

Um dem Temperatur-Phänotyp der Hsp90 Mutanten zu testen, wurden auf *His⁻ drop out* Medien 3×10^5 Zellen gespotted und 1 h bei Raumtemperatur anwachsen gelassen. Danach wurde linearer Temperaturgradienten von 30 °C – 50 °C mit Hilfe eines Temperatur-Gradient-Gel-Elektrophoretischen System (Biometra, Göttingen, Germany) angelegt.

Zur Analyse der v-Src Aktivität wurden die Hefezellen, die die verschiedenen Hsp90 Varianten exprimieren, mit dem Expressionsplasmid YpR316 transformiert (URA3-Marker). Aufgrund der Toxizität der v-Src Kinase steht die Expression unter Kontrolle eines induzierbaren Galaktose-Promotors. Dadurch ist der Hefe auf Glucose als C-Quelle reguläres Wachstum möglich, da Glucose den Galaktose-Promotor vollständig reprimiert. Zur Aktivitätsanalyse wurden in Glucose gewachsene Hefezellen über Nacht in ein Raffinose-Medium überführt. Zur Expression der v-Src wurden die Hefezellen in ein Galaktose Medium überführt und die Zellen für 6 h bei 30 °C inkubiert. 2 ml Zellen wurden geerntet und mit Hilfe von Glaskugeln in 450 μ l PBS Puffer mit 30 μ l Protease Inhibitor FY (Serva, Heidelberg, Deutschland) aufgeschlossen. Die Zellbruchstücke wurden bei 14.000 x g und 4 °C abgetrennt und 200 μ l Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit Hilfe des Bradford Assay (Pierce, Rockford, USA) (50 μ l Proteinlösung in 950 μ l Assaylösung, OD₅₉₅ bei etwa 0.2) bestimmt. Nach einer Angleichung mit PBS Puffer wurden gleiche Proteinkonzentrationen (120 μ l) im 50 μ l 5 x Laemmli-Puffer für die SDS-PAGE und Westernblot Analyse verwendet, wobei die gleiche Beladung (25 μ l) des Gels über die Coomassie Färbung überprüft wurde. Der quantitative Nachweis von Phosphotyrosinen im Westernblot wurde mittels des spezifischen Antikörpers 4G10 (Stratagene, La Jolla, USA) als primären und einem Anti-Maus-POD Antikörper als sekundären Antikörper durchgeführt. Die Expression von Hsp90 wurde mit

einem Anti-Hefe Hsp90 spezifischen Antikörper überprüft. Eine densitrometrische Auswertung von drei unabhängigen Westernblot wurde mit Hilfe der software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Domänenstruktur von Hsp90

Das molekulare Chaperone Hsp90 besteht aus drei Domänen, die unterschiedliche Aufgaben sowohl im ATPase Zyklus als auch in der Substraterkennung übernehmen. Die N-terminale Nukleotid-Bindedomäne ist sehr gut charakterisiert. Hier binden die Hsp90 Inhibitoren wie 17-AAG, Geldanamycin oder Radicicol und konkurrieren mit ATP um die Bindung in die Nukleotid-Bindetasche (Roe et al., 1999). Die Hsp90 Mitteldomäne weist einerseits direkte Kontakte zur N-Domäne auf und stellt andererseits ein katalytisches Arginin, was zur Hydrolyse von ATP wichtig ist und Hsp90 als eine „split ATPase“ klassifiziert (Meyer et al., 2003). Eine vollständige Charakterisierung der Hsp90 Mitteldomäne ist bisher noch nicht vorgenommen worden. Die C-terminale Domäne ist hauptsächlich an der Dimerisierung von Hsp90 beteiligt (Wegele et al., 2003). Die Grenzen der einzelnen Domänen, die im Hefe Hsp90 (γ Hsp90) durch unstrukturierte Linker miteinander verbunden sind, kann durch einen Blot vorhergesagt werden, der strukturierte und unstrukturierte Bereiche eines Proteins identifiziert (**Abb. 3-1**).

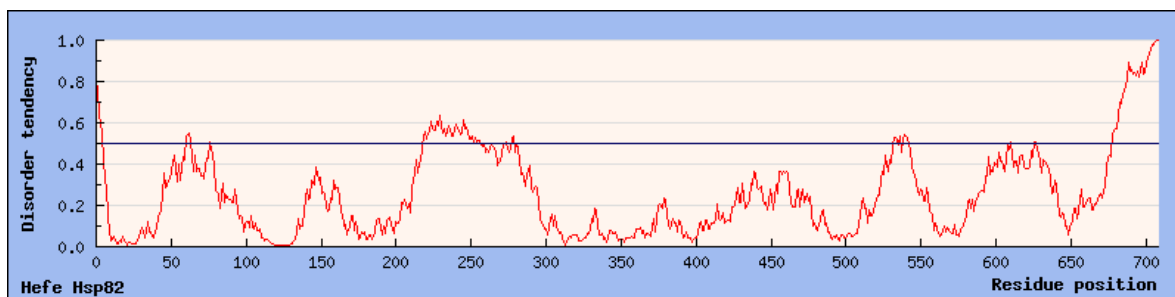


Abbildung 3-1: Vorhersage von unstrukturierten Bereichen in γ Hsp90

Die Berechnung der Tendenz für ungefaltete Bereiche (disorder tendency) erfolgte mit Hilfe des Programms IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>) bei einer Voreinstellung für kurze, unstrukturierte Bereiche. Ein Wert über 0.5 zeigt Bereiche an, die eine erhöhte Tendenz aufweisen, unstrukturiert zu sein, wie *Linker*-Bereiche, oder terminale Peptidbereiche. Der Blot wurde nach (Dosztányi et al., 2005) durchgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in der Hsp90 Struktur einige Bereiche eine Tendenz zur Unordnung besitzen. Der letzte Bereich der C-terminalen Domäne zeigt ebenso eine starke Tendenz zur Unordnung an wie der so genannte Linker im Bereich zwischen Aminosäure 210 und 290, der die N-terminale mit der Mitteldomäne von Hsp90 verbindet. Es sind drei weitere intrinsische Bereiche in Hsp90 erkennbar, die ebenso eine Tendenz zur Unordnung

anzeigen. Der tendenziell unstrukturierte Bereich zwischen Aminosäure 520 – 560 wurde als Domänengrenze für die Hsp90 Mitteldomäne herangezogen (s.h. 3.2).

3.2 Charakterisierung der Hsp90 Mitteldomäne

Die Mitteldomäne von Hsp90 zeigt in **Abb. 3-1** einen gut strukturierten Bereich in der Polypeptidkette von Aminosäure 290 – 520. Zur Charakterisierung der M-Domäne wurden mehrere Konstrukte geplant, die in **Abb. 3-2** schematisch aufgelistet sind.

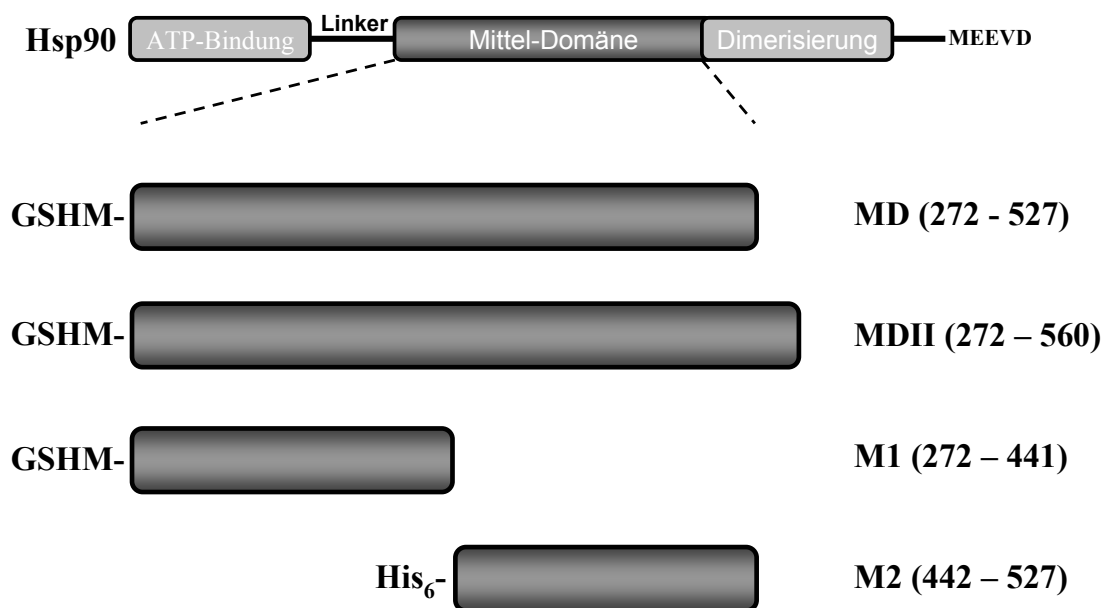


Abbildung 3-2: Darstellung der klonierten Konstrukte für die Hsp90 Mitteldomäne

Die Konstrukte für die γ Hsp90 Mitteldomäne wurden anhand der Abb. 1 und auf Grundlage der Kristallstruktur (Meyer et al., 2004) kloniert. Die Vorsequenz GSHM ergibt sich bei der Klonierung in den pET28a Vektor und nach *tag*-Proteolyse durch Thrombin. M2 wurde in den pQE30Xa Vektor mit N-terminalem *His*₆-tag kloniert.

Die Einteilung der Hsp90 Mitteldomäne in die obigen Subdomänen M1 und M2 wurde unter anderem deswegen notwendig, weil die Zuordnung des *backbones* im heteronuklearen 2-Dimensionalen NMR des Konstruktes MD über die Subdomänen M1 und M2 erfolgte. Die bis zur Aminosäure verlängerte Mitteldomäne MDII bis zur Aminosäure 560 wurde für NMR Titrationsexperimente verwendet. Die Reinigung der Konstrukte, die Abspaltung des His₆-tags, sowie die ²H, ¹³C, ¹⁵N - Isotopenmarkierung erfolgte wie unter 2.4.5 beschrieben und gab Ausbeuten von ~ 10 mg Protein pro Liter Kulturmedium.

3.2.1 Struktur- und Stabilitätsanalyse der Hsp90 Mitteldomäne

Die Faltung und die Stabilität der Hsp90 Mitteldomäne und der Subdomänen wurden mit verschiedenen biochemischen Methoden analysiert. Die Hsp90 Mitteldomäne (MD) (**Abb. 3-3**) zeigt eine kompakte Faltung, die sowohl thermisch als auch chemisch in einem kooperativen Ein-Phasenübergang $N_{\text{ative}} \leftrightarrow U_{\text{nfolded}}$ entfaltet.

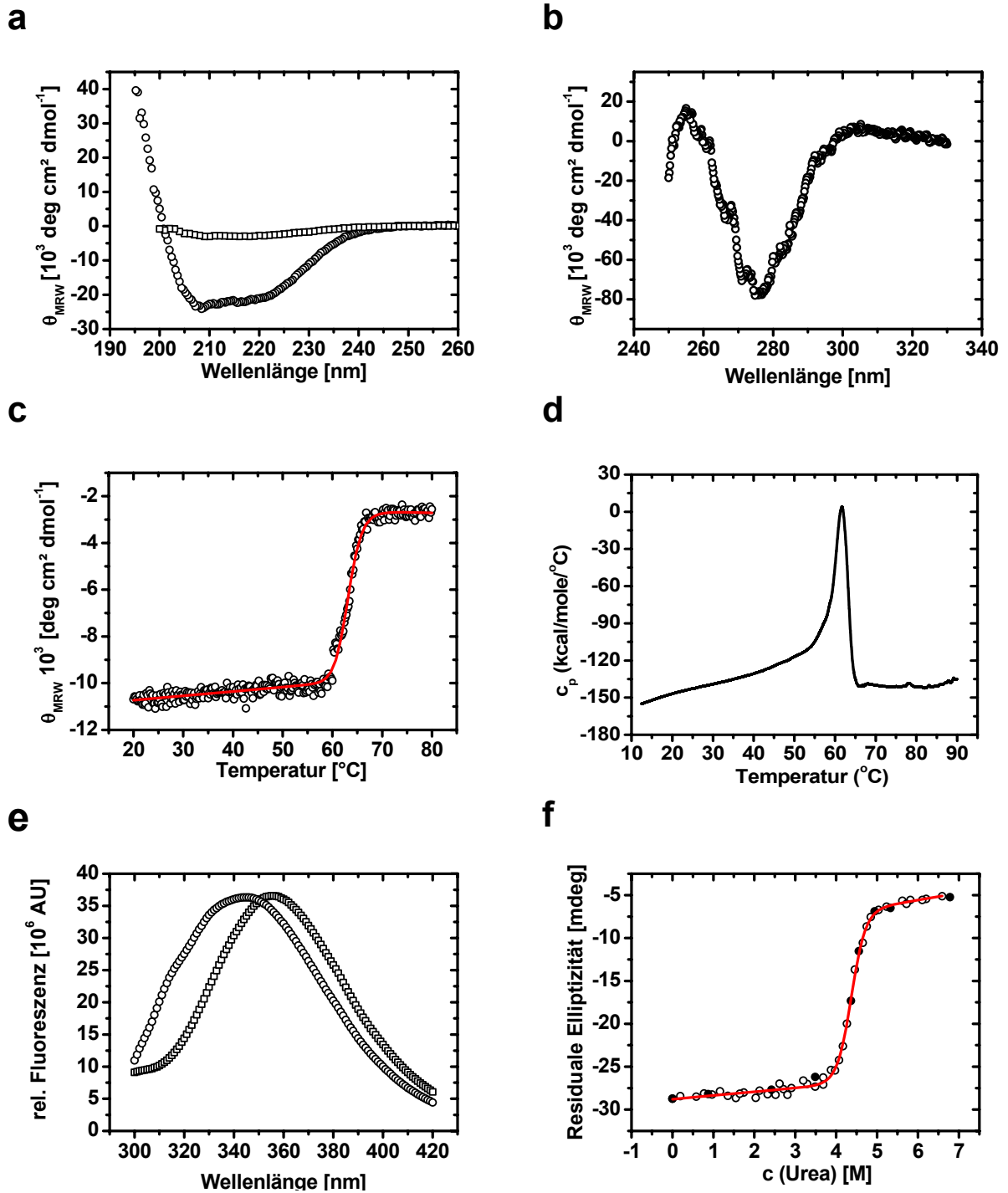


Abbildung 3-3: Strukturelle Untersuchung von Hsp90MD

A, das Fern-UV CD-Spektrum und B, das Nah-UV CD-Spektrum von 10 μM Hsp90MD aufgenommen bei 20 $^{\circ}\text{C}$ (O) und bei 80 $^{\circ}\text{C}$ (\square). C, die thermische Stabilität der Hsp90MD ergab bei einer konstanten Heizrate von 20 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ bei einer Wellenlänge von 222 nm im CD-Spektrometer eine Schmelztemperatur von 63.2 $^{\circ}\text{C}$, gefittet nach Boltzmann (rot). D, DSC Lauf von 30 μM Hsp90MD bei einer konstanten Heizrate von 20 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ im Bereich von 10 $^{\circ}\text{C}$ bis 90 $^{\circ}\text{C}$. Die apparente Schmelztemperatur (61.7 $^{\circ}\text{C}$) wurde nach einer Korrektur der Basislinie ermittelt. E, Fluoreszenzspektren von 10 μM Hsp90MD bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ bei 20 $^{\circ}\text{C}$ für die native Form (O) und die in 6 M Harnstoff entfaltete Struktur (\square). F, Harnstoff-induzierte chemische Entfaltung von Hsp90MD im Gleichgewicht. 10 μM Hsp90MD enthaltene Proben wurden bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen von 0 – 6.6 M Harnstoff über Nacht bei 20 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und die Signalintensität für die Entfaltung (O) und Rückfaltung (\bullet) im CD-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 222 nm über 60 s gemessen und nach Gleichung (13) ausgewertet. Alle Messungen wurden im Standardpuffer 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl durchgeführt.

Die Hsp90 Mitteldomäne zeigt eine hohe Toleranz gegenüber thermisch oder chemisch induzierter Entfaltung mit einem Schmelzpunkt von ≈ 62 °C und einem Mittelpunkt des harnstoffinduzierten Übergangs von 4.2 M. Damit bildet die Hsp90 Mitteldomäne vergleichbar zur N-terminalen Domäne eine in sich sehr stabile, kompakt gefaltete Struktur. Im Bereich zwischen 10 °C und 45 °C wurde keine strukturelle Veränderung der Hsp90 Mitteldomäne festgestellt, weshalb Messungen wie das *Assignment* im NMR oder der Chaperon-Assay bei erhöhten Temperaturen durchgeführt werden konnten.

Die Unterteilung der Hsp90 Mitteldomäne in die zwei Subdomänen M1 und M2 ergab zwei gefaltete Domänen (**Abb. 3-4**), wobei die Subdomäne M1 aggregationsanfällig war.

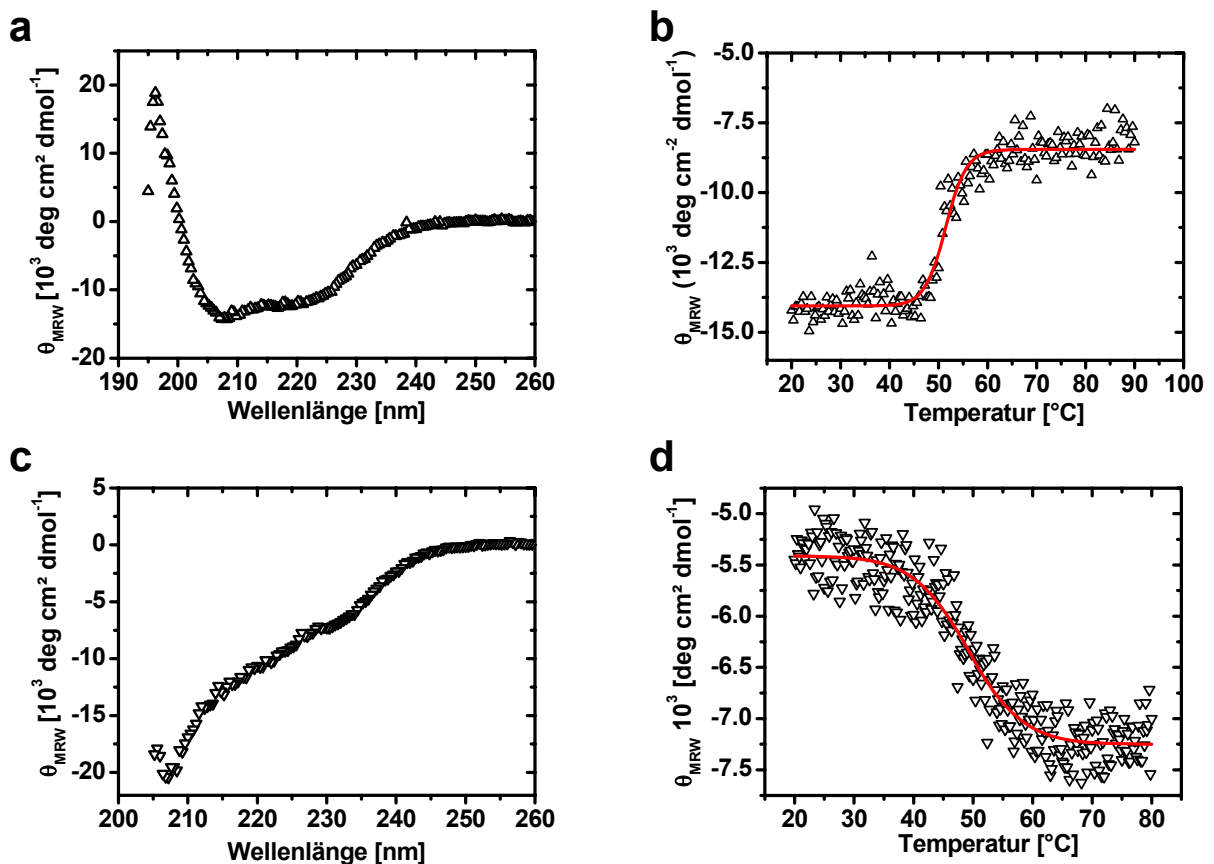


Abbildung 3-4: Strukturelle Untersuchung der Subdomänen M1 und M2

A - B, Fern-UV CD-Spektrum und thermische Stabilität der Hsp90M1 (Δ). **C - D,** Fern-UV CD-Spektrum und thermische Stabilität der Hsp90M2 (∇). CD-Spektren wurden bei 20 °C in 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl aufgenommen. Die thermischen Stabilitäten wurden bei einer konstanten Heizrate von 20 °C/h bei einer Wellenlänge von 222 nm aufgenommen und nach Boltzmann gefittet (rot). **A** und **B** wurden bei einer Proteinkonzentration von 5 μM aufgenommen, **C** und **D** bei jeweils 20 μM .

Ein Vergleich beider Domänen macht deutlich, dass die Subdomäne M1 eine kompaktere Faltung als M2 besitzt. Die Fern-UV CD-Spektren lassen sowohl für M1 als auch für M2 auf eine gefaltete Domäne schließen, wobei die Domäne M2 durch den vorhandenen *His*-

tag einen größeren *random coil* Anteil aufweist. Der thermisch induzierte Entfaltungsübergang der Subdomäne M1 zeigt einen kooperativen Übergang mit einer Schmelztemperatur von 51 °C. Die Subdomäne M2 entfaltet weniger kooperativ, besitzt aber eine ähnliche Schmelztemperatur (49 °C). Zusammenfassend sind die Subdomänen für eine NMR Charakterisierung geeignet und wurden dementsprechend isotoptenmarkiert und vermessen. Die erhaltenen heteronuklearen HSQC-Spektren für M1 und M2 sind in **Abb. 3-5** gezeigt.

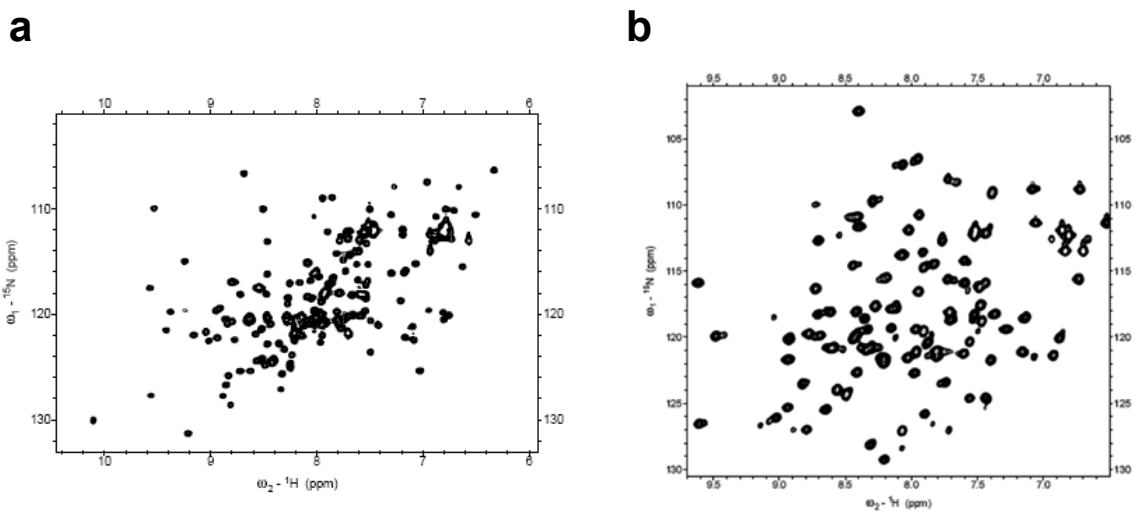


Abbildung 3-5: ^{15}N , ^1H – HSQC Spektrum der Hsp90 Subdomänen M1 und M2

A, ^{15}N , ^1H - HSQC Spektrum von Hsp90M1. Zur Erhöhung der Dispersion wurde die Probe ^2H , ^{13}C , ^{15}N – isotoptenmarkiert. **B**, ^{15}N , ^1H - HSQC Spektrum von Hsp90M2. Die Probe wurde ^{15}N – isotoptenmarkiert.

Die beiden Subdomänen M1 und M2 zeigen die für eine kompakt gefaltete Struktur mit hohem β -sheet Anteil typische Dispersion im HSQC Spektrum. Die M1 Domäne allerdings zeigte eine deutliche Tendenz zur Aggregation und musste aus *inclusion bodies* gereinigt werden. Die Reinigung von M2 erfolgte nach den Standardvorgaben (s.h. 2.4.1). Die Informationen, die aus diesen Spektren gewonnen werden könnten, wurden für die Protein-Rückgrat Zuordnung (*assignment*) der Hsp90MD Domäne benötigt (**Abb. 3-6**).

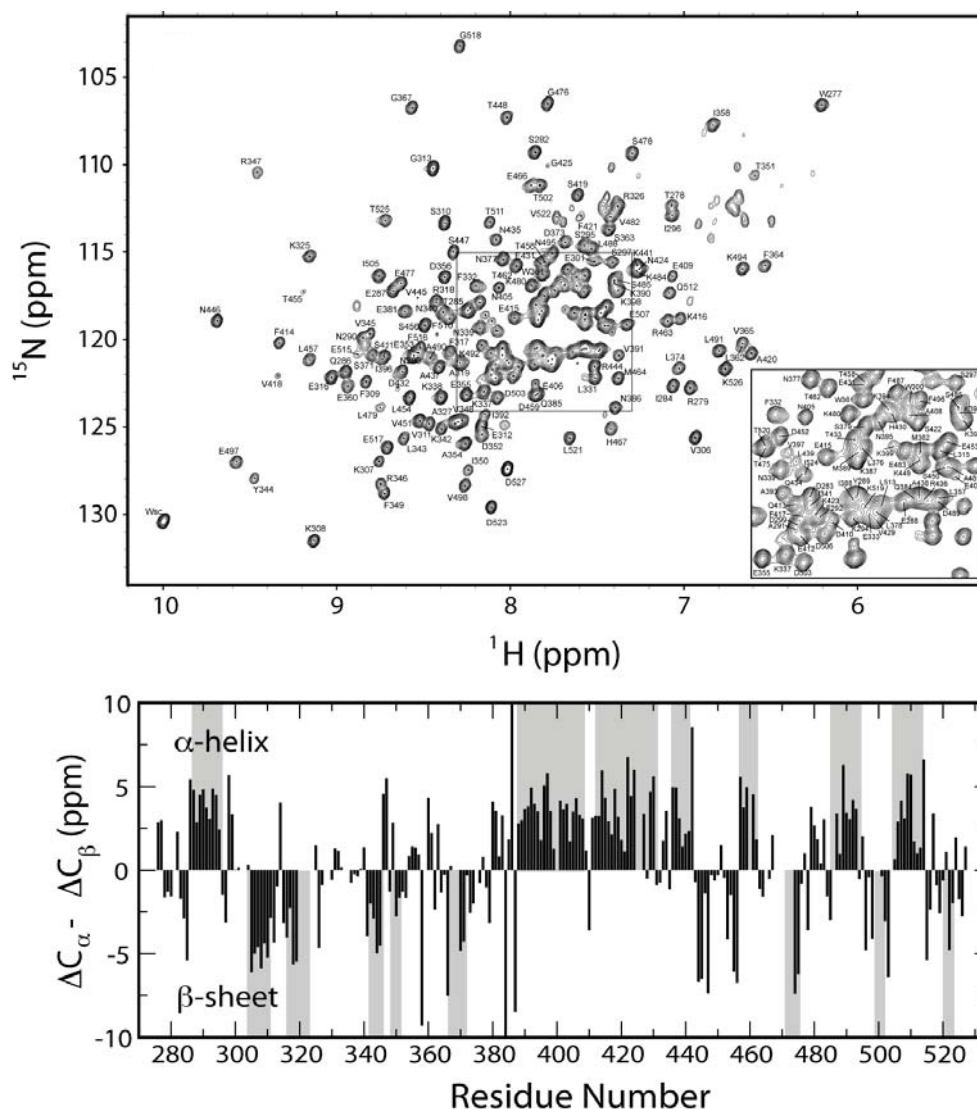


Abbildung 3-6: Protein-Rückgrat Zuordnung der Hsp90 Mitteldomäne bei 25 °C
 ^{15}N -TROSY Spektrum in 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl inklusive der Zuordnung der NH Korrelationssignale. Die Zuordnungseffizienz liegt bei 85 %. Die sekundäre chemische Verschiebung $\Delta C_{\alpha} - \Delta C_{\beta}$ ist ein Indikator für die korrekte Zuordnung. In Grau sind die sekundär Strukturelemente aus der Kristallstruktur der Mitteldomäne dargestellt, wobei positive Zahlen α -Helices und negative Zahlen β -Strukturelemente verdeutlichen. Die NMR Messungen wurden von Franz Hagn durchgeführt.

Das HSQC-Spektrum der Hsp90 Mitteldomäne zeigt eine Dispersion, die ebenfalls charakteristisch ist für eine kompakt gefaltete Struktur. Allerdings musste die Mitteldomäne für die Zuordnung deuteriert werden, um eine bessere Signaldispersion zu erhalten. Die sekundären Strukturelemente der Hsp90 Mitteldomäne im Kristall und in Lösung sind gut vergleichbar (Abb. 3-6, unten) und verifizieren gleichzeitig die Struktur sowie das Assignment der Hsp90 Mitteldomäne.

3.3 Die Hsp90 C-terminale Domäne

Die C-terminale Domäne von Hsp90 besitzt hauptsächlich zwei Funktionen. Eine Helix-Anordnung bildet die konstante Dimerisierungsstelle in Hsp90 und am C-terminalen Ende befindet sich mit dem MEEVD-Motiv eine Peptidsequenz, die viele Co-Chaperone über die TPR-Domäne binden. Die C-Domäne (Aminosäure 528 – 709) ist im Unterschied zu der N- und M-Domäne von Hefe Hsp90 nicht kompakt gefaltet und zeigt unkooperative, reversible Temperaturübergänge, wie in **Abb. 3-7** gezeigt.

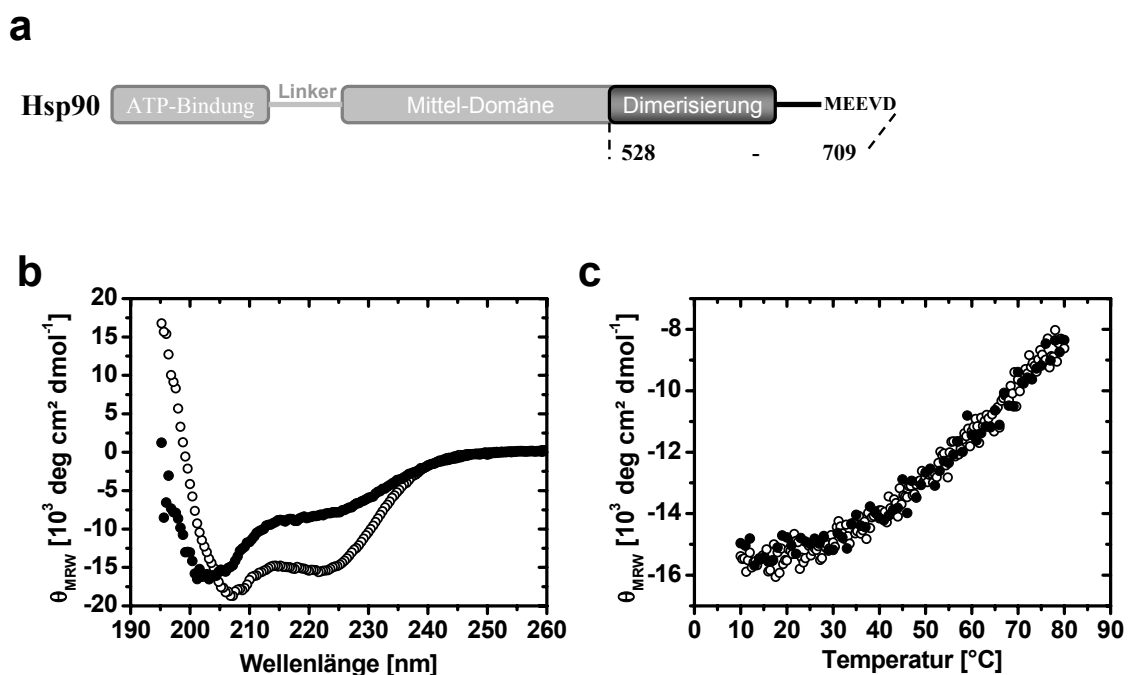


Abbildung 3-7: Strukturelle Untersuchung der Hsp90 C-Domäne

A, Darstellung des Konstruktes zur Untersuchung der Eigenschaft der C-terminalen Domäne. **B**, Fern-UV CD-Spektrum von 10 μM Hsp90 C-Domäne aufgenommen bei 10 $^{\circ}\text{C}$ (O) und 80 $^{\circ}\text{C}$ (●). **C**, thermische Stabilität und Reversibilität der Hsp90 C-Domäne aufgenommen bei einer Wellenlänge von 222 nm und einer konstanten Heizrate von 30 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ für den Temperaturbereich 10 $^{\circ}\text{C}$ – 80 $^{\circ}\text{C}$ (O) und für das Abkühlen der Probe von 80 $^{\circ}\text{C}$ auf 10 $^{\circ}\text{C}$ (●). Alle Messungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM im 40 mM KPP, pH 7.5 Puffer aufgenommen.

Die C-Domäne zeigt ein typisches Spektrum für ein α -helikales Protein mit den Minima bei 222 nm und bei 208 nm. Allerdings zeigt das Spektrum bei 80 $^{\circ}\text{C}$ ebenfalls Sekundärstrukturen an, so dass keine vollständige Denaturierung vorliegt. Zur besseren Charakterisierung wurde ein HSQC-Spektrum der C-Domäne aufgenommen (**Abb. 3-8**).

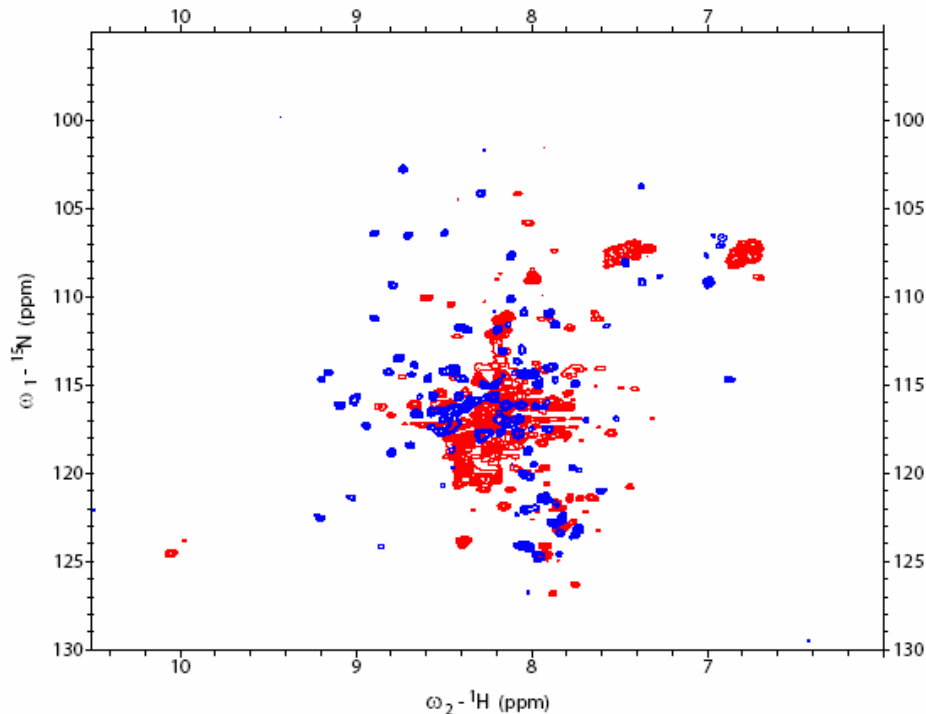


Abbildung 3-8: ^{15}N , ^1H - HSQC der Hsp90 C-Domäne bei verschiedenen Temperaturen

Das HSQC der Hsp90 C-Domäne (245 μM) wurde bei 30 °C (rotes Spektrum) und bei 60 °C (blaues Spektrum) in 40 mM KPP, pH 7.5 mit je 32 Scans aufgenommen und zeigt die Abhängigkeit der Dispersion von der Temperatur, die auch schon im CD-Spektrum deutlich wurde. Die HSQC Spektren wurden von Stephan Lageleder aufgenommen.

Die C-Domäne besitzt im Gegensatz zu der N- und M-Domäne von Hsp90 ungewöhnliche Struktureigenschaften. Die thermisch induzierte strukturelle Änderung beginnt schon ab 20 °C, also weit unter den physiologischen Temperaturen und ist reversibel. Die Dispersion des HSQC-Spektrums zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Temperatur. Die C-Domäne scheint damit in Hsp90 einen Bereich mit erhöhter Flexibilität aufzuweisen und sie ist, anders als die anderen Domänen, isoliert nicht kompakt gefaltet oder tolerant gegenüber erhöhten Temperaturen.

3.4 Die Regulation von Hsp90 durch einen C-terminalen „Druckpunkt“

3.4.1 Die Konservierung des Druckpunkts

Humanes Hsp90 α wird *in vivo* an einem einzigen Cystein (Cys-597) durch das Radikal Stickstoffmonoxid post-translational modifiziert, die so genannte S-Nitrosylierung (SNO). Dieses Cystein befindet sich in der C-terminalen Domäne von Hsp90 und es konnte gezeigt werden, dass die S-Nitrosylierung einen Einfluss auf die ATPase Aktivität von Hsp90 besitzt (Martinez-Ruiz et al., 2005). Im Zusammenhang dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es sich hierbei um einen konservierten Mechanismus handelt und wie es möglich ist, dass die Modifikation einer bestimmten Aminosäure, die sich weit entfernt von der Nukleotid-Bindedomäne befindet, einen Einfluss auf die ATPase Aktivität ausüben kann. Zur besseren Visualisierung zeigt **Abb. 3-9** ein Alignment innerhalb der Hsp90-Familie und die korrespondierende Stelle ist in der Kristallstruktur von Hefe Hsp90 markiert.

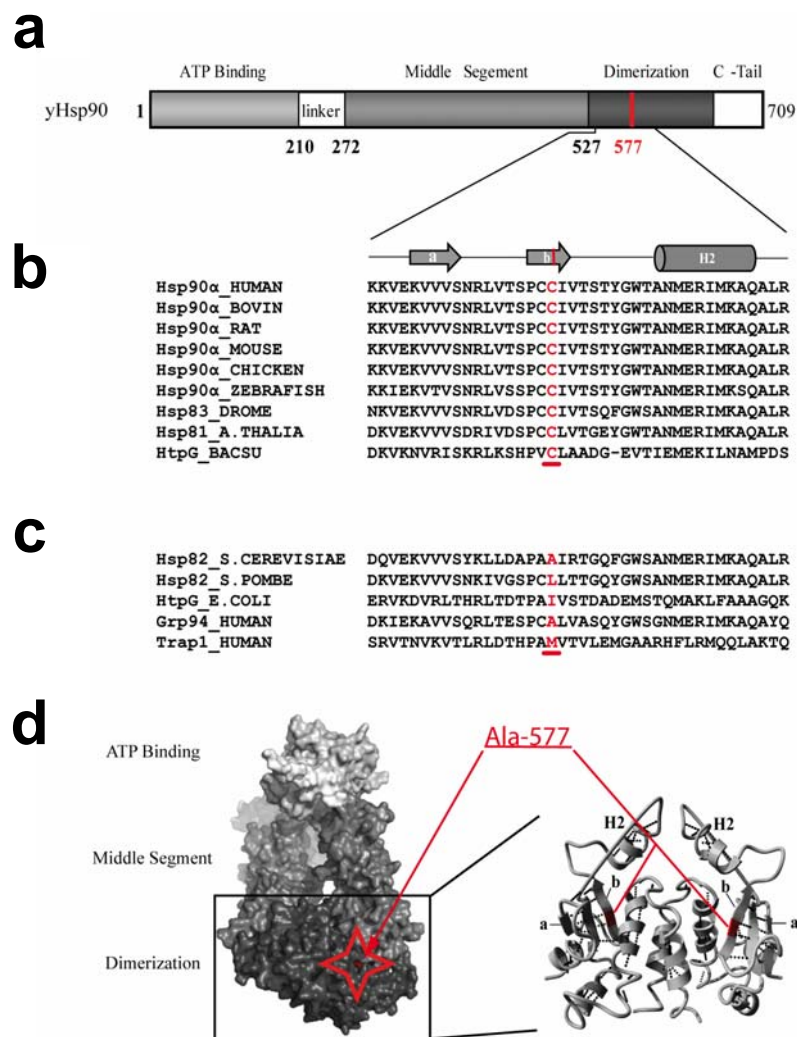


Abbildung 3-9: Sequenz-Alignment von Hsp90 Homologen und Struktur der C-terminalen Dimerisierungsdomäne

A, Schematische Domänenstruktur von Hefe Hsp90 mit der zum humanen Hsp90 α Cys-597 korrespondierenden Aminosäure an Position 577, die ebenfalls in Abb. 3-9 **B–D** in rot gekennzeichnet ist. **B**, Alignment von Hsp90 Homologen, die ein konserviertes Cystein an der gekennzeichneten Stelle tragen, welches im humanen Hsp90 α modifiziert werden kann. **C**, Alignment von Repräsentanten der Hsp90 Familie, die kein konserviertes Cystein an der entsprechenden Stelle aufweisen. **D**, Oberflächenstruktur des geschlossenen Komplexes von Hsp90 (auf Basis der Kristallstruktur pdb code 2CG9). Ebenfalls in rot markiert ist die Position Ala-577, die zur SNO-modifizierbaren Aminosäure Cys-597 im humanen Hsp90 α gehört. Die Vergrößerung zeigt die Sekundärstrukturelemente der C-Domäne wie sie in **B** markiert sind und kennzeichnet Ala-577 als eingebunden in einem β -sheet.

Die zum Cys-597 im humanen Hsp90 α korrespondierende Aminosäure im Hefe Hsp90 (Ala-577) ist in der C-terminalen Domäne von Hsp90 lokalisiert, ohne eine offensichtliche, direkte Beteiligung an der Dimerisierung zu haben. Ala-577 ist nicht an der Oberfläche exponiert, sondern umgeben von geladenen und hydrophoben Aminosäuren, ohne aber den vollständigen Kontakt zum Lösungsmittel zu verlieren. Im Alignment fällt auf, dass das modifizierbare Cystein (Cys-597 im hHsp90 α) in allen höheren Eukaryoten konserviert ist. In allen niedrigeren Eukaryoten, wie der Hefe, und in den Prokaryoten fehlt ein Cystein an

dieser Stelle. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in allen Organismen oder Organellen, die ein Cystein an der entsprechenden Stelle aufweisen, das Molekül Stickstoffmonooxid eine signaltragende Rolle spielt, meist in Kombination mit dem Auftreten der NO-Synthasen (eNOS, nNOS etc.). In niederen Eukaryoten oder Prokaryoten, sowie z.B. im Mitochondrium, spielt NO als Signalstoff keine Rolle, oder ist überhaupt nicht vorhanden, weswegen auch der Cysteinrest zur Regulation nicht konserviert ist.

3.4.2 *ATPase Aktivität der Hsp90 Cystein-Mutanten und der Einfluss der in vitro S-Nitrosylierung*

Die Frage ist, ob es sich bei dieser SNO-modifizierbaren Aminosäure in Hsp90 um einen Regulationspunkt handelt, der für alle Mitglieder der Hsp90 Familie wichtig ist. So könnten verschiedene Organismen durch den Einbau einer bestimmten Aminosäure an dieser Stelle, die Hsp90 Aktivität individuell anpassen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Mutationsstudien an der entsprechende Aminosäure im Hefe Hsp90 (Ala-577) durchgeführt. Dazu wurde zuerst Ala-577 gegen ein Cystein ausgetauscht (Cys-577), was später *in vitro* post-translational modifiziert werden kann. Die S-Nitrosylierung von Cys-577 *in vitro* erfolgt durch ein •NO-Donorsalz, wodurch die Verhältnisse *in vivo* nachgestellt werden können. Weiterhin kann die Thiolgruppe des Cysteins durch die Reaktion, z.B. mit Maleimiden, modifiziert werden. **Abb. 3-10** zeigt, dass die Einführung eines Cysteins an Position 577 die ATPase Aktivität von Hefe Hsp90 stark erhöht. Weiterhin lässt sich die ATPase Aktivität durch SNO-Modifikation des eingefügten Cysteins und durch Carboxymethylierung des Cysteins mit Iodacetamid stark reduzieren.

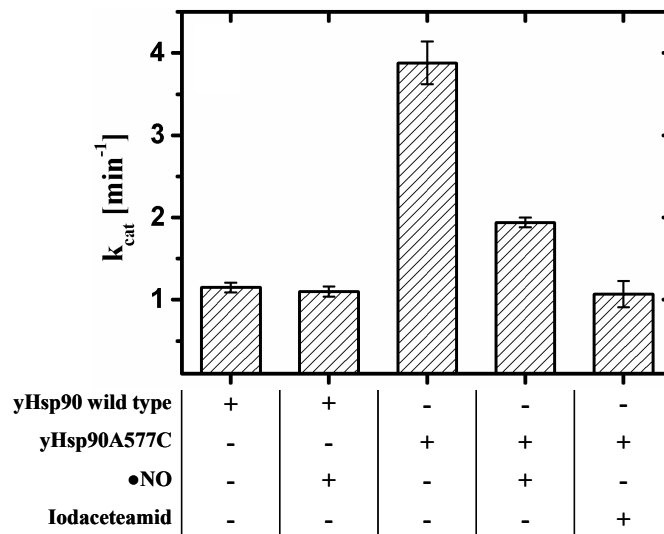


Abbildung 3-10: Steady state k_{cat} Größen von Hsp90 Wildtyp und der Hsp90A577C Mutanten bei 37 °C

Die Hydrolyserate von Hsp90 Wildtyp wird nicht durch die Anwesenheit von •NO oder Iodacetamid beeinflusst. Die erhöhte ATPase Aktivität der Hsp90A577C Mutante hingegen kann durch Modifikation des Cysteinrestes effektiv verringert werden. Die Effektivität der S-Nitrosylierung von Hsp90A577C mit •NO lag bei 68 %, die Carboxymethylierung mit Iodacetamid bei 100 %.

Es wird deutlich, dass die ATPase Aktivität von yHsp90 durch eine wichtige Aminosäure in der C-terminalen Domäne reguliert werden kann und dass sich Modifikationen dieser Aminosäure ebenfalls auf die ATPase Aktivität auswirken. Auffällig ist, dass die Einführung des Cysteins in yHsp90 an Position 577 eine 4fache Erhöhung der ATPase Aktivität zur Folge hat, obwohl die Aminosäure weit entfernt von der N-terminalen Nukleotidbindestelle liegt und ein direkter Einfluss auf die ATPase Aktivität nicht ersichtlich ist. Die Zugabe eines •NO-Donorsalz zeigt zudem, dass es möglich ist, den eingeführten Cysteinrest *in vitro* zu S-nitrosylieren und die ATPase Aktivität von yHsp90 zu inhibieren. Das deutet darauf hin, dass, obwohl das Cystein an der entsprechenden Stelle nicht bei allen Mitgliedern der Hsp90 Familie konserviert ist, dieser Rest eine große Rolle bei der Regulation der Aktivität von Hsp90 spielen könnte. Eine weitere Modifikation der Thiolgruppe des Cysteinrestes durch Iodacetamid ergab, dass auch die Carboxymethylierung einen inhibierenden Einfluss (Faktor 4) auf die Hsp90 Aktivität besitzt. Jede Veränderung der Cystein-Seitenkette an dieser Position wirkt sich also auf die ATPase Aktivität aus.

3.4.3 Der Einfluss auf die Hsp90 Aktivität durch Substitution einer Aminosäure

Ob sich ein ähnlicher Effekt auch bei anderen Hsp90 Homologen ergibt, wurde durch eine Mutationsstudie von humanem Hsp90 β untersucht, wobei die zu Cys-597 des hHsp90 α korrespondierende Position 590 im hHsp90 β modifiziert wurde. Die ATPase Aktivitäten der hHsp90 β Mutanten sind in **Tabelle 7** aufgeführt.

Tabelle 7: ATP Hydrolyseraten k_{cat} für humanes Hsp90 β und Hsp90 β Mutanten bei 37 °C

	k_{cat} [min ⁻¹] 37 °C
hHsp90 β wild type	0.056 ± 0.006
hHsp90C590I	0.065 ± 0.002
hHsp90C590A	0.018 ± 0.011

Die steady state k_{cat} Größen für Hsp90 wurden bei 37 °C nach der Vorschrift von 2.11.1 ermittelt. Die Konzentration von humanem Hsp90 β im Assay betrug 10 μ M, die von ATP 5 mM. Die ATPase Aktivität wurde durch die Zugabe von 250 μ M Radicol inhibiert und die Aktivität dementsprechend korrigiert.

Auch die ATPase Aktivität des humanen Hsp90 β ist abhängig von der eingeführten Aminosäure an Position 590. Interessanterweise kann die ATPase Aktivität durch die Einführung eines Isoleucins leicht erhöht werden, während die Substitution des Cysteinrestes durch ein Alanin die Aktivität stark reduziert. Durch die Substitution der Aminosäure an der betrachteten Stelle kann also die Aktivität von Hsp90 eingestellt werden.

Ein detaillierteres Bild sollte für γ Hsp90 erstellt werden. Dafür wurde Ala-577 durch eine Reihe von Aminosäuren substituiert und die Auswirkung auf die ATPase Aktivität bei verschiedenen Temperaturen untersucht (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Vergleich der k_{cat} und K_M Werte für Hefe Hsp90 und Hsp90 Mutanten

	k_{cat} [min ⁻¹] 25 °C	K_M (ATP) [μM] 25 °C	k_{cat} [min ⁻¹] 30 °C	K_M (ATP) [μM] 30 °C	k_{cat} [min ⁻¹] 37 °C	K_M (ATP) [μM] 37 °C
yHsp90 wt	0.20 ± 0.03	248 ± 25	0.60 ± 0.02	315 ± 31	1.15 ± 0.06	298 ± 16
yHsp90A577C	0.58 ± 0.13	185 ± 17	1.52 ± 0.03	175 ± 13	3.88 ± 0.12	166 ± 12
yHsp90A577I	1.43 ± 0.03	132 ± 7	2.53 ± 0.05	121 ± 12	4.22 ± 0.19	82 ± 7
yHsp90A577N	0.01 ± 0.01	363 ± 50	0.26 ± 0.01	458 ± 35	0.81 ± 0.06	347 ± 68
yHsp90A577D	0.10 ± 0.02	254 ± 30	0.30 ± 0.01	485 ± 61	0.56 ± 0.08	344 ± 29
yHsp90A576C	0.20 ± 0.01	547 ± 62	0.55 ± 0.02	344 ± 51	1.09 ± 0.02	378 ± 20
yHsp90A509C	0.23 ± 0.02	311 ± 50	0.57 ± 0.02	346 ± 57	1.27 ± 0.09	309 ± 56
yHsp90P486C	0.15 ± 0.02	403 ± 71	0.40 ± 0.01	342 ± 33	0.67 ± 0.09	372 ± 58

Die steady state k_{cat} Werte wurden wie unter 2.11.1 beschrieben ermittelt. Die Konzentration von Hsp90 variierte zwischen 2.5 μM und 5 μM. Die K_M Werte wurden ermittelt, in dem die ATP Konzentration zwischen 10 μM und 5 mM variiert wurde. Als Fit wurde die Michaelis-Menten Gleichung herangezogen. Die Hintergrundaktivität wurde durch Zugabe von 125 μM Radicicol ermittelt.

Die **Tabelle 8** beschreibt, dass die unterschiedliche Substitution des Ala-577 in Hsp90 eine Erhöhung der ATPase Aktivität durch Einführung eines Cysteins (Faktor 3) oder eines Isoleucins (Faktor 4) oder eine Erniedrigung der Aktivität durch Einführung eines Asparagins (Faktor 1.5) oder Aspartats (Faktor 2) zur Folge haben. Der Trend der Regulation der ATPase Aktivität korreliert interessanterweise mit der Eigenschaft der verwendeten Aminosäure, β -sheet Strukturelemente zu stabilisieren (Minor, JR & Kim, 1994). So besitzen Cystein- und Isoleucinreste eine hohe Tendenz, Asparagin- und Aspartatreste eine geringe Tendenz zur Stabilisierung von β -sheet Strukturen. Wie in **Abb. 3-9** gezeigt, liegt Ala-577 in einer β -Faltblatt Struktur und die Substitution könnte einen Einfluss auf die Stabilität des β -sheets ausüben. Durch die Substitution an der benachbarten Position Ala-576 zum Cystein bleibt die ATPase Aktivität im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Das verdeutlicht, dass der Druckpunkt in der C-terminalen Domäne von Hsp90 stark regioselektiv auf nur eine Aminosäure fixiert ist. Auch die weiteren Substitutionen von Ala-509, welche sich in einer α -Helix in der Mitteldomäne befindet,

und die Substitution an Position Pro-486, welche sich auf der Moleküloberfläche in räumlicher Nähe zur Position 577 befindet, zeigen keinen zur Position 577 vergleichbaren Effekt. Weiterhin zeigt sich, dass durch die Einführung von Asparagin oder Aspartat an der Position 577 in yHsp90 der Effekt der *in vitro* S-Nitrosylierung in Bezug auf die ATPase Aktivität nachgeahmt werden kann.

3.4.4 *Der Einfluss der Co-Chaperone auf die ATPase Aktivität von Hsp90 Varianten*

Da sich die *in vitro* ATPase Aktivität von Hsp90 nicht ohne weiteres mit seiner *in vivo* Funktionalität verknüpfen lässt, ist es sinnvoll, die Aktivität von Hsp90 unter Anwesenheit seiner Co-Chaperone zu betrachten. Die Co-Chaperone Sti1, Aha1 oder Sba1 üben einen starken Effekt auf die ATPase Aktivität aus. Um erstens herauszufinden, ob die Co-Chaperone einen unterschiedlichen Effekt auf die ATPase Aktivität von Hsp90 Mutanten haben, wurden die *in vitro* ATPase Assays unter Anwesenheit der Co-Chaperone wiederholt (**Abb. 3-11**), um so zweitens den Schritt im ATPase Zyklus näher beschreiben zu können, der durch die C-terminale Substitution beeinflusst wird.

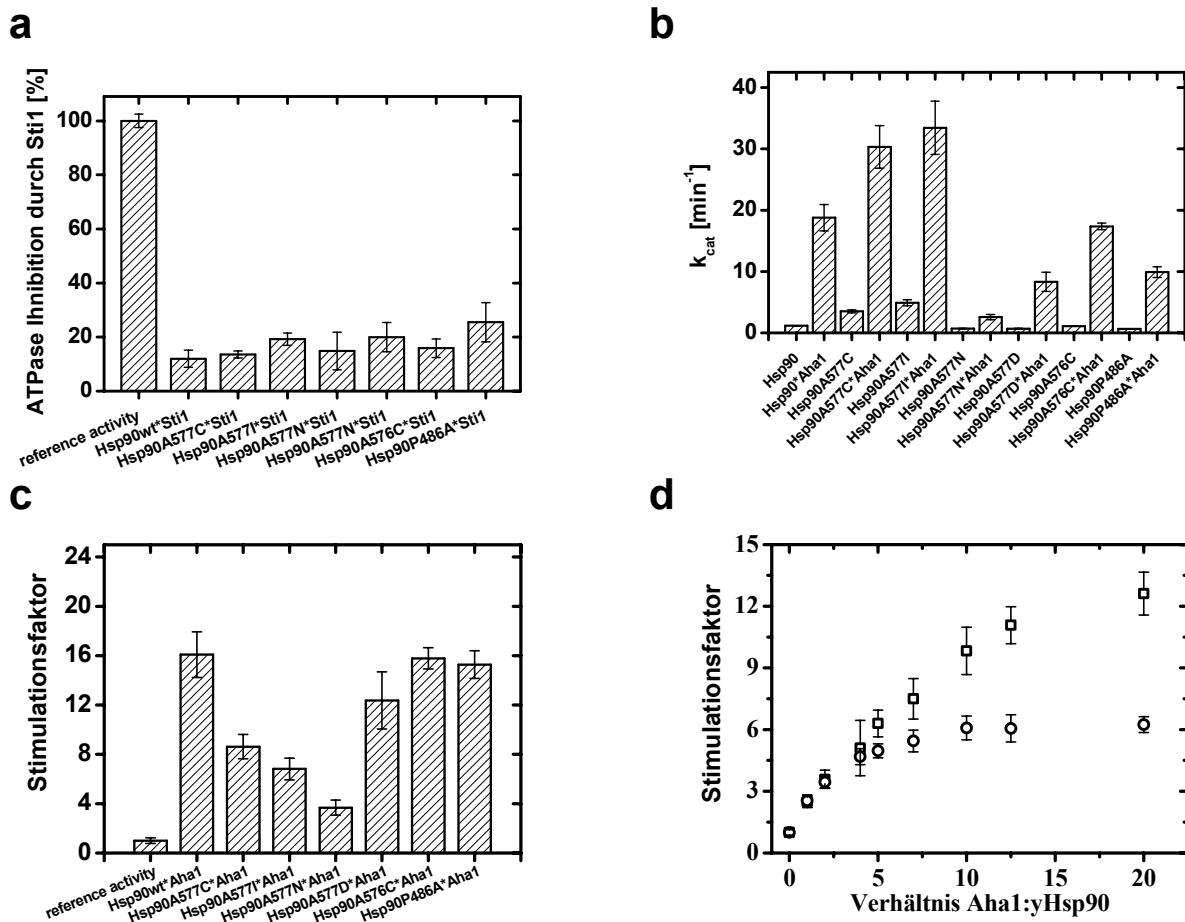


Abbildung 3-11: Effekte der Co-Chaperone auf die ATPase Aktivität von Hsp90 Wildtyp und Mutanten

A, der inhibierende Effekt von Stt1 auf die ATPase Aktivität von Hsp90. 2.5 μM Hsp90 Varianten wurden mit 5 μM Stt1 inkubiert. Die Aktivität von Hsp90 Wildtyp ohne Stt1 wurde auf 100 % gesetzt und aufgeführt als „reference activity“. **B – D**, der stimulierende Effekt von Aha1 auf die ATPase Aktivität von Hsp90 Varianten. Die Hsp90 Konzentration lag bei 1 μM , die Aha1 Konzentration bei 20 μM oder wurde zwischen 0 und 20 μM variiert, wie in **D** angedeutet. **B**, steady state k_{cat} Werte für Hsp90 mit und ohne Aha1. **C**, der Stimulationsfaktor der Aha1 Aktivierung für die verschiedenen Hsp90 Varianten wurde nach **B** berechnet. Der Stimulationsfaktor für alle Hsp90 Varianten ohne Aha1 wurde auf 1 gesetzt und als „reference activity“ aufgeführt. **D**, der Stimulationsfaktor der ATPase Aktivität von Hsp90 Wildtyp (\square) und Hsp90A577C (\circ) bei unterschiedlichen Aha1 Konzentrationen. Die ATPase Aktivität der Hsp90 Varianten ohne Aha1 wurde auf 1 gesetzt. Alle Messungen wurden bei 37 °C durchgeführt, jeweils 4-mal gemessen und um die Hintergrundaktivität korrigiert.

Die getesteten Co-Chaperone Stt1, Sba1 und Cpr6, die entweder am C-Terminus oder in der N-Terminale Domäne von Hsp90 binden, zeigen alle den gleichen Einfluss auf die ATPase Aktivität der Hsp90 Punktmutanten im Vergleich zum Wildtyp (teilweise Daten nicht gezeigt). Nur Aha1, das hauptsächlich an der Mitteldomäne von Hsp90 bindet, besitzt eine deutlich unterschiedliche Stimulierung der Aktivität, wie in **Abb. 3-11 b** und **c** gezeigt. Die Punktmutanten Hsp90A577I und Hsp90A577C ($k_{cat} \approx 33 \text{ min}^{-1}$ und 30 min^{-1}) repräsentieren die maximale durch Aha1 stimulierte Hydrolyserate, bei andere Mutanten

wie Hsp90A577N zeigt Aha1 einen weitaus geringeren Effekt auf den k_{cat} . Vergleicht man allerdings die Stimulationsfaktoren (**Abb. 3-11 c**) zeigt sich, dass der Wildtyp sowie die Mutanten Hsp90A576C und Hsp90P486C am stärksten (Faktor 15) durch Aha1 stimuliert werden, die Mutanten Hsp90A577I und Hsp90A577C werden aber nur halb so effektiv, Hsp90A577N nur zu einem Viertel, stimuliert. In **Abb. 3-11 d** ist eine ausführlichere Aktivierung von Hsp90 Wildtyp und Hsp90A577C gegenübergestellt, die zeigt, dass sich der Unterschied der ATPase Stimulation deutlicher bei höheren Aha1 Konzentrationen abzeichnet. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass von allen getesteten Co-Chaperonen nur Aha1 ein unterschiedliches Verhalten in der ATPase Regulation der Hsp90 Punktmutanten aufweist. Dieser Effekt von Aha1 könnte auf die unterschiedliche Flexibilität der Hsp90 Mutanten in den einzelnen Domänenbewegungen zurückzuführen sein, die im ATPase Zyklus von Hsp90 eine entscheidene Rolle spielt und für die ATP-Hydrolyse geschwindigkeitsbestimmend ist, wie später noch detaillierter besprochen wird.

3.4.5 Strukturelle Untersuchung der Hsp90 Mutanten

Die Unterschiede der einzelnen Hsp90 Mutanten in der ATPase Aktivität könnten auf induzierte strukturelle Änderungen beruhen. Die Charakterisierung der Sekundärstruktur der Volllängenproteine sowie zweier Fragmente konnte diese Annahme aber nicht bestätigen. Zuerst wurde Hsp90 nach **Abb. 3-12** in mehrer Subfragmente unterteilt, und jeweils die Wildtyp-Sequenz und die A577C-Sequenz der Proteine rekombinant exprimiert und aufgereinigt.

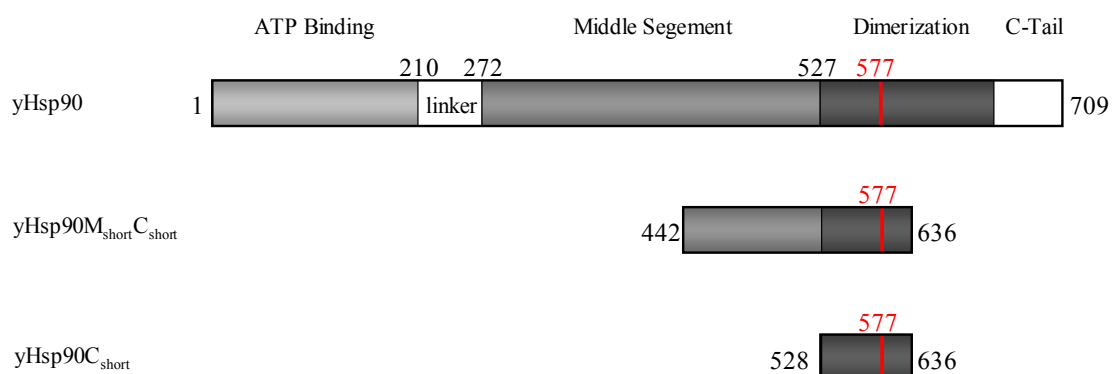


Abbildung 3-12: Fragmentierung von Hsp90 zur Analyse des Einflusses der A577C Mutation auf die Struktur

Die Fragmente yHsp90_{M_{short}C_{short}} und yHsp90_{C_{short}} sind monomer in Lösung, wie über analytische SEC-HPLC gezeigt (Daten nicht abgebildet). Das Fragment yHsp90_{M_{short}C_{short}} wurde ¹⁵N-isotopen markiert und mittels NMR Spektroskopie analysiert.

Die CD-Charakterisierung der Hsp90 Volllänge und der Fragmente zeigte keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich der Wildtyp- und der A577C-Sequenz. Alle Fragmente verhielten sich annähernd identisch, so dass eine signifikante Änderung der Sekundärstruktur durch die Einführung des Cysteinrestes ausgeschlossen werden kann. Um diese These zu stützen, wurde ein *finger print* HSQC des isotopen markierten Fragments γ Hsp90M_{short}C_{short} per NMR Spektroskopie aufgenommen (**Abb. 3-13**). Das Overlay der Spektren für die wildtyp- und die A577C-Sequenz zeigt eine identische Dispersion. Die Fragmente weisen demnach die gleiche Faltung auf, ohne lokale Veränderungen in der Sekundärstruktur erkennen zu lassen.

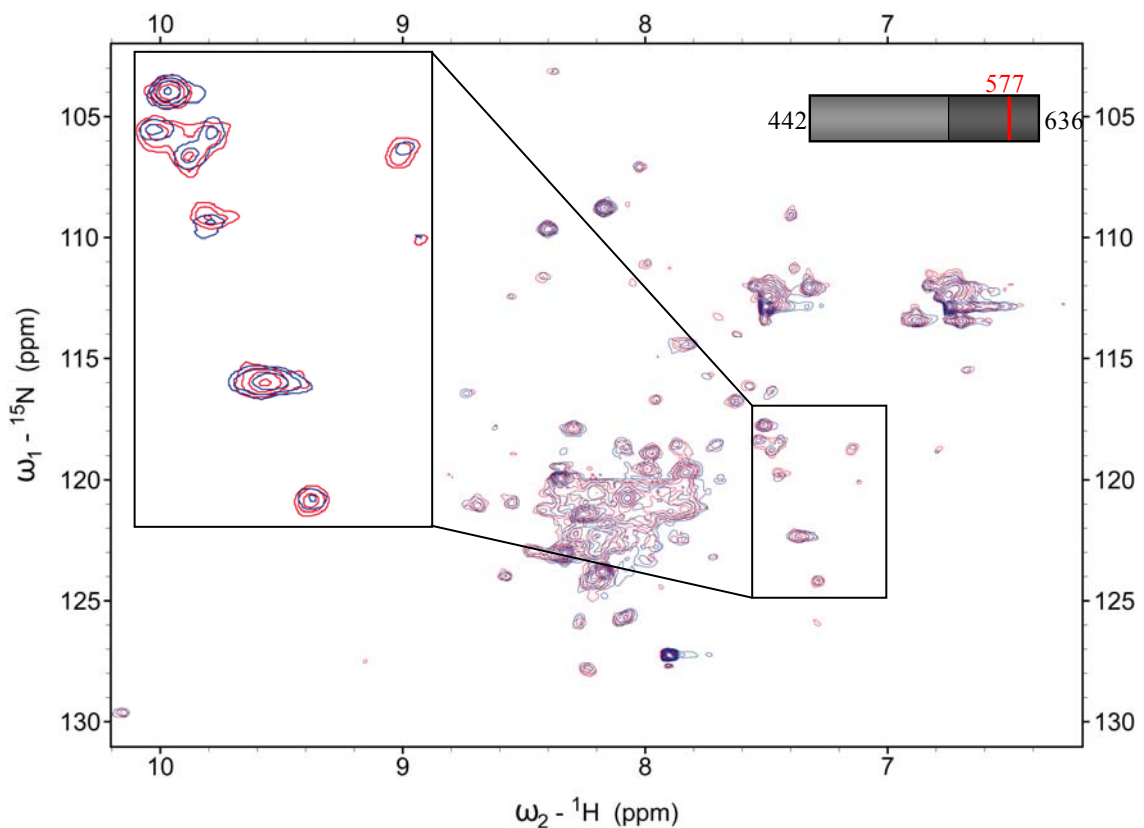


Abbildung 3-13: Overlay der [^{15}N , ^1H] HSQC Spektren der γ Hsp90 Fragmente γ Hsp90M_{short}C_{short} (Aminosäuren 442 – 636) gezeigt für die Wildtyp- (rot) und A577C- Sequenz (Blau)

[^{15}N , ^1H] Experimente wurden an einem Bruker DMX 600 Spektrometer ausgestattet mit einem Dreiaachsen-Gradient bei 298 K in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 50 mM KCl, 0.5 mM TCEP, pH 7.5 mit 10 % D_2O bei einer Proteinkonzentration von $\sim 400 \mu\text{M}$ aufgenommen. Für jedes der 128 t1-Inkrementen wurden 16 scans aufgenommen. Die Spektren wurden prozessiert mit Hilfe der software TopSpin 2.1 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) und analysiert mit SPARKY (University of California, San Francisco, USA). Die Messungen wurden von Stephan Lagleder durchgeführt.

Der Einfluss der Mutationen an der Position 577 auf die Aktivität von Hsp90 lässt sich also nicht auf eine Strukturänderung oder große konformationelle Umlagerungen zurückführen. Die Punktmutation könnte aber einen Einfluss auf die Gleichgewichtslage verschiedener Konformationen von Hsp90 haben. Hsp90 liegt in Ab- oder Anwesenheit von Nukleotiden in einem Gleichgewicht aus offener und geschlossener Konformation dar, wobei sich das Verhältnis je nach dem Hsp90-Protein verändert (Krukenberg et al., 2006; Cunningham et al., 2008). Die Veränderung des Konormationsgleichgewichts würde einen unterschiedliche Population von offenen und geschlossenen Zuständen bedeuteten. Da Hsp90 in der offenen oder geschlossenen Koformation jeweils eine andere Affinität zu hydrophoben Oberflächen aufweist, kann die quantitative Bindung zu 8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure (ANS) benutzt werden, diesen Effekt zu verdeutlichen. ANS ist eine umgebungs-sensitiver, hydrophober Fluoreszenzfarbstoff. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute von ANS steigt mit der Bindung an hydrophobe Oberflächen an. Die Fluoreszenz von ANS wird dabei zur quantitativen Analyse der Hydrophobizität der Hsp90 Varianten herangezogen. In **Abb. 3-14 a** sieht man die Rotverschiebung der ANS Fluoreszenz nach Bindung an Hsp90. Die Titration von ANS zu den verschiedenen Hsp90 Varianten (**Abb. 3-14**, innen) kann zur Bestimmung einer Affinitätskonstante K_D (ANS) herangezogen werden (**Tabelle 9**, Gleichung (9)). In **Abb. 3-14 b** sind die Unterschiede in der Quantenausbeute nach der maximalen Bindung von ANS an die Hsp90 Varianten graphisch dargestellt.

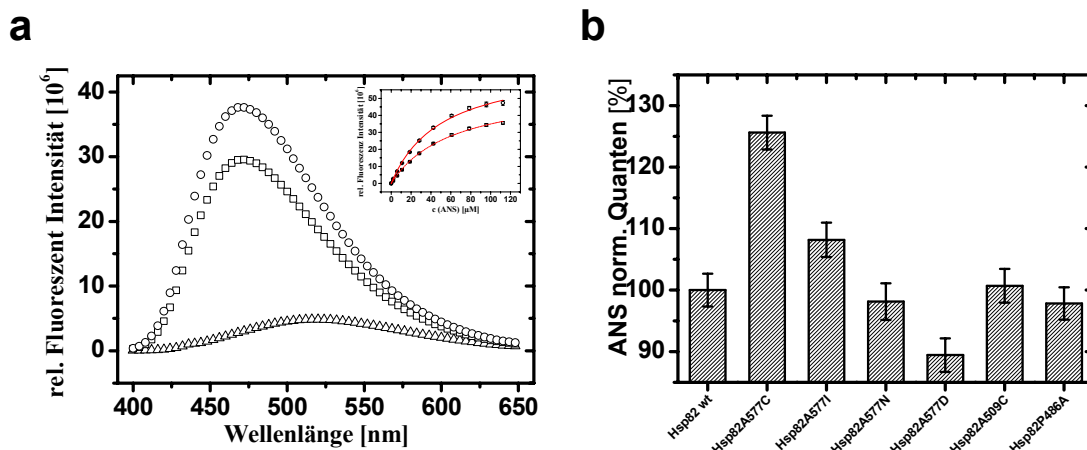


Abbildung 3-14: Fluoreszenztitration von ANS an yHsp90 Wildtyp und Mutanten

A, Fluoreszenz Emissionsspektren von 200 μM ANS [Δ] in 50 mM HEPES, 150 mM KCL, pH 7.5 und inkubiert mit 2 μM yHsp90 wt [\square] und 2 μM yHsp90A577C [\circ]. Spektren wurden bei 25 $^{\circ}\text{C}$ bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm aufgenommen. Das Innenfenster zeigt die Fluoreszenztitrations von ANS in Bereich zwischen 2 μM - 120 μM ANS zu 2 μM yHsp90 wt [\square] und 2 μM yHsp90A577C [\circ]. Die gezeigten Daten wurden um die ANS Eigenabsorption korrigiert und für yHsp90 wt (gepunktete Linie) und yHsp90A577C (durchgezogene Linie) nach Gleichung (9) gefittet. **B**, Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der ANS Bindung an yHsp90 Varianten. Die relative Intensität für yHsp90 wt wurde gleich 100 % gesetzt. Messbedingungen siehe A. Alle Experimente wurden zweifach ausgeführt. Die Standardabweichung ist angegeben.

Tabelle 9: Die Affinitätswerte für die Bindung von ANS an yHsp90 Varianten

	K_D (ANS) [μ M]	rel. Fluorescence Intensity at 475 nm
Hsp82 wt	62 \pm 4	100 \pm 3
Hsp82A577C	51 \pm 3	126 \pm 3
Hsp82A577I	52 \pm 3	108 \pm 3
Hsp82A577N	64 \pm 4	98 \pm 3
Hsp82A577D	59 \pm 4	89 \pm 3
Hsp82A509C	61 \pm 4	101 \pm 3
Hsp82P486A	59 \pm 3	98 \pm 3

Die Affinitätskonstanten K_D (ANS) für die Bindung des hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffs an yHsp90 Varianten wurde über die Titration von ANS an Hsp90 wie in Abb. 3-14 beschrieben durchgeführt und nach Gleichung (9) ausgewertet. Die Werte sind mit dem Standardfehler angegeben.

Diese Charakterisierung zeigte, dass sich die Zugänglichkeit von ANS an die Hsp90 Varianten unterscheidet. Hier zeigen die Hsp90 Mutanten mit erhöhter ATPase Aktivität auch eine erhöhte Affinität zu hydrophoben Bindungspartner, die Mutanten mit reduzierter ATPase Aktivität zeigen umgekehrt eine erniedrigte ANS Bindeaffinitäten, verglichen zum Wildtyp oder Wildtyp ähnliche Mutanten (Hsp90A509C und P486A). Diese quantitative Analyse ist eine *ensemble*-Messung aller Zustände der Hsp90 Varianten in Lösung, die sich in der Affinität zu ANS unterscheiden. Da keine strukturellen Unterschiede zwischen den Hsp90 Varianten festgestellt wurden, könnte die unterschiedliche Affinität zu ANS Ausdruck der verschiedenen Konformationsgleichgewichte der Hsp90 Varianten sein. Die Mutation an Position 577 könnte daher die Population der Konformationszustände in Hsp90 verändern.

3.4.6 Strukturelle und kinetische Untersuchung der Hsp90 Varianten mittels FRET

Um eine weitere Aussage über die Konformationszustände der Hsp90 Varianten zu erhalten, wurden die C-terminale sowie die N-terminale Dimerisierung kinetisch bestimmt. Drei Hsp90 Varianten wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in Heterodimerassays über den *Förster resonance energy transfer* (FRET) Effekt charakterisiert. Der FRET Effekt beruht auf einen strahlungsfreien Übergang der Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor) auf einen sich im Grundzustand befindenden anderen Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor) über Dipol-Dipol

Wechselwirkungen. Die Intensität des Fluoreszenzabfalls des Donors ist abhängig von der Entfernung des Akzeptors, wobei die FRET-Effizienz mit der 6. Potenz des Abstands der FRET-Paare abnimmt.

Um die Heterodimerexperimente durchzuführen, wurde zuerst getestet, ob die Hsp90A577C Mutanten immer noch in der Lage ist, zum Wildtyp vergleichbare Heterodimere mit der ATPase –defizienten Mutante $\Delta 24$ Hsp90 (**Abb. 3-15**) auszubilden, (Richter et al., 2001).

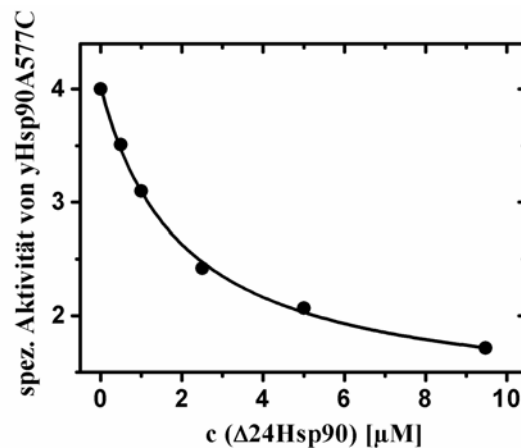


Abbildung 3-15: Heterodimerbildung von Hsp90577C

Einfluss der $\Delta 24$ -Hsp90 Mutanten auf die ATPase Aktivität von yHsp90A577C. Die Daten wurden analysiert nach Richter et al., (2002). Die statistische Auswertung der induzierten Hemmung ergab eine ATPase Aktivität des Heterodimers von ungefähr $1.23 \mu\text{M}_{\text{ATP}}/(\text{min} \cdot \mu\text{M}_{\text{Hsp90}})$ und einen n -Faktor von 1.2. Der n -Faktor von 1 deutet auf eine gleiche Affinität der Hsp90A577C Mutante hin, Homodimere und Heterodimere zu bilden.

Danach wurde die Kinetik der Dimerisierungsprozesse zwischen Donor- und Akzeptor-markierten Hsp90-Cystein Mutanten per FRET analysiert. Die Einführung eines Cysteins in die Aminosäuresequenz von Hsp90 an Position 61 oder 385 beeinflusst weder die *in vitro* noch die *in vivo* Aktivität des sonst cysteinfreien yHsp90 nicht (Hessling et al., 2009), was zudem in **Tabelle 10** für die *in vitro* ATPase Aktivität gezeigt ist.

Tabelle 10: Steady state k_{cat} Werte für die yHsp90 Varianten bei 25 °C

yHsp90 (modification)	k_{cat} at 25°C [min ⁻¹]
wild type	0.20 ± 0.03
D61C	0.20 ± 0.03
Q385C	0.20 ± 0.06
A577I	1.43 ± 0.03
D61C/A577I	1.05 ± 0.06
Q385C/A577I	0.92 ± 0.10
A577N	0.01 ± 0.01
D61C/A577N	0.02 ± 0.01
Q385C/A577N	0.01 ± 0.02

Die ATPase Aktivität von 2.5 µM Hsp90 Wildtyp und Mutanten wurde wie unter 2.11.1 gemessen. Die Cystein Mutanten wurden für die FRET Messungen mit FITC oder TAMRA markiert, was die ATPase Aktivität nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Die kinetischen Untersuchungen wurden mit FITC- oder TAMRA-markierten Cystein Mutanten von Hsp90 durchgeführt, die zusätzlich an Position 577 ein Asparagin (geringe ATPase Aktivität) oder ein Isoleucin (hohe ATPase Aktivität) aufwiesen. Für den Austausch der Untereinheiten wurde die Abnahme der Hsp90 Donor-Fluoreszenz gemessen, die mit der Assoziierung von FRET-Dimeren und einer neuen Domänenorientierung im Heterodimer korrespondiert (**Abb. 3-16 a**). Da die FRET-Effizienz mit der räumlichen Nähe des Donors und Akzeptors zusammenhängt, ist die Intensität der Fluoreszenzabnahme ein Hinweis der Domänenorientierung im Hsp90 Dimer. Die Mutanten yHsp90A577I mit der hohen ATPase Aktivität zeigte eine wesentlich höhere FRET Effizienz, was auf eine kompaktere Struktur in dieser Mutante hindeutet.

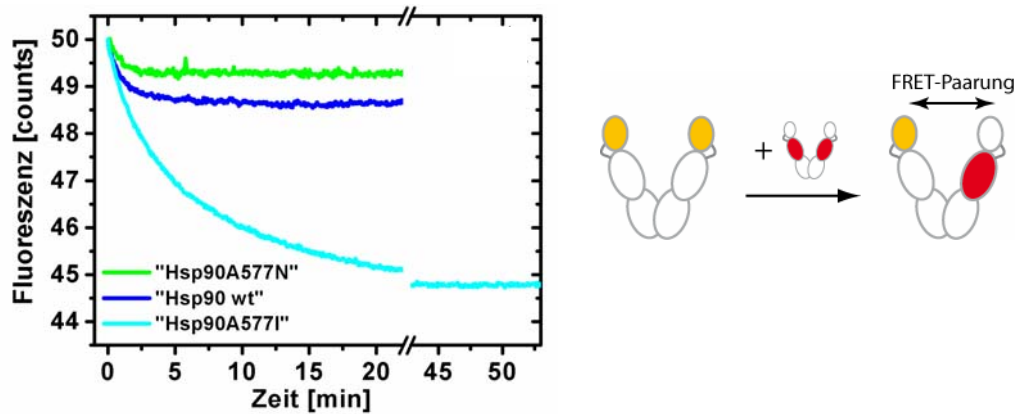
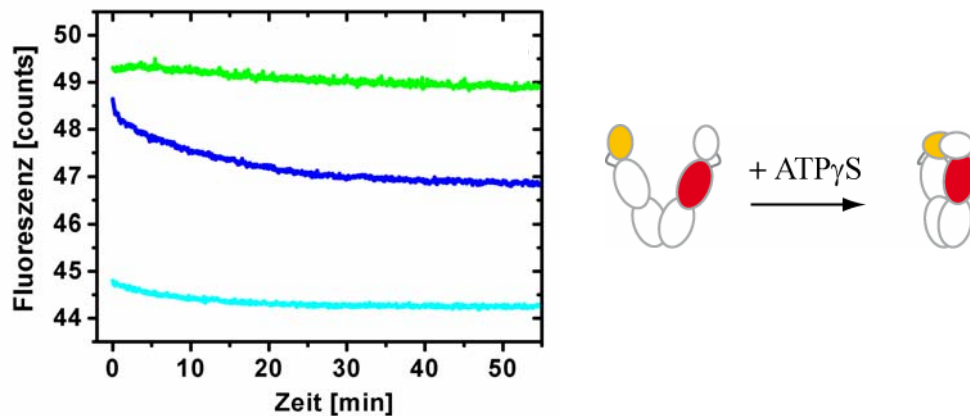
a**b**

Abbildung 3-16: Effekte der Hsp90 Varianten auf die C- und N-terminale Dimerisierung gemessen per FRET

A, Untereinheitenaustausch von Hsp90 Dimeren. Das Fluoreszenzsignal wurde bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ verfolgt, nachdem 100 nM FITC-markiertes Hsp90 mit 100 nM TAMRA-markiertes Hsp90 unter Rühren gemischt wurden. Alle Experimente wurden bei 25 °C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl durchgeführt. Die Daten wurden um lineares *bleaching* korrigiert, und folgender Farbcode verwendet: „yHsp90 wt“ 61C/385C (blau, Wildtyp Aktivität), „yHsp90A577I“ 61C/385C (cyan, hohe Aktivität), „yHsp90A577N“ 61C/385C (grün, geringe ATPase Aktivität). Die konkreten ATPase Aktivitäten der Mutanten sind in Tabelle 11 aufgelistet. **B**, N-terminale Dimerisierung der Heterodimere aufgenommen durch die Abnahme des Fluoreszenzsignals nach Zugabe von 2 μM ATP γS . Der Farbcode entspricht dem in **A** verwendeten.

Zusätzlich zu den Fluoreszenzintensitäten zeigen die qualitativ ermittelten apparenten Halbwertszeiten für die Reaktion des Untereinheitenaustauschs, dass die yHsp90A577I eine 5-fach erhöhte Halbwertszeit aufweist und die C-terminale Dimerisierung in dieser Mutante wesentlich stabiler ist. Die Hsp90A577N Mutante, die fast keine ATPase Aktivität mehr aufweist, zeigt eine 2-fach reduzierte Halbwertszeit für den Austausch der Untereinheiten (**Tabelle 11**) und eine reduzierte FRET Effizienz. Diese Effekte werden ebenfalls deutlich, wenn man die apparenten K_D -Werte für die C-terminale Assoziation der Hsp90 Mutanten vergleicht, die per analytischer Größenausschluss-HPLC ermittelt wurden

(Tabelle 12). Hier zeigt die yHsp90A577I Mutante erneut eine starke Assoziation im Vergleich zum Wildtyp oder zur Hsp90A577N Mutante.

Die transiente N-terminale Dimerisierung in Hsp90 wurde durch ATP γ S-Zugabe induziert. Hier zeigten sich bei den Hsp90 Wildtyp und der Hsp90A577I Mutante nur geringe Unterschiede (Abb. 3-16 b). Die yHsp90A577N Mutante hingegen zeigte eine stark gehemmte N-terminale Assoziierung und ein abweichendes Verhalten nach ATP γ S-Zugabe. Nicht nur die apparente Halbwertszeit ist bei dieser Mutante stark erhöht (Tabelle 11), auch die FRET Effizienz ist sehr gering, was auf eine geringe Anzahl von Dimerisierungsprozessen hindeutet. Die Tatsache, dass für alle Mutanten eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität nach Zugabe des Nukleotids erhalten wird, deutet entweder auf eine unterschiedliche Domänenorientierung auch im geschlossenen Zustand oder, was wahrscheinlicher ist, auf eine variierende Zahl von Dimerisierungsprozessen hin.

Tabelle 11: Kinetische Effekte der Hsp90 Varianten auf die C-terminale und N-terminale Dimerisierung

yHsp90 Varianten	$t_{1/2, \text{app}}$ Austausch der Untereinheiten [min ⁻¹]	$t_{1/2, \text{app}}$ N-terminale Dimerisierung [min ⁻¹]	$k_{\text{cat ATPase}}$ bei 25 °C [min ⁻¹]
“wt” D61C/Q385C	1.02 ± 0.02	9.42 ± 0.07	0.20 ± 0.03
“A577I” D61C/Q385C	5.19 ± 0.03	6.73 ± 0.08	1.43 ± 0.03
“A577N” D61C/Q385C	0.62 ± 0.02	25.65 ± 1.25	0.01 ± 0.01

Die apparente Halbwertszeit ($t_{1/2, \text{app}}$) wurde auf den FRET Experimenten aus Abb. 3-16 a und b ermittelt. Die qualitative Halbwertszeit wurde mit Hilfe der Gleichung (11) ermittelt. Die aufgeführten k_{cat} Werte sind aus Tabelle 8 zum besseren Vergleich entnommen.

Tabelle 12: Ermittlung der apparenten Dissoziationskonstanten für Hsp90 per analytischer Größenausschluss-HPLC

	app. K_D Hsp90 _{C-Terminus} [nM]
yHsp90 Wildtyp	34 ± 5
yHsp90A577I	25 ± 2
yHsp90A577N	71 ± 6

Die apparenten K_D Werte für yHsp90 Wildtyp, yHsp90A577I und yHsp90A577N wurden wie unter 2.5.7 beschrieben, siehe auch (Richter et al., 2001).

3.4.7 Auswirkungen der Hsp90 Mutationen auf die Prozessierung der Reversen Transkriptase

Die oben beschriebenen Unterschiede der Hsp90 Varianten geben eine detaillierte Übersicht über die Auswirkung der Mutation auf die ATPase Aktivität und die damit verbundenen Konformationsänderungen in Hsp90. Ob diese Änderungen sich auch auf die Hsp90-vermittelte Aktivierung von Substraten auswirken, sollte anhand der Aktivierung der Hepatitis-B Virus Reversen Transkriptase (RT) untersucht werden. Hepadnaviren sind DNA beinhaltende Viren, die sich mit Hilfe der RT replizieren. Ein Schlüsselschritt im Mechanismus ist die Bindung von ϵ -RNA, welche die RT veranlasst, ein kleines DNA Oligonukleotid zu synthetisieren (*priming reaction*). Kürzlich wurde der stimulierende Einfluss von hHsp90 und yHsp90 auf die Aktivität der RT in Anwesenheit des Hsc70/Hsp40 Systems und dem Co-chaperone Sti1/Hop nachgewiesen (Stahl et al., 2007). RT wurde in dieser Arbeit herangezogen, um den Einfluss der Mutationen an Position 577 auf die Hsp90-vermittelte Aktivierung von Substraten zu untersuchen. Es zeigte sich, dass alle Hsp90 Varianten die *priming reaction* unterstützen (**Abb. 3-17 a**). Eine quantitative Analyse ergab, dass die RT Aktivierung durch Hsp90 Mutanten, die eine erniedrigte ATPase-Rate aufwiesen, auch weniger stimuliert wurde. Der größte Rückgang der RT Aktivität wurde bei Hsp90A577N und Hsp90A577D im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (**Abb. 3-17 b**). Die Mutanten Hsp90A577I und Hsp90A577C hingegen zeigten eine leichte Steigerung in der Stimulierung der RT Aktivität.

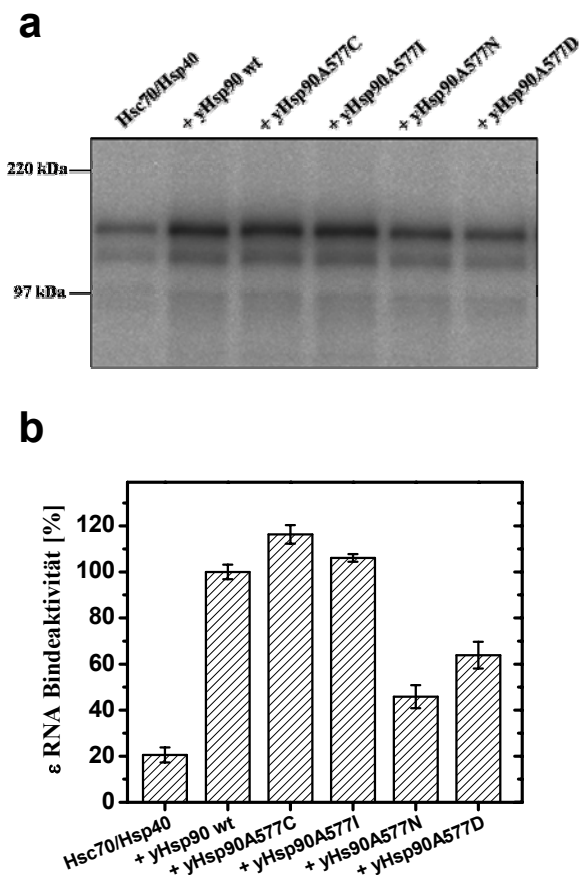


Abbildung 3-17: Auswirkung der Hsp90 Mutation auf die RT Aktivierung

A, RT-εRNA Komplexe wurden erzeugt: von der Enten Hepatitis-B-Virus Reversen Transkriptase als Fusionsprotein mit GrpE (sog. GrpDP, vergl. Beck & Nassal, 2003) (150 nM) und festgelegten Konzentrationen von Hsc70 (4.2 μM), Hsp40 (5.2 μM), Hop (0.9 μM) und ³²P-markierte De RNA (1 μM) plus (0.6 μM) des yHsp90 Wildtyps und den entsprechenden Mutanten. Komplexe wurde bei 20 °C für 2 h gebildet. Danach wurden die Proben dem *priming assay* unterzogen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden per SDS-PAGE separiert und die ³²P-markierte RT wurde per Autoradiographie analysiert. **B**, densitometrische Analyse des Effekt der Hsp90 Varianten auf die Bildung der *priming*-aktiven RT-εRNA Komplexbildung. Hsp90 Wildtyp Stimulation wurde auf 100 % normiert.

Die Punktmutationen von Hsp90 an der Position 577 zeigten eine deutliche Korrelation zwischen der ATPase Aktivität und der Hsp90-vermittelten Substrataktivierung. Die Hsp90 Mutanten mit geringer ATPase Aktivität weisen eine deutliche verringerte Stimulierung der Reversen Transkriptase auf und umgekehrt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die beschriebenen Auswirkungen der Mutation auf die Hsp90 ATPase Aktivität *in vitro* auch auf ein verändertes Verhalten von Hsp90-vermittelten Substrataktivitäten übertragen werden können.

3.4.8 *In vivo* Charakterisierung der Hsp90 Mutanten

Die Auswirkungen der Hsp90 Mutanten *in vivo* wurden in einem *HSC/HSP82*^{-/-} *double knockout* Stamm getestet (Nathan & Lindquist, 1995), der mit einem Plasmid transfiziert wurde, auf dem *HSP82* Wildtyp oder die entsprechenden Hsp90 Mutationen codiert war. Somit war das eingefügte γ Hsp90 das einzige Hsp90 in der Zelle, in der außerdem alle Co-Chaperone von Hsp90 vorliegen. Es ist bekannt, dass die Bindung und die Hydrolyse von ATP für die essentiellen Funktionen von Hsp90 und daher für die Lebensfähigkeit der Hefen absolut notwendig sind (Prodromou et al., 1997; Obermann et al., 1998). Hier zeigte sich, dass alle Hsp90 Varianten die essentiellen Funktionen für die Lebensfähigkeit der Hefen bei 30 °C unterstützten. Der Temperatur-Phänotyp der Hefen wies ein vergleichbares Wachstum der verschiedenen Hefestämme bis zu einer Temperatur von 39 °C (**Abb. 3-18 a**). Es wird deutlich, dass die Unterschiede in den ATPase Aktivitäten keine entscheidende Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Hefen haben und es erscheint möglich, dass die Regulation durch Co-chaperone die Effekte der ATPase Aktivität ausgleichen können.

Um die Hsp90-vermittelte Aktivierung von Substratproteinen *in vivo* analysieren zu können, wurden die Hefestämme mit der viralen Src-Kinase, die streng von der Aktivität des Chaperons Hsp90 abhängt, co-transfiziert. Da die aktive Src-Kinase mit der Zeit für die Hefe tödlich ist, wird sie unter einem Galaktose-induzierbaren Promotor geschaltet und die Expression erst durch Medienwechsel induziert (Nathan & Lindquist, 1995). Die Aktivität der v-Src kann über den totalen zellulären Gehalt an Proteinen gemessen werden, die eine Tyrosin-Phosphorylierung aufweisen (**Abb. 3-18**). Die Expressionslevel der Hsp90 Varianten sind in allen Hefestämmen unter diesen Bedingungen identisch (**Abb. 3-18 b, untere Bande**). Die quantitative, densitometrische Analyse dreier unabhängiger Versuche zeigt eine strikte Korrelation zwischen erhöhter ATPase Aktivität der Hsp90 Varianten und höherer Substrataktivierung und umgekehrt (**Abb. 3-18 c**).

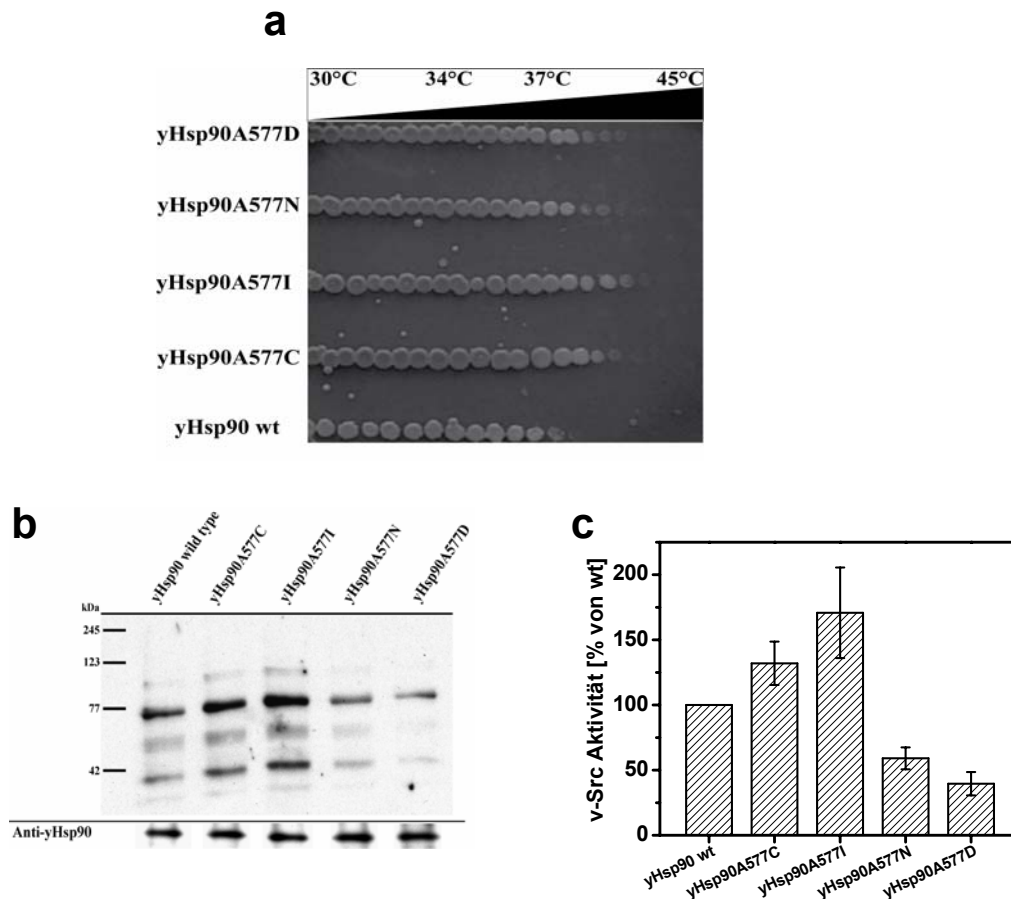


Abbildung 3-18: In vivo Charakterisierung der Hsp90 Mutanten

A, ein *HSC/HSP82* Deletionsstamm wurde mit yHsp90 Wildtyp oder Hsp90 Mutanten transfiziert und auf einem Temperatur-sensitiven Phänotyp getestet. Dazu wurden 3×10^5 Zellen auf einem His⁻ drop out Medium ausplattiert und ein linearer Temperaturgradient für 36 h angelegt. **B**, die Hsp90 Wildtyp oder Varianten exprimierenden Deletionsstämme wurden mit einem v-SRC codierenden Plasmid co-transfiziert. Die Phosphorylierungsaktivität der v-Src wurde mittels Western Blot und einem anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10) nachgewiesen. Die Expressionslevel der Hsp90 Varianten wurde mit einem Anti-Hsp82-Antikörper ebenfalls per Western Blot nachgewiesen. **C**, densitometrische Analyse der Hsp90 stimulierten v-Src Aktivität dreier unabhängiger Experimente wie in B. Hsp90 Wildtyp Aktivität wurde für jedes Experiment auf 100 % gesetzt und mit den Mutanten verglichen. Die Fehlerbalken basieren auf den Standardabweichungen.

Die *in vivo* Charakterisierung zeigte, dass die Hsp90A577I Mutante die v-Src Aktivität zu 170 % stimuliert und die Stimulation bei der Hsp90A577D auf 40 % abfällt, beides im Vergleich zum Wildtyp. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Substrataktivierung bei der Veränderung der Aminosäure-Seitenkette an der Position 577 *in vitro* und *in vivo* vergleichbar ist und die Korrelation zwischen erhöhter ATPase Aktivität und erhöhter Stimulation der Substrataktivität auch in der Hefezelle Bestand hat.

3.4.9 Zusammenfassung: S-Nitrosylierung: die post-translationale Modifikation von Hsp90 am C-term. Druckpunkt

In dem letzten Abschnitt konnte gezeigt werden, dass sowohl die ATPase als auch die Chaperone Aktivität von Hsp90 durch die Veränderung der Seitenkette einer einzelnen Aminosäure im C-terminalen Bereich reguliert werden kann. Dieser Druckpunkt scheint in der Hsp90-Familie konserviert zu sein, zumindest von der Hefe bis zum Menschen. Es wurde berichtet, dass hHsp90, post-translationale durch S-Nitrosylierung (SNO) an diesem Druckpunkt modifiziert, eine reduzierte ATPase Aktivität aufweist (Martinez-Ruiz et al., 2005). Durch Mutationsstudien an hHsp90 und yHsp90 konnte dieser Effekt der S-Nitrosylierung nachgestellt werden. Interessanterweise korreliert die Veränderung der ATPase Aktivität mit der Eigenschaft der eingeführten Aminosäure, β -Strukturen zu stabilisieren (Minor, Jr & Kim, 1994). Substitution an der Position 577 in yHsp90 zu Isoleucin, einer β -sheet stabilisierenden Aminosäure, resultierte in einer Erhöhung der Hsp90 Aktivität. Aminosäuren, die β -sheet Strukturen schwächen, wie Asparagin und Aspartat, zeigen eine reduzierte Hsp90 Aktivität, die vergleichbar zur S-Nitrosylierung ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Substitutionen an dem Druckpunkt durch Aminosäuren, die eine S-Nitrosylierung imitieren, das konformationelle Gleichgewicht von Hsp90 hin zu einer offenen Struktur mit gehemmter N-terminaler Dimerisierung verändern. Es scheint, dass die Energiebarriere für die N-terminal dimerisierte, geschlossene Konformation von Hsp90 erhöht und damit die ATPase Aktivität erniedrigt wird.

Die essentiellen Funktionen von yHsp90 für die Lebensfähigkeit von Hefen werden durch die Mutationen am Druckpunkt allerdings nicht beeinflusst. Die Hsp90-vermittelte Stimulierung von Substrataktivitäten hingegen ist abhängig von der Punktmutation in Hsp90. SNO-imitierende Substitutionen zeigten eine deutlich schwächere Stimulation der Hsp90 Substrate, so dass eine eindeutige Korrelation zwischen der Regulation der ATPase Aktivität und der Substrataktivierung festgestellt wurde.

Die Tatsache, dass ein für die S-Nitrosylierung notwendiges Cystein an der homologen Position erst bei höheren Eukaryoten konserviert ist, zeigt eine mögliche ko-evolutionäre Entwicklung in Hsp90 selbst. Die Aktivität von Hsp90 kann durch eine einzelne Aminosäure variiert werden und den Lebensbedingungen des jeweiligen Organismus angepasst werden. Weiterhin kann in höheren eukaryontischen Systemen so das zelluläre Level an freiem NO durch die Hsp90-abhängige Stimulation der NO-Synthasen in einer *feedback* Schleife reguliert werden.

einer post-translationalen Modifikation von Hsp90 und die Notwendigkeit, die Aktivität von Hsp90 durch Stickstoffmonoxid regulieren zu können. Eine direkte Auswirkung dieser Regulation lässt sich in der *feedback*-Schleife der Aktivierung der endothelalen NO-Synthase durch Hsp90 finden (xxx).

3.5 Die Regulation von Hsp90 durch das Co-chaperon Aha1

Hsp90 ist eine ATPase mit geringer Aktivität. So beträgt die Hydrolyserate von Hefe Hsp90 nur 1 min^{-1} und die von humanem Hsp90 sogar nur 0.05 min^{-1} (Richter et al., 2008; McLaughlin et al., 2006). Diese Hydrolyseraten deuten auf die Funktion von Hsp90 in der Zelle hin, wobei Hsp90 bei der Faltung von Proteinen erst im späteren Stadium eingreift und es diskutiert wird, ob Hsp90 nicht eher eine *holdase*- als eine *foldase*-Funktionalität aufweist. Die geringe Hydrolyserate von Hsp90 wird zudem von einer Anzahl von Co-chaperonen reguliert, die meist einen inhibierenden Effekt auf die ATPase Aktivität von Hsp90 ausüben, wie Sba1/p23, Sti1/Hop oder Cdc37/p50. Bisher wurde nur ein Aktivator der Hsp90 Aktivität identifiziert, Aha1 (Panaretou et al., 2002).

3.5.1 Die Domänenstruktur von Aha1

Aha1 ist ein konserviertes Protein, bestehend aus einer N- und C-terminalen Domäne (**Abb. 3-19 a**). Die N-terminale Domäne von Aha1 (Aha1-N) ist homolog zu Hch1, einem Protein das nur in niederen Eukaryoten zu finden ist. Aha1-N bindet hauptsächlich über ionische Wechselwirkungen an die Hsp90 Mitteldomäne (Meyer et al., 2004). Der C-terminalen Domäne von Aha1 (Aha1-C) konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden.

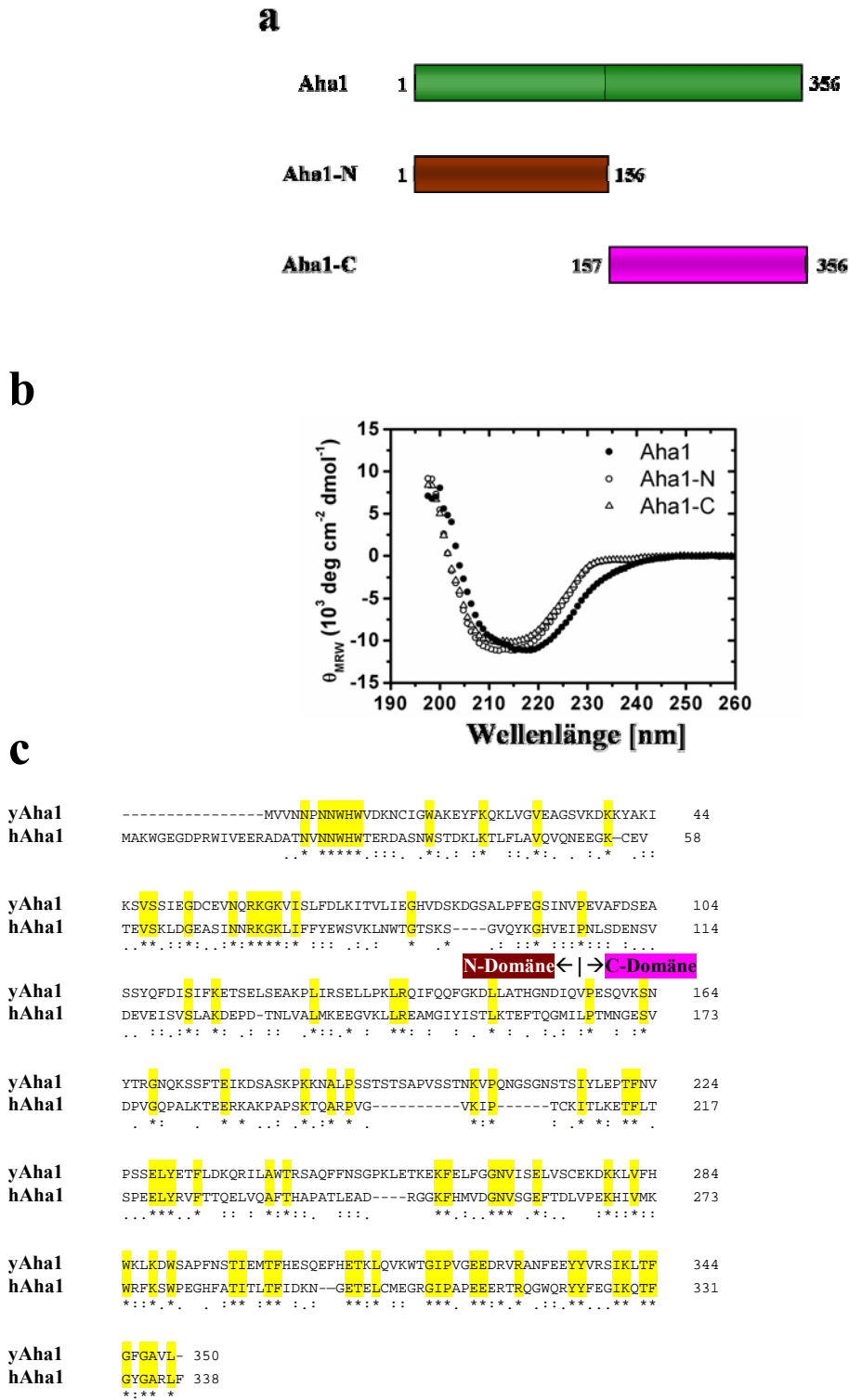


Abbildung 3-19: Domänenstruktur, Stabilität und Homologie von Aha1

A, der Aktivator der Hsp90 ATPase Aktivität Aha1 ist in zwei Domänen aufgeteilt, eine N-terminale Domäne (Aha1-N), die homolog zu Hch1 ist, sowie eine C-terminale Domäne (Aha1-C) mit bislang unbekannter Funktion. B, Fern-UV CD Spektrum von 10 μ M Aha1 (\bullet), 10 μ M Aha1-N (\circ) and 10 μ M Aha1-C (Δ) aufgenommen bei 15 $^{\circ}$ C in 25 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.5, 20 mM KCl, 0.5 mM TCEP. C, Alignment von yAha1 und hAha1 mit Markierung N- und C-Domäne von Aha1. Gelb unterlegt sind die konservierten Aminosäuren.

Die Sekundärstrukturanalyse per CD-Spektroskopie von Aha1 und von den Aha1 Fragmenten zeigte für Aha1 und für die N-terminale und C-terminale Domäne eine kompakte Faltung (**Abb. 3-19 b**). Die Stabilitäten der einzelnen Domänen Aha1-N und Aha1-C zeigen sogar einen höheren Schmelzpunkt im Vergleich zur Volllänge **Tabelle 13**. Dies deutet darauf hin, dass die individuellen Domänen von Aha1 unabhängig voneinander intakte Domänen repräsentieren, die eigene Funktionen übernehmen könnten.

Tabelle 13: Schmelzpunkt-Bestimmung von Aha1 und Aha1 Fragmenten durch thermisch induzierte Entfaltung

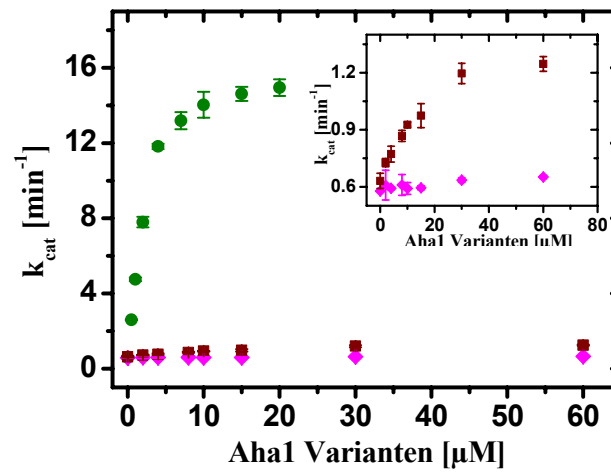
Protein	Schmelztemperatur [°C]
Aha1	63 ± 0.1
Aha1-N	65.4 ± 0.1
Aha1-C	73.6 ± 0.1

Änderungen der Sekundärstruktur durch die thermisch induzierte Entfaltung von 10 µM Aha1, 10 µM Aha1-N oder Aha1-C wurde im CD bei 218 nm bei einer konstanten Heizrate von 60 °C/h beobachtet. Die erhaltenen Daten wurden nach der Boltzmann-Gleichung ausgewertet und mit dem Standardfehler angegeben. Die Messung erfolgte in 25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.5, 20 mM KCl, 0.5 mM TCEP.

3.5.2 Aha1 bindet mit beiden Domänen an Hsp90

Obwohl Hch1 und Aha1-N eine hohe Homologie aufweisen und anhand der Kristallstruktur von Aha1-N und der Hsp90 Mitteldomäne eine vollständige Interaktion der beiden Domänen ohne Beteiligung der Aha1-C vorstellbar wäre, zeigt **Abb. 3-20** dass die Bindung von Aha1 an Hsp90 beide Domänen einschließt. Zwar ist Aha1-N in der Lage, die ATPase Aktivität von Hsp90 allein zu stimulieren, aber die Stimulation im Vergleich zur Aha1 Volllänge ist um das 10fache geringer. Die C-Domäne hingegen besitzt alleine keine stimulierende Funktion. Fügt man jedoch beide Aha1 Domänen zusammen der ATPase Reaktion zu, lässt sich annähernd die ursprüngliche Stimulation der Aha1 Volllänge wieder erreichen.

a



b

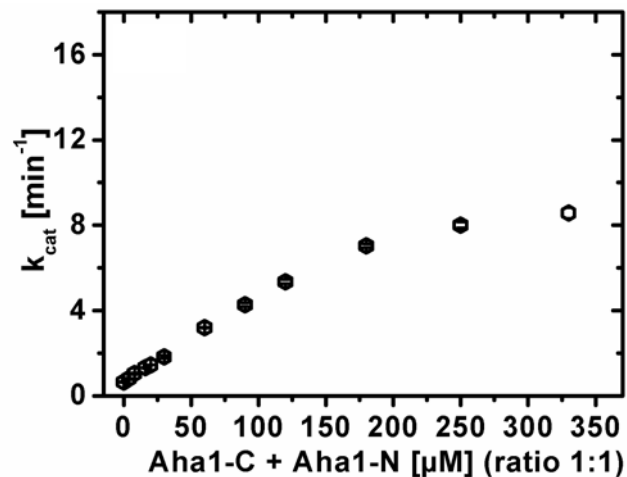


Abbildung 3-20: Effekte von Aha1 und Aha1 Domänen auf die ATPase Aktivität von Hsp90

A, der stimulierende Einfluss von Aha1 (grün), Aha1-N (weinrot) und Aha1-C (magenta) auf die ATPase Aktivität von Hsp90. 1 μM Hsp90 wt wurde mit Aha1 Varianten im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 60 μM vorm Start der Reaktion für 10 min bei 30 °C inkubiert. **B**, Gleiche Konzentrationen von Aha1-N und Aha1-C wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit 1 μM Hsp90 wt vorm Start der Reaktion inkubiert. Angegeben sind die Endkonzentration beider Aha1-Fragmente. Alle Versuche wurden bei 30 °C in 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM ATP durchgeführt und die Hintergrundaktivität nach Zugabe von 150 μM Radicol wurde abgezogen. Aha1 und Aha1 Fragmente zeigten keine ATPase Aktivität.

Die Stimulierung der Hsp90 ATPase Aktivität zeigt, dass für die Aktivierung von Hsp90 beide Domänen von Aha1 wichtig sind. Die individuellen Domänen von Aha1 bilden in Lösung keine Assoziat (Daten nicht gezeigt). Berücksichtigt man zudem die Tatsache, dass die Volllänge Aha1 in Lösung Monomer vorliegt, lässt sich schlussfolgern, dass,

abgesehen von der Hsp90 Mitteldomäne, mindestens noch eine weitere Bindestelle für Aha1 in Hsp90 vorhanden sein muss. Es wäre aber möglich, dass durch die Bindung von Aha1-N die zweite Aha1-Bindestelle in Hsp90 erst induziert wird und Aha1-C zeitlich nach der Bindung der N-terminalen Domäne erfolgt.

3.5.3 *Bindung von Aha1 und Aha1 Fragmenten an Hsp90 und die Brückenfunktion von Aha1*

Nachdem gezeigt wurde, dass die Bindung von Aha1 an Hsp90 komplexer Natur ist, wurde die Funktionalität jeder einzelnen Domäne untersucht. Dazu wurde die Domänenorientierung und der Austausch von Untereinheiten in Hsp90 Dimeren über den *Förster resonance energy effect* (FRET) gemessen. Für die Messungen wurde eine Cystein-Mutante von Hsp90D61C entweder mit ATTO-488 oder mit ATTO-550 markiert, wobei die Mutation und der Label keinen Einfluss auf die Aktivität von Hsp90 ausüben (Hessling et al., 2009). Zuerst wurden FRET-Paarungen in Hsp90 Heterodimeren erzeugt, indem die markierten Hsp90 Homodimere miteinander gemischt wurden und die Abnahme der Donor-Fluoreszenz detektiert wurde (**Abb. 3-21 a**). Als nächstes wurde Aha1 oder Aha1 Fragmente zu den Hsp90 Heterodimeren gegeben und die Änderung in Donor-Fluoreszenz gemessen (**Abb. 3-21 b**). Die Zugabe von Aha1 resultierte in einer deutlichen Abnahme der Hsp90 Donor-Fluoreszenz, folglich auch in einer Zunahme der FRET Effizienz, was möglicherweise auf eine neue, kompaktere Domänenorientierung in Hsp90 mit sich annähernden N-Domänen zurückzuführen ist. Alle weiteren Aha1 Fragmente zeigten bei einer Konzentration, bei der völlige Sättigung erreicht sein sollte, einen vergleichbaren, wenn auch viel geringeren Effekt, was eine Bindung der einzelnen Aha1 Fragmente an Hsp90 zeigt. Zur Untersuchung des kinetischen Effekts von Aha1 auf den Austausch der Hsp90 Untereinheiten wurde ein Überschuss von unmarkierten Hsp90 Wildtyp zu den Lösungen gegeben und die wiederkehrende Donor-Fluoreszenz detektiert (**Abb. 3-21 c**).

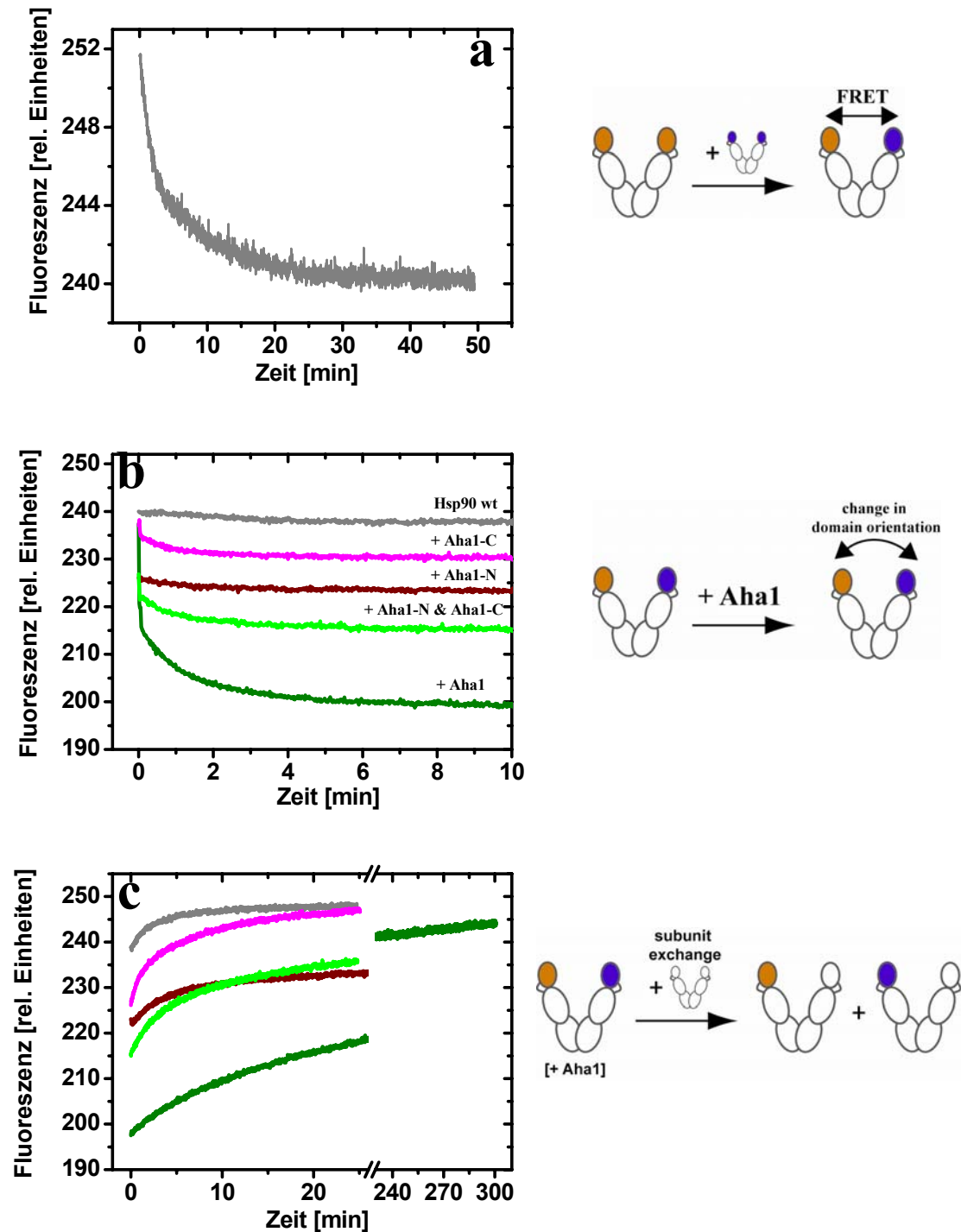


Abbildung 3-21: Bindung von Aha1 und Aha1 Fragmenten und die Brückenfunktion von Aha1 gemessen über fluorescence resonance energy transfer (FRET)

A, die Bildung von unterschiedlich markierten Hsp90-FRET-Paarungen mit 100 nM ATTO-488 und 100 nM ATTO-550 markierten Hsp90 Cys-61 Mutanten. ATTO-488 markiertes Hsp90 wurde für 20 min vorinkubiert (photo-bleaching) und die Abnahme der Donor-Fluoreszenz nach Zugabe von ATTO-550 markiertem Hsp90 über die Zeit gemessen ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 523 \text{ nm}$). **B**, Abnahme der Hsp90 Donor-Fluoreszenz (grau) nach der Zugabe von Aha1 (20 μM , olive), Aha1-N (60 μM , magenta), Aha1-C (60 μM , weinrot) oder Aha1-N + Aha1-C (120 μM im Verhältnis 1:1, grün) zu den vorgeformten Hsp90 Heterodimeren. **C**, Austausch der Hsp90 Untereinheiten in Abwesenheit und Anwesenheit der Aha1 Varianten nach der Zugabe von 2 μM unmarkiertem Hsp90 Wildtyp. Gezeigt ist die Zunahme der Donor-Fluoreszenz. Die Farbzuordnung und Konzentrationen sind die selben wie in **B**. Die apparenten Halbwertszeiten für jeden Untereinheiten austausch sind in Tabelle 14 angegeben. Alle Messungen wurden in 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl bei 20 °C durchgeführt.

Durch die Zugabe eines Überschusses von unmarkierten Hsp90 lässt sich die Kinetik des Austausches der Hsp90 Untereinheiten messen. Die qualitative Auswertung der Daten über die Bestimmung der Halbwertszeit der Reaktion ergab die in **Tabelle 14** aufgelisteten Werte. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von Aha1 in einer starken Verlangsamung des Austauschs der Hsp90 Untereinheiten resultierte, wobei die Halbwertszeit der Reaktion etwa um Faktor 20 erhöht wurde. Dies deutet darauf hin, dass in Anwesenheit von Aha1 die Assoziation der einzelnen Hsp90 Protomere stark erhöht ist und dass dieser Effekt Nukleotid-unabhängig ist. Aha1 besitzt eine Art Brückenfunktion für die Untereinheiten von Hsp90, wobei die Bindung von Aha1 eine neue Orientierung der Domänen im Hsp90 Dimer zur Folge hat. Die einzelnen Domänen von Aha1 zeigen ebenfalls eine Neuorientierung der Hsp90 Domänen, also indirekt auch eine Bindung. Für die Brückenfunktion von Aha1 ist allerdings das Volllängenprotein notwendig.

Tabelle 14: Kinetische Effekt von Aha1 und Aha1 Fragmenten auf den Austausch der Untereinheiten von Hsp90 gemessen über FRET

Protein	app. $t_{1/2}$ Untereinheitenaustausch [min]
Hsp90	2.5 ± 0.02
+ Aha1	53.98 ± 0.15
+ Aha1-C	4.33 ± 0.03
+ Aha1-N	4.25 ± 0.04
+ Aha1-C & Aha1-N	5.21 ± 0.04

Die apparenten Halbwertszeiten ($t_{1/2, app}$) für den Austausch der Untereinheiten (subunit exchange) der Hsp90 Dimere abgeleitet von den Daten in Abb. 3-21 C. Die qualitative Halbwertszeit in Anwesenheit und Abwesenheit der Aha1 Varianten wurden wie unter „Material und Methoden“, Gleichung (12) beschrieben bestimmt und inklusive des Standardfehlers angegeben. Die Experimente wurden in 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl bei 20 °C durchgeführt.

3.5.4 Aha1 Bindung an die Mutante *yHsp90V391E*

Mit den FRET Experimenten konnte gezeigt werden, dass Aha1 eine Brückenfunktion für die Hsp90 Untereinheiten einnehmen könnte. Obwohl hier sowie in den ATPase Assays gezeigt werden konnte, dass die N-terminale und C-terminale Domänen von Aha1 bei der Bindung und Stimulierung von Hsp90 beteiligt sind, bleibt unklar, ob Aha1 an einem

Hsp90 Protomer bindet oder die Brückenfunktion durch die Bindung eines Aha1 Moleküls an beide Protomere im Hsp90 Dimer stattfindet. Um diese Frage beantworten zu können, wurden Hsp90 Heterodimere mit einer Mutation erzeugt, die nur die Bindung eines Aha1 Moleküls an ein Hsp90 Protomer erlauben. Auf Grundlage der Kristallstruktur des Komplexes von Aha1-N und der Hsp90 Mitteldomäne (Meyer et al., 2004), wurde die Mutante yHsp90V391E kreiert. Diese Hsp90 Mutante benötigte sehr viel mehr Aha1, um stimuliert zu werden, zeigte eine stark reduzierte Stimulation durch Aha1 und bindet Aha1 wesentlich schlechter im Vergleich zum Hsp90 Wildtyp (**Abb. 3-22**).

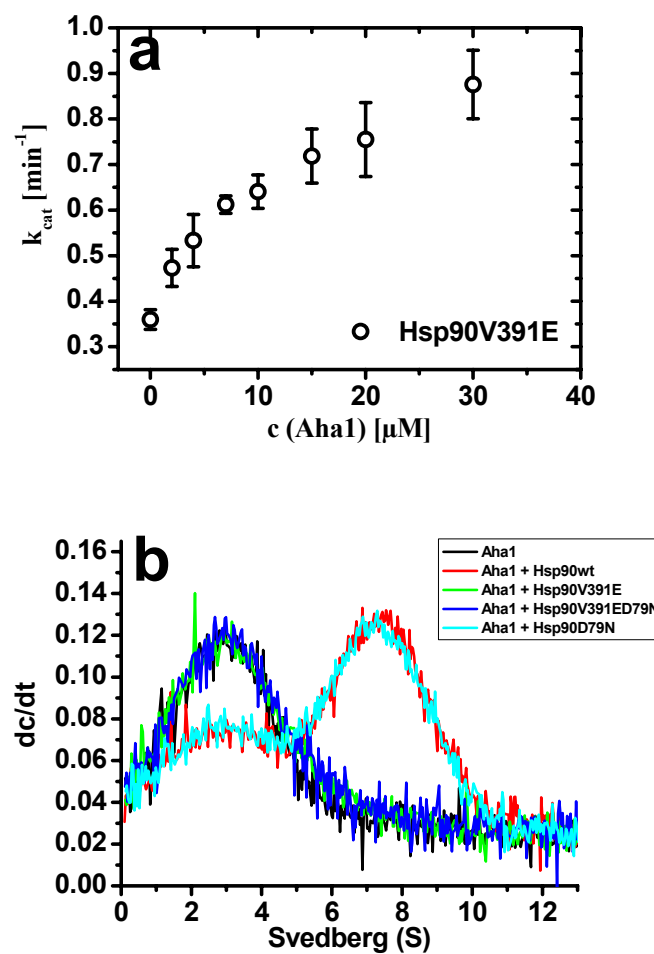


Abbildung 3-22: Komplexierung von Aha1 mit Hsp90 Mutanten

A, Stimulierender Effekt von Aha1 auf die ATPase Aktivität von Hsp90V391E. 1 μM Hsp90V391E wurde mit verschiedenen Aha1 Konzentrationen von 0 – 40 μM inkubiert. Die ATPase Aktivität wurde bei 30 °C in 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM ATP gemessen. **B**, 1 μM FITC-markiertes Aha1 wurde mit 4 μM Hsp90 Wildtyp und Hsp90 Mutanten für 30 min bei RT in 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl inkubiert. Die Inkubation von 1 μM Aha1 mit 29 μM unmarkierten Hsp90 zeigte keine Veränderung des Oligomerisierungsverhaltens von Aha1 (Daten nicht gezeigt). Die Sedimentationsläufe wurden bei 45.000 upm und 23 °C durchgeführt. Die Verschiebung von 3 S auf 7.5 S zeigt eine Komplexbildung von Aha1 mit Hsp90 an. Hsp90V391E und die Doppelmutante Hsp90V391E/D79N weisen eine stark reduzierte Affinität zu Aha1 auf.

Um qualitativ beschreiben zu können, ob Aha1 an Hsp90 bindet, wurde Aha1 zu diesem Zweck FITC-markiert und die Bindung an Hsp90 in der Ultrazentrifuge analysiert (**Abb. 3-22 b**). Hier zeigt sich erstens, dass Aha1 in einem Konzentrationsbereich bis 30 μM als Monomer vorliegt (Daten nicht gezeigt) und zweitens, dass eine starke Bindung von Aha1 zum Hsp90 Wildtyp durch die Zunahme der Swedberg-Konstante (S) von 3 S auf 7.8 S beobachtet werden kann, die Bindung zu Hsp90V391E und der Doppelmutanten Hsp90V391E/D79N aber fast vollständig inhibiert wird. Hsp90D79N ist eine Mutante, die weder ATP bindet noch hydrolysieren kann (Obermann et al., 1998).

3.5.5 Aha1 stimuliert die Hsp90-Untereinheiten in *cis* und *trans*

Um zu untersuchen, ob die Stimulation von Aha1 in dem selben Protomer von Hsp90 stattfindet, an das auch Aha1 gebunden ist, es sich also um eine *cis*-Aktivierung handelt, oder ob Aha1 das gegenüberliegende Protomer in *trans* aktiviert, werden verschiedene Heteromere von Hsp90 durch Titration erzeugt und die ATPase Aktivität in Anwesenheit von Aha1 gemessen. In **Abb. 3-23 a**, sind die Aha1-stimulierten ATPase Aktivitäten aller homodimeren Mutanten sowie der C-terminalen Domäne von Hsp90 (Hsp90-C) gezeigt. Um zuerst die *trans*-Stimulierung zu testen, wird zu Hsp90V391E eine steigende Konzentration der Hsp90D79N Mutante in Anwesenheit von 10 μM Aha1 titriert. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der ATPase Aktivität (**Abb. 3-23 b**), die einerseits die Ausbildung von Heterodimeren bewies, aber andererseits auch zeigte, dass diese Heterodimer bei Anwesenheit von Aha1 sehr stark aktiviert werden können. In Abwesenheit von Aha1 konnte keine Änderungen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Stimulierung des gebildeten Heterodimers durch Aha1 zeigt deutlich eine *trans*-aktivierende Funktion von Aha1. Um eine *cis*-Stimulierung zu testen, wurde zum Hsp90 Wildtyp, das durch Aha1 stark stimuliert werden kann, die Doppelmutante Hsp90V391E/D79N titriert. Bei diesen Heterodimeren ist eine *trans*-Aktivierung inhibiert (**Abb. 3-23 c**). Interessanterweise zeigte sich keine Änderung in der ATPase Aktivität, was auf eine ebenfalls *cis*-gerichtete Aktivierung hindeutet. Wenn zum Hsp90 Wildtyp unter Anwesenheit von Aha1 die C-terminale Domäne von Hsp90 titriert wird, zeigt sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der ATP-Umsatzrate (**Abb. 3-23 d**). Dies deutet darauf hin, dass die *cis*-Aktivierung von Aha1 im Hsp90 Dimer auf die Anwesenheit zweier vollständiger Protomere beruht, die aber nicht unbedingt voll funktional sein müssen.

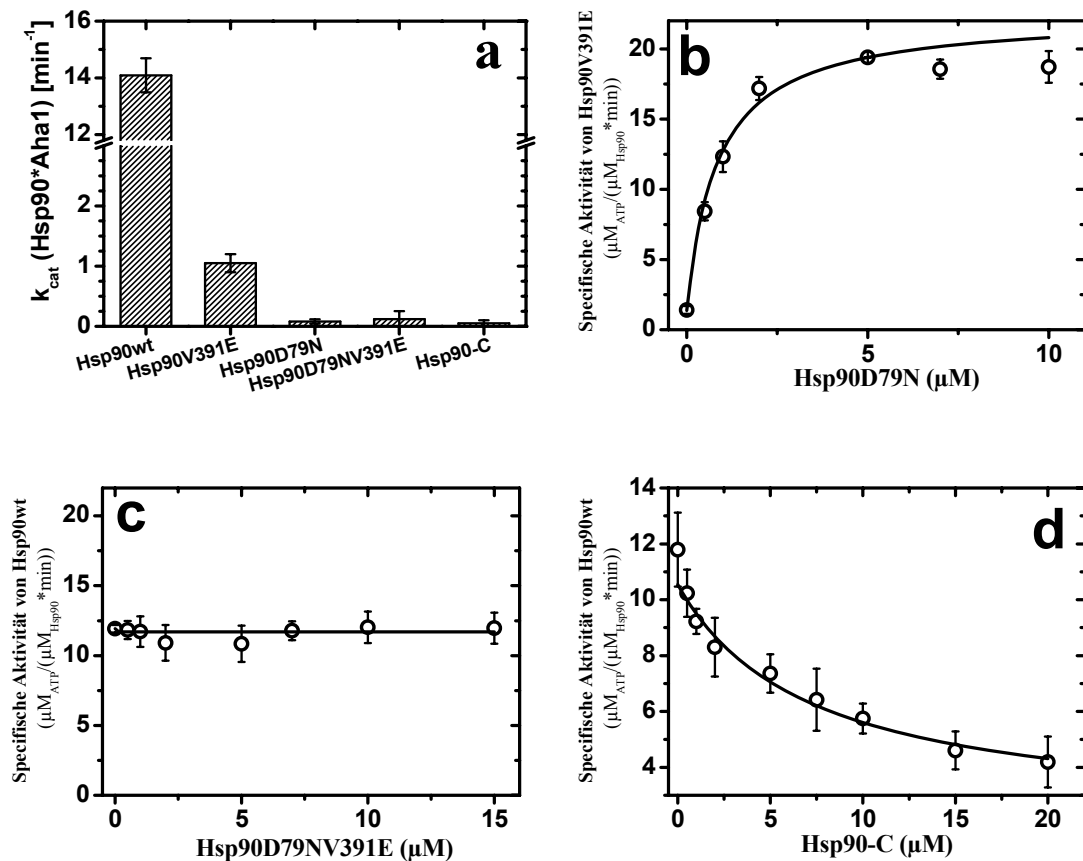


Abbildung 3-23: Heterodimer ATPase Assay zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von Aha1

A, *steady state* k_{cat} Werte von 1 μM Hsp90 wt und Hsp90 Mutanten in Anwesenheit von 10 μM Aha1. **B – D**, der Effekt der Heterodimer Bildung auf die durch Aha1 stimulierte ATPase Aktivität von Hsp90. **B**, die spezifische ATPase Aktivität von 1 μM Hsp90V391E in Anwesenheit von 10 μM Aha1 unter Erhöhung der Konzentration von Hsp90D79N. **C – D**, spezifische Aktivität von 1 μM Hsp90 Wildtyp in Anwesenheit von 10 μM Aha1 unter Erhöhung der Konzentration der Doppelmutanten Hsp90D79NV391E (**C**) oder der C-terminalen Domänen von Hsp90 (**D**). Die Ausbildung der Heterodimere wurde durch Mischung der Hsp90 Varianten und Inkubation bei 30 °C für 10 Minuten erreicht. Danach wurde Aha1 zugegeben und für weitere 5 Minuten inkubiert. Die ATPase Assays wurden in 40 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM KCl bei 30 °C durchgeführt, mit 125 μM Radicol abgestoppt und um die Hintergrundaktivität korrigiert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Stimulierung der Hsp90 ATPase Aktivität durch Aha1 in beide Richtungen funktioniert, sowohl in *cis* als auch in *trans*. Dabei ist die Stimulierung in beiden Richtungen nicht davon abhängig, dass zwei Aha1 Moleküle an das Hsp90 Dimer gebunden sind. Die Assoziation eines Aha1 Moleküls an Hsp90 reicht aus, um eine vollständige Stimulation der ATPase Aktivität zu bewirken. Dieses Modell würde nahelegen, dass die durch Aha1 hervorgerufene konformationelle Änderung in Hsp90 zu einer Änderung in der N-terminalen Dimerisierung führen würde, was folglich in einer Hydrolysereaktion in beiden Hsp90 Untereinheiten resultieren würde. Diese Eigenschaft von Aha1 und die oben gezeigte Brückenfunktion weisen deutlich darauf hin, dass, neben

der Interaktion von Aha1 mit der Hsp90 Mitteldomäne, es mindestens noch eine weitere Bindestelle für Aha1 gibt, möglicherweise im *trans*-liegenden Hsp90 Protomer.

3.5.6 Die Bindung von Aha1 erfolgt an die N-terminale und Mitteldomäne von Hsp90

Um die möglichen Interaktionsfläche zwischen Aha1 und Hsp90 herauszufinden, wurden ^1H , ^{15}N HSQC-NMR Experimente mit isotopen-markierten Proben durchgeführt. Die zuvor erstellten *Assignments* (Protein-Rückgrat Zuordnungen) der N-terminalen und Mitteldomäne von Hsp90 (Salek, 2002; Dehner, 2003; Hagn, unveröffentlicht) wurden verwendet, um die Interaktionsfläche in Hsp90 über chemische Verschiebungsexperimente zu bestimmen. Die Titration von Aha1 zu der markierten Hsp90 Mitteldomäne bestätigte die Interaktionsfläche, die in der Kristallstruktur der Hsp90 Mitteldomäne mit der N-terminalen Domäne von Aha1 beschrieben wurde (Meyer et al., 2004; **Abb. 3-24 a und b**, **Abb. 3-25**).

Nach Bestätigung der Kontakte in der Hsp90 Mitteldomäne, wurde die Hsp90 N-Domäne im Komplex mit Aha1 untersucht. Hier wurden ebenfalls chemische Verschiebungen einzelner Aminosäuren nach der Zugabe von Aha1-N detektiert (**Abb. 3-24 a**, **Abb. 3-25**), die eine weitere spezifische Bindestelle in der N-Domäne von Hsp90 anzeigen. Die Aminosäuren befinden sich in der letzten α -Helix und dem C-terminalen β -sheet (Reste 187 – 210) auf der Hsp90 N-Domäne.

Wenn dagegen zu der isolierten Hsp90 N-Domäne in der nukleotidfreien Form die Aha1-C Domäne titriert wird, konnten keine chemischen Verschiebungen detektiert werden, folglich wurde keine Bindung zwischen Hsp90-N und Aha1-C in Abwesenheit von Nukleotid festgestellt. In der AMP-PNP gebundenen Form zeigte die Hsp90 N-Domäne hingegen eine Interaktion mit der Aha1-C Domäne (**Abb. 3-24 a und b**, **Abb. 3-25**). Dieses Ergebnis zeigt eine nukleotid-abhängige zweite Bindestelle für Aha1 in Hsp90. Die individuellen Aminosäuren, die bei der Bindung zwischen Hsp90-N und Aha1-C beteiligt sind, clustern im Bereich des ATP-Lids und der Helix 1 in der Hsp90 N-Domäne. Um diese Interaktion zu bestätigen und zu vervollständigen, wurde das Assignment der C-terminalen Domäne von Aha1 bestimmt. Für Aha1-C könnten 94 % aller nicht-Prolin Reste für den Bereich Aminosäure 213 – 350 zugeordnet werden. Chemische Verschiebungs- und NOE-Experimente bestätigten die Anordnung von Sekundärstrukturelementen, wie sie in der C-terminalen Domäne des homologen humanem Aha1-C gefunden wurden (pdb: 1x53). Bei der Titration von Aha1-C mit Hsp90-N zeigte

sich dieselbe Nukleotidabhängigkeit, eine deutlich stärkere Wechselwirkung beider Domänen in Anwesenheit von AMP-PNP (**Abb. 3-24 c**, **Abb. 3-25**). Die individuellen Aminosäuren, die bei dieser Bindung beteiligt sind, wurden auf das Homologiemodell der Aha1 C-terminalen Domäne übertragen (**Abb. 3-24 d**).

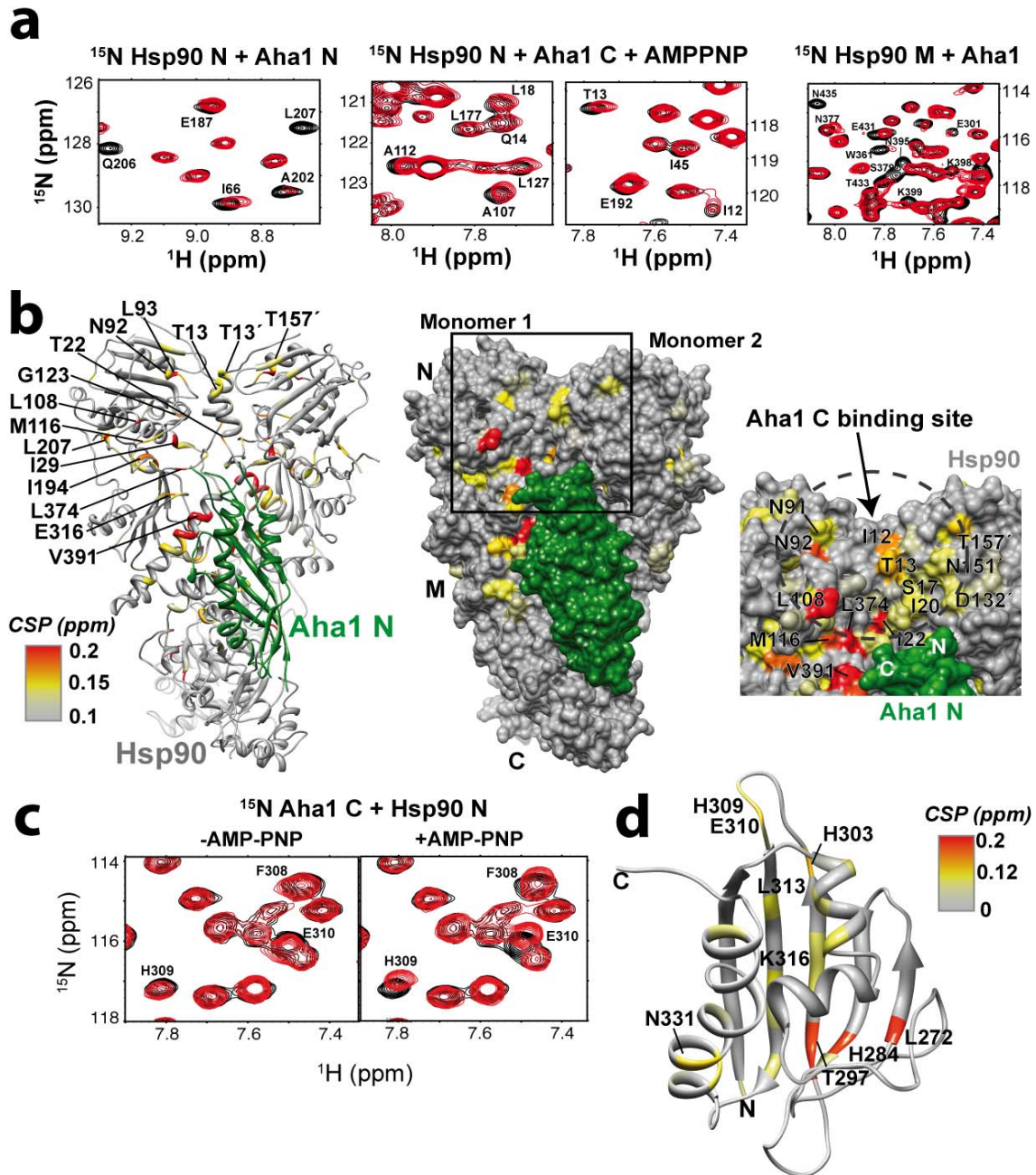


Abbildung 3-24: Ermittlung der Interaktionsfläche zwischen den individuellen Domänen von Aha1 und Hsp90

A, Bereiche des ^{15}N HSQC-Spektrums der Hsp90 N-Domäne und der Mitteldomäne in Anwesenheit von Aha1-N und Aha1-C. Aha1-N bindet an die N-terminale Domäne (links) und an die Mitteldomäne (rechts) von Hsp90. Aha1-C interagiert mit der AMP-PNP gebundenen Form der Hsp90 N-Domäne (Mitte). **B**, Übertragung der chemischen Verschiebungen nach **A** auf die Hsp90 Voll-längenstruktur (pdb: 2cg9) mit steigender Intensität von grau nach rot). Die chemischen Verschiebungen auf der Hsp90 Mitteldomänen-Seite nach Zugabe von Aha1-N stimmen mit der Kristallstruktur überein (pdb: 1usu). Zusätzliche chemische Verschiebungen wurden auf der Hsp90-N Domäne mit Aha1-N oder Aha1-C detektiert. Reste beider individuellen Aha1 Domänen tragen zu der Interaktionsfläche zwischen Aha1 und Hsp90 bei und sind ebenfalls auf die Hsp90 Struktur übertragen, wobei signifikante Reste markiert sind. Die Aha1-N Domäne (weinrot) wurde auf die Hsp90 Mitteldomäne basierend auf den chemischen Verschiebungen nach **A** gedockt. **C**, Ausschnitt des ^{15}N HSQC-Spektrums von Aha1-C ohne (schwarz) und mit (blau) der Hsp90 N-Domäne. Signifikante chemische Verschiebungen zeigten sich erst bei der Anwesenheit der AMP-PNP gebundenen Form der Hsp90 N-terminalen Domäne (rechts). **D**, die mittleren chemischen Verschiebungen nach **C** übertragen auf das Homologiemodell der Aha1 C-Domäne basierend auf der NMR Struktur des humanen Aha1-C (pdb: 1x53). Signifikante Effekte zeigen sich am Ende der β -sheet Region. Die Messungen wurden von Franz Hagn durchgeführt.

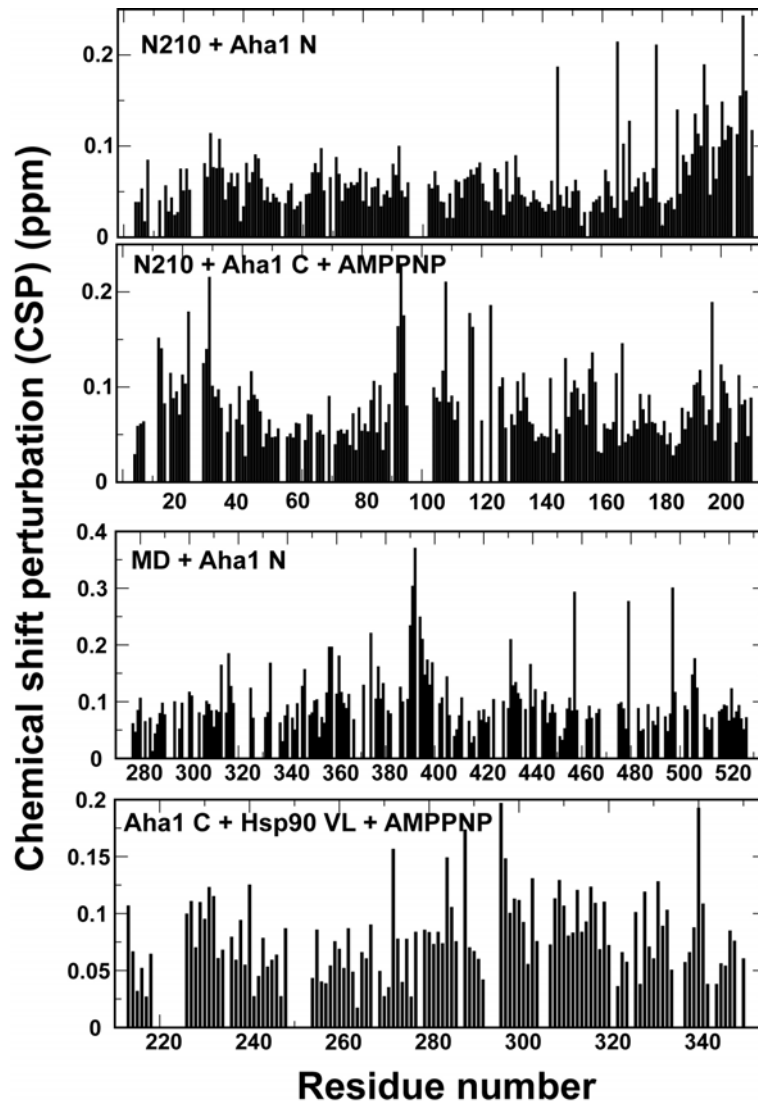


Abbildung 3-25: Ermittlung der Aha1-Hsp90 Binderegion

Chemische Verschiebungen (CSP) der individuellen Hsp90 Domänen und der Aha1 C-Domäne detektiert über ^{15}N HSQC- oder TROSY-Experimente bei 25 °C. Die CSP Werte wurde ermittelt nach (Dehner et al., 2003). Von oben nach unten: 500 μM Hsp90 N-terminale Domäne (N210) titriert mit 1 mM Aha1-N; 500 μM Hsp90-N210 titriert mit Aha1-C und 2 mM AMP-PNP; 600 μM Hsp90 Mitteldomäne titriert mit 1 mM AHA1-N; 500 μM Aha1-C titriert mit 500 μM Hsp90 Volllänge und 2 mM AMP-PNP. Die Messungen wurden von Franz Hagn durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich die Interaktion zwischen Aha1 und Hsp90 in zwei Interaktionsereignisse unterteilen. Die Bindung von Aha1-N an die Hsp90 Mitteldomäne und die zusätzliche Interaktion mit dem letzten Bereich der Hsp90 N-Domäne könnte die Bindung von Aha1 an Hsp90 ermöglichen. Danach könnte die Aha1 C-Domäne spezifisch an die Hsp90-N Domänen binden und den energetisch ungünstigen geschlossenen Zustand von Hsp90 stabilisieren und damit die Population der ATPase-kompetenten Konformation von Hsp90 erhöhen. Nach ATP-Bindung bindet Aha1 vollständig und mit höherer Affinität an Hsp90.

3.5.7 *Zusammenfassung: Der Aktivierungsmechanismus von Hsp90 durch Aha1 zeigt eine Brückenfunktion von Aha1 und die gleichzeitige cis- und trans-Stimulierung*

Aha1 ist der einzig bisher bekannte Aktivator der Hsp90 ATPase Funktion. In der vorliegenden Studie wurde der Mechanismus der Stimulation von Aha1 weiter aufgeklärt und Aha1 in den Kontext andere Co-chaperone eingebunden. Wie schon früher beschrieben, schließt sich die gleichzeitige Bindung von Sti1 und Aha1 gegenseitig aus, sei es aufgrund überlappender Bindungsflächen oder weil die bindungskompetenten Zustände von Hsp90 konträr sind (Panaretou et al., 2002; Lotz et al., 2003; Harst et al., 2005). Sti1 bindet eher an die offene, Aha1 an die geschlossene, N-terminal dimerisierte Konformation von Hsp90 (Richter et al., 2003). Obwohl Sba1, ebenso wie Aha1, die Bindung an den geschlossenen Zustand von Hsp90 bevorzugt, ist die Interaktion beider Co-Chaperone nicht kompetitiv, ihre Wirkung auf die ATPase Aktivität von Hsp90 aber gegensätzlich.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für eine vollständige Aktivierung von Hsp90 die Anwesenheit beider Aha1 Domänen notwendig ist (vergleiche auch Panaretou et al., 2002). Der beschriebene Brückeneffekt, der die Dimerisierung der Hsp90 Untereinheiten stabilisiert, ist zudem nur bei der Anwesenheit des Volllängenproteins zu beobachten. Die Bindung von Aha1 induziert zusätzlich eine Domänenneuorientierung in Hsp90, die zu einer kompakteren Struktur mit sich annähernden Hsp90 N-terminalen Domäne führt. Durch die Bildung von Hsp90 Heterodimeren mit einzelnen Punktmutationen konnte gezeigt werden, dass die Bindung eines Aha1 Moleküls ausreicht, um beide Protomere im Hsp90 Dimer zu stimulieren. Die Stimulation von Hsp90 durch ein Molekül Aha1 erfolgt also sowohl in *cis* als auch in *trans* und würde einen intermediären, asymmetrischen Komplex ergeben. Unter zellulären Bedingungen ist die Konzentration von Hsp90 über 30-mal höher als die von Aha1 (Ghaemmaghami et al., 2003), würde das bedeuten, dass nur ein Aha1 Molekül ausreichen würde, um im Komplex mit Hsp90 die volle Stimulierung der Hsp90 Aktivität zu erreichen. Die Bindung von zwei Molekülen Aha1 an Hsp90 wäre nicht erforderlich und die Hypothese der Ausbildung eines asymmetrischen, intermediären Komplexes ist durchaus wahrscheinlich.

Die NMR-basierenden Titrationsexperimente individueller Domänen von Hsp90 und Aha1 wurden verwendet, um den Binde- und Aktivierungsmechanismus von Aha1 zu vervollständigen. Die Interaktionsfläche der Hsp90 Mitteldomäne mit Aha1-N in Lösung ist vergleichbar zu der in der Kristallstruktur beschriebenen Interaktion (Mayer et al., 2004). Zudem wurde eine weitere Bindestelle zwischen Aha1-N und der N-terminalen Domäne von Hsp90 detektiert, die sich am Ende der Hsp90 N-Domäne befindet und teilweise mit den N-terminalen und Mitteldomänen Kontakte im Hsp90 Dimer überlappt

(Ali et al., 2006). Zudem zeigte sich eine weitere Interaktionsfläche zwischen der nukleotidgebundene Form der N-terminalen ATPase Domäne von Hsp90 und der C-terminalen Domäne von Aha1. Die Reste der Interaktionsfläche waren hauptsächlich um den ATP-Lid und der ersten Helix von Hsp90 N-Domäne lokalisiert und bezogen sich hauptsächlich auf hydrophobe Seitenketten.

Zusammenfassend spielt Aha1 eine entscheidende Rolle im Aktivierungsmechanismus von Hsp90, indem die energetisch ungünstige N-terminale dimerisierte Form von Hsp90 induziert wird, die erreicht werden muss, um ATP zu hydrolysieren (**Abb. 3-26**). Zusätzlich begünstigt die Bindung von ATP in der Hsp90 N-Domäne die Bindung der Aha1 C-terminalen Domäne und so wird wahrscheinlich die N-terminal dimerisierte Form von Hsp90 durch Aha1 stabilisiert. Die Brückenfunktion von Aha1 ist aber nukleotid-unabhängig und führt zu einer neuen Domänenorientierung am Beginn des ATPase Zyklus von Hsp90, wobei möglicherweise die Population von ATPase-kompetenten Zuständen erhöht wird. Die Änderung des konformationellen Gleichgewichts könnte mit der Substraterkennung und Prozessierung zusammenhängen und die Rolle von Aha1 nicht nur im ATPase sondern auch im Chaperon Zyklus von Hsp90 erklären.

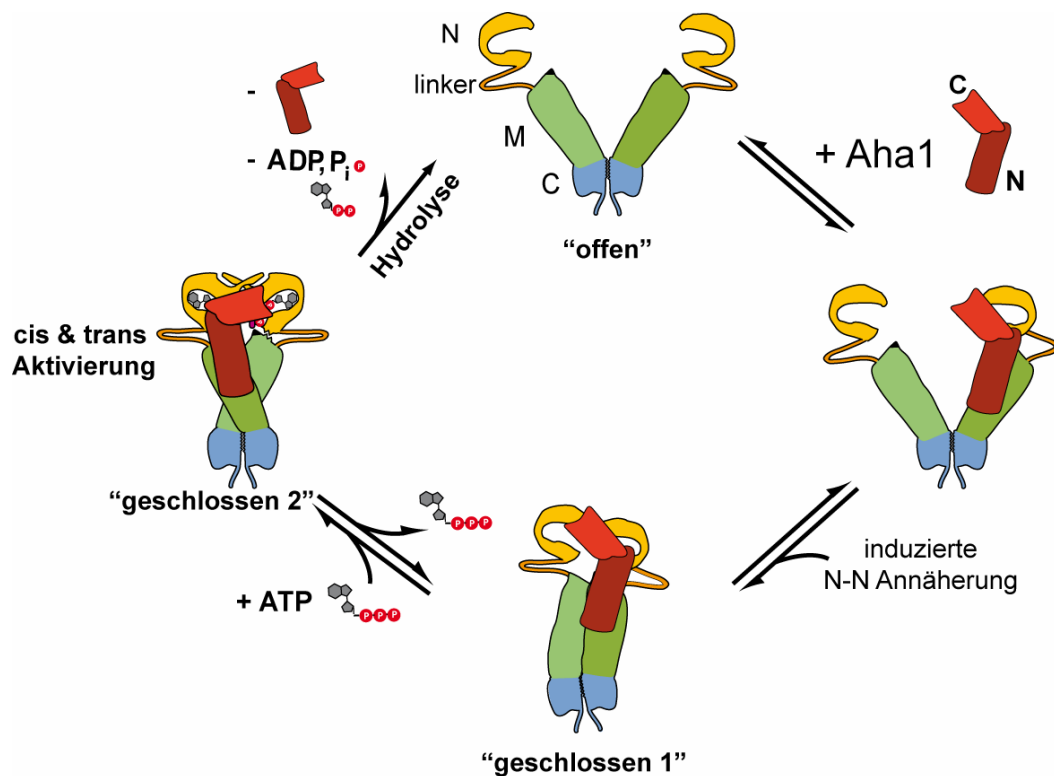


Abbildung 3-26: Schematische Präsentation der Aktivierungsmechanismus von Aha1

Hsp90 befindet sich in offen „entspannten“ Zustand. Der monomere Aktivator Aha1 bindet an ein Protomer des Hsp90 Dimer, führt die beiden Protomere zusammen und induziert eine neue Domänenorientierung. Diese führt zu einer kompakteren Hsp90 Konformation mit sich annähernden Hsp90 N-Domänen. Aha1 Bindung resultiert in einen asymmetrischen geschlossenen Hsp90 Komplex („geschlossen 1“). Ein Aha1 Molekül kann die Aktivierung beider Hsp90 ATP-bindenden Domänen in *cis* und *trans* vollständig stimulieren. In Anwesenheit von ATP entsteht eine weitere geschlossenen Struktur von Hsp90 („geschlossen 2“), die eine mögliche weitere Bindestelle für Aha1 enthält und an die Aha1 mit einer höheren Affinität bindet. Die durch Aha1 induzierte Domänenneuorientierung könnte die Energiebarriere der energetisch ungünstigen konformationellen Änderung im Hsp90 ATPase Zyklus überwinden und die Population der ATPase-kompetenten Konformation erhöhen. Das würde konsequenterweise zu einer Beschleunigung der ATP Hydrolyse führen. Nach der Umsetzung von ATP und der Abgabe von ADP kehrt Hsp90 wieder in den Ausgangszustand zurück. Die offene und die zweite geschlossene Struktur sind dem ATPase Zyklus entnommen, wie er bei Wandering et al, (2008) beschrieben wird. Die intermediären Zustände sind abstrahiert dargestellt, weil eine detaillierte Aussage auf Grund der Datenlage nicht möglich ist.

3.6 Die Substraterkennung und Prozessierung des molekularen Chaperones Hsp90

3.6.1 Die Interaktion von Hsp90 mit dem Tumorsuppressor p53

Einer der bedeutendsten Fragen der Hsp90-Forschung ist die Frage nach der Substraterkennung und der Prozessierung. Wie kann Hsp90 in dem komplexen Milieu einer Zelle seine Substrate identifizieren?

Um sich der Beantwortung dieser Frage zu nähern, wurde die Interaktion von individuellen Domänen von Hsp90 mit dem Tumorsuppressor p53 untersucht. Wie schon früher gezeigt, wechselwirkt vor allem die Hsp90 Mitteldomäne mit der DNA-binde Domäne (DBD) von p53 (Müller et al., 2004; Walerych et al., 2004), allerdings ist diese bloße Wechselwirkung nicht ausreichend, um die Aggregation von p53 DBD zu unterdrücken (**Abb. 3-27 a**), eine Eigenschaft, die typisch ist für Chaperone. Interessanterweise zeigt nur die Hsp90 Volllänge und das Konstrukt Hsp90M_{short}C_{short} (Aminosäure 442-636) eine konzentrationsabhängige Chaperonfunktion für die thermisch induzierten Aggregation von p53 DBD (**Abb. 3-27 b und c**). Bei der gewählten Temperatur von 45 °C wird die Aggregation von p53 DBD induziert, wobei Hsp90 seine native Konformation beibehält (**Abb. 3-3 und 3-40**). Da p53 natürlicherweise nicht in der Hefe vorkommt, es aber als Substrat von Hefe Hsp90 erkannt wird, deutet weiterhin auf einen konservierten Mechanismus der Substraterkennung in der Hsp90 Familie hin.

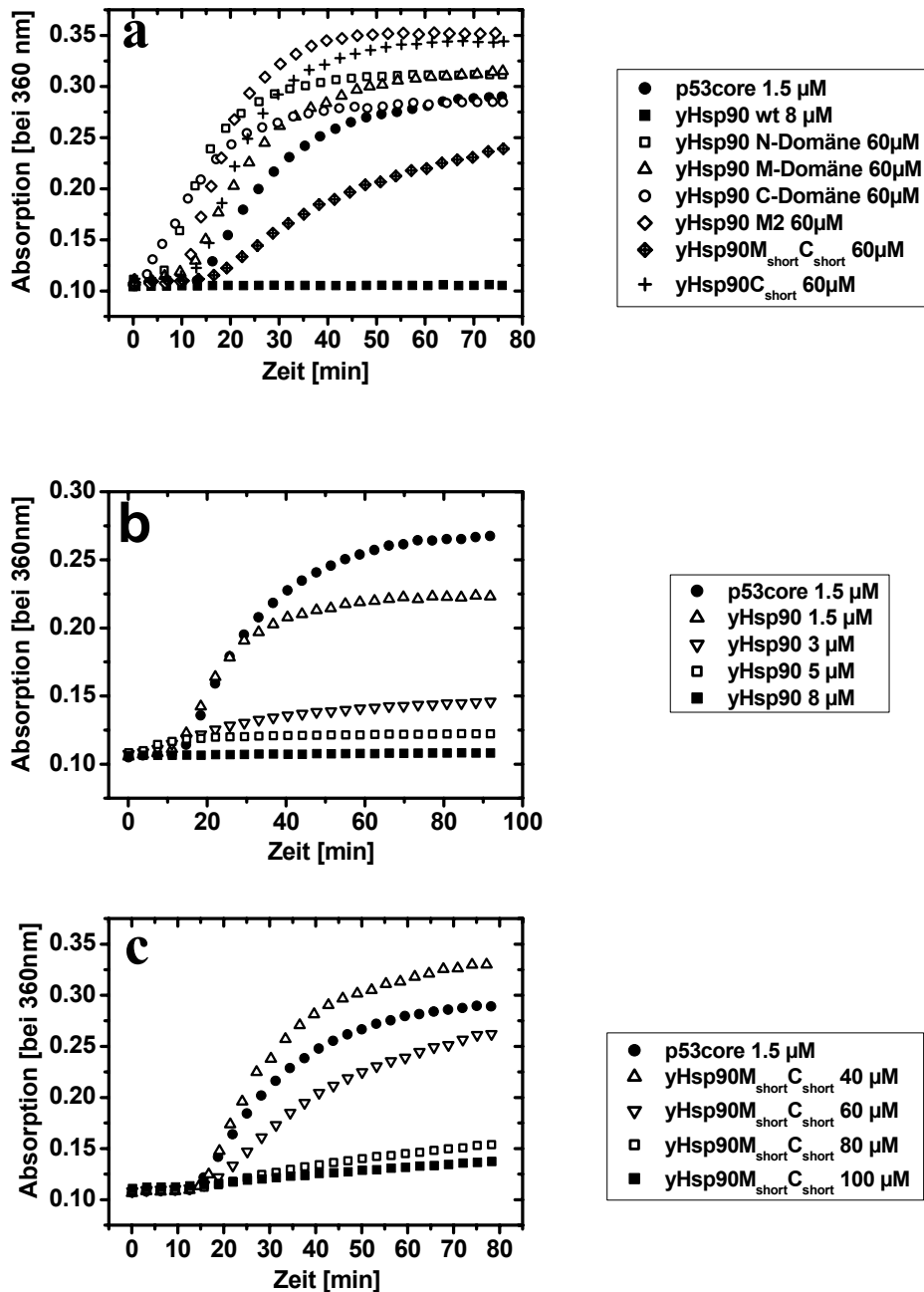


Abbildung 3-27: Chaperoneaktivität von Hsp90 und Hsp90 Domänen

A-C, die Eigenschaft die thermisch induzierte Aggregation von p53 DBD zu unterdrücken wurde bei 45 °C indirekt über die Absorption von UV-Licht bei 360 nm gemessen. Vor dem Assay wurde p53 DBD mit den angezeigte Hsp90 Varianten bei RT für 10 min inkubiert und danach auf 45 °C geschiftet. Die Erhöhung der Absorptionswerte könnte eine Ko-aggregation der Hsp90 Domänen mit p53 bedeuten, was auch durch eine Verkürzung der lag-Phase für die Aggregation zeigt. Die einzelnen Konstrukte besaßen folgende Aminosäuresequenz: N-Domäne (1-210); M-Domäne (272-527); M2 (442-527); M_{short}C_{short} (442-636); C_{short} (528-636), C-Domäne (527-709). Alle Messungen wurde in 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl in einem Volumen von 200 μl durchgeführt.

Die Tatsache, dass nur die Volllänge von Hsp90 wirklich in der Lage ist, die Aggregation von p53 DBD zu unterdrücken, lässt vermuten, dass alle drei Domänen von Hsp90 zusammenwirken und zusammen an der Interaktion mit p53 involviert sind. Die Unterdrückung der p53 DBD-Aggregation ist dabei Nukleotid-unabhängig, sodass für diese *in vitro* Chaperonfunktion keine ATPase Aktivität von Hsp90 benötigt wird. Die erhöhten Absorptionswerte, z.B. bei der Inkubation von p53 DBD mit der Hsp90 Mitteldomäne und die nach vorne verschobene *lag-Phase*, sind Anzeichen einer Interaktion zwischen den Proteinen, die zu einer Co-Aggregation führen. Die Eigenschaft des Konstruktes Hsp90M_{short}C_{short} die Aggregation zu unterdrücken, wenn auch bei sehr hohen Konzentrationen, kann hier nicht vollständig geklärt werden. Zu beachten ist zudem die Abhängigkeit der Lichtstreuung von der Teilchengröße, so dass vielleicht die Aggregate hier nicht detektiert werden, da sie nicht genügend Licht streuen.

3.6.2 Interaktionseigenschaften von Hsp90 mit p53

Um die Bindung von Hsp90 mit p53 nicht nur qualitativ durch den Chaperonassay beschreiben zu können, sondern um auch Aussagen über die Bindestärke der Interaktion zwischen Hsp90 und p53 treffen zu können, wurde Hsp90 (oder die entsprechenden Konstrukte) FITC-markiert und die Änderung der Fluoreszenz durch die Bindung von p53 gemessen. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur, bei der sowohl Hsp90 als auch p53 in der nativen Konformation vorliegen (**Abb. 3-3 und 3-40**). Über die Änderung der Fluoreszenz von Hsp90 nach der Titration mit p53 (**Abb. 3-28 a**) wurde mit einem einfachen Bindemodell, bei dem je eine Bindestelle pro Hsp90 Protomer gleich gut besetzt werden kann, eine apparente Bindestärke ermittelt (app. K_D). Dieses Bindemodell kann auf die Interaktion fast aller Konstrukte sehr gut angewandt werden (**Abb. 3-28 b**), nur bei der Interaktion von Hsp90 Wildtyp mit p53 Volllänge beschreibt das Modell die Daten schlechter, was auf eine mögliche sterische Hinderung bei der Bindung des tetrameren p53 zurückzuführen ist.

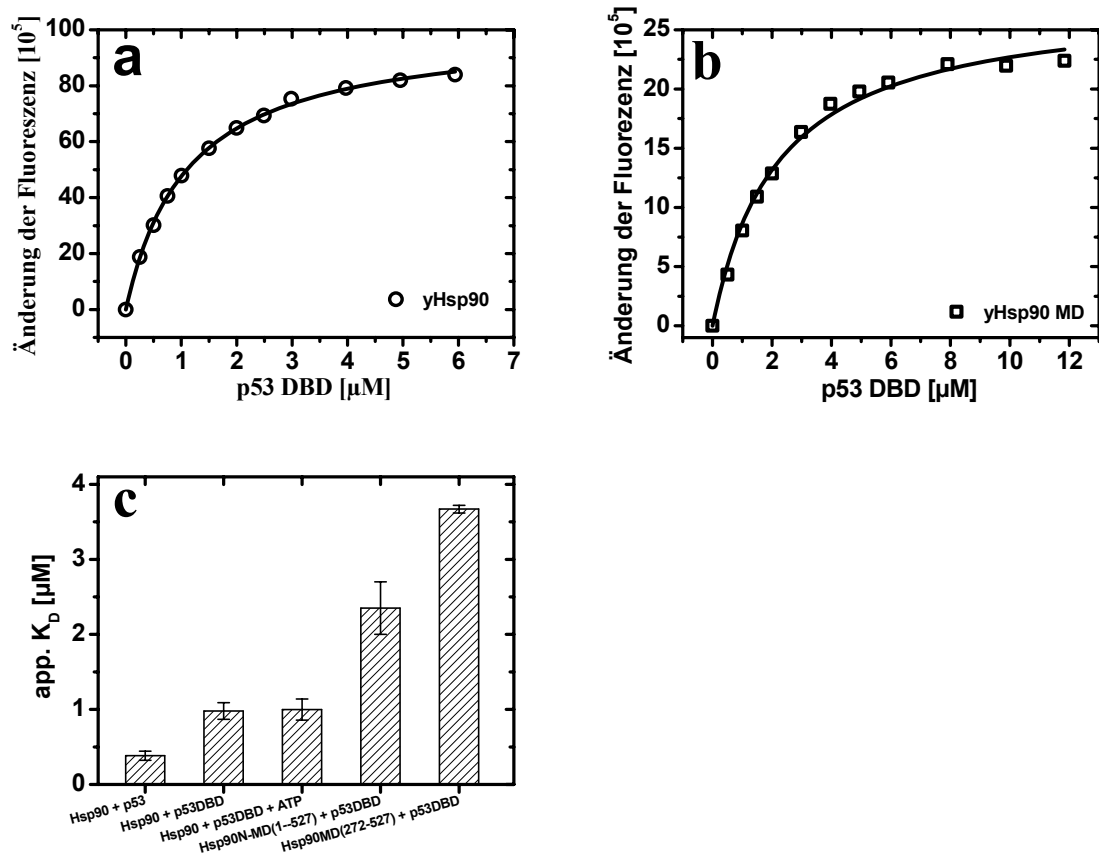


Abbildung 3-28: Fluoreszenz-Titrationsexperimente zur Bestimmung der Affinität der Bindung zwischen Hsp90 und p53

A - B, Beispiele der gemessenen Fluoreszenz-Quenching Experimente zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante $app\ K_D$ für die Bindung von p53 an Hsp90. Für die Messungen wurde die FITC-markierten Hsp90 Varianten für 20 min in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 25 mM KCl bei 15 °C vorinkubiert (bleaching) und mit p53 DBD (in 50 mM KPP (7.5), 50 mM KCl) alle 40 - 70 sek titriert ($\lambda_{em} = 494\text{ nm}$, $\lambda_{ex} = 515\text{ nm}$). **A**, 1 μM FITC-markiertes Hsp90 wurde mit verschiedenen Konzentrationen der p53 DBD titriert und die Änderung der Fluoreszenz nach Einstellung des Gleichgewichts gemessen. Die Daten wurden nach einem einfachen Bindemodell (1:1) ausgewertet. **B**, gemessene Fluoreszenzänderung zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante für die Interaktion von FITC-markierter Hsp90 Mitteldomäne mit p53 DBD. **C**, Vergleich der $app. K_D$ Werte von verschiedenen Hsp90 Varianten mit verschiedenen p53 Varianten. Hsp90N-ND, Aminosäure 1 – 527 (Delta-Linker), Hsp90MD, Aminosäure 272 – 527. Fehler sind die Standardabweichungen.

Die apparenten Affinitäten der einzelnen Hsp90 Fragmente (**Abb. 3-28 c**) verstärken die durch die Chaperonassays aufgestellte Vermutung, dass das Zusammenspiel aller drei Domänen in der Volllänge von Hsp90 bei der Wechselwirkung mit p53 wichtig ist. Die hauptsächliche Interaktionsfläche ist in der Hsp90 Mitteldomäne lokalisiert, wobei aber die Interaktionsfläche einen Bereich in der N-terminalen sowie in der C-terminalen Domäne einschließt. Die Interaktion der nativen Proteine liegt in höheren nanomolaren Bereich ($\approx 300\text{ nM}$) und macht eine alleinige Interaktion beider Proteine in der Zelle unter Normalbedingungen unwahrscheinlich, bedenkt man die subnanomolare Konzentration

und die hohe *turnover* Rate von p53. Es könnten also weitere Erkennungsereignisse in der Zelle geben, wie die Übertragung aus dem Hsp70/Hsp40 Zyklus, oder die Regulation von Hsp90 durch seine Co-Chaperone, die die Affinität von Hsp90 zu seinen Substraten verändern könnte. Weiterhin könnte die Interaktion beider Proteine erst unter Stressbedingungen mit erhöhtem p53 Expressionlevel relevant werden.

3.6.3 *Der Einfluss der Co-Chaperone auf die Substraterkennung von Hsp90*

Um zu testen, ob die Co-Chaperone Aha1 oder Sti1 einen Einfluss auf die Substraterkennung von Hsp90 haben, wurde die Bindung der Hsp90 Mitteldomäne mit p53 DBD unter Anwesenheit von Aha1 und Sti1 über Fluoreszenz-Titrationsexperimente untersucht (**Abb. 3-29**). Aha1 zeigte in diesen Experimenten keinen Einfluss auf die Bindeeigenschaft der Hsp90MD (**Abb. 3-29 a und b**). Die Affinität zu p53 DBD blieb unverändert bei $\approx 3 \mu\text{M}$. In Anwesenheit von Sti1 hingegen, wurde ein komplett anderes Verhalten beobachtet (**Abb. 3-29 c**). Die Zugabe der p53 DBD scheint Sti1 zu verdrängen, wobei die Bindung von Sti1 und p53 DBD an Hsp90MD kompetitiv ist. Die Affinität von Hsp90MD zu p53 DBD in Anwesenheit von Sti1 verschlechtert sich um mehr als das 4-fache.

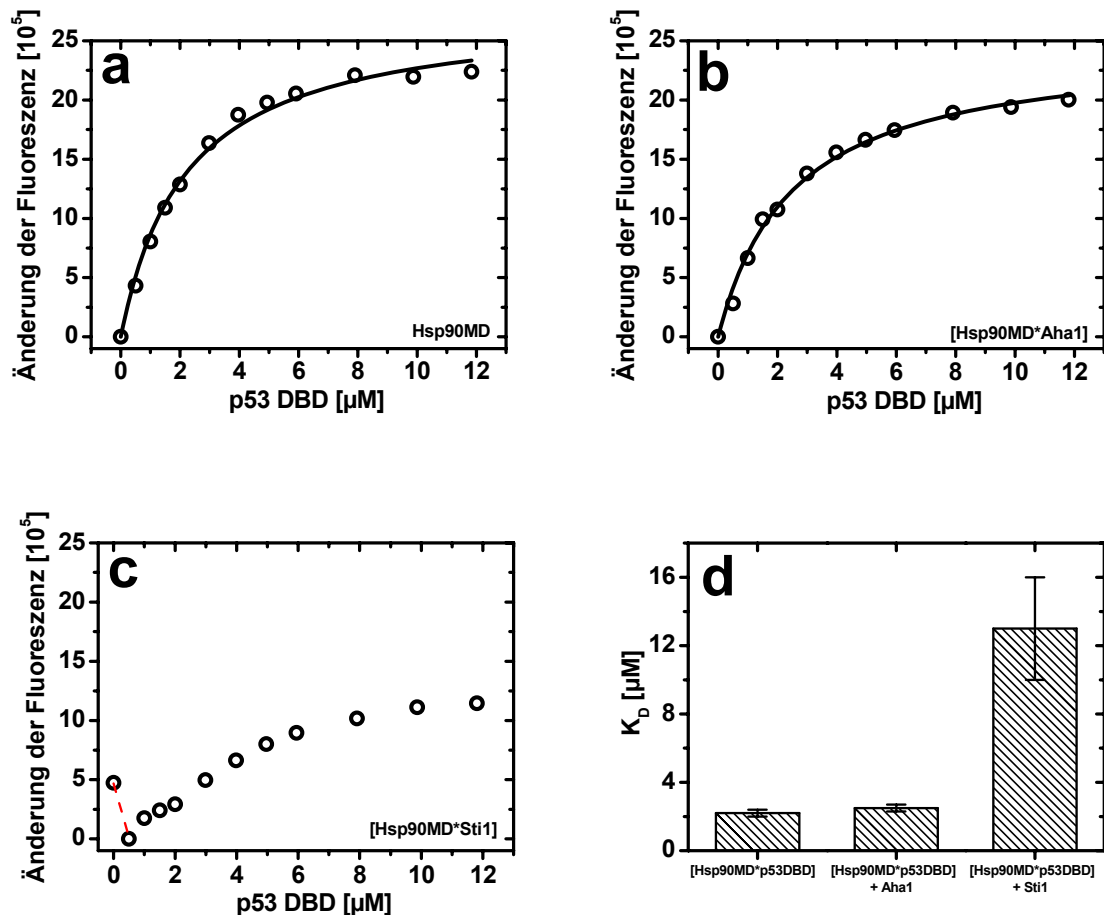


Abbildung 3-29: Fluoreszenz-Titrationsexperimente zur Charakterisierung des Einflusses der Co-Chaperone Aha1 und Sti1 auf die Interaktion zwischen Hsp90MD und p53DBD

A, Fluoreszenz-Quenching von $1 \mu\text{M}$ FITC-markierter Hsp90-MD bei der Titration von p53 DBD (vgl. Abb. 3-28). B - C, $1 \mu\text{M}$ FITC-markierter Hsp90-MD wurden vor der Titration mit p53 DBD mit $5 \mu\text{M}$ Aha1 (B) oder $5 \mu\text{M}$ Sti1 (C) für 10 min bei 15°C in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 25 mM KCl vorinkubiert. Die Auswertung erfolgte näherungsweise mit einem einfachen Bindemodell (1:1). D, Einfluss der Co-Chaperone auf den app. K_D Wert der Interaktion von Hsp90MD mit p53 DBD. Angabe der Werte mit der Standardabweichung.

Auf Grund dieser Experimente ist eine gleichzeitige Bindung von Aha1 und p53 an Hsp90 wahrscheinlich. Wie weiter unten noch genau beschrieben wird, könnte dieses durchaus mechanistische Gründe haben. Die Bindung von Sti1 und p53 an Hsp90 hingegen sollten sich nach diesen Experimenten gegenseitig ausschließen. Die Bindeflächen von Sti1 und p53 müssten demnach auf der Hsp90 Mitteldomäne überlappen.

3.6.4 Die Substraterkennung von Hsp90 ist nukleotid-unabhängig

Die ATPase Funktion von Hsp90 ist essentiell für die Lebensfähigkeit von Hefen (Prodromou et al., 1997; Obermann et al., 1998). Wie in **Abb. 3-28 c** schon gezeigt, konnte kein Unterschied in der *in vitro* Substraterkennung von Hsp90 in Abwesenheit oder Anwesenheit von ATP festgestellt werden. Eine erweiterte Untersuchung zeigte zudem, dass auch die Anwesenheit anderer Nukleotide wie ATP γ S oder dem Hsp90 Inhibitor Radicol die Affinität von Hsp90 zu p53 DBD nicht wesentlich beeinflussen (**Abb 3-30 a**). Die Interaktion von p53 mit Hsp90 sollte demnach nicht signifikant von der Konformation von Hsp90 abhängen. Auch zeigte sich in den Chaperonassays mit thermisch induzierter Aggregation von p53 kein Einfluss von Nukleotiden auf die Chaperoneigenschaft von Hsp90. Um zu testen, ob die Anwesenheit von p53 einen Einfluss auf den ATPase Zyklus von Hsp90 ausübt, wurde der regenerative ATPase Assay zur Bestimmung der Hsp90 ATP-Hydrolyse in Abwesenheit und Anwesenheit von p53 DBD durchgeführt (**Abb. 3-30 b**). Hierbei konnte kein Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit festgestellt werden. Unerwarteterweise zeigte die Anwesenheit von p53 DBD im ATPase Assay auch keinen Einfluss auf die aktivierende Wirkung von Aha1 oder die Inhibierung durch Sti1 (**Abb. 3-30 b**).

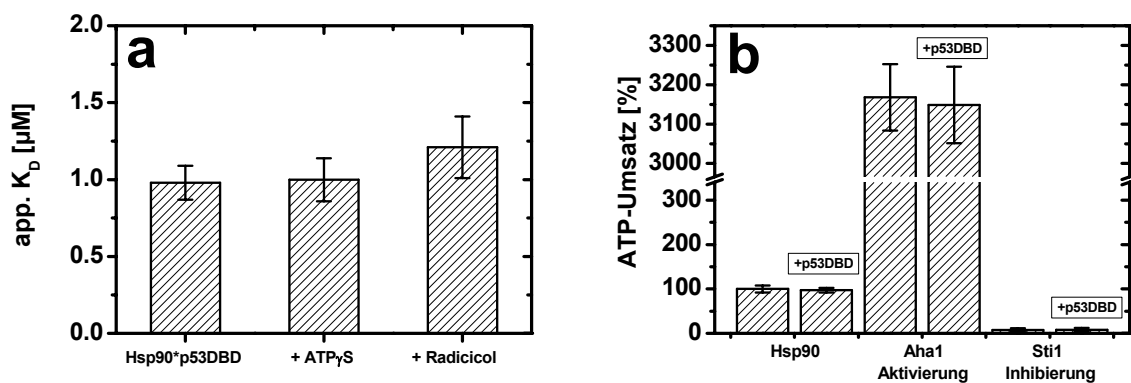


Abbildung 3-30: Die Wechselwirkung von p53 DBD mit dem Hsp90 ATPase Zyklus

A, Einfluss des Nukleotids ATP γ S und des Hsp90 Inhibitors Radicol auf die Affinität von FITC-markiertem Hsp90 zu p53 DBD. Versuch wurde nach **Abb. 3-28 a** durchgeführt unter der Anwesenheit von ATP γ S (300 μ M) und Radicol (100 μ M). **B**, Einfluss von p53 DBD (25 μ M) auf die ATPase Aktivität von Hsp90 (2.5 μ M) und den stimulierenden Effekt von Aha1 (5 μ M) sowie den inhibierenden Effekt von Sti1 (5 μ M). Der ATPase Assay wurde wie in Kapitel 2.11.1 beschrieben durchgeführt.

Dafür, dass p53 keinen Einfluss auf die Hsp90 ATPase Aktivität zeigt, könnte es mehrere Gründe geben. Die Affinität von p53 an Hsp90 unter den Bedingungen des ATPase Assays (erhöhte Salzkonzentration, Mg²⁺, Nukleotid) könnte zu gering sein, um einen Einfluss zu zeigen. Weiterhin sind die Affinitäten der Co-Chaperone zur Hsp90 Volllänge wesentlich

stärker, als zur Mitteldomäne alleine, was eine komplette Verdrängung von p53 DBD erklären könnte. Ein andere, mechanistische Erklärung wäre, dass Sti1 Hsp90 in eine Konformation zwingt, die nicht p53 binde-kompetent und nicht durch p53 verdrängt werden kann und dass Aha1 ebenfalls zu Konformationsänderung in Hsp90 führt, die die Freisetzung von p53 stark bevorzugt, und der Effekt von p53 unter diesen Bedingungen nicht detektiert werden kann.

3.6.5 Die induzierte Dissoziation des Chaperon-Substrat-Komplexes durch DNA

Wenn anscheinend die Dissoziation des Hsp90*p53 Komplexes nicht durch die Umsetzung von ATP induziert wird, ergibt sich die Frage, welches Signal in der Zelle die Auflösung des Chaperon-Substrat Komplexes bestimmt. Für die Glucocorticoid-Rezeptoren, ist bekannt, dass Hsp90 die Hormonrezeptoren in einem aktiven Zustand fixiert, bis die Rezeptoren das entsprechende Hormon binden, was eine Dissoziation des Hsp90-Hormonrezeptor Komplexes induziert (Pratt & Toft, 1997). Mit Hilfe der Fluoreszenz-Titrationsexperimenten konnte ein ähnliches Verhalten für die induzierte Dissoziation des Hsp90*p53 Komplexes durch p53 Konsensus-DNA gezeigt werden (**Abb. 3-31 a**). Hier wurde zuerst der Komplex aus FITC-markiertem Hsp90 und p53 vorgeformt, was durch Quenching der Fluoreszenz angezeigt wird. Wird zu diesem Komplex eine doppelsträngige p53-Erkennungssequenz (p21-DNA) zugegeben, dissoziiert der Hsp90*p53 Komplex innerhalb von Sekunden und die ungequenchte FITC-Hsp90 Fluoreszenz erscheint wieder. Der gleiche Effekt ist zu beobachten, wenn der Komplex aus Hsp90 und der p53 DBD vorgeformt wird, um dann ebenfalls die Dissoziation durch die Zugabe von p21-DNA zu induzieren (**Abb. 3-31 b**).

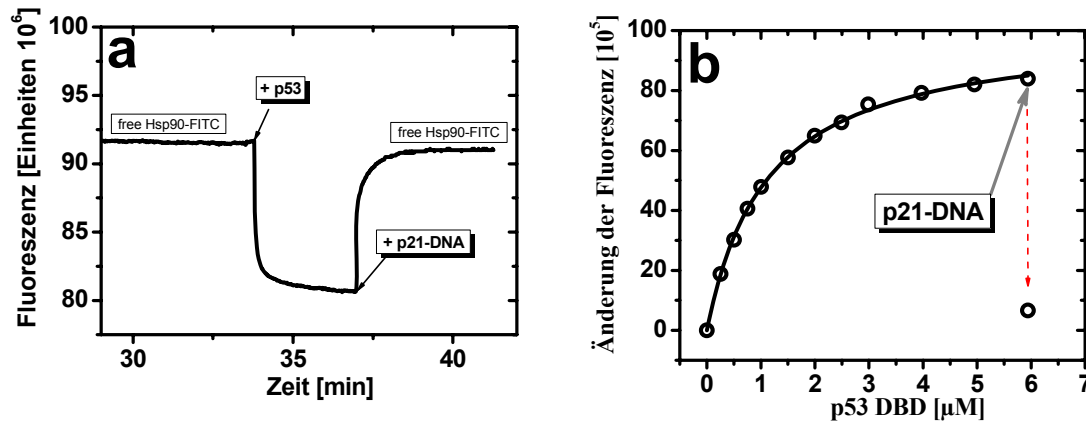


Abbildung 3-31: Substratprozessierung von Hsp90

A, Dissoziation des Hsp90*p53 Komplexes durch Zugabe der p53 konsensus DNA-Sequenz. 1 μM FITC-markiertes Hsp90 wurde in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 20 mM KCl bei 15 °C für 30 min *bleached* und die Änderung der Fluoreszenz durch Zugabe von 1 μM p53 detektiert. Nach Erreichen einer Basislinie wurden 2 μM p21-ds-DNA (p53 Consensus-DNA) zugegeben und die Zunahme der Fluoreszenz detektiert ($\lambda_{\text{em}} = 494$ nm, $\lambda_{\text{ex}} = 515$ nm). **B**, Dissoziation des Hsp90*p53 DBD Komplexes (gl. Abb. 3-28) nach Zugabe von 5 μM p21-ds-DNA. Aufgetragen ist die normierte Änderung der Fluoreszenz von FITC-markiertem Hsp90. Die Messung wurde in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 20 mM KCl bei 15 °C durchgeführt.

Die Dissoziation des Hsp90-p53 Komplexes durch DNA verdeutlicht die Funktion von Hsp90 gegenüber Substraten. Hsp90 bindet Substrate, um sie zu stabilisieren. Die Bindung wird erst durch die Anwesenheit von Co-Faktoren der Substrate wie Hormone oder DNA aufgelöst. Hsp90 hält dabei die meist metastabilen Substrate so lange in einer aktiven Form, bis sie ihre eigentlichen Aufgaben übernehmen können. Hsp90 agiert also eher als „holdase“ denn als „foldase“. Hier wird der Komplex durch die Anwesenheit von DNA dissoziiert, wobei die Bindung von DNA die DNA-Bindedomäne von p53 thermodynamisch stabilisiert (Bullock et al., 1997). Die Dissoziation erfolgt auf Grund der um ca.100fach stärkeren Affinität von p53 zur DNA im Vergleich zur Affinität zu Hsp90 innerhalb von Sekunden (vgl. Abb. 3-42). Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass die Ausbildung eines ternären Komplexes aus Hsp90, p53 und DNA nicht möglich ist. Daraus lässt sich schließen, dass entweder die DNA eine Konformation in p53 induziert, die Hsp90 binde-inkompetent ist, oder, was wahrscheinlicher ist, die Bindeflächen der DNA und von Hsp90 auf der p53 DBD überlappen.

3.6.6 Bestimmung der Interaktionsfläche zwischen Hsp90MD und p53 DBD

Um eine residuale Auflösung der Interaktion von Hsp90 und p53 zu erhalten, wurden NMR basierte Bindungsstudien mit individuellen Domänen von Hsp90 und der p53 DBD durchgeführt. Dazu wurde einmal das Assignment von p53 DBD (Wong et al., 1999), sowie das in **Abb. 3-6** beschriebene Assignment der Hsp90 MD verwendet. Um die Interaktionsfläche auf der Hsp90 Seite zu identifizieren, wurde zu der ^{15}N , ^2H -markierten Hsp90 Mitteldomäne die p53 DBD titriert und die chemische Verschiebung der einzelnen Aminosäurereste im ^{15}N TROSY-Spektrum analysiert (**Abb. 3-32 a und b**). Um die Bindung auf der p53 Seite zu charakterisieren, wurde zu einer ^{15}N -markierten p53 DBD Probe die Hsp90MD titriert und ebenfalls die Reste identifiziert, die eine signifikante chemische Verschiebung aufwiesen (**Abb. 3-32 c und d**). Werden diese Reste auf die Kristallstrukturen der Hsp90 Mitteldomäne (**Abb. 3-32 e**) oder der Struktur der p53 DBD (**Abb. 3-32 f**) übertragen, wird die Interaktionsfläche der beiden Proteine deutlich.

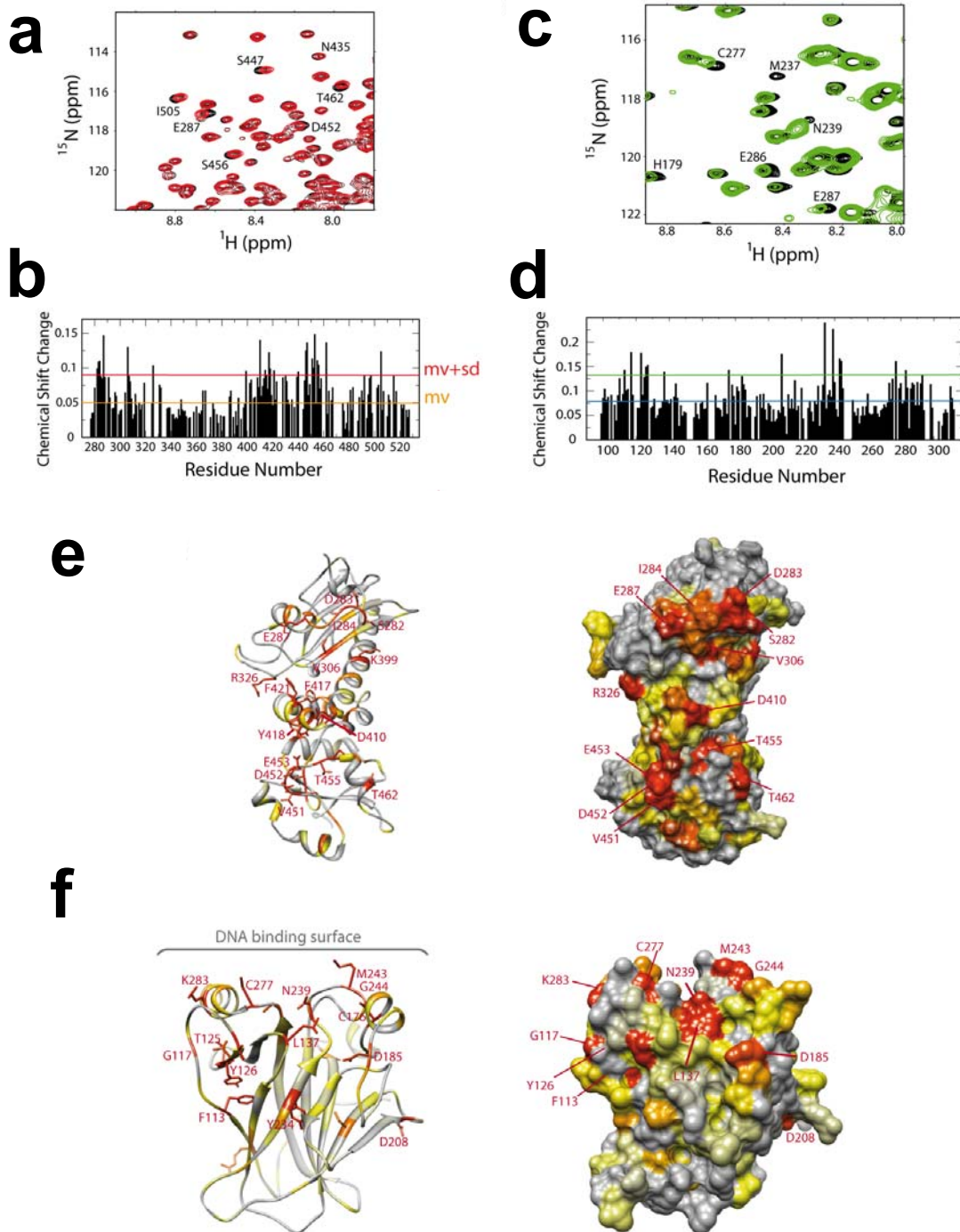


Abbildung 3-32: Bestimmung der Interaktionsfläche zwischen Hsp90MD und p53 DBD

A – B, signifikante chemische Verschiebungen der Hsp90 Mitteldomäne bei der Titration der p53 DBD gezeigt für signifikante Reste im ^{15}N TROSY-Spektrum (A) und eine Auflistung die chemischen Verschiebung aller Reste der Hsp90MD (B). Markiert ist der Mittelwert (mv) und der Mittelwert plus einer Standardabweichung (mv+sd). **C – D**, chemische Verschiebung der p53 DBD bei der Titration der Hsp90MD gezeigt im ^{15}N TROSY-Spektrum (C) und für alle Reste (D). **E**, Rückgrat- und Oberflächendarstellung der Hsp90 Mitteldomäne (pdb: 1hk7) mit Markierung der Reste, die bei der Bindung von p53 DBD signifikante chemische Verschiebungen zeigen (Reste 282-287, 306-307, 451-456, rot = starke, gelb = schwache chemische Verschiebung). **F**, Rückgrat- und Oberflächendarstellung der p53 DBD (pdb: 2fej) mit Markierung der Reste, die bei der Bindung von Hsp90MD signifikante chemische Verschiebungen zeigen. Bei der Bindung von p53 DBD an Hsp90MD zeigen die gleichen Reste eine Verschiebung, die auch bei der Bindung der DNA an p53 DBD beteiligt sind. Die Messungen wurden von Franz Hagn durchgeführt.

Auf der Hsp90 Seite befinden sich die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren alle auf einer Seite des Proteins. Die Oberflächendarstellung zeigt eine große Interaktionsfläche an, die sich über die gesamte Hsp90 Mitteldomäne erstreckt und eine Bindefläche mit mehr als 2200 Å aufweist. Die Bindefläche von p53 DBD lokalisiert genau in dem Bereich, der für die DNA Bindung verantwortlich ist. Die Überlappung der DNA-Bindefläche und der Interaktionsfläche von Hsp90 auf der p53 DBD passt zu der in Anwesenheit von p21-DNA induzierten Dissoziation des Hsp90*p53 Komplexes.

3.6.7 Die Interaktionsfläche der Co-Chaperone Aha1 und Sti1 mit der Hsp90MD

Um eventuelle Bindefläche von Aha1 oder Sti1 auf der Hsp90 Mitteldomäne zu identifizieren, wurde zu der ¹⁵N, ²H-markierten Hsp90MD jeweils ein Überschuss von Aha1 (**Abb. 3-33 a**) oder von Sti1 (**Abb. 3-33 b**) titriert. Hier zeigte die Interaktion von Aha1 mit Hsp90MD starke chemische Verschiebungen, die vergleichbar mit den Resten waren, die in der Kristallstruktur von der N-terminalen Domäne von Aha1 mit der Hsp90 Mitteldomäne identifiziert worden waren (pdb: 1usu). Die Interaktion von Sti1 mit Hsp90MD hingegen zeigte weniger starke chemische Verschiebungen. Wenn die chemischen Verschiebungen nach der Zugabe der Co-Chaperone auf die Hsp90 Mitteldomäne übertragen werden, sieht man für Aha1 (**Abb. 3-33 c**), dass die Interaktionsfläche von Aha1 der von p53 DBD genau gegenüberliegt. Für Sti1 hingegen sind die an der Bindung beteiligten Reste teilweise auf der gleichen Seite wie bei der Bindung von p53 DBD (**Abb. 3-33 d**).

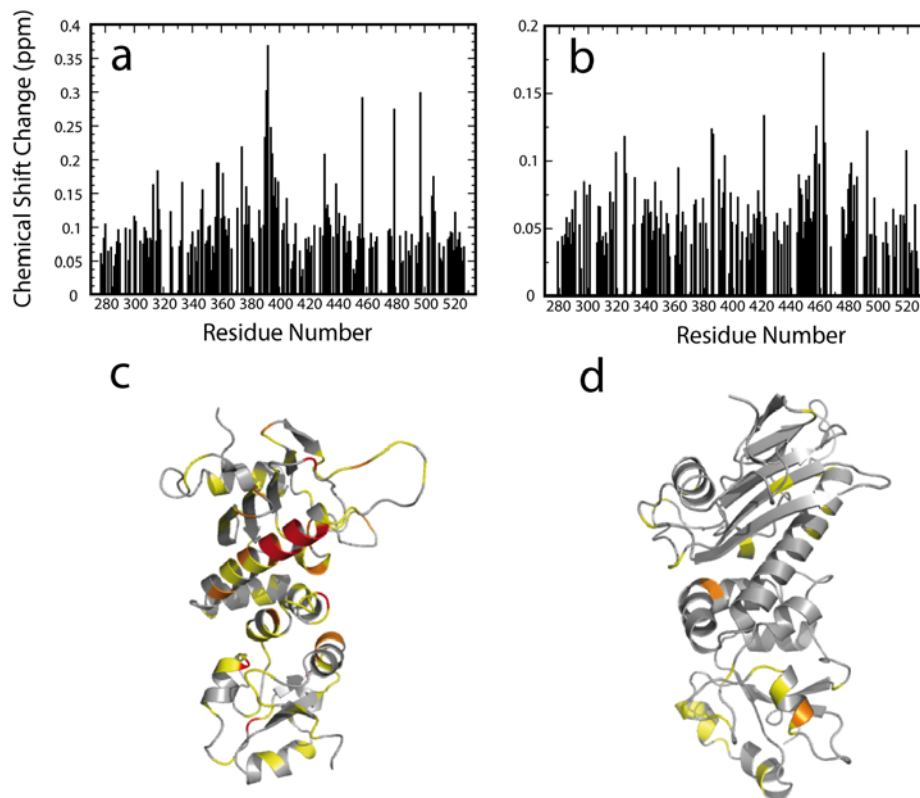


Abbildung 3-33: Chemische Verschiebungen der Hsp90 Mitteldomäne nach der Zugabe von Co-Chaperonen

A – B, Auflistung der Reste, die eine chemische Verschiebung der Hsp90MD nach Zugabe eines doppelten Überschuss von Aha1 (**A**) oder Sti1 (**B**) zeigten. **C – D**, Übertragung der Reste, die bei der Bindung von Aha1 (**C**) und Sti1 (**D**) auf die Protein-Rückgrat Repräsentation der Hsp90 Mitteldomäne. Der Farbcode zeigt eine chemische Verschiebung über den Mittelwert (gelb) oder über den Mittelwert plus der Standardabweichung (orange) oder plus 2-mal der Standardabweichung (rot) an. Die chemischen Verschiebungen von Aha1 liegen auf der gegenüberliegenden Seite der p53 DBD Bindung. Die Messungen wurden von Franz Hagn durchgeführt.

Die Lokalisierung der Bindestellen für Aha1 und Sti1 auf der Hsp90 Mitteldomäne bestätigt die in den Fluoreszenz-Titrationsexperimenten charakterisierte Eigenschaft für Aha1 gleichzeitig an die Hsp90MD binden zu können und erklärt die kompetitive Eigenschaft von Sti1, da hier die Interaktionsfläche mit p53 DBD überlappt. Alle weiteren getesteten Co-Chaperone wie Sba1/p23, Cpr6, Cpr7, Ppt5, FKBP52 und Cdc37 zeigten keine signifikante Interaktion mit der Hsp90 Mitteldomäne, auch nicht in Anwesenheit des Hsp90 C-terminalen Pentapeptids MEEVD.

3.6.8 Die Interaktionsfläche von p53 ist in der Hsp90 Familie konserviert

Die Interaktionsfläche von Hsp90 und p53 ist auf der „Außenseite“ des Hsp90 Dimers lokalisiert (**Abb. 3-34 a**). Dieser Bereich ist keiner signifikanten Konformationsänderung während des ATPase Zykluses unterworfen und erklärt die beobachtete, Nukleotid-

unabhängige Wechselwirkung mit p53. Es wird weiterhin deutlich, dass sich die Interaktionsfläche für p53 über einen großen Bereich des Hsp90 Protomers an dessen äußeren Fläche erstreckt. Vergleicht man die in der Interaktionsstudie von p53 mit yHsp90 identifizierten Reste, die an der Bindung beteiligt sind, in einem Alignment mit anderen Mitgliedern der Hsp90 Familie und überträgt diese Reste auf die Kristallstrukturen der Hsp90 Homologen, erkennt man, dass die Bindestelle für p53 in allen Hsp90 Homologen vom Prokaryonten bis zum Mensch mechanistisch konserviert sind (**Abb. 3-34 b**). Bei allen Hsp90 Homologen zeichnet sich eine Bindestelle an der äußeren Seite der Protomere ab, die sich über die ganze Mitteldomäne erstreckt. Zudem sind alle Aminosäure-Seitenketten fast ausschließlich an der Oberfläche des Moleküls exponiert. Daraus lässt sich vermuten, dass alle Hsp90 Homologen die gleiche Substraterkennung zumindest bezüglich p53 besitzen und dass die Unterschiede in der Affinität auf die Natur der einzelnen Aminosäure-Seitenketten zurückzuführen ist, vielleicht auch auf Unterschiede in den Konformationsgleichgewichten, die Interaktionsfläche als solche aber konserviert ist.

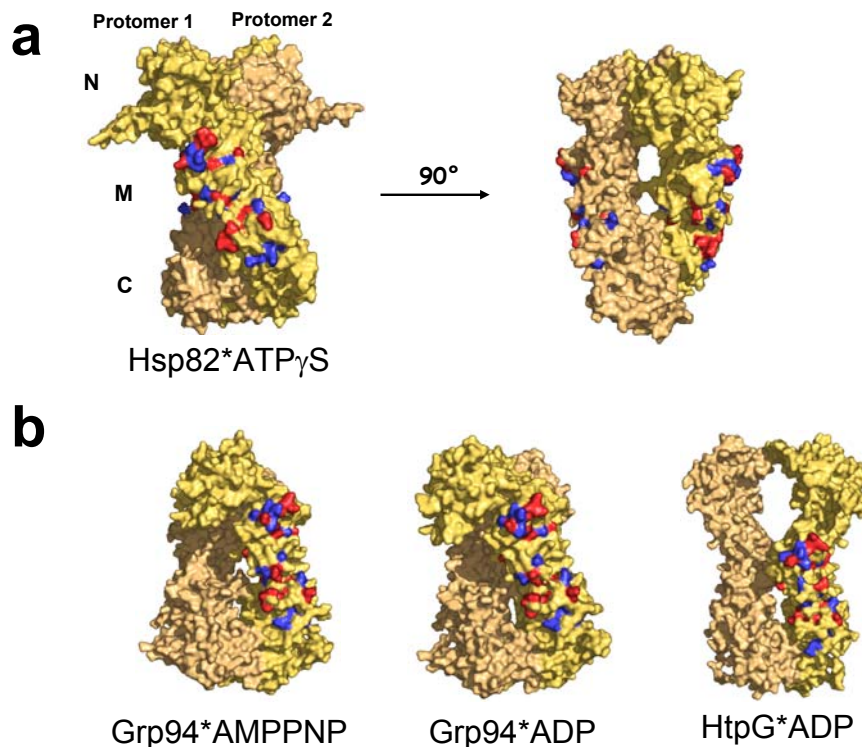


Abbildung 3-34: Die Interaktionsfläche für Substrate ist in der Hsp90 Familie konserviert

A, die Interaktion zwischen Hsp90MD und p53 DBD aus den NMR Experimenten übertragen auf die Vollängenstruktur von yHsp90 (pdb: 2cge). Markiert sind Reste die eine hohe chemische Verschiebung bei den Bindungsexperimenten zeigten (rot = starke shifts (über 0.1 ppm, blau = mittelstarke shifts (über 0.75 ppm)). **B**, Einfärbung der nach einem Alignment von yHsp90 mit Grp94 und HtpG korrespondierenden Reste, die für eine Bindung von p53 DBD verantwortlich sein könnten. Die Reste sind nicht konserviert, wohl aber die Lokalisierung and der Oberfläche des Hsp90 Dimers. Für das Homologiemodel wurde Grp94 im AMP-PNP gebundenen Zustand (pdb: 2o1u) und im ADP gebundenen Zustand (pdb: 2o1v), sowie HtpG im ADP-gebundenen Zustand (pdb: 2iop) verwendet. Die Einfärbung ist wie in A.

3.6.9 *Kreation individueller Hsp90 Punktmutanten zur Charakterisierung der Substratinkteraktion*

Um die Interaktionsfläche zwischen Hsp90 und p53 einerseits zu verifizieren und andererseits besser beschreiben zu können, wurden verschiedene Punktmutationen in Hsp90 eingeführt, die eine Änderung der Substratinteraktion von Hsp90 aufweisen sollten. Die einzelnen Reste wurden auf Grund der chemischen Verschiebung, der Konservierung in der Hsp90 Familie und der Lösungsmittelzugänglichkeit ausgewählt und sind in **Abb. 3-35 a** auf die geschlossene Struktur von yHsp90 übertragen worden. Zuerst wurden die gereinigten Hsp90 Mutanten in einem ATPase Assay auf ihre Aktivität untersucht (**Abb. 3-35 b**). Dabei war die ATPase Aktivität aller Hsp90 Mutanten in etwa vergleichbar. Die Einführung der Punktmutationen veränderte die Funktionalität der ATPase nicht wesentlich. Auch die Inhibierung der Hsp90 ATPase Aktivität durch Sti1 (**Abb. 3-35 c**) oder die Stimulierung durch Aha1 (**Abb. 3-35 c**) zeigt ein vergleichbare Bild der Punktmutanten und des Hsp90 Wildtyps. Eine Ausnahme bildet die Hsp90D503H Mutante, die ein etwas verändertes Verhalten zeigte. Zusammenfassend wird durch die Einführung der Punktmutationen die Aktivität von Hsp90 und die Interaktion mit den Co-Chaperonen Aha1 und Sti1 nicht wesentlich beeinflusst.

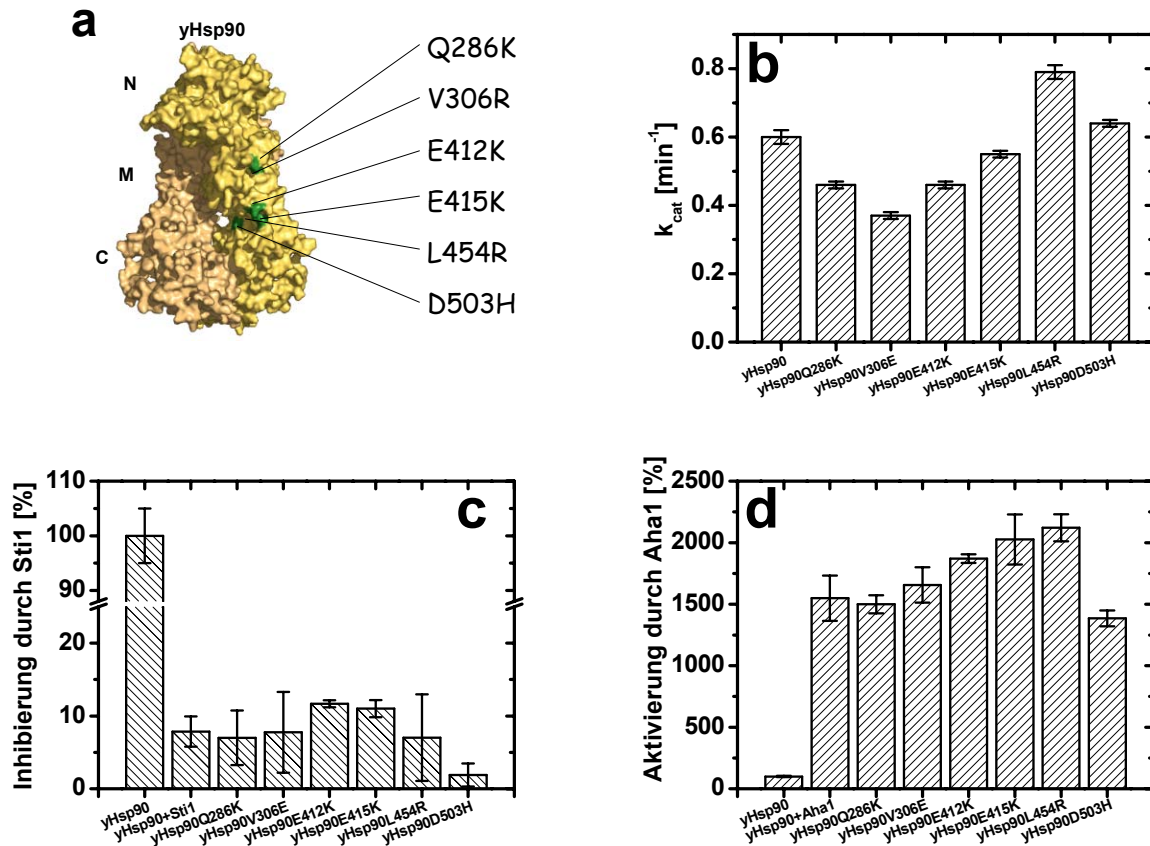


Abbildung 3-35: Charakterisierung von Hsp90 Substratbinde-Mutanten

A, Lokalisierung der Hsp90 Substrat-Bindemutanten kreiert auf Grundlage der chemischen Verschiebungen nach der Interaktion von Hsp90MD und p53 DBD. Gezeigt ist die geschlossene Kristallstruktur von yHsp90 (pdb: 2cge) und die Position der Reste, die jeweils einzeln mutiert wurden (in grün eingefärbt). **B**, steady state k_{cat} Werte von yHsp90 Wildtyp und Punktmutationen. ATPase Aktivität wurde bei 30 °C mit 2.5 μM ATPase in 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM ATP gemessen. **C**, inhibierender Effekt von Sti1 auf die ATPase Aktivität von Hsp90 Varianten. 2.5 μM Hsp90 Varianten wurden von Zugabe von ATP zum ATPase Assay mit 5 μM Sti1 für 10 min bei 30 °C inkubiert. Die individuellen ATPase Aktivitäten von Hsp90 Wildtyp und Mutanten wurden auf 100 % gesetzt, wie repräsentativ für yHsp90 Wildtyp gezeigt, und die Inhibition von Sti1 wurde auf diese Aktivität prozentual errechnet. **D**, stimulierender Einfluss von Aha1 auf die ATPase Aktivität von Hsp90 Varianten bei 30 °C. Gezeigt ist die prozentuale Aktivierung von 10 μM Aha1, inkubiert für 10 min bei 30 °C mit 2.5 μM Hsp90 Varianten. Die individuellen Aktivitäten für die Hsp90 Varianten in Abwesenheit von Aha1 wurden auf 100 % gesetzt, wie für den Hsp90 Wildtyp gezeigt. Alle ATPase Assay wurde durch Abstoppen mit 125 μM Radicol um die Hintergrund-ATPase-Aktivität korrigiert und in dreifacher Ausföhrung gemessen.

3.6.10 Der Einfluss der Punktmutationen von Hsp90 auf die Substraterkennung

Da die Punktmutanten auf Grundlage der Interaktionsstudie zwischen Hsp90 und p53 kreiert worden sind, wurde mittels der Fluoreszenz-Titrationsexperimente getestet, ob die Punktmutanten von Hsp90 eine veränderte Affinität zu p53 DBD aufweisen. Dazu wurden die Hsp90 Mutanten FITC-markiert und die Änderung der Fluoreszenz nach Zugabe von

p53 DBD gemessen (s.h. **Abb. 3-29**). Hier zeigte sich, dass vor allem die Hsp90Q286K und Hsp90D503H und weniger stark Hsp90V306R eine erhöhte Bindeaffinität zu p53 DBD aufweisen, wobei die Hsp90D503H die stärkste Affinität (app. $K_D \approx 0.5 \mu\text{M}$) besitzt. Alle anderen Mutationen zeigen keine veränderte Bindestärke (**Abb. 3-36**)

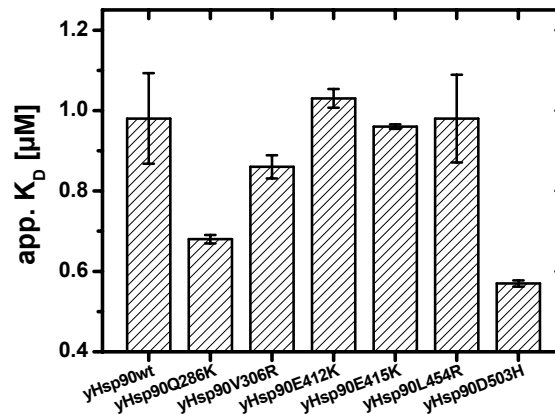


Abbildung 3-36: Charakterisierung der Hsp90 Varianten im Komplex mit p53 DBD

Vergleich der apparenten Bindungskonstanten (K_D Werte) von verschiedenen Hsp90 Varianten bei der Bindung von p53 DBD. Dazu wurde die Hsp90 Varianten FITC-markiert und die Affinität zu p53 DBD wie in Abb. 3-28 beschrieben ermittelt. Angegeben sind die gefitteten K_D Werte inklusive der Standardabweichung.

Dass die Substraterkennung durch die Punktmutationen in Hsp90 nicht wesentlich verschlechtert werden, ist in Anbetracht der großen Interaktionsfläche, die bei der Interaktion zwischen den Proteinen eingenommen wird, nicht verwunderlich. Vielmehr unterstreicht dieses Ergebnis die Eigenschaft von Hsp90, eher mit einer großen Interaktionsfläche denn mit einzelnen spezifischen Resten mit dem Substrat zu interagieren. Auf der anderen Seite wird interessanterweise die Bindung zwischen Hsp90 und p53 durch die Einführung der Mutation D503H und Q286K in Hsp90 eher stärker als schwächer. Das könnte auf ein komplexes Gleichgewicht zwischen Substratbindung und Freisetzung hindeuten, um die Funktionalität beider Proteine optimal zu gewährleisten.

3.6.11 In vivo Analyse der Hsp90 Punktmutanten

Die Bindungsstudien und die daraus resultierenden Hsp90 Punktmutanten wurden aus der Interaktionsstudie von Hsp90 mit p53 kreiert. Ob diese Punktmutanten die essentielle Funktion von Hsp90 *in vivo* beeinflussen, wurde in einem *HSP/HSC*^{-/-} Deletionsstamm getestet, der mit Hsp90 Wildtyp oder den individuellen Hsp90 Mutanten transfiziert wurde. Alle getesteten Hsp90 Varianten unterstützen die Lebensfähigkeit der Hefezellen und zeigten einen vergleichbaren Temperatur-Phänotyp (**Abb. 3-37 a**). Somit ist die

Funktionalität der Hsp90 Mutanten im Allgemeinen nicht beeinflusst. Ob die Mutationen einen Einfluss auf die Hsp90 vermittelte Aktivierung der Src-Kinase haben, wurde ebenfalls *in vivo* durch die Einführung eines *V-SRC* enthaltenden Plasmids in die Hefezelle getestet (**Abb. 3-37 b und c**). Die Aktivität der v-Src ist strikt von der Hsp90 Funktionalität abhängig. Hier zeigte sich, dass vor allem die Hsp90Q286K, Hsp90V306R und Hsp90L454R Mutanten eine veränderte Aktivierung der Src-Kinase ausweisen. Eine auf 200 % erhöhte Aktivierung der v-Src konnte bei den Hsp90Q286K und Hsp90L454R Mutanten im Vergleich zum Hsp90 Wildtyp beobachtet werden. Die Hsp90V306R Mutante hingegen zeigte eine sehr stark verminderte Kinase-Aktivität.

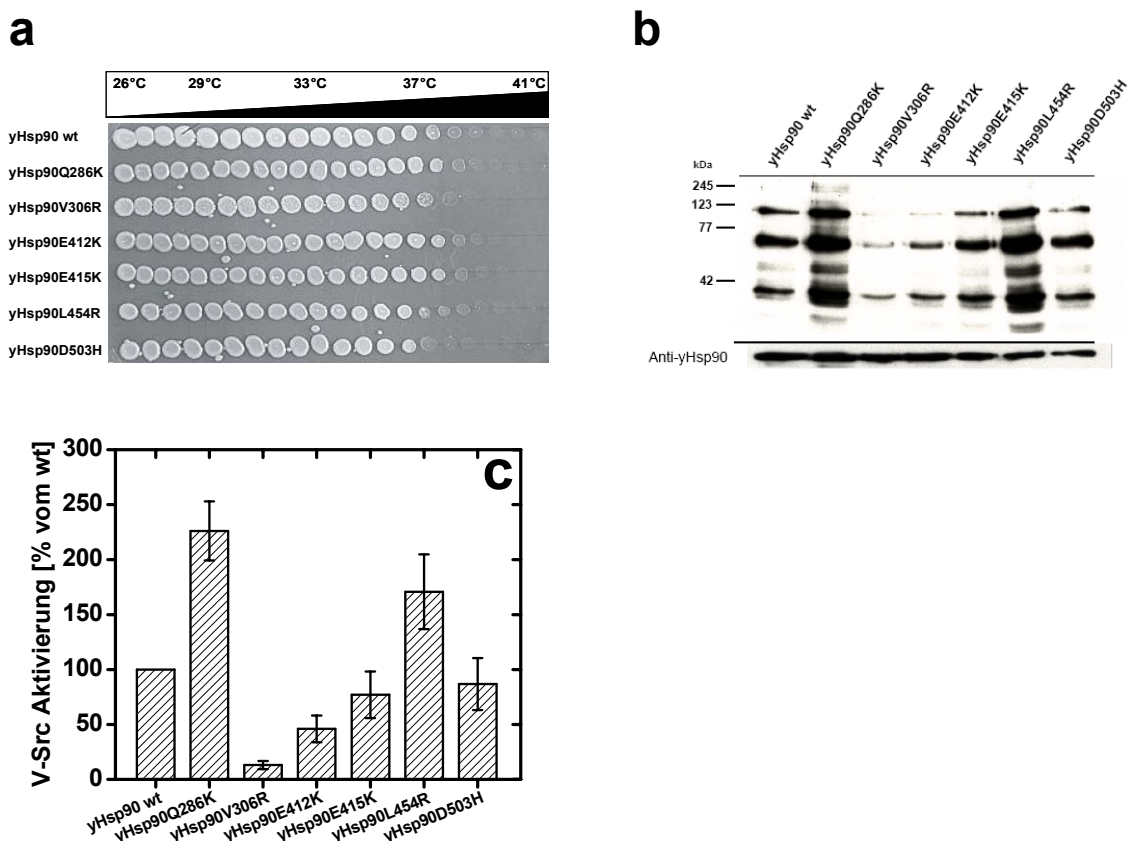


Abbildung 3-37: *In vivo* Charakterisierung der Hsp90 Punktmutanten und der vermittelten *in vivo* Aktivierung der v-Src Kinase

A, ein Hefe *HSC/HSP*^{-/-} Deletionsstamm, transfiziert mit Hefe Hsp90 Wildtyp oder Hsp90 Mutanten, wurde auf einen Temperatur-sensitiven Phänotyp getestet. 3 x 10⁵ Zellen wurden auf ein His⁻ drop out Medium plattiert und für 36 h nach Anlegen eines linearen Temperaturgradienten inkubiert. **B – C**, der *HSC/HSP*^{-/-} Deletionsstamm wurde mit einem *V-SRC* enthaltenden Plasmid co-transfiziert. Nach der Induktion der v-Src durch Mediumwechsel auf Galaktose für 6 h bei 30 °C, wurde die gesamte zelluläre Proteinmenge, die mit dem phospho-Tyrosin spezifischen Antikörper 4G10 reagiert, über einen Western Blot analysiert (**B**). Gleiche Beladung wurde per Coomassie Färbung kontrolliert. Die Expressionslevel für die Hsp90 Varianten wurden über ein Hefe Hsp90 spezifischen Antikörper nachgewiesen (**B**, untere Bande). **C**, densitometrische Analyse von vier individuellen Experimenten der Hsp90 vermittelten v-Src Aktivierung. Die Hsp90 Wildtyp Aktivität wurde für jedes Experiment auf 100 % gesetzt und mit den Hsp90 Mutanten verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die densitometrische Analyse wurde mit Hilfe des Programms ImageJ durchgeführt.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Substraterkennung und Prozessierung verschiedener Substrate wie p53 und der v-Src durch die Hsp90 Mitteldomäne reguliert wird, wenn auch offensichtlich in unterschiedlicher Weise. Zwar sind die essentiellen Hsp90 Funktionen durch die Punktmutationen nicht beeinflusst und alle transfizierten Hefezellen zeigen eine vergleichbare Lebensfähigkeit, aber die Hsp90 vermittelte Aktivierung der Src-Kinase unterscheidet sich bei den einzelnen Punktmutanten. Der größte Effekt konnte bei den Mutanten Hsp90Q286K und Hsp90V306R festgestellt werden. Diese befinden sich beide räumlich in der Nähe des Hsp90 loops (um Aminosäure 300), der als wichtig in der Aktivierung von Kinasen identifiziert wurde (Sato al., 2000). Darin scheint auch die Region um Leu-454 betroffen zu sein. Die unterschiedliche Auswirkung der Punktmutanten von Hsp90 auf die Bindung von p53 *in vitro* und die Aktivierung der Src-Kinase *in vivo* deuten auf mehrer Bindestellen in Hsp90 hin, die je nach Substrat variieren können. Gleichzeitig zeigt es aber auch, dass sowohl p53 als auch die Src-Kinase wesentlich mit der Hsp90 Mitteldomäne wechselwirken und die Hsp90 vermittelte Substrataktivierung durchaus durch die Bindung an die Mitteldomäne bestimmt wird.

3.6.12 *In vivo* Stimulierung der p53 Aktivität durch Hsp90

Um die Wechselwirkung der Hsp90 Punktmutanten mit p53 besser charakterisieren zu können, wurde ein *in vivo* Reporter-Assay von Julia Rohrberg entwickelt, der die Hsp90-abhängige Aktivität von p53 indirekt über die Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt. Nach der Induktion der Expression von p53 durch Kupfer, kann p53 abhängig von der Hsp90 Aktivität ein *response*-Element binden und so die Expression der β -Galaktosidase induzieren (**Abb. 3-38**). Diese β -Galaktosidase Aktivität ist der p53 Aktivität direkt proportional und hängt damit auch indirekt von der Hsp90 Aktivität ab. Hier zeigte sich, dass alle Hsp90 Varianten die Aktivität von p53 unterstützten, wenn auch in unterschiedlicher Weise.

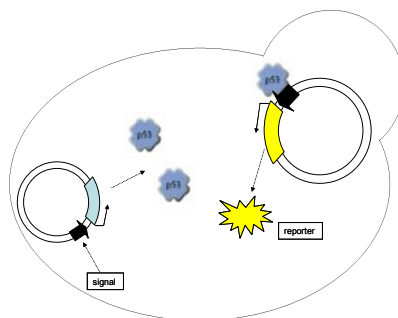


Abbildung 3-38: Prinzip des Hefe-Reporter-Assays zur Bestimmung der p53 Aktivität

Der β -Galaktosidase Assay ist direkt an die Aktivität von p53 und indirekt an die Hsp90 Aktivität gekoppelt. Die Messungen wurden von Julia Rohrberg entwickelt und durchgeführt. Adaptiert von Julia Rohrberg.

Es zeigt sich ein vergleichbares Bild, wie bei der *in vitro* Charakterisierung der Hsp90 Varianten in Bezug auf die Affinität zu p53. Wiederum zeigt sich, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure keine drastische Auswirkung auf die Hsp90-vermittelte Substrataktivierung zeigt und verdeutlicht die große Interaktionsfläche von Hsp90 mit seinen Substraten. Vergleicht man beide *in vivo* Substrat-Assays wird deutlich, dass die Hsp90 Mitteldomäne mindestens zwei unterschiedliche Funktionen gegenüber den Hsp90 Substraten einnimmt. Auch könnte es mehrere bevorzugte Bindestellen in Hsp90 für unterschiedliche Substrate geben.

3.6.13 Zusammenfassung: Die Substraterkennung von Hsp90 ist hauptsächlich von der Hsp90 Mitteldomäne abhängig, nukleotid-unabhängig und verschieden für unterschiedliche Substrate

Die Ergebnisse dieses Abschnitts zeigen, warum einer der größten Fragen von Hsp90, die nach der Substraterkennung und der Substratprozessierung, nur sehr unvollständig beantwortet ist. Die Komplexität der Substratbindung, die einerseits auf einer sehr großen Interaktionsfläche zwischen Hsp90 und seinem Substrat beruht, andererseits aber auch zwischen verschiedenen Substraten variieren kann, macht eine direkte Identifizierung der Substratbindestelle schwierig. Hier konnte die Interaktionsfläche der Hsp90 Mitteldomäne mit der DNA-Bindedomäne des Tumorsuppressors p53 in Lösung identifiziert und charakterisiert werden. Dabei überlappen die Bindestellen von Hsp90 und der DNA auf der p53 DNA-Bindedomäne und es wird angenommen, dass Hsp90 p53 so lange bindet und stabilisiert, bis p53 durch die Bindung an die DNA selbst thermodynamisch stabilisiert wird (Bullock et al., 1997) Die Bindung von Hsp90 und der DNA an p53 sind dabei kompetitiv und zeigen stark überlappende Interaktionsflächen. Auf der Hsp90 Seite

hingegen bindet die p53 DBD an dem äußeren Bereich der Mitteldomäne. So ergeben sich pro Hsp90 Dimer zwei p53 DBD Bindestellen. Die Interaktion mit der p53 Volllänge hingegen zeigt, dass vermutlich durch die sterische Hinderung ein einfaches Bindemodell mit 2 Substratbindestellen nicht mehr angewandt werden kann. Jedenfalls ist die Interaktionsfläche, die zwischen Hsp90 und p53 ausgebildet wird, mit 2200 Å sehr groß und überspannt weite Bereiche der Außenseite der Hsp90 Mitteldomäne. Das noch andere nicht identifizierte Bereich im Hsp90 Molekül für die Bindung von p53 notwendig sind, konnte nur qualitativ geklärt werden. Dass die Interaktion auf einer Fläche der Außenseite eines Hsp90 Protomers stattfindet, die von konformationellen Änderungen im ATPase Zyklus nahezu unberührt bleibt, wird auch durch die nukleotid-unabhängige Bindeaffinität von Hsp90 an p53 bestätigt. In jedem nukleotidgebundenen Zustand von Hsp0 war die Affinität zu p53 vergleichbar und die Anwesenheit von p53 zeigte keine Auswirkungen auf die Umsatzrate von ATP. Allerdings zeigten weitere Bindungsstudien von Hsp90MD mit den Co-Chaperonen Aha1 und Sti1, dass die Bindung von Aha1 und p53 DBD gleichzeitig stattfinden kann, die Bindungsstellen von Sti1 an die Hsp90 Mitteldomänen aber mit der Interaktionsfläche von p53 DBD teilweise überlappt.

Die Charakterisierung der Substratbindefläche auf der Hsp90MD wurde weiterhin durch die Einführung einzelnen Punktmutationen vorgenommen. Die kreierte Hsp90 Mutanten konnten alle essentiellen Funktion von Hsp90 in einem Hefe-Deletionsstamm übernehmen, zeigten aber unterschiedliche Stimulierungen der Aktivität der v-Src und p53 *in vivo*. Interessanterweise zeigten die Hsp90 Punktmutanten in den Assays auch unterschiedliche Effekte auf v-Src und p53. Daraus lässt sich schließen, dass der stimulierende Effekt von Hsp90 sowie die Substraterkennung stark von der Hsp90 Mitteldomäne dominiert werden und dass die Hsp90MD verschiedene Substrate wohl unterschiedlich erkennt und bindet. So könnte es mindestens zwei unterschiedliche Substratbindestellen in der Hsp90 Mitteldomäne geben. Durch die große Interaktionsfläche von Hsp90 mit seinen Substraten waren die Effekte der Punktmutation moderat, aber zeigten zudem, was mit der Annahme, dass für die Bindung die ganze Fläche auf der Mitteldomäne wichtig ist, im Einklang steht.

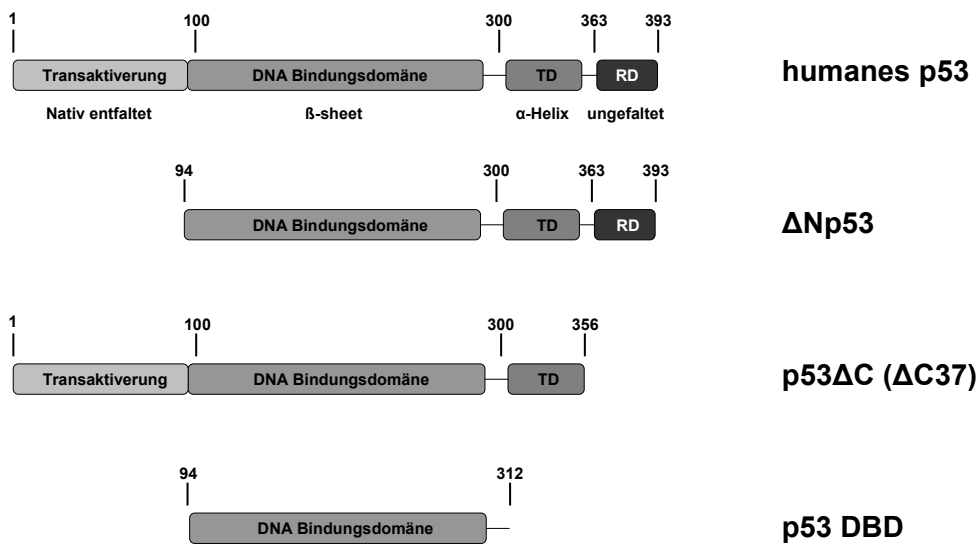
3.7 Die Domänenkommunikation im tetrameren p53

Der Tumorsuppressor p53 ist eines der am besten untersuchten Proteine. Seine Rolle als „Wächter des Genoms“ (Levine, 1997; Lane, 1992) und die Tatsache, dass in über 50 % der menschlichen Tumore p53 eine Mutation trägt, verdeutlicht die Stellung von p53 im Lebenszyklus der Zelle. Obwohl es an die 50.000 Publikationen über p53 gibt, ist das Protein überraschenderweise biochemisch nur in Ansätzen charakterisiert worden, nicht zuletzt wegen der metastabilen Struktur von p53. So beschränken sich die Veröffentlichungen hauptsächlich auf die Charakterisierung einzelner Domänen von p53, wie die DNA-Bindedomäne, wobei das Zusammenspiel der Domänen im Tetramer vernachlässigt wird. Diese Domänenkommunikation scheint zudem durch post-translationale Modifikationen beeinflusst zu werden.

3.7.1 Die Domänenstruktur von p53 und die Konservierung der Regulationsdomäne

Die Proteine der p53 Familie sind in höheren Eukaryonten zu finden und weisen eine hohe Homologie auf. Wenn auch durch alternative Splice-Varianten (Nikoshkov & Hurd, 2006; Bourdon et al., 2005; Rohaly et al., 2005) oder das Vorkommen von polymorphen Proteinen (Franeckova et al., 2007; Hiyama et al., 2008) die Eigenschaften von p53 variieren, so besitzen alle Mitglieder der p53 Familie die gleiche Domänenstruktur. Diese besteht aus einer nativ entfalteten N-terminalen Transaktivierungsdomäne, der DNA-Bindedomäne, einer α -helicalen Tetramerisierungsdomäne und einer C-terminalen, unstrukturierten Regulationsdomäne (**Abb. 3-39, a**). Es wurden neben dem *tag*-freien p53 Wildtyp auch p53 Mutanten rekombinant exprimiert, die verschiedenen Deletionen und Punktmutationen aufweisen (**Tabelle 15 a**). Die hohe Homologie der p53 Familie zeigt sich vor allem auch in der C-terminalen Regulationsdomäne (**Abb. 3-39, b**), die viele post-translationale Modifikationsmöglichkeiten aufweist, wobei die Phosphorylierung von Serin-392 die Aktivierung von p53 steuert (Nichols et al., 2002).

a



b

p53_HUMAN	RAHSSHLKSKKGGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD	(393)
p53_MACMU	RAHSSHLKSKKGGQSTSRHKKFMFKTEGPDSD	(393)
p53_BOVINE	RAHSSHLKSKKRPSPSCHKKPMLKREGPDSD	(386)
p53_SHEEP	RAHSSHLKSKKGPSPSCHKKPMLKREGPDSD	(382)
p53_PIG	RAHSSHLKSKKGGQSPSRHKKPMFKREGPDSD	(386)
p53_RABBIT	RAHSSYLKAKKGGQSTSRHKKPMFKREGPDSD	(391)
p53_RAT	RAHSSYPKTKKGGQSTSRHKKPMIKKVGPDSD	(391)
p53_MOUSE	RAHSSYLKTKKGGQSTSRHKKTMVKKVGPDSD	(390)
	***** : * : ** * . * *** * . * *****	

Abbildung 3-39: Schematischer Aufbau von p53

A, Domänenstruktur von humanem p53 mit der N-terminalen, nativ entfalteten Transaktivierungsdomäne, der hauptsächlich aus β -sheet Strukturelementen bestehende DNA-Bindedomäne (DBD) und der Tetramerisierungsdomäne (TD) bestehend aus einem α -Helix Bündel und der ungefalteten Regulationsdomäne (RD). Abgeleitet von der Domänenstruktur von p53 wurden die p53 Mutanten Δ Np53, p53 Δ C und die p53 DBD erzeugt. **B**, das Alignment der Regulationsdomäne von p53 in der p53 Familie zeigt eine sehr hohe Konservierung vor allem der post-translational modifizierbaren Aminosäuren, angezeigt durch *P* für Phosphorylierungsstellen und *Ac* für Acetylierungsstellen.

Abgeleitet von den letzten zehn Aminosäuren der humanen p53 Regulationsdomäne wurden Peptide synthetisiert, die zur Aufklärung der Rolle der Regulationsdomäne in der Domänenkommunikation im tetrameren p53 beitragen sollen (**Tabelle 15 b**). Dabei wurden diese Peptide unter anderem N-terminal FITC-markiert oder trugen eine spezifische Serin-Phosphorylierung.

Tabelle 15: Übersicht der p53 Mutanten und der von der p53 Regulationsdomänen abgeleiteten Peptide

a

Proteinname		Modifikation
p53	1 - 393	keine
p53R280E	1 - 393	DNA-Bindemutante
p53ΔC10	1 - 383	-
p53ΔC30	1 - 363	-
p53ΔC37	1 - 356	-
p53S392E	1 - 393	phosphomimetrische Mutation
p53S392R	1 - 393	Anti-phosphomimetrische Mutation
p53394C	1 - 394	Zusätzliche Cystein an Position 394
ΔNp53	94 - 393	
ΔNp53R280E	94 - 393	DNA-Bindemutante
ΔNp53ΔC10	94 - 383	
ΔNp53ΔC37	94 - 356	
ΔNp53S392E	94 - 393	phosphomimetrische Mutation
ΔNp53S392R	94 - 393	Anti-phosphomimetrische Mutation

b

Name	Peptidsequence	M _w [Da]	Modifikation
p53C10	MFKTEGPDS	1126.2	-
p53C10S(p)	MFKTEGPDS(p)D	1206.5	Phosphorylierung des Serines
p53C10SR	MFKTEGPDRD	1195.3	-
FITC-p53C10	FITC-MFKTEGPDS	1514.5	N-terminales FITC-label
FITC-p53C10S(p)	FITC-MFKTEGPDS(p)D	1594.8	N-terminales FITC-label, Phosphorylierung des Serine

A, alle rekombinant exprimierten p53 Mutanten, die in den folgenden Studien verwendet wurden. Angegeben sind die Bezeichnungen, die Aminosäure-Bereiche (bezogen auf humanes p53) und die intendierten Modifikationen. **B**, die von der humanen p53 Regulationsdomäne abgeleiteten Peptide, die in den Bindungsstudien mit p53 verwendet wurden, sowie die Modifikationen der Peptide. Die Phosphorylierung des Serins bei dem Peptids p53C10S(p) wurde bei der Synthese eingefügt. Diese Modifikation ist unter den gewählten Bedingungen für mindestens einen Tag stabil (Daten nicht gezeigt).

3.7.2 Beiträge der individuellen Domänen auf die Stabilität von p53

Die individuellen Domänen von p53 wurden in der Vergangenheit isoliert auf ihre Struktur und Stabilität untersucht (Sakaguchi et al., 1997; Davison et al., 2001; Dawson et al., 2003). Welchen Einfluss dabei die einzelnen Domänen auf die Eigenschaft von p53 ausüben, ist hingegen weitgehend unverstanden. Daher wurde die Struktur und Stabilität von p53 Mutanten untersucht, denen eine oder mehrere Domänen fehlten, um so indirekt den Einfluss der fehlenden Domäne über die Eigenschaft der p53 Deletionsmutante zu untersuchen. Die Sekundärstruktur-Analysen dieser p53 Mutanten sind in **Abb. 3-40 a-h** abgebildet und zeigen, dass die Stabilität der tetrameren p53 nur durch die DNA-Bindedomäne bestimmt wird. Alle p53 Mutanten weisen die gleiche Temperatur auf, bei der die thermisch induzierte Denaturierung der Proteine beginnt (≈ 40 °C). Die einzelnen p53 Domänen scheinen bei diesen Denaturierungskurven nur den Verlauf der Entfaltung

zu beeinflussen, nicht aber den Beginn der Entfaltung. Auffällig ist, dass die p53 Δ C Mutante einen anderen Verlauf der Denaturierung zeigt und sogar bei sehr hohen Temperaturen noch einen großen Anteil an Sekundärstruktur aufweist. Diese p53 Mutante aggregiert im Vergleich zu p53 Wildtyp auch bei hohen Temperaturen nicht (Daten nicht gezeigt). Dieselbe Eigenschaft wurde bei der p53R280E Punktmutanten festgestellt (**Abb. 3-40 i – k** und Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Einführung der Punktmutation an Position 280 den gleichen Effekt auf die Denaturierung von p53 hat, wie die Deletion der ganzen Regulationsdomäne, was auf eine Interaktion der Regulationsdomäne mit der DNA-Bindedomäne hindeuten könnte, die durch die Mutation R280E beeinflusst wird.

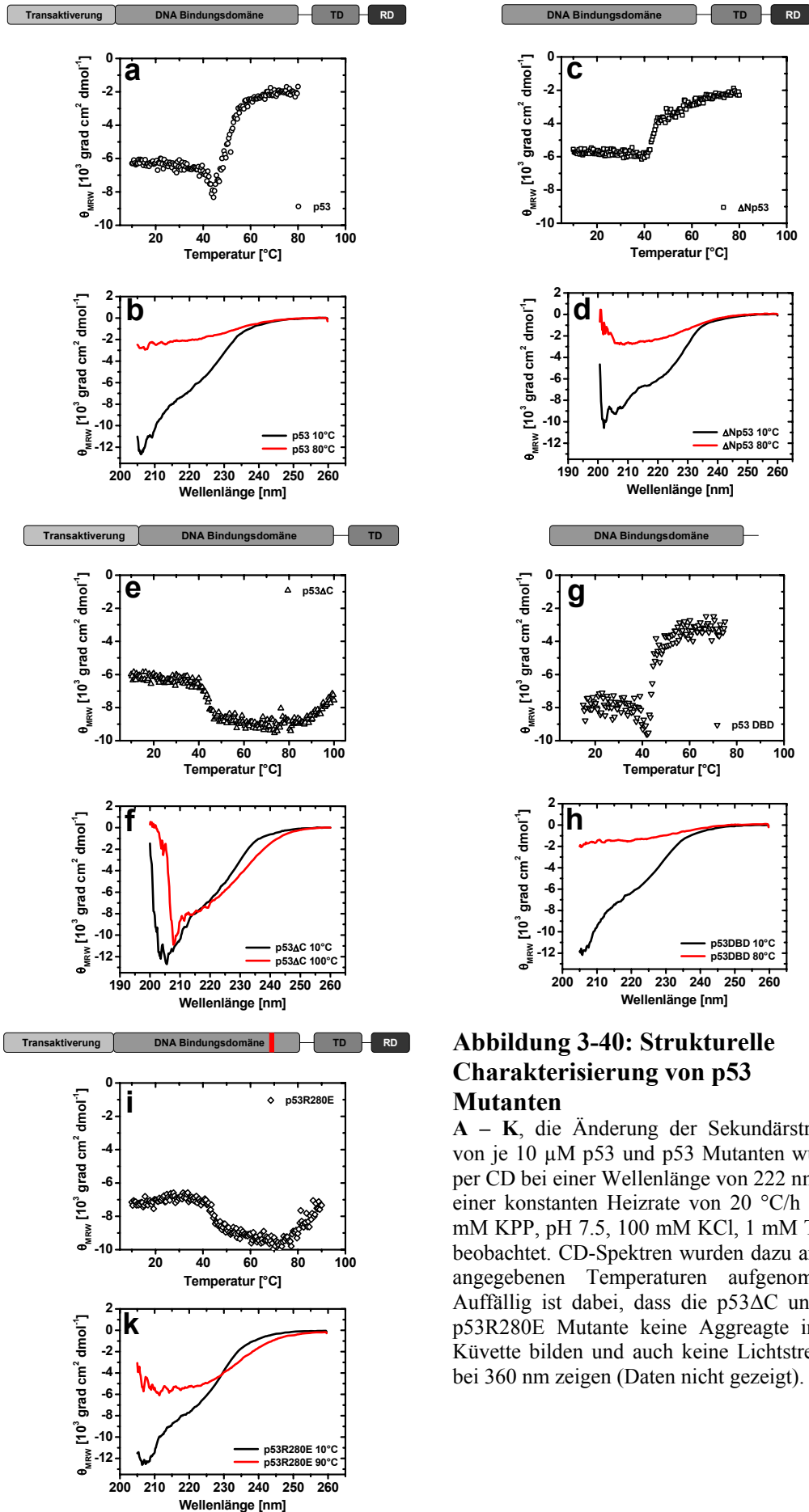


Abbildung 3-40: Strukturelle Charakterisierung von p53 Mutanten

A – K, die Änderung der Sekundärstruktur von je 10 μM p53 und p53 Mutanten wurden per CD bei einer Wellenlänge von 222 nm und einer konstanten Heizrate von 20 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ in 50 mM KPP, pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM TCEP beobachtet. CD-Spektren wurden dazu an den angegebenen Temperaturen aufgenommen. Auffällig ist dabei, dass die p53ΔC und die p53R280E Mutante keine Aggregate in der Küvette bilden und auch keine Lichtstreuung bei 360 nm zeigen (Daten nicht gezeigt).

3.7.3 Das Oligomerisierungsverhalten von p53 wird durch die Regulationsdomäne beeinflusst

Die Quartärstruktur von p53 ist wichtig für die Aktivität des Proteins, wobei auf Grund der niedrigen Expressionsrate und der hohen *turnover* Rate von p53 in der Zelle der Tetramerisierung eine bedeutende Rolle zukommt. Die Stabilisierung des Tetramers von p53 durch die Regulationsdomäne wurde über analytische SEC-HPLC Läufe gezeigt (**Abb. 3-41**). p53 Wildtyp zeigt unter den gewählten Bedingungen eine homogene Quartärstruktur mit einer dem Tetramer von p53 korrespondierenden relativen Masse (Retentionszeit \approx 16.5 min). Deletionsmutanten von p53, denen verschieden viele Aminosäuren im C-terminalen Bereich fehlen, zeigen eine unterschiedliche Quartärstruktur inklusive Spezies mit niedrigeren Molekulargewichten (Retentionszeit \approx 22.5 min, dimeres p53). Je mehr Aminosäuren der C-terminalen Regulationsdomäne deletiert wurden, desto größer ist der Anteil der niedermolekularen Spezies. Die Punktmutante p53R280E zeigte eine zum p53 Wildtyp vergleichbare homogene Verteilung von p53 Tetrameren.

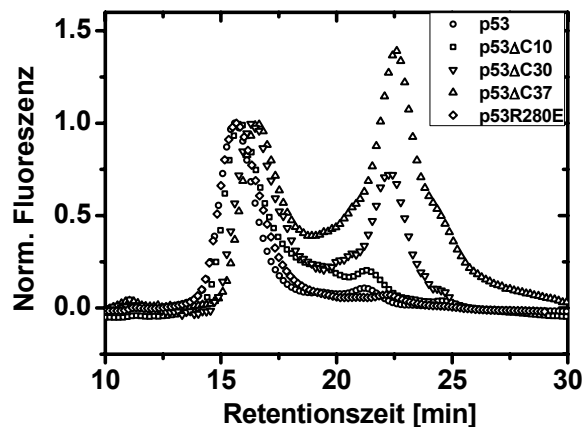


Abbildung 3-41: Analyse der Quartärstruktur von p53 und p53 Mutanten über SEC

Die Quartärstruktur von p53 und p53 Mutanten wurde über die analytische Größenausschluss-Chromatographie (SEC) an einer HPLC bestimmt. Dazu wurde eine Superdex200 Säule equilibriert in 50 mM KPP; pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM TCEP mit je 100 μ l einer 1 μ M Proteinlösung beladen und unter einer Flussgeschwindigkeit von 0.75 ml/min die Retentionszeit von p53 über die intrinsische Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 280\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 330\text{nm}$) bestimmt. Die Intensität aller Läufe wurde bei einer Retentionszeit des tetrameren p53 (ca. 15.6 min) auf eins normiert. Die Chromatogramme für p53 Wildtyp (O), p53 Δ C10 (\square), p53 Δ C30 (∇), p53 Δ C37 (Δ) und p53R280E (\diamond) zeigen das Oligomerisierungsverhalten der einzelnen Proteine.

Es wird deutlich, dass die Regulationsdomäne eine Funktion im p53 Molekül einnimmt, die die Tetramerisierung und dadurch wahrscheinlich auch die Aktivität des Proteins beeinflusst. Eine Wechselwirkung der Regulationsdomäne mit weiteren Domänen im p53 Tetramer scheint daher wahrscheinlich. Weitere Mutanten, wie die N-terminal verkürzten

p53 Mutanten konnten nicht per SEC-HPLC analysiert werden, da sie mit der Säulenmatrix interagierten und ein unnatürliches Laufverhalten zeigten.

3.7.4 Die DNA-Bindeaffinität von p53 wird sowohl von der N-terminalen als auch von der Regulationsdomäne beeinflusst

In Tumoren mit mutiertem p53 kommen vor allem p53 Punktmutationen vor, die eine Mutation in der DNA-Binderegion aufweisen. p53 ist dadurch nicht mehr in der Lage, spezifisch an seine Konsensussequenz zu binden (Ang et al., 2006; Hupp et al., 2000;). Der C-terminalen Regulationsdomäne wird eine unspezifische DNA-Bindung auf Grund von elektrostatischen Anziehungskräften zugeschrieben (Ahn & Prives, 2001; Bakalkin et al., 1995; Friedler et al., 2005). Hier sollte der Einfluss der N-terminalen Transaktivierungsdomäne und der Regulationsdomäne auf die spezifische Bindung von p53 an die doppelsträngige p21-DNA aufgeklärt werden. Dazu wurde die p21-DNA Cy5-fluoreszenzmarkiert und die Bindung von p53 Varianten an die DNA in Lösung über Fluoreszenz-Anisotropie bestimmt (**Abb. 3-42 a, c**). Aus den gewonnenen Daten wurden die Affinitätswerte (K_D) für die einzelnen p53 Varianten ermittelt (**Abb. 3-42 b, d**). Die N-terminale Deletionsmutante wies eine 4fach erhöhte Affinität im Vergleich zum p53 Wildtyp für p21-DNA auf ($K_D \approx 100$ nM). Verkürzt man zusätzlich die Regulationsdomäne, wird die Bindung der p53 Mutanten zur p21-DNA immer schlechter bis hin zu einer 6fachen Erniedrigung der Affinität bei vollständiger Deletion der Regulationsdomäne (**Abb. 3-42 a, b**). Dass es sich bei der DNA-Bindung ausschließlich um die Interaktion der p53 DBD mit der DNA handelt, konnte über die DNA-Bindungsinkompetente Mutante $\Delta Np53R280E$ gezeigt werden. Die C-terminalen p53 Deletionsmutanten hingegen zeigten nur eine geringe Abnahme der Affinität zur DNA (**Abb. 3-42 c, d**), aber einen wesentlichen Unterschied in der Änderung der Anisotropiewerte. Da die Änderung der Anisotropiewerte der komplexierten DNA direkt von der Korrelationszeit des Fluorophors abhängt, könnte eine unterschiedliche Molekülgestalt des Komplexes aus p53 und DNA der Grund für die verschiedenen Anisotropiewerte darstellen. Dass auch die N-terminale Domäne DNA nicht unspezifisch bindet, konnte mit der p53R280E Mutanten gezeigt werden.

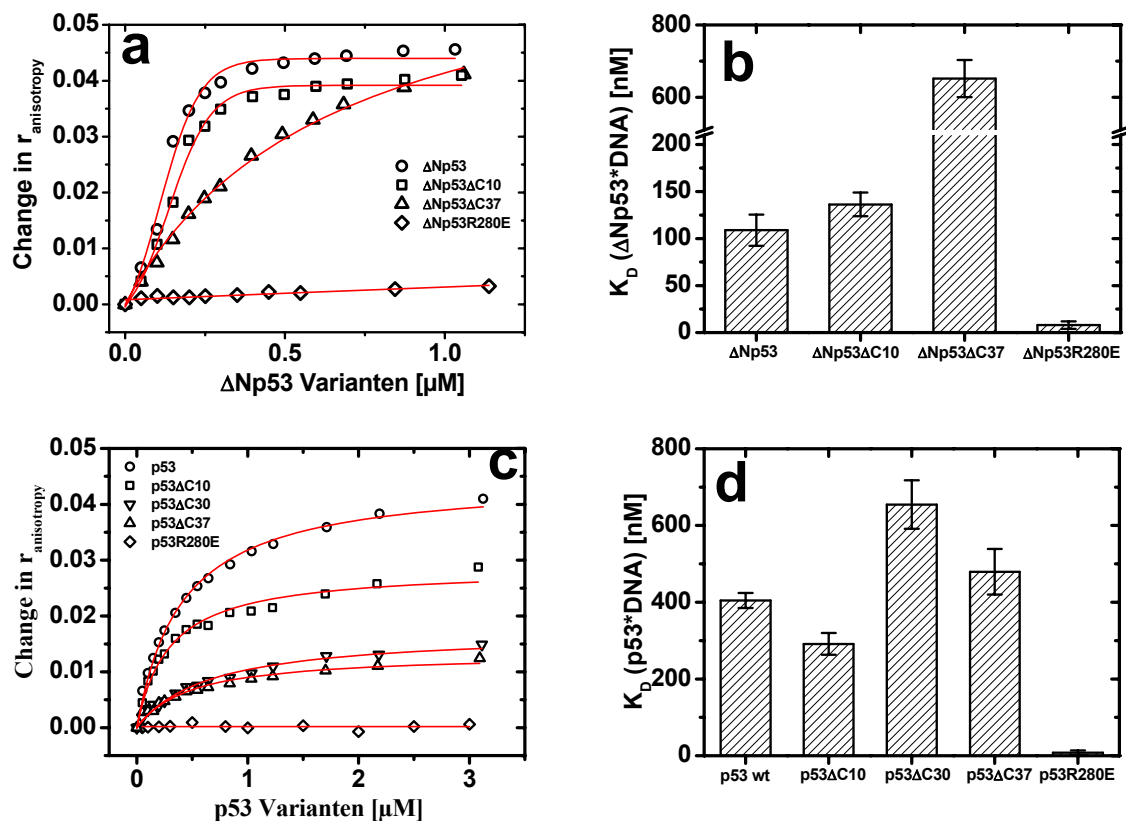


Abbildung 3-42: Charakterisierung der p21-DNA Affinität von p53 und p53 Mutanten in Lösung mittels Fluoreszenz-Polarisationsmessungen

A, die Änderung der normierten Anisotropiewerte von 50 nM Cy5-markierter p21-ds-DNA nach der Titration von ΔNp53 Varianten. Alle Anfangsanisotropiewerte wurden auf 0 normiert. **B**, Auswertung der Anisotropiedaten für die Bindung von ΔNp53 Varianten an p21-DNA. Für ΔNp53 und $\Delta\text{Np53}\Delta\text{C10}$ wurden sigmoide Fits verwendet, für $\Delta\text{Np53}\Delta\text{C37}$ und $\Delta\text{Np53R280E}$ wurde ein einfaches Bindemodell (Gleichung (5)) angenommen. **C**, die Änderung der normierten Anisotropiewerte von 50 nM Cy5-markierter p21-DNA nach der Titration von p53 Varianten. Die Normierung der Anfangswerte erfolgte ebenfalls auf 0. **D**, Auswertung der Anisotropiedaten für die Bindung von p53 Varianten an p21-DNA. Für alle p53 Varianten wurde ein einfaches Bindemodell angenommen. Alle K_D Werte sind mit den Standardabweichungen angegeben. Die Experimente wurden in 50 mM KPP, pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM TCEP bei 15 °V vorgenommen. Die Quantenausbeute der Cy5-DNA Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 514$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 528$ nm) ändert sich durch die Bindung von p53 nicht. Titrationsschritte wurde mit 60 Sekunden Abstand durchgeführt und der Durchschnitt der erhaltenen Anisotropiewerte wurde ermittelt.

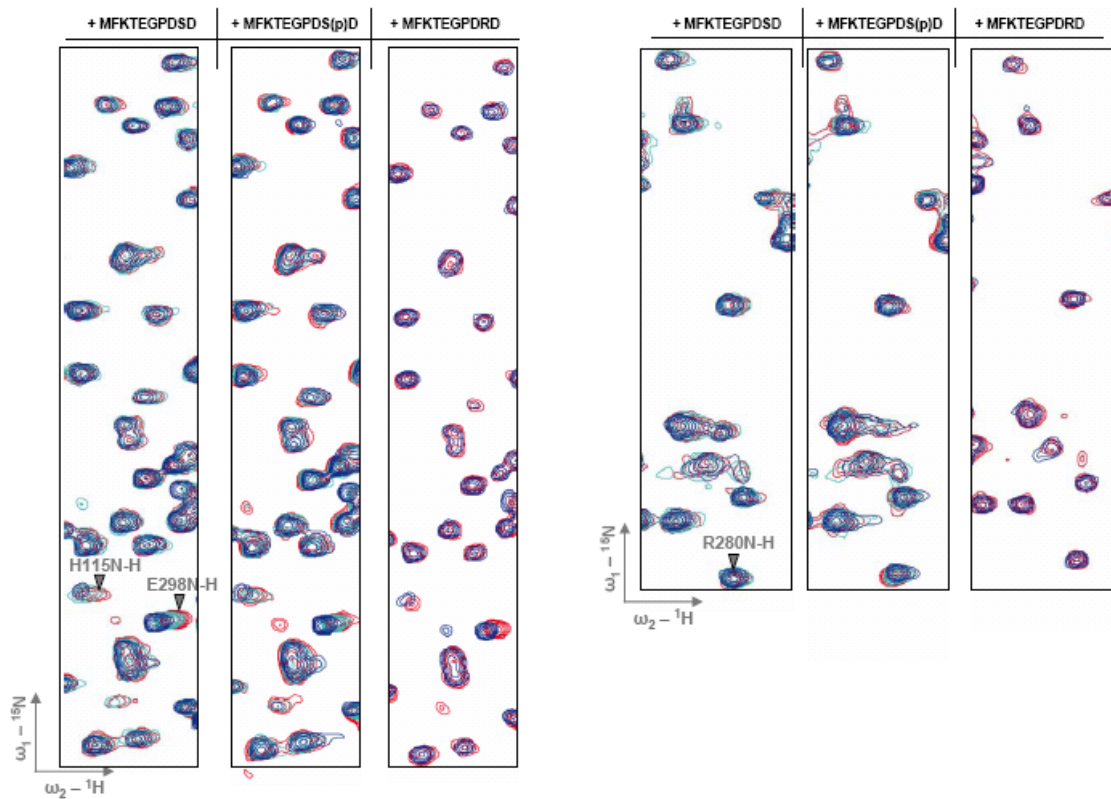
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die N-terminale Domäne in p53 einen inhibierenden Effekt auf die Bindung von DNA ausübt, während die Regulationsdomäne genau entgegengesetzt wirkt und die Affinität zur DNA, wenngleich geringfügiger, verstärkt. Die inhibierende Wirkung der N-terminalen Domäne könnte einerseits durch die Interaktion mit anderen Bereichen des p53 Tetramers beruhen, oder aber andererseits sterische Gründe haben, dadurch dass die N-terminale Domäne nativ entfaltet ist und damit einen hohen Platzbedarf aufweist. Die C-terminale Regulationsdomäne könnte einen positiven Einfluss auf die DNA-Bindung haben, indem sie die Tetramerisierung von p53

verstärkt und somit das Protein zu einem bestimmten Grad aktiviert. Hierzu wäre aber wieder die Interaktion der Regulationsdomäne mit einem anderen Bereich des p53 Tetramers notwendig.

3.7.5 Die Regulationsdomäne von p53 interagiert mit der DNA-Binderegion

Wie in den obigen Experimenten gezeigt, ist eine Interaktion der Regulationsdomäne mit anderen Bereichen in p53 wahrscheinlich. Zur Lokalisierung dieses Bereichs wurden NMR-Titrationsexperimente mit ^{15}N -markierter p53 DBD und den von der Regulationsdomäne abgeleiteten C-terminalen Peptiden vorgenommen. Dazu wurden Peptide mit der unmodifizierten Primärsequenz, mit einer Serin-Phosphorylierung und mit einem Aminosäureaustausch (Serin zu Arginin) synthetisiert (**Tabelle 15 b**) und zur p53 DBD titriert (**Abb. 3-43 a und b**). Alle Peptide interagierten mit der p53 DBD, wobei das Serin-phosphorylierte Peptid die stärkste Interaktion zeigte. Bei dem Serin-phosphorylierten Peptid konnte vor allem eine zusätzliche Interaktion mit den Aminosäuren um Arg-280 detektiert werden, was auf eine Interaktion zwischen dem Phospho-Serin und Arg-280 der p53 DBD hindeutet. Arg-280 ist wesentlich an der DNA-Bindung von p53 beteiligt und die Punktmutation dieser Aminosäure inhibiert die DNA-Bindung von p53 (vgl. **Abb 1-11**). Diese Interaktion konnte bei keinem anderen Peptid festgestellt werden (**Abb. 3-43 a**, rechts). Die chemische Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren nach Zugabe der verschiedenen Peptide sind in **Abb. 3-43 b** aufgelistet. In den NMR Experimenten konnte nur eine schwache Interaktion zwischen den Peptiden und der p53 DBD detektiert werden, die sich in der chemischen Verschiebung einzelner Aminosäuren äußert. Eine induzierte konformationelle Änderung der p53 DBD durch Bindung der Peptide kann somit ausgeschlossen werden und durch die Titrationsexperimente kann die Affinität der Peptide zur der p53 DBD auf den hohen μM - bis mM -Bereich abgeschätzt werden.

a



b

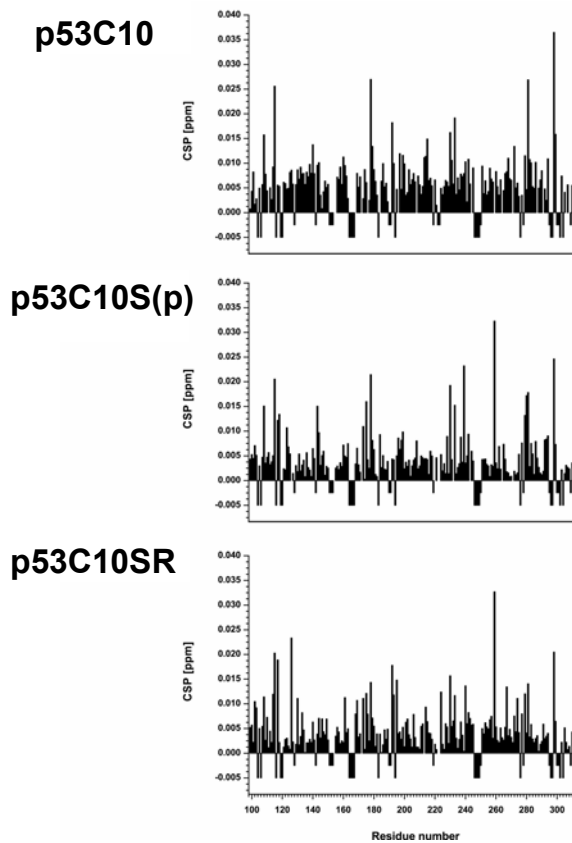


Abbildung 3-43: Chemische Verschiebung des ¹⁵N HSQC-Spektrums der p53 DBD nach Zugabe von p53 abgeleiteten Peptide

A, Ausschnitte einer Überlagerung der ¹⁵N HSQC Spektren von p53 DBD (250 μM) nach Zugabe des 2fachen (cyan) oder 10fachen (blau) Überschusses der vom p53 C-terminalen Bereiche abgeleiteten und über den Spektren angegebenen Peptiden. Die Peptide wurden gegen 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl über Nacht dialysiert und die Messung erfolgte im selben Puffer bei 20 °C. B, residuale chemische Verschiebung der Aminosäuren der p53 DBD nach Zugabe des 10fachen Überschusses der p53-Peptide.

Die Aminosäure, die signifikant an der Bindung des p53C10S(p) Peptids beteiligt sind, wurden auf die p53 DBD Struktur übertragen (**Abb. 3-44 a**). Im Vergleich dazu ist die Struktur der p53 DBD in Komplex mit einem Peptid abgebildet (**Abb. 3-44 b**), das von dem p53-Bindeprotein2 abgeleitet ist. Dieses Peptid interagiert mit der p53 DBD und erhöht die Stabilität der DNA-Bindedomäne (Friedler et al., 2002).

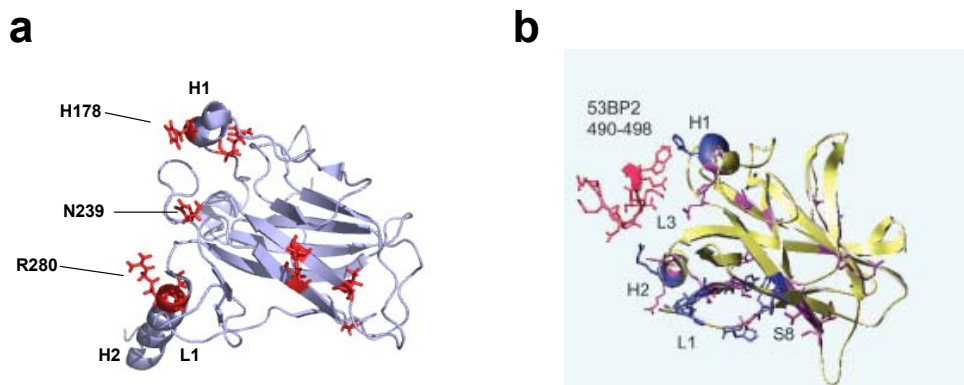


Abbildung 3-44: An der Bindung von Peptiden beteiligte Aminosäuren der p53 DBD

A, Aminosäuren, die nach der Titration des Peptids p53C10S(p) starke chemische Verschiebungen zeigten (in rot), sind auf die NMR Struktur von p53 DBD (pdb code: 2fej) übertragen worden. Markiert sind die Helices H1 und H2, der Loop L1 und die signifikant shiften Aminosäuren, die hauptsächlich an der Bindung des Phosphopeptids p53C10S(p) beteiligt sind. **B**, die p53 DBD in Komplex mit einem Peptid, das aus der Bindung mit dem p53 Bindeprotein2 (53BP2) abgeleitet wurde. Abbildung entnommen aus (Friedler et al., 2002).

Der Interaktionsfläche der beiden Peptide p53C10S(p) und 53BP2-Peptid mit der p53 DBD sind auf der Grundlage der chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren sehr gut vergleichbar. Die Interaktionsfläche der Peptide befindet sich in der DNA-Bindefläche von p53, wo vor allem das His-178, Asn-239 und das Arg-280 an der Bindung der Peptide beteiligt sind.

3.7.6 Die Serin-Phosphorylierung erhöht die Affinität des C-terminalen Peptids zu p53

Durch die NMR Titrationsexperimente konnte gezeigt werden, dass das Phospho-Peptid p53C10S(p) im Vergleich zu dem unmodifizierten Peptid eine veränderte Interaktionsfläche besitzt. Ob sich diese Änderung auch qualitativ auf die Affinität des Peptids zu p53 auswirkt, wurde über einen etablierten EMSA Assay untersucht. Dazu wurden die N-terminal FITC-markierten Peptide p53C10 und p53C10S(p) mit p53 inkubiert und elektrophoretisch auf einem Nativ-Gel aufgetrennt. Die Zugabe von Cy5-markierter DNA sollte Aufschluss darüber geben, ob die Bindung von DNA und Peptid gleichzeitig oder kompetitiv stattfindet. Es zeigte sich, dass das Serin-phosphorylierte Peptid an die Volllänge von p53 bindet, da es auf der Lauflänge des DNA-gebundenen p53

Tetramers detektiert wurde (**Abb. 3-45 a**). Die Affinität des Peptids zu p53 wird durch die Phosphorylierung im Vergleich zum unmodifizierten Peptid signifikant erhöht. Die Anwesenheit der p53 konsensus-DNA verdrängte das Phospho-Peptid vollständig (**Abb. 3-45 b**).

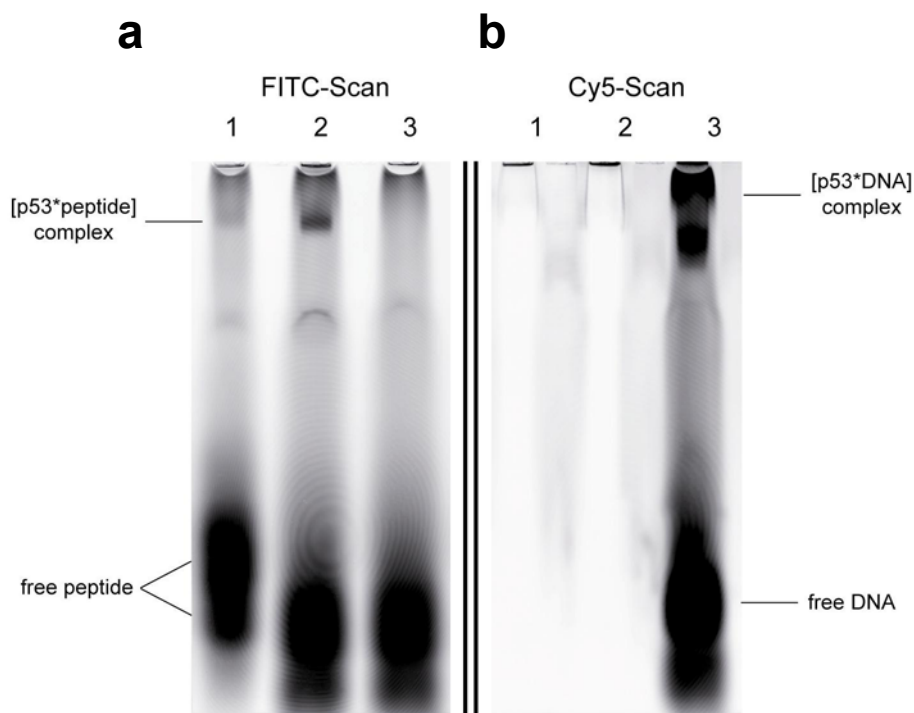


Abbildung 3-45: Phosphorylierung von Serin 392 verstärkt die Bindung des Peptids an p53

A - B, Elektromobilitäts-shift-Assay (EMSA) zur qualitativen Untersuchung der Bindungsaffinität der Peptide p53C10 und p53C10S(p) an p53 wt. **A**, Fluoreszenz-scan des nativ-Gels, Bande 1, p53 wt (8.8 μg , 8 μM) inkubiert mit 26 μM FITC-p53C10, Bande 2, p53 wt (8 μM) inkubiert mit 26 μM FITC-p53C10S(p); Bande 3, wie Bande 2 mit zusätzlich 2 μM Cy5-markierter p21-ds-DNA und 2 μM unspezifischer, doppelsträngiger Poly-dIdC. **B**, das selbe Gel wurde einem Cy5-scan unterzogen. Die nativ-PAGE wurde wie unter (2.4.2) beschrieben durchgeführt und mit einem Thyphoon imager gescannt.

Der EMSA Assay bestätigt damit die NMR Ergebnisse. Einmal weist das Serin-phosphorylierte Peptid eine erhöhte Affinität zu p53 auf und zweitens überlappen die Interaktionsflächen der Peptid- und der DNA-Bindung. Da die DNA eine um 4-Potenzen höheren Affinität im Vergleich zum Peptid aufweist, wird das Peptid in Anwesenheit der DNA vollständig aus dem Komplex mit p53 verdrängt. Dieses Ergebnis konnte auch über analytische SEC-HPLC Läufe bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Da in den Versuchen mit C-terminalen p53 Deletionsmutanten die Verkürzung um 10 Aminosäuren keinen entscheidenden Effekt auf z.B. den Oligomerisierungszustand von p53 hatte, sondern erst die Verkürzung um 30 oder 37 Aminosäuren stärkere Effekte zeigte, ist nicht

ausgeschlossen, dass auch der verbleibende Teil der Regulationsdomäne, nicht nur die letzten 10 Aminosäuren, mit anderen Bereichen von p53 interagiert.

3.7.7 Erzeugung und Charakterisierung einer C-terminal verlängerten p53 Cystein-Mutante

Die NMR-Experimente suggerieren eine räumliche Nähe des Arg-280 der p53 DBD und des Ser-392 der Regulationsdomäne. In der DNA-Binderegion von p53 befinden sich ebenfalls in räumlicher Nähe vier reaktive, oberflächenexponierte Cysteine, Cys-176, Cys-182, Cys-242 und Cys-275. Die Primärsequenz von p53 wurde um ein Cystein C-terminal verlängert (p53_394C, **Abb. 3-46 a**) mit der Hoffnung, dass, wenn die beiden Aminosäuren Arg-280 und Ser-392 in räumlicher Nähe zueinander sind, das zusätzliche Cys-394 mit einem der oben genannten Cysteine eine kovalente Disulfid-Brücke ausbilden kann. Dazu wurde die p53_394C Mutante exprimiert, gereinigt und einer Sekundärstrukturanalyse per CD-Spektroskopie unterzogen (**Abb. 3-46 b – e**). Dazu wurde das Protein nach der Reinigung über Nacht gegen einen Puffer mit 5 mM TCEP dialysiert, um reduzierende Bedingungen zu erreichen oder gegen den gleichen Puffer ohne TCEP, um oxidierende Bedingungen einzustellen.

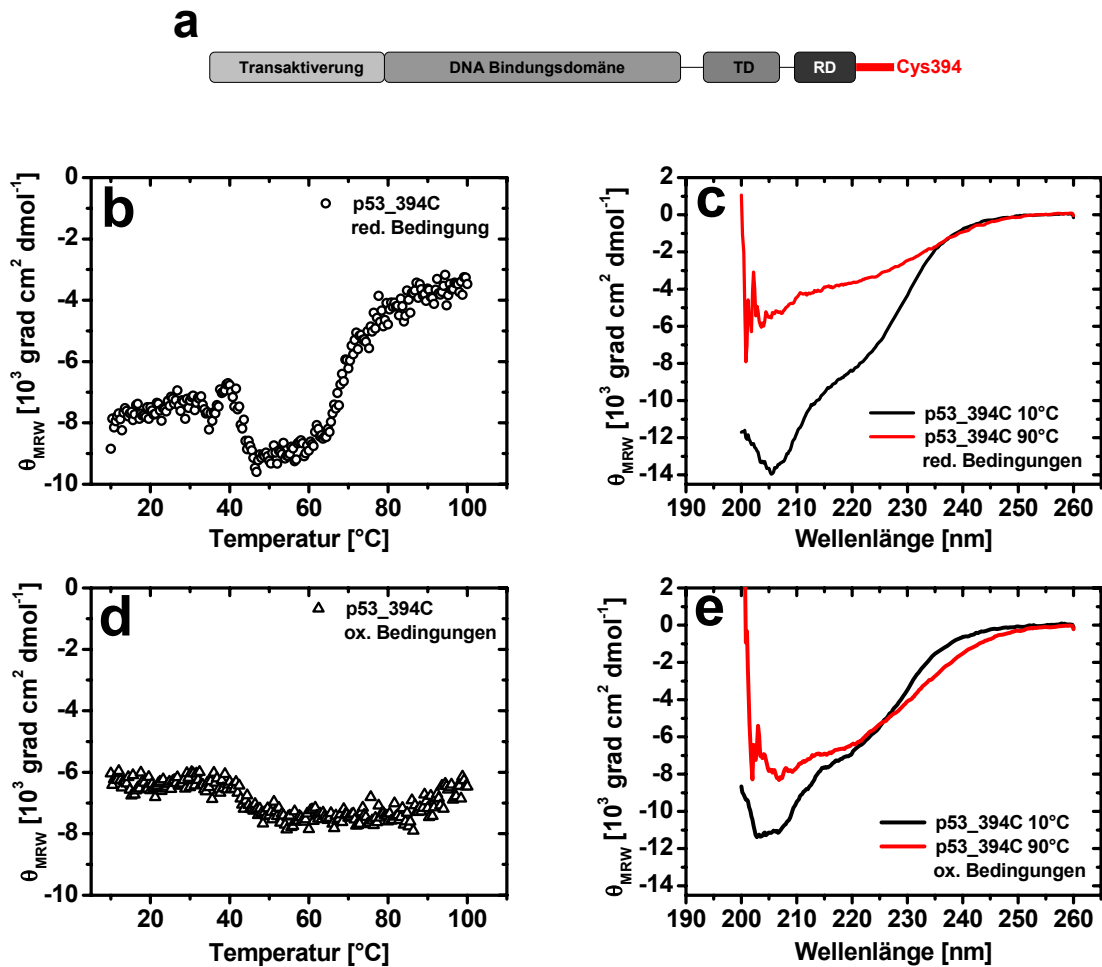


Abbildung 3-46: Charakterisierung der p53_394C Mutanten unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen

A, Domänenstruktur der p53_394C Mutante. **B**, thermisch induzierte Denaturierungskurve der p53_394C Mutante unter reduzierenden Bedingungen, 50 mM KPP, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM TCEP. Es wurde die Änderung der Sekundärstruktur von 5 μ M p53_394C bei einer Wellenlänge von 222 nm und einer konstanten Heizrate von 20 $^{\circ}$ C/h gemessen. **C**, CD-Spektren der p53_394C Mutanten unter reduzierenden Bedingungen bei 10 $^{\circ}$ C und bei 90 $^{\circ}$ C. **D**, thermisch induzierte Denaturierungskurve der p53_394C Mutanten unter oxidierenden Bedingungen, 50 mM KPP, pH 7.5, 100 mM KCl. Selbe Bedingungen wie in **B**. **E**, CD-Spektrum der p53_394C Mutanten unter oxidierenden Bedingungen bei 10 $^{\circ}$ C und bei 90 $^{\circ}$ C.

Aus den thermisch induzierten Denaturierungskurven sowie den CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen wird deutlich, dass die Einführung des C-terminalen Cysteins abhängig von den gewählten Bedingungen einen unterschiedlichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten des Proteins ausübt. Im nativen Zustand (10 $^{\circ}$ C, **Abb. 3-46. c, e** schwarze Kurven) sind die Spektren von p53_394C unter den reduzierenden und oxidierenden Bedingungen vergleichbar, bei erhöhten Temperaturen (90 $^{\circ}$ C, **Abb. 3-46 c, e** rote Kurven) wird allerdings ein Unterschied deutlich, der sich auch in den Denaturierungskurven widerspiegelt (**Abb. 3-46 b, d**). Dabei zeigt die p53_394C Mutante

unter oxidierenden Bedingungen keine sichtbare Aggregation nach thermischer Denaturierung, im Gegensatz zu der p53 Mutante unter reduzierender Bedingung. An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass das Redox-Potential von Cystein, beschrieben über die Nernstsche Gleichung, stark temperaturabhängig ist, hier aber vorerst nicht berücksichtigt wurde.

3.7.8 Die p53_394C Mutante bildet kovalente Oligomere aus

Durch die CD-spektroskopische Analyse ist eine Interaktion des zusätzlichen Cysteins mit einem Bereich in p53 wahrscheinlich. Eine genauere Analyse wurde per SDS-PAGE vorgenommen. Dazu wurde p53_394C über Nacht bei 4 °C unter oxidierenden Bedingungen (50 mM KPP, pH 7.5, 100 mM KCl) inkubiert und anschließend mit dem 10fachen Überschuss an Iodacetamid behandelt. Iodacetamid carboxymethyliert reaktive Cysteine und verhindert so, dass während der SDS-PAGE unspezifische Disulfid-Brücken ausgebildet werden. Das Protein wurde dann in Anwesenheit und Abwesenheit von β -Mercaptoethanol auf die Ausbildung von kovalenten Oligomeren untersucht (**Abb. 3-47 a**). p53_394C ist unter Anwesenheit des reduzierenden β -Mercaptoethanols nur als Monomer auf dem SDS-Gel sichtbar. In Abwesenheit von β -Mercaptoethanol hingegen sind auch Spezies mit höherer Molekularmasse detektierbar, die dem p53 Dimer und höheren Oligomeren entsprechen. Um eine Charakterisierung der Proteine mittels Massenspektrometrie vornehmen zu können, wurden an den entsprechenden Stellen, die entweder nur das p53 Monomer oder die kovalente Verknüpfung mehrerer Untereinheiten zu Oligomeren enthielten, Proben entnommen (**Abb. 3-47 a**, Einstiche). Die Proteinproben wurden aus dem Gel isoliert, eventuell noch vorhandene freie Cysteine carboxymethyliert und danach wurden die Proben einem Trypsinverdau unterzogen und die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch analysiert. Beim Vergleich der Spektren fiel vor allem ein Peptid mit der Masse $M_w = 1665.80$ auf, dass ausschließlich bei dem Spektrum der monomeren p53_394C Probe detektiert wurde, bei allen Oligomeren aber fehlte, wie für das Spektrum des p53 Dimers angezeigt (**Abb. 3-47 b**). Die Masse des Peptids ist identisch mit der angegebenen Peptidsequenz aus der p53 DND-Binderegion.

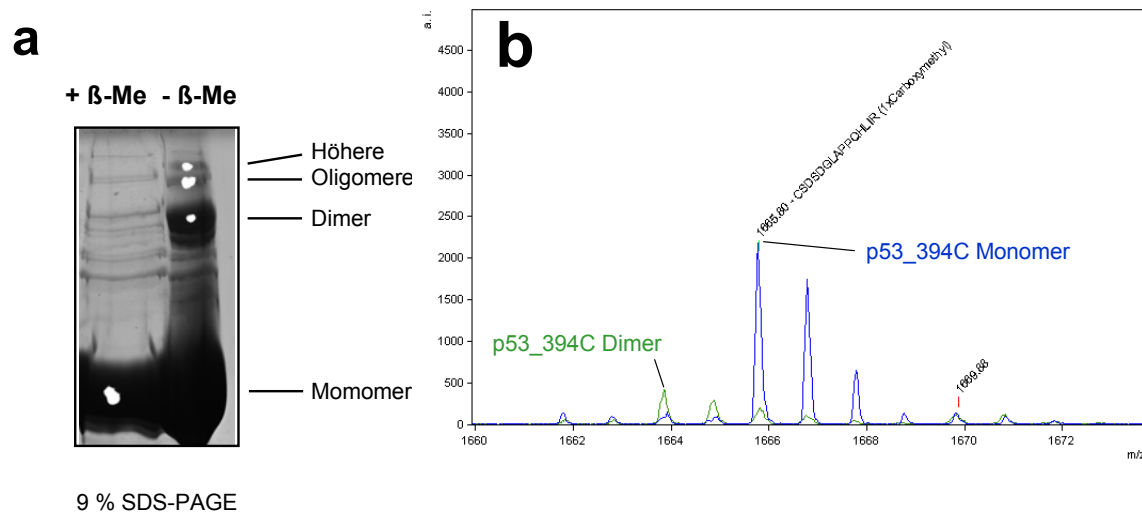


Abbildung 3-47: p53_394C bildet unter oxidierenden Bedingungen kovalente Oligomere aus

A, Die p53_394C Mutante wurde über Nacht bei 4 °C in 50 mM KPP, pH 7.5, 100 mM KCl inkubiert, anschließend mit einem 10fachen Überschuss an Iodacetamid behandelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Rechte Bande, Laemmli-Puffer (Probenauftragungspuffer) enthielt 2.5 % β -Mercaptoethanol (β -ME), linke Bande, Laemmli-Puffer enthielt kein β -Me und zeigt höhere oligomere Spezies von p53_394C an. **B**, die aus dem Gel aus **A** entnommenen Proben wurden extrahiert, Trypsin-verdaut und die erhaltenden Peptide massenspektrometrisch untersucht. Dabei sind alle freien Cysteine durch die Behandlung mit Iodacetamid carboxymethyliert. Eine Überlagerung des Massenspektrum von monomeren p53_394C (blau) und des dimeren p53_394C (grün) zeigt, dass nur im Monomer ein Peptid mit der Masse 1665.8 Da gefunden wird, dass dem carboxymethylierte Peptid C_{carboxymethyl}SDSDGLAPPQHLIR zugeordnet werden konnte.

Weitere eindeutige Aussagen konnten aber auf Grund der Komplexität der Massenspektren nicht getroffen werden. Um die Ausbildung kovalent verknüpfter p53 Untereinheiten zu erhöhen und daraus eindeutige Aussagen über die Eigenschaften der p53-Spezies treffen zu können, wurde im Folgenden mit verschiedenen thiol-spezifischen Crosslinkern gearbeitet.

3.7.9 Kovalente Verknüpfung von p53_394C mit einem Bimane-basierten fluoreszenzaktiven Crosslinker

Der Bimane-basierte Crosslinker biBromobimane (bBBR) ist ein thio-spezifischer Crosslinker (**Abb. 3-48 a**, oben), der fluoreszenzaktiv wird, sobald er mit zwei Thiolgruppen reagiert hat. Somit kann die Crosslink-Reaktion über das Fluoreszenzspektrum detektiert werden. Zuerst wurde der Crosslinker mit p53_394C unter oxidierenden Bedingungen inkubiert und die Ausbildung von SDS- und β -Mercaptoethanol-stabilen kovalenten Oligomeren per SDS-PAGE analysiert (**Abb. 3-48 a**, unten). Der Crosslinker interagiert mit p53_394C unter der Ausbildung nur einer spezifischen oligomeren Spezies mit dem Molekulargewicht des p53 Tetramers. Ob der

Crosslinker bei der Reaktion mit p53_394C auch fluoreszenzaktiv wird, wurde in einem weiteren Experiment getestet. Hier wurde wiederum p53_394C mit bBBr inkubiert und das Fluoreszenzspektrum bei einer Anregung von 390 nm aufgenommen (**Abb. 3-48 b**). Der Crosslinker alleine zeigte dabei eine vernachlässigbare Fluoreszenz. Interagiert der Crosslinker aber mit p53_394C, so nimmt die Fluoreszenz unter einer Rotverschiebung deutlich zu. Die Zunahme der Fluoreszenz ist vergleichbar der Reaktion des Crosslinkers mit reduziertem Glutathion. Die entstehende Fluoreszenz kann ebenfalls bei einer SEC-HPLC Analyse genutzt werden, um den Oligomerisierungszustand der kovalent verknüpften p53_394C Untereinheiten zu charakterisieren (**Abb.3-48 c**).

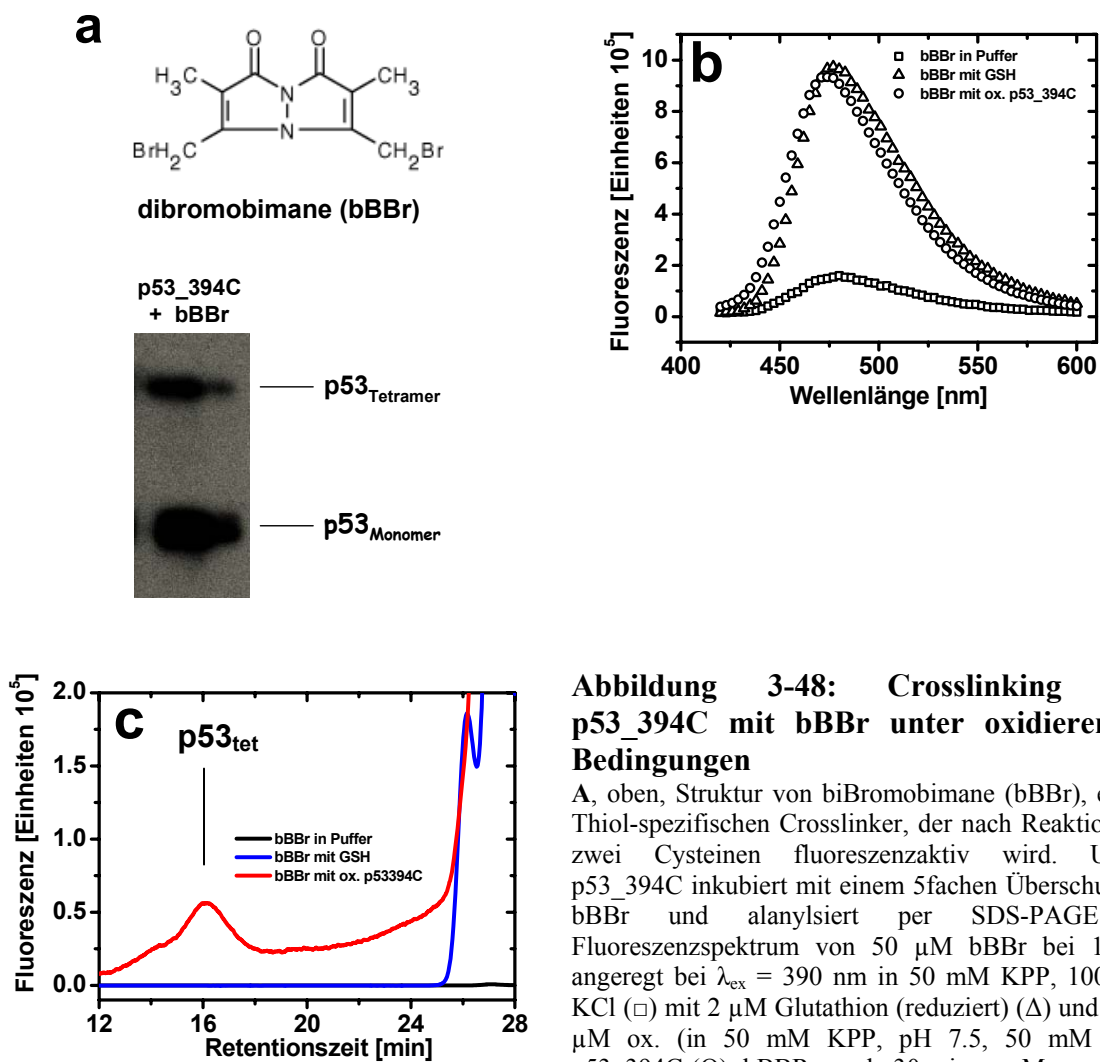


Abbildung 3-48: Crosslinking von p53_394C mit bBBr unter oxidierenden Bedingungen

A, oben, Struktur von biBromobimane (bBBr), einem Thiol-spezifischen Crosslinker, der nach Reaktion mit zwei Cysteinen fluoreszenzaktiv wird. Unten, p53_394C inkubiert mit einem 5fachen Überschuss an bBBr und analysiert per SDS-PAGE **B**, Fluoreszenzspektrum von 50 μ M bBBr bei 15 °C angeregt bei $\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm in 50 mM KPP, 100 mM KCl (\square) mit 2 μ M Glutathion (reduziert) (Δ) und mit 2 μ M ox. (in 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl) p53_394C (\circ). bBBr wurde 30 min vor Messung des Spektrums bei 4 °C mit GSH oder p53_394C inkubiert. **C**, analytischer SEC-HPLC-Lauf der Proben aus B (100 μ l, mit GSH gequench) mit einer Superdex200 equilibriert in 50 mM KPP, pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM TCEP und einer Flussgeschwindigkeit von 0.75 ml/min. Detektion der Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 470$ nm.

Die SEC-HPLC Analyse, die nur die Fluoreszenz des Crosslinkers detektiert, zeigt, dass eine dominante Spezies nach Behandlung von p53_394C mit dem Crosslinker entsteht, die eine vergleichbare Retentionszeit zum nativen, tetrameren p53 Wildtyp besitzt. Andere p53 Oligomere konnten hier nicht detektiert werden. Freier Crosslinker, der mit GSH reagiert hat, wurde nach einer Retentionszeit von 24 Minuten detektiert. GSH wurde auch der p53_394C Probe vor dem Lauf zugesetzt, um eine Interaktion des Crosslinkers mit der Säule zu vermeiden. Die Verwendung des Crosslinkers bBBr zeigt eindeutig die Ausbildung einer dominanten Spezies und über die Fluoreszenz des Crosslinkers kann diese Spezies sehr gut verfolgt werden. Alle kinetischen Untersuchungen, die Aussagen über die Reaktionsgeschwindigkeit des Crosslinkers zulassen würden, konnten aber auf Grund der hohen Sensitivität der Crosslinker gegenüber Sauerstoff nicht durchgeführt werden. Die Fluoreszenz des Crosslinkers ändert sich bei längerer Inkubation in Puffer, auch in Abwesenheit von Crosslink-Partnern.

3.7.10 Die spezifische, kovalente Verknüpfung von p53_394C Untereinheiten über dem thiol-spezifischen, wasserlöslichen Crosslinker BM(POE)₂

Ein weiterer thiol-spezifischer, wasserlöslicher Crosslinker BM(POE)₂ mit genau definierter *Spacer*-Länge (**Abb. 3-49 a**, oben) wurde weiterhin verwendet, um definierte p53_394C Tetramere zu erzeugen. BM(POE)₂ crosslinkt dabei sehr effizient die p53_394C Untereinheiten zu Tetrameren und höheren Oligomeren (**Abb. 3-49 a**, unten), wobei SDS- und β -Mercaptoethanol-resistente Spezies entstehen. Ein großer Vorteil dieses Crosslinkers ist die Möglichkeit, gleichzeitig Reduktionsmitteln in der Proteinlösung zu verwenden, da BM(POE)₂ nicht mit TCEP wechselwirkt. Das heterogene Gemisch nach der Behandlung von p53_394C mit dem Crosslinker wurde in einem weiteren Reinigungsschritt mittels FPLC/HPLC homogenisiert und es wurde nur mit dem verknüpften p53_394C Tetramere weitergearbeitet. In dem auf der Fluoreszenz-Polarisation beruhenden Aktivitätsassay von p53 zeigte das verknüpfte p53_394C keine Bindung der spezifischen p21-DNA (**Abb. 3-49 b**).

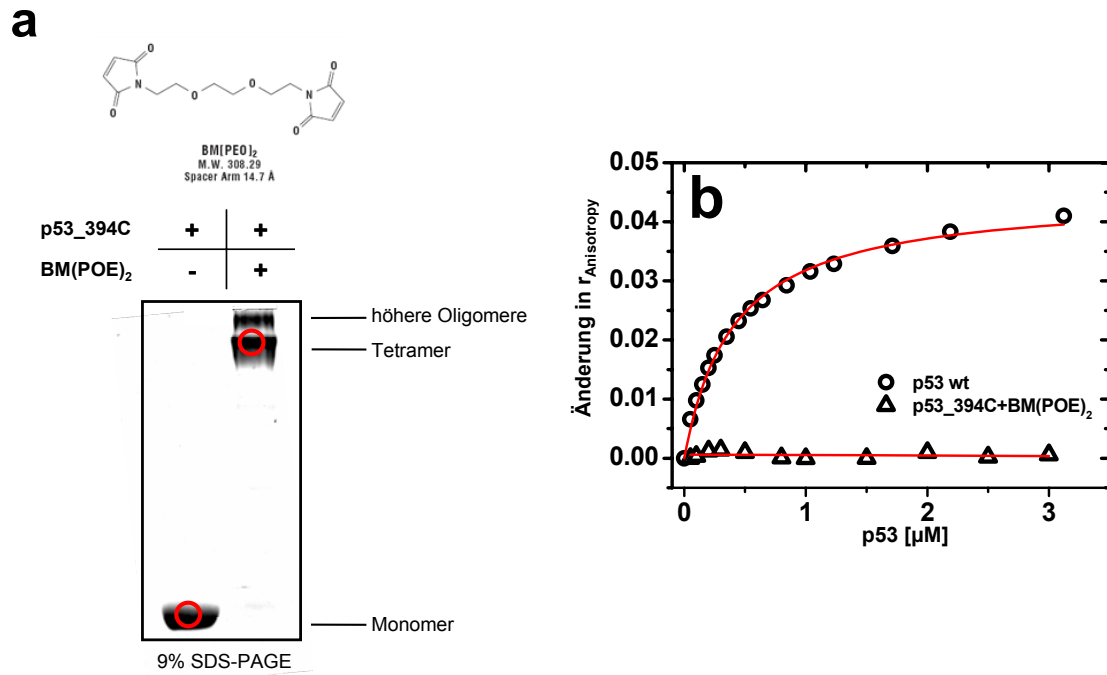


Abbildung 3-49: Crosslinking von p53_394C führt zu inaktiven Tetrameren

A, oben, Struktur und Eigenschaften des thiol-spezifischen, wasserlöslichen Crosslinkers BM(POE)₂. **A**, unten, p53_394C wurde zusammen mit einem 5fachen Überschuss des Crosslinkers BM(POE)₂ für 2 h bei 4 °C in 50 mM KPP, pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM TCEP inkubiert, danach mit einem 10fachen Überschuss an Iodacetamid versetzt und per SDS-PAGE analysiert. Die gebildeten Oligomere sind β -Mercaptoethanol und SDS-stabil. Aus diesem Gel wurden Proben zur massenspektrometrischen Analyse (**Abb. 3-51**) entnommen (rote Kreise). **B**, p53_394C wurde mit dem 5fachen Überschuss von BM(POE)₂ inkubiert. Danach wurde die heterogene Proteinlösung über eine Superdex200 (16/10) per FPLC homogenisiert. Die Fraktionen, die nach der SDS-PAGE Analyse hauptsächlich mit BM(POE)₂ gecrosslinktes tetrameres p53_394C enthielten, wurden vereinigt und per Fluoreszenz-Polarisationsanalyse auf die Affinität zur p21-DNA im Vergleich zum p53 Wildtyp (O) untersucht. Die Fähigkeit von p53_394C_BM(POE)₂ (Δ) wurde durch den Crosslink inhibiert.

Die Unfähigkeit der p53_394C verknüpften tetrameren Spezies DNA zu binden, lässt darauf schließen, dass die Crosslinker-vermittelte Tetramerisierung der Untereinheiten über das zusätzlich eingefügte Cys-394 und einem Cystein der DNA-Bindedomäne stattfindet. Die dominante Ausbildung von p53 Tetrameren zeigt zudem, dass die Verknüpfung zweier Cysteine *inter*-molekular bevorzugt wird. Daraus lässt sich schließen, dass der C-Terminus der Regulationsdomäne einer p53 Untereinheit mit der DNA-Bindedomäne einer anderen Untereinheit in räumlicher Nähe steht, so dass die Ausbildung von gecrosslinkten *inter*-molekularen Cysteinen stark bevorzugt ist. Alle weiteren p53 Varianten reagieren mit dem Crosslinker BM(POE)₂ nur unspezifisch unter der Ausbildung heterogener Gemische (**Abb. 3-50**).

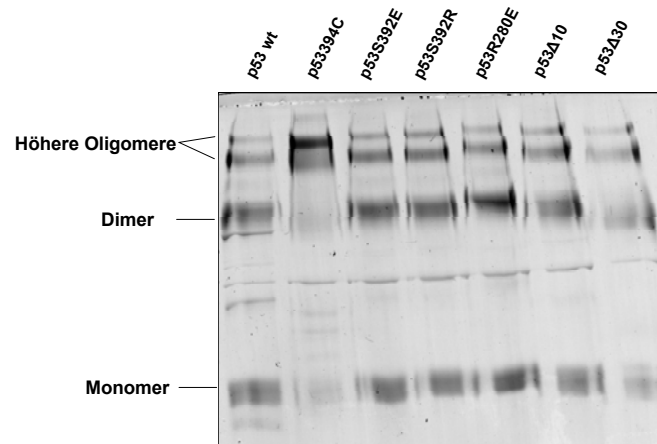


Abbildung 3-50: Die Spezifität des Crosslinkers BM(POE)₂

p53 Wildtyp und p53 Mutanten wurden mit einem 5fachen Überschuss des Crosslinkers BM(POE)₂ für 2 h bei 4 °C in 50 mM KPP, pH 7.5, 100 mM KCl inkubiert und per SDS-PAGE analysiert. Alle p53 Varianten zeigen eine Interaktion mit dem Crosslinker und die Ausbildung von höheren oligomeren Spezies. p53_394C zeigt als einziges Protein eine homogene Verteilung, was eine spezifische Interaktion anzeigt.

3.7.11 Identifikation der spezifischen inter-molekularen Interaktion des Cys-394 mit Cys-182

Um eindeutig die Interaktion des C-terminal eingefügten Cys-394 mit der p53 DBD zeigen zu können, und um das spezifische Cystein der p53 DBD identifizieren zu können, das mit Cys-394 wechselwirkt, wurde eine weitere massenspektrometrische Analyse des mit BM(POE)₂ behandelten p53_394C im Vergleich mit dem unbehandelten Protein durchgeführt. Dazu wurden die in **Abb. 3-49** mit roten Kreisen markierten Proteinproben aus dem Gel extrahiert, carboxymethyliert und Trypsin-verdaut. Der Vergleich der beiden Massenspektren wies einen neuen Massenpeak bei $M_w = 2739.1$ Da auf, der nur in dem Spektrum des mit dem Crosslinker behandelten p53_394C auftrat (**Abb. 3-51 a**). Dieser Massenpeak wurde sequenziell analysiert und die einzelnen Fragmente konnten eindeutig einem gecrosslinktem Peptid zugeordnet werden (**Abb. 3-51 b**). Die Masse des neu erscheinenden Peaks sowie die sequenzielle Analyse ergaben ein Peptid bestehend aus den letzten acht Aminosäuren der p53_394C Mutante (TEGPDSDC), was verknüpft über den Crosslinker BM(POE)₂ mit einem Peptid aus der p53 DNA-Binderegion (C₁₈₂SDSDGLAPPQHLIR) detektiert wurde.

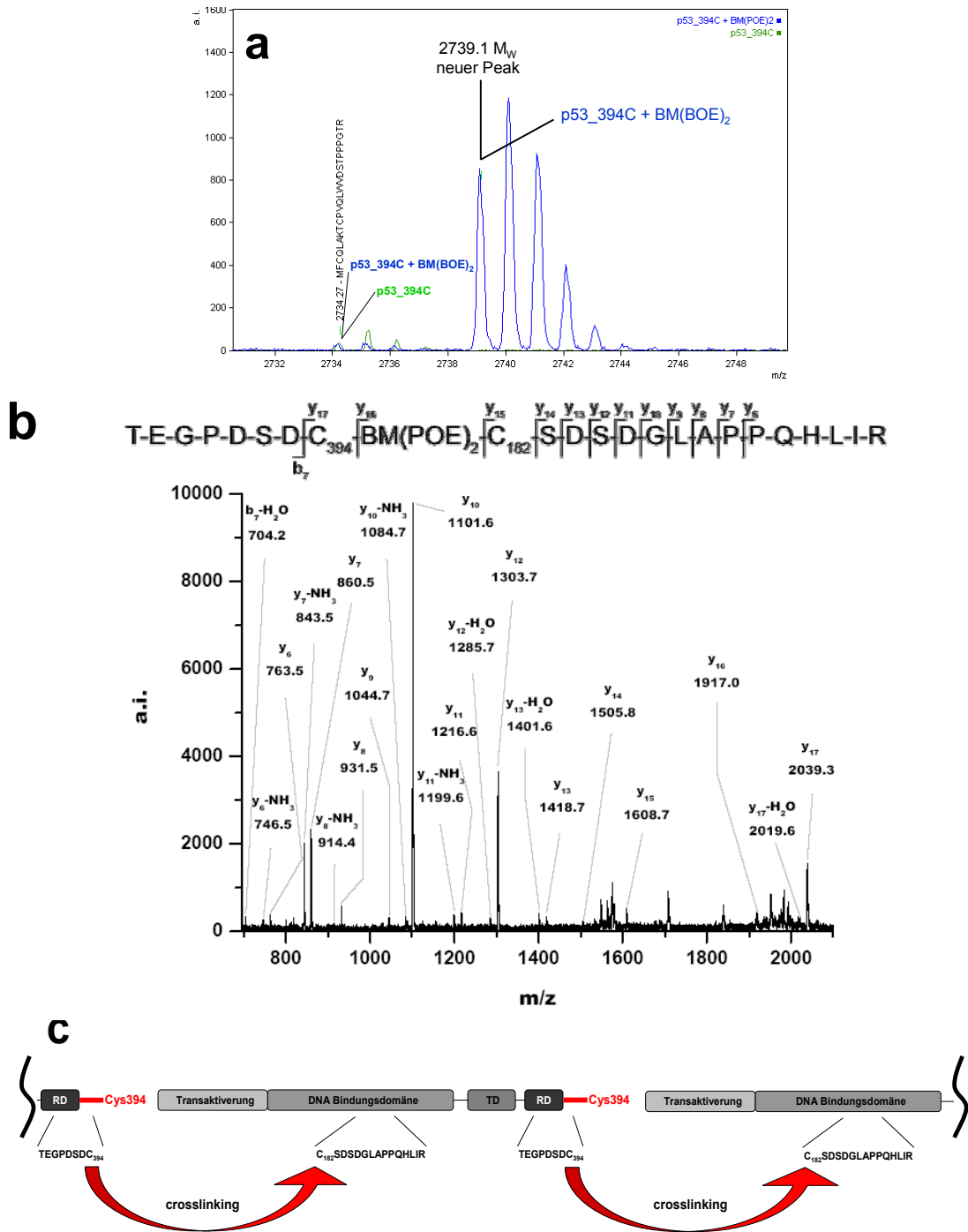


Abbildung 3-51: Massenspektrometrische Analyse der BM(POE)₂ gecrosslinkten p53_394C Tetramere ergibt eine spezifische Verknüpfung von Cys-394 mit Cys-182

A, Überlagerung eines Ausschnitts der beiden Massenspektren für monomeres p53_394C (grün) und für tetrameres p53_394C + BM(POE)₂ (blau). Die Proben wurden nach der SDS-PAGE ausgestochen und nach 2.6.2 für die massenspektrometrischen Analyse vorbereitet. Gezeigt ist der Peak mit der Molekularmasse $M_w = 2734.27$ Da, der bei beiden Massenspektren identifiziert wurde und einem Peptid mit angegebener Sequenz zugeordnet werden konnte. Das Peptid mit der Molekularmasse $M_w = 2739.1$ Da wurde nur im Massenspektrum des mit BM(POE)₂ behandelten tetrameren p53_394C identifiziert. B, sequenzielle, massenspektrometrische Analyse des Peptids mit den entsprechenden Zuordnungen der Zerfallsprozesse. Beide Spektren wurden an einem MALDI_TOF/TOF aufgenommen. C, schematische Darstellung und Lokalisierung der gecrosslinkten Peptide, identifiziert über A und B. Die *inter*-molekulare Wechselwirkung des Cys-394 einer p53 Untereinheit mit dem Cys-182 einer anderen Untereinheit wird durch die SDS-PAGE Analyse deutlich, da hier nur eine dominante Form, ein durch den Crosslinker stabilisiertes Tetramer von p53, auftritt.

Die massenspektrometrische Analyse des gecrosslinkten p53_394C Tetramers ergab, dass das zusätzliche C-terminale Cys-394 in so enger räumliche Nähe der DBD ist, dass es spezifisch über den Crosslinker BM(POE)₂ mit dem Cys-182 der DNA-Bindedomäne interagieren kann (**Abb. 3-51 c**). Dass diese Wechselwirkung auch ohne Crosslinker stattfinden kann, wenn auch zu einem wesentlich geringeren Anteil, zeigte die Eigenschaft von p53_394C unter oxidierenden Bedingungen ebenfalls kovalente Oligomere auszubilden, bei denen genau das carboxymethylierte Peptid fehlte, was hier über die massenspektrometrische Analyse identifiziert wurde. Die Ausbildung von dominanten, verbrückten p53 Tetrameren zeigte weiterhin, dass die Wechselwirkung der Regulationsdomäne einer p53 Untereinheit nicht *intra*-molekular, sondern ausschließlich *inter*-molekular stattfindet.

3.7.12 Analyse der DNA Bindeeigenschaft und der Molekülgestalt von p53 Varianten über analytische Ultrazentrifugation

Zur Klärung der unterschiedlich gemessenen Änderungen der Anisotropie wurden Sedimentationsläufe in der analytischen Ultrazentrifuge mit den p53 Varianten und FITC-markierter p21-DNA durchgeführt. Die Komplexierung der DNA durch p53 wurde einmal bei einer p53 Konzentration durchgeführt, bei der noch freie DNA unkomplexiert vorliegt (**Abb. 3-52 a**) und einmal mit 10fachem Überschuss an p53, so dass alle sich in der Lösung befindende DNA an p53 gebunden sein sollte (**Abb. 3-52 b**).

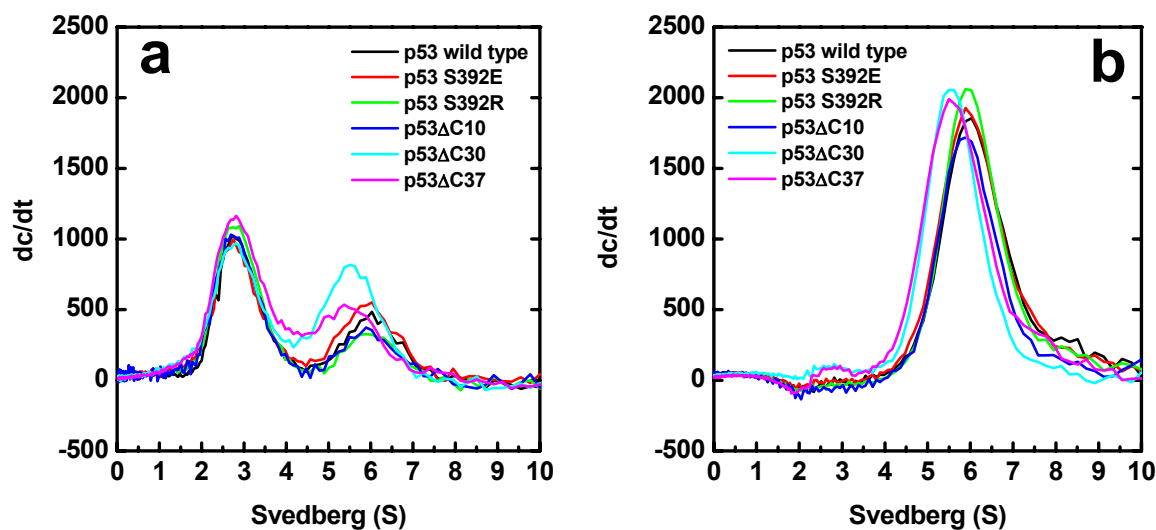


Abbildung 3-52: Charakterisierung der DNA Bindungseigenschaften und der Molekülgestalt vom freien und DNA-komplexgebundenen p53 über analytische Ultrazentrifugation

A, 100 nM p53 Wildtyp und p53 Mutanten wurden zusammen mit 50 nM p21-ds-DNA für 30 min bei 4 °C inkubiert und per analytische Ultrazentrifugation analysiert. Freie p21-DNA mit der Molekularmasse $M_w = 24$ kDa zeigt einen Sedimentationskoeffizient von 2.8 S. In gebundener Form vergrößert sich der Sedimentationskoeffizient auf bis zu mehr als 6 S. **B**, 500 nM p53 Wildtyp und p53 Mutanten wurden mit 50 nM p21-DNA unter den selben Bedingungen wie unter A inkubiert und der aUZ analysiert. Die Aufnahme und die Auswertung der aUZ Daten wurde von Titus Franzman durchgeführt.

Die Analyse ergab, dass alle p53 Varianten eine vergleichbare Menge an DNA komplexierten, angezeigt durch die Verschiebung der Svedberg-Konstanten (S) von 2.8 auf 6 S. Weiterhin zeigte die Analyse, dass sich die Form der p53 Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht drastisch ändert, da bei allen Mutanten vergleichbare Svedberg-Konstanten gemessen wurden. Die Verringerung der Svedberg-Konstante bei den C-terminalen Deletionsmutanten ist auf die geringere Molekularmasse zurückzuführen.

3.7.13 Das tetramere p53 wird durch ein Zusammenspiel der Domänen funktionalisiert

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der einzelnen Domänen auf die Struktur, die Aktivität und das Oligomerisierungsverhalten von p53 charakterisiert. Es zeichnete sich eindeutig ab, dass die p53 DNA-Bindedomäne ausschließlich verantwortlich ist für die Stabilität von p53. Alle weiteren Domänen beeinflussen zwar das Denaturierungsverhalten, nicht aber die thermische Stabilität an sich. Anders verhält es sich hingegen bei der Oligomerisierung. Die ersten Versuche zeigten, dass die Deletion der regulatorischen Domäne die Tetramerisierungseigenschaften von p53 verschlechtert. Je mehr die C-

terminale Domäne verkürzt wurde, desto geringer war die Tendenz von p53, Tetramere zu bilden. Diese Eigenschaft konnte mit Hilfe einer C-terminalen Cystein-Mutante aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulationsdomäne einer Untereinheit von p53 an die DNA-Bindedomäne einer anderen Untereinheit *inter*-molekular bindet und dadurch das Tetramer stabilisiert (**Abb. 3-53**). Die Bindung der C-terminalen Regulationsdomäne an die DNA-Bindefläche von p53 ist eher schwach und kann daher von der DNA, die um die gleiche Bindestelle konkurriert, auf Grund der höheren Affinität verdrängt werden. Das könnte Aufschluss über die Funktion dieser Brückenbildung im p53 Tetramer geben. Liegt p53 in seiner tetrameren Form vor, ist es aktiver und stabiler (Nichols et al., 2002). Der hier aufgezeigte Regulationsmechanismus könnte p53 so lange in der aktiven, tetrameren Form halten, bis p53 über die DBD an DNA bindet. Bedenkt man die geringe Konzentration von p53 in der Zelle und die hohe *turnover* Rate, könnten solche Regulationsmechanismen den Ausschlag geben, ob p53 aktiv vorliegt oder abgebaut wird. Zusätzliche post-translationale Modifikationen können diesen Regulationsmechanismus zudem verstärken. Die Serin-Phosphorylierung an Position 392 z.B. wird als Aktivationsmechanismus beschrieben (Nichols et al., 2002). Es konnte hier gezeigt werden, dass die Serin-Phosphorylierung eines von dem p53 C-Terminus abgeleiteten Peptids an eine neue Region um Arg-280 der p53 DNA-Binderegion bindet und dass qualitativ die Affinität dieses Peptids zu p53 im Vergleich zum unmodifizierten Peptids steigt. Durch die NMR-Experimente sowie durch die massenspektrometrische Analyse der kovalent-verknüpften p53_394C Mutante konnte deutlich die enge räumliche Nähe des C-terminalen Endes der Regulationsdomäne zu der p53 DBD, vor allem zu Arg-280 und zu Cys-182 gezeigt werden, die sich beide in der DNA-Bindefläche von p53 befinden. Eine Aktivitätsanalyse von p53 Varianten in Lösung ergab, dass die spezifische DNA-Bindung u.a. stark von der N-terminalen Transaktivierungsdomäne beeinflusst wird. Eine Deletion der N-terminalen Domäne resultierte in einer Zunahme der Affinität zur DNA. Ob dieser Effekt funktionale oder sterische Gründe hat, konnte hier nicht geklärt werden. Der Einfluss der C-terminalen Regulationsdomäne in diesen Aktivitätsassays war maginal, was an den eingesetzten Konzentrationen liegen könnte, die weit über dem K_D (≈ 40 nM) für die Tetramerisierung von p53 liegen. Herauszufinden, was genau der Effekt der Interaktion der Regulationsdomäne mit der DNA-Bindedomäne im Bezug auf die Funktionalität von p53 ist, wird Gegenstand der zukünftigen Forschung sein.

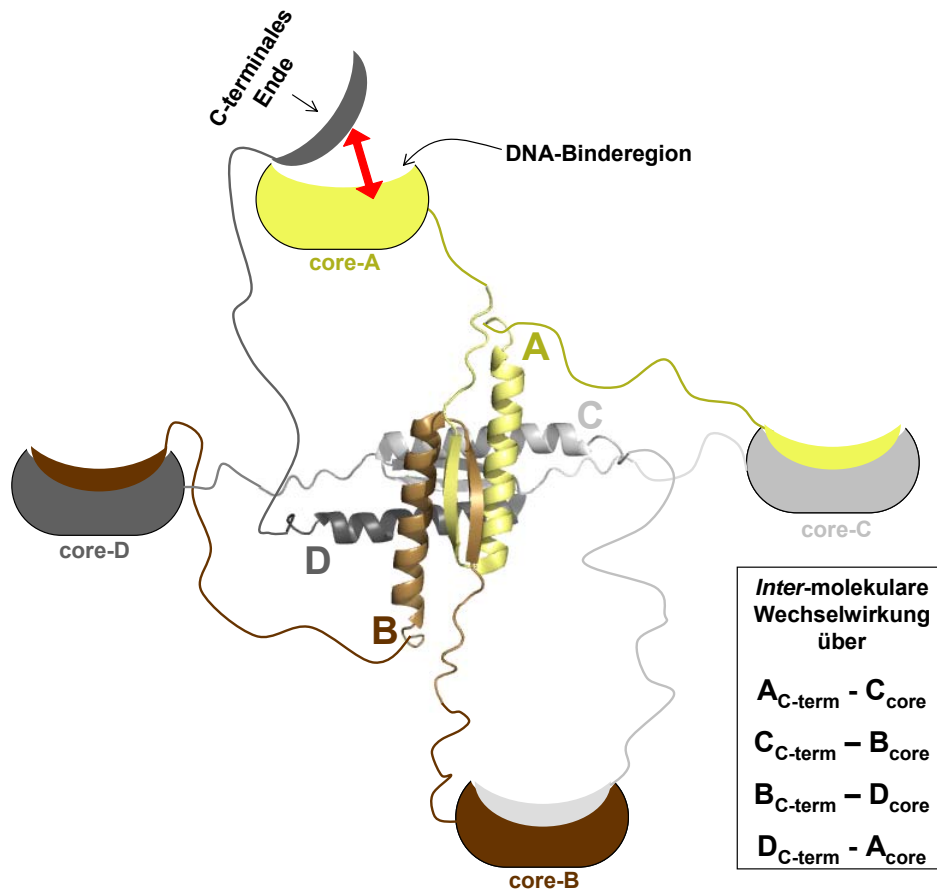


Abb. 3-53: Inter-play in tetramerem p53

Schematisches Modell der *inter*-molekularen Interaktionen im p53 Tetramer. In der Mitte ist die Tetramerisierungsdomäne gezeigt (pdb: 3sak). Das p53 Tetramer besteht aus einem Dimer von Dimeren. Je ein Dimer bilden die Untereinheiten A (gold) und B (braun), sowie C (hellgrau) und D (dunkelgrau). Weiterhin ist dargestellt: die Wechselwirkung des carboxy-terminalen Tails einer Untereinheit eines Dimers mit der DNA-Binderegion einer anderen Untereinheit aus dem anderen Dimer. Die inter-molekularen Wechselwirkungen über A – C und B – D stabilisieren das Tetramer. (Es kann dabei nicht unterschieden werden, ob die Wechselwirkungen nicht über A – D sowie B – C verlaufen.) Die Interaktion zwischen C-terminaler Domäne und DNA-Binderegion wird wahrscheinlich durch post-translationale Modifikationen beeinflusst. Phosphorylierung an Ser-392 scheint die Interaktion zu verstärken.

4 Diskussion

4.1 Konformationsgleichgewichte in den Hsp90-Proteinen

In den letzten drei Jahren wurde mit Hilfe von biophysikalischen Methoden, Kristall- und EM-Daten ein genaues Bild über die Struktur und die Konformationsänderungen von Hsp90 erstellt (Ali et al., 2006; Shiau et al., 2006; Dollins et al., 2006; Hessling et al., in press). Dabei zeigte sich, dass die durch ATP-Bindung induzierten Konformationsänderungen in der Hsp90-Familie konserviert sind (Richter et al., 2008; Frey et al., 2008). Die generellen Konformationsänderungen sind deshalb nicht für die Unterschiede in den Aktivitäten von Hsp90 verantwortlich. Vielmehr wird ein Modell immer wahrscheinlicher, in dem die unterschiedlichen Mitglieder der Hsp90-Familie unterschiedliche Gleichgewichte der Konformationsverteilung ausbilden (Southworth et al., 2008). Hsp90 durchläuft während des ATPase Zyklus, ausgehend von der offenen „entspannten“ Konformation, nach ATP-Bindung einen hochenergetischen geschlossenen „gespannten“ Zustand. Wie stark die offene Konformation bevorzugt wird und wie hoch die Energiebarriere für die N-terminale Dimerisierung und die damit verbundenen energetisch ungünstigen Konformationsänderungen ist, scheint den Unterschied zwischen den Hsp90 Homologen auszumachen und könnte erklären, warum die ATPase von humanem Hsp90-Protein um ein Vielfaches geringer ist als die der Hefe Homologen (Richter et al., 2008; McLaughlin et al., 2006; Southworth et al., 2008). Interessanterweise können scheinbar zwar Co-Chaperone nicht aber Substrate dieses konformationelle Gleichgewicht von Hsp90 signifikant verschieben, was auf eine Substratbindestelle in Hsp90 hindeutet, die nicht direkt in die Konformationsänderungen eingebunden ist, was in Kapitel 4.4 diskutiert wird (Ali et al., 2006; Richter et al., 2003; Siligardi et al. 2004).

4.2 Ein konservierter „Druckpunkt“ in der Hsp90-Familie reguliert die Hsp90 Aktivität

Das angesprochene Konformationsgleichgewicht in den Hsp90-Proteinen kann durch einen „Druckpunkt“ in der C-terminalen Domäne von Hsp90 verschoben werden. In höheren Eukaryoten, bei denen sich an dieser Stelle ein konserviertes Cystein befindet, kann das Konformationsgleichgewicht und, direkt damit verbunden, die ATPase Aktivität von Hsp90 durch die S-Nitrosylierung der Cystein Seitenkette reguliert werden (Martinez-Ruiz et al., 2005). Zudem ist Hsp90 eine molekulare Maschine, die auch durch weitere post-translationale Modifikationen reguliert werden kann (Scroggins et al., 2007b). Die S-

Nitrosylierung von Hsp90 betrifft einen Cystein-Rest, der sich in einer aus drei Strängen aufgebauten β -Faltblattstruktur in der Nähe der Dimerisierungshelix befindet. In der vorliegenden Arbeit wurde in zwei Vertretern der Hsp90-Familie die Seitengruppe dieses Restes variiert und der Einfluss die Aktivität von Hsp90 untersucht. Es zeigte sich, dass, obwohl an dieser Stelle keine Aminosäure in der Hsp90-Familie hochkonserviert ist, der Druckpunkt für die Regulation von Hsp90 in der ganzen Familie konserviert ist. Durch die Veränderungen der Seitenkette des Druckpunktes konnten sowohl aktivere als auch fast gänzlich inaktive Hsp90 Punktmutanten in Bezug auf die ATPase und Chaperonaktivität erzeugt werden. Dieser Druckpunkt scheint das Konformationsgleichgewicht der ATPase und direkt die Dimerisierungseigenschaften von Hsp90 zu beeinflussen. Punktmutationen, die eine S-Nitrosylierung nachahmen, scheinen das Konformationsgleichgewicht zu einer offenen Struktur zu verschieben und dadurch die Energiebarriere zu erhöhen, die für die N-terminale Dimerisierung während der ATP-Hydrolyse notwendig ist, um so die Aktivität von Hsp90 zu reduzieren. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich dieser Effekt auf die Hsp90-vermittelte Reifung und Stimulierung von Substraten *in vivo* auswirkt, ohne jedoch die essentielle Funktion von Hsp90 für die Lebensfähigkeit zu beeinflussen.

Durch den beschriebenen Druckpunkt kann die Aktivität von Hsp90 durch eine einzelne Aminosäure variiert und den Lebensbedingungen des jeweiligen Organismus angepasst werden. Durch die Konservierung des Cysteins an diesem Druckpunkt in höheren Eukaryoten kann weiterhin das zelluläre Level an freiem NO durch die Hsp90-abhängige Stimulation der NO-Synthasen in einer *feedback* Schleife reguliert werden.

Anscheinend hat sich diese Stelle in Hsp90 ko-evolutionär mit den Aufgaben von Hsp90 entwickelt und die Aktivität von Hsp90 wurde seiner Aufgabe in der Zelle angepasst. Hsp90, das auch als „Kondensator für morphologische Evolution“ beschrieben wurde (Mayer and Bukau, 1999; Rutherford and Lindquist, 1998) scheint hier selbst der evolutionären Entwicklung zu unterliegen.

4.3 Das Co-Chaperon Aha1 aktiviert Hsp90 über einen intermediären, kompakten Zustand

Dass für die Regulation von Hsp90 besonders unter Stressbedingungen die Co-Chaperone eine entscheidende Rolle bei der Substratprozessierung spielen, wurde in vielen Versuchen verdeutlicht (Nathan et al., 1999; Richter et al., 2004; Wandinger et al., 2006; Wegele et al., 2006). Allerdings ist noch immer nicht klar, wie die Co-Chaperone in den ATPase und Chaperonzyklus von Hsp90 eingreifen. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Mechanismus

des einzig bisher bekannten Aktivators von Hsp90 Aha1 untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Bindung von Aha1 an Hsp90 einen kompakteren Zustand induziert und diesen durch Interaktion mit einer zweiten Bindestelle, die nach ATP-Bindung zugänglich wird, stabilisiert. Interessanterweise reicht die Bindung eines Aha1 Monomers aus, um eine vollständige Aktivierung des Hsp90 Dimers zu erhalten, was auch unter zellulären Verhältnissen plausibel erscheint, da die Konzentration von Hsp90 im Cytosol etwa 30mal höher im Vergleich zu Aha1 ist (Ghaemmaghami et al., 2003). Die Bindung von einem Molekül Aha1 setzt demnach voraus, dass sich im Hsp90 ATPase-Zyklus ein intermediärer, asymmetrischer Komplex ausbilden muss. Die Ausbildung von asymmetrischen Komplexen könnte ein Schlüsselschritt im Zusammenspiel der gleichzeitigen Bindung von Co-Chaperonen und Substraten an Hsp90 sein, wie es für den ternären Komplex aus Hsp90-Cdc37-Cdk4 gezeigt werden konnte (Vaughan et al., 2006). In dieser Arbeit konnte zudem die Interaktionsfläche zwischen Hsp90 und Aha1 residual bestimmt werden. Ein Vergleich mit der Interaktionsfläche anderer Co-Chaperonen mit Hsp90 unter Einbeziehung der biochemischen Daten, ermöglicht es, ein Bild zu erstellen, welche Co-Chaperone gleichzeitig an der Regulation von Hsp90 beteiligt sein könnten. Wie schon früher berichtet wurde, ist die gleichzeitige Bindung von Aha1 und Sti1 an Hsp90 ausgeschlossen (Panaretou et al., 2002; Lotz et al., 2003; Harst et al., 2005), was mit den in dieser Arbeit erstellten Modell übereinstimmt, in dem Aha1 vorzugsweise an den geschlossenen Zustand bindet, im Gegensatz zu Sti1 (Richter et al., 2003). Die Bindung von p23/Sba1 und Aha1 an Hsp90 dagegen scheint nicht-kompetitiv zu verlaufen. Sowohl p23/Sba1 als auch Aha1 binden bevorzugt an den geschlossenen Zustand von Hsp90 und scheinen diesen zu stabilisieren (Sullivan et al., 2002; Ali et al., 2006; McLaughlin et al., 2006). Diese Co-Chaperone zeigen aber eine unterschiedliche Regulation der Hsp90 ATPase Aktivität. Daran zeigt sich, dass nicht nur die Verschiebung des Konformationsgleichgewichts zwischen offener und geschlossener Struktur von Hsp90 für die Regulation der ATPase Aktivität wichtig ist, sondern das noch weitere Effekte regulatorisch wirken, wie hier der Einfluss der Co-Chaperonbindung auf die Konformation der N-terminale ATPase-Domäne, genauer des ATP-Lids. Hier wird vor allem das Zusammenspiel zwischen der Domänenorientierung im Hsp90 Dimer und der strukturellen Änderung der individuellen Domänen deutlich, die zusammen die Aktivität von Hsp90 beeinflussen.

4.4 Die Interaktion von Hsp90 und p53

Nach der detaillierten Aufklärung der (strukturellen) Zustände im ATPase Zyklus von Hsp90 ist die entscheidende Frage, wie Hsp90 seine Substrate erkennt und in den ATPase Zyklus zur Substratprozessierung einbindet. Dazu ist in der Literatur noch sehr wenig bekannt. Man vermutet, dass der Mitteldomäne bei der Unterscheidung von Substraten eine gewisse Rolle zukommt (Hawle et al., 2006). In dieser Arbeit dazu gezeigt werden, dass sich die Interaktionsfläche von Hsp90 mit seinem Substrat p53 an der äußeren Seite des Hsp90 Dimers befindet. Dieser Bereich unterliegt keinen signifikanten Konformationsänderungen innerhalb des ATPase Zyklus von Hsp90, was mit der hier postulierten nukleotid-unabhängigen Interaktion von Hsp90 mit p53 übereinstimmt. Dabei wird die Wechselwirkung der beiden Proteine durch eine sehr große Fläche bestimmt. Es konnte jedoch einzelnen Punktmutationen in Hsp90 erzeugt werden, die einen signifikanten Verlust der Hsp90-vermittelten Stimulierung der p53 Aktivität zeigten.

Die Affinität beider Proteine im nativen Zustand liegt im unteren micromolaren Bereich, wobei eine vollständige Dissoziation des Hsp90*p53 Komplexes durch die Anwesenheit der p53 Konsensus-DNA innerhalb von Sekunden induziert werden konnte. Die Affinität von p53 an die DNA ist dabei mindestens um Faktor-10 höher. Interessanterweise überlappen die Binderegionen von Hsp90 und DNA auf der p53 DNA-Bindedomäne und es konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindedomäne von p53 durch die Anwesenheit von DNA thermodynamisch stabilisiert werden konnte (Bullock et al., 1997). Das könnte darauf hindeuten, dass Hsp90 das Substrat so lange bindet und in der aktiven Konformation hält, bis es seine eigentliche Aufgabe, in diesem Fall die Bindung der DNA, erfüllen kann. Somit wirkt hier das molekulare Chaperon Hsp90 eher als „Holdase“ denn als „Foldase“ seiner Substrate. Bei der biochemischen Charakterisierung der individuellen Domänen von Hsp90 erwies sich die Hsp90 Mitteldomäne als sehr stabile, kompakt gefaltete Domäne, die eine hohe Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen und Denaturierungsmitteln zeigte. Unter physiologischen Bedingungen und vor allem unter Stressbedingungen liegt es nahe, dass labile Substrate von dieser kompakten Domäne erkannt und gebunden werden. Die Freisetzung des Substrates erfolgt durch die Anwesenheit eines Co-Faktors des Substrates. Es konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden, wie die Substraterkennung mit der ATPase-gekoppelten Prozessierung des Substrats zusammenhängt. Es wurde weder ein Einfluss des Substrates auf die ATPase Aktivität von Hsp90 festgestellt, noch eine signifikant veränderte Affinität von Hsp90 zu p53 in Anwesenheit von Nukleotiden. In der Strukturanalyse des *E. coli*-Homologen HtpG

wurde allerdings eine Struktur identifiziert, die nach ATP-Hydrolyse im ADP-gebundenen Zustand eine kompakte Konformation einnimmt, bei der die N-terminale Domäne mit der Hsp90 Mitteldomäne in der Art wechselwirkt, die eine Freisetzung des Substrats auf Grund von überlappenden Interaktionsflächen zur Folge haben müsste (Krukenberg et al., 2008; Cunningham & Agard, 2008).

4.5 Die *inter*-molekularen Wechselwirkungen im tetrameren p53

Der Transkriptionsfaktor p53 ist als „Wächter des Genoms“ (Levine, 1997; Lane, 1992) ein entscheidender Regulator, dessen Verlust an Funktionen durch so genannte *hot spot* Mutationen in der DNA-Binderegion die Entstehung von Tumoren begünstigt (Hernandez-Boussard et al., 1999). Die wichtigste Eigenschaft von p53 ist die Erkennung von DNA-Schäden und die darauf folgende Einleitung von Reparatur- oder Apoptosemechanismen. Die Regulation der p53 Aktivität erfolgt dabei durch die *turnover* Rate von p53, die ganz entscheidend von seinem Antagonisten Mdm2 abhängt (Juven-Gershon & Oren, 1999; Freedman et al., 1997). Weiterhin können post-translationale Modifikationen, die vor allem die N- und C-terminalen Bereiche von p53 betreffen, die Aktivität von p53 (Brooks & Gu, 2003; Bode & Dong, 2004).

Trotz seiner zentralen Bedeutung ist die biochemische Charakterisierung des nativen Volllängenproteins p53 unvollständig. Es wurde in der Vergangenheit hauptsächlich mit individuellen Domänen von p53 gearbeitet, was ein Verständnis der Kommunikation der einzelnen Domänen in p53 von vornherein ausschließt. In dieser Arbeit wurde daher mit nativem, unmarkiertem p53 Protein gearbeitet, um den Einfluss der einzelnen Domänen auf die Struktur-Funktionsbeziehung im p53 Tetramer zu charakterisieren. Dabei wurde deutlich, dass sowohl die N-terminale Domäne, als auch die C-terminale Regulationsdomäne die Aktivität von p53 verändern. Die N-terminale Domäne scheint die spezifische DNA-Bindung der p53 DBD um den Faktor vier zu inhibieren. Diese Verringerung der DNA-Bindung könnte aber rein sterische Gründe haben, da die N-terminale Domäne in p53 nativ entfaltet ist. Die C-terminale Regulationsdomäne, die auch als negative Regulationsdomäne beschrieben wurde (Hupp et al., 1992), zeigt in dieser Arbeit einen stabilisierenden Effekt auf die Tetramerisierung von p53 durch eine Wechselwirkung mit der DNA-Binderegion. Dabei konnte eine direkte Interaktion der letzten zehn C-terminalen Aminosäuren mit der sensiblen DNA-Binderegion in p53 nachgewiesen werden. In p53 ist die Interaktion der C-terminalen Regulationsdomäne mit der DNA-Binderegion *inter*-molekular, so dass eine kreisförmige Kommunikation im p53

Tetramer stattfindet, welche direkt die Tetramerisierung stabilisiert und so p53 in seiner aktiven Konformation hält. Somit wirkt die Regulationsdomäne nicht negativ-inhibierend auf p53, sondern kann die Tetramerisierung von p53 stabilisieren. Dieser Effekt könnte physiologisch eine große Bedeutung haben, berücksichtigt man das geringe Expressionslevel von p53, das im Gegensatz zu der Abhängigkeit der p53 Aktivität von seiner tetrameren Form steht (Davison et al., 2001; Hainaut et al., 1994). Erste Quartärstrukturanalysen von p53 (**Abb. 1-14**) zeigten die Architektur von p53 im offenen und geschlossenen Zustand (Tidow et al., 2006), wobei die Rolle der C-terminalen Domäne nicht geklärt werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die C-terminale Regulationsdomäne eine Art DNA-Mimikum bildet, die *inter*-molekular die labile DNA-Binderegion in p53 stabilisieren könnte und zwar in der Art, wie es auch bei der Assoziation der DNA für p53 gezeigt wurde (Bullock et al., 1997).

5 Literaturverzeichnis

- Akakura,S., Yoshida,M., Yoneda,Y., and Horinouchi,S. (2001). A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *J. Biol. Chem.*, **276**, 14649-14657.
- Ali,J.A., Jackson,A.P., Howells,A.J., & Maxwell,A. (1993). The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry*, **32**, 2717-2724.
- Ali,M.M., Roe,S.M., Vaughan,C.K., Meyer,P., Panaretou,B., Piper,P.W., Prodromou,C., & Pearl,L.H. (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, **440**, 1013-1017.
- Anderson,M.E., Woelker,B., Reed,M., Wang,P., and 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,C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- Anfinsen,C.B., Haber,E., Sela,M., & White,F.H., Jr. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **47**, 1309-1314.
- Ang,H.C., Joerger,A.C., Mayer,S., and Fersht,A.R. (2006). Effects of common cancer mutations on stability and DNA binding of full-length p53 compared with isolated core domains. *J. Biol. Chem.*, **281**, 21934-21941.
- Bakalkin,G., Selivanova,G., Yakovleva,T., Kiseleva,E., Kashuba,E., Magnusson,K.P., Szekeley,L., Klein,G., Terenius,L., and Wiman,K.G. (1995). p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 362-369.
- Balagurumoorthy,P., Sakamoto,H., Lewis,M.S., Zambrano,N., Clore,G.M., Gronenborn,A.M., Appella,E., and Harrington,R.E. (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.
- Ban,C. & Yang,W. (1998). Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell*, **95**, 541-552.
- Bardwell,J.C. & Craig,E.A. (1988). Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.*, **170**, 2977-2983.
- Barlev,N.A., Liu,L., Chehab,N.H., Mansfield,K., Harris,K.G., Halazonetis,T.D., and Berger,S.L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol. Cell*, **8**, 1243-1254.
- Bates,G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet*, **361**, 1642-1644.
- Beck,J. and Nassal,M. (2003). Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36128-36138.
- Becker,W., Kentrup,H., Klumpp,S., Schultz,J.E., & Joost,H.G. (1994). Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22586-22592.
- Beissinger,M. and Buchner,J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.*, **379**, 245-259.

- Bell,S., Hansen,S., and Buchner,J. (2002). Refolding and structural characterization of the human p53 tumor suppressor protein. *Biophys. Chem.*, **96**, 243-257.
- Benaroudj,N., Batelier,G., Triniolles,F., and Ladjimi,M.M. (1995). Self-association of the molecular chaperone HSC70. *Biochemistry*, **34**, 15282-15290.
- Bergerat,A., de Massy,B., Gadelle,D., Varoutas,P.C., Nicolas,A., & Forterre,P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, **386**, 414-417.
- Bergman,L.W. and Kuehl,W.M. (1979). Formation of intermolecular disulfide bonds on nascent immunoglobulin polypeptides. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5690-5694.
- Beyreuther,K., Bush,A.I., Dyrks,T., Hilbich,C., Konig,G., Monning,U., Multhaup,G., Prior,R., Rumble,B. & Schubert,W. (1991). Mechanisms of amyloid deposition in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **640**, 129-139.
- Bilwes,A.M., Alex,L.A., Crane,B.R., & Simon,M.I. (1999). Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell*, **96**, 131-141.
- Birnby,D.A., Link,E.M., Vowels,J.J., Tian,H., Colacurcio,P.L., & Thomas,J.H. (2000). A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **155**, 85-104.
- Blond-Elguindi,S., Fourie,A.M., Sambrook,J.F., and Gething,M.J. (1993). Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J. Biol. Chem.*, **268**, 12730-12735.
- Bode,A.M. and Dong,Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 793-805.
- Boguski,M.S., Sikorski,R.S., Hieter,P., & Goebel,M. (1990). Expanding family. *Nature*, **346**, 114.
- Bonnefoy,S., Attal,G., Langsley,G., Tekaia,F., & Mercereau-Puijalon,O. (1994). Molecular characterization of the heat shock protein 90 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **67**, 157-170.
- Bork,P., Sander,C., & Valencia,A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 7290-7294.
- Borkovich,K.A., Farrelly,F.W., Finkelstein,D.B., Taulien,J., & Lindquist,S. (1989). hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 3919-3930.
- Bose,S., Weikl,T., Bugl,H., & Buchner,J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science*, **274**, 1715-1717.
- Bosl,B., Grimminger,V., & Walter,S. (2006). The molecular chaperone Hsp104--a molecular machine for protein disaggregation. *J. Struct. Biol.*, **156**, 139-148.
- Bossy-Wetzel,E., Schwarzenbacher,R., & Lipton,S.A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat. Med.*, **10 Suppl**, S2-S9.
- Bourdon,J.C., Fernandes,K., Murray-Zmijewski,F., Liu,G., Diot,A., Xirodimas,D.P., Saville,M.K., and Lane,D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.*, **19**, 2122-2137.
- Braakman,I., Hoover-Litty,H., Wagner,K.R., and Helenius,A. (1991). Folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **114**, 401-411.
- Brady,J.P., Garland,D., Douglas-Tabor,Y., Robison,W.G., Jr., Groome,A., and Wawrousek,E.F. (1997). Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion

- bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 884-889.
- Brandts,J.F., Halvorson,H.R., & Brennan,M. (1975). Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry*, **14**, 4953-4963.
- Brooks,C.L. and Gu,W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 164-171.
- Brugge,J.S. (1986). Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60src with the cellular proteins pp50 and pp90. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **123**, 1-22.
- Buchner,J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.*, **10**, 10-19.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. – a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.*, **24(4)**, 136-41.
- Bukau,B. and Horwich,A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.
- Bullock,A.N. and Fersht,A.R. (2001). Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 68-76.
- Bullock,A.N., Henckel,J., DeDecker,B.S., Johnson,C.M., Nikolova,P.V., Proctor,M.R., Lane,D.P., and Fersht,A.R. (1997). Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 14338-14342.
- Campomenosi,P., Monti,P., Aprile,A., Abbondandolo,A., Frebourg,T., Gold,B., Crook,T., Inga,A., Resnick,M.A., Iggo,R., and Fronza,G. (2001). p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene*, **20**, 3573-3579.
- Caspari,T. (2000). How to activate p53. *Curr. Biol.*, **10**, R315-R317.
- Caplan,A.J., Mandal,A.K., & Theodoraki,M.A. (2007). Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol.*, **17**, 87-92.
- Cashikar,A.G., Duennwald,M., & Lindquist,S.L. (2005). A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J. Biol. Chem.*, **280**, 23869-23875.
- Chadli,A., Bouhouche,I., Sullivan,W., Stensgard,B., McMahon,N., Catelli,M.G., & Toft,D.O. (2000). Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 12524-12529.
- Cheetham,M.E., Jackson,A.P., and Anderton,B.H. (1994). Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HsJ1a and HsJ1b. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 99-107.
- Chen,B., Piel,W.H., Gui,L., Bruford,E., & Monteiro,A. (2005). 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*, **7**, 156.
- Chen,S., Prapapanich,V., Rimerman,R.A., Honore,B., & Smith,D.F. (1996). Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70. *Mol. Endocrinol.*, **10**, 682-693.
- Chen,S. & Smith,D.F. (1998). Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, **273**, 35194-35200.
- Chene,P. (1998). In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *J. Mol. Biol.*, **281**, 205-209.

- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-355.
- Clevenger, R.C. & Blagg, B.S. (2004). Design, synthesis, and evaluation of a radicicol and geldanamycin chimera, radamide. *Org. Lett.*, **6**, 4459-4462.
- Clore, G.M., Ernst, J., Clubb, R., Omichinski, J.G., Kennedy, W.M., Sakaguchi, K., Appella, E., and Gronenborn, A.M. (1995). Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 321-333.
- Cowen, L.E. and Lindquist, S. (2005). Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science*, **309**, 2185-2189.
- Craig, E.A., Huang, P., Aron, R., & Andrew, A. (2006). The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.*, **156**, 1-21.
- Craig, E.A., Eisenman, H.C., and Hundley, H.A. (2003). Ribosome-tethered molecular chaperones: the first line of defense against protein misfolding? *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 157-162.
- Craig, E.A. & Yan, P.J., (1999), Molecular Chaperones and Folding-Catalysts, Ed: Bukau, B., *Harwood*, Amsterdam
- Creighton, T.E. (1990). Protein folding. *Biochem. J.*, **270**, 1-16.
- Cunningham, C.N., Krukenberg, K.A., and Agard, D.A. (2008). Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90. *J. Biol. Chem.*, **283**, 21170-21178.
- Darby, N.J., Freedman, R.B., & Creighton, T.E. (1994). Dissecting the mechanism of protein disulfide isomerase: catalysis of disulfide bond formation in a model peptide. *Biochemistry*, **33**, 7937-7947.
- Dasgupta, G. and Momand, J. (1997). Geldanamycin prevents nuclear translocation of mutant p53. *Exp. Cell Res.*, **237**, 29-37.
- Davison, T.S., Nie, X., Ma, W., Lin, Y., Kay, C., Benchimol, S., and Arrowsmith, C.H. (2001). Structure and functionality of a designed p53 dimer. *J. Mol. Biol.*, **307**, 605-617.
- Dawson, R., Muller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H., and Buchner, J. (2003). The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J. Mol. Biol.*, **332**, 1131-1141.
- Dehner, A., Furrer, J., Richter, K., Schuster, I., Buchner, J., and Kessler, H. (2003). NMR chemical shift perturbation study of the N-terminal domain of Hsp90 upon binding of ADP, AMP-PNP, geldanamycin, and radicicol. *Chembiochem.*, **4**, 870-877.
- Dehner, A., Klein, C., Hansen, S., Muller, L., Buchner, J., Schwaiger, M., and 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.
- de Jong, W.W., Leunissen, J.A., & Voorter, C.E. (1993). Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 103-126.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., and Neill, S.J. (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.*, **55**, 205-212.
- Dey, B., Lightbody, J.J., & Boschelli, F. (1996). CDC37 is required for p60v-src activity in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1405-1417.
- Dill, K.A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K.M., Yee, D.P., Thomas, P.D., and Chan, H.S. (1995). Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Sci.*, **4**, 561-602.
- Dill, K.A. and Chan, H.S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 10-19.

- Dolinski, K.J., Cardenas, M.E., & Heitman, J. (1998). CNS1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 7344-7352.
- Dollins, D.E., Warren, J.J., Immormino, R.M., & Gewirth, D.T. (2007). Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol. Cell*, **28**, 41-56.
- Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1731-1737.
- Donnelly, A. and Blagg, B.S. (2008). Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 2702-2717.
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H., and Dixit, V.M. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*, **429**, 86-92.
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics.*, **21**, 3433-3434.
- Dougherty, J.J., Puri, R.K., and Toft, D.O. (1982). Phosphorylation in vivo of chicken oviduct progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, **257**, 14226-14230.
- Dougherty, J.J., Rabideau, D.A., Iannotti, A.M., Sullivan, W.P., and Toft, D.O. (1987). Identification of the 90 kDa substrate of rat liver type II casein kinase with the heat shock protein which binds steroid receptors. *Biochim. Biophys. Acta*, **927**, 74-80.
- Duina, A.A., Chang, H.C., Marsh, J.A., Lindquist, S., & Gaber, R.F. (1996a). A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science*, **274**, 1713-1715.
- Duina, A.A., Marsh, J.A., & Gaber, R.F. (1996b). Identification of two CyP-40-like cyclophilins in *Saccharomyces cerevisiae*, one of which is required for normal growth. *Yeast*, **12**, 943-952.
- Dutta, R. & Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 24-28.
- Erbse, A., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2004). Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochem. Soc. Trans.*, **32**, 617-621.
- Fairbanks, G., Steck, T.L., and Wallach, D.F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606-2617.
- Falsone, S.F., Leptihn, S., Osterauer, A., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2004). Oncogenic mutations reduce the stability of SRC kinase. *J. Mol. Biol.*, **344**, 281-291.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8945-8951.
- Fang, Y., Fliss, A.E., Rao, J., & Caplan, A.J. (1998). SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 3727-3734.
- Fanghanel, J. & Fischer, G. (2004). Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci.*, **9**, 3453-3478.
- Fenton, W.A. & Horwich, A.L. (1997). GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci.*, **6**, 743-760.
- Fersht, A.R., (1997). Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 3-9.
- Fersht, A.R. and Daggett, V. (2002). Protein folding and unfolding at atomic resolution. *Cell*, **108**, 573-582.

- Fischer,G. & Aumuller,T. (2003). Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.*, **148**, 105-150.
- Fischer, G., (1994). *Angew. Chem.* **106**, 1479-501
- 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.
- Franekova,M., Zubor,P., Stanclova,A., Dussan,C.A., Bohusova,T., Galo,S., Dobrota,D., Kajo,K., Pec,M., and Racay,P. (2007). Association of p53 polymorphisms with breast cancer: a case-control study in Slovak population. *Neoplasma*, **54**, 155-161.
- Freedman,D.A., Epstein,C.B., Roth,J.C., and Levine,A.J. (1997). A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol. Med.*, **3**, 248-259.
- Freedman,R.B., Hirst,T.R., & Tuite,M.F. (1994). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 331-336.
- Freeman,B.C., Toft,D.O., & Morimoto,R.I. (1996). Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science*, **274**, 1718-1720.
- Frey,S., Leskovar,A., Reinstein,J., and Buchner,J. (2007). The ATPase cycle of the endoplasmic chaperone Grp94. *J. Biol. Chem.*, **282**, 35612-35620.
- Friedler,A., Hansson,L.O., Veprintsev,D.B., Freund,S.M., Ripplin,T.M., Nikolova,P.V., Proctor,M.R., Rudiger,S., and Fersht,A.R. (2002). A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: chaperone strategy for rescue of oncogenic mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 937-942.
- Friedler,A., Veprintsev,D.B., Freund,S.M., von Glos,K.I., and Fersht,A.R. (2005). Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation. *Structure.*, **13**, 629-636.
- Frydman,J., Nimmegern,E., Ohtsuka,K., and Hartl,F.U. (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*, **370**, 111-117.
- Fukumura,D., Gohongi,T., Kadambi,A., Izumi,Y., Ang,J., Yun,C.O., Buerk,D.G., Huang,P.L., and Jain,R.K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 2604-2609.
- Fukumura,D., Kashiwagi,S., and Jain,R.K. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 521-534.
- Fulton,A.B. (1982). How crowded is the cytoplasm? *Cell*, **30**, 345-347.
- Galigniana,M.D., Harrell,J.M., O'Hagen,H.M., Ljungman,M., and Pratt,W.B. (2004). Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. *J. Biol. Chem.*, **279**, 22483-22489.
- Gallo,O., Masini,E., Morbidelli,L., Franchi,A., Fini-Storchi,I., Vergari,W.A., and Ziche,M. (1998). Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, 587-596.
- Garcia-Cardena,G., Fan,R., Shah,V., Sorrentino,R., Cirino,G., Papapetropoulos,A., and Sessa,W.C. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, **392**, 821-824.
- Geller,R., Vignuzzi,M., Andino,R., and Frydman,J. (2007). Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance. *Genes Dev.*, **21**, 195-205.
- Georgopoulos,C. and Welch,W.J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 601-634.

- Gething, M.J. & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, **355**, 33-45.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., & Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**, 737-741.
- Glover, J.R. & Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, **94**, 73-82.
- Go, N. and Taketomi, H. (1978). Respective roles of short- and long-range interactions in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 559-563.
- Goetz, M.P., Toft, D., Reid, J., Ames, M., Stensgard, B., Safgren, S., Adjei, A.A., Sloan, J., Atherton, P., Vasile, V., Salazar, S., Adjei, A., Croghan, G., & Erlichman, C. (2005). Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.*, **23**, 1078-1087.
- Goetz, M.P., Toft, D.O., Ames, M.M., & Erlichman, C. (2003). The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann. Oncol.*, **14**, 1169-1176.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A.A., and Lorimer, G.H. (1989). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in Escherichia coli. *Nature*, **337**, 44-47.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 13732-13737.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J.*, **18**, 6462-6471.
- Grammatikakis, N., Vultur, A., Ramana, C.V., Siganou, A., Schweinfest, C.W., Watson, D.K., & Raptis, L. (2002). The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 8312-8320.
- Grenert, J.P., Sullivan, W.P., Fadden, P., Haystead, T.A., Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H.J., Schulte, T.W., Sausville, E., Neckers, L.M., & Toft, D.O. (1997). The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23843-23850.
- Gruber, C.W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J.L., & Craik, D.J. (2006). Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 455-464.
- Gruebele, M. (2002). Protein folding: the free energy surface. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 161-168.
- Grossman, S.R. (2001). p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2773-2778.
- Gu, W., Shi, X.L., and Roeder, R.G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*, **387**, 819-823.
- Gupta, R.S. (1995). Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 1063-1073
- Haas, I.G. and Wabl, M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, **306**, 387-389.
- Hainaut, P., Hall, A., and Milner, J. (1994). Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding. *Oncogene*, **9**, 299-303.
- Hainzl, O., Wegele, H., Richter, K., & Buchner, J. (2004). Cns1 is an activator of the Ssa1 ATPase activity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 23267-23273.

- Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hansen,S., Hupp,T.R., and Lane,D.P. (1996). 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.
- Hao,G., Derakhshan,B., Shi,L., Campagne,F., and Gross,S.S. (2006). SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 1012-1017.
- Harrison,C.J., Hayer-Hartl,M., Di Liberto,M., Hartl,F., and Kuriyan,J. (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science*, **276**, 431-435.
- Harper,J.W. (2004). Neddylation the guardian; Mdm2 catalyzed conjugation of Nedd8 to p53. *Cell*, **118**, 2-4.
- Hartl,F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-579.
- Hartl,F.U. & Hayer-Hartl,M. (2002). Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science*, **295**, 1852-1858.
- Harris,S.F., Shiau,A.K., and Agard,D.A. (2004). The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure.*, **12**, 1087-1097.
- Harst,A., Lin,H., and Obermann,W.M. (2005). Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *Biochem. J.*, **387**, 789-796.
- Haslbeck,M. and Buchner,J. (2002). Chaperone function of sHsps. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **28**, 37-59.
- Haslbeck,M., Franzmann,T., Weinfurter,D., & Buchner,J. (2005a). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 842-846.
- Haslbeck,M., Miess,A., Stromer,T., Walter,S., & Buchner,J. (2005b). Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J. Biol. Chem.*, **280**, 23861-23868.
- Hawle,P., Siepmann,M., Harst,A., Siderius,M., Reusch,H.P., and Obermann,W.M. (2006). The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 8385-8395.
- Helmbrecht,K., Zeise,E., and Rensing,L. (2000). Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.*, **33**, 341-365.
- Hernandez-Boussard,T., Rodriguez-Tome,P., Montesano,R., and Hainaut,P. (1999). IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Cancer. *Hum. Mutat.*, **14**, 1-8.
- Hiyama,T., Yoshihara,M., Tanaka,S., and Chayama,K. (2008). Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int. J. Oncol.*, **32**, 945-973.
- Hofseth,L.J., Hussain,S.P., and Harris,C.C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**, 177-181.
- Holmes,J.L., Sharp,S.Y., Hobbs,S., and Workman,P. (2008). Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.*, **68**, 1188-1197.
- Horwitz, J., (2003). Alpha-crystallin. *Exp. Eye. Res.*, **76(2)**, 145-53.

- Hostein,I., Robertson,D., DiStefano,F., Workman,P., and Clarke,P.A. (2001). Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res.*, **61**, 4003-4009.
- Hupp,T.R. and Lane,D.P. (1994). Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr. Biol.*, **4**, 865-875.
- Hupp,T.R., Lane,D.P., and Ball,K.L. (2000). Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem. J.*, **352 Pt 1**, 1-17.
- Hupp,T.R., Meek,D.W., Midgley,C.A., and Lane,D.P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, **71**, 875-886.
- Hupp,T.R., Sparks,A., and Lane,D.P. (1995). Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell*, **83**, 237-245.
- Iannotti,A.M., Rabideau,D.A., and Dougherty,J.J. (1988). Characterization of purified avian 90,000-Da heat shock protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **264**, 54-60.
- Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., and Kimura,A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.
- Jeffrey,P.D., Gorina,S., and Pavletich,N.P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, **267**, 1498-1502.
- Jesenberger,V. and Jentsch,S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 112-121.
- Johnson,C.R., Morin,P.E., Arrowsmith,C.H., and Freire,E. (1995). Thermodynamic analysis of the structural stability of the tetrameric oligomerization domain of p53 tumor suppressor. *Biochemistry*, **34**, 5309-5316.
- Johnson,B.D., Chadli,A., Felts,S.J., Bouhouche,I., Catelli,M.G., and Toft,D.O. (2000). Hsp90 chaperone activity requires the full-length protein and interaction among its multiple domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 32499-32507.
- Juven-Gershon,T. and Oren,M. (1999). Mdm2: the ups and downs. *Mol. Med.*, **5**, 71-83.
- Kamal,A., Thao,L., Sensintaffar,J., Zhang,L., Boehm,M.F., Fritz,L.C., & Burrows,F.J. (2003). A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, **425**, 407-410.
- Kang,B.H., Plescia,J., Dohi,T., Rosa,J., Doxsey,S.J., and Altieri,D.C. (2007). Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. *Cell*, **131**, 257-270.
- Kang,H., Sayner,S.L., Gross,K.L., Russell,L.C., & Chinkers,M. (2001). Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation. *Biochemistry*, **40**, 10485-10490.
- Kelley,P.M. and Schlesinger,M.J. (1982). Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species. *Mol. Cell Biol.*, **2**, 267-274.
- Kellis,M., Birren,B.W., & Lander,E.S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **428**, 617-624.
- Kern,S.E., Pietenpol,J.A., Thiagalingam,S., Seymour,A., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*, **256**, 827-830.
- Kimura,Y., Rutherford,S.L., Miyata,Y., Yahara,I., Freeman,B.C., Yue,L., Morimoto,R.I., & Lindquist,S. (1997). Cdc37 is a molecular chaperone with specific functions in signal transduction. *Genes Dev.*, **11**, 1775-1785.

- Kitayner,M., Rozenberg,H., Kessler,N., Rabinovich,D., Shaulov,L., Haran,T.E., and Shakked,Z. (2006). Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol. Cell*, **22**, 741-753.
- Klein,C., Planker,E., Diercks,T., Kessler,H., Kunkele,K.P., Lang,K., Hansen,S., and 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.
- Knarr,G., Kies,U., Bell,S., Mayer,M., and Buchner,J. (2002). Interaction of the chaperone BiP with an antibody domain: implications for the chaperone cycle. *J. Mol. Biol.*, **318**, 611-620.
- Ko, L.J. and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, **10**, 1054-72.
- Kortemme,T., Ramirez-Alvarado,M., and Serrano,L. (1998). Design of a 20-amino acid, three-stranded beta-sheet protein. *Science*, **281**, 253-256.
- Kostova,Z. and Wolf,D.H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.*, **22**, 2309-2317.
- Kovacs,J.J., Murphy,P.J., Gaillard,S., Zhao,X., Wu,J.T., Nicchitta,C.V., Yoshida,M., Toft,D.O., Pratt,W.B., and Yao,T.P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell*, **18**, 601-607.
- Krukenberg,K.A., Forster,F., Rice,L.M., Sali,A., and Agard,D.A. (2008). Multiple conformations of E. coli Hsp90 in solution: insights into the conformational dynamics of Hsp90. *Structure.*, **16**, 755-765.
- Kumar,R., Pavithra,S.R., & Tatu,U. (2007). Three-dimensional structure of heat shock protein 90 from Plasmodium falciparum: molecular modelling approach to rational drug design against malaria. *J. Biosci.*, **32**, 531-536.
- Kuster,U., Bohnensack,R., & Kunz,W. (1976). Control of oxidative phosphorylation by the extra-mitochondrial ATP/ADP ratio. *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 391-402.
- Lane,D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.
- Langkjaer,R.B., Cliften,P.F., Johnston,M., & Piskur,J. (2003). Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes. *Nature*, **421**, 848-852.
- Lee,G.J. & Vierling,E. (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol*, **122**, 189-198.
- Lee,S., Sowa,M.E., Choi,J.M., & Tsai,F.T. (2004). The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein disaggregating machine. *J. Struct. Biol.*, **146**, 99-105.
- Lee,W., Harvey,T.S., Yin,Y., Yau,P., Litchfield,D., and Arrowsmith,C.H. (1994). Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. *Nat. Struct. Biol.*, **1**, 877-890.
- Lees-Miller,S.P. and Anderson,C.W. (1989). The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17275-17280.
- Leskovar,A., Wegele,H., Werbeck,N.D., Buchner,J., and Reinstein,J. (2008). The ATPase cycle of the mitochondrial Hsp90 analog Trap1. *J. Biol. Chem.*, **283**, 11677-11688.
- Levine,A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Levinthal, C., (1968), *J. Chim. Phys.*, **65**, 44-5.
- Li,M., Brooks,C.L., Kon,N., and Gu,W. (2004). A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol. Cell*, **13**, 879-886.

- Li,M., Brooks,C.L., Wu-Baer,F., Chen,D., Baer,R., and Gu,W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, **302**, 1972-1975.
- Li,Q., Feldman,R.A., Radhakrishnan,V.M., Carey,S., and Martinez,J.D. (2008). Hsf1 is required for the nuclear translocation of p53 tumor suppressor. *Neoplasia*, **10**, 1138-1145.
- Liang,P. and MacRae,T.H. (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, **110 (Pt 13)**, 1431-1440.
- Liberek,K., Marszalek,J., Ang,D., Georgopoulos,C., and Zylicz,M. (1991). Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 2874-2878.
- Lindquist,S. & Craig,E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631-677.
- Lorimer,G.H. (1996). A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo. *FASEB J.*, **10**, 5-9.
- Lottspeich,F. & Zorbas,H. (1999). *Bioanalytik I*. Spektrum Verlag.
- Lotz,G.P., Lin,H., Harst,A., & Obermann,W.M. (2003). Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *J. Biol. Chem.*, **278**, 17228-17235.
- Lucking,C.B. & Brice,A. (2000). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol. Life Sci.*, **57**, 1894-1908.
- Luo,J., Su,F., Chen,D., Shiloh,A., and Gu,W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, **408**, 377-381.
- Luo,Y., Batalao,A., Zhou,H., and Zhu,L. (1997). Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *Biotechniques*, **22**, 350-352.
- Maltzman,W. and Czyzyk,L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell Biol.*, **4**, 1689-1694.
- Marsh,J.A., Kalton,H.M., & Gaber,R.F. (1998). Cns1 is an essential protein associated with the hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin 40-dependent functions in cpr7Delta cells. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 7353-7359.
- Martin,J., Horwich,A.L., and Hartl,F.U. (1992). Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science*, **258**, 995-998.
- Martinez-Ruiz,A., Villanueva,L., Gonzalez,d.O., Lopez-Ferrer,D., Higuera,M.A., Tarin,C., Rodriguez-Crespo,I., Vazquez,J., and 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.
- Martinez-Yamout,M.A., Venkitakrishnan,R.P., Preece,N.E., Kroon,G., Wright,P.E., and Dyson,H.J. (2006). Localization of sites of interaction between p23 and Hsp90 in solution. *J. Biol. Chem.*, **281**, 14457-14464.
- Maruya,M., Sameshima,M., Nemoto,T., & Yahara,I. (1999). Monomer arrangement in HSP90 dimer as determined by decoration with N and C-terminal region specific antibodies. *J. Mol. Biol.*, **285**, 903-907.
- Mateu,M.G. and Fersht,A.R. (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, M.G. and Fersht, A.R. (1999). Mutually compensatory mutations during evolution of the tetramerization domain of tumor suppressor p53 lead to impaired hetero-oligomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 3595-3599.
- May, P. and May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, **18**, 7621-7636.
- Mayer, M.P. and Bukau, B. (1999). Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Curr. Biol.*, **9**, R322-R325.
- Mayhew, M., da Silva, A.C., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Hartl, F.U. (1996). Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature*, **379**, 420-426.
- 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.
- McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.*, **249**, 126-137.
- McKinney, K., Mattia, M., Gottifredi, V., and Prives, C. (2004). p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol. Cell*, **16**, 413-424.
- McLaughlin, S.H., Sobott, F., Yaol, Z.P., Zhang, W., Nielsen, P.R., Grossmann, J.G., Laue, E.D., Robinson, C.V., & Jackson, S.E. (2006). The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. *Journal of Molecular Biology*, **356**, 746-758.
- Meek, D.W. (2004). The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1049-1056
- Melchior, F. and Hengst, L. (2002). SUMO-1 and p53. *Cell Cycle*, **1**, 245-249.
- Merton-Zuckerman, B., (1980), *Nematodes as biological models*, page 2
- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W., & Pearl, L.H. (2003). Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol. Cell*, **11**, 647-658.
- Meyer, P., Prodromou, C., Liao, C., Hu, B., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Vlastic, I., Panaretou, B., Piper, P.W., & Pearl, L.H. (2004). Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J.*, **23**, 1402-1410.
- Milner, J., Medcalf, E.A., and Cook, A.C. (1991). Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 12-19.
- Minor, D.L., Jr. and Kim, P.S. (1994). Measurement of the beta-sheet-forming propensities of amino acids. *Nature*, **367**, 660-663.
- Moll, U.M., Ostermeyer, A.G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M., and Zambetti, G. (1996). Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1126-1137.
- Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (1994). The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, Ed: Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C., *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbour
- Morishima, Y., Kanelakis, K.C., Murphy, P.J., Lowe, E.R., Jenkins, G.J., Osawa, Y., Sunahara, R.K., & Pratt, W.B. (2003). The hsp90 cochaperone p23 is the limiting component of the multiprotein hsp90/hsp70-based chaperone system in vivo where it acts to stabilize the client protein: hsp90 complex. *J. Biol. Chem.*, **278**, 48754-48763.
- Mounier, N. and Arrigo, A.P. (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress. Chaperones.*, **7**, 167-176.

- Muller,L., Schaupp,A., Walerych,D., Wegele,H., and Buchner,J. (2004). Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48846-48854.
- Muller,P., Hrstka,R., Coomber,D., Lane,D.P., and Vojtesek,B. (2008). Chaperone-dependent stabilization and degradation of p53 mutants. *Oncogene*, **27**, 3371-3383.
- Muller-Tiemann,B.F., Halazonetis,T.D., and Elting,J.J. (1998). Identification of an additional negative regulatory region for p53 sequence-specific DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6079-6084.
- Mullis,K.B. and Faloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Murphy,P.J., Morishima,Y., Kovacs,J.J., Yao,T.P., and Pratt,W.B. (2005). Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J. Biol. Chem.*, **280**, 33792-33799.
- Nadeau,K., Das,A., & Walsh,C.T. (1993). Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1479-1487.
- Nagaich,A.K., Zhurkin,V.B., Durell,S.R., Jernigan,R.L., Appella,E., and Harrington,R.E. (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., and 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.
- Nakamoto,H. & Vigh,L. (2007). The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol. Life Sci.*, **64**, 294-306.
- Nathan,D.F. & Lindquist,S. (1995). Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 3917-3925.
- Nathan,D.F., Vos,M.H., & Lindquist,S. (1997). In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 12949-12956.
- Nathan,D.F., Vos,M.H., & Lindquist,S. (1999). Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 1409-1414.
- Neckers,L. (2006). Using natural product inhibitors to validate Hsp90 as a molecular target in cancer. *Curr. Top. Med. Chem.*, **6**, 1163-1171.
- Nichols,N.M. and Matthews,K.S. (2002). Human p53 phosphorylation mimic, S392E, increases nonspecific DNA affinity and thermal stability. *Biochemistry*, **41**, 170-178.
- Nikoshkov,A. and Hurd,Y.L. (2006). p53 splice variants generated by atypical mRNA processing confer complexity of p53 transcripts in the human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 383-386.
- Nimmanapalli,R., Fuino,L., Bali,P., Gasparetto,M., Glozak,M., Tao,J., Moscinski,L., Smith,C., Wu,J., Jove,R., Atadja,P., and Bhalla,K. (2003). Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells. *Cancer Res.*, **63**, 5126-5135.
- Obermann,W.M., Sondermann,H., Russo,A.A., Pavletich,N.P., & Hartl,F.U. (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.*, **143**, 901-910.

- Oda,K., Arakawa,H., Tanaka,T., Matsuda,K., Tanikawa,C., Mori,T., Nishimori,H., Tamai,K., Tokino,T., Nakamura,Y., and Taya,Y. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, **102**, 849-862.
- Okorokov,A.L., Sherman,M.B., Plisson,C., Grinkevich,V., Sigmundsson,K., Selivanova,G., Milner,J., and Orlova,E.V. (2006). The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *EMBO J.*, **25**, 5191-5200.
- Panaretou,B., Prodromou,C., Roe,S.M., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., & Pearl,L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.*, **17**, 4829-4836.
- Panaretou,B., Siligardi,G., Meyer,P., Maloney,A., Sullivan,J.K., Singh,S., Millson,S.H., Clarke,P.A., Naaby-Hansen,S., Stein,R., Cramer,R., Mollapour,M., Workman,P., Piper,P.W., Pearl,L.H., & Prodromou,C. (2002). Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol. Cell*, **10**, 1307-1318.
- Parsell,D.A., Kowal,A.S., Singer,M.A., & Lindquist,S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, **372**, 475-478.
- Parsell,D.A., Sanchez,Y., Stitzel,J.D., & Lindquist,S. (1991). Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature*, **353**, 270-273.
- 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.
- Perdew,G.H. & Whitelaw,M.L. (1991). Evidence that the 90-kDa heat shock protein (HSP90) exists in cytosol in heteromeric complexes containing HSP70 and three other proteins with Mr of 63,000, 56,000, and 50,000. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6708-6713.
- Picard,D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol. Life Sci.*, **59**, 1640-1648.
- Picard,D., Khursheed,B., Garabedian,M.J., Fortin,M.G., Lindquist,S., & Yamamoto,K.R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature*, **348**, 166-168.
- Pratt,W.B. & Toft,D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, **18**, 306-360.
- Prives,C. and Manley,J.L. (2001). Why is p53 acetylated? *Cell*, **107**, 815-818.
- Prodromou,C. and Pearl,L.H. (2003). Structure and functional relationships of Hsp90. *Curr. Cancer Drug Targets.*, **3**, 301-323.
- Prodromou,C., Panaretou,B., Chohan,S., Siligardi,G., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Roe,S.M., Piper,P.W., & Pearl,L.H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.*, **19**, 4383-4392.
- Prodromou,C., Roe,S.M., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., & Pearl,L.H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, **90**, 65-75.
- Prodromou,C., Siligardi,G., O'Brien,R., Woolfson,D.N., Regan,L., Panaretou,B., Ladbury,J.E., Piper,P.W., & Pearl,L.H. (1999). Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J.*, **18**, 754-762.
- Prusiner,S.B. (1996). Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 482-487.
- Queitsch,C., Sangster,T.A., and Lindquist,S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, **417**, 618-624.

- Rabindran,S.K., Giorgi,G., Clos,J., and Wu,C. (1991). Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 6906-6910.
- Rajagopalan,S., Jaulent,A.M., Wells,M., Veprintsev,D.B., and Fersht,A.R. (2008). 14-3-3 activation of DNA binding of p53 by enhancing its association into tetramers. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5983-5991.
- Richter,K., Meinschmidt,B., and Buchner,J. (2005). Hsp90: From dispensable heat shock protein to global player. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, New York, pp. 768-829.
- 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., and Buchner,J. (2001). Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33689-33696.
- Richter,K., Muschler,P., Hainzl,O., Reinstein,J., & Buchner,J. (2003). Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the atpase cycle. *J. Biol. Chem.*, **278**, 10328-10333.
- Richter,K., Soroka,J., Skalniak,L., Leskovar,A., Hessling,M., Reinstein,J., and Buchner,J. (2008). Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. *J. Biol. Chem.*, **283**, 17757-17765.
- Richter,K., Walter,S., & Buchner,J. (2004). The Co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of Hsp90 to the progression of the chaperone cycle. *J. Mol. Biol.*, **342**, 1403-1413.
- Rippin,T.M., Freund,S.M., Veprintsev,D.B., and Fersht,A.R. (2002). Recognition of DNA by p53 core domain and location of intermolecular contacts of cooperative binding. *J. Mol. Biol.*, **319**, 351-358.
- Rodriguez,M.S., Desterro,J.M., Lain,S., Midgley,C.A., Lane,D.P., and Hay,R.T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J.*, **18**, 6455-6461.
- Roe,S.M., Ali,M.M., Meyer,P., Vaughan,C.K., Panaretou,B., Piper,P.W., Prodromou,C., and Pearl,L.H. (2004). The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell*, **116**, 87-98.
- Roe,S.M., Prodromou,C., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., & Pearl,L.H. (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.*, **42**, 260-266.
- Rohaly,G., Chemnitz,J., Dehde,S., Nunez,A.M., Heukeshoven,J., Deppert,W., and Dornreiter,I. (2005). A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell*, **122**, 21-32.
- Ronnen,E.A., Kondagunta,G.V., Ishill,N., Sweeney,S.M., Deluca,J.K., Schwartz,L., Bacik,J., & Motzer,R.J. (2006). A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*, **24**, 543-546.
- Ross,P.D. and Minton,A.P. (1977). Analysis of non-ideal behavior in concentrated hemoglobin solutions. *J. Mol. Biol.*, **112**, 437-452.
- Rubin,R. (2008). Environmental and Nutritional Pathology, *Rubin's Pathology*, Philadelphia, pages: 278 ff
- Ruddock,L.W. and Klappa,P. (1999). Oxidative stress: Protein folding with a novel redox switch. *Curr. Biol.*, **9**, R400-R402.
- Rudiger,S., Freund,S.M., Veprintsev,D.B., Fersht,A.R. (2002). CRINEPT-TROSY NMR reveals p53 core domain bound in an unfolded form to the chaperone Hsp90. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99**, 11085-11090.

- Rutherford,S.L. and Lindquist,S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, **396**, 336-342.
- Sakaguchi,K., Sakamoto,H., Xie,D., Erickson,J.W., Lewis,M.S., Anderson,C.W., and Appella,E. (1997). Effect of phosphorylation on tetramerization of the tumor suppressor protein p53. *J. Protein Chem.*, **16**, 553-556.
- Sanchez,Y., Taulien,J., Borkovich,K.A., & Lindquist,S. (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.*, **11**, 2357-2364.
- Sato,S., Fujita,N., and Tsuruo,T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 10832-10837.
- Sauer,M., Bretz,A.C., Beinoraviciute-Kellner,R., Beitzinger,M., Burek,C., Rosenwald,A., Harms,G.S., and Stiewe,T. (2008). C-terminal diversity within the p53 family accounts for differences in DNA binding and transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1900-1912.
- Scharf,K.D., Siddique,M., and Vierling,E. (2001). The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress. Chaperones.*, **6**, 225-237.
- Scheibel,T., Neuhofer,S., Weikl,T., Mayr,C., Reinstein,J., Vogel,P.D., & Buchner,J. (1997b). ATP-binding properties of human Hsp90. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18608-18613.
- Scheibel,T., Siegmund,H.I., Jaenicke,R., Ganz,P., Lilie,H., & Buchner,J. (1999). The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 1297-1302.
- Scheufler,C., Brinker,A., Bourenkov,G., Pegoraro,S., Moroder,L., Bartunik,H., Hartl,F.U., & Moarefi,I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, **101**, 199-210.
- Schirmer,E.C., Glover,J.R., Singer,M.A., and Lindquist,S. (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 289-296.
- Schmid,F.X. (1989). Creighton,T.E. (Ed.), *Protein Structure: A Practical Approach*, . IRL Press, Oxford, New York,Tokyo, pp. 251-285.
- Schonbrunner,E.R., Mayer,S., Tropschug,M., Fischer,G., Takahashi,N., & Schmid,F.X. (1991). Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3630-3635.
- Schroder,H., Langer,T., Hartl,F.U., and Bukau,B. (1993). DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.*, **12**, 4137-4144.
- Schubert,U., Anton,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-774.
- Schulte,T.W., Blagosklonny,M.V., Ingui,C., & Neckers,L. (1995). Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24585-24588.
- Scroggins,B.T., and Neckers, L. (2007) *Expert Opin Drug Discovery* **2**, 1403-1414
- Scroggins,B.T., Robzyk,K., Wang,D., Marcu,M.G., Tsutsumi,S., Beebe,K., Cotter,R.J., Felts,S., Toft,D., Karnitz,L., Rosen,N., and Neckers,L. (2007). An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol. Cell*, **25**, 151-159.
- Sefton,B.M., Beemon,K., and Hunter,T. (1978). Comparison of the expression of the src gene of Rous sarcoma virus in vitro and in vivo. *J. Virol.*, **28**, 957-971.

- Sepehrnia,B., Paz,I.B., Dasgupta,G., and 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.
- Shaulian,E., Zauberman,A., Ginsberg,D., and Oren,M. (1992). Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 5581-5592.
- Shaulsky,G., Goldfinger,N., Ben Ze'ev,A., and 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.
- Shaw,P., Freeman,J., Bovey,R., and Iggo,R. (1996). Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene*, **12**, 921-930.
- Shmueli,A. and Oren,M. (2005). Life, death, and ubiquitin: taming the mule. *Cell*, **121**, 963-965.
- Shen,G. & Blagg,B.S. (2005). Radester, a novel inhibitor of the Hsp90 protein folding machinery. *Org. Lett.*, **7**, 2157-2160.
- Shiau,A.K., Harris,S.F., Southworth,D.R., & Agard,D.A. (2006). Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell*, **127**, 329-340.
- Shibata,N., Hirano,A., Yamamoto,T., Kato,Y., & Kobayashi,M. (2000). Superoxide dismutase-1 mutation-related neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral. Scler. Other Motor Neuron Disord.*, **1**, 143-161.
- Sikorski,R.S., Boguski,M.S., Goehl,M., & Hieter,P. (1990). A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell*, **60**, 307-317.
- Siligardi,G., Hu,B., Panaretou,B., Piper,P.W., Pearl,L.H., & Prodromou,C. (2004). Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. *J. Biol. Chem.*, **279**, 51989-51998.
- Siligardi,G., Panaretou,B., Meyer,P., Singh,S., Woolfson,D.N., Piper,P.W., Pearl,L.H., & Prodromou,C. (2002). Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J. Biol. Chem.*, **277**, 20151-20159.
- Sinclair,C., Borchers,C., Parker,C., Tomer,K., Charbonneau,H., & Rossie,S. (1999). The tetratricopeptide repeat domain and a C-terminal region control the activity of Ser/Thr protein phosphatase 5. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23666-23672.
- Smith,D.F., Sullivan,W.P., Marion,T.N., Zaitsev,K., Madden,B., McCormick,D.J., and Toft,D.O. (1993). Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 869-876.
- Soti,C., Racz,A., & Csermely,P. (2002). A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7066-7075.
- Soussi,T. (1997). [Tumor suppressor p53 gene: a potential target for cancer therapy?]. *Bull. Cancer*, **84**, 753-756.
- Southworth,D.R. and Agard,D.A. (2008). Species-dependent ensembles of conserved conformational States define the Hsp90 chaperone ATPase cycle. *Mol. Cell*, **32**, 631-640.
- Spence,J. & Georgopoulos,C. (1989). Purification and properties of the Escherichia coli heat shock protein, HtpG. *J. Biol. Chem.*, **264**, 4398-4403.

- Sreeramulu,S., Jonker,H.R., Langer,T., Richter,C., Lancaster,C.R., and Schwalbe,H. (2009). The Human Cdc37{middle dot}Hsp90 Complex Studied by Heteronuclear NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **284**, 3885-3896.
- Stafford, W.F. III. (1992) Boundary analysis in sedimentation transport experiments: A procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal. Biochem.* 203, 295 – 301
- Stahl,M., Retzlaff,M., Nassal,M., and Beck,J. (2007). Chaperone activation of the hepadnaviral reverse transcriptase for template RNA binding is established by the Hsp70 and stimulated by the Hsp90 system. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6124-6136.
- Stamler,J.S., Jaraki,O., Osborne,J., Simon,D.I., Keaney,J., Vita,J., Singel,D., Valeri,C.R., and Loscalzo,J. (1992). Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 7674-7677.
- Stamler,J.S., Lamas,S., and Fang,F.C. (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, **106**, 675-683.
- Stebbins,C.E., Russo,A.A., Schneider,C., Rosen,N., Hartl,F.U., & Pavletich,N.P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, **89**, 239-250.
- Steegenga,W.T., van der Eb,A.J., and Jochemsen,A.G. (1996). How phosphorylation regulates the activity of p53. *J. Mol. Biol.*, **263**, 103-113.
- Steinmeyer,K. and Deppert,W. (1988). DNA binding properties of murine p53. *Oncogene*, **3**, 501-507.
- Stepanova,L., Leng,X., Parker,S.B., & Harper,J.W. (1996). Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev.*, **10**, 1491-1502.
- Stephanou,A., Isenberg,D.A., Nakajima,K., & Latchman,D.S. (1999). Signal transducer and activator of transcription-1 and heat shock factor-1 interact and activate the transcription of the Hsp-70 and Hsp-90beta gene promoters. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1723-1728.
- Stirling, P.C., Bakhoun,S.F., Feigl,A.B., and Leroux,M.R. (2006). Convergent evolution of clamp-like binding sites in diverse chaperones. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 865-870.
- Sugito,K., Yamane,M., Hattori,H., Hayashi,Y., Tohna,I., Ueda,M., Tsuchida,N., and Ohtsuka,K. (1995). Interaction between hsp70 and hsp40, eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ, in human cells expressing mutant-type p53. *FEBS Lett.*, **358**, 161-164.
- Sullivan,W.P., Owen,B.A., & Toft,D.O. (2002). The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90. *J. Biol. Chem.*, **277**, 45942-45948.
- Sun,J., Xin,C., Eu,J.P., Stamler,J.S., and Meissner,G. (2001). Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 11158-11162.
- Szak,S.T., Mays,D., and Pietenpol,J.A. (2001). Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 3375-3386.
- Tafvizi,A., Huang,F., Leith,J.S., Fersht,A.R., Mirny,L.A., and van Oijen,A.M. (2008). Tumor suppressor p53 slides on DNA with low friction and high stability. *Biophys. J.*, **95**, L01-L03.
- Terasawa,K., Yoshimatsu,K., Iemura,S., Natsume,T., Tanaka,K., and Minami,Y. (2006). Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 3378-3389.
- Thompson,M.W. & Maurizi,M.R. (1994). Activity and specificity of Escherichia coli ClpAP protease in cleaving model peptide substrates. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18201-18208.

- Tidow,H., Melero,R., Mylonas,E., Freund,S.M., Grossmann,J.G., Carazo,J.M., Svergun,D.I., Valle,M., and Fersht,A.R. (2007). Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **104**, 12324-12329.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **76**, 4350-4354.
- Tsai,B. and Rapoport,T.A. (2002). Unfolded cholera toxin is transferred to the ER membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by Ero1. *J. Cell Biol.*, **159**, 207-216.
- Uehara,Y. (2003). Natural product origins of Hsp90 inhibitors. *Curr. Cancer Drug Targets.*, **3**, 325-330.
- Ungermann,C., Neupert,W., and Cyr,D.M. (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science*, **266**, 1250-1253.
- van der,S.A., Rommel,C., Dickson,B., & Hafen,E. (1997). The heat shock protein 83 (Hsp83) is required for Raf-mediated signalling in Drosophila. *EMBO J.*, **16**, 1961-1969.
- Van Montfort,R., Slingsby,C., and Vierling,E. (2001). Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv. Protein Chem.*, **59**, 105-156.
- Vaughan,C.K., Gohlke,U., Sobott,F., Good,V.M., Ali,M.M., Prodromou,C., Robinson,C.V., Saibil,H.R., & Pearl,L.H. (2006). Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. *Mol. Cell*, **23**, 697-707.
- Vaughan,C.K., Mollapour,M., Smith,J.R., Truman,A., Hu,B., Good,V.M., Panaretou,B., Neckers,L., Clarke,P.A., Workman,P., Piper,P.W., Prodromou,C., and Pearl,L.H. (2008). Hsp90-dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Mol. Cell*, **31**, 886-895.
- Vaziri,H., Dessain,S.K., Ng,E.E., Imai,S.I., Frye,R.A., Pandita,T.K., Guarente,L., and Weinberg,R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, **107**, 149-159.
- Vogelstein,B., Lane,D., and Levine,A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Wall,D., Zylicz,M., and Georgopoulos,C. (1994). The NH2-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5446-5451.
- Walker,K.K. and Levine,A.J. (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.
- Walter,S. & Buchner,J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **41**, 1098-1113.
- Walerych,D., Kudla,G., Gutkowska,M., Wawrzynow,B., Muller,L., King,F.W., Helwak,A., Boros,J., Zylicz,A., and Zylicz,M. (2004). Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48836-48845.
- Wandinger,S.K., Richter,K., and Buchner,J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, **283**, 18473-18477.
- Wandinger,S.K., Suhre,M.H., Wegele,H., & Buchner,J. (2006). The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J.*, **25**, 367-376.
- Wang,C. and Chen,J. (2003). Phosphorylation and hsp90 binding mediate heat shock stabilization of p53. *J. Biol. Chem.*, **278**, 2066-2071.
- Wang,P., Reed,M., Wang,Y., Mayr,G., Stenger,J.E., Anderson,M.E., Schwedes,J.F., and Tegtmeyer,P. (1994). p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 5182-5191.

- Wang,X., Christiani,D.C., Wiencke,J.K., Fischbein,M., Xu,X., Cheng,T.J., Mark,E., Wain,J.C., and Kelsey,K.T. (1995). Mutations in the p53 gene in lung cancer are associated with cigarette smoking and asbestos exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **4**, 543-548.
- Wang,X., Venable,J., LaPointe,P., Hutt,D.M., Koulov,A.V., Coppinger,J., Gurkan,C., Kellner,W., Matteson,J., Plutner,H., Riordan,J.R., Kelly,J.W., Yates,J.R., III, and Balch,W.E. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*, **127**, 803-815.
- Waters,E.R. and Vierling,E. (1999). Chloroplast small heat shock proteins: evidence for atypical evolution of an organelle-localized protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 14394-14399.
- Wayne,N. and Bolon,D.N. (2007). Dimerization of Hsp90 is required for in vivo function. Design and analysis of monomers and dimers. *J. Biol. Chem.*, **282**, 35386-35395.
- Weaver,A.J., Sullivan,W.P., Felts,S.J., Owen,B.A., & Toft,D.O. (2000). Crystal structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 co-chaperone. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23045-23052.
- Wegele,H., Haslbeck,M., Reinstein,J., & Buchner,J. (2003a). 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., Muschler,P., Bunck,M., Reinstein,J., & Buchner,J. (2003). Dissection of the contribution of individual domains to the ATPase mechanism of Hsp90. *J. Biol. Chem.*, **278**, 39303-39310.
- Wegele,H., Wandinger,S.K., Schmid,A.B., Reinstein,J., & Buchner,J. (2006). Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J. Mol. Biol.*, **356**, 802-811.
- Weikl,T., Muschler,P., Richter,K., Veit,T., Reinstein,J., & Buchner,J. (2000). C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. *J. Mol. Biol.*, **303**, 583-592.
- Weinberg,R.L., Vepintsev,D.B., and Fersht,A.R. (2004). Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J. Mol. Biol.*, **341**, 1145-1159.
- Welch,W.J. and Feramisco,J.R. (1982). Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, **257**, 14949-14959.
- Whitesell,L., Mimnaugh,E.G., De Costa,B., Myers,C.E., & Neckers,L.M. (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 8324-8328.
- Whitesell,L., Sutphin,P.D., Pulcini,E.J., Martinez,J.D., and Cook,P.H. (1998). The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 1517-1524.
- Wigley,D.B., Davies,G.J., Dodson,E.J., Maxwell,A., & Dodson,G. (1991). Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature*, **351**, 624-629.
- Wong,K.B., DeDecker,B.S., Freund,S.M., Proctor,M.R., Bycroft,M., and Fersht,A.R. (1999). Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 8438-8442.
- Woo,K.M., Kim,K.I., Goldberg,A.L., Ha,D.B., & Chung,C.H. (1992). The heat-shock protein ClpB in Escherichia coli is a protein-activated ATPase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20429-20434.
- Workman,P., Burrows,F., Neckers,L., & Rosen,N. (2007). Drugging the cancer chaperone HSP90: Combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*.

- Xirodimas,D.P., Saville,M.K., Bourdon,J.C., Hay,R.T., and Lane,D.P. (2004). Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*, **118**, 83-97.
- 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,Z., Horwich,A.L., & Sigler,P.B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*, **388**, 741-750.
- Young,J.C., Schneider,C., and Hartl,F.U. (1997). In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett.*, **418**, 139-143.
- Yu,X., Guo,Z.S., Marcu,M.G., Neckers,L., Nguyen,D.M., Chen,G.A., and Schrump,D.S. (2002). Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**, 504-513
- Yu,H., Chen,J.K., Feng,S., Dalgarno,D.C., Brauer,A.W., and Schreiber,S.L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*, **76**, 933-945.
- Yue,L., Karr,T.L., Nathan,D.F., Swift,H., Srinivasan,S., & Lindquist,S. (1999). Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in Drosophila spermatogenesis. *Genetics*, **151**, 1065-1079.
- Zaika,A., Marchenko,N., and Moll,U.M. (1999). Cytoplasmically "sequestered" wild type p53 protein is resistant to Mdm2-mediated degradation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 27474-27480.
- Ziemiecki,A., Catelli,M.G., Joab,I., & Moncharmont,B. (1986). Association of the heat shock protein hsp90 with steroid hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**, 1298-1307.
- Zolkiewski,M. (2006). A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol. Microbiol.*, **61**, 1094-1100.

Erklärung

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

München, Februar 2009

Die vorliegende Arbeit ist in einem Zeitraum von Dezember 2005 bis Februar 2009 entstanden. Ich möchte mich zuerst ganz herzlich bei Prof. Dr. Johannes Buchner für die Übernahme des Doktorvaters bedanken. In den vergangenen vier Jahren habe ich verstanden, was der Begriff „Doktorvater“ bedeutet, denn Prof. Buchner hat mich nicht nur wissenschaftlich betreut und mir die Möglichkeit zur Anfertigung einer Doktorarbeit gegeben, sondern die Betreuung ging weit über das Wissenschaftliche hinaus. Vielen Dank dafür.

Meinen Eltern ist diese Arbeit gewidmet, denn ohne ihren selbstlosen Beistand in meinen nun schon neun Jahren an der Universität, wäre mein Ziel immer noch in unerreichbarer Ferne. Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle bei euch bedanken, dass ihr immer der ruhende Pol wart, zu dem ich jeder Zeit kommen konnte. Mögen wir noch viele Abende an unserem üppig gedeckten Tisch verbringen.

Meinem Bruder Maik möchte ich sagen, dass ich mir keinen anderen Menschen als Bruder wünschen würde. Du kennst all meine Freuden, Sorgen und Nöte. Es ist eine tiefe Freundschaft, die uns verbindet und unsere gemeinsamen Urlaube sind die Abwechslung, die man während einer Doktorarbeit braucht.

Meinem Onkel Heinz, meiner Tante Marianne und meiner Cousine Nadine möchte ich ebenfalls dafür danken, dass ihr von Anfang an an mich geglaubt und mich unterstützt habt, auch wenn ich die Gesichtscrème immer noch nicht entwickelt habe.

Ein besonderer Dank richtet sich an meine Freundin Natascha, die mehr als jeder Mensch mit mir „aushalten“ musste, bis diese Doktorarbeit fertiggestellt war. Uns eint der Satz: „Zusammen sind wir mehr als die Summe unserer Teile“ und ich möchte dir hier sagen, dass ohne dich mein Leben nicht das wäre, was es ist. Ich freue mich auf unsere Zukunft.

All meinen Freunden an dieser Stelle zu danken würde einige Zeit dauern. Deswegen sein hier an alle das Wort gerichtet, die mich begleitet haben: Vielen Dank für all die Tage und Abende, in denen wir über unsere Forschung oder eben gerade nicht darüber gesprochen haben.